

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Bioquímica Médica - Programa de Biologia Estrutural
Tese de Doutorado

**Estudos estruturais de defensina de *Pisum sativum* (Psd1) e
sua interação com membrana: identificação de sítios de
interação e mecanismos envolvidos.**

Renata Angeli

Orientadores: Ana Paula Valente
Fábio C. L. Almeida

Dezembro, 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Renata Angeli

**Estudos estruturais de defensina de *Pisum sativum* (Psd1) e
sua interação com membrana: identificação de sítios de
interação e mecanismos envolvidos.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, para a obtenção do título de Doutora em Química Biológica

Orientadores: Ana Paula Valente

Fábio C. L. Almeida

Dezembro, 2010

Este trabalho foi realizado no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear de Macromoléculas Jiri Jonas, do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ, sob a orientação da professora Ana Paula Valente e co-orientação do professor Fábio C. L. de Almeida, com os auxílios cedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e BioImagem e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Ficha Catalográfica

Angeli, Renata

Estudos estruturais de defensina de *Pisum sativum* (Psd1) e sua interação com membrana: identificação de sítios de interação e mecanismos envolvidos/ Renata Angeli – Rio de Janeiro, UFRJ/CCS/IBqM, 2010

136p.

Tese (doutorado) Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientadora: Ana Paula Valente

1. Proteína, 2. Ressonância Magnética Nuclear, 3. Defensina, 4. Interação Proteína-Membrana.

I. Valente, A.P. (orientadora) II. Universidade Federal do Rio de Janeiro/ UFRJ. Instituto de Bioquímica Médica III. Título

Estudos estruturais de defensina de *Pisum sativum* (Psd1) e sua interação com membrana: identificação de sítios de interação e mecanismos envolvidos.

Renata Angeli

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Química Biológica.

Banca Examinadora:

Dr.^a. Yraima L. Cordeiro
Prof.^a. Adjunta da Faculdade de Farmácia, UFRJ

Dr.^a. Luzineide T. Wanderley
Prof.^a. Adjunta do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais, UFRJ

Dr.^a. Maria Lúcia Bianconi
Prof.^a. Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ

Dr.^a. Russolina B. Zingali
Prof.^a. Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ
(Revisora e Suplente Interna)

Dr.^a. Daniela S. Alviano
Prof.^a. Adjunta de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ
(Suplente Externa)

Dr.^a. Ana Paula C. Valente
Prof.^a. Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ
(Orientadora)

Dr. Fábio C. L. Almeida
Prof.^a. Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ
(Co-orientador)

Ainda pior que a convicção do não e a incerteza do talvez é a desilusão de um quase. É o quase que me incomoda, que me entristece, que me mata, trazendo tudo que poderia ter sido e não foi. Basta pensar nas oportunidades que escaparam pelos dedos, nas chances que se perderam por medo, nas idéias que nunca saíram do papel! O nada não ilumina, não aflinge nem acalma, apenas amplia o vazio que cada um traz dentro de si. Para as coisas que não podem ser mudadas resta-nos somente paciência, porém, preferir a derrota prévia à dúvida da vitória é desperdiçar a oportunidade de merecer. Pros erros há perdão; pros fracassos, chance; pros amores impossíveis, tempo. De nada adianta cercar um coração vazio ou economizar a alma! Por isso, não deixe que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você.

Sara Westephal Batista

Dedico esta tese aos meus pais: Renato e Lourdes, pelo amor e apoio incondicional sempre e a Nathalia pelo estímulo e pelo companherismo sempre, sem você eu não teria conseguido!

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Ana Paula Valente, obrigada por ter me aceitado e ter sido sempre tão disponível! Você me fez ficar muito à vontade num ambiente tão novo e difícil...! Obrigada por ter me ensinado tantas coisas de RMN, da teoria até a prática no aparelho, por inserir meu pensamento na biologia estrutural, pela torcida infinita e principalmente por ter confiado sempre em mim! Eu tenho o maior orgulho do que a gente construiu nesses quatros anos! E tenho certeza que você também tem! OBRIGADA!

Ao Prof. Fábio Almeida, obrigada por tudo! Mesmo tendo ficado 2 anos sem falar comigo (eu tinha que escrever isso) quando resolveu falar você salvou a minha vida! Você é um exemplo de pessoa, de orientador mas sobretudo de professor na essência mais pura da palavra! Obrigada pelo estímulo (pro Fábio sempre tudo vai dar certo), pela disponibilidade, generosidade, pelas cobranças (eu sou a Miss Skype, hahaha) e por tudo que você me ensinou. Palavras serão sempre poucas pra expressar toda a minha gratidão, então tentei fazer uma equação para tentar te mostrar, mas você sabe que a matemática não é o que eu mais domino né?!

Às Professoras Yraima Cordeiro, Luzineide Tinoco, Lúcia Bianconi e Daniela Alviano por aceitarem participar e compor a banca examinadora da minha defesa.

À professora Lina Zingali por ter realizado a revisão tão cuidadosa deste trabalho mas antes disso pela torcida sempre tão entusiasmada e por ficar feliz com todas as minhas conquistas! Você é sem dúvida a grande responsável pelo sucesso do intercâmbio Recife-Rio de Janeiro, sei que tem o maior orgulho do casadinho e espero não ter decepcionado a sua aposta! Obrigada pela preocupação, pelo cuidado, pela amizade, por todo o carinho sempre!

À professora Débora Foguel pelo apoio e amizade! A minha admiração por você é enorme, desde a primeira vez que te vi na SBBq em 2004 mostrando a semelhança da fibra amilóide com os arcos da LAPA até nos dias de hoje comandando as reuniões do nosso conselho deliberativo, o meu pensamento é o mesmo – como ela consegue ser tão genial?!

À Professora Eleonora Kurtenbach do Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica de Proteínas do Instituto de Biofísica pela colaboração e por ceder a Psd1! Agradeço ao Luciano Neves de Medeiros pela ajuda na purificação da proteína e especialmente ao Iuri Bastos Pereira (quem diria!!!) por toda a ajuda com tudo, pela paciência, pelas discussões científicas noturnas sempre regadas a coca zero, doces e muitas risadas! Você é o cara e eu sou sua fã! Ainda bem que a primeira impressão não é a que fica!

Às Professoras Ivete Pomarico e Liana Fernandes do Departamento de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ pela colobaração no projeto das salivas (cuspoma)! E especialmente a Tatiana Kelly, querida companheira de experimentos, uma guerreira, inteligente, doce e muito muito prestativa. Agora já não tenho mais tanto pavor de dentistas!

À Professora Eliana Barreto-Bergter por ter sido tão generosa cedendo o CMH todas as vezes que precisava! Na urgência das ideias dos experimentos sempre tinha pronto 1 mg pra me doar!

À secretaria de Pós Graduação, especialmente ao Professor Robson e a Tereza, por toda a ajuda com a minha dúvidas e prazos e pelo carinho que sempre fui tratada quando precisei de vocês.

A todos do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear! Foi muito bom passar esses 4 anos com vocês! Obrigada por tantas trocas! A gente trabalha mas a gente também se diverte muito! Catarina, minha queridona que morro de saudades sempre! Gisele e Cris queridas amigas que agora já não estão presente no dia a dia do lab. mas que foram fundamentais na minha chegada, pelo bom humor, por toda ajuda e amizade! Carolzinha (companheira de doutorado, compartilhamos todos os prazos e estresses né?! Sorte e sucesso pra você!). Obrigada ao Chico por tanta doação, por sempre resolver nossos problemas da wi-fi (eu não consigo viver sem net) e por ter sido sempre um querido comigo! Laurinha (minha professora de balé), Camila, Guilherme, Cosme, Luciana (pelos chocolates), Aline (bichinha arretada igual a mim), Natália Gomes (você dormiu bem Nath?!), Elen (minha companheira de analgésicos), Karen (pelas orações, rss), Debora (veiaaaaa!), Roseane (por toda a organização e capricho com a nossa burocracia). Agradeço a vocês o carinho e ajuda sempre que eu precisei! E

meu agradecimento SUPER ESPECIAL ao técnico do laboratório Fabrício por toda a ajuda (me ajuda com o clorofórmio?), torcida (*E. coli* não é a maioria na flora!), disponibilidade, carinho, pelo seu bom humor e por ser meu fã quando na verdade ele que é uma estrela do Rock!

À Carolina Cruzeiro por toda ajuda com TODOS os programas e códigos do lab.! Obrigada pela paciência e carinho! Compartilhamos todas as dúvidas, desesperos, prazos e tudo mais nesses quatro anos! Eu torço muito por você! Sorte e sucesso sempre!

À Fabiana Albernaz por tudo que você me ensinou quando cheguei no lab.! Das coisas básicas que mesmo básicas eram novas pra mim até todos os macetes pra tratar a SERCA (proteínazinha difícil!!!). Você tem todo o meu respeito e admiração! Obrigada por me deixar fazer parte do seu miolo!

À Viviane de Paula querida, pela ajuda, amizade, por ser minha companheira nos congressos, no dia a dia do lab., na hora do almoço, no lanche! Desejo toda felicidade do mundo para você e o pro Thiago, meu amigo para assuntos automobilísticos e imobiliários!

À Talita Santos querida amiga que desde do começo me fez sentir acolhida! Por tudo que compartilhamos nesse período! Dos estresses no lab. até os nossos momentos lúdicos! Rsss...

Ao Rodolpho Machado... Talvez você tenha sido o único que me entendeu completamente durante esses quatro anos e isso me ajudou tanto! Porque a gente sempre tinha um plano B! E apesar de tudo a gente se divertiu muito! Obrigada por tudo! Pelo cuidado, pelas comidas, pelos mimos, pelas músicas, por sempre dizer sim! Te amo!

Ao Anderson Pinheiro (agora PROFESSOR ANDERSON) que saudade de ter você na mesa ao lado todos os dias! Saudades do seu humor ácido, da sua risada gostosa, do seu abraço (muito) apertado, do seu ombro amigo! Obrigada pelo carinho e por toda a ajuda com o meu trabalho, com as minhas dúvidas! Tenho tanto orgulho de você!

Ao Guilherme Razzera por tudo nesses quatro anos (na verdade três anos e meio)! Obrigada pela preocupação, pela ajuda, por me escutar, pelos conselhos, pelas caronas! Foi tão bom e importante saber que eu podiar contar com você para qualquer coisa! Na verdade eu POSSO contar e isso será eterno mesmo que você não seja mais meu vizinho!

À Carolina Braga (AGORA PROFESSORA CAROLINA!!!!) e ao Leonardo Palmiere! Queridos amigos...obrigada por tudooooo! Nesse quatro anos dividimos tantas coisas e eu sei que vocês estarão comigo sempre! Que presente eu ganhei, palavras são poucas para expressar o meu amor pelos dois! Amo vocês!

Aos meus queridos amigos, Ricardo (adoro estar conectada com você), Carlos (cariño), Renan (saudades!), Dabinha (saudades!), Joana (querida sempre!), Yra e Flávio (melhores anfitriões do mundo!) vocês foram muito importantes durante esse doutorado, obrigada por tudo, pelos nossos momentos lúdicos. E a Priscila querida que tem um coração lindo, por todos os conselhos e os cuidados e agradeço também a toda família dela pelo carinho e tratamento VIP que sempre recebi nos nossos encontros!

Aos amigos do LTPV/LAPA por toda a disponibilidade! Obrigada por toda a ajuda, os empréstimos, os churrascos, as trocas! Sempre senti que fazia parte desse laboratório! Vocês são especiais pra mim! Moniquinha (professora Monica!), Fernando (professor Fernando), Mariana, Tuane queridos sempre! Obrigada aos Professores: Jerson Lima, André Gomes e Andrea Cheble pela convivência diária e amistosa! Rose, obrigada por sempre ter facilitado a minha vida, eu adoro vc!

Aos meus queridos amigos preteiros!!! Que grande surpresa o nosso encontro né?! E como esse encontro me faz feliz! Anderson (meu faztudo lindo, obrigada por tudo que você representa hoje para mim, love!), Rebeca (você me incentivou tanto, obrigada pelo orgulho, pelo carinho, amo ter vc e a sua amizade), Viviane (você é sensacional, obrigada por tanto carinho, te amo), Glaucio e Cris (queridos da minha vida), Sarinha (pelos conselhos, pelo carinho, pelo estímulo), Rezzito (meu gêmeo, obrigada por sempre me fazer rir, amoo!), queridos perigons (Kit, Juliana, Ronaldo, Paulo Vitor, Frederico, Pedro..., eu adorooco vocês), Nathalia (queridaaaa!), Itaiara, Calil, Joyce,

Tatinha, Glaucinha, Silvia, Cris, Babi (amores)! E a Preta querida, amada, idolatrada por me fazer tão bem, por se orgulhar de ter uma fã crânio (hahahaha) e por trazer tanta gente linda e tanta alegria à minha vida!

Aos meus amigos queridos e amados de sempre e para sempre Ana Paula e Jayme (compadres); Danilla e Túlio; Deborah e Marcelo; Renata e Bizu; Gabriella e Rodrigo pelo apoio, paciência, carinho. Enfim pela nossa amizade tão verdadeira que se manteve tão presente apesar de rotinas tão diferentes e da distância! Obrigada pelos meus amados “sobrinhos” americanos: Theo, Júlia e Isabela (mesmo tão distante eu já amo tanto vocês) e a minha afilhada linda Maria Júlia porque tudo ficou mais bonito depois que você chegou, a Dinda te ama!

À Tereza...é sempre tão bom saber que eu tenho você! E se eu cheguei até aqui, você tem tanta responsabilidade nisso! Mesmo distante fisicamente a sua presença foi constante! Não existiram dificuldades, conquistas, dúvidas (muitas né?!), medos, perdas, dramas (kkkk) ou ideias nesse quatros anos que você não estivesse presente, você é a primeira pessoa que eu penso em ligar pra contar qualquer coisa pessoal e profissional! Obrigada por me escutar, por se preocupar e por se doar tanto pra mim, eu sei que você estará sempre ali me dando o seu melhor!

À minha família que sempre me apoiou e que morrem de orgulho de mim!Minha vó Nair, querida sempre, meu avô Alfredo (*in memorian*), meus tios Lotar, Célia, Ranúzia, Adenaide e Suzi pela torcida infinita. Meus primos Débora e Ricardo, tão importantes na minha chegada aqui no Rio, pela acolhida e carinho! Ao meu tio Renato, que amo como se fosse um irmão e que me ensinou tantas coisas! Agora ele está aqui no Rio junto comigo e isso é muitooooo bom! Te desejo todo o sucesso do mundo nessa sua empreitada acadêmica!

À Nathalia, agradecimentos em palavras não são suficientes para demonstrar toda a minha gratidão por ter você na minha vida. Obrigada por tudo, por cada palavra, por cada gesto, por cada sorriso, por cada lágrima que você compartilhou comigo. Sem você não teria sido tão bom... Porque mesmo quando tudo parecia dar errado eu só precisava escutar você falando que tudo no final ia dar certo para continuar acreditando. Você é a

minha direção! Um agradecimento especial a Gleice Varejão por ter me ensinado a pensar sempre positivo!!!

Aos meus pais amados Lourdes e Renato! É muito difícil colocar em palavras toda a minha gratidão! A vocês eu devo tudo o que sou hoje! Obrigada por tanto amor, pelo apoio incondicional quando tomei a decisão de vir pro Rio, mesmo sabendo que isso significava um separação física! Obrigada novamente pelo apoio na minha decisão de ficar aqui! Eu amo MUITO vocês! E ainda que estejamos separados fisicamente, estaremos sempre juntos, porque tudo que faço é para vocês se orgulharem de mim. E ainda a GOL é a nossa parceira né?!Rsss! E ao meu irmão Raphael (*in memorian*)...ainda é muito esquisito e difícil viver sem você ao meu lado, mas eu sei que onde você estiver, hoje você será o mais orgulhoso e feliz por essa minha conquista. Não há um só dia que eu não pense em você!

Resumo

Psd1 é uma defensina de 46 aminoácidos de semente de ervilha (*Pisum sativum*) que possui uma estrutura globular compacta consistindo de uma α -hélice e uma β -folha antiparalela interligadas por quatro pontes dissulfeto intramoleculares, um motivo estrutural conhecido como $\alpha\beta$ estabilizado por cistina (1jzk). Defensinas antifúngicas atuam na membrana do patógeno, sendo um glicosíngolípido (CMH) seu primeiro alvo proposto. Um sítio específico de interação com o CMH foi mapeado por perturbação do deslocamento químico e mudanças nos parâmetros de relaxação. A região de ligação coincide com regiões de troca conformacional na escala de tempo de milissegundos e a variabilidade conformacional parece ser um importante fator para a ligação da proteína. O peptídeo correspondente ao loop da Psd1 que apresenta essa variabilidade conformacional (pepLoop1) foi sintetizado quimicamente (Genemed Synthesis Inc.) e determinamos sua estrutura em micelas de dodecilsulfocolina (DPC) e em DPC:CMH. O pepLoop1 foi assinalado através dos espectros de NOESY e TOCSY. A estrutura então foi calculada usando os NOEs obtidos do espectro de NOESY com um tempo de mistura de 150 ms. Os resíduos que participam da interação com o DPC são a Val13, Phe15 e Ala18 que são resíduos hidrofóbicos. A Asn17 provavelmente participa da ligação fazendo uma ponte de hidrogênio com o fosfato. Também foi observado o efeito da adição de CMH ao peptídeo. Já na estrutura do Peploop1 com DPC:CMH, o número de NOEs diminuiu drasticamente sugerindo que esse peptídeo tenha uma conformação mais estendida quando o CMH é adicionado como foi confirmado pelo cálculo da estrutura. Contudo existem NOEs entre a Phe15 e Thr16 com a ceramida e o açúcar do CMH mostrando a interação entre os dois. Baseados nos resultados do peptídeo correspondente ao loop1 da Psd1, nós decidimos analisar a estrutura da proteína inteira na presença de DPC e CMH para identificar se os resíduos que interagem entre o peptídeo e as membranas são os mesmos envolvidos na interação da Psd1 e ainda identificar outros resíduos na proteína que participam dessa interação, resíduos estes que são apresentados como essenciais para a atividade antifúngica das defensinas. O assinalamento da proteína foi feito através da comparação do HSCQ dela livre e com DPC:CMH. A maioria dos picos sofreu uma pequena alteração na presença de CMH, contudo os resíduos que formam o loop1 da proteína tiveram seu deslocamento químico bastante alterado como a Thr9, Tyr10, Arg11, Gly12, Val13, Cys14, Phe15 e Asn17 e ainda diminuíram de intensidade, outros resíduos que também tiveram o deslocamento químico alterado foram Cys35, His36 e Asn37, estes participam de outra região que é essencial para a função das defensinas (turn 3). Os aminoácidos Thr16, Trp38 e a Arg39 não são vistos no espectro de HSCQ da rPsd1 em DPC:CMH devido ao alargamento de seus sinais. No espectro de TOCSY e NOESY da rPsd1 em DPC:CMH não foi possível de visualizar todos os sistemas de spin da proteína, provavelmente essa supressão de sinal foi causada pela interação de alta afinidade da rPsd1 com o sistema DPC:CMH fazendo com que o sinal da proteína alargasse. Como esperado a proteína na presença de DPC:CMH apresentou os mesmos elementos de estrutura secundária da rPsd1 livre. Contudo os primeiros resíduos da hélice e ainda os resíduos pertencentes ao loop1 e a volta 3 não foram assinalados por causa do alargamento. Os dados mostram que essas regiões participam do processo de reconhecimento da proteína pelo glicosíngolípido mas com o desaparecimento dos sinais não foi possível identificar a presença de NOEs entre eles. O assinalamento da proteína não está completo devido à falta das ressonâncias desses aminoácidos e a estrutura não pode ser concluída.

Palavras-Chave: Defensina, PepLoop1, Ressonância Magnética Nuclear, DPC:CMH.

Abstract

Plant defensins are cysteine-rich cationic peptides, components of the innate immune system. 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. The antifungal sensitivity of certain exemplars was correlated to the level of complex glycosphingolipids (CMH) in the membrane of fungi strains. The interaction of Psd1 with CMH 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 (loop1 and turn 3) showed conformation exchange properties in the μs – ms timescale supporting the conformation selection as the binding mechanism. We synthesized a peptide corresponding to part of Loop1 (pepLoop1: Gly12 to Ser19) and did the structure in DPC micelles and DPC:CMH by NMR experiments. The pepLoop1 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. So we decided to do a structure of full protein in the presence of DPC:CMH to observe the NOEs in the same regions and in another proteins regions that showed conformation exchange properties in the μs – ms timescale like a turn 3. The 2D [1H, 1H]-TOCSY, 2D [1H, 1H]-NOESY, 3D 15N resolved [1H, 1H]-TOCSY and 3D 15N resolved [1H, 1H]-NOESY spectra were acquired and the sequential assignments of backbone and side chain hydrogen (H) resonances of the protein were obtained. But not obtained full resonance assignments for Psd1 in the DPC:CMH. Residues presents of the major binding epitope (loop1 and turn 3) were not assigned due the line broad and so this was not possible analyze the presence of NOEs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Indução e supressão da primária e secundária resposta imune em plantas por patógenos.....	04
Figura 2. Estrutura de defensinas de diferentes espécies.....	09
Figura 3. Alinhamento de nove defensinas de plantas.....	13
Figura 4. Estrutura de seis defensinas de plantas.....	15
Figura 5. Modelo tentativo da ação de Rs-AFP ₂ em <i>C. albicans</i>	20
Figura 6. Sistemas de <i>spins</i> esperados em um espectro de TOCSY para os hidrogênios dos 20 aminoácidos mais comuns.....	35
Figura 7. Segmento tripeptídico de uma proteína hipotética mostrando a estratégia de identificação dos NOEs sequenciais para assinalamento das ressonâncias de três sistemas de spin a partir do aminoácido i.....	40
Figura 8. Alinhamento de onze defensinas da família fabacea mostrando os resíduos conservados utilizando o programa ClustalW.....	41
Figura 9. Estrutura tridimensional da defensina de <i>Pisum sativum</i> (Psd1).....	43
Figura 10. Região da rPsd1 onde fica localizado o pepLoop1.....	51
Figura 11. Espectro de TOCSY com o assinalamento do CMH com base na estrutura publica por Duarte <i>et al.</i> , 1998.....	52
Figura 12: Espectro unidimensional do peploop1 em DPC e DPC:CMH	
Figura 13. Sobreposição das 15 estruturas de menor energia do pepLoop1 na presença de DPC (A) e com DPC:CMH (B).....	53
Figura 14. Sumário de NOEs do pepLoop1 em DPC (A) e em DPC:CMH (B).....	54
Figura 15. Espectro de NOESY na região onde existe NOE entre o HD1 da Phe15 hidrogênios 2 e 3 da ceramida do CMH).....	55
Figura 16. Sobreposição dos espectros de TOCSY (vermelho) e NOESY (preto) em DPC:CMH na região onde existe NOE entre o HB da Thr16 e os hidrogênios da parte glicídica do CMH.....	56
Figura 17. Diferenças de deslocamento químico observadas entre a ⁵ N rPsd1 livre (preto) e com DPC:CMH(vermelho).....	58
Figura 18. Espectro de TOCSY da ¹⁵ N rPsd1 com DPC:CMH.....	61

Figura 19. Espectro de NOESY da ^{15}N rPsd1 com DPC:CMH.....	62
Figura 20: Sobreposição dos espectros da ^{15}N rPsd1 livre (preto) e com DPC:CMH a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (vermelho) e $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ (verde).....	63
Figura 21. Diferenças de deslocamento químico entre os hidrogênios α da rPsd1 na presença de DPC:CMH em pH 5,5 e em estrutura randômica.....	64
Figura 22. Espectro de HSQC de Carbono da $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ rPsd1 em DPC:CMH.....	65
Figura 23. Painel de Disposição Energética (<i>Energy Landscape</i>) que define a amplitude e a escala de tempo dos movimentos nas proteínas.....	67
Figura 24. Representação do pepLoop1, dois monômeros de DPC e um de CMH.....	69
Figura 25. Estrutura da rPsd1 mostrando em azul os resíduos que não puderam ser assinalados e em vermelho aquele que tiveram seus deslocamento químicos perturbados na presença de DPC:CMH.....	71
Figura 26. Mecanismos de Reconhecimento Molecular Molecular em Proteínas.....	73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

Ah-AMP1 – Defensina de *Aesculus hippocastanum*

B₀ – Campo Magnético Externo

B₁ – Campo Magnético Aplicado

CMH – MonoHexosilCeramida

CS $\alpha\beta$ – Motivo estrutural $\alpha\beta$ estabilizado por Cistina

CSI – Índice de Deslocamento Químico

Ct-AMP1 – Defensina de *Clitori ternatea*

DPC – Dodecilfosfocolina

ET – Etileno

FID – *Free Induction Decay*

FT – *Fourier Transform*

HIV – Vírus da Imunodeficiencia Adquirida Humana

HNP – Peptídeo de Neutrófilo Humano

HR – Resposta Hipersensitiva

Hs-AFP2 – Defensina de *Heuchera sanguinea*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

JA – Jasmonato

Lc-def – Defensina de *Lens culinaris*

LPS – Lipopolissacarídeo

LTPs – Proteínas Transportadores de Lipídeos

MAMPs – Padrões Moleculares Associados ao Patógeno

MGD-1 – Defensina de *Mytilus galloprovincialis*

MHz – MegaHertz

μM – Micromolar
mM – Milimolar
 μs – Microssegundos
ms – Milissegundos
MtDEF2 – Defensina de *Medicago truncatula*
NaD1 – Defensina de *Nicotiana alata*
NOE – Efeito Nuclear Overhauser (NOE)
NOESY – *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
PAM – Peptídeos Antimicrobiano
Ph1 – Defensina de *Petunia hybrida*
PR – Proteínas Relacionadas com Patogênese
PRRs – Receptores de Reconhecimento Padrão
Psd1 – Defensina 1 de *Pisum sativum*
Psd2 – Defensina 2 de *Pisum sativum*
PvD1 – Defensina de *Phaseolus vulgaris*
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
ROIs – Intermediários Reativos de Oxigênio
RSA – Resistência Sistêmica Adquirida
Rs-AFP – Defensinas de Rabanete
RTD – Defensinas de Macaco Rhesus
SA – Ácido Salicílico
Sd5 – Defensina de *Saccharum L.*
SPE10 – Defensina de *Pachyrhizus erosus*
TAD1 – Defensina *Triticum aestivum*
Tfgd1 – Defensina de *Trigonella foenum-graecum*

TOCSY – *Total Correlated Spectroscopy*

TROSY – *Transversed Relaxation Optimized Spectroscopy*

TvD1 – Defensina de *Tephrosia villosa*

VrD1 – Defensina de *Vigna radiata*

VUDEF – Defensina de *Vigna unguiculata*

SÚMARIO

1. Introdução	01
1.1 Mecanismo de Defesa em Plantas.....	02
1.1.1 Peptídeos Antimicrobianos de Plantas.....	06
1.2 Defensinas.....	09
1.2.1 Defensinas de Plantas.....	12
1.2.2.1 Estrutura.....	14
1.2.2.2 Atividade Biológica.....	15
1.2.2.3 Relação entre estrutura e função.....	21
1.2.2.4 Contexto Biotecnológico.....	23
1.4 Defensinas de <i>Pisum sativum</i>	24
1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	25
1.3.1 Ressonância Magnética Nuclear na Caracterização Estrutural de Proteínas.....	25
1.3.2 Fundamentos.....	26
1.3.2.1 Energia e Frequência em RMN.....	27
1.3.2.2 Constante Magnetogírica.....	28
1.3.2.3 <i>Free Induction Decay</i>	30
1.3.2.4 Deslocamento Químico.....	30
1.3.2.5 Acoplamento <i>Spin-Spin</i>	31
1.3.2.6 Efeito Nuclear Overhauser (NOE).....	32
1.3.3 Experimentos Bidimensionais e Tridimensionais para a Determinação Estrutura de Proteínas.....	34
1.3.3.1 TOCSY (<i>Total Correlated Spectroscopy</i>).....	34
1.3.3.2 NOESY (<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>).....	36
1.3.3.3 HSQC (<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>).....	36
1.3.3.4 Experimentos Tridimensionais.....	37
1.3.4 Estratégia geral para a determinação de estruturas de proteínas....	38
1.3.4.1 Assinalamento sequencial das ressonâncias.....	39
2. Objetivos	43
3. Metodologia	44
3.1 Materias.....	44
3.2 Preparação do PepLoop1 em DPC e em DPC:CMH.....	44
3.3 Assinalamento do PepLoop1 em DPC e DPC:CMH.....	44
3.4 Cálculo da Estrutura do pepLoop1 em DPC e em DPC:CMH.....	45
3.5 Assinalamento da ¹⁵ N rPsd1 em DPC:CMH.....	46
3.6 Assinalamento da ¹⁵ N/ ¹³ C rPsd1 em DPC:CMH.....	46
4.Resultados	48
4.1 Resultados Parte I.....	48
4.1.1 Estrutura do pepLoop1 em DPC e em DPC:CMH.....	48

4.2 Resultados Parte II.....	58
4.2.1 Assinalamento da rPsd1 na presença de DPC:CMH.....	57
5. Discussão.....	67
6. Conclusão.....	76
7. Referências.....	78
8. Anexos.....	94
9. Currículo.....	136

1. Introdução

Todos os organismos vivos, de microrganismos até plantas e mamíferos, possuem mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos. O mais sofisticado desses mecanismos chamado de resposta imune adaptativa atua empregando anticorpos e células “killer” para reconhecer e eliminar moléculas invasoras, contudo esse tipo de resposta existe somente em vertebrados superiores. A imunidade inata, no entanto é uma forma primitiva de defesa contra infecção microbiana compartilhada por plantas, insetos e mamíferos. O sistema imune inato provê a primeira linha de defesa contra um grande espectro de microrganismos antes do desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Receptores de reconhecimento padrão, como os receptores tipo Toll em animais ou receptores com um domínio rico em leucina em plantas agem como iniciadores da resposta imune inata reconhecendo padrões moleculares associados à patógenos culminando na expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos (PAM) (Akira *et al.*, 2006). Estes peptídeos não possuem o reconhecimento específico entre antígeno e anticorpo como visto na resposta imune adaptativa, contudo devido à sua produção ser através de transcrição e tradução de um único gene, eles podem ser transportados relativamente rápido após a interação com uma entrada limitada de energia e biomassa (Thomma, 2002).

A produção de PAM tem sido descrita em todos os grupos de organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas e animais. Estes peptídeos possuem espectro de ação excepcionalmente amplo, incluindo atividade antifúngica, antibacteriana e/ou antiviral. Além de apresentarem baixa similaridade de sequência primária, os peptídeos antimicrobianos possuem uma grande diversidade de estrutura tridimensional. Entre

estas podemos citar: peptídeos cuja estrutura se limita a duas fitas- β estabilizadas por duas cisteínas: peptídeos lineares que formam α -hélices anfipáticas em ambientes hidrofóbicos: peptídeos cíclicos e pequenas proteínas (40 a 95 aminoácidos) com estrutura mais complexa estabilizada por três a oito cisteínas que inclui três fitas- β antiparalelas e algumas vezes uma α -hélice (Leher e Ganz, 2002; Almeida *et al.*, 2002).

Apesar desta baixa similaridade de sequência primária, normalmente estes peptídeos possuem um maior número de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos que frequentemente são cruciais para a sua atividade biológica. Diferentes evidências mostram que os PAM atuam primeiramente na membrana dos patógenos e a partir de então uma série de mudanças acontecem levando a desestabilidade e conseqüente morte do organismo (Aerts *et al.*, 2008). Entender o mecanismo de ação desses compostos antimicrobianos é importante na elaboração racional de novos medicamentos para fins terapêuticos visto que uma alta resistência de diversos organismos patógenos é encontrada aos antibióticos convencionais (Lay e Anderson, 2005).

1.1 Mecanismo de Defesa em Plantas

Há evidências da origem primitiva conservada do sistema imune inato de plantas, insetos e mamíferos. Contudo, diferente dos mamíferos que têm células móveis especializadas em defesa, cada célula da planta é responsável por sua própria defesa. Assim, cada célula integra sinais do meio externo para ativar respostas de defesa locais e sistêmicas.

As plantas têm desenvolvido dois sistemas integrados de resposta imune inata contra patógenos. A primeira linha de defesa é ativada através de receptores bem definidos, conhecidos como receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados ao patógeno (PMAPs). Após esse reconhecimento existe uma resposta primária como alteração na parede celular, deposição de calose e acumulação de proteínas relacionadas com a defesa como quitinase, gluconases e proteases (Figura 1A). PRRs reconhecem possivelmente um domínio particular na molécula de PMAPs que com frequência possui uma função enzimática ou estrutural que é crucial para o patógeno. Alguns PMAPs têm sido identificados, incluindo flagelinas, peptidoglicanos, lipolissacarídeos (LPS), fatores de alongamento Tu (EF-Tu) de bactérias Gram-negativas como também quitinas e glucanas derivada da parede celular de fungos e oomicetos (Cohn, 2001).

Vírus, bactérias e fungos desenvolveram mecanismos sofisticados para escapar ou suprimir o reconhecimento dos PMAPs e subsequentemente a indução da resposta imune primária. Plantas então têm desenvolvido resposta imune secundária que é ativada após o reconhecimento de moléculas do organismo invasor, chamadas de efetores ou de perturbações causadas por esses efetores ou produtos do gene de avirulência (Avr) (Figura 1B). Os efetores podem ser metaloproteases, proteases, proteínas ligadoras de quitina, inibidores de proteases, proteínas ricas em cisteínas (Chisholm *et al.*, 2006). As proteínas de resistência monitoram na planta esses efetores e ativam a segunda resposta imune que com frequência culmina numa resposta de defesa imediata e localizada chamada de resposta hipersensitiva (HR) que bloqueia um futuro crescimento do patógeno (Figura 1C). Alguns patógenos no entanto tem produzido uma nova geração de efetores que não são reconhecidos pelas proteínas de

resistência e estes conseguem infectar a planta. (Figura 1D). Proteínas de resistência podem se localizar fora ou dentro da célula vegetal e por isso são capazes de reconhecer os efetores intra e extracelular do patógeno. Elas são classificadas estruturalmente em cinco diferentes classes, todas contendo os domínios ricos em leucina (Jones e Dangl, 2006).

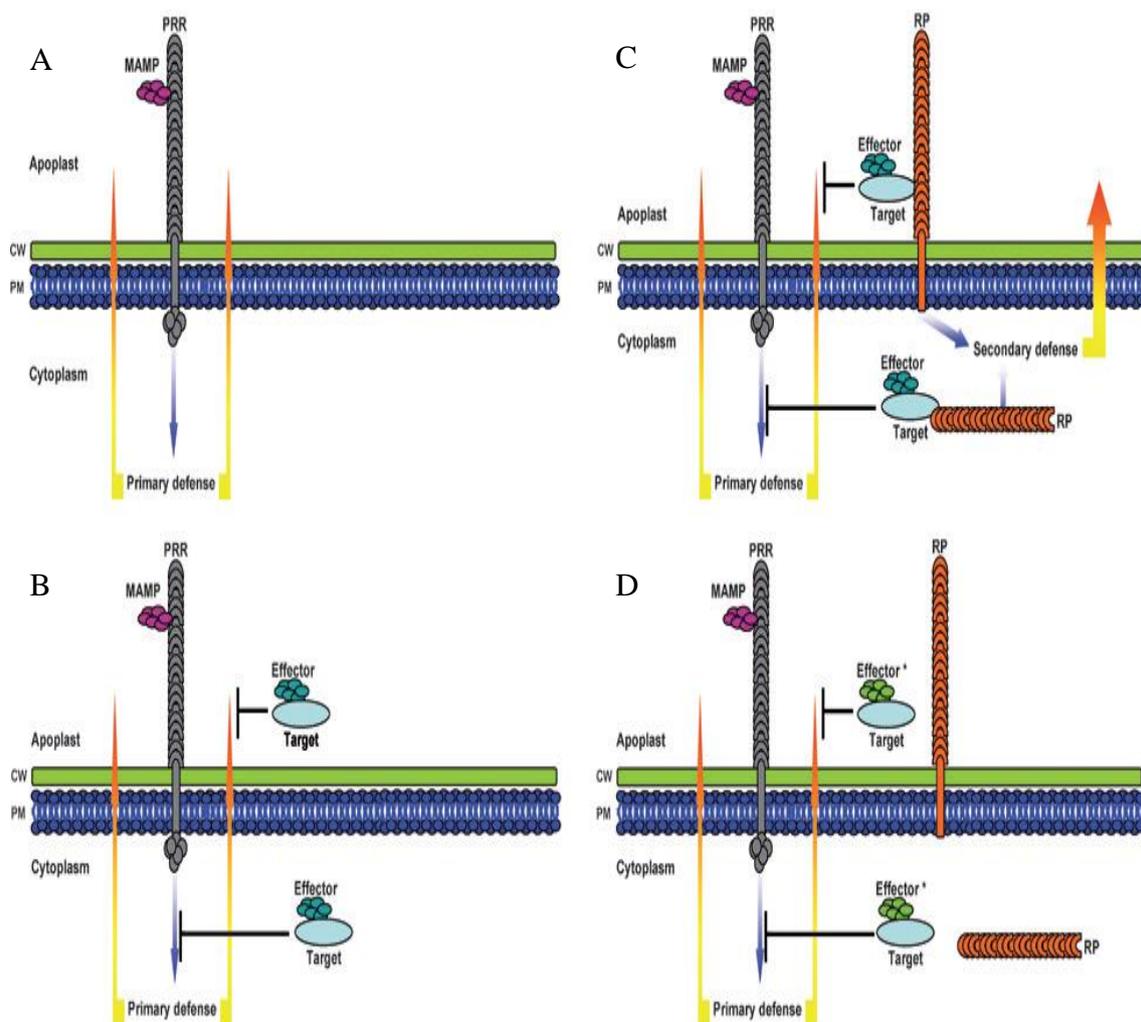


Figura 1: Indução e supressão da primária e secundária resposta imune em plantas por patógenos. A. A primeira linha de defesa é ativada através de receptores bem definidos conhecidos como receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que reconhecem padrões moleculares associados ao patógeno (PMAPs). B. Efetores que interagem com o hospedeiro suprimindo a resposta primária. C. Proteínas de resistência (RP) reconhecem esses efetores e ativam a segunda resposta imune. D. Efetores que não são reconhecidos pelas proteínas de resistência conseguem infectar a planta (Wit, 2007).

A resposta hipersensitiva é rápida, localizada no lugar da infecção e consiste na produção de substâncias tóxicas como os intermediários reativos de oxigênio (ROIs) e moléculas sinalizadoras: etileno (ET), jasmonato (JA) e ácido salicílico (SA). A produção de ROIs em plantas é similar ao estresse oxidativo descrito em mamíferos que emprega um sistema dependente de NADPH-oxidase e H_2O_2 e radicais superóxidos (O_2^-) e resultam num dano celular em ambos, planta e patógenos (Cohn, 2001). A sinalização dependente de SA está relacionada a resistência da planta e expressão de peptídeos antimicrobianos, plantas que são atingidas por patógenos acumulam níveis muito maiores de SA que aquelas não sofrerem ataque. A sinalização dependente de ET e JA induz a expressão de compostos antimicrobianos que não são induzidos por SA e estão envolvidos na resposta da planta à feridas mecânicas e causadas por herbívoros que incluem ativação de inibidores de protease (Dong, 1996). A resposta hipersensitiva é reponsável tanto pela morte do patógeno assim como pela morte do tecido vegetal nas mediações da infecção. Essa necrose localizada impede a propagação para outra regiões da planta sendo conceitualmente similar a apoptose em animais (Nurnberger, 2004). Os caminhos de defesa que são dependentes desses hormônios são ativos não só contra microorganismos mas também contra insetos. O nível e o efeito de ambas as respostas local e sistêmica e a dependência de hormônios é determinado pelo tipo do fitopatógeno. E ainda sim alguns patógenos passam por essas barreiras e conseguem infectar a planta (Figura 1d).

As plantas também são protegidas por um mecanismo chamado de resistência sistêmica adquirida (RSA) que confere resistência a diversos patógenos por vários meses após a infecção, ocorrendo simultaneamente com a primeira e a segunda resposta imune e essa resposta está intimamente relacionada com a produção do ácido salicílico.

A relação do SA na indução da defesa sistêmica adquirida tem sido demonstrada com experimentos em plantas transgênicas que expressam um gene de bactéria (*nahG*) que codifica a enzima salicilato hidrolase inativando o SA, essas plantas então não acumularam SA após a exposição a patógenos e foram mais suscetíveis a patógenos que causam doenças e patógenos que induzem resistência. Além disso, essas plantas falharam ao desenvolver a resistência adquirida indicando a dependência de ácido salicílico na indução da resposta sistêmica adquirida (Cohn 2001). RSA é caracterizada pela indução da expressão de genes que codificam proteínas tóxicas, proteínas relacionadas com patogênese (PR), inibidores de protease, hidrolases, proteases, e peptídeos antimicrobianos (Wit, 2007).

1.1.1 Peptídeos Antimicrobianos de Plantas

Os peptídeos antimicrobianos (PAM) são amplamente distribuídos na natureza, estando presentes desde plantas e insetos até vertebrados superiores. Eles são geralmente definidos como tendo entre 12 e 50 aminoácidos, hidrofóbicos, possuem carga positiva e apresentam uma ampla faixa de atividade biológica contra fungos, bactérias, vírus envelopados ou não e também como inibidores de enzimas digestivas como α -amilases e serino-proteases (Brown e Hancock, 2006).

Em plantas os PAM ocupam um importante papel na defesa, pois apresentam expressão constitutiva e também após a infecção. Critérios como atividade antimicrobiana “in vitro”; distribuição e concentração do peptídeo na planta (antes e depois da infecção); variações dos níveis de expressão do peptídeo de acordo com os

sintomas da infecção e a correlação entre a virulência e a resistência dos patógenos aos peptídeos são avaliados na classificação destes (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998).

Geralmente os peptídeos antimicrobianos de planta apresentam uma diversidade em suas estruturas primárias, contudo possuem estrutura tridimensional similar, são altamente básicos e contém um alto conteúdo de resíduos de cisteína conservadas que estão envolvidas em ligação dissulfeto intramolecular e fornecem a esses peptídeos estabilidade estrutural.

Evidências crescentes sugerem que peptídeos antimicrobianos atuem inicialmente na membrana plasmática dos microorganismos alvo, contudo o dano à membrana seria apenas o primeiro alvo desses peptídeos (Jelinek e Kolusheva, 2006, Lobo *et al.*, 2008). Conforme já foi dito, uma característica comum a todos os PAM é a sua carga positiva, muitos estudos demonstram que exista uma interação eletrostática com as cadeias negativas dos fosfolípidos presentes nas membranas dos microorganismos patógenos como fungos e bactérias (Papo e Shai, 2003). Essa interação, em geral, é perturbada pelo aumento da força iônica no meio, contudo além da interação eletrostática alguns estudos mostram alguns componentes específicos na parede celular ou na membrana dos patógenos também participam da ação destes componentes antimicrobianos (Marcos *et al.*, 2008). Membranas miméticas como micelas composta por uma mistura de fosfolípidos vem sendo usadas para o melhor entendimento da interação dos peptídeos com os patógenos, uma vez que o peptídeo pode sofrer alteração quando encontra a micela (Papo e Shai, 2003).

Baseado na identidade de sequência de aminoácidos e estrutural, distintas famílias de PAM têm sido identificadas. Entre elas estão tioninas, proteínas

transportadoras de lipídeos, peptídeos cíclicos, snakinas e defensinas (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998).

Tioninas apresentam geralmente de 45 a 47 aminoácidos, são anfipáticas e divididas em cinco tipos (I a V), com base na sua sequência primária. Contudo apesar dessa divergência na sequência elas apresentam uma estrutura tridimensional bastante similar e que lembra a letra grega γ . Essa estrutura é formada por duas α -hélices antiparalelas no braço maior e por fitas- β antiparalelas no braço menor, possuindo quatro pontes dissulfeto. Estudos mostram que a super expressão de tionina endógena em *Arabidopsis thaliana* aumenta a resistência dessa planta a *Fusarium oxysporum* e *Plasmodiophora brassicae* (Terras *et al.*, 1992).

Proteínas transportadores de lipídeos (LTPs) apresentam de 90 a 95 aminoácidos, foram classificados inicialmente, como proteínas envolvidas no transporte de lipídeos entre as organelas e recentemente tem sido implicados na defesa da planta. LTPs tem sido encontrado em vários tecidos de mono e dicotiledôneas. A estrutura terciária dessas proteínas é formada por quatro α -hélices conectadas por loops flexíveis com uma cavidade hidrofóbica que pode acomodar uma variedade de lipídeos. O possível papel antimicrobiano de LTPs tem sido observado em plantas transgênicas como *Arabidopsis* e tabaco que têm drasticamente os sintomas reduzidos após a infecção das folhas com *Pseudomonas syringae* devido a super expressão de LTP de cevada (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998).

Os peptídeos cíclicos ou ciclotídeos apresentam uma grande variedade atividade biológica destacando-se como poderosos agentes virais. Eles apresentam seis resíduos de cisteínas conservados que estão envolvidas em pontes dissulfeto formando um

motivo que conecta a folha- β conferindo sua estrutura cíclica que o torna muito resistente a proteólise e estável quimicamente. O primeiro ciclotídeo de plantas estruturalmente caracterizado foi o kalata B1, que possui 29 aminoácidos de *Oldenlandia affinis* uma planta tropical africana muito usada na medicina popular como um chá para facilitar e acelerar o parto em mulheres (Craik, 2001).

Ainda dentre as classes de PAM existe as snakinas que são peptídeos com 12 cisteínas formando seis pontes dissulfeto descobertos em batata. A St-SN1 possui 63 resíduos e é ativa contra fungo, bactéria gram-positiva e gram-negativa (Segura *et al.*, 1999). As defensinas, tema central e objeto de estudo desta tese será descrita no tópico a seguir.

1.2 Defensinas

O termo defensina deriva da palavra *defendo* que em latim significa repelir. Em 1985, Ganz *et al.* isolaram um grupo de peptídeos antimicrobianos de macrófagos e granulócitos de coelho (Lambert *et al.*, 1989). A larga família das defensinas inclui moléculas que conservam sua estrutura tridimensional e função sendo descritas em vertebrados, invertebrados e plantas (Figura 2).

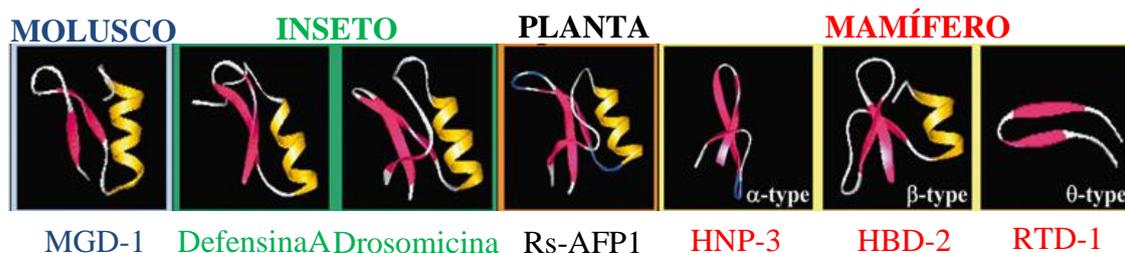


Figura 2: Estrutura de defensinas de diferentes espécies. MGD-1: Mexilhão; Defensina A e Drosomicina: Diferentes espécies de Mosca; Rs-AFP1: Rabanete; HNP-3 e HBD-2: Defensinas Humanas; RTD-1: Defensinas de Macaco (Thomma *et al.*, 2002).

As defensinas de mamíferos são classificadas em três subfamílias: α , β e θ -defensinas, que diferem na sua distribuição tecidual e no padrão de ligações dissulfeto entre os seis resíduos de cisteína conservados, elas possuem de 18 a 40 aminoácidos e apresentam atividade contra bactérias e fungos. Quatro α -defensinas foram identificadas em neutrófilos sendo denominadas de *Human Neutrophil Peptides* (HNP1, HNP2, HNP3 e HNP4) onde participam do sistema imune inato, outras duas α -defensinas HD5 e HD6 são expressas em células intestinais (células de paneth) e provavelmente contribuem para a defesa da mucosa do intestino grosso (Cunliffe, 2003). Embora os genes para 28 β -defensinas tenham sido identificados, apenas seis (HBD1, HBD2, HBD3, HBD4, HBD5 e HBD6) são expressas, principalmente em células epiteliais (Yang *et al.*, 2000). As defensinas de mamíferos α e β diferem no padrão das pontes dissulfetos formadas pelas seis cisteínas conservadas e são produtos de dois genes diferentes mas que tiveram um ancestral comum encontrado em nas snakinas de veneno de cobra. θ -defensinas são encontradas exclusivamente em leucócitos de macacos do velho mundo (RTD1, RTD2 e RTD3) e apresentam uma potente atividade antiviral, inclusive contra o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (Trabi *et al.*, 2001). θ -defensinas derivam de uma mutação no gene de uma α -defensina e apresentam uma estrutura cíclica que confere a essas moléculas alta estabilidade (Selsted e Ouelletl, 2005). Transcritos de RNA homólogos aos do gene θ -defensina rhesus (DEFT) são encontrados na medula óssea humana, contudo estes transcritos contém um códon de parada pré-maturo anteriormente à seqüência sinal, abolindo a sua subsequente tradução. A discussão sobre a relação entre a ausência da expressão dessa proteína em humanos e a evolução da AIDS foi levantada por Nguyen *et al.*, 2003.

Defensinas de aves são bem caracterizadas apresentando-se muito semelhantes as β -defensinas de mamíferos. Landon *et al.*, 2004 resolveu a estrutura de uma defensina de pinguim (AvBD103b) por ressonância magnética nuclear. Ela possui seis cisteínas envolvidas na formação de três pontes dissulfeto, e sua estrutura tridimensional é formada por duas β -fitas e uma α -hélice. Em peixes o estudo de defensinas ainda está num estágio inicial, por homologia de sequência algumas espécies apresentam β -defensinas putativas que estão sendo caracterizadas, contudo apenas a defensina putativa de *Oncorhynchus mykiss* mostrou ter atividade antiviral (Falco *et al.*, 2008).

As defensinas de insetos possuem em torno de 40 aminoácidos, apresentando um padrão de seis cisteínas envolvidas na formação de três pontes dissulfeto como podemos exemplificar a defensina A de *Sarcophaga bercea* onde uma α -hélice é combinada com duas β -fitas. Contudo foram identificadas defensinas de insetos com 8 cisteínas formando 4 pontes disulfeto como é o caso da drosomicina isolada de *Drosophila melanogaster* que apresenta a α -hélice combinada com três β -fitas. As defensinas de inseto apresentam atividade antifúngica e antibacteriana (Thomma *et al.*, 2002). Em moluscos como o mexilhão já foram identificadas defensinas com 6 cisteínas e três pontes dissulfeto na espécie *Mytilus edulis* (Charlet *et al.*, 1996) e também com oito cisteínas apresentando quatro pontes dissulfeto como a defensina MGD-1 de *Mytilus galloprovincialis* que teve sua estrutura resolvida (Yang *et al.*, 2000). Outras defensinas de moluscos têm sido caracterizadas e apresentam atividade antifúngica e antibacteriana (Roch *et al.*, 2008). Crustáceos e aracnídeos também apresentam defensinas com atividade antimicrobiana.

Tem sido postulado que todas as defensinas possuam um único precursor comum. Esta hipótese é baseada na homologia de sequência onde existe uma relação maior entre β -defensina de vertebrado e defensina de insetos que entre α e β -defensinas de vertebrados. Mygind *et al.* em 2005 identificaram a primeira defensina de fungo denominada de plectasina isolada de *Pseudoplectania nigrella*, que possui atividade antimicrobiana. A identificação desta proteína num organismo eucarioto inferior (unicelular) demonstra que existe uma larga distribuição das defensinas em diferentes reinos de eucariotos e sugere que existiu um ancestral genético comum antes das linhagens de fungos e insetos se dividirem, o que aconteceu a mais de 1 bilhão de anos atrás. Isso mostra que além da homologia estrutural das defensinas entre os diferentes reinos de eucariotos parece existir também uma homologia funcional entre elas (De Paula *et al.*, 2008; Carvalho e Gomes, 2009).

1.2.1 Defensinas de Plantas

Defensinas de plantas foram descritas pela primeira vez em sementes de trigo e cevada e primeiramente foram relacionadas com tioninas devido à similaridade na sequência de aminoácidos, massa molecular e no número de cisteínas. Contudo estudos posteriores na estrutura dessas proteínas de plantas mostraram a existência de algumas diferenças como, por exemplo, o padrão de pontes dissulfeto e então elas foram classificadas como uma classe de peptídeos antimicrobianos de plantas e foram denominadas de defensinas por serem funcionalmente e estruturalmente semelhante às defensinas de mamíferos e insetos (Thomma, 2002). Esses peptídeos são distribuídos em quase todas as espécies de plantas, integrando o sistema imune destas. Apesar de

apresentarem similaridade de estrutura secundária e terciária, as defensas de plantas não possuem similaridade significativa de sequência primária apresentando poucos resíduos conservados (Figura 3) (Almeida *et al.*, 2002).

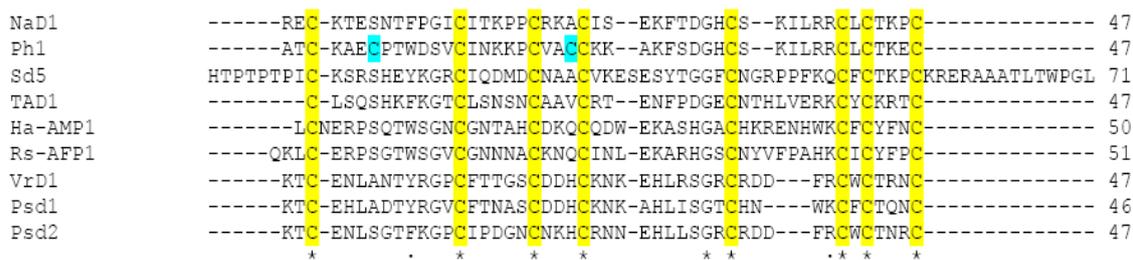


Figura 3: Alinhamento de nove defensas de plantas feito através do ClustalW. Oito são estão presentes em semente e a Ph1 é uma defensina floral. NaD1: *Nicotiana Alata*; Ph1: *Petunia Hybrida*; Sd5: ; TAD1: *Triticum aestivum*; Ah-AMP1: *Aesculus hippocastanum*; Rs-AFP1: *Rafanus sativum*; VrD1: *Vigna Radiata*; Psd1: *Pisum sativum*; Psd2: *Pisum sativum*.

Um grande número de defensas de plantas tem sido isoladas de sementes onde esses peptídeos são mais abundantes, mas também essa classe de peptídeos tem sido identificada em outros tecidos na planta, incluindo, talos, raízes, folhas, frutos e tecidos florais. E ainda a maioria das defensas de planta estão concentradas principalmente em células periféricas ou estômatos, o que fortalece a teoria do papel desta na proteção da planta contra patógenos (Stotz *et al.*, 2009).

Algumas classificações têm sido propostas para agrupar as defensas de plantas em diferentes grupos como, por exemplo, de acordo com sua função biológica, similaridade de sequência primária ou se gera modificações na morfologia do fungo para aquelas que tem atividade antifúngica porém essas classificações estão se tornando imprecisas. Contudo, existe uma classificação que divide as defensas de plantas em dois grandes grupos de acordo com a estrutura da proteína precursora predita pelos

clones de cDNA. O primeiro e grande grupo a proteína precursora possui um peptídeo sinal que direciona a molécula para o retículo endoplasmático e também o domínio defensina madura e no segundo grupo além do peptídeo sinal de endereçamento para o retículo, a proteína precursora possui um pro-domínio no domínio C-terminal que não possui uma função conhecida como é o caso de algumas defensinas de flores (Lay *et al.*, 2003).

1.2.2.1 Estrutura

Defensinas de plantas são peptídeos básicos com um ponto isoelétrico em torno de 8 a 9. Possuem de 45 a 70 aminoácidos, resultando numa pequena molécula com massa molecular entre 5 e 7 kDa. Existem oito resíduos de cisteínas conservadas em todas as defensinas de planta que estão envolvidas em quatro pontes dissulfeto responsáveis pela estabilização da estrutura tridimensional e essas pontes dissulfeto estão organizadas numa arquitetura $\beta\alpha\beta\beta$ (Almeida *et al.*, 2002).

Oito defensinas extraídas de sementes e duas de flores tiveram suas estruturas determinadas por RMN. Todas elas apresentaram um enovelamento global consistindo de uma α -hélice e uma β -folha antiparalela interligadas por quatro pontes dissulfeto intramoleculares, um motivo estrutural conhecido como $\alpha\beta$ estabilizado por cistina ($CS\alpha\beta$), como mostra a figura 4 (Villa-Perelló *et al.*, 2003). Esse motivo estrutural foi proposto por Kobayashi *et al.* em 1991, onde dois resíduos de cisteína localizados na α -hélice e separados por três aminoácidos (CXXXC) formam duas pontes dissulfeto com outras duas cisteínas separadas por um resíduo (CXC) localizadas na última β -fita. $CS\alpha\beta$ é encontrado também em outras proteínas envolvidas com atividade

antimicrobiana como podemos citar algumas neurotoxinas de escorpião (Jablonsky *et al.*, 2001). Adicionalmente a defensina floral PhD1 de *Petunia hybrida*, possui uma quinta ponte dissulfeto localizada entre a Cis57 e a Cis23, resultando numa estrutura mais compacta. Esta quinta ponte dissulfeto não afeta a orientação global da α -hélice em relação à fita- β quando comparada às outras defensinas com quatro pontes dissulfeto (Janssen *et al.*, 2003).

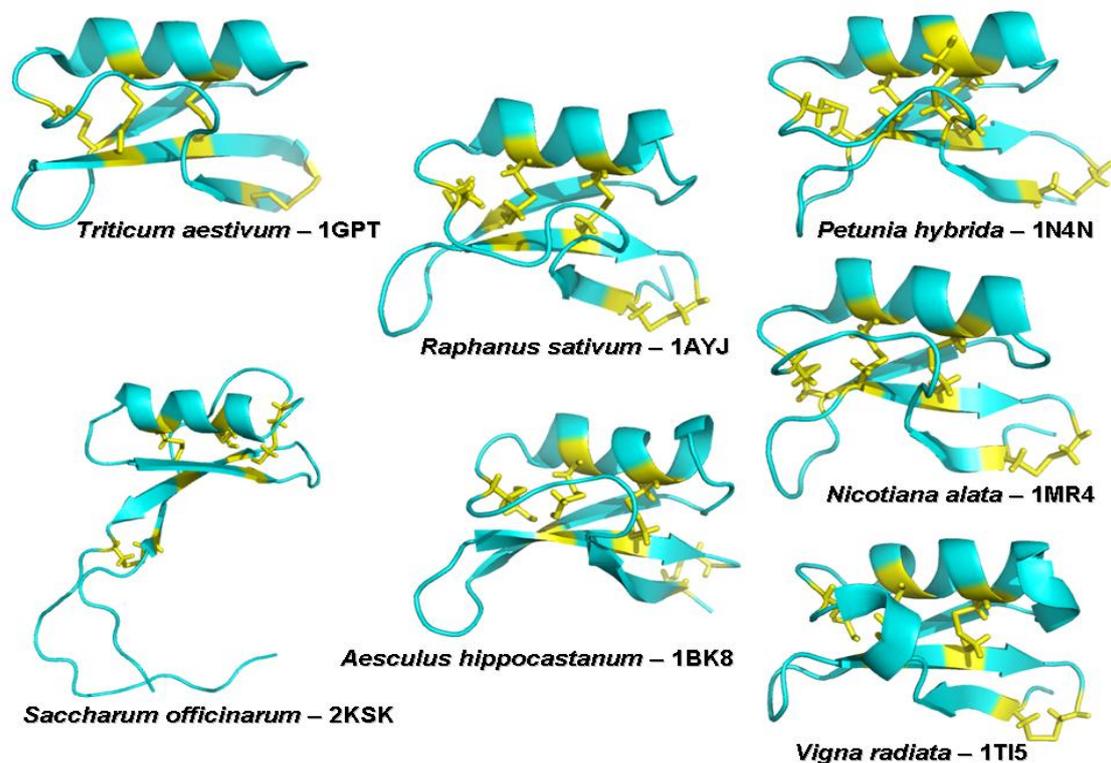


Figura 4: Estrutura de seis defensinas de plantas geradas através do programa PyMOL. As estruturas estavam depositadas no PDB.

1.2.2.2 Atividade Biológica

A descoberta da atividade antimicrobiana das defensinas de plantas foi reportado em meados em 1990 por Mendez *et al.* Esta atividade é principalmente evidenciada contra fungos, e também contra algumas bactérias principalmente aquelas Gran

positivas. Elas possuem ainda outras atividades biológicas, entre elas, inibidoras de enzimas como proteases e α -amilase de insetos; mediadoras de tolerância a zinco em plantas; bloqueadoras de canais iônicos (Carvalho e Gomes, 2009). Contudo a atividade antifúngica é a mais bem caracterizada e vai ser melhor descrita nesta tese.

Atividade Antifúngica

A incidência de infecções por fungos (micoses) em humanos tem aumentando consideravelmente, principalmente pelo aumento da ocorrência de pacientes imunodeprimidos e o aumento do uso de cateteres e implantes. *Candida albicans* e fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são os maiores agentes causadores de micoses e o único recurso clínico utilizado no combate a essas infecções é a terapia com antifúngicos. Os antimicóticos podem ser agrupados em 4 grupos: derivados de azol que inibem a 14α -lanosterol demetilase, enzima chave na biossíntese do ergosterol, componente essencial da membrana plasmática do fungo e que não ocorre em células de mamíferos; polienos que interagem com o ergosterol alterando a função da membrana; echinocadinas que inibe a β -1,3-glicana sintase e fluorinato de pirimidina que inibe a síntese de DNA e RNA (François *et al.*, 2005). Contudo uma grande resistência é encontrada a esses medicamentos principalmente pelo fungo *Candida albicans* e também por diferentes espécies de *Fusarium*.

Os primeiros experimentos que tentaram revelar o mecanismo de ação das defensinas contra fungos foram conduzidos por Thevissen *et al.* em 1996. Esses estudos iniciais verificaram a interação de duas defensinas Rs-AFP₂ e Dm-AMP₁ com o fungo *Neurospora crassa* gerando uma aumento no influxo de Ca^{+2} , efluxo de K^{+} , mudança no

potencial de membrana e concomitante alcalinização do meio de incubação. E como depois foi mostrado que o crescimento das hifas estava diretamente relacionado com o gradiente de Ca^{+2} (Silverman-Gavrila e Lew, 2002), pensou-se que a entrada de Ca^{+2} provocada pela interação com as defensinas poderia alterar este gradiente, resultando numa inibição do crescimento do fungo. Contudo outras drogas que inibem o crescimento de *N. crassa* como a carbendazima não altera esse fluxo de Ca^{+2} (Thevissen *et al.*, 1996). Thevissen *et al.* em 1999, usando uma sonda fluorescente (*Sytox green*) que penetra na célula quando a membrana está estruturalmente comprometida forma um complexo fluorescente com ácidos nucléicos, mostraram que em contato com a Dm-AMP₁ ocorre uma permeabilização da membrana pela formação deste complexo fluorescente, sugerindo que a inibição do crescimento do fungo está diretamente relacionado com essa desestruturação da membrana.

Dados experimentais indicam uma possível interação das defensinas de plantas com um receptor específico presente na membrana ou na parede celular do fungo. Esses sítios de interação das defensinas de plantas na membrana do fungo foram identificados como lipídeos complexos. As principais classes de lipídeos presentes em membranas biológicas de eucariotos são fosfoglicerolipídeos, glicoglicerolipídeos, esfingolípídeos e esteróis. Diferenças estruturais entre os lipídeos pertencentes aos fungos e as plantas fazem com que as defensinas sejam tóxicas apenas para as células dos fungos (Thevissen *et al.*, 2003).

O preciso modo de ação das defensinas de plantas não é totalmente elucidado e para a maioria das defensinas os componentes moleculares envolvidos na sinalização, na interação e na inibição permanecem desconhecidos. Para as defensinas Dm-AMP₁ e

Rs-AFP₂ parte das bases moleculares dessa inibição dos fungos *S. cerevisiae* e *Pichia pastoris* respectivamente foi revelada.

Para a defensina Dm-AMP₁ o sítio de interação com *S. cerevisiae* é um esfingolípídeo de membrana denominado manose-(inositol-fosfato)₂-ceramida (M(IP)₂C). O gene IPT1 codifica uma proteína chamada inositol fosfotranferase que está envolvido na biossíntese de M(IP)₂C e este gene determina não só a capacidade de ligação como também está envolvida na permeabilização e inibição do crescimento do fungo. Eliminação do IPT1 em leveduras faz com que estas não tenham M(IP)₂C incorporada em sua membrana e a Dm-AMP₁ praticamente não se liga a membrana destas leveduras mutantes, não causa permeabilização caracterizada pela incorporação do SYTOX green e não inibe o crescimento de *S. cerevisiae* (Thevissen *et al.*, 2000a). Contudo uma cepa mutante de *S. cerevisiae* sem o gene IPT1 crescendo em meio com poucos nutrientes apresentou a mesma sensibilidade à defensina que a cepa selvagem e esta cepa estava produzindo pequenas quantidades de M(IP)₂C por uma via biossintética alternativa, indicando que a resistência à Dm-AMP₁ é dependente da presença do esfingolípídeo.

Estudos usando ensaios de ELISA revelaram uma interação direta entre M(IP)₂C e a defensina. Essa interação facilita a inserção desta defensina na membrana, alterando a permeabilidade e finalmente inibindo o crescimento do fungo (Thevissen *et al.*, 2000b). Em estudos anteriores foi visto que existia uma competição pelo sítio de interação com o fungo entre a defensina Dm-AMP₁ e outras defensinas homólogas como a Ah-AMP₁ isolada de *Aesculus hippocastanum* e Ct-AMP₁ isolada de *Clitoria ternatea* sugerindo que essas defensinas possuam o mesmo sítio de interação e a levedura mutada sem o gene IPT1 também ficava mais resistente a estas defensinas.

Enquanto defensinas menos relacionadas a Dm-AMP₁ como Rs-AFP₂ e a defensina de *Heuchera sanguinea* (Hs-AFP₂) não existe essa competição pelo sítio de interação e não apresentam diferenças na atividade antifúngica (Thevissen *et al.*, 1996 e Thevissen *et al.*, 2000a).

O gene que determina a sensibilidade de *P. pastoris* e *C. albicans* à defensina Rs-AFP₂ foi identificado como GCS, esse gene codifica uma enzima (GlcCer sintase) que está envolvida na síntese de glicoensfingolípídeos como a monohexosilceramida (CMH) usada nos experimentos desta tese. *P. pastoris* e *C. albicans* mutantes que não possuem esse gene apresentam cerca de 20 vezes maior a resistência a esta defensina e essas leveduras mutantes ainda se apresentaram mais resistentes a heliomicima, uma defensina de inseto (Thomma *et al.*, 2002). Essa observação que ambas defensinas de plantas e insetos possuam um mesmo sítio de interação na membrana de fungo suporta a idéia de uma conservação evolutiva desses peptídeos no reino animal e vegetal.

O envolvimento de esfingolípídeos no processo de inibição do crescimento do fungo pelas defensinas de planta também foi demonstrado com o uso de mutantes do fungo filamentoso *N. crassa*. Esses mutantes foram mais resistentes a permeabilização de suas membranas e tiveram seus lipídeos analisados. O padrão de alguns principais lipídeos foram estruturalmente e quantitativamente diferentes entre as cepas mutantes a selvagem (Ferket *et al.*, 2003).

Foi recentemente descrito que Rs-AFP₂ induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *C. albicans*, não demonstrando essa produção em cepas mutantes desse fungo que não possuem o gene GSC sugerindo uma ligação entre a produção de ROS e a atividade antifúngica (Aerts *et al.*, 2008). Como a indução de ROS é característica de apoptose em fungos (Madco *et al.*, 1997) as defensinas poderiam

induzir essa morte celular, porém ainda é preciso uma maior investigação desse fenômeno.

Ainda é incerto se as defensinas de plantas são internalizadas para dentro das células fúngicas após a interação destas com esfingolípídeos ou se apenas essa interação modula os processos que vão levar o fungo a morte como por exemplo a produção de ROS (Figura 5). Esfingolípídeos de membrana de fungo são promissores alvos na elaboração de novos agentes antimicóticos porque eles são importantes fatores na patogenicidade de cepas de fungos, parecem ter um importante papel na transdução e regulação celular e os esfingolípídeos de fungo são estruturalmente diferentes daqueles encontrados na membrana plasmáticas de humanos.

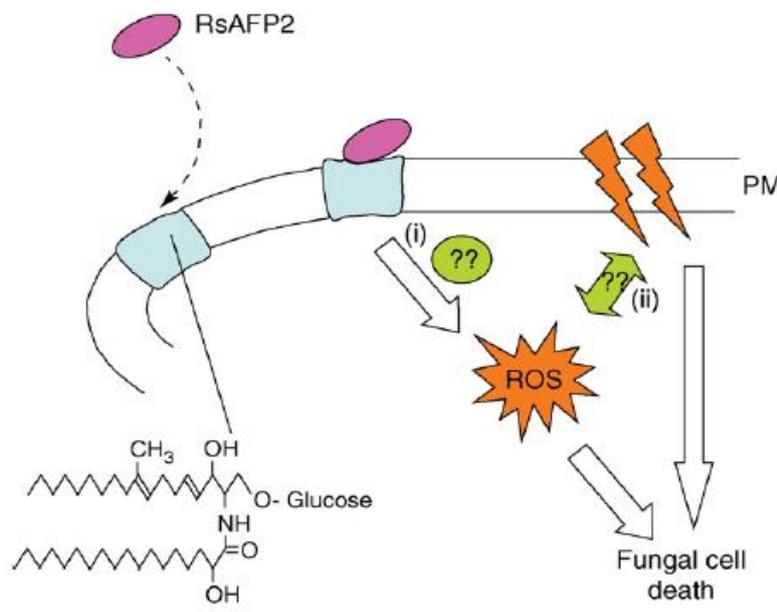


Figura 5: Modelo tentativo da ação de Rs-AFP₂ (defensina de rabanete) em *C. albicans*. A defensina representada por bolinhas rosas interage com glicosilceramidas (representados por quadrados azuis) na membrana plasmática do fungo. Após essa inicial interação, a membrana é permeabilizada (setas laranjas) levando a morte das células fúngicas. Ainda, Rs-AFP₂ induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) após a interação com glicosilceramidas (Thevissen *et al.*, 2007).

Não existem experimentos *in vivo* utilizando defensinas de plantas como antimicótico contudo uma variante da defensina de inseto heliomicina, EDT-151, apresentou uma maior atividade contra *Candida sp.* e *Aspergillus sp.* em camundongos infectados que os antimicóticos tradicionais, como o cetoconazol, fluconazol, intraconazol e AmB. Ainda a defensina EDT-151 apresentou baixa toxicidade quando administrada intravenosamente fazendo deste peptídeo um forte candidato para futuros ensaios clínicos (Andres e Dimarcq, 2004).

1.2.2.3 Relação entre estrutura e função

A diversidade de atividade biológica parece estar relacionada com a divergência na estrutura primária e essa diversidade na sequência de aminoácidos dificulta a identificação de um sítio de ligação com aminoácidos conservados durante a evolução e o entendimento do mecanismo de ação destas. Só os oito resíduos de cisteínas são conservados em todas as defensinas de plantas como mostrado na figura 5.

Algumas estratégias tem sido usadas para identificar um domínio ativo coma finalidade de criar agentes antimicrobianos. As defensinas de rabanete, Rs-AFP₁ e Rs-AFP₂ diferem em apenas dois aminoácidos. Glu5 e Asn27 em Rs-AFP₁ foi substituída por Gln e Arg em Rs-AFP₂. A carga da Rs-AFP₂ apresenta duas cargas positivas a mais e apresenta maior potência na atividade antifúngica que a Rs-AFP₁. Essa relação entre atividade antimicrobiana e carga positiva tem sido usada para revelar os aminoácidos importantes na interação (Terras *et al.*, 1992).

Estudos com mutantes de Rs-AFP₂ baseados em sequência de outras defensinas antifúngicas foram feitos para identificar possíveis aminoácidos envolvidos nessa atividade. Um sítio importante para a atividade biológica ocorre na volta que conecta a

fita- β_2 e a fita- β_2 entre os aminoácidos Tyr38, Phe40, Pro41, Ala42, Lys44 e Ile46. Com exceção da prolina e da lisina todos os outros aminoácidos são hidrofóbicos. Inserção de um aminoácido de carga positiva na posição 39 resulta num mutante que tem uma alta atividade antifúngica comparada com a defensina selvagem e a substituição de uma lisina por uma glutamina diminui a atividade. Um outro sítio indicado por esse estudo ocorre dentro do loop que conecta a fita- β_1 e a α -hélice como também os resíduos contínuos entra a hélice e a fita- β_3 (Thr10, Ser12, Leu28 e Phe49). Ainda quando num mutante a Val39 foi trocada por um resíduo de carga positiva como uma arginina resultou num aumento da atividade antifúngica. Contudo nem todas as inserções de resíduos positivos aumentou a atividade antifúngica mostrando a existência de um lugar característico da interação (De Samblanx *et al.*, 1997). Um outro estudo com um mutante da defensina MsDEF1 revelou que a Arg38 localizada no loop entre a fita- β_2 e a fita- β_3 é essencial para a atividade antimicrobiana pois a troca deste resíduo pela glutamina fez esta defensina perder a sua atividade antifúngica (Kushmerick *et al.*, 1998).

Em 2000, Sharper *et al.* sintetizaram um peptídeo de 19 resíduos correspondente ao loop entre a fita- β_2 e a fita- β_3 da defensina de rabanete (Rs-AFP₂) com três cisteínas (MBG 01) e um outro onde as cisteínas foram retiradas (MBG 02). Os dois peptídeos surpreendentemente mantiveram suas atividades. Outro peptídeo de seis resíduos (13 ao 19) baseado na tionina de *Pyricularia pubera* também permanece com a atividade antibacteriana similar a proteína nativa (Vila-Perelló *et al.*, 2005 e Vila-Perelló *et al.*, 2006).

Resultados similares foram observados para as β defensinas humanas, onde a perda das cisteínas não interferiram na atividade antibacteriana (Wu *et al.*, 2003).

1.2.2.4 Contexto Biotecnológico

Durante a última década a antiga idéia do uso de PAM tem sido revisitada. PAMs apresentam algumas atividades que tem atraído a atenção dos pesquisadores. Entre elas incluem: um largo espectro de ação contra microorganismos como vírus, bactérias (Gram + e Gram -) e fungos e também contra protozoários; atividades em baixas doses; sinergismo com outros agentes terapêuticos; habilidade em inativar endotoxinas; improvável desenvolvimento de resistência; geralmente apresentam baixa toxicidade em células de mamíferos e alguns PAMs são hábeis em modular a resposta imune em mamíferos, criando novas possibilidades terapêuticas (Giulliani *et al.*, 2007).

As atividades biológicas características das defensinas de plantas fazem destas proteínas moléculas atrativas para o uso em biotecnologia. Entre estas atividades estão antimicrobiana, inseticida e antiparasitária fazendo desses peptídeos candidatos para o seu uso em engenharia de proteínas e na criação de plantas transgênicas que sejam importantes agronomicamente pois plantas que expressam essas peptídeos antimicrobianos em grande quantidades ficariam mais resistentes a patógenos e pestes. Adicionalmente, defensinas podem trabalhar junto com outros compostos antimicrobianos conferindo ou aumentando a resistência a patógenos. A hipótese de que as defensinas participam no processo de defesa dos vegetais superiores é reforçada pelo fato de que plantas transformadas com genes que expressam defensinas constitutivamente em quantidades muito maiores que o normal apresentam maior resistência à infecção por fungos em relação às plantas não transformadas.

Terras *et al.* em 1995 verificou que a resistência do tabaco ao patógeno *Alternaria longipes* aumentou quando esta planta foi transformada com um gene da defensina Rs-AFP₂. O aumento da resistência da batata (*Solanum tuberosum*) ao fungo

Verticillium dahliae a partir da superexpressão da defensina de alfAFP, isolada de *Medicago sativa* (alfafa) (Gao *et al.*, 2000). Arroz transgênico que expressa constitutivamente a defensina de *Wasabia japonica* e tb Rs-AFP₂ tem maior resistência ao fungo *Megnaporth grisea* que aquele não transformado (Kanzaki *et al.*, 2002). Ainda, *Carica papaya* expressando a defensina Dm-AMP₁ se torna mais resistente ao patógeno *Phytophthora palmivora* (Zhu *et al.*, 2007).

1.4 Defensinas de *Pisum sativum*

A família Fabaceae (leguminosas) apresentam mais de 15 defensinas descritas de diferentes espécies. A maioria destas possuem atividade anti-fúngica. As defensinas dessa família apresentam resíduos bem conservados principalmente na região do loop1 como a Phe15 e Thr16 (Figura 8).

Psd1	KTCEHLADTYRGVCFETNAS	DDHC	KNKAHLISGTCHN	---	WKC	FCTQNC	46		
Tfgd1	ATCENLADTFRGPCFGNSN	CFHCK	TKEHLLSGRCRDD	--	FRC	WCTKRC	47		
MtDEF2	KTCENLADKYRGPCF	--SG	CDTHCTTKENAVSGRCRDD	--	FRC	WCTKRC	45		
Lc-def	KTCENLSDSFKGPCI	FDGN	CNKHC	KEKEHLLSGRCRDD	--	FRC	WCTRNC	47	
Psd2	KTCENLSGTFKGPCI	FDGN	CNKHC	RNEHLLSGRCRDD	--	FRC	WCTNRC	47	
VrD1	KTCENLANTYRGPCFT	TGSC	DDHC	KNKEHLRSGRCRDD	--	FRC	WCTRNC	47	
VUDEF	KTCENLADTYRGPCFT	TGSC	DDHC	KNKEHLLSGRCRDD	--	VRC	WCTRNC	47	
PvD1	KTCENLADTYKGPCFT	TGSC	DDHC	KNKEHLRSGRCRDD	--	FRC	WCTKNC	47	
TvD1	KTCENLADTYRGPCFT	TGSC	DDHC	KNKEHLLSGRCRDD	--	FRC	WCTKRC	47	
SPE10	KTCENLADTFRGPCFT	DGSC	DDHC	KNKEHLIKGRCRDD	--	FRC	WCTRNC	47	
Ct-AMP1	NLCERASLTWTGNC	GN	TGH	CDTQC	RNWESAKHGACH	KRGNWKC	FCYFNC	49	
	**.	:	..	*	*	.	*:	:*	
					*	*	..	:	*:*
								*	

Figura 8: Alinhamento de onze defensinas da família fabacea mostrando os resíduos conservados utilizando o programa ClustalW. Tfgd1: *Trigonella foenum-graecum*; MtDEF2: *Medicago truncatula*; Lc-def: *Lens culinaris*; Psd1: *Pisum sativum*; Psd2: *Pisum sativum*; VrD1: *Vigna Radiata*; VUDEF: *Vigna unguiculata*; PvD1: *Phaseolus vulgaris*; TvD1: *Tephrosia villosa*; SPE10: *Pachyrhizus erosus*; Ct-AMP1: *Clitori ternatea*.

Duas defensinas foram isoladas de sementes de ervilha (*Pisum sativum*) denominadas Psd1 e Psd2, com 46 e 47 aminoácidos, respectivamente. Apesar da identidade da sequência primária ser relativamente baixa entre elas (45 %), essas proteínas possuem algumas características comuns como: baixo peso molecular; ponto isoelétrico levemente básico, oito resíduos de cisteínas conservados, envolvidos em pontes dissulfeto e oito resíduos hidrofóbicos, homólogos ou idênticos, conservados ao longo da sequência, sendo que a Psd1 possui um total de onze resíduos hidrofóbicos e a Psd2 possui nove. Elas apresentam atividade antifúngica, mas não contra bactérias.

As duas defensinas estão localizadas nos feixes vasculares e na epiderme da vagem da ervilha que são tecidos periféricos e possuem atividade antifúngica contra *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus Versicolor*, and *Fusarium solani* mas não contra *Saccharomyces cerevisiae* e essa atividade é modulada pela presença de cátions. A expressão da Psd1 é constitutiva enquanto que a expressão da Psd2 é induzida em resposta à infecção com fungo (Almeida *et al.*, 2000).

Almeida *et al.* em 2001 clonaram a Psd1 através da obtenção do cDNA através de RT-PCR a partir de preparações de RNA total de vários tecidos da planta e a sua expressão heteróloga foi em *Pichia pastoris* onde os autores conseguem uma grande quantidade de Psd1 recombinante (rPsd1) (Cabral *et al.*, 2003). Espectros bidimensionais de RMN (NOESY) mostram que as duas proteínas são bem enoveladas e que as oito cisteínas tanto na proteína nativa como na recombinante participam da formação de quatro pontes dissulfeto organizadas numa arquitetura $\beta\alpha\beta\beta$. A atividade antifúngica da rPsd1 também foi a mesma que a proteína nativa. A Psd1 teve então sua estrutura tridimensional resolvida em 2002 (Almeida *et al.*, 2002). Esta defensina possui

estrutura globular compacta que inclui uma α -hélice entre os resíduos Asn17 e Leu27 e uma folha- β anti-paralela composta de três fitas- β (Thr2-Leu6, Ser32-His36 e Lys39-Asn45) conectados por dois loops (Ala 7-Thr16 e Ala28-Ile31). Ainda a Psd1 possui o padrão de pontes dissulfeto (Cys3-Cys46, Cys14-Cys35, Cys20-Cys40, Cys24-Cys42) conhecido como CS α β típico para proteínas de defesa como já foi dito (Figura 9).

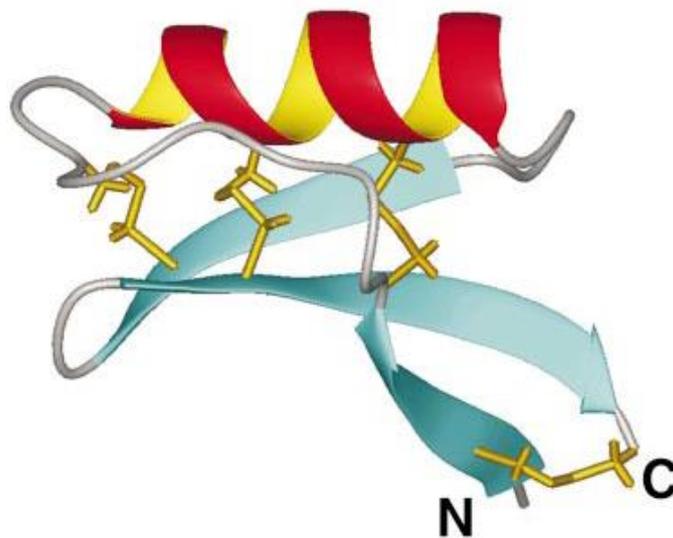


Figura 9: Estrutura tridimensional da defensina de *Pisum sativum* (Psd1) (Almeida *et al.*, 2002).

Recentemente foi demonstrado que a rPsd1 é internalizada e interage com a ciclina F de *Neurospora crassa*, uma proteína relacionada com o ciclo celular. Experimentos mostraram que a Psd1 está colocalizada no núcleo afetando a progressão do ciclo celular. Estes resultados demonstram que existe um alvo intracelular na planta para a Psd1 que demonstram que além do dano à membrana plasmática visto para as outras defensinas esta defensina tem um alvo intracelular (Lobo *et al.*, 2007).

Contudo, como a Psd1 e outras defensinas vencem a sua primeira barreira, a membrana ainda não está totalmente esclarecido, principalmente a nível molecular.

Finalmente, defensinas de plantas são produtos naturais criados e fortalecidos através da evolução para lidar com as ameaças à sobrevivências das plantas. A habilidade desta na proteção da planta tem sido bastante estudada e sua utilização apresenta novas oportunidades para um melhoramento da colheita e em novas estratégias biomédicas que podem gerar um grande impacto na economia e saúde na sociedade.

Estudar a estrutura tridimensional é um primeiro passo para tentar entender o mecanismo de ação dessas proteínas pois o tipo de enovelamento e os elementos de estrutura secundária nos dão informações sobre algumas características da molécula e a ressonância magnética nuclear é uma ferramenta importante nesse estudo porque através desta técnica podemos visualizar a estrutura e também mapear os resíduos que participam de interações e que são fundamentais para a sua função biológica.

1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

1.3.1 Ressonância Magnética Nuclear na Caracterização Estrutural de Proteínas

Até o presente momento, as duas técnicas capazes de fornecer uma descrição completa da estrutura de proteínas ao nível atômico são a cristalografia e difração de raios-X e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Ao contrário da cristalografia e difração de raios-X, que necessita da obtenção de cristais, as medidas de RMN são feitas em solução, condição mais próxima à fisiológica. Isto permite não só o estudo da estrutura das proteínas, mas também uma descrição do seu comportamento dinâmico (Clore e Gronenborn, 1998).

O tamanho das proteínas que podem ter suas estruturas determinadas por RMN tem aumentado durante os últimos anos. O desenvolvimento de uma gama de experimentos de RMN bidimensionais (2D), no início dos anos 80, culminou na determinação de um número de estruturas de pequenas proteínas (Clore e Gronenborn, 1991a). No final dos anos 80 e início dos anos 90, o surgimento dos experimentos em três e quatro dimensões permitiu um aumento da resolução espectral e, conseqüentemente, uma melhora na exatidão das estruturas tridimensionais (Clore e Gronenborn, 1991a). Avanços tecnológicos mais recentes, como o desenvolvimento de espectrômetros de alto campo e a introdução da criosonda, fizeram com que a RMN superasse limitações anteriores, principalmente no que diz respeito ao tamanho das proteínas. Em paralelo, a introdução de novas metodologias como a técnica de TROSY (*Transversed Relaxation Optimized Spectroscopy*) permitiu um aumento na sensibilidade dos experimentos de RMN realizados para proteínas grandes (> 30 kDa) (Pervushin *et al.*, 1997). Recentes avanços na metodologia com RMN multidimensional (4D) e de magnetos mais potentes têm permitido elucidar estruturas de proteínas de até 250 resíduos (Clore e Gronenborn, 1998). Tal fato possibilitou também um considerável avanço nos estudos de dinâmica molecular que, antes da RMN, limitava-se quase que exclusivamente a dados cristalográficos (Key, 2005).

A utilização desta técnica possibilitou a determinação da estrutura da malato sintase de 82 kDa (Tugarinov *et al.*, 2002) e da DHNA de *Staphylococcus aureus*, uma proteína multimérica de 110 kDa (Salzmann *et al.*, 2000), assim como a obtenção de espectros de correlação heteronuclear ^1H - ^{15}N para o complexo GroES-GroEL de *Escherichia coli*, que apresenta uma arquitetura oligomérica com uma massa molecular combinada de 1 MDa (Fiaux *et al.*, 2002).

1.3.2 Fundamentos

A ressonância magnética nuclear (RMN) é um tipo de espectroscopia onde a interação da radiação eletromagnética com a matéria se dá com o campo magnético e não com o campo elétrico como, por exemplo, o infravermelho ou o ultravioleta. A RMN encontra-se nas radiofrequências (MHz). Em um campo magnético sob determinadas condições, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência, absorção essa governada por características da própria amostra. Essa absorção é função de determinados núcleos presentes na molécula que são sensíveis a radiação aplicada e, por isso, esses núcleos são alvo de estudo para compreensão da RMN (Nascimento e Bloch Jr., 2001).

1.3.2.1 Energia e Frequência em RMN

A grandeza física envolvida em RMN é o spin nuclear e o seu conceito provém da Mecânica Quântica podendo ser entendido como uma propriedade que determinados núcleos apresentam. Tais núcleos, devido à sua configuração nuclear, assumem um comportamento característico de momento angular, capaz de gerar um momento magnético, pois uma carga em movimento gera um campo magnético. O momento magnético (μ) gerado pode ser descrito em termos do número de spin (I), cujos valores, calculados pela mecânica quântica, podem ser 0, 1/2, 1, 3/2 etc (Strauss, 1968; Matthews, 1986).

Quando uma amostra é submetida a um campo magnético (B_0) externo de alta intensidade e homogêneo, os spins nucleares tendem a assumir determinadas

orientações, segundo a mecânica quântica o número de orientações é determinado pelo número de spin através da relação $2I + 1$.

Para núcleos com valores de spin = 1/2, por exemplo, apenas duas orientações são possíveis quando é aplicado um campo magnético: uma parcialmente alinhada (α) e outra parcialmente contra (β) o campo magnético. As duas orientações representam diferentes estados energéticos: α é o de menor energia (+1/2) e β o de maior energia (-1/2). As energias desses níveis podem ser descritas como $E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0$, sendo a diferença de energia que surge entre esses dois níveis expressa por $\Delta E = 2\mu B_0$ (Martin *et al.*, 1980), estando diretamente relacionada com o campo magnético aplicado: quanto maior for o campo magnético, maior será a diferença de energia entre os dois níveis e maior será a diferença de população associada a esses níveis. Isso significa que, para uma melhor resolução de spins nucleares em ambientes químicos semelhantes, são desejáveis espectrômetros com campos cada vez mais intensos.

1.3.2.2 Constante Magnetogírica

O momento angular (L) e o momento magnético (μ) podem ser representados por vetores e a proporcionalidade entre eles é chamada de constante magnetogírica. Essa constante que determina a frequência de ressonância do núcleo constitui um parâmetro muito importante em RMN e é representada por γ , apresentando um valor próprio para cada núcleo, sendo expressa pela relação: $\gamma = 2\mu\pi/hI$, onde h é a constante de Plank ($\Delta E = h\nu$). Além de ser responsável pela frequência de ressonância de cada núcleo, a constante magnetogírica influencia outros fenômenos importantes da ressonância magnética nuclear, como é o caso do acoplamento de spins, da sensibilidade dos núcleos, em processos de polarização cruzada, entre outros (Derome, 1995).

Substituindo-se as equações anteriores ($\Delta E = h\nu$ e $\gamma = 2\mu\pi/hI$), pode-se chegar a $\nu = \gamma B_0/2\pi$ expressa em Hertz que é a equação fundamental utilizada em RMN e que define a condição de ressonância para um núcleo com $\text{spin} = 1/2$.

Observa-se que a diferença entre níveis de energia, inicialmente inexistente, surge devido ao efeito do campo magnético externo aplicado sobre o sistema de spins em estudo. Essa é uma outra diferença entre RMN e outros tipos de espectroscopia: em infravermelho e ultravioleta, por exemplo, já existem diferentes níveis energéticos (vibracionais e eletrônicos, respectivamente), bastando à aplicação de uma radiação de frequência apropriada para que uma transição (vibracional ou eletrônica) ocorra. No caso da RMN, os diferentes níveis energéticos devem ser primeiramente criados pela aplicação de um campo magnético externo de alta intensidade; só assim é que se pode proceder à espectroscopia, aplicando-se então, a radiação de frequência apropriada para cada núcleo.

Para se proceder então a ressonância deve ser aplicado um segundo campo magnético (B_1), proveniente de uma fonte de radiofrequência aplicada perpendicularmente ao campo externo. Esse segundo campo magnético é o que permite a observação de absorções nesta técnica. A absorção em RMN é, portanto, uma consequência entre o nível de maior e menor energia, possíveis pela aplicação de um segundo campo magnético na região de radiofrequência.

O campo B_1 é aplicado na forma de um pulso, ou seja, a fonte de radiofrequência permanece ligada por períodos controlados da ordem de microssegundos (μs) a milissegundos (ms). O pulso eletromagnético é criado por manipulação da fonte de radiação eletromagnética, ligando-a ou desligando-a, e a duração do pulso (μs a ms) é o tempo para qual a fonte de radiação se encontra ligada. No método pulsado, os núcleos

são excitados em uma região de frequência em um ou mais pulsos. A aplicação então de B_1 faz com que alguns núcleos que se encontravam em situação de equilíbrio (magnetização líquida em z) absorvam energia e seus momentos magnéticos nucleares passem a precessar no plano xy . Ou seja, o campo B_1 altera a direção de precessão da magnetização, acarretando, portanto, uma perturbação do sistema, retirando-o do equilíbrio. A nova componente gerada no plano xy pode ser observada com o auxílio de um detector no mesmo plano de precessão. Para isso a fonte de radiofrequência deve ser desligada. O sistema volta à situação inicial de equilíbrio e esse processo é conhecido como relaxação fazendo os núcleos perderem o excesso de energia e retornem as suas posições originais de equilíbrio.

1.3.2.3 *Free Induction Decay*

O decaimento da magnetização xy , que dá origem ao sinal de RMN, para retornar à sua posição de equilíbrio é exponencial e dá origem ao chamado sinal FID (*Free Induction Decay*). Os sinais da FID são detectados como uma função do tempo, encontrando-se aí todas as informações sobre acoplamento e deslocamento químico contidos em um espectro de RMN. Como existem vários núcleos em uma amostra, também são originados vários sinais de FID que se superpõem, de forma que se torna muito difícil a extração das informações desejadas. Para que estas sejam interpretadas de maneira facilitada, os sinais da FID são convertidos para um domínio de frequências de ressonâncias, características de cada núcleo, através de uma operação matemática chamada transformada de Fourier. A transformada de Fourier dos diferentes sinais de FID dá origem ao espectro de RMN comumente analisado.

1.3.2.4 Deslocamento Químico

Os espectros de RMN evidenciam o aparecimento de sinais em diferentes valores de frequência, isto indica que o campo magnético experimentado por cada núcleo depende da localização do mesmo na molécula como também a vizinhança de núcleos que a rodeiam. Cada núcleo possui um deslocamento químico (δ) de acordo com a nuvem eletrônica ao seu redor, cuja densidade varia com o ambiente químico. Essa nuvem eletrônica gera campos magnéticos secundários que são os principais responsáveis pela alteração do deslocamento químico de um núcleo em uma macromolécula. Este feito chamado de Blindagem Nuclear justifica diferentes absorções para núcleos eletronegativos, onde a desblindagem é maior, uma vez que átomos eletronegativos diminuem a densidade eletrônica dos átomos de hidrogênio que estejam em suas vizinhanças. Os valores de deslocamento químico em unidades de frequência são valores muito próximos, por isso é muito usual a chamada escala delta (δ) dada pela relação: $\delta = V_{\text{amostra}} \times 10^6 / V_{\text{espectrômetro}}$, onde V_{amostra} é dada em Hertz (Hz) e $V_{\text{espectrômetro}}$ em MHz. A escala δ é, portanto adimensional com valores expressos em ppm. Os núcleos mais blindados apresentam valores de δ menores, enquanto os mais desblindados apresentam valores de δ maiores. O deslocamento químico é de extrema importância para os estudos de hidrogênios em proteínas por RMN, pois é possível distinguir diversos grupos de átomos de hidrogênio através do seu deslocamento químico característico.

1.3.2.5 Acoplamento *Spin-Spin*

Observando-se um espectro de RMN, pode-se ver que os sinais originados das absorções nem sempre aparecem como picos únicos ou singletos, mas podem aparecer

também como dupletos, tripletos, quartetos e isso está relacionado com o que se chama acoplamento spin-spin. Esse fenômeno é originado quando núcleos em diferentes ambientes eletrônicos estão próximos entre si (normalmente o efeito é observado em até três ligações, exceto quando existirem duplas ou triplas ligações). Basicamente, existem dois tipos de acoplamento spin-spin: o acoplamento homonuclear, quando o acoplamento ocorre entre o mesmo tipo de núcleos, como, por exemplo, quando hidrogênios em diferentes ambientes químicos acoplam entre si, e o acoplamento heteronuclear, que ocorre entre núcleos diferentes, como, por exemplo, entre hidrogênio e nitrogênio (Gil e Geraldês, 1987).

A distância entre cada um dos picos de um multipletto é chamada de constante de acoplamento J e indica o quanto um acoplamento entre núcleos é efetivo: uma maior constante de acoplamento significa um acoplamento mais efetivo. Além disso, a constante de acoplamento também pode servir para identificar diferentes acoplamentos no espectro. Essa identificação é facilitada tendo-se em conta que, se um núcleo A acopla-se a um núcleo B com uma constante de acoplamento J_{AB} , a constante de acoplamento de B com A (J_{BA}) deve ser igual a J_{AB} ($J_{AB} = J_{BA}$). Tabelas contendo diferentes valores de constantes de acoplamento para diferentes grupos funcionais e moléculas podem ser encontradas na literatura, o que facilita a interpretação dos sinais em um espectro de RMN de uma maneira inequívoca. Os valores das constantes de acoplamento J são dados em unidades de frequência (Hz) e são chamadas 1J, 2J, 3J,, nJ, dependendo do número de ligações existentes entre os núcleos que acoplam (1, 2, 3,, n ligações, respectivamente) (Martin, 1980).

1.3.2.6 Efeito Nuclear Overhauser (NOE)

A principal fonte de informação geométrica empregada na determinação da estrutura tridimensional de proteínas reside no efeito nuclear Overhauser, que pode ser utilizado para identificar núcleos separados por menos de 5 Å (Overhauser, 1953). Este limite resulta do fato de que o NOE é proporcional ao inverso da distância entre os núcleos elevada à sexta potência. Por esta razão, a intensidade do NOE diminui muito rapidamente com o aumento da distância entre o par de núcleos. Apesar do pequeno alcance das interações observadas, as distâncias derivadas das medidas de NOE são altamente restritivas para a conformação da proteína, particularmente quando envolvem resíduos que estão longe na seqüência primária (Gil e Geraldes, 1987).

O princípio do NOE é relativamente simples. Consideremos um sistema constituído apenas por um par de núcleos de hidrogênio i e j , acoplados entre si via acoplamento dipolar, entre os quais a magnetização é transferida através de um processo conhecido como relaxação cruzada. Uma vez que a velocidade de relaxação cruzada nas duas direções é igual, a magnetização dos dois hidrogênios no equilíbrio é igual. Este sistema pode ser comparado a duas espécies interconvertíveis que apresentam uma constante de equilíbrio de 1. A taxa de relaxação cruzada é proporcional a duas variáveis: r^{-6} , onde r é a distância entre os dois hidrogênios, e τ_{eff} , o tempo de correlação rotacional efetivo do vetor internúcleos. Se a magnetização de um dos núcleos é perturbada, a do segundo irá mudar. A mudança na magnetização do hidrogênio i após a perturbação da magnetização do hidrogênio j é conhecida como efeito nuclear Overhauser (Gil e Geraldes, 1987).

1.3.3 Experimentos Bidimensionais e Tridimensionais para a Determinação de Estrutura de Proteínas

O primeiro passo para determinar a estrutura tridimensional de uma macromolécula é a obtenção de espectros de boa qualidade e a interpretação destes através do assinalamento dos picos de ressonância. Os experimentos unidimensionais são muito importantes porque podem evidenciar rapidamente informações quanto ao estado da amostra. Com apenas este experimento, problemas como concentração de proteína, grau de pureza e solubilidade são observados. O espectro unidimensional da proteína contém informações quanto a dispersão do deslocamento químico, que pode nos informar sobre estrutura, pois quanto maior a dispersão do deslocamento químico mais estruturada a proteína. Apesar deste experimento mostrar todos os picos da proteína, é impossível o assinalamento somente com este espectro, devido a sobreposição dos picos (Harris, 1986).

Para diminuir este tipo de problema é necessária a utilização de experimentos de duas ou mais dimensões como o 2D TOCSY e 2D NOESY que são espectros de correlação homonuclear e HSQC de correlação heteronuclear e ainda experimentos tridimensionais.

1.3.3.1 TOCSY (*Total Correlated Spectroscopy*)

O TOCSY compreende uma seqüência de pulsos que nos fornece as correlações entre os hidrogênios via acoplamento escalar. Nesta seqüência a magnetização é transferida para todo o sistema de spins de um aminoácido.

Este experimento nos permite observar picos de correlação referentes a conectividades entre núcleos ligados covalentemente um ao outro. É amplamente utilizado na determinação estrutural de proteínas pois, em um espectro deste tipo,

podemos observar correlações entre hidrogênios de um mesmo aminoácido, ou seja, de um único sistema de spins. Estes sistemas de spins possuem uma configuração padrão em um espectro de TOCSY (Figura 6) e, deste modo, pode-se fazer o reconhecimento individual de cada tipo de aminoácido constante da seqüência primária da cadeia polipeptídica (Sanders e Hunter, 1993).

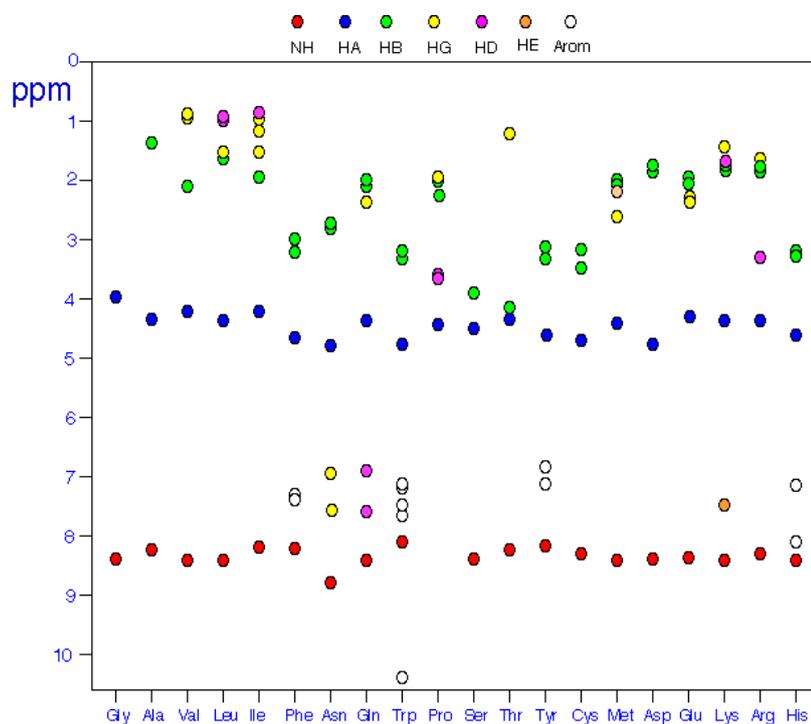


Figura 6: Sistemas de *spins* esperados em um espectro de TOCSY para os hidrogênios dos 20 aminoácidos mais comuns. Cada linha vertical representa as correlações escalares existentes entre os hidrogênios amídicos e os demais hidrogênios de um determinado aminoácido. Cada núcleo está representado por uma cor como indicado na legenda acima da figura.

1.3.3.2 NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*)

O NOESY compreende uma seqüência de pulsos que nos fornece as correlações entre os hidrogênios via acoplamento dipolar. Este experimento baseia-se no efeito nuclear Overhauser (NOE), descrito anteriormente. Em um espectro de NOESY observamos picos de correlação entre núcleos que estão distantes espacialmente até 5 Å, distância máxima para a observação de NOE entre eles. É essencial no estudo estrutural

de proteínas, pois correlacionam aminoácidos distantes na seqüência primária, mas próximos na estrutura terciária, que pode ser reconstruída a partir de um grande número de tais correlações (Gil e Geraldes, 1987). Na prática, o que se observa em ambos os espectros (TOCSY e NOESY) são picos cruzados em uma mesma linha vertical, sendo cada uma destas linhas um sistema de spins pertencente a um resíduo de aminoácido.

1.3.3.3 HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)

Nos experimentos em que obtemos correlações heteronucleares, ocorre a transferência de magnetização entre ^1H e heteronúcleos como ^{15}N , ^{13}C ou ^1P . Após a transformada de Fourier, em uma dimensão observamos o espectro de um tipo de spin, como ^{13}C , ^{15}N ou ^1P , e na outra, de spins ^1H acoplados a estes núcleos (Sanders e Hunter, 1993). Cada pico de um espectro deste tipo nos fornece o deslocamento químico de, por exemplo, um carbono e os hidrogênios acoplados a ele. Estes experimentos podem ser utilizados para o assinalamento dos heteronúcleos, para adicionarmos uma segunda dimensão a um espectro complexo ou para observarmos indiretamente um núcleo através de seu efeito sobre outro.

Na seqüência de pulsos destes experimentos a magnetização é transferida entre núcleos isotopicamente distintos e unidos através de acoplamento escalar. O $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMQC ou HSQC correlaciona o deslocamento químico dos nitrogênios com o deslocamento químico dos hidrogênios diretamente ligados a estes. Já o $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC ou HSQC, fornece a mesma relação para os carbonos. Em um espectro HSQC, estão contidos os sinais de todos os hidrogênios amídicos do esqueleto proteico (com exceção do N-terminal), além dos sinais das cadeias laterais de asparaginas e glutaminas, e de grupamentos aromáticos de triptofanos.

1.3.3.4 Experimentos Tridimensionais

Os experimentos tridimensionais combinam as características dos experimentos bidimensionais para fornecer espectros 3D correlacionando qualquer combinação das frequências do ^1H , ^{15}N e ^{13}C . O espectro 3D pode ser considerado como várias séries de espectros 2D transformados ao longo da terceira dimensão para formar uma matriz 3D. Nesta tese foram utilizados os espectros 3D [1H, 1H]-TOCSY resolvido para ^{15}N e 3D [1H, 1H]-NOESY resolvido para ^{15}N e o 3D HCCH-TOCSY.

O 3D [1H, 1H]-TOCSY resolvido para ^{15}N contém picos de correlação via acoplamento escalar como observados no 2D TOCSY, porém agora o espectro contém uma terceira dimensão correspondente ao ^{15}N . Esta terceira dimensão permite que o espectro seja separado em planos referentes ao deslocamento químico do ^{15}N , de forma que cada plano conterà um sistema de spin relativo a um aminoácido específico sem sobreposição de sinal com outro sistema de spin, como é observado em um espectro 2D para proteínas maiores que 8 kDa. Desta forma, consegue-se identificar os sistemas de spin sem ambigüidades.

O 3D [1H, 1H]-NOESY resolvido para ^{15}N contém correlações 1H-1H NOE entre os prótons amídicos e os outros prótons localizados próximos espacialmente. Os prótons ligados a ^{15}N são detectados na dimensão direta do experimento, enquanto que os deslocamentos químicos do ^{15}N e os deslocamentos químicos dos prótons próximos no espaço são detectados nas outras duas dimensões indiretas.

O 3D HCCH-TOCSY correlaciona os hidrogênios alifáticos das cadeias laterais com as ressonâncias de ^{13}C dentro um mesmo aminoácido. Este experimento fornece o assinalamento quase completo das ressonâncias de ^1H e ^{13}C alifáticos, com algumas

exceções de cadeias laterais longas, como Lis e Arg, que possuem muitas sobreposições. Em um espectro deste tipo os deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C e ^1H estão dispostos em três dimensões independentes.

1.3.4 Estratégia geral para a determinação de estruturas de proteínas

A estratégia básica para a determinação de estruturas de proteínas por RMN é bastante objetiva e pode ser dividida em quatro etapas. A primeira etapa consiste em obter os assinalamentos seqüenciais das ressonâncias utilizando a combinação de correlações através da ligação química e através do espaço. A segunda etapa consiste em identificar as conectividades via espaço entre hidrogênios separados por menos de 5 Å através da análise dos espectros de NOESY.

A terceira etapa consiste em obter restrições experimentais de ângulos torcionais utilizando medidas de constante de acoplamento escalar a cada três ligações (3J). A quarta e última etapa envolve o cálculo das estruturas tridimensionais com base nas restrições experimentais de distâncias e ângulos, utilizando um ou mais algoritmos de dinâmica molecular, como geometria de distância e/ou “simulated annealing” (Clore e Gronenborn, 1989). Não é essencial assinalar todos os NOEs inicialmente. De fato, muitos deverão ser ambíguos, e muitas possibilidades existirão para os seus assinalamentos. Uma vez que uma estrutura de baixa resolução foi calculada a partir de um conjunto de NOEs que foram interpretados de forma não ambígua, é então possível empregar métodos interativos para resolver a maioria das ambigüidades. Consideremos, por exemplo, um pico de correlação NOE que pôde ser atribuído à interação via espaço entre dois hidrogênios A e B, ou A e C. Tendo uma estrutura de baixa resolução

disponível, é usualmente possível se discriminar entre estas duas possibilidades. Se os hidrogênios A e C estão significativamente mais longe do que 5 Å, enquanto os A e B estão a menos de 5 Å de distância, está claro que o pico de correlação deve se originar do NOE existente entre os hidrogênios A e B.

1.3.4.1 Assinalamento sequencial das ressonâncias

Em uma proteína, cada aminoácido está separado do seu vizinho através de uma ligação peptídica. Devido à natureza eletrônica desta ligação, os aminoácidos constituem grupos de *spins* nucleares isolados conectados via acoplamento escalar. A primeira etapa durante o processo de assinalamento sequencial é a identificação dos sistemas de *spins* através das possíveis correlações via ligação química. Isto é feito através da análise dos experimentos de correlação homonuclear ^1H - ^1H COSY (*Correlated Spectroscopy*) e/ou TOCSY (Wüthrich, 1986).

Os 20 aminoácidos encontrados em proteínas produzem dez padrões de correlações intraresiduais para os hidrogênios alifáticos e quatro padrões para os aromáticos, como mostrado pela Figura 7. Combinando estes padrões com os valores de deslocamento químico dos hidrogênios de cada aminoácido em conformação randômica é possível distinguir o sistema de *spins* de cada resíduo da proteína estudada.

Com base na seqüência primária da proteína em questão e nas informações obtidas a partir das correlações intraresiduais, inicia-se a etapa de identificação sequencial dos sistemas de *spins* de aminoácidos vizinhos a partir das conectividades inter-residuais fornecidas pelo espectro de NOESY (Figura 7).

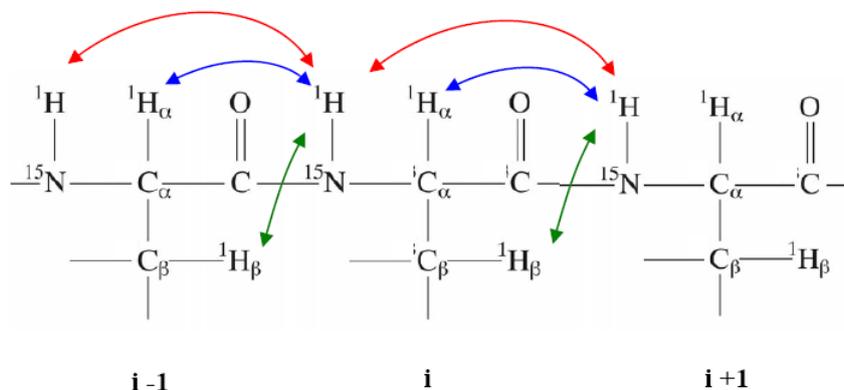


Figura 7: Segmento tripeptídico de uma proteína hipotética mostrando a estratégia de identificação dos NOEs sequenciais para assinalamento das ressonâncias de três sistemas de spin a partir do aminoácido *i*, segundo a abordagem de Wüthrich (1986). As cores das setas representam os tipos de NOEs sequenciais (vermelho – d_{NN} ; azul – $d_{\alpha N}$; verde - $d_{\beta N}$). Para o assinalamento procuram-se conectividades (NOE) do HN do aminoácido na posição *i* com H_{α} , HN e algumas vezes, H_{β} do aminoácido que o precede na seqüência (posição *i* -1), assim como conectividades do H_{α} , HN e às vezes do H_{β} do aminoácido *i* com o HN do aminoácido que o sucede (posição *i* +1).

Uma vez tendo todos ou quase todos os sistemas de spins identificados através das conectividades de curta distância (NOEs sequenciais), o próximo passo é assinalar os NOEs de média e de longa distância entre os prótons da cadeia principal (HN e H_{α}) e também entre os prótons da cadeia lateral dos aminoácidos (Wuthrich, 1986).

Existem ainda os chamados experimentos de tripla ressonância, realizados com amostras de proteínas duplamente marcadas com ^{15}N e ^{13}C , correlacionam três núcleos diferentes através das constantes de acoplamento escalares entre eles. A nomenclatura destes experimentos indica os caminhos de correlação entre os núcleos. HN, N, HA, CA, HB, CB e CO, representam os *spins* hidrogênio amídico (NH), nitrogênio amídico (^{15}N), hidrogênio alfa ($\text{C}^{\alpha}\text{H}$), carbono alfa ($^{13}\text{C}^{\alpha}$), hidrogênio beta (C^{β}H), carbono beta ($^{13}\text{C}^{\beta}$) e carbono da carbonila (^{13}CO), respectivamente. Núcleos através dos quais a coerência é apenas transferida durante a seqüência de pulsos são indicados entre parênteses (Kay *et al.*, 1990).

2. Objetivos

Estudar a interação da defensina de *Pisum sativum* (Psd1) com membrana por RMN através da identificação de sítios de interação e mecanismos envolvidos.

2.1 Objetivos específicos:

→ Determinar a a estrutura do peptídeo pepLoop1 (peptídeo de 8 resíduos correspondente ao loop 1 da Psd1) em micela de dodecilsulfocolina (DPC);

→ Determinar a a estrutura do peptídeo pepLoop1 em DPC:CMH (glicosilcermida purificada da hifa do fungo *Fusarium solani*);

→ Assinalar os aminoácidos da rPSD1 na presença de DPC:CMH;

→ Avaliar por perturbação do deslocamento químico os resíduos que interagem com a membrana.

3. Metodologia

3.1 Materiais

O peptídeo pepLoop1 (GVSFTNAS) correspondente ao loop 1 da defensina de sementes de ervilha (Psd1) foi sintetizado pela Genemed Synthesis Inc com de 95 % de pureza e certificado por espectroscopia de massas.

Perdeuterada D38-dodecilmfosfolina (DPC) foi adquirido da Cambridge Isotope Laboratory; Monohexosilceramida (CMH) de *Fusarium solani* foi isolado como descrito por Duarte *et al.*, 1998. Todos os outros reagentes foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

3.2 Preparação do PepLoop1 em DPC e micelas de DPC:CMH

PepLoop1 (3,6 mM) foi dissolvido em 300 mM D38-dodecylphosphocholine (DPC) perdeuterado (Cambridge Isotop), 40 mM de tampão fosfato de sódio pH 5,5 e 10 % de água deuterada (D₂O). As amostras de DPC:CMH foram preparadas pela adição de CMH seco à amostra de DPC:Peptídeo. A razão molar do pepLoop1/CMH foi de 0,5:1 e 3:1.

3.3 Assinalamento do PepLoop1 em DPC e DPC:CMH

Todos os experimentos de RMN foram coletados em um aparelho Bruker-DRX 600 MHz, a 25 °C. O sinal da água foi suprimido utilizando a seqüência WATERGATE (Piotto *et al.*, 1992). Para a aquisição dos dados foi utilizado o programa XwinNMR

(Bruker BioSpin) em uma estação *Silicon Graphics*. Para o assinalamento do peptídeo em DPC foi usado uma combinação de espectros de TOCSY (Braunschweiler *et al.*, 1983) com 60 ms de tempo de mistura e NOESY (Jeener *et al.*, 1979) com 100, 150 e 200 ms de tempo de mistura. Os dados foram adquiridos a 25 °C. E para o assinalamento do pepLoop1 em DPC/CMH com uma razão molar de 3:1 além dos espectros de TOCSY e NOESY. O espectro de COSY foi utilizado para analisar o glicosfingolípídeo. Todos os dados foram processados utilizando o programa NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995). Para a análise dos espectros foi utilizado o programa NMR View 5.0 (Johnson e Blavins, 1994).

3.4 Cálculo da Estrutura do pepLoop1 em DPC e em DPC:CMH

Para o pepLoop1 em DPC, a estrutura foi calculada usando CNS_solve v.1.1 (Brünger *et al.*, 1998) usando 300 restrições de distância derivados do NOESY com 200 ms de tempo de mistura, não foi observada difusão de spin nesse tempo. Para o cálculo da estrutura do pepLoop1 em DPC/CMH, foi usado o CNS_solve v 1.1 com 80 restrições de distância derivados do NOESY sendo a maioria NOEs sequenciais. Também foram utilizadas restrições de diedro derivadas de ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$, quando ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ foi maior que 8Hz foi usada medidas de restrições do angulo phi de 90° a 150°. As estruturas calculadas foram visualizadas e analisadas com o programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996). As violações das restrições utilizadas foram analisadas com o programa VMD-XPLOR (Schwieters e Clore, 2001).

3.5 Assinalamento da ^{15}N rPsd1 em DPC:CMH

A proteína rPsd1 recombinante marcada com ^{15}N foi obtida de acordo com Cabral *et al.*, 2003. Os experimentos foram feitos usando 1 mM de rPsd1, 300mM de DPC e CMH com a taxa molar de 1:3 (rPsd1/CMH). Todos os experimentos de RMN foram coletados em um aparelho Bruker-DRX 600 MHz, a 25 °C. O sinal da água foi suprimido utilizando a seqüência WATERGATE (Piotto *et al.*, 1992). Para a aquisição dos dados foi utilizado o programa XwinNMR (Bruker BioSpin) em uma estação *Silicon Graphics*. Para o assinalamento da proteína em DPC:CMH foi usado uma combinação de espectros de TOCSY com 60 ms de tempo de mistura e NOESY com 100, 150 e 200 ms de tempo de mistura e também HSQC. Os dados foram adquiridos a 25 °C. Todos os dados foram processados utilizando o programa NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995). Para a análise dos espectros foi utilizado o programa NMR View 5.0 (Johnson e Blavins, 1994).

3.6 Assinalamento da $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ rPsd1 em DPC:CMH

A proteína rPsd1 recombinante duplamente marcada com ^{15}N e ^{13}C foi obtida de acordo com Cabral *et al.*, 2003 mas o metanol usado no protocolo foi marcado com o isótopo ^{13}C (Cambridge Isotope Laboratory). Os experimentos foram feitos usando 300 uM de rPsd1, 300 mM de DPC e CMH com a taxa molar de 1:3 (rPsd1/CMH). Experimentos de RMN foram coletados em aparelhos Bruker-DRX 600 MHz e 800MHz, a 25 °C. O sinal da água foi suprimido utilizando a seqüência WATERGATE (Piotto *et al.*, 1992). Para a aquisição dos dados foi utilizado o programa XwinNMR

(Bruker BioSpin) em uma estação *Silicon Graphics*. Para o assinalamento da proteína em DPC:CMH foi usada uma combinação de espectros de TOCSY com 60 ms de tempo de mistura e NOESY com 100, 150 e 200 ms de tempo de mistura. Ainda espectros de ^{13}C HSQC e tridimensionais como 3D-TOCSY resolvido para ^{13}C e ^{15}N e 3D-NOESY resolvido para ^{13}C e ^{15}N e o 3D HCCH-TOCSY. Todos os dados foram processados utilizando o programa NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995). Para a análise dos espectros foi utilizado o programa NMR View 5.0 (Johnson e Blavins, 1994).

4. Resultados

4.1 Resultados Parte I

4.1.1 Estrutura do pepLoop1 em DPC e em DPC:CMH

O CMH é um lipídeo neutro extraído da hifa de *Fusarium solani*, sendo uma monohexasilceramida que pertence a segunda maior classe de lipídeos de membrana, conhecidos como esfingolipídeos. Este possuem uma cabeça polar, duas caudas não polares e uma molécula de glicose ligada diretamente ao –OH no C-1 da porção ceramida, sendo subclassificado em glicoesfingolipídeo. A determinação da sua estrutura foi feita por Duarte *et al.*, em 1993 através de experimentos de cromatografia gasosa, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas.

Baseado no mapeamento da interação específica da rPsd1 com CMH nós decidimos sintetizar a região da proteína que foi perturbada por essa interação (pepLoop 1). O loop 1 se estende do resíduo 7 até o 17 e parecer ser, pelos experimentos de perturbação do deslocamento químico, dinâmica e por comparação com outras defensinas, o mais importante sítio de ligação à membrana do fungo e apontado como o responsável pelo primeiro evento da atividade antifúngica da defensina. Fragmentos de uma proteína não necessariamente apresentam a mesma conformação quando estão livres solução, contudo eles conservam suas propriedades de interação com menor afinidade. Peptídeos livres em solução apresentam diversas conformações em equilíbrio e quando estes encontram um alvo de interação uma conformação é selecionada.

O pepLoop1 foi sintetizado a partir da Gly12 (único resíduo, além das cisteínas, conservado nas defensinas de plantas) e se estende até a Ser19. Para facilitar os procedimentos experimentais a Cys14 foi trocada por uma serina no peptídeo sintético. Na figura 10 observamos os resíduos do pepLoop1 destacados em vermelho na estrutura da rPsd1, esta estrutura como já dito foi descrita por Almeida *et al.*, em 2002.

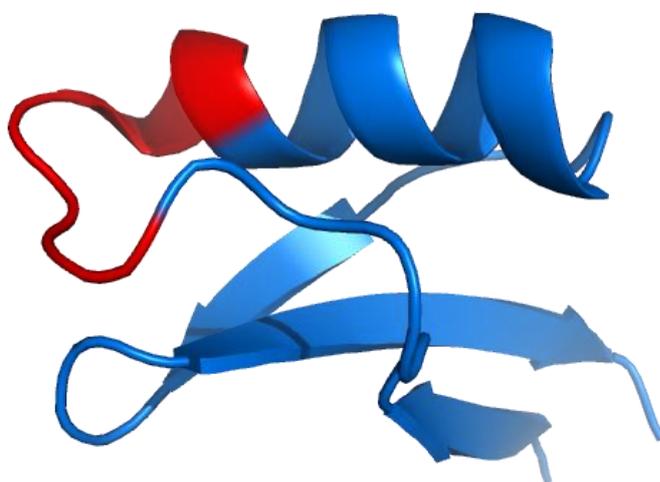
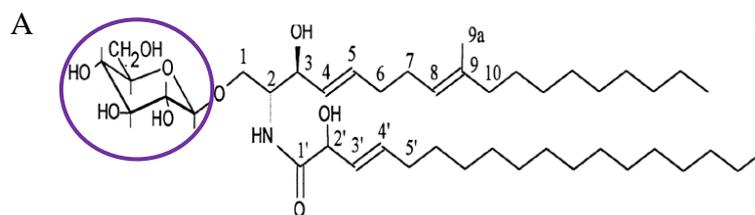
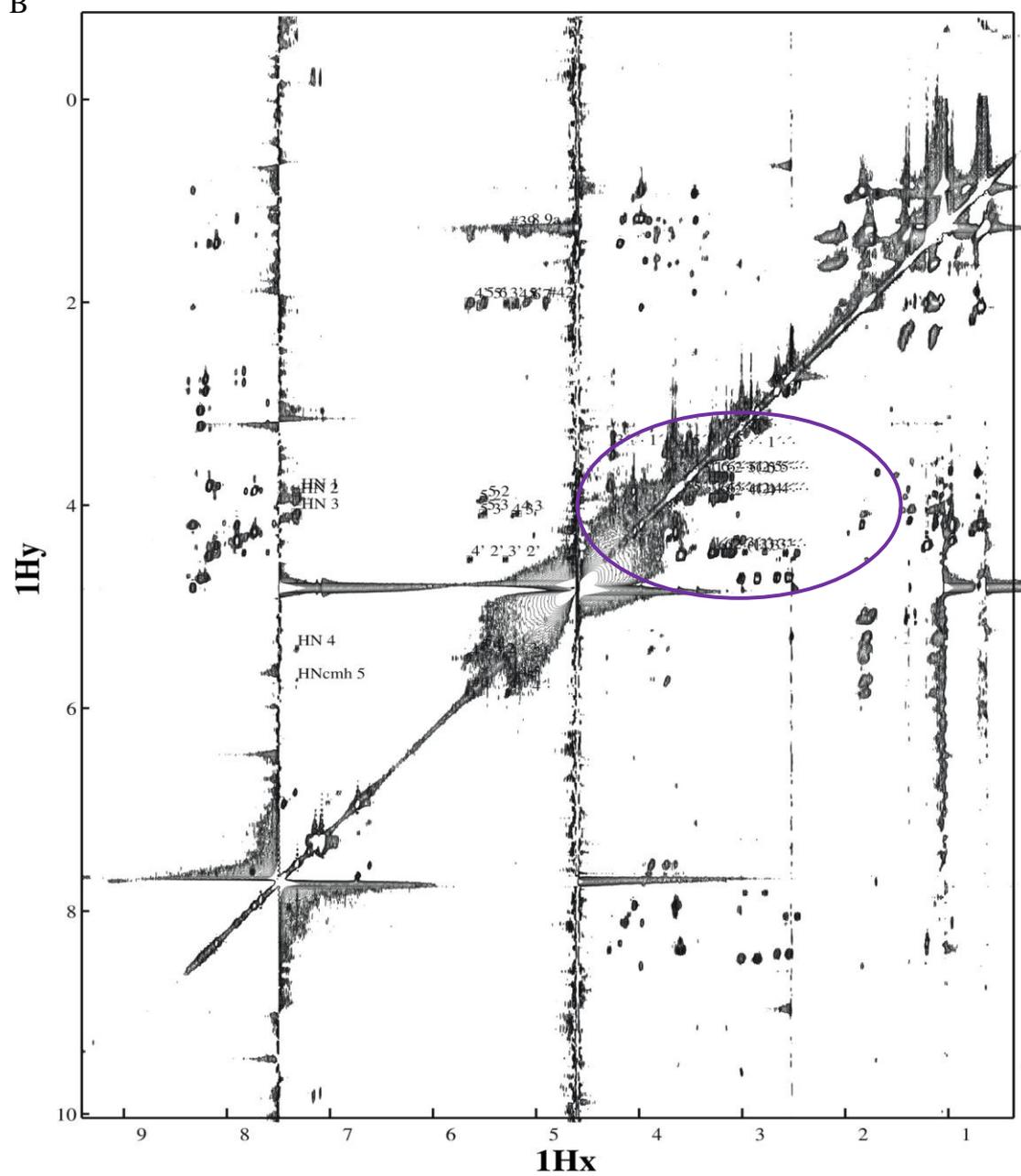


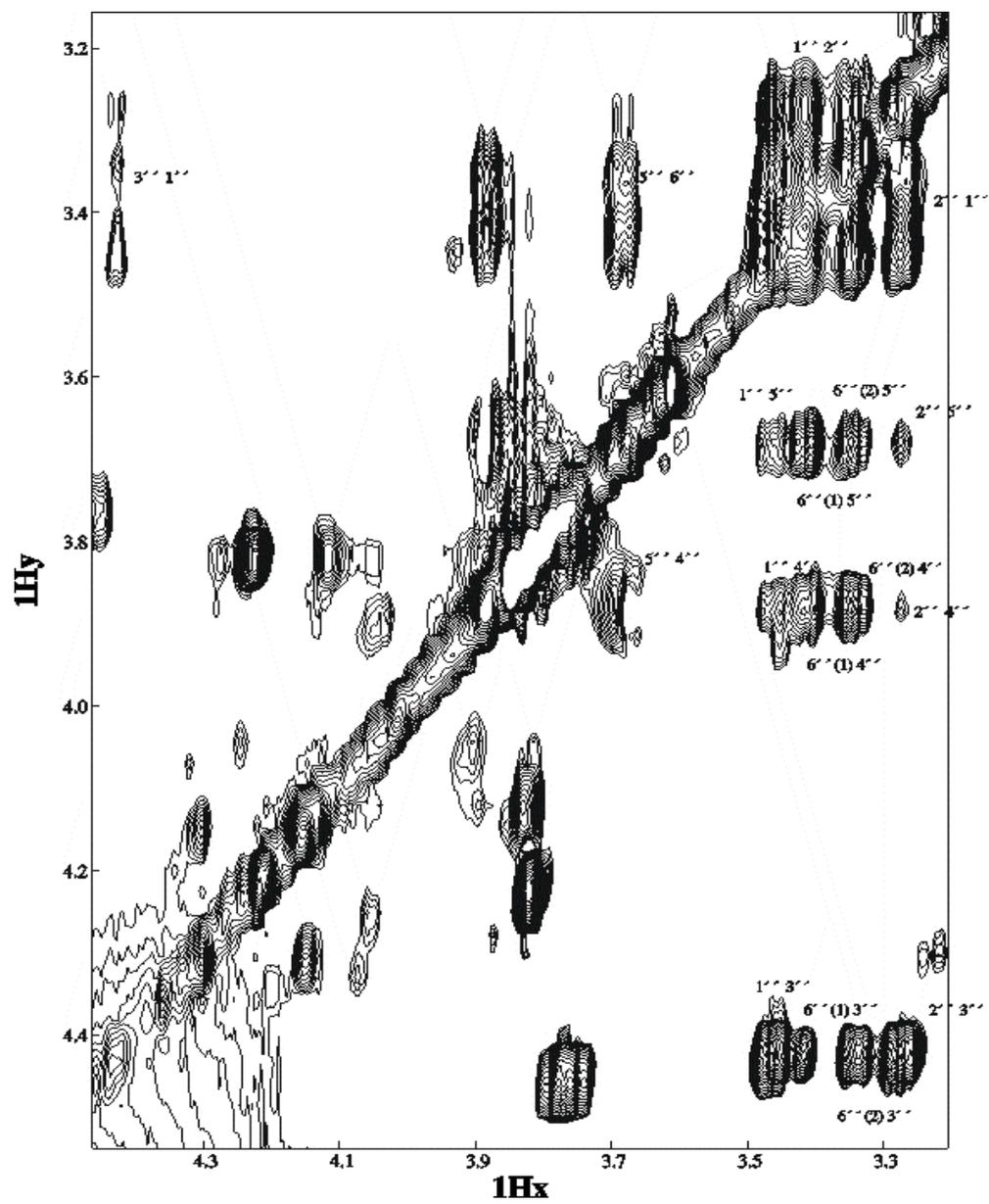
Figura 10: Região da rPsd1 onde fica localizado o pepLoop1.
 KTCEHLADTYR**GVCF**TNAS**CDD**HCKNKAHLISGTCHNWKCFCTQNC.

Antes de fazer os experimentos de interação do peptídeo com o CMH, o glicosíngolípido foi reassinalado através de experimentos de TOCSY e COSY. A figura 11B mostra o espectro de TOCSY do peploop1 em DPC:CMH (3:1) com os valores dos deslocamentos químicos do glicosíngolípido com base no assinalamento de Duarte *et al.*, 1993 (figura 11A).



B





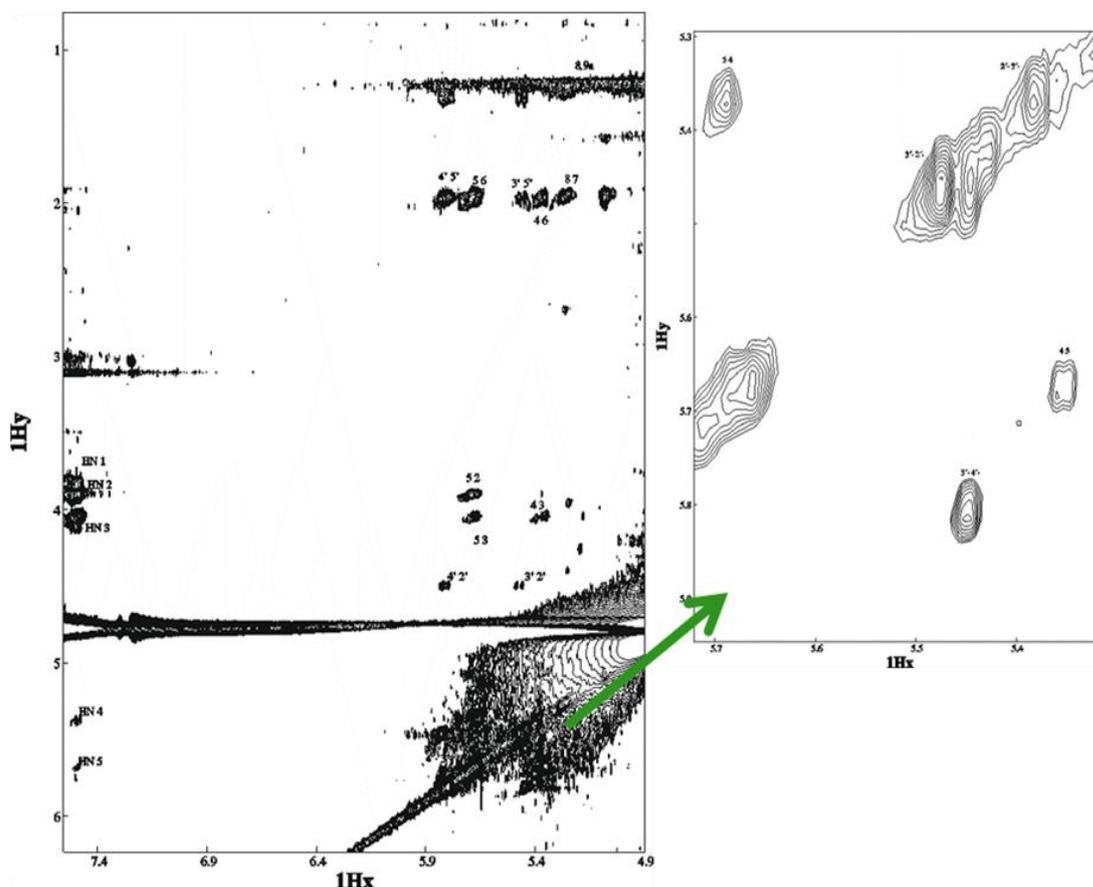


Figura 11: Espectro de TOCSY com o assinalamento do CMH com base na estrutura publicada por Duarte *et al.*, 1998. O círculo roxo indica a região do assinalamento que pertence a glicose do glicosfingolipideo. O peptídeo (3,6 mM) foi preparado em 300 mM de DPC e 10,8 mM de CMH, 20 mM de tampão fosfato de sódio (pH: 5,5) e 10 % de D₂O (H₂O deuterada) e o espectro foi feito a 25 °C.

PepLoop1 não apresenta uma estrutura estável em solução mas foi estabilizado na presença de micelas de DPC. Na figura 12, podemos ver os espectros unidimensionais do peptídeo em DPC e em DPC:CMH, a presença do CMH causa um alargamento de linha na região onde está localizado o açúcar do esfngolipideo, provavelmente pela presença de troca lenta do OH da glicose com a água.

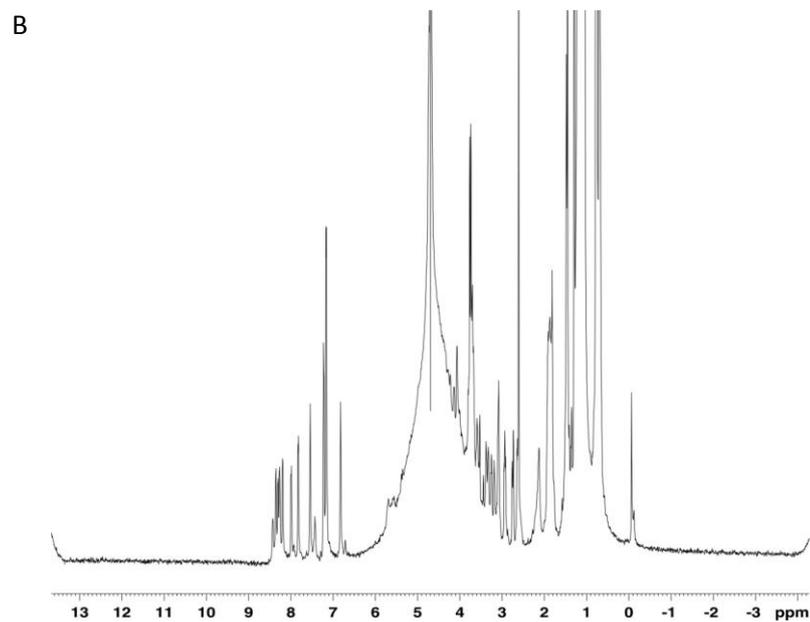
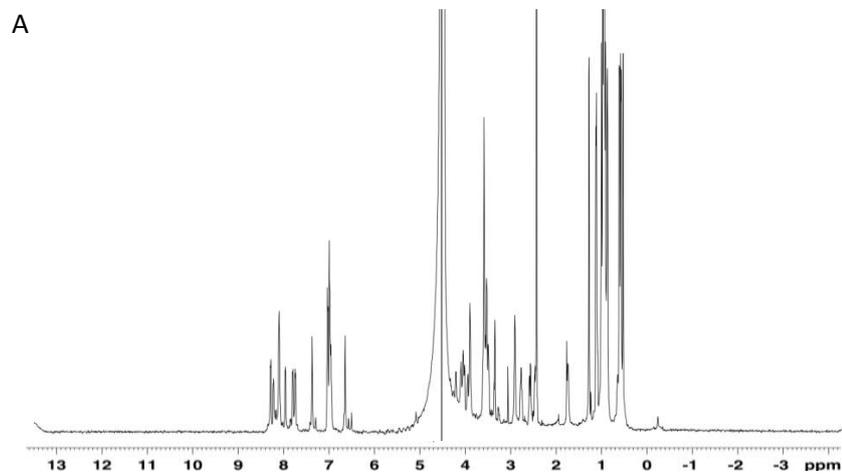


Figura 12: Espectro unidimensional do peploop1 em DPC e DPC:CMH. O peptídeo (3,6 mM) foi preparado em 300 mM de DPC e 10.8 mM de CMH, 20 mM de tampão fosfato de sódio (pH: 5,5) e 10 % de D₂O (H₂O deuterada) e o espectro foi feito a 25 °C.

Apesar de ser um pequeno peptídeo, ele apresenta uma estrutura convergente como podemos ver na figura 12 com as cadeias laterais da Ser14, Phe15 e Thr16 também se apresentando convergentes. Val13, Phe15 e Ala18 formam uma superfície hidrofóbica que provavelmente está revestindo a micela. Quando o CMH é adicionado a estrutura, ela se torna mais estendida (figura 12B).

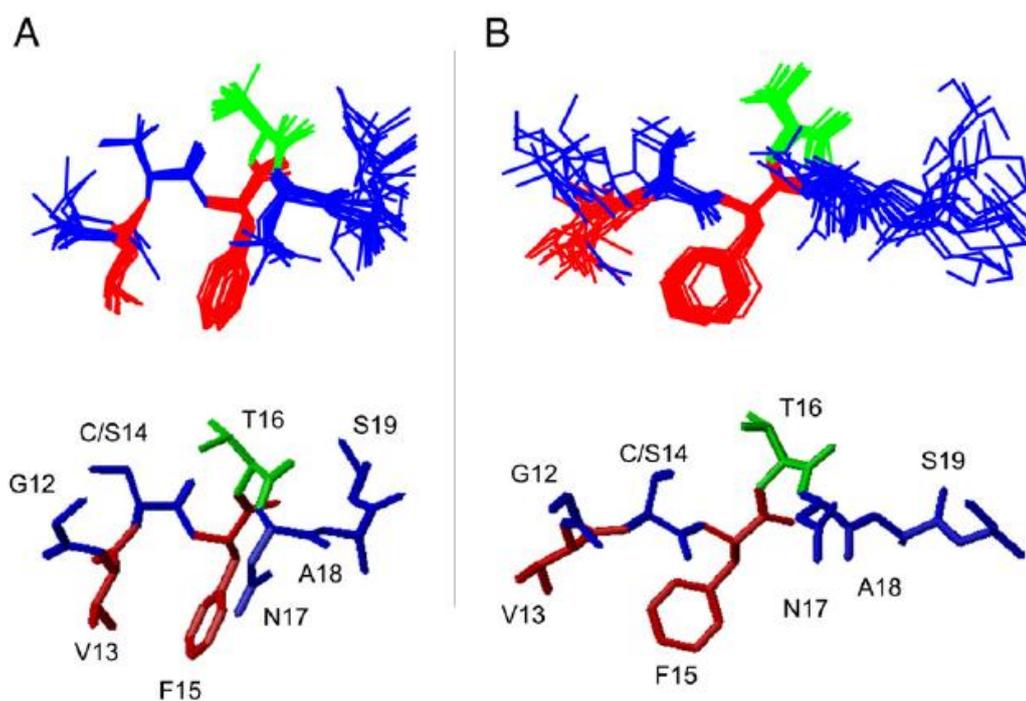


Figura 13: Sobreposição das 15 estruturas de menor energia do pepLoop1 na presença de DPC (A) e com DPC:CMH (B). O peptídeo (3,6 mM) foi preparado em 300 mM de DPC, e 10,8 mM de CMH (B), 20 mM de tampão fosfato de sódio (pH: 5,5) e 10 % de D₂O (H₂O deuterada). O CMH foi adicionado seco à amostra contendo pepLoop1 e DPC. Abaixo é mostrado uma representação do conjunto de cada estrutura.

Esta diferença estrutural é melhor verificada quando é avaliado o perfil de NOEs nas duas estruturas. Na figura 13A podemos observar os NOEs do pepLoop1 em micelas de DPC. Conectividades de media e longa distância são observadas e ainda um

NOE de longa distância entre a Val13 e a Ala18 que é impõe uma ligeira curvatura ao peptídeo. Quando o CMH é adicionado (figura 13B) o perfil de NOE muda bastante e todas as conectividades de média e longa distância são perdidas fazendo a estrutura do peptídeo ficar mais estendida como foi visto na figura 12B.

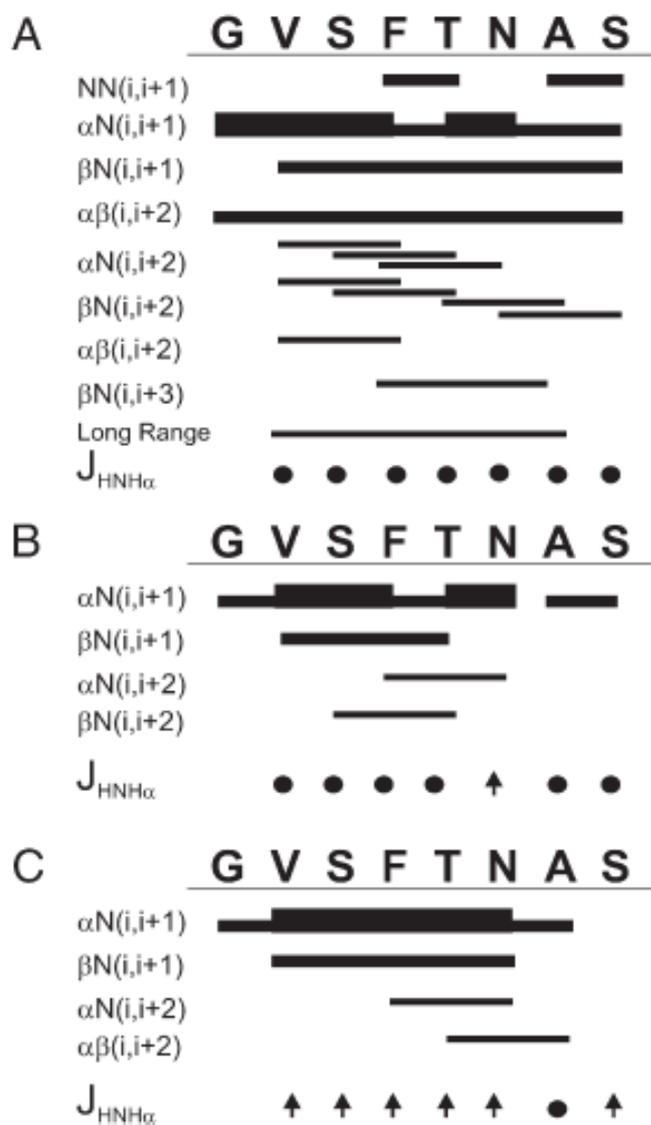


Figura 14: Sumário de NOEs do pepLoop1 em DPC (A) e em DPC:CMH (B). Os dados foram extraídos do espectro de Noesy com tempo de mistura de 150 ms. Todos os experimentos fora feitos com 3,6 mM de pepLoop1, 20 mM de fosfato de sódio e 300 mM de DPC e ainda de 10,8 mM de CMH (B).

Contudo foram observados NOEs entre o CMH e o pepLoop1 indicando que houve interação entre os dois. Os resíduos que interagem são a Phe15 e Thr16 com a parte ceramida e a glicídica respectivamente. A figura 14 mostra a região do espectro de NOESY onde existe NOE entre o hidrogênio delta da Phe15 com os hidrogênio localizados na parte ceramida do CMH. E na figura 15 estão sobrepostos os espectros de TOCSY (vermelho) e NOESY (preto) na região onde a Thr16 interage com os hidrogênios da parte glicídica do glicosfingolipídeo.

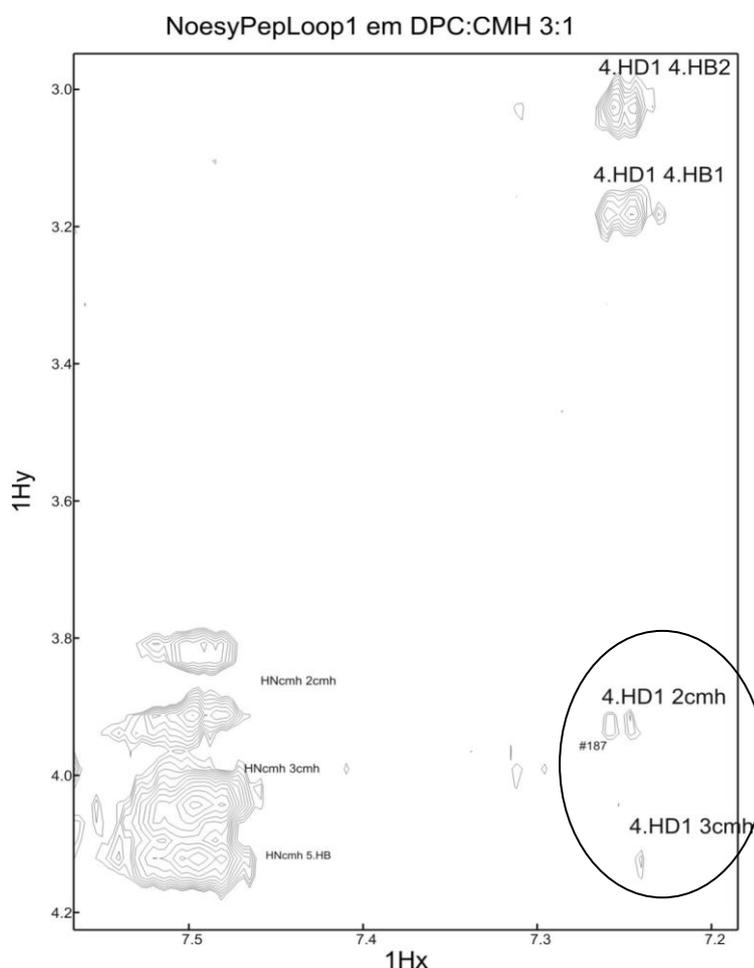


Figura 15: Espectro de NOESY na região onde existe NOE entre o HD1 da Phe15 (nomeado como 4 referente ao número desse resíduo no pepLoop1 e os hidrogênios 2 e 3 da ceramida do CMH). O peptídeo (3,6 mM) foi preparado em 300 mM de DPC, 3 mM de CMH, 20 mM de tampão fosfato de sódio (pH: 5,5) e 10 % de D₂O (H₂O deuturada) e o espectro foi feito a 25 °C.

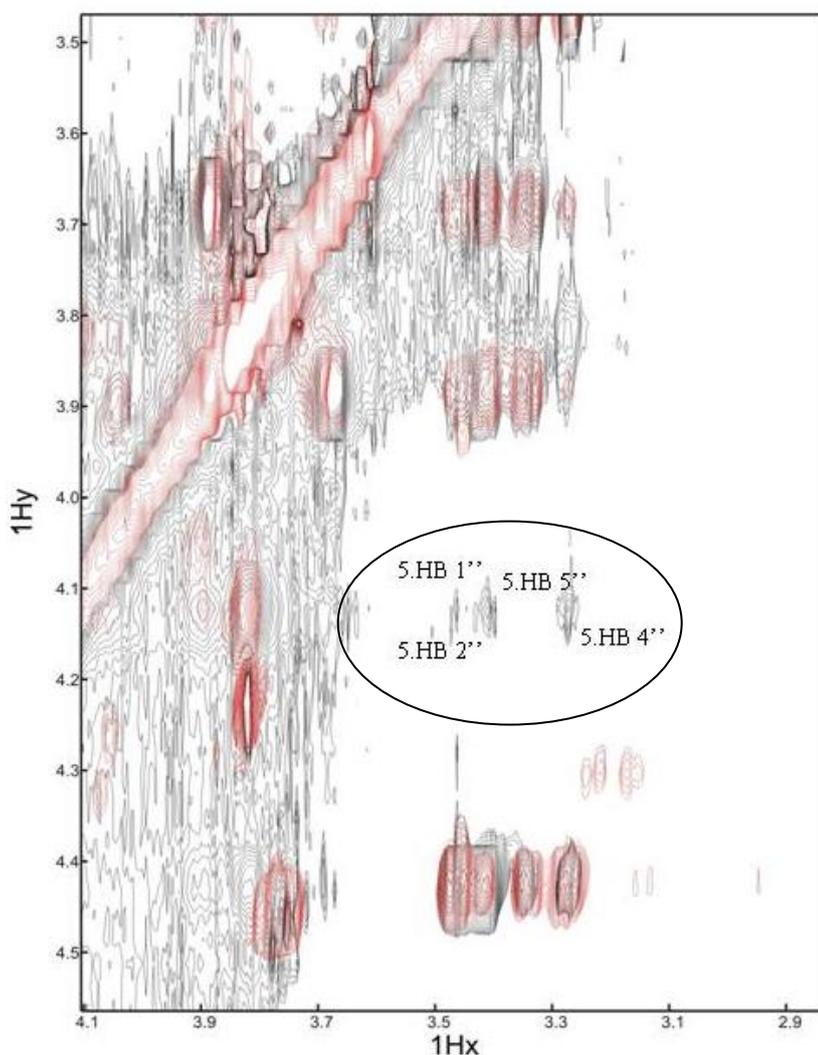


Figura 16: Sobreposição dos espectros de TOCSY (vermelho) e NOESY (preto) em DPC:CMH na região onde existe NOE entre o HB da Thr16 (nomeado como 5 referente ao número desse resíduo no pepLoop1) e os hidrogênios da parte glicídica do CMH. O peptídeo (3,6 mM) foi preparado em 300 mM de DPC, 3 mM de CMH, 20 mM de tampão fosfato de sódio (pH: 5,5) e 10 % de D₂O (H₂O deuterada) e o espectro foi feito a 25 °C.

Esses dados relacionados ao pepLoop1 juntamente com dados da dinâmica da proteína inteira foram publicados na revista BBActa (doi:10.1016/j.bbamem.2009.07.013) que está anexo no final desta tese.

4.2 Resultados Parte II

4.2.1 Assinalamento da rPsd1 na presença de DPC:CMH

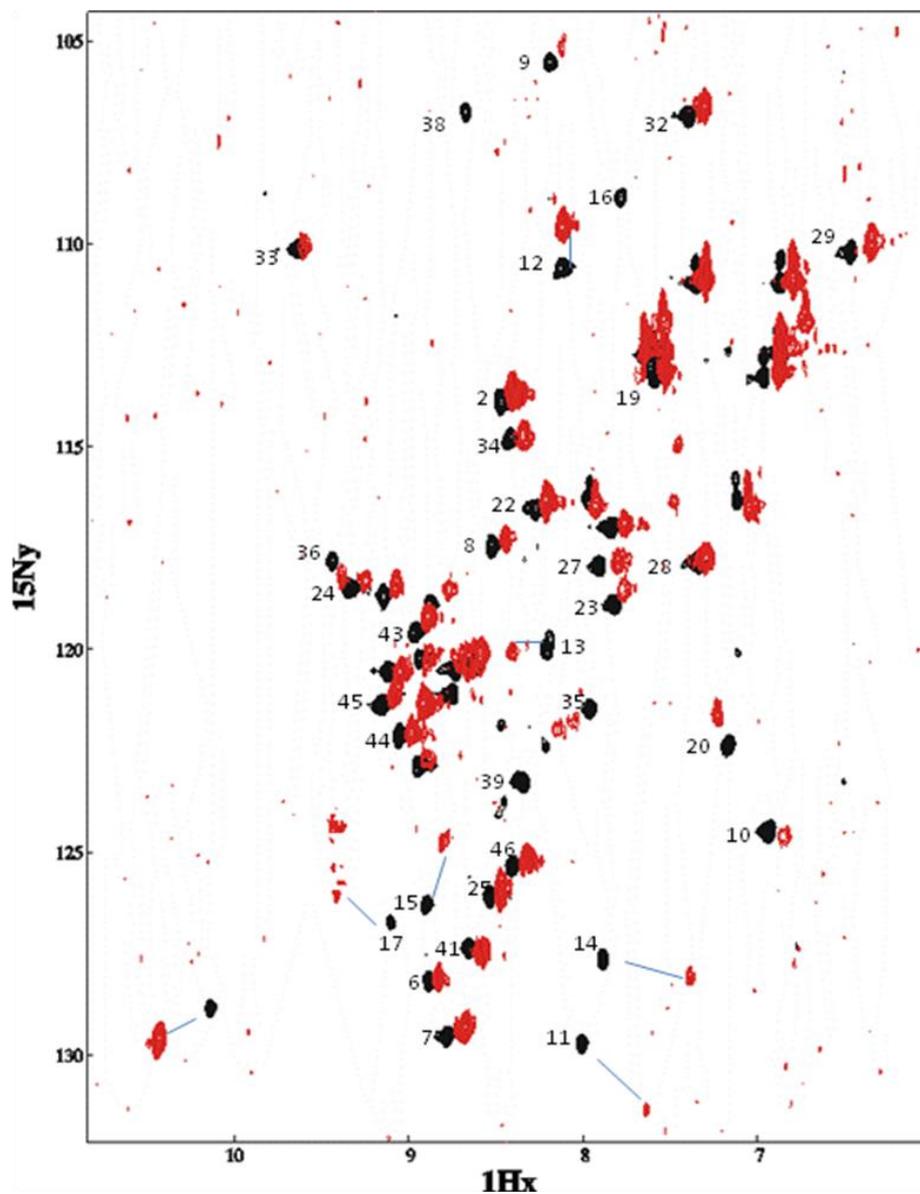
Baseados nos resultados do peptídeo correspondente ao loop1 da Psd1, nós decidimos analisar a estrutura da proteína inteira na presença de DPC e CMH para identificar se os resíduos que interagem entre o peptídeo e as membranas são os mesmos envolvidos na interação da Psd1 e ainda identificar outros resíduos na proteína que participam dessa interação, resíduos estes que são apresentados como essenciais para a atividade antifúngica das defensinas.

Como a rPSD1 já teve sua estrutura resolvida nós fizemos um assinalamento por comparação, observando os aminoácidos pelo seus deslocamentos químicos visualizados através do espectro de HSQC. Na figura 16 estão os espectros de HSQC da rPsd1 livre (preto) e na presença de DPC:CMH (vermelho). A maioria dos picos sofreu uma pequena alteração na presença de CMH, contudo os resíduos que formam o loop1 da proteína tiveram seu deslocamento químico bastante alterado como a Thr9, Tyr10, Arg11, Gly12, Val13, Cys14, Phe15 e Asn17 e ainda diminuíram de intensidade, outros resíduos que também tiveram o deslocamento químico alterado foram Cys35, His36 e Asn37, estes participam de outra região que é essencial para a função das defensinas (turn 3) (Terras *et al.*, 1992; De Samblanx *et al.*, 1997).

Os aminoácidos Thr16, Trp38 e a Arg39 não são vistos no espectro de HSCQ da rPsd1 em DPC:CMH devido ao alargamento de seus sinais. Esses resíduos são os mesmos que nos experimentos de dinâmica apresentam movimentos na escala de micro

a milissegundos, estando em troca conformacional (Medeiros et al., 2009 – anexo desta tese).

É importante notar que a Thr16 corresponde ao aminoácido que interagiu com a parte glicídica do CMH nos estudos com o peploop1 mostrando então que esse resíduo deve ter uma grande participação na interação com o ligante.



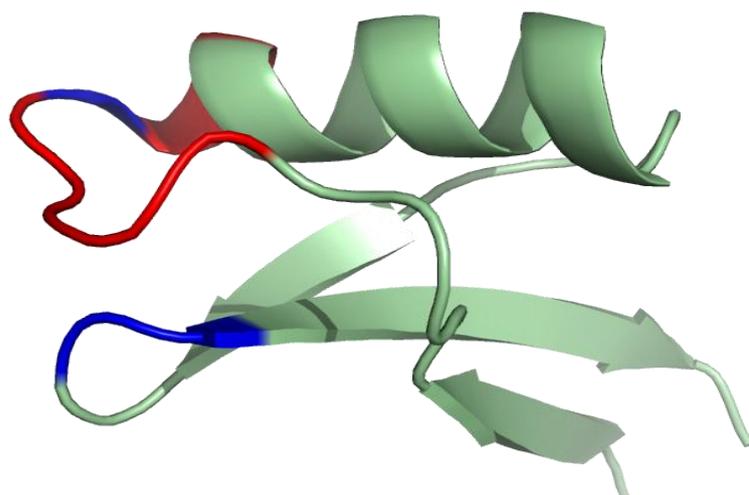
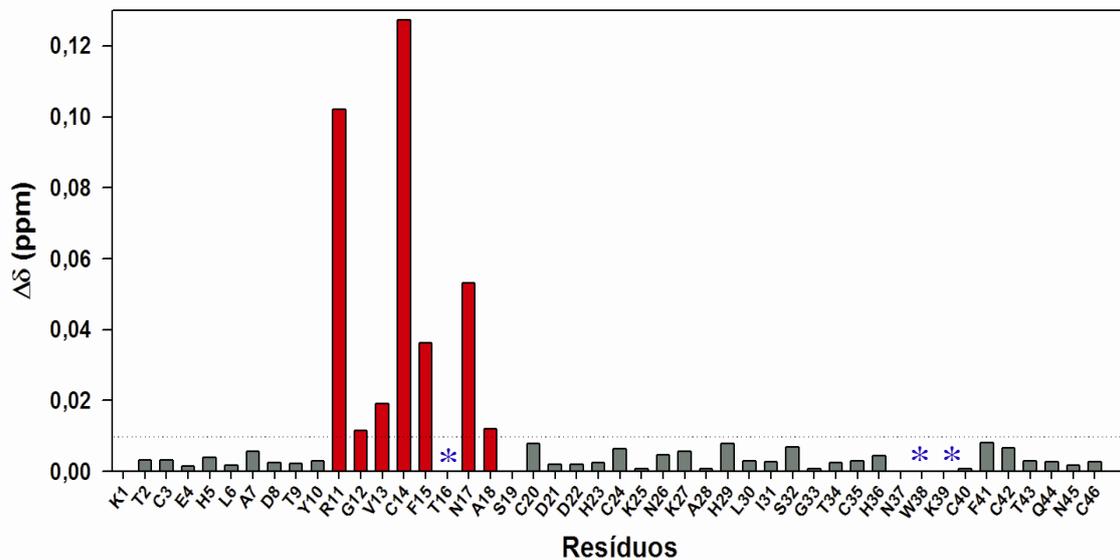


Figura 17: Diferenças de deslocamento químico observadas entre a ^{5}N rPsd1 livre (preto) e com DPC:CMH(vermelho). A: Sobreposição dos espectros de ^1H - ^{15}N HSQC coletados para as amostras de ^{15}N rPsd1 e com DPC:CMH. A rPsd1 (1 mM) foi preparado em 300 mM de DPC, 20 mM de tampão, 3 mM de fosfato de sódio (pH: 6,0) e 10 % de D_2O (H_2O deuterada) e o espectro foi feito a 25 °C. Os resíduos são indicados pelo correspondente número da sequência primária e aqueles que sofreram maiores mudanças de deslocamento químico estão indicados pela B: Quantificação dos valores absolutos das diferenças de deslocamento químico das ressonâncias de hidrogênio e nitrogênio amídicos observadas nos espectros mostrados em A feita segunda a equação $\Delta\delta = [(\Delta\delta_{\text{HN}})^2 + (\Delta\delta_{\text{HN}}/6,49)^2]^{1/2}$. Os assinalamentos dos resíduos que mostraram diferenças de deslocamento químico significativas tiveram $\Delta\delta$ acima de 0,01. C: Estrutura tridimensional da rPsd1 colorida de acordo com os valores das diferenças de deslocamento químico medidas em B. Os resíduos que sofreram mudanças de deslocamento químico significativas estão em vermelho os coloridos em azul dizem respeito àqueles cujas ressonâncias amídicas não puderam ser identificadas nos espectros de ^1H - ^{15}N HSQC na presença de DPC:CMH.

Durante a identificação dos sistemas sequenciais também foi usado os experimentos TOCSY e TOCSY-HSQC, onde observamos os deslocamentos químicos dos prótons de um mesmo resíduo. Como mostrado anteriormente na figura 6, cada resíduo possui um padrão de frequências próprio, que será utilizado para o reconhecimento de cada um deles no espectro. Os hidrogênios amídicos estão localizados em torno de 8,0 ppm, assim como os hidrogênios α estão próximos de 4,0 ppm; os β , δ e γ se localizam entre 3,0 e zero ppm. No espectro de TOCSY na rPsd1 em DPC:CMH não foi possível visualizar todos os sistemas de spin da proteína (Figura 17). O TOCSY-HSQC também não apresentou sinais suficientes para prosseguir com o assinalamento sequencial. Isso dificultou bastante o assinalamento pois experimentos TOCSY e NOESY são analisados simultaneamente, para que as correlações intra-residuais possam ser distinguidas das inter-residuais. O TOCSY da rPsd1 livre foi então usado para assinalar os sistemas que não sofreram mudanças bruscas do seu deslocamento químico (analisados no ^{15}N HSQC da rPsd1 livre e em DPC:CMH) contudo a maioria dos aminoácidos pertencentes ao loop1 e aqueles em que o sinal no HSQC não foram visualizados não puderam ter seus sistemas assinalados por essa comparação.

Provavelmente essa supressão de sinal foi causada pela interação de alta afinidade da rPsd1 com o sistema DPC:CMH fazendo com que o sinal da proteína alargasse. Diferentes tempos de mistura foram utilizados para tentar melhorar o sinal mas os resultados foram os mesmos, ainda nos experimentos da proteína duplamente marcada também não houve nenhuma melhora na qualidade dos espectros.

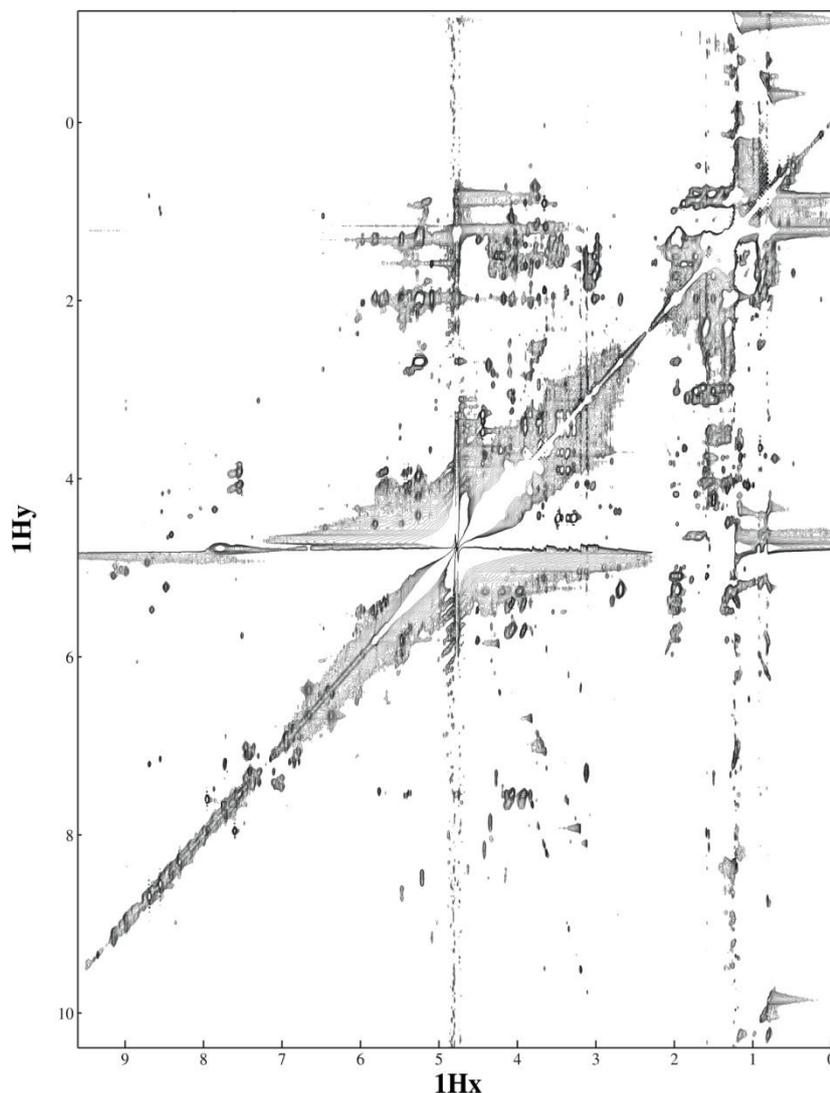


Figura 18: Espectro de TOCSY da ^{15}N rPsd1 em DPC:CMH. A rPsd1 (1 mM) foi preparado em 300 mM de DPC, 20 mM de tampão, 3 mM de fosfato de sódio (pH: 6,0) e 10 % de D_2O (H_2O deuterada) e o espectro foi feito a 25 °C.

O espectro de NOESY é a principal fonte de informação para o cálculo de estruturas tridimensionais através da RMN. Este nos fornece sinais referentes a conectividades via espaço (NOE), que são convertidos em restrições de distância interatômica, como visto no item 1.3.3.2. O espectro 2D NOESY (Figura 18) e 3D-NOESY editado para Nitrogênio possuem um grande número de conectividades do tipo NOE, o que contribui enormemente para a qualidade da estrutura final. Já no 3D-

NOESY editado para Carbono não foi possível visualizar muitos NOEs.

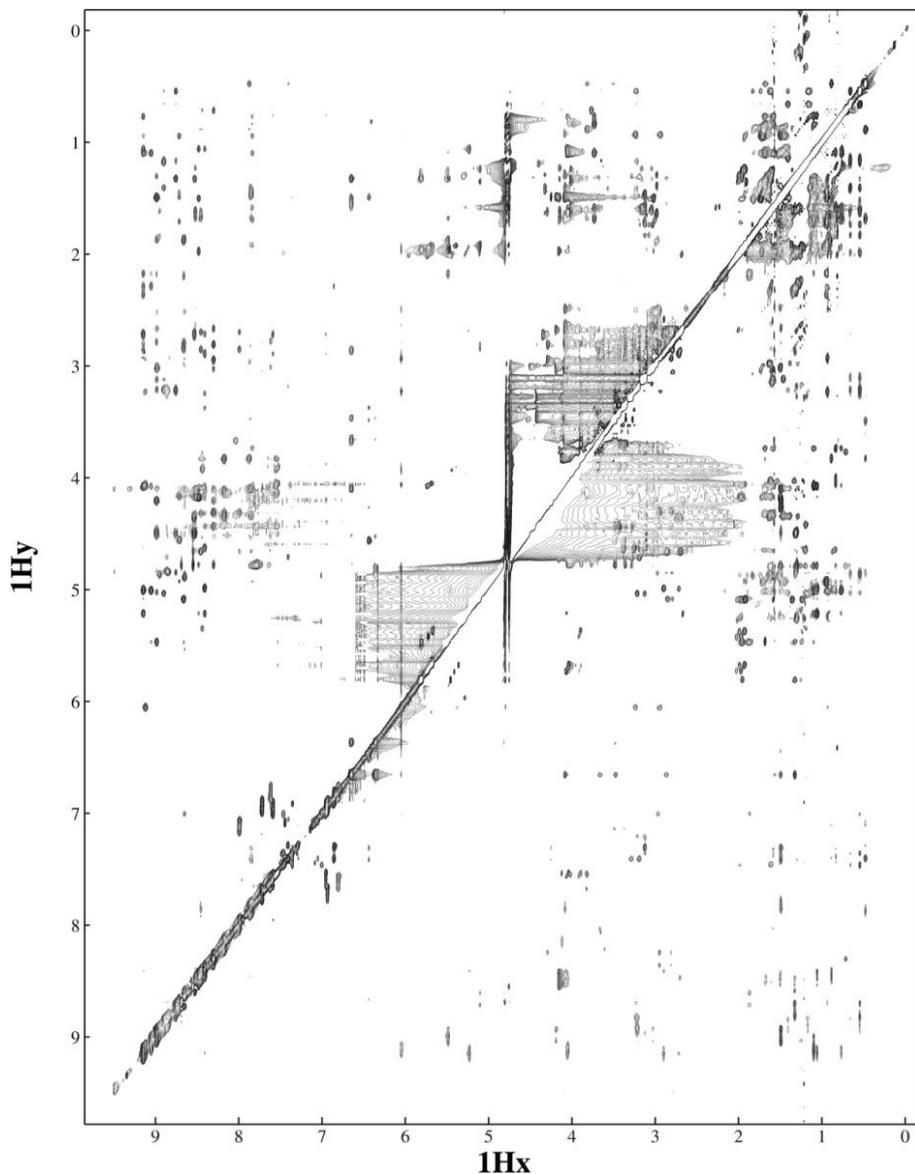


Figura 19: Espectro de NOESY ^{15}N rPsd1. A rPsd1 (1 mM) foi preparado em 300 mM de DPC, 20 mM de tampão, 3 mM de fosfato de sódio (pH: 6,0) e 10 % de D_2O (H_2O deuterada) e o espectro foi feito a 25°C .

Entretanto os resíduos do loop1 (Thr9, Tyr10, Arg11, Gly12, Val13, Cys14, Thr16, Asn18 e Ser19) e a região formada pela aminoácidos: His36, Trp38 e Lys39 não puderam ser visualizados nestes espectros. Ainda das 8 cisteínas presentes na rPsd1 apenas 3 puderam ser assinaladas (3, 40 e 46). Esses aminoácidos então não foram

assinalados. Outros experimentos de 2D – 3D – NOESY na temperatura de 15° C também foram feitos para tentar encontrar as ressonância dessa região mas como podemos ver na figura 19 (sinais em verde), o experimento de HSQC a 15° C apresentou um perfil muito similar do que aquela feito a 25° C, e também os resíduos Thr16, Trp38 e Lys39 não foram visualizados.

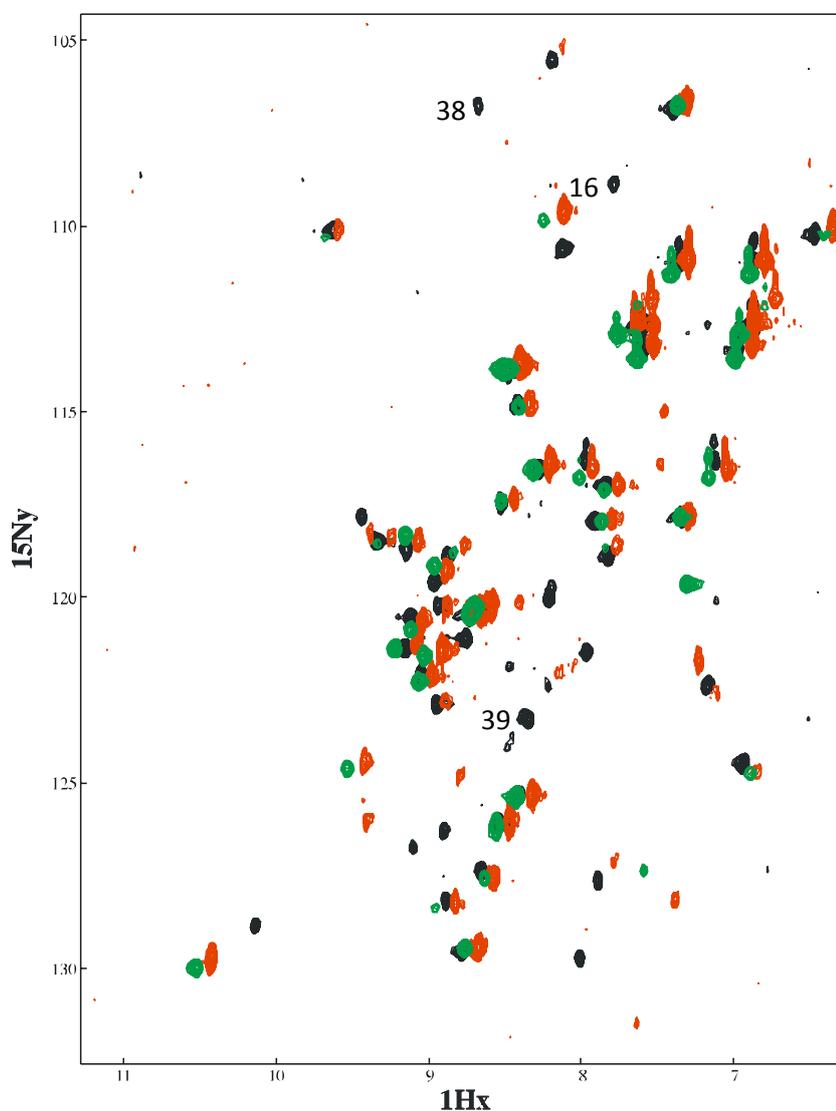


Figura 20: Sobreposição dos espectros da ^{15}N rPsd1 livre (preto) e com DPC:CMH a 25 °C (vermelho) e 15 °C (verde) . A rPsd1 (1 mM) foi preparado em 300 mM de DPC, 20 mM de tampão, 3 mM de fosfato de sódio (pH: 6,0) e 10 % de D_2O (H_2O deuterada).

Uma outra fonte de informação é o índice de deslocamento químico (CSI) de núcleos como $^{13}\text{C}\alpha$ e $^1\text{H}\alpha$. Este índice representa a diferença entre o deslocamento químico experimental e valores teóricos referentes a uma estrutura em conformação randômica. Em relação ao $^1\text{H}\alpha$, quando um mínimo de 4 resíduos sequenciais possuem valores menores que os teóricos, é sugerida conformação em hélice alfa nesta região. O contrário, valores maiores que o teórico é verdadeiro para fitas beta (Wishart e Sykes,1994). Os índices de deslocamento químico e sua estrutura secundária relacionada para a rPsd1 em DPC:CMH estão na figura 20A.

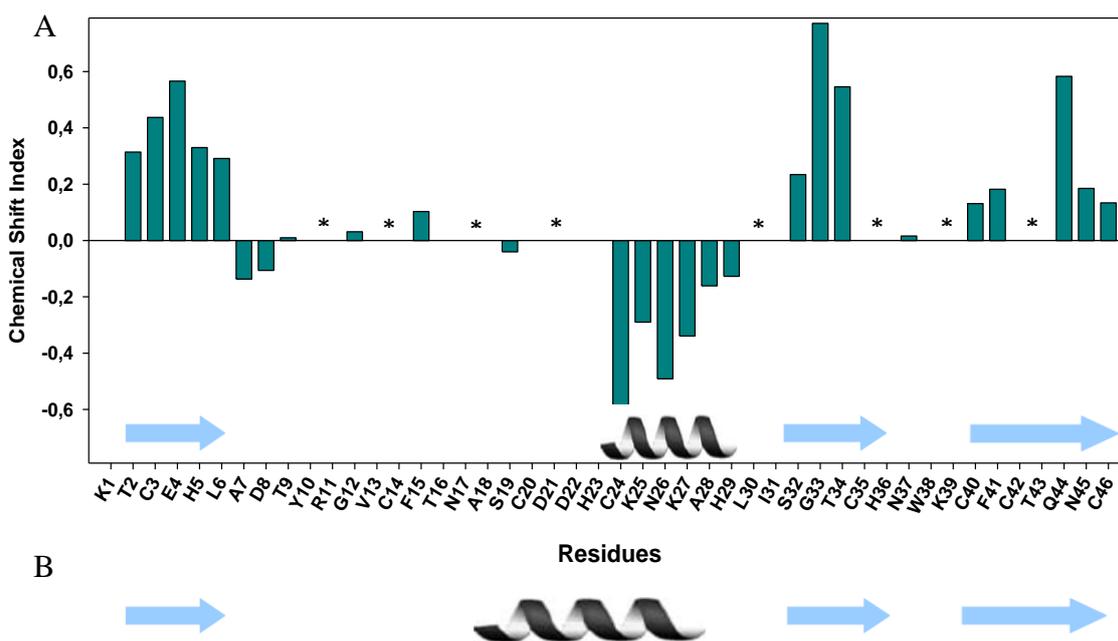


Figura 21: A. Diferenças de deslocamento químico entre os hidrogênios α da rPsd1 na presença de DPC:CMH e em estrutura randômica. Em B podemos ver os elementos de estrutura secundária da Psd1 livre.

Como esperado a proteína na presença de DPC:CMH apresentou os mesmos elementos de estrutura secundária da rPsd1 (figura 20B). Contudo os primeiros resíduos da hélice não foram assinalados e ainda os outros resíduos já citados nesta tese.

Para assinalar os carbonos foram utilizados espectros de HSQC editado pra Carbono (^{13}C -HSQC) e ^{13}C -HCCH-TOCSY da $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ rPsd1 com DPC:CMH. Os carbonos assinalados também foram baseados no assinalamento do tocsy da rPsd1 livre. Portanto aqueles resíduos do loop e também as cisteínas não puderam ter suas ressonâncias assinaladas nesse espectro, mas a maioria do Carbonos Beta e Gama foram assinalados (Figura 21).

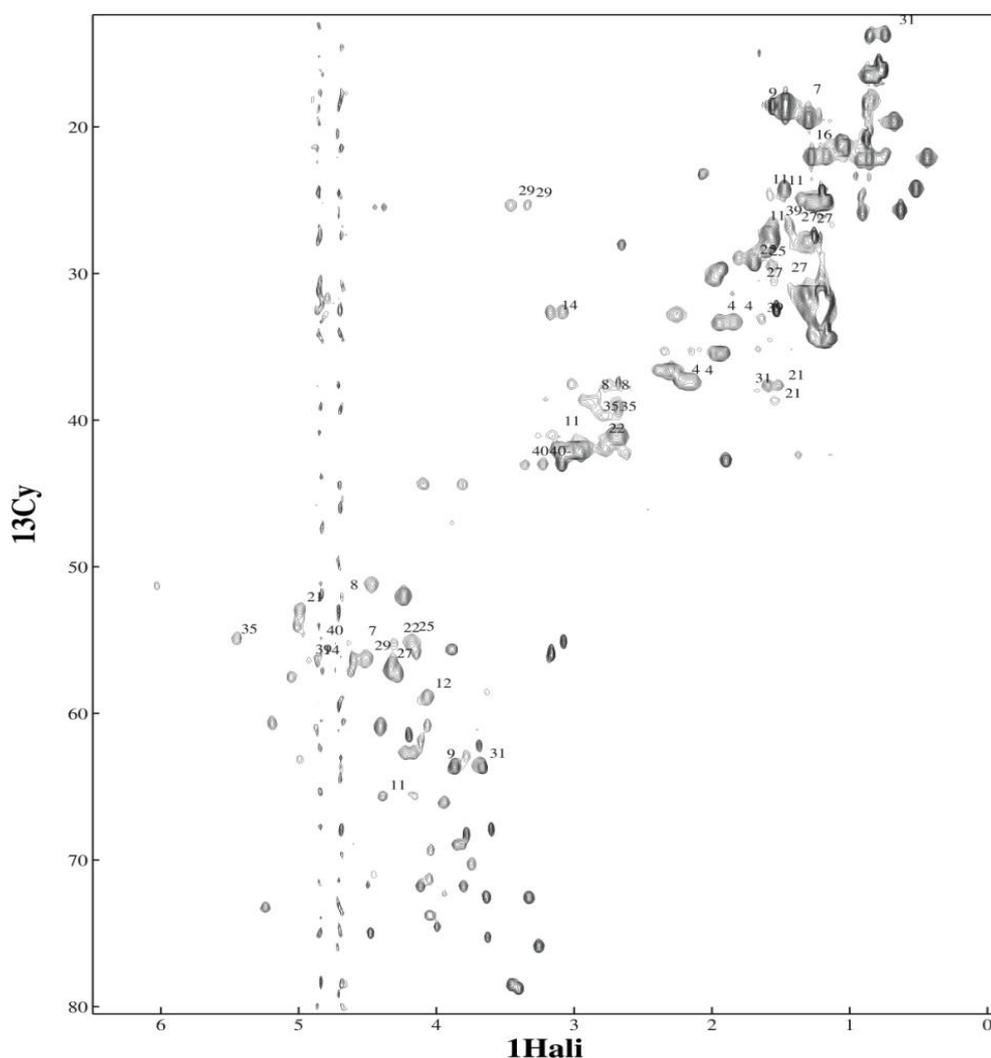


Figura 22: Espectro de HSQC de Carbono da $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ rPsd1 em DPC:CMH. A rPsd1 (300 μM) foi preparado em 300 mM de DPC e 0,9 mM de CMH, 20 mM de tampão, 0,9 mM de fosfato de sódio (pH: 6,0) e 10 % de D_2O (H_2O deuterada) e o espectro foi feito a 25 $^\circ\text{C}$.

5. Discussão

Defensinas em geral apresentam uma baixa conservação de sequência primária. Várias estratégias tem sido usadas para identificar domínios mínimos ativos nessas proteínas e a partir daí criar novos agentes antimicrobianos (Kushmerick *et al.*, 1998; Vila-Perelló *et al.*, 2005 e Vila-Perelló *et al.*, 2006)

Nesta tese estudamos a interação da defensina recombinante de ervilha rPsd1 com o CMH, um glicosíngolípídeo presente na membrana ou parede celular de fungo que tem sido proposto como sendo o primeiro alvo de ação da defensina (Thomma *et al.*, 2002). Os glicosíngolípídeos presente em fungos estão implicados em processos celulares fundamentais incluindo crescimento, diferenciação e morfogênese. E como suas estruturas não são encontradas em mamíferos, bloquear a biossíntese deste tem se tornado um alvo para o desenvolvimento de terapias (Toledo *et al.*, 2007).

O loop1 da Psd1 é uma região muito importante para a interação da proteína com a membrana e provavelmente para a sua atividade. As proteínas constituem sistemas dinâmicos intrinsecamente flexíveis e a dinâmica mostrada por elas está intimamente relacionada às suas propriedades biofísicas e funções biológicas (Henzler-Wildman e Kern, 2007). Através de experimentos de dinâmica por RMN da proteína livre, Medeiros *et al.*, 2009 (Anexo 1) mostraram que essa região apresenta movimentos na faixa de micro- a milisegundos. Esses movimentos são interpretados como uma interconversão entre duas ou mais conformações possíveis e essas regiões da proteína que apresentam variabilidade conformacional participam diretamente de eventos de ligação ou de transição alostérica. Existem ainda regiões que apresentam movimentos na escala de tempo de pico a nanosegundos, ditos movimentos térmicos e são interpretados

como uma flexibilidade local de determinadas regiões da proteína (Valente *et al.*, 2006). Na figura 22 podemos ver os movimentos característicos dentro da proteína e ainda aqueles que acontecem em escala de tempo que podem ser medidas por experimentos de RMN.

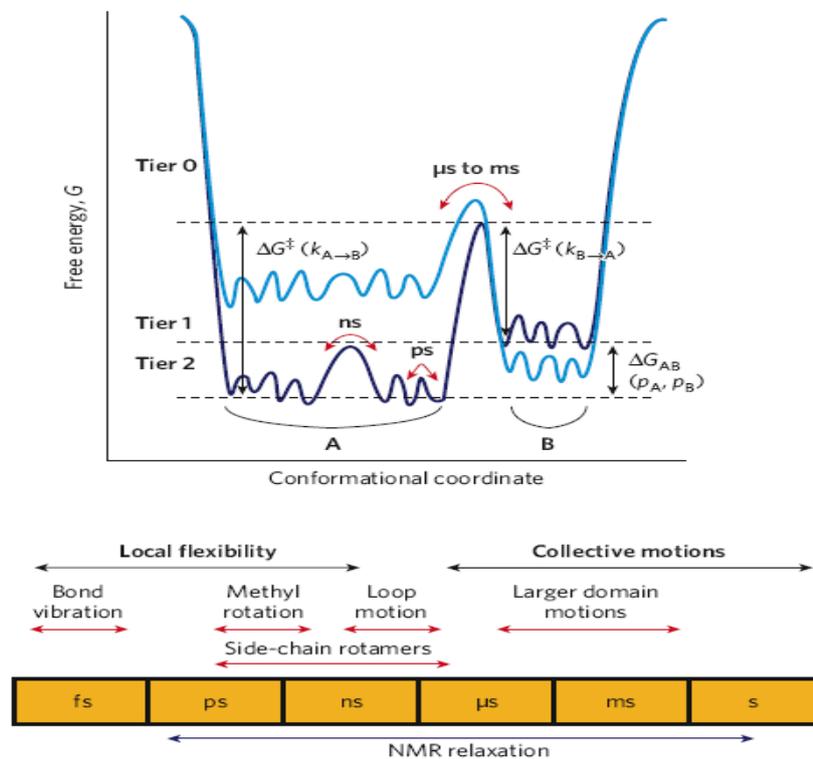


Figura 23: Painel de Disposição Energética (*Energy Landscape*) que define a amplitude e a escala de tempo dos movimentos nas proteínas. E a ainda aqueles que podem ser mapeados por experimentos de RMN (relaxação).

Baseados nos resultados dos experimentos de dinâmica e da descoberta de regiões em troca lenta, um peptídeo correspondente a região do loop1 foi sintetizado (pepLoop1), e sua estrutura em micelas de DPC e de DPC:CMH foram resolvidas. O peptídeo foi sintetizado a partir da Glicina (Gly12), resíduo conservado em todas as defensinas de plantas. Entre os resíduos que compõem o loop 1, a Gly12 é o único aminoácido que apresenta movimentos na escala de pico a nano segundos (movimentos

térmicos), contribuindo para a plasticidade dessa região e provavelmente essencial para o processo de reconhecimento. Um resíduo conservado que apresenta flexibilidade térmica pode ser a característica chave mantida pela evolução dessas proteínas.

PepLoop1 mesmo sendo um peptídeo com 8 resíduos apresentou uma estrutura bem convergente em DPC com um grande número de NOEs. Ainda quando o glicosíngolípídeo foi adicionado, a maioria dos NOEs são perdidos e a estrutura do pepLoop1 então se torna mais estendida mas ainda bastante convergente. O sumário da estatísticas estruturais estão em anexo como material suplementar do artigo (anexo 1).

Nós conseguimos observar NOEs entre o peptídeo e o CMH. Dois resíduos do pepLoop1 estão diretamente envolvidos na interação. A Phe15 através dos hidrogênios Delta interagindo com Hidrogênios da cauda ceramida do CMH e a Thr16 através dos Hidrogênios Beta que interage com os Hidrogênios presentes na porção glicídica, provavelmente fazendo pontes de hidrogênio.

Esse resíduo de Fenilalanina é 50 % conservado nas defensinas de plantas e alternativamente é substituído por outros resíduos hidrofóbicos. Se comparamos a presença de Fenilalanina (Phe15) entre as defensinas de Fabaceae a conservação aumenta para 74 %. O outro resíduo que participa da interação: a Treonina (Thr16) é 51 % conservado nas defensinas de Fabaceae (figura 8). A partir disso, pode-se sugerir que a habilidade de interagir com o CMH é uma característica conservada dentro das defensinas de Fabaceae.

Na figura 23 podemos ver a representação esquemática da interação do pepLoop1 com o CHM.

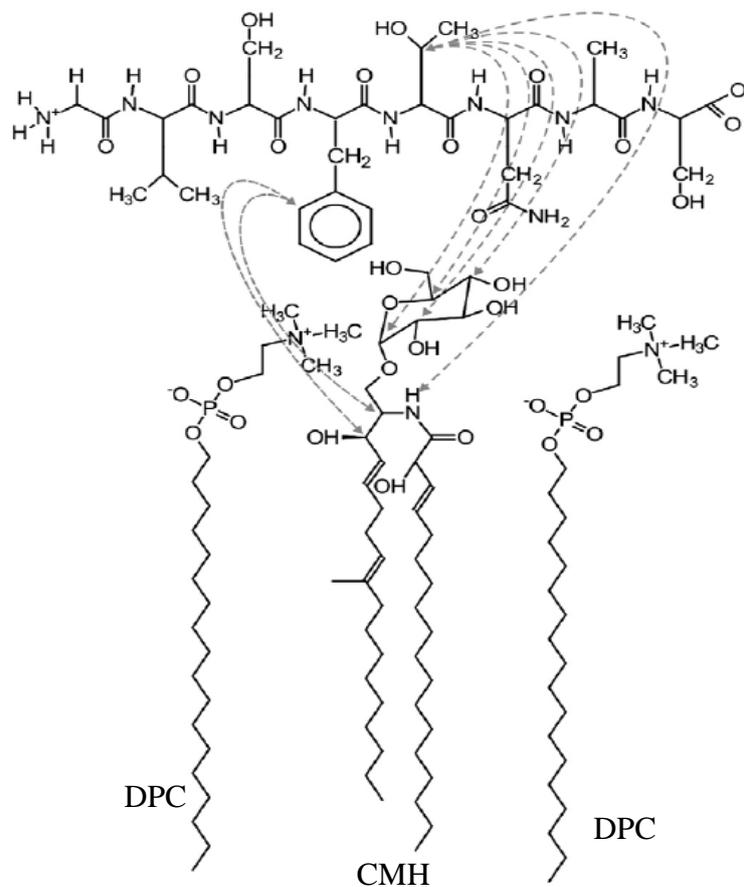


Figura 24: Representação do pepLoop1, dois monômeros de DPC e um de CMH. As setas mostram os NOEs intermolecular obtidos do espectro de NOESY com tempo de mistura de 150 ms. Todos os experimentos fora feitos com 3,6 mM de pepLoop1, 20 mM de fosfato de sódio e 300 mM de DPC e ainda de 10,8 mM de CMH (B). Notar que a interação do peptídeo com CMH ocorreu através do contato da cadeia lateral da Phe15 com grupos alifáticos e da Thr16 com a glicose. Não foi observada NOE com DPC porque ele é 1 % protonado.

Estudos com peptídeos corroboram a afirmação que fragmentos de defensinas conservam suas propriedades de interação e que peptídeos derivados da proteína são em alguns casos mais potentes que a fonte. Um grande esforço tem sido empregado no entendimento da relação estrutura – função de peptídeos que desestabilizam membrana com o objetivo de fazer o designer racional de novos peptídeos que são potencialmente importantes para aplicações biotecnológicas no campo de antibióticos, biosensores e transporte de drogas.

Como na interação do pepLoop1 com o CMH foi possível ver atômica e diretamente os resíduos envolvidos nesse reconhecimento, nós pensamos em analisar a estrutura da rPsd1 com o CMH para reconhecer esses mesmos resíduos e eventualmente outros que também participam dessa interação. Como já foi dito, frequentemente regiões da proteína que participam de reconhecimento apresentam movimentos na escala de tempo de mili a microsegundos e a Psd1 apresenta duas regiões que tem esses movimentos característicos, o Loop1 e uma outra região conhecida como Turn 3, formada pelos resíduos 37 ao 39.

Contudo a proteína quando interagiu com o glicosfingolípido apresentou um alargamento de sinal exatamente nessas regiões e ainda alguns resíduos foram tão afetados pela adição do CMH que suas ressonâncias não puderam ser vistas nos espectros. Os resíduos presentes na interface de interação do estado ligado experimentam um ambiente químico diferente daquele do estado livre e suas ressonâncias amídicadas exibem um alargamento de linha dos seus sinais devido à interconversão entre estes dois ambientes quando os estados livre e ligado estão em equilíbrio (Ishima *et al.*, 2000).

Esses dados corroboram que essas regiões participam desse processo de reconhecimento da proteína pelo glicosfingolípido mas com o desaparecimento dos sinais não foi possível identificar a presença de NOEs entre eles. Ainda o assinalamento da proteína não está completo devido à falta das ressonâncias desses aminoácidos. Experimentos em diferentes temperaturas foram feitos e estão sendo analisados para tentar encontrar as ressonâncias desses resíduos. Ainda assim, como a maioria dos aminoácidos foram assinalados foi possível inferir as regiões de estruturas secundárias regulares a partir dos valores de deslocamento químico de $^1\text{H}^\alpha$.

Já é conhecido na literatura que os resíduos presente no Turn 3 são os maiores responsáveis pela atividade antifúngica da defensina. Na Psd1 ela é composta por Asn37, Trp38 e Lys39, e esses dois últimos resíduos desaparecem na presença de DPC:CMH (figura 24 – resíduos coloridos em azul). Na defensina de Rs-AFP₂ a inserção de um aminoácido de carga positiva na posição 39 resulta num mutante que tem uma alta atividade antifúngica comparada com a defensina selvagem e a substituição da Lisina por uma Glutamina diminui a atividade. Essa relação entre atividade antimicrobiana e carga positiva tem sido usada para revelar os aminoácidos importantes na interação (Terras *et al.*, 1992). Contudo nem todas as inserções de resíduos positivos aumentou a atividade antifúngica mostrando a existência de um lugar característico de interação (De Samblanx *et al.*, 1997).

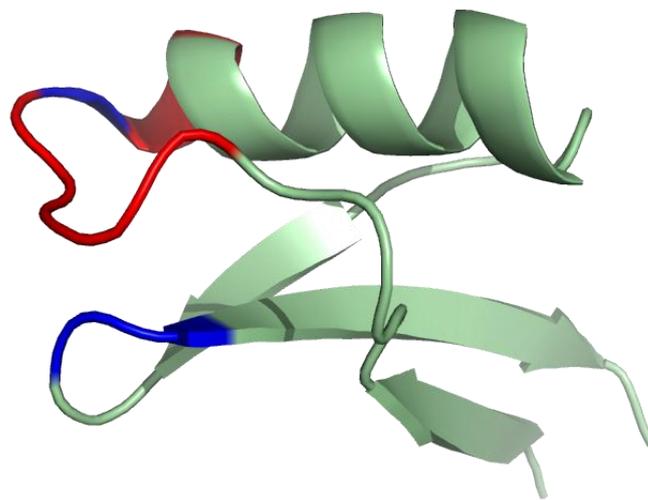


Figura 25: Estrutura da rPsd1. Os resíduos coloridos em azul sumiram do HSQC quando foi adicionado DPC:CMH e os resíduos em vermelho apresentaram os seus deslocamentos bastantes perturbados quando da adição da membrana.

Nos últimos anos, uma nova visão de ligação e alosteria tem sido deduzida, a partir do comportamento dinâmico das proteínas em seus estados livres. Neste estado as

regiões de reconhecimento estão em equilíbrio entre duas ou mais conformações e a ligação a um determinado substrato protéico estaria selecionando uma conformação que já existiria no estado livre da proteína. Desta maneira, nenhuma mudança conformacional seria requerida para a ligação. A ligação estaria apenas deslocando o equilíbrio em direção ao estado conformacional ligado. Com este modelo, a entropia conformacional não seria tão reduzida, em oposição ao modelo de ajuste induzido, contribuindo positivamente para a energia livre de ligação (Valente *et al.*, 2006). No modelo de ajuste induzido, a interação inicial entre a proteína e o ligante induz a uma mudança conformacional na proteína num processo gradativo. Esta nova visão é conhecida como seleção conformacional e foi descrita pela primeira vez por Dill e Chan em 1997. A técnica de RMN é particularmente efetiva em revelar a verdadeira diversidade conformacional em proteínas. Análises por RMN tem demonstrado de fato que proteínas podem adotar diferentes conformações em solução na ausência do ligante (Choy e Forman-Kay, 2001; James and Tawfik, 2003; Valente *et al.*, 2006; Henzler-Wildman and Kern., 2007; Csermely *et al.*, 2010).

Os dados de dinâmica da Psd1 livre somados aos dados de perturbação do descolamento químico dessa mesma região na presença de CMH argumentam fortemente em favor da hipótese de que a Psd1 adota diferentes conformações no estado livre acordando com a nova visão de seleção conformacional que algumas regiões da proteína experimentam vários estados conformacionais e que essas estão envolvidas em processos de reconhecimento e no desempenho do seu papel biológico. A ligação específica da Psd1 com o CMH já está codificada na proteína.

A figura 25 mostra os dois modelos estudados de reconhecimento entre proteína e ligantes. A seleção conformacional é muito mais adequada se formos pensar em

evolução e ainda na capacidade das proteínas de se ligarem a diferentes alvos (promiscuidade funcional) e com isso serem capazes de realizar diferentes funções. A visão tradicional de especificidade funcional e absoluta de uma única estrutura bem definida provavelmente não respondem as pressões evolutivas.

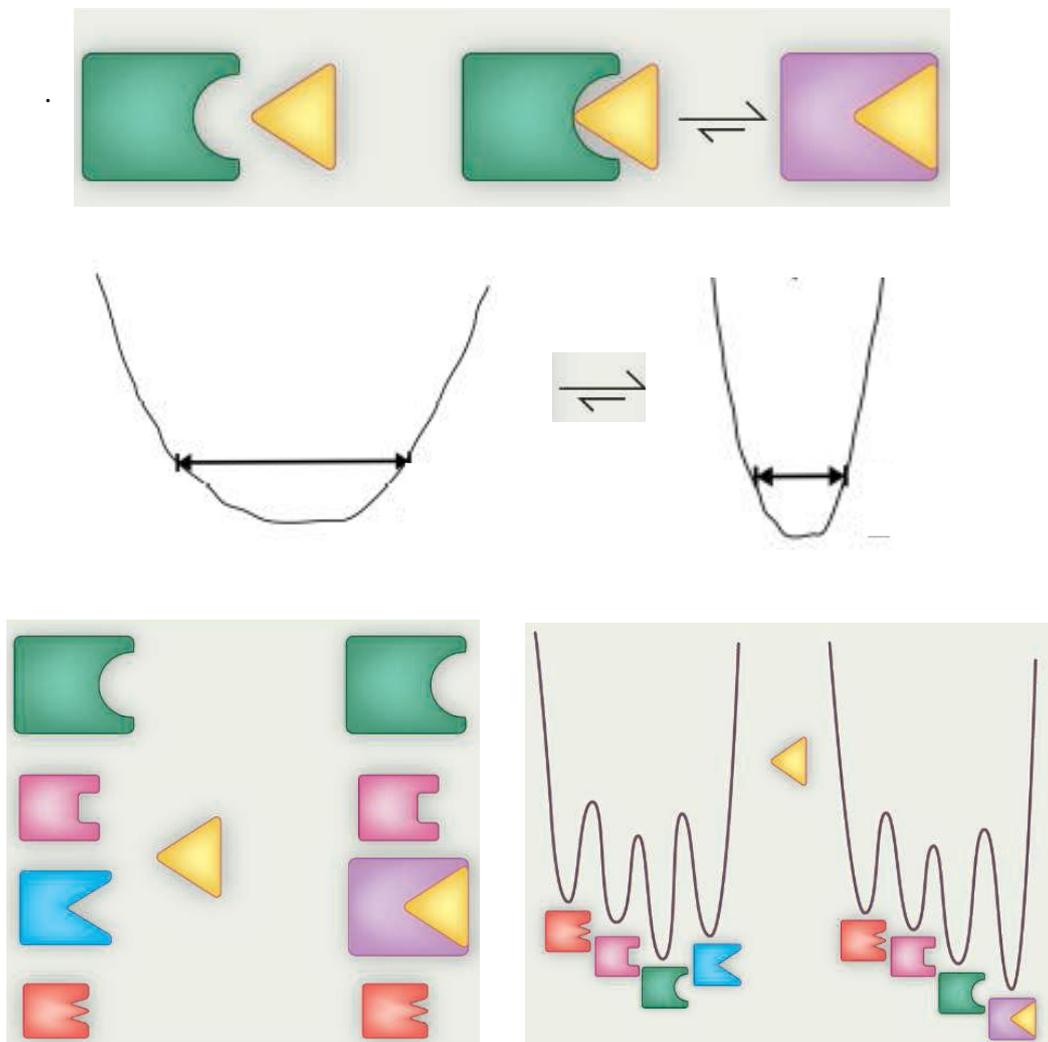


Figura 26: Mecanismos de Reconhecimento Molecular Molecular em Proteínas. A: Modelo do ajuste induzido – Interação inicial entre a proteína e o ligante, seguida de mudança conformacional que atua para otimizar a interação. Abaixo é visto o *Energy Landscape* representativo da mudança estrutural induzida pela ligação. B: Modelo de Seleção Conformacional – Várias conformações em equilíbrio e na presença de um ligante, uma conformação é reconhecida. Abaixo é visto o *Energy Landscape* representativo da seleção de uma das conformações existentes no equilíbrio (Boehr e Wright, 2008)

Conformações que são pré-existent no estado livre da Psd1 (loop1 e turn 3) são importantes para o reconhecimento de receptores presentes na membrana de fungos.

Os dados com o peptídeo mostram a interação específica dos resíduos do loop com o CMH podendo ajudar a compreender a relação estrutura-função de peptídeos que reconhecem e interagem com membranas com alvos específicos na membrana de patógenos com o objetivo de desenhar novos agentes terapêuticos para tratar doenças infecciosas e também no combate à resistência aos antibióticos.

6. Conclusões

O loop1 da Psd1 é uma região muito importante para a interação da proteína com a membrana e provavelmente para a sua atividade. A partir disso, um peptídeo correspondente aos resíduos do loop1 foi sintetizado quimicamente (pepLoop1).

O pepLoop1 teve sua estrutura resolvida na presença de micela de dodecilsfosfatilcolina (DPC) e apesar de ser um peptídeo com oito resíduos apresentou uma estrutura bastante convergente. Os resíduos Val13, Phe15 e Ala18 formam uma superfície hidrofóbica que provavelmente está revestindo a micela. Também foi feita a estrutura do peptídeo na presença de DPC e CMH. O CMH é um glicosfingolípido presente na membrana de fungos e tem sido proposto como sendo o primeiro alvo da ação das defensas de plantas que possuem atividade antifúngica.

Quando o CMH é adicionado então muitos NOEs são perdidos e a estrutura do pepLoop1 se torna mais estendida, contudo é observado NOEs entre o peptídeo e o CMH. Dois resíduos do pepLoop1 estão diretamente envolvidos na interação. A Phe15 através dos hidrogênios Delta interagindo com Hidrogênios da cauda ceramida do CMH e a Thr16 através dos Hidrogênios Beta que interage com os Hidrogênios presentes na porção glicídica. Esses resíduos são bastante conservados nas defensas de planta e isso sugere que essas proteínas tenham conservado um sítio de interação com o CMH.

Baseados nos resultados do peptídeo correspondente ao loop1 da Psd1, nós decidimos analisar a estrutura da proteína inteira na presença de DPC e CMH para identificar se os resíduos que interagem entre o peptídeo e as membranas são os mesmos envolvidos na interação da Psd1 e ainda identificar outros resíduos na proteína que participam dessa interação, resíduos estes que são apresentados como essenciais

para a atividade antifúngica das defensinas. A interação da rPsd1 com DPC:CMH foi monitorada através do alargamento de linha diferencial das ressonâncias amídicicas comparando-as com a da proteína livre.

Como a proteína já foi assinalada foi feita um assinalamento por comparação contudo dos 46 resíduos da proteína 19 não puderam ser assinalados pois suas ressonância aparecem no HSQC mas as mesmas não são vistas no NOESY e TOCSY. Ainda toda a região do loop1 tiveram seus deslocamentos bastantes alterados no HSQC e três resíduos não puderam ser visualizados. Os aminoácidos do Turn 3 que é uma região já conhecida como sendo responsável pela atividade das defensinas de plantas e o resíduo 16 pertencente ao loop1 que foi visto nos experimentos com o peptídeo interagindo com o CMH. Por fim, estes resíduos correlacionam bem com os resíduos identificados como importantes para a interação entre a proteína e o glicosfingolípido.

7. Referências

1. Aerts, A. M.; François, I. E. J.A.; Cammue, B. P. A.; Thevissen, K., The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**, 2069-2079.
2. Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O., Pathogen recognition and innate immunity, *Cell*, **2006**, 783-801.
3. Almeida, M. S.; Cabral, K. M. S.; Kurtenbach, E.; Almeida, F. C. L.; Valente, A. P., Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: Plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action, *J. Mol. Biol.*, **2002**, 749-757.
4. Almeida, M. S.; Cabral, K. M. S.; Zingali, R. B.; Kurtenbach, E., Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2000**, 278-286.
5. Andersson, A.; Almqvist, J.; Hagn, F.; Måler, L., Diffusion and dynamics of penetratin in different membrane mimicking media, *Biochim Biophys Acta.*, **2004**, 18-25.
6. Andres, E. e Dimarcq, J. L., Cationic antimicrobial peptides: update of clinical development, *Journal of Internal Medicine*, **2004**, 519-520.

7. Braunschweiler, L.; Bodenhausen, G.; Ernst, R. R., New approaches to the dynamic interpretation and prediction of NMR relaxation data from proteins, *Mol. Phys.*, **1983**, 535-560.
8. Brown, K. L. e Hancock, R. E. W., Cationic host defense (antimicrobial) peptides, *Current Opinion in Immunology*, **2006**, 24-30.
9. Cabral, K. M. S.; Almeida, M. S.; Valente, A. P.; Almeida, F. C. L.; Kurtenbach, E., Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd1) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. *Protein Express. Purif.*, **2003**, 115-122.
10. Carvalho A.O. e Gomes, V. M., Plant defensins—Prospects for the biological functions and biotechnological Properties, *Peptides*, **2009**, 1007-1020.
11. Charlet, M.; Chernysh, S.; Philippe, H.; Hetru, C.; Hoffmann, J. A.; Bulet, P., Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis* *J. Biol. Chem.*, **1996**, 21808-21813.
12. Chisholm, S. T.; Coaker, G.; Day, B.; Staskawicz, B. J., Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response, *Cell*, **2006**, 803-814.

13. Choy, W. Y. e Forman-Kay, J. D., Calculation of ensembles of structures representing the unfolded state of an SH3 domain, *Journal of Molecular Biology*, **2001**, 1011-1032.
14. Clore, G. M. e Gronenborn, A. M., Structures of larger proteins in solution: three- and four-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy, *Science*, **1991(a)**, 1390-1399.
15. Clore, G. M. e Gronenborn, A. M., Determining the structures of large proteins and protein complexes by NMR, *Trends Biotech.*, **1998**, 22-34.
16. Cohn, J.; Sessa, G.; Martin, G. B., *Current Opinion in Immunology*, **2001**, 55-62.
17. Craik, D. J., *Toxicon*, **2001**, 1809-1813.
18. Cruzeiro-Silva, C.; Gomes-Neto, F.; Tinoco, L.W. ; Cilli, E. M.; Barros, P.V.; Lapidou-Loureiro, P.A.; Bisch, P.M.; Almeida, F.C. L.; Valente, A.P., *Biochim Biophys Acta*, **2007**, 3182-3192.
19. Csermely, P.; Palotai, R.; Nussinov, R., *Nature Precedings*, **2010**, hdl:10101/npre.2010.4422.1
20. Cunliffe, R. N., alpha-Defensins in the gastrointestinal tract, *Molecular Immunology*, **2003**, 463-467.

21. David D. Boehr, D. D. e Wright, P. E., How Do Proteins Interact? *Biochemistry*, **2008**, 1429-1430.
22. De Samblanx, G.W.; Goderis, I. J.; Thevissen, K.; Raemaekers, R.; Fant, F.; Borremans, F., Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity *J. Biol. Chem.*, **1997**, 1171-1179.
23. Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G. W.; Zhu, G.; Pfeifer, J.; Bax, A., NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J. Biomol. NMR.*, **1995**, 277-293.
24. 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. Mol. Biol.*, **2008**, 321-335.
25. Derome, A. E., *Modern NMR Techniques for Chemistry Research Pergamon Press*, **1995**.
26. Dong, X. *Current Opinion in Plant Biology*, SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants, **1996**, 316-323.

27. Falco, A.; Chico, V.; Marroqui, L.; Perez, L.; Coll, J. M.; Estepa, A., Expression and antiviral activity of a β -defensin-like peptide identified in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EST sequences, *Mol. Immunol.*, **2008**, 757-765.
28. Ferket, K. K. A.; Levery, S. B.; Park, C.; Cammue B. P. A.; Thevissen K., Isolation and characterization of *Neurospora crassa* mutants resistant to antifungal plant Defensins, *Fung. Genet. Biol.*, **2003**, 176-85.
29. Fiaux, J.; Bertelsen, E. B.; Horwich, A. L.; Wüthrich, K., NMR analysis of a 900K GroEL-GroES complex, *Nature*, **2002**, 207-211.
30. Francois, I.E.; Aerts, A. M.; Cammue, B. P. A.; Thevissen, K., Currently used antimycotics: spectrum, mode of action and resistance occurrence, *Curr Drug Targets*, **2005**, 895-907.
31. Ganz, T.; Selsted, M. E.; Szklarek, D.; Harwig, S. S. L.; Daher, K.; Baintone, D. F.; Lehrer, R., *J. Clin. Invest.*, **1985**, 1427-1435.
32. Gao, A.G.; Hakimi, S. M.; Mittanck, C. A.; Wu, Y.; Woerner, B. M., Stark, D. M.; Shah, D. M.; Liang, J.; Rommens, C. M., Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide, *Nature Biotechnology*, **2000**, 1307-1310.
33. García-Olmedo, F.; Molina, A.; Alamillo, J. M.; Rodríguez-Palenzuela, P., Plant defense peptides, *Biopolymers (Peptide Science)*, **1998**, 479-491.

34. Gil, V. M. S e Geraldles, C. F. G. C., *Ressonância Magnética Nuclear, fundamentos, métodos e aplicações*, **1987**.
35. Giulliani, A.; Pirri, G.; Nicoletto, S. F., *Central European Journal of Biology*, **2007**, 1-33.
36. Harris, R. K. Nuclear Magnetic Resonance. *A Physicochemical View Longman Scientific e Technical*, **1986**.
37. Henzel-Wildman, K. e Kern, D., Dynamic personalities of proteins, *Nature*, **2008**, 964-972.
38. Ishima, R. e Torchia, D., Protein dynamics from NMR, *Nat. Struct. Biol.*, **2000**, 740-743.
39. Jablonsky, M. J.; Jackson, P. L.; Krishna, N. R., Solution Structure of an Insect-Specific Neurotoxin from the New World Scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing, *Biochemistry*, **2001**, 8273–8282.
40. James, L. C. e Tawfik, D. S., Conformational diversity and protein evolution – a 60 year old hypothesis revisited, *Trends Biochem. Sci. (TiBS)*, 2003, 361-368.

41. Janssen, B. J.; Schirra, H. J.; Lay, F. T.; Anderson, M. A.; Craik, D. J., Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds, *Biochemistry*, **2003**, 8214-8222.
42. Jeener, J.; Méier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R., Investigation of exchange processes by two-dimensional spectroscopy, *J. Chem. Phys.*, **1979**, 4546-4553.
43. Jelinek, R. e Kolusheva, S., Membrane interactions of host defense peptides studied in model systems, *Current Protein and Peptide Science*, **2005**, 103-114.
43. Johnson, B. A. e Blavins, R. A., NMR View – a computer program for the visualization and analysis of NMR data, *J. Biol. NMR*, **1994**, 603-614.
44. Jones, J. D. G. e Dangl, J. L., *The plant immune system*, **Nature**, 2006, 323-329.
45. Kanzaki, H.; Nirasawa, S.; Saitoh, H.; Ito, M.; Nishihara, M.; Terauchi, R., *Theor. Appl. Genet.*, **2002**, 8098-8114.
46. Kay, L. E.; Ikura, M.; Tschudin, R.; Bax, A., Three-dimensional triple Resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins *J. Magn. Res.*, **1990**, 496-514.
47. Kushmerick, C.; Castro, M. S.; Cruz, J. S.; Bloch Jr., C.; Beirão, P. S. L., Functional and Structural features of γ -zeathionins, a new class of sodium channel blockers, *FEBS Lett.*, **1998**, 302-306.

48. Lambert, J.; Keppi, E., Dimarcq, J. L.; Wicker, C.; Reichhart, J. M.; Dunbart, B., Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1989**, 262-266.
49. Landon, C.; Thouzeau, Labbe, C. H.; Bulet, P.; Vovelle, F., *J. Biol. Chem.*, **2004**, 3043-30439.
50. Lay, F.T. e Anderson, M.A., Defensins – Components of the innate immune system in plants, *Current Protein and Peptide Science*, **2005**, 85-101.
51. Lay, F.T.; Brugliera, F.; Anderson, M. A., Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia, *Plant Physiology*, **2003**, 1283-1293.
52. Lehrer, R. I. e Ganz, T., Defensins of vertebrate animals, *Curr. Opin. Immunol.*, **2002**, 96-102.
53. Lipari, G.; Szabo, A., Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. I. Theory and range of validity *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 4546-4559.
54. Lobo, D. S.; Pereira, I. B.; Fragel-Madeira, L.; Medeiros, L. N.; Cabral, L. M.; Faria, J.; Campos, M. B.; Linden, R. C. R.; Kurtenbach, E., Antifungal *Pisum sativum*

defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle
Biochemistry, **2007**, 987-996.

55. Marcos, J. F.; Munoz, A.; Perez-Pay, E.; Misra, S.; e Lopez-Garcia, B.,
Identification and Rational Design of Novel Antimicrobial Peptides for Plant Protection,
Annu. Rev. Phytopathol., **2008**, 273-301.

56. Martin, M. L.; Delpuech, J. J.; Martin, G. J., *Practical NMR Spectroscopy Heyden e
Son Ltd*, London, **1980**.

57. Matthews, P. S. C., *Quantum Chemistry of Atoms and Molecules Cambridge
University Press*, **1986**.

58. Mendez, E.; Moreno, A.; Colilla, F.; Pelaez, F. G.; Limas, G.; Mendez, Primary
structure and inhibition of protein synthesis in eukariotic cell-free system of a novel
thionin, gammahordothionin, from barley endosperm, *R. Eur. J. Biochem.*, **1990**, 533-
539.

59. Molina, A. e García-Olmedo, F., Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused
by transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2, *Plant J.*, **1997**, 669-675.

60. Mygind, P.H.; Fischer, R. L.; Schnorr, K. M.; Hansen, M. T.; Sönksen, C. P.;
Ludvigsen, S.; Raventós, D.; Buskov, S.; Christensen, B.; De Maria, L.; Taboureau,
O.; Yaver, D.; Elvig-Jørgensen, S. G.; Sørensen, M. V.; Christensen, B. E.; Kjaerulff,

S.; Frimodt-Moller, N.; Lehrer, R. I.; Zasloff, M.; Kristensen, H. H., Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus *Nature*, **2005**, 975-980.

61. Nascimento, C. H. e Bloch Jr., C., Ressonância Magnética Nuclear: *Gradus Primus* Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, **2001**.

62. Nguyen, T. X.; Cole, A. M.; Lehrer, R. I., Evolution of primate θ -defensins: a serpentine path to a sweet tooth, *Peptides*, **2003**, 1647-1654.

63. Nurnberger, T.; Brunner, F.; Kemmerling, B.; Piater, L., Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences, *Immunological Reviews*, **2004**, 249-266.

63. Overhauser, A., Polarization of nuclei in metals, *Phys. Rev.*, **1953**, 411-415.

64. Palmer, A.G.; Kroenke, C. D.; Loria, J.P., NMR probes of molecular dynamics: overview and comparison with other techniques, *Methods Enzymol.*, **2001**, 204-238.

65. Papo, N. e Shai, Y., Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model membranes? *Peptides*, **2003**, 1693-1703.

66. Pervushin, K.; Riek, R.; Wider, G.; Wüthrich, K., Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an

avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **1997**, 12366-12371.

67. Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V., Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solution, *J. Biomol. NMR.*, **1992**, 661-665.

68. Roch, P.; Yang, Y.; Toubiana M.; Aumelas, A., *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 227–238.

69. Salzmann, M.; Pervushin, K.; Wider, G.; Senn, H.; Wüthrich, K., NMR assignment and secondary structure determination of an octameric 110 kDa protein using TROSY in triple resonance experiments, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 543-7548.

70. Sanders, J. K. M. e Hunter, B. K., *Modern NMR Spectroscopy: A Guide for Chemistry oxford University*, **1993**.

71. Schwieters, C. D. e Clore, G. M., The VMD-XPLOR visualization package for NMR structure refinement, *J Magn Reson.*, **2001**(b), 239-244.

72. Segura, A.; Moreno, M.; Madueno, F.; Molina, A. e García-Olmedo, F., Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens, *Mol. Plant Microbe Interact*, **1999**, 16-23.

73. Segura, A.; Moreno, M.; Molina, A.; García-Olmedo, F., Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*), *FEBS Lett.*, **1998**, 159-62.
74. Selsted, M. e Ouellette, A. J., Mammalian Defensins in the antimicrobial immune response, *Nature Immunology*, **2005**, 551-557.
75. Silverman-Gavrila, L. B. e Lew, R. R., A IP₃-activated Ca²⁺ channel regulates fugal tip growth, *J. Cell. Sci.*, **2002**, 5013-5025.
76. Stotz, H. U.; Thomson, J.; Wang, Y., Plant defensins: Defense, development and application *Plant Signaling and Behaviour*, **2009**, 1010-1013.
77. Strauss, H. L., *Quantum Mechanics – An Introduction Prentice Hall*, **1968**.
78. Terras, F. R. G.; Schoofs, H.; De Bolle, M. F. C.; Van Leuven, F.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J.; Cammue, B. P. A.; Broekaert, W. F., *J. Biol. Chem.*, A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species, **1992**, 15301-15309.
79. Terras, F. R.; Eggermont, K.; Kovaleva, V.; Raikhel, N. V.; Osborn, R. W.; Kester, A. Rees, S. B.; Torrekens, S.; Van Leuven, F.; Vanderleyden, J., Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: Their role in host defense *Plant Cell*, **1995**, 573-588.

80. Thevissen, K.; Cammue, B. P. A.; Lemaire, K.; Winderickx, J.; Dikson, R. C.; Lester, R., A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), *Proc Natl.*, **2000**, 9531-9536.
81. Thevissen, K.; Ferket, K. K. A. François, I. E. J. A.; Cammue, B. P. A., Interactions of antifungal plant defensin with fungal membrane components, *Peptides*, **2003**, 1705-1712.
82. Thevissen, K.; Ghaze, A.; De Samblanx, G. W.; Brownlee, C.; Osborn R. W.; Broekaert, W. F., Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 15018-15025.
83. Thevissen, K.; Kristensen, H.; Thomma, B.; Cammue, B.; François, I., Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins, *Drug discovery today*, **2007**, 966-971.
84. Thevissen, K.; Osborn, R.W.; Acland, D. P.; Broekaert, W. F., A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), *Mol. Plant. Microb. Interact.*, **2000**, 54-61.
85. Thevissen, K.; Terras, F. R. G.; Broekaert, W. F., Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1999**, 5451-5418.

86. Thomma, B. P. H. J.; Cammue, B. P. A.; Thevissen, K., Plant defensins, *Planta*, **2002**, 193-202.
87. Toledo, M. S.; Levery, S. B.; Bennion, B.; Guimarães, L. L.; Castle, S. A.; Lindsey, R.; Momany, M.; Park, C.; Straus, A. H.; Takahashi, H. K., Analysis of glycosylinositol phosphorylceramides expressed by the opportunistic mycopathogen *Aspergillus fumigatus*, *J. Lipid Res.*, **2007**, 1801-1824.
88. Trabi, M.; Schirra, H. J.; Craik, D. J., Three-dimensional structure of RTD-1, a cyclic antimicrobial defensin from rhesus macaque leukocytes, *Biochemistry*, **2001**, 4211-4221.
89. Traficante, D. D., *Concepts in Magnetic Resonance*, **1989**, 7-13.
90. Tugarinov, V.; Muhandiram, R.; Ayed, A.; Kay, L. E., Four-dimensional NMR spectroscopy of a 723-residue protein: chemical shift assignments and secondary structure of malate synthase g, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 10025-10035.
91. Valente, A. P.; Miyamoto, C. A.; Almeida, F. C. L., Implications of protein conformational diversity for binding and development of new active compounds, *Curr. Med. Chem.*, **2006**, 3697-3703.

92. Vila-Perelló, M.; Sanchez-Vallet, A.; Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Andreu, D., Structural dissection of a highly knotted peptide reveals minimal motif with antimicrobial activity, *J. Biol. Chem.*, **2005**, 1661-1668.
93. Vila-Perelló, M.; Sanchez-Vallet, A.; Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Andreu, D., Synthetic and structural studies on *Pyricularia pubera* thionin: A single-residue mutation enhances activity against Gram-positive bacteria, *FEBS Lett.*, **2003**, 215-219.
94. Vila-Perelló, M.; Togno, S.; Sanchez-Vallet, A.; Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Andreu, D., A Minimalist Design Approach to Antimicrobial Agents Based on a Thionin Template, *J. Med. Chem.*, **2006**, 448-451.
95. Wishart, D. S. e Sykes, B. D., The ¹³C chemical shift index. A simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical shift data, *J. Biomol. NMR*, **1994**, 171-180.
96. Wit, P. J. G. M., How plants recognize pathogens and defend themselves, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2007**, 2726 -2732.
97. Wu, Z.; Hoover, D. M.; Yang, D.; Boulegue, C.; Santamaria, F.; Oppenheim, J. J.; Lubkowski, J.; Lu, W., **Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3**, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2003**, 8880-8885.

98. Wüthrich, K., *NMR of proteins and Nucleic Acids. Jon Wiley and Sons, 1986.*
99. Yang, Y.S.; Mitta, G.; Chavanieu, A.; Calas, B.; Sanchez, J. F.; Roch, P.; Aumelas, A., Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil derived neurotoxin in host defense, *Biochemistry*, **2000**, 14436-14447.
100. Zhu, Y.J.; Agbayani, R.; Moore, P. H., Ectopic expression of *Dahlia merckii* defensin Dm-AMP1 improves papaya resistance to *Phytophthora palmivora* by reducing pathogen vigor, *Planta*, **2007**, 87-97.

8. Anexos

Artigo 1: Backbone dynamics of the antifungal Psd1 pea defensin and its correlation with membrane interaction by NMR spectroscopy (artigo publicado na revista *Biochimica et Biophysica Acta*)

Artigo 2: NMR Metabolomics identified the profile of systemic healthy children with and without caries lesion. (artigo submetido à revista *Analytical Biochemistry*)



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

Luciano Neves de Medeiros^{a,b,1}, Renata Angeli^{b,1}, Carolina G. Sarzedas^b, Eliana Barreto-Bergter^c, Ana Paula Valente^{b,*}, Eleonora Kurtenbach^a, Fabio C.L. Almeida^{b,*}

^a Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Biologia Molecular e Estrutural, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

^b Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Biologia Estrutural, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

^c Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, 21941-900, Rio de Janeiro RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2009

Received in revised form 25 June 2009

Accepted 8 July 2009

Available online 24 July 2009

Keywords:

Plant defensin
Membrane
Membrane protein
NMR
Dynamic
Lipari–Szabo
Antimicrobial
Fungus
Protein recognition
Membrane recognition
Transient interaction
Psd1
Antifungal

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, R1 and R2 ^{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 R2 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.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

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 transcripts 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 [5–8].

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 evidence 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

Abbreviations: CMH, monohexosylceramide; CSP, chemical shift perturbation; DmAMP, *Dahlia merckii* antimicrobial peptide; DPC, dodecylphosphocholine; Het-NOE, Heteronuclear ^{15}N Nuclear Overhauser Enhancement; $-M(\text{IP})_2\text{C}$, mannosyl diinositolphosphoryl-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

* Corresponding authors.

E-mail addresses: valente@cnrmn.bioqmed.ufjr.br (A.P. Valente), falmeida@cnrmn.bioqmed.ufjr.br (F.C.L. Almeida).

¹ Both authors contributed equally to this work.

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 evidence 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 ¹⁵N longitudinal relaxation (T₁), transverse relaxation (T₂), and ¹⁵N–¹H heteronuclear NOE of a uniformly ¹⁵N 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 access the importance of conformation selection for protein-membrane binding. We used PRE (paramagnetic relaxation enhancement) effect to investigate the conformation 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. [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 rPsd1 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 μs–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-phosphatidylcholine (PC) from egg yolk was purchased from Avantis Corp.; Perdeuteretade D38-dodecylphosphocholine (DPC) and ¹⁵NH₄Cl was purchased from Cambridge Isotope Laboratory; Monohexosylceramide (CMH) from *F. solani* was isolated as described by Duarte et al. [32]. All other chemicals were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). All products were of analytical grade.

2.1. *P. pastoris* expression and purification of ¹⁵N 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 ¹⁵NH₄Cl. The induction of rPsd1 synthesis was carried out for 120 h by daily supplementation of 0.7% methanol. The crude culture was applied to a Toyopearl SP-650 M 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. Vesicle 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 WATER-GATE technique [34,35].

2.3.1. Relaxation parameters

¹⁵N 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. [36]. T1, T2 and NOE spectra were recorded with spectral widths of 1024×256 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 T1 and T2 measurements was 4 and 2 s, respectively. T1 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; and 1.250 s. T2 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; and 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-Szabó 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 - ^{15}N heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectra with $1024 \text{ points} \times 256 \text{ points}$. NMR spectra were recorded on 0.5 mL samples of 50–200 μM ^{15}N -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: $\Delta\delta = (\Delta\delta_{\text{H}}^2 + \Delta\delta_{\text{N}}^2 / 10)^{1/2}$ in ppm, and $\Delta\delta_{\text{H}}$ or $\Delta\delta_{\text{N}}$ 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 μM) or pepLoop1 (3.6 mM) 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 $^3\text{J}_{\text{HNH}\alpha}$. According to Fig. 6, when $^3\text{J}_{\text{HNH}\alpha}$ was higher than 8 Hz we used the phi angle restrained to from 90° to 150° . The $^3\text{J}_{\text{HNH}\alpha}$ 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 1](#).

3. Results

3.1. Psd1 backbone dynamics in the free state

The backbone dynamics of rPsd1 have been determined through solution NMR measurements of relaxation parameters R1, R2 and steady-state NOE of the amide group resonances. Fig. 1 shows the relaxation measurements values for the rPsd1 amino acid residues. Most of Psd1 residues showed similar values for R1, R2 and NOE compatible with the defensin fold and therefore stable secondary structure elements. Gly12 is the only residue that showed reduced

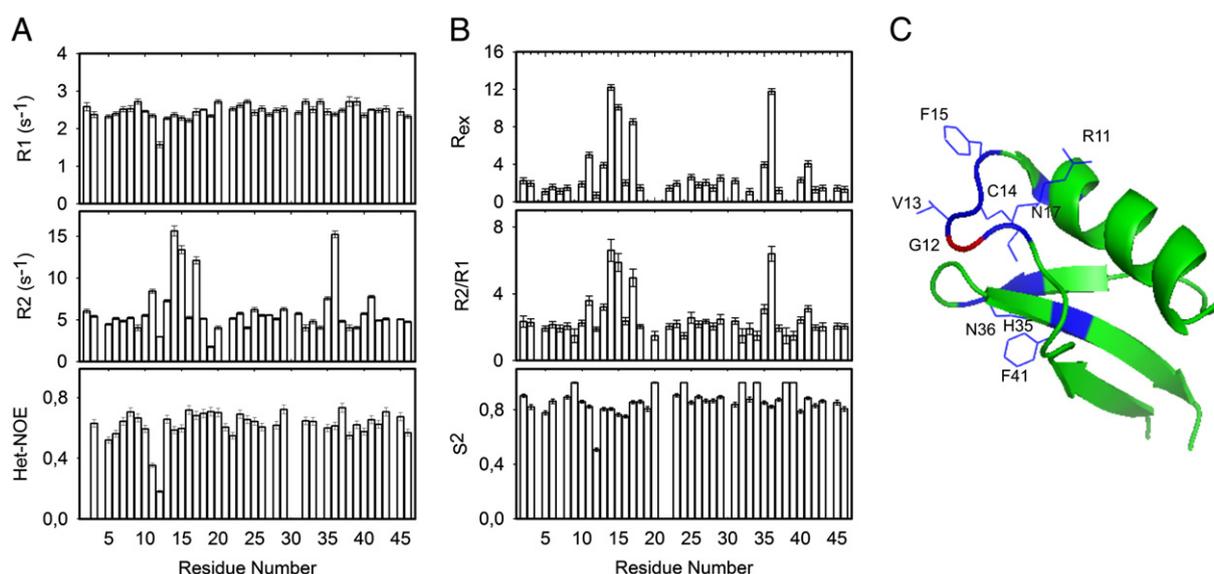


Fig. 1. ^{15}N backbone relaxation measurements for Psd1 free in solution. (A) R1, R2, and $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ heteronuclear NOE plotted as a function of the residue number for Psd1. Values of R1 and R2 were obtained from the fit as single exponential decay of the time dependence of the relaxation 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-Szabó model-free analysis of ^{15}N relaxation data of Psd1. The figure shows R_{ex} , R2/R1 and order parameter (S^2) plotted as a function of the residue number for Psd1. The experiments were run at 25°C . (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.

values of R1, R2 and HNNOE, indicating the presence of motion in the timescale of picoseconds. R2 values in the first loop (Ala7–Asn17) and Turn3 (His36–Trp38) showed bigger values than the average, typical of internal motion in μs – 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 μs – ms (Rex). 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 Rex, was necessary to correctly describe the dynamics around the loops, especially Loop1 (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 R2/R1 ratio. Values of R2/R1 bigger than the average value can be readily attributed to conformational exchange, especially for Psd1 as shown in Fig. 2. In the present manuscript we will use R2/R1 ratio to compare the milli- to microsecond motion 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 Rex by using the extended Lipari–Szabo model-free formalism or by looking at R2/R1 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, Phe15 and Asn17, resulting in positive values of Rex and residues Cys35 and His36, close to Turn3. The correlated motion between Loop1 and Turn3 is not surprising, since they are connected via disulfide bond (Cys14–Cys35). Fig. 1 shows the ribbon representation of Psd1 where the amino acids with conformational exchange (high Rex) 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.

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

We used chemical shift perturbation (CSP) to monitor rPsd1 interaction with PC and PC:CMH vesicles. We acquired HSQC spectra of the ^{15}N labeled rPsd1 free and in the presence of vesicles prepared with PC and PC:CMH (molar ratio 9:1). Fig. 2 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 rPsd1 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 Fig. 2 shows the limit of one standard deviation. In Fig. 2 the residues with CSP above the line are highlighted. Note that the perturbed regions are predominantly positive (Fig. 2), 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 reinforce that the Coulombic attraction as the first binding event.

Also CSP decreases with the increase of protein concentration, showing a saturation behavior. The effect showed in Fig. 2 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-saturating 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 (Fig. 2, red bars). They are highlighted in red in Fig. 2. 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.

3.3. 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, τ_m , and motions in μs – 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 (Fig. 3). 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 (Fig. 3, red). In opposition, residues Asn17, His29, His36, Asn37 and Trp38 had an increase in the R2/R1 ratio (Fig. 3, magenta). As expected, the amino acids with that presented bigger changes colocalize 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 (Fig. 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 effect in Rex. Probably, conformational selection is taking place, but the transient binding prevent 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.

3.4. 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

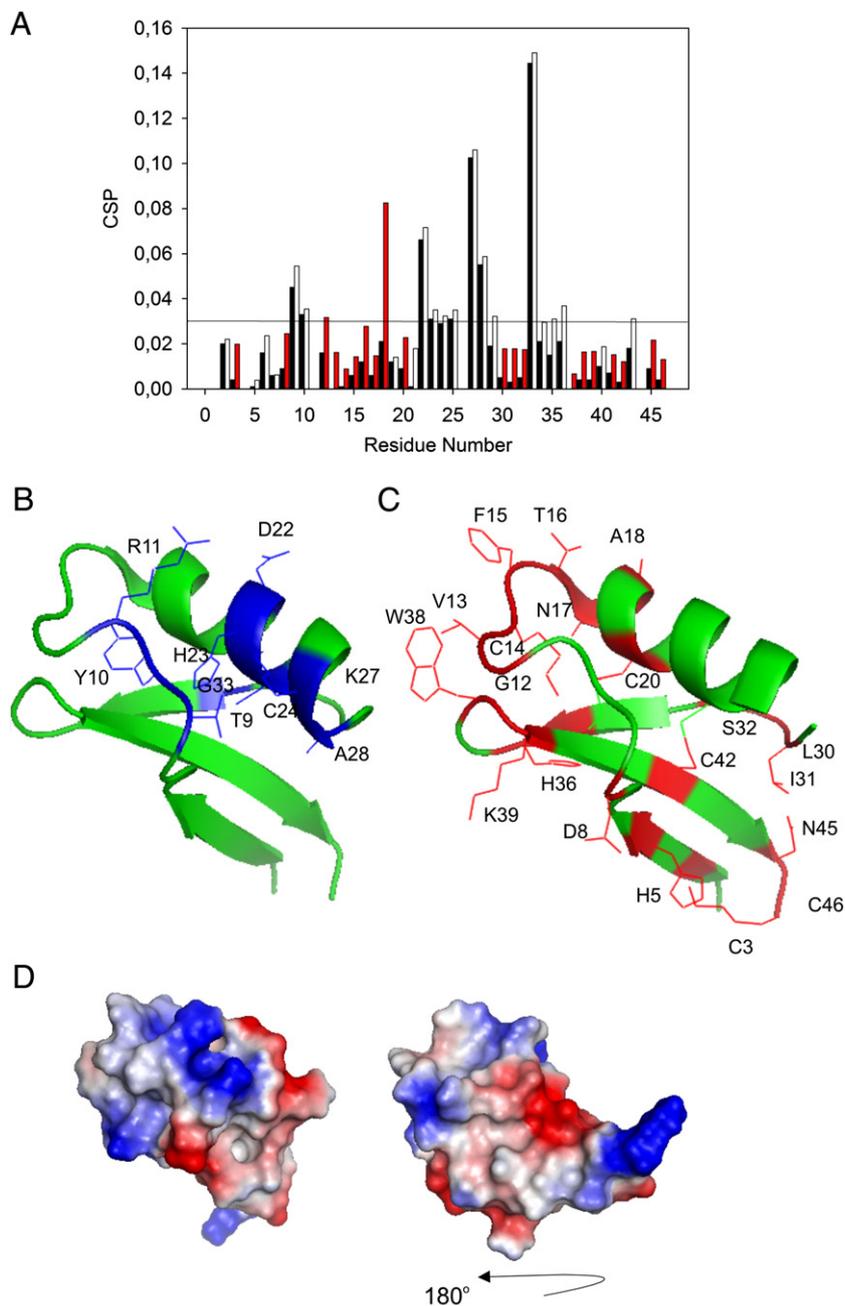


Fig. 2. Chemical shift perturbation (CSP) of Psd1 in the presence of vesicles of PC and PC:CMH (9:1) (A). CSP was obtained according to the equation shown in the Materials and methods section. The horizontal line shows the limit of one standard deviation. To map CSP evoked by the presence of PC, we considered significant CSP above one standard deviation (above the line). Sample condition was as following: 50 μ M [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°.

shift of rPsd1 in the presence of micelles of DPC and DPC:CMH. Fig. 4 shows the CSP when chemical shift values in the presence of compared to rPsd1 in the free state. The residues that were perturbed above one standard deviation were colored in magenta (Fig. 4). Residues that the resonances are broadened beyond detection are shown in red (Fig. 4). 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 rPsd1 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.

3.5. 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

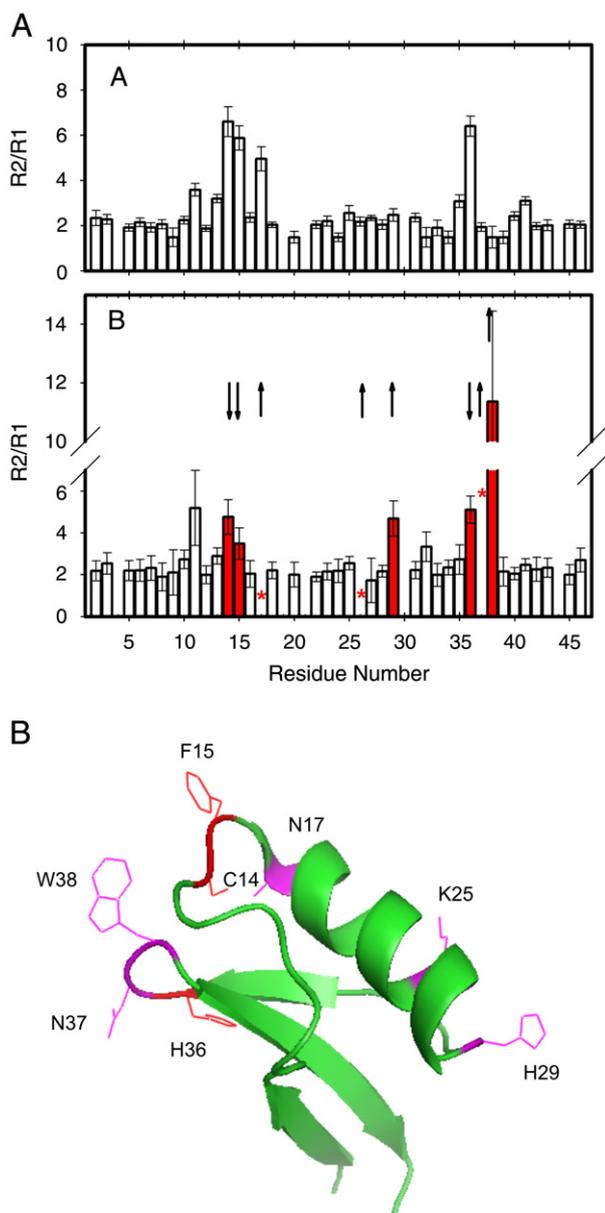


Fig. 3. (A) R2/R1 ratio for each amide ^{15}N of Psd1 (top), values obtained for Psd1 free in solution, the same shown in Fig. 1; (bottom), values obtained for Psd1 in the presence of PC:CMH (9:1) vesicles. The experiments were performed with extruded vesicles prepared with 20 mM phosphate pH 5, 20 mM NaCl, 200 μM 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 asterisk 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.

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 appears 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 Fig. 6A. 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.

Fig. 5A shows the observed NOEs for pepLoop1 in DPC micelles. Several medium and long range connectivities were observed. The long range NOE between Val13 and Ala18 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 ($^3J_{\text{HNH}\alpha}$). Fig. 6B shows the calculated structure for the new set of NOEs and the observed scalar coupling ($^3J_{\text{HNH}\alpha}$). It is worth mentioning that in the presence of CMH $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ ranged from 7 to 15 Hz in the region Val13-Asn17, indicative of an extended conformation.

Fig. 5B shows the observed NOEs for pepLoop1 in the presence of DPC:CMH (0.5:1 – CMH:pepLoop1) and Fig. 5C DPC:CMH (3:1 –

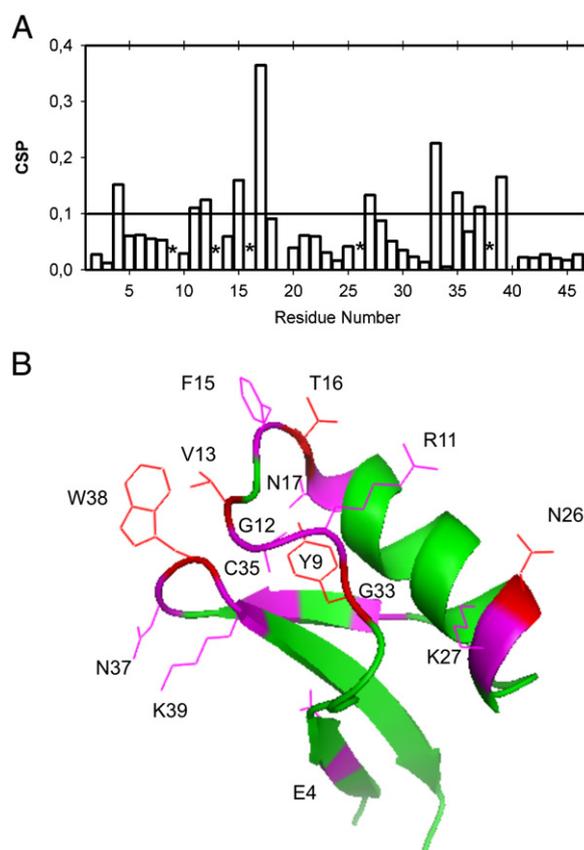


Fig. 4. (A) Chemical shift perturbation of Psd1 by the presence of DPC micelles and DPC micelles plus CMH, respecting a molar ratio CMH:Psd1 1:10. The presence of CMH did not show any change in the HSQC spectrum. The CSP plot refers to both conditions. The sample condition was as follows: 160 μM [Psd1] in 20 mM phosphate buffer pH 5.0 plus, 20 mM NaCl, 300 mM DPC. In the sample containing CMH, we added 600 μM 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 asterisks shows residue with broadening of the line beyond detection. These residues are in conformational exchange. (B) Ribbon representation of Psd1 highlighted in magenta shows 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.

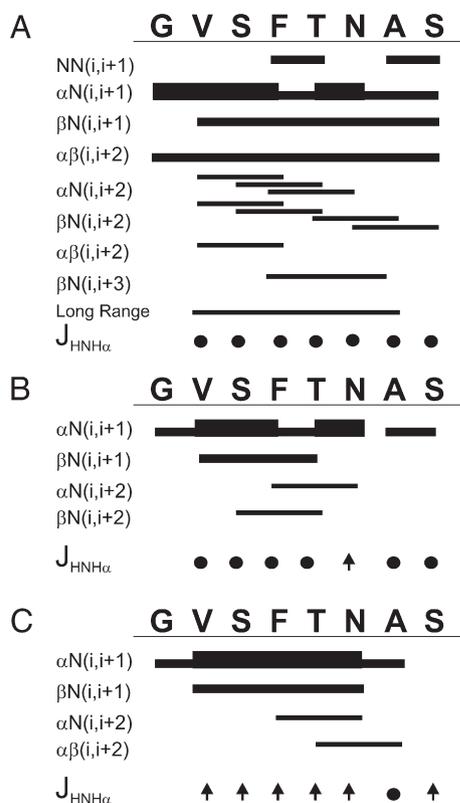


Fig. 5. Summary of NOEs of pepLoop1 in DPC micelles (A) or DPC plus CMH, respecting the CMH:pepLoop1 molar ratio of 0.5:1 (B) and 3:1 (C). The data were extracted from NOESY spectra with mixing time of 150 ms. All experiments were carried out at 3.6 mM pepLoop1, 20 mM phosphate buffer and 300 mM DPC.

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 (Fig. 7). CMH was re-assigned in DPC based on previously published values [32]. Phe15 aromatic δ protons showed NOEs with the ceramide part of CMH and Thr16 β protons showed several unambiguous NOEs with the glycosyl part of CMH. These data suggest that Psd1 is interacting with the surface of the micelle.

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 $\beta 2$ – $\beta 3$ 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 antimicrobial 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 chemotactic properties of the protein [42]. On the other hand, it is not clear if this is always the case. The presence of cysteines 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.

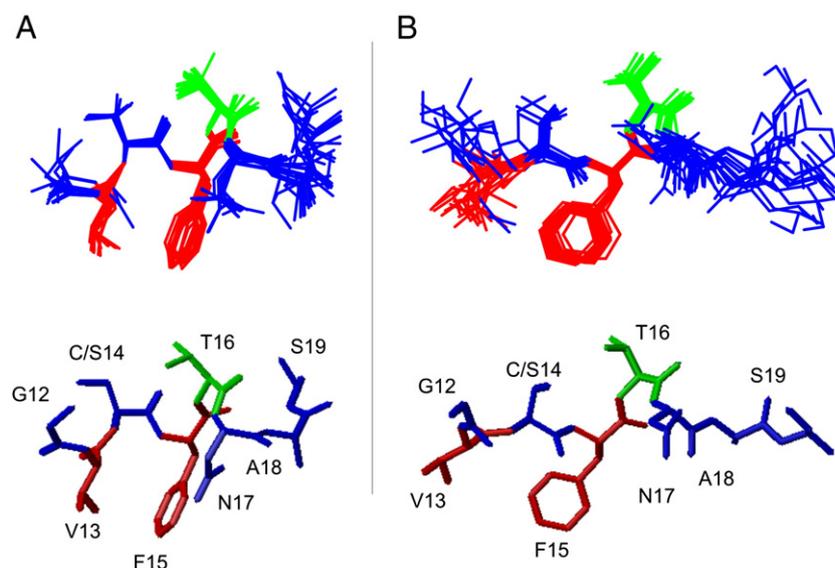


Fig. 6. Superposition of the 15 lowest energy structures of pepLoop1 in the presence of DPC (A, top) and DPC plus CMH, respecting a molar ratio CMH:pepLoop1 3:1 (B, top). pepLoop1 sample (3.6 mM) was prepared in 300 mM DPC, 20 mM sodium phosphate buffer (pH 5.5), 10% D₂O and DPC:CMH samples were prepared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

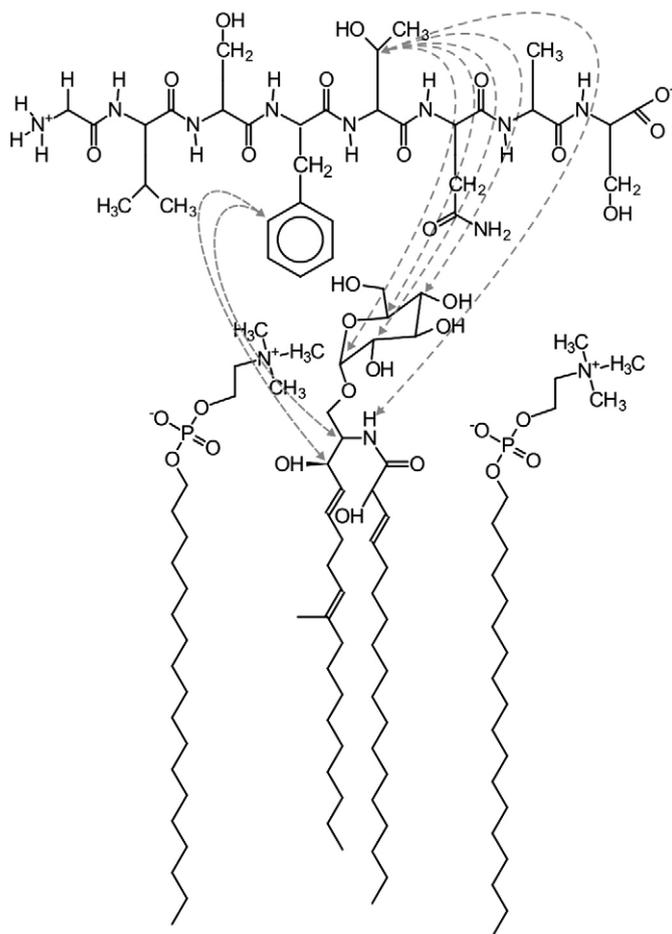


Fig. 7. Representation of pepLoop1, two DPC monomers and one CMH. The arrows shows the observed intermolecular NOEs obtained from a NOESY spectrum with mixing time of 150 ms. All experiments were carried out at 3.6 mM pepLoop1, 20 mM phosphate buffer and 300 mM DPC and 10.8 mM CMH (CMH:pepLoop1 molar 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.

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 Loop1 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].

4.3. 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 led 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-Triestes, 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).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbmem.2009.07.013.

References

- [1] B.P.H.J. Thomma, B.P.A. Cammue, K. Thevissen, Plant defensins, *Planta* 216 (2002) 193–202.
- [2] J. Sels, J. Mathys, B.M.A. De Coninck, B. Cammue, M.F.C. De Bolle, Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides, *Plant Physiol. and Biochem.* 46 (2008) 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) 262–280.
- [4] V.S. De Paula, G. Razzera, L. Medeiros, C.A. Miyamoto, M.S. Almeida, E. Kurtenbach, F.C.L. Almeida, A.P. Valente, Evolutionary relationship between defensins in the Poaceae family strengthened by the characterization of new sugarcane defensins, *Plant Mol. Biol.* 68 (2008) 321–335.
- [5] F.R. Terras, K. Eggermont, V. Kovaleva, N.V. Raikhel, R.W. Osborn, A. Kester, S.B. Rees, S. Torreken, F. van Leuven, J. Vanderleyden, Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense, *Plant cell* 7 (1995) 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, C.M. Rommens, Fungal pathogen protection in potato by expression of plant defensin peptide, *Nature Biotechnol.* 18 (2000) 1307–1310.
- [7] J.F. Marcos, A. Muñoz, E. Pérez-Payá, S. Misra, B. López-García, Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection, *Ann. Rev. Phytopathol.* 46 (2008) 273–301.
- [8] W.W.J. Janisiewicz, I.B. Pereira, M.S. Almeida, D.P. Roberts, M. Wisniewski, E. Kurtenbach, Improved biocontrol of fruit decay fungi with *Pichia pastoris* recombinant strains expressing Psd1 antifungal peptide, *Post. Biol. Technol.* 47 (2008) 218–225.
- [9] A.M. Aerts, I.E.J.A. François, B.P.A. Cammue, K. Thevissen, The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 2069–2079.
- [10] R. Jelinek, S. Kolusheva, Membrane interactions of host-defense peptides studied in model systems, *Curr. Protein Pept. Sci.* 6 (2005) 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) 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) 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) 3900–3905.
- [14] K. Henzel-Wildman, D. Kern, Dynamic personalities of proteins, *Nature* 450 (2008) 964–972.
- [15] B. Volkman, D. Lipson, D.E. Wemmer, D. Kern, Two-state allosteric behavior in a single-domain signaling protein, *Science* 295 (2002) 2429–2433.
- [16] L.C. James, D.S. Tawfik, Conformational diversity and protein evolution – a 60-year-old hypothesis revisited, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 361–368.
- [17] N. Tokuriki, F. Stricher, L. Serrano, D.S. Tawfik, How protein stability and new functions trade off, *PLoS Comp. Biol.* 4 (2008) e1000002.
- [18] A.P. Valente, C.A. Miyamoto, F.C.L. Almeida, Implications of protein conformational diversity for binding and development of new biological active compounds, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 3697–3703.
- [19] A.G. Palmer, NMR probes of molecular dynamics: overview and comparison with other techniques, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30 (2001) 129–155.
- [20] R. Brüschweiler, New approaches to the dynamic interpretation and prediction of NMR relaxation data from proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13 (2003) 175–183.
- [21] G. Lipari, 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) 4546–4559.
- [22] L.W. Tinoco, A. Da Silva Jr., A. Leite, A.P. Valente, 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) 3651–3656.
- [23] L.W. Tinoco, F. Gomes-Neto, A.P. Valente, F.C. Almeida, Effect of micelle interface on the binding of anticoccidial PW2 peptide, *J. Biomol. NMR* 39 (2007) 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, A.P. Valente, Structural biology of membrane-acting peptides: conformational plasticity of anticoccidial peptide PW2 probed by solution NMR, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 3182–3192.
- [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, A. Leite, Avian anticoccidial activity of a novel membrane-interactive peptide selected from phage display libraries, *Mol. Biochem. Parasitol.* 120 (2002) 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) 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) 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) 115–122.
- [29] M. Vila-Perello, S. Togno, A. Sanchez-Vallet, F. Garca-Olmedo, A. Molina, D. Andreu, A minimalist design approach to antimicrobial agents based on a thionin template, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 448–451.
- [30] M. Vila-Perello, A. Sanchez-Vallet, F. Garca-Olmedo, A. Molina, 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) 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) 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) 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) 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) 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, L.E. Kay, Backbone dynamics of a free and a phosphopeptidecomplexed Src homology 2 domain studied by ¹⁵N NMR relaxation, *Biochemistry* 33 (1994) 5984–6003.
- [37] H.Y. Carr, E.M. Purcell, Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments, *Phys. Rev.* 94 (1954) 630–638.
- [38] S. Meiboom, D. Gill, Modified spin-echo method for measuring nuclear spin relaxation times, *Rev. of Sci. Instrum.* 29 (1958) 688–691.
- [39] A.G. Palmer, J. Willians, A. McDermott, Nuclear Magnetic Resonance studies of biopolymer dynamics, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 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) 204–238.
- [41] T.L. Raguse, E.A. Porter, B. Weisblum, 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) 12774–12785.
- [42] Z. Wu, D.M. Hoover, D. Yang, C. Boulegue, F. Santamaria, J.J. Oppenheim, J. Lubkowski, W. Lu, Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 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) 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) 15504–15513.
- [45] M. Buyong, T. Elkayam, H. Wolfson, 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) 5772–5777.
- [46] A. Shulman-Peleg, M. Shatsky, R. Nussinov, H.J. Wolfson, Spatial chemical conservation of hot spot interactions in protein-protein complexes, *BMC Biology* 5 (2007) 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) 13508–13514.

Elsevier Editorial System(tm) for Analytical Biochemistry
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: NMR Metabolomics identified the profile of systemic healthy children with and without caries lesion

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Metabolite Determination

Keywords: Saliva; Magnetic Resonance Spectroscopy; Principal component analysis; Metabolomics; Dental caries.

Corresponding Author: Dr. Ivete P Souza, PhD

Corresponding Author's Institution: Federal University of Rio de Janeiro

First Author: Tatiana K Fidalgo, M.D.

Order of Authors: Tatiana K Fidalgo, M.D.; Renata Angeli, M.D.; Elicardo Gonsalves, Graduated; Adriane Muniz, PhD; Raquel Santos, M.D.; Jurandir Nadal, M.D., Ph.D.; Fabio Almeida, PhD; Liana Freitas-Fernandes, PhD; Ana P Valente, PhD; Ivete P Souza, PhD

Abstract: NMR salivary metabolite profiles of healthy children with primary, mixed and permanent dentition were investigated for the first time. In this work we used NMR and Principal Component Analysis (PCA) to identify differences in the salivary metabolites of children at different dentition stages. We also compared the profile obtained for children with or without caries lesion. Unstimulated whole saliva samples from 65 systemic healthy children aged from 3 to 13 years old were analyzed using ¹H NMR spectra, acquired and processed on a Bruker 400 MHz Advance spectrometer. Analysis showed small but consistent difference between dentitions: Gamma-aminobutyric acid (GABA) appeared more expressively in permanent dentition and mixed dentition showed higher levels of proline. In the case of children with caries lesions saliva, others metabolites such as lactate, lysine, glucose, glutamate, glutamine, propionate, ornithine and saturated fatty were statistically higher distinguishing them from caries lesion-free children ($p < 0.05$; F test). Our data showed similar salivary metabolite profiles for healthy subjects despite differences in their oral hygiene habits, socioeconomic status and food intake.

Suggested Reviewers:



Prof. Ana Paula Valente
Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear – Jiri
Jonas
Instituto de Bioquímica Médica
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro - RJ - 21.941-590 - Brasil
Tel. +55 21 2562-6756

Rio de Janeiro, 27th August, 2010.

To Dr. William Jakoby
Editor-in-Chief

We wish to submit for evaluation as an "Original Manuscript", the manuscript entitled "NMR Metabolomics identified the profile of systemic healthy children with and without caries lesion" for publication in Analytical Biochemistry.

In the present manuscript the whole saliva of healthy children was analyzed using NMR and Principal component analysis (PCA) was used for statistical analysis. The present work identified significant differences in the metabolite profiles among dentitions. These changes may also be influenced by the pre-pubertal period. The knowledge of the salivary metabolite profiles of healthy children is a standard data set for future investigations of salivary biomarkers for oral and systemic disorders. It was also assessed salivary metabolites from children with and without caries lesion and was identified differences between them. Therefore we believe that the data presented here is relevant and suitable for Analytical Biochemistry.

We assure that all authors have made substantive contribution to this manuscript, and all have reviewed the final paper prior to its submission. We also guarantee that the article has not been published, and is not being considered for publication elsewhere. We declare that we have no proprietary, financial, professional or other personal interest of any nature or kind in any product, service and/or company that could be construed as influencing the position presented in or the review of this submitted manuscript. We also declare that we transfer the present manuscript and their accompanying illustrations to the permanent property of Journal of Dental Research, if accepted to publication.

Thank you for your consideration.
Yours sincerely,

Authors

ABSTRACT

NMR salivary metabolite profiles of healthy children with primary, mixed and permanent dentition were investigated for the first time. In this work we used NMR and Principal Component Analysis (PCA) to identify differences in the salivary metabolites of children at different dentition stages. We also compared the profile obtained for children with or without caries lesion. Unstimulated whole saliva samples from 65 systemic healthy children aged from 3 to 13 years old were analyzed using ^1H NMR spectra, acquired and processed on a Bruker 400 MHz Advance spectrometer. Analysis showed small but consistent difference between dentitions: Gamma-aminobutyric acid (GABA) appeared more expressively in permanent dentition and mixed dentition showed higher levels of proline. In the case of children with caries lesions saliva, others metabolites such as lactate, lysine, glucose, glutamate, glutamine, propionate, ornithine and saturated fatty were statistically higher distinguishing them from caries lesion-free children ($p < 0.05$; F test). Our data showed similar salivary metabolite profiles for healthy subjects despite differences in their oral hygiene habits, socioeconomic status and food intake.

Key words: Saliva; Magnetic Resonance Spectroscopy; Principal component analysis; Metabolomics; Dental caries.

INTRODUCTION

Saliva is a complex biofluid that has important functions in oral homeostasis and its composition is related to systemic and oral physiological conditions [1; 2]. Dental caries is the most common chronic disease of children between 6 and 11 years old (25%) and adolescents from 12 to 19 years old (59%). Dental caries have been reported to be five times more prevalent than other childhood diseases such as asthma [3].

Individual differences among oral metabolites could be associated to physiological or pathological conditions as well as environmental factors, which may influence the salivary composition and could also be correlated to disease susceptibility [4]. Human saliva is a potential source of novel diagnostic markers for both systemic and oral diseases [5; 6; 7; 8; 9].

Despite the large amount of information about saliva macromolecular composition, there are few data available concerning the low molecular weight metabolites in children and their relation to individual oral health condition [7]. Since physiological modifications occur during childhood especially in the pre-pubertal period [10], we decided to investigate salivary metabolites from oral healthy children with different dentition stages and oral conditions. We used NMR for metabolites analysis and all spectra were acquired using standard pulse sequences, including a T2 filter to suppress signals from proteins and other macromolecules. The samples of whole saliva were stable throughout the NMR acquisition period.

The NMR data obtained from each subject was analyzed using the principal component analysis (PCA) and standard distance (SD). PCA is a multivariate statistical technique widely used in metabolomics [11; 12], which is used to reduce the dimensionality of a data set with a large number of

interrelated variables [13]. Here, it was used to identify saliva metabolites among subjects based on PC and SD [14].

NMR salivary metabolite profiles of oral healthy children with primary, mixed and permanent dentition were investigated for the first time. In this study we found that few salivary metabolites had different concentrations depending on the dentition stage. For instance mixed dentition subjects were found to have a higher amount of proline in their saliva, probably due to the physiological root re-absorption of collagen. Other metabolites characterized the presence or absence of caries, such as propionate, lactate and n-valerate that probably are from microorganism metabolism. Our data showed similar salivary metabolite profiles for oral healthy subjects despite differences in their oral hygiene habits, socioeconomic status and food intake;

MATERIALS AND METHODS

Sample collection and preparation

Sixty five systemically healthy children attending the Pediatric Dentistry Clinic for regular dental care were recruited for the study. None of the subjects had any periodontal disease or systemic disease nor had they taken any systemic antibiotics or used anti-bacterial toothpaste in the six months prior to sample collection. Dental caries was diagnosed clinically according to the World Health Organization's (WHO) diagnostic criteria using the Decayed Missing and Filled Teeth index (dmft for primary teeth and DMFT for permanent teeth and dmft/DMFT for mixed dentition) [15]. High scores indicate higher severity of caries disease. The group of oral healthy children with different dentitions was constituted of children with dmft/DMFT=0 and the breakdown according to dentition stage was: primary (n=15, mean age=4.27 ± 1.27, 11 female and 4

male), mixed (n=18, mean age=7.94 ± 2.09, 9 female and 9 male) and permanent (n=17, mean age=10.88 ± 1.05, 9 female and 8 male) dentition. For dental caries assessment, a group of children with dental caries in mixed dentition was also recruited (n=15, mean age= 7.23 ± 2.01, 6 female and 9 male) and compared with the children without caries in the same dentition stage. A visual-tactile examination of each subject was carried out by a single examiner. The dmft/DMFT index was calculated for each subject and they were separated according to the presence and absence of caries, with mean of dmft=0.33 and DMFT=5.40.

A 3 mL of unstimulated whole saliva was expectorated (~5 minutes) into a plastic universal tube in the morning. Each subject was also requested to refrain from oral activities (*i.e.*, eating, drinking, toothbrushing, oral rinsing) during the period between awakening and sample collection, about 2 hours [16]. All samples were centrifuged at 10,000g for 60 minutes at 4°C, and the supernatants were stored at –80°C until NMR analysis.

The use of human materials was approved by the proper Research Ethics Committee of Community Health Studies.

NMR measurements

NMR spectra were acquired using a Bruker 400 MHz Advance spectrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) equipped with a Bruker 5 mm high-resolution probe and operating at a frequency of 400.13 (¹H) MHz. All spectra were recorded at 25°C, with water suppression by presaturation [17]. Samples were prepared by mixing 0.45 mL of salivary supernatant, deuterium oxide (99.8% D₂O; 0.05 mL to provide a field frequency lock) and a 500 μM solution of sodium 3-trimethylsilyl [2,2,3,3-²H₄] propionate (TSP) for chemical shift

reference of ^1H spectra, $\delta = 0.00$ ppm. The CPMG (Carr–Purcell–Meiboom–Gill) pulse sequence was used to suppress signals from proteins and other macromolecules through a T2 filter, using 1024 scans. ^1H - ^1H total correlation (TOCSY) experiments with acquisition parameters of 256 t1 increments, each with magnitude of 2048 data points; spectral width 12,019 Hz in each dimension and a mixing time of 70 ms. A control investigation showed that the samples of whole saliva were stable throughout the NMR acquisition period and showed reproducibility (data not shown). The major signals could be unambiguously assigned consistent with earlier studies [16; 18].

NMR signals were determined over a defined range of frequency resonances called chemical shifts, expressed in ppm. Saliva was analyzed using NMR spectroscopy and assignments were identified based on Silwood et al [16] and the Human Metabolome database (<http://www.hmdb.ca/>).

Each spectral dataset was normalized to the total sum of the integrals to partially compensate for differences in concentrations.

Statistical analysis

The metabolite data were computed on the statistical program AMIX (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany). Each NMR spectrum was reduced to a smaller number of variables, calculated by integrating regions of an equal bucket size of 0.01 ppm. The water region was excluded (4.5 - 5.5 ppm).

For the assessment of the group of oral healthy children with different dentitions the datasets of the different dentition stages were stored in a matrix **E** with 50 rows (50 subjects) and 906 columns (906 chemical shifts) and the operating characteristic curve (AUC) was set at 0.933; overall accuracy was set at 0.938; sensitivity was set at 0.867 and specificity was set at 1.000.

For the assessment of the dental caries, the datasets of caries lesion subjects and caries lesion-free were stored in a matrix **E** with 33 rows (33 subjects) and 906 columns (906 chemical shifts). The matrix was normalized by Pareto scaling [19]: accuracy= 0.94, sensibility= 0.93, specificity= 0.94. Principal component analysis (PCA) was applied to the covariance matrices **S** (906x906) from each **E**, by the linear system [13]:

$$\mathbf{S}\mathbf{x}_p = \lambda_p \mathbf{x}_p$$

where λ is the eigenvalues of **S** ranked in decreasing order and **x** is the corresponding normalized eigenvectors or principal components (PCs). These PCs are independent waveform features, representing the loading factor applied to the corresponding sample of the original waveforms. The first PCs correspond to the largest sources of variation, being orthogonal to each other. The screen plot selected the relevant PCs for the analysis. Datasets of PC vectors retained in the screen test were represented as data points in 2 dimensional loading plots. The PC scores of the permanent, mixed and primary dentition individuals correspond to the product of the respective eigenvector and the matrix **E**.

The standard distance (SD) proposed by Flury and Riedwyl [20] was calculated including the selected PC scores in matrix **E**. This index represents the distance between each subject and the center of the ellipsis in the space of the PC scores from caries lesion-free subjects. To classify caries lesion-free and caries lesion subjects, the cut-off point between SD values from the caries lesion-free and caries lesion subjects was obtained by logistic regression. In the same way, to classify dentition stages the cut-off point between SD values from permanent and primary dentition and permanent and mixed dentition was

obtained by logistic regression. The permanent dentition was chosen as a control as it had lower inter-individual variation. The classifier performance was assessed by the leave-one-out cross-validation technique [21].

The ANOVA and Tukey's tests were used to compare differences among PC scores from primary, mixed and permanent dentitions. The Wilcoxon rank-sum test was used to compare standard values from caries lesion-free and caries lesion subjects. The F test was performed to compare the chemical shifts that contributed to the separation between the groups. The significance level was set at 5%. All signal processing procedures and statistical tests were executed in Matlab 6.5 (The Mathworks, USA).

RESULTS

Resonances that correspond to salivary components were assigned based on chemical shift reports available by Silwood [16] and the Human Metabolome database (<http://www.hmdb.ca/>). Ambiguous assignments were resolved through analysis of TOCSY spectrum.

Oral healthy children with different dentitions

Fig. 1 shows the 400 MHz 1D ^1H NMR spectra of human saliva samples. There are clear differences in intensity of resonances that are related to different concentrations of components for each subject. Each spectrum was analyzed using AMIX and their intensity variation was compared using PCA and SD.

Fig. 2A illustrates the PCA results obtained for subjects in different dentition stages. This analysis quantifies the multivariable boundaries that characterize the metabolite profile in each stage (primary, mixed and

permanent) that, in this case did not show any significant group separation. A total of 13 PCs were used, which explained 81.9% of the variation. The first and the second principal components in the PCA explained 17.9% and 11.5% of the data variation, respectively.

Although the PCA analysis showed that the data presented low metabolite inter-relationship, we could see that the level of some components were different (ANOVA and Tukey's tests; $p < 0.05$). The metabolites gamma-aminobutyric acid, proline, ethanol, propane-1,2-diol, propionate and valine presented differences among dentitions ($p < 0.05$). The main difference between primary, mixed and permanent dentition occurs in valine, where primary dentition has more variation than mixed dentition ($p = 0.017$). Table 1 summarizes the information about the changes in the metabolite concentrations.

In order to classify the subjects according to dentition stage the standard distance was applied. So that the index represents the distance between each subject and the center of the ellipsis in the space of the PC scores from healthy subjects with permanent dentition, which is normalized by the variance of each parameter (see Material and Methods for details). Therefore, subjects with similar SD values belong to a similar pattern and its variability can be used to calculate the heterogeneity of the group.

Fig 2B and Table 2 show the SDs values for each subject in the corresponding dentition stage. Table 2 shows the standard distance for each subject. The cut-off was 4.48 for permanent dentition, for median primary dentition it was 29.70 and for mixed it was 16.64. The individuals in the primary

dentition (blue), showed high SD variability followed by mixed (red) and permanent dentition (green) that showed the lowest inter-individual variability.

Dental caries assessment

To evaluate if our methodology was able to distinguish specific individual oral conditions, we compared the SD values obtained from caries lesion-free and those with caries lesion. We decided to investigate individuals with mixed dentition since they were the largest group in terms of numbers and the individuals, besides they had an intermediary inter individual variation. Fig 3 shows the aliphatic region of the saliva ^1H NMR spectra of caries lesion-free (A) and caries lesion (B) subjects. Several differences were observed and each number in Fig. 3 indicates the metabolites that showed intensity differences between the two samples.

The PCA analysis showed the differences between the caries lesion-free and caries lesion groups. The main difference was demonstrated by the scatter plot formed by the third PC score versus the fourth PC score (Fig. 4A). The screening test retained 10 PCs in the analysis, which explained 86.13% of the total variation. The classification was mainly carried out by the third PC score plane when the most caries-lesion subjects were placed on the left side of the graphic.

The loadings of the 10 PCs which most influenced the separation of caries lesion-free and caries group are summarized in Table 3. The metabolites lactate, propionate and N-valerate were statistically higher in children with caries lesion ($p < 0.001$) and probably are from microorganism metabolism.

Choline, 3-D-hydroxybutyrate, sucrose, acetate, glycerol and 4-hydroxyproline were higher in the caries lesion-free group ($p < 0.05$).

The inter-individual variation is much higher for subjects with caries lesion. Also, the caries-lesion free subjects had a mean SD statistically lower than caries-lesion subjects (Mean = 2.96 for caries free and 19.35 with caries, Fig. 4B; Table 4). In this case, the calculated SD cut off value for caries free subjects was 3.98. Fig. 4B shows the SD values calculated for the caries-free (blue) and the caries lesion (red) subjects.

Only one subject in the caries lesion-free group presented a higher SD and only one of the caries group had a normal SD value. No particularity was found in any of these individuals.

Additionally, no statistical correlation between SD values neither with dmft/DMFT index ($p = 0.45$), which indicates severity of caries disease, nor with the number of teeth with caries-lesion ($p = 1.10$) was found (Table 4).

DISCUSSION

The saliva assay is a growing area of research with implications for basic and clinical settings. Metabolites from adult saliva have already been analyzed by NMR, however this is the first data presented of saliva from children with different dentitions using this method. Surprisingly, the profile of salivary metabolites of oral healthy children showed similar pattern and could be identified as normal differences independent of the oral hygiene habits, socioeconomic status and food. In the present study, metabolite data were determined by ^1H NMR spectroscopy and showed a few compound differences among the dentition stages.

In the oral healthy group, inter-individual variation in salivary metabolites was higher in primary dentition, thereafter it was slightly smaller in mixed dentition and it was very small in permanent dentition. This small variation in the metabolites in saliva of children in permanent dentition can be related to the stabilization of the oral environment.

The analysis of specific metabolites that are different between each group gave some interesting insights such as propano-1,2-diol, propionate and ethanol, which are considered microorganism metabolites [22], were in low levels in primary dentition. On the other hand, these metabolites were found in much higher levels in permanent dentition. This difference can be associated to the eruption of permanent teeth and increased contact surfaces and therefore associated with elevated bacterial sites [23]. Proline is a non-essential amino acid which is a principal component of dentine collagen [24]. In the present study, mixed dentition showed higher levels of proline than primary dentition, probably because the root dentine is reabsorbed and the collagen rearrangement leads to increased levels of proline in saliva in the mixed dentition. Gamma-aminobutyric acid (GABA) appeared more expressively in permanent than in primary dentition. Silwood et al [16] reported GABA in adult saliva and, in the present work, GABA was also found in the children's saliva. GABA is an inhibitory neurotransmitter found in the nervous systems and alteration of the GABA level is correlated to some degenerative diseases [25].

The dental caries group was chosen with mixed dentition due to availability of these children with caries lesions at the dental clinic. In addition, children with mixed dentition were found to have an intermediated salivary metabolites variation. To the best of our knowledge this is the first time that

caries lesion and caries lesion-free saliva samples have been evaluated using high-resolution ^1H NMR.[2; 18].

The high-resolution ^1H NMR spectroscopy datasets are represented as complex matrices with hundreds of proton signals originating from the various metabolites. These complexities can be untangled using chemometric methods that are used to reduce the size of the ^1H NMR data for visualization purposes and to identify inherent patterns among sets of spectral measurements [19]. Principal components (PCs) are new variables created from linear combinations of the starting spectra descriptors with appropriate weighting coefficients.

The PC3 and PC4 were the CPs that contributed more to the classification caries lesion-free subjects than PC1 and PC2; this was possible since the best trade-off between variance and classification should be taken into account in the classification approaches [13]. SD is a multivariate statistical method to quantify the extent by which an experimental condition deviates from that of an unimpaired control [26]. SD is computed using PCA as a standard multivariate statistical technique. The classifier model, calculated by the leave-one-out approach, showed good accuracy. A direct relationship between SD and the number of teeth with caries lesions was not found as demonstrated in the CPOD index and the number of caries cavities. For this reason it is suggested that SD could determine an individual's susceptibility to caries lesion.

Metabolites such as propionate, lactate, n-butyrate and n-caproate are probably metabolites from oral microorganisms and for that reason caries lesion subjects have a larger quantity of them. On the other hand, choline and ornithine are probably endogen metabolites. Thus, the presence or absence of endogen biomarkers will be of great value for evaluating susceptibility of dental

caries. Sucrose has been considered the most cariogenic carbohydrate due to the increased porosity of dental plaque matrix formed in its presence [27]. This disaccharide is composed of glucose and fructose; several oral microorganisms lower the pH of dental plaque in the presence of glucose [28; 29]. Lower amounts of sucrose but higher amounts of α -glucose were found in the caries lesion than the caries lesion-free subjects, indicating that sucrose was metabolized by oral microorganisms in individuals that presented more caries susceptibility into α -glucose.

Glutamate and glutamine were found in higher quantities in the caries-lesion group using NMR analysis and PCA. In the literature a study carried out by mass spectrometry found higher levels of glutamate and glutamine in saliva in systemic and oral cancer adult subjects suggesting that those metabolites could be a biomarker for cancer [1].

Hexogen metabolites were identified in saliva from both caries lesion and caries lesion-free subjects. Valine is an essential amino acid and probably originates from food intake. In the current study, all children were requested to refrain from oral activities before sample collection, however sodium dodecyl sulfate (SDS) was found in saliva. SDS is an ionic surfactant component that is widely used in toothpaste [30; 31] and has affinity for biofilm formed on oral cavity surfaces. Higher amounts of SDS were found in caries lesion subjects, probably due to adsorption and desorption of SDS on dental biofilm and on the irregular surfaces of the caries lesions.

According to Tomita et al [32], lipid concentrations in parotid saliva from caries susceptible subjects were higher than those from caries resistant ones and a difference in fatty acid composition was detected, corroborating with our

data. Although the current study analyzed whole saliva, saturated fatty acid was also highest in caries lesion individuals. The variations in the lipid levels and fatty acid composition may be associated with those in caries development. The presence of the lipids on the salivary pellicle of tooth surfaces increases the effect of caries development by inhibition of acid diffusion [33].

Conclusion

This study showed that it was possible to analyze saliva from healthy children using NMR. The profile of the salivary metabolites of oral healthy children showed a similar pattern which could be identified as being independent of the oral hygiene habits, socio-economic status and food intake; however some salivary metabolites differed from those among caries lesion subjects.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support from the following agencies: National Institute of Science and Technology of Structural Biology and Bioimaging (INCT-INBEB), CNPq, FAPERJ, FINEP and CAPES.

REFERENCES

- [1] M. Sugimoto, D.T. Wong, A. Hirayama, T. Soga, and M. Tomita, Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles, *Metabolomics*. 6 (2010) 78-95.
- [2] I. Takeda, C. Stretch, P. Barnaby, K. Bhatnager, K. Rankin, H. Fu, A. Weljie, N. Jha, and C. Slupsky, Understanding the human salivary metabolome, *NMR Biomed*. 22 (2009) 577-84.

- [3] E.D. Beltran-Aguilar, L.K. Barker, M.T. Canto, B.A. Dye, B.F. Gooch, S.O. Griffin, J. Hyman, F. Jaramillo, A. Kingman, R. Nowjack-Raymer, R.H. Selwitz, and T. Wu, Surveillance for dental caries, dental sealants, tooth retention, edentulism, and enamel fluorosis--United States, 1988-1994 and 1999-2002, *MMWR Surveill Summ.* 54 (2005) 1-43.
- [4] L. Bergandi, P. Defabianis, F. Re, G. Preti, E. Aldieri, S. Garetto, A. Bosia, and D. Ghigo, Absence of soluble CD14 in saliva of young patients with dental caries, *Eur J Oral Sci.* 115 (2007) 93-6.
- [5] V. de Almeida Pdel, A.M. Gregio, M.A. Machado, A.A. de Lima, and L.R. Azevedo, Saliva composition and functions: a comprehensive review, *J Contemp Dent Pract.* 9 (2008) 72-80.
- [6] M.W. Dodds, D.A. Johnson, and C.K. Yeh, Health benefits of saliva: a review, *J Dent.* 33 (2005) 223-33.
- [7] M. Hardt, L.R. Thomas, S.E. Dixon, G. Newport, N. Agabian, A. Prakobphol, S.C. Hall, H.E. Witkowska, and S.J. Fisher, Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC, and mass spectrometry, *Biochemistry.* 44 (2005) 2885-99.
- [8] E.J. Helmerhorst, and F.G. Oppenheim, Saliva: a dynamic proteome, *J Dent Res.* 86 (2007) 680-93.
- [9] C.F. Streckfus, L.R. Bigler, and M. Zwick, The use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to detect putative breast cancer markers in saliva: a feasibility study, *J Oral Pathol Med.* 35 (2006) 292-300.
- [10] L. Di Luigi, C. Baldari, M.C. Gallotta, F. Perroni, F. Romanelli, A. Lenzi, and L. Guidetti, Salivary steroids at rest and after a training load in young male athletes: relationship with chronological age and pubertal development, *Int J Sports Med.* 27 (2006) 709-17.

- [11] N. Aranibar, K.H. Ott, V. Roongta, and L. Mueller, Metabolomic analysis using optimized NMR and statistical methods, *Anal Biochem.* 355 (2006) 62-70.
- [12] M.T. Werth, S. Halouska, M.D. Shortridge, B. Zhang, and R. Powers, Analysis of metabolomic PCA data using tree diagrams, *Anal Biochem.* 399 (2010) 58-63.
- [13] I.T. Jolliffe, (2002). *Principal component analysis*. New York: Springer-Verlag; 2. ed.
- [14] E. Holmes, and H. Antti, Chemometric contributions to the evolution of metabonomics: mathematical solutions to characterising and interpreting complex biological NMR spectra, *Analyst.* 127 (2002) 1549-57.
- [15] WHO Oral Health Country/Area Profile Programme: Caries Prevalence: DMFT and DMFS. Accessed (2010 Aug 02) at: <http://www.whocollab.od.mah.se/expl/orhdmft.html>.
- [16] C.J. Silwood, E. Lynch, A.W. Claxson, and M.C. Grootveld, ¹H and ¹³C NMR spectroscopic analysis of human saliva, *J Dent Res.* 81 (2002) 422-7.
- [17] M. Piotto, V. Saudek, and V. Sklenar, Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions, *J Biomol NMR.* 2 (1992) 661-5.
- [18] H.C. Bertram, N. Eggers, and N. Eller, Potential of human saliva for nuclear magnetic resonance-based metabolomics and for health-related biomarker identification, *Anal Chem.* 81 (2009) 9188-93.
- [19] Z. Ramadan, D. Jacobs, M. Grigorov, and S. Kochhar, Metabolic profiling using principal component analysis, discriminant partial least squares, and genetic algorithms, *Talanta.* 68 (2006) 1683-91.
- [20] B.K. Flury, Riedwyl, H. (1986). Standard Distance in Univariate and Multivariate Analysis. *Am Stat*, 40, 249-251.

- [21] L. Breiman, Friedman, J., Olshen, R., Stone, C., 1998. Classification and Regression Trees. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC.
- [22] D.J. Arp, Butane metabolism by butane-grown 'Pseudomonas butanovora', Microbiology. 145 (Pt 5) (1999) 1173-80.
- [23] V.A. Gerardu, M.J. Buijs, J.M. ten Cate, and C. van Loveren, The effect of a single application of 40% chlorhexidine varnish on the numbers of salivary mutans streptococci and acidogenicity of dental plaque, Caries Res. 37 (2003) 369-73.
- [24] L. Kukkola, R. Hieta, K.I. Kivirikko, and J. Myllyharju, Identification and characterization of a third human, rat, and mouse collagen prolyl 4-hydroxylase isoenzyme, J Biol Chem. 278 (2003) 47685-93.
- [25] L. Mauch, C.C. Abney, H. Berg, W.A. Scherbaum, B. Liedvogel, and W. Northemann, Characterization of a linear epitope within the human pancreatic 64-kDa glutamic acid decarboxylase and its autoimmune recognition by sera from insulin-dependent diabetes mellitus patients, Eur J Biochem. 212 (1993) 597-603.
- [26] L.M. Schutte, U. Narayanan, J.L. Stout, P. Selber, J.R. Gage, and M.H. Schwartz, An index for quantifying deviations from normal gait, Gait Posture. 11 (2000) 25-31.
- [27] J. van Houte, Role of micro-organisms in caries etiology, J Dent Res. 73 (1994) 672-81.
- [28] O. Fejerskov, A.A. Scheie, and F. Manji, The effect of sucrose on plaque pH in the primary and permanent dentition of caries-inactive and -active Kenyan children, J Dent Res. 71 (1992) 25-31.
- [29] C. Vadeboncoeur, and M. Pelletier, The phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of oral streptococci and its role in the control of sugar metabolism, FEMS Microbiol Rev. 19 (1997) 187-207.

- [30] F.C. Petersen, S. Assev, and A.A. Scheie, Combined effects of NaF and SLS on acid- and polysaccharide-formation of biofilm and planktonic cells, *Arch Oral Biol.* 51 (2006) 665-71.
- [31] I. Rantanen, K. Jutila, I. Nicander, J. Tenovuo, and E. Soderling, The effects of two sodium lauryl sulphate-containing toothpastes with and without betaine on human oral mucosa in vivo, *Swed Dent J.* 27 (2003) 31-4.
- [32] Y. Tomita, N. Miyake, and S. Yamanaka, Lipids in human parotid saliva with regard to caries experience, *J Oleo Sci.* 57 (2008) 115-21.
- [33] B.L. Slomiany, V.L. Murty, I.D. Mandel, G. Zalesna, and A. Slomiany, Physico-chemical characteristics of mucus glycoproteins and lipids of the human oral mucosal mucus coat in relation to caries susceptibility, *Arch Oral Biol.* 34 (1989) 229-37.

LEGENDS

Figures

Fig. 1: Representative ^1H NMR spectrum of child saliva samples in the 0–4.5ppm (A,B,C) and 5.5–10.0ppm regions (D,E,F). A, D- Primary dentition; B, E- Mixed dentition; C, F- Permanent dentition. No statistical differences were found among dentitions in the 5.5-10.0ppm region. Assignments: 1- propionate, 2- ethanol, 3- propane-1,2-diol, 4- gamma aminobutyric acid, 5- proline, 6- valine.

Fig. 2: A- The principal components analysis shows no differences among dentitions; B- Standard distance showing low inter-individual variability in permanent dentition.

Fig. 3: Representative ^1H NMR spectra of whole saliva from caries-lesion free (A) and caries-lesion (B) subjects demonstrating differences in metabolites (1- propionate, 2-lactate, 3- acetate, 4- ornithine, 5- 4-hydroxyproline, 6- sucrose, 7- α -glucose and 8- 3-D-hydroxybutyrate).

Fig. 4: A- Scores plot of a two-component PCA model of ^1H NMR spectra showing sample clustering according to the presence or absence of caries-lesion. The percentage of variance captured by PC3 was 7.84% and PC4 was 10.93%. B- Standard distance showing that caries lesion-free subjects presented lower SD values than caries-lesion ones.

Tables

Table 1: Resonance assignments of unstimulated human saliva, its metabolites components ($p < 0.05$; ANOVA, Tukey's test) detectable in 400 MHz. $^1\text{H-NMR}$ spectra comparison between primary, mixed and permanent dentition.

Table 2: Standard distance index for classify primary, mixed and permanent dentition.

Table 3: The standard distance classifying caries-free lesion and caries-lesion individuals with respective dmft/DMFT index and number of teeth with caries lesion.

Table 4: Resonance assignments of unstimulated human saliva, its metabolites components ($p < 0.05$) detectable in 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectra comparison between caries-lesion and caries-lesion free children subjects.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

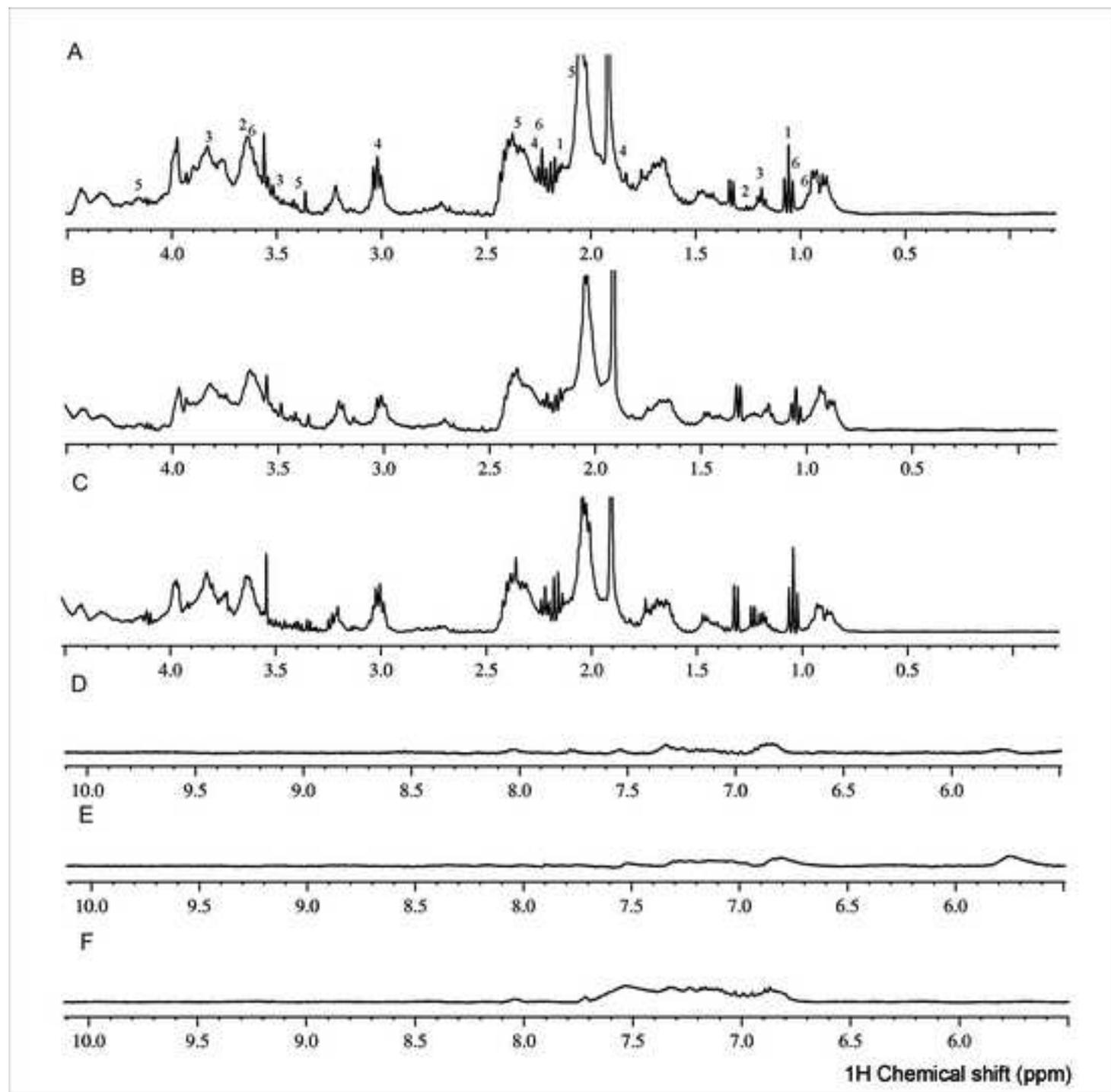


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

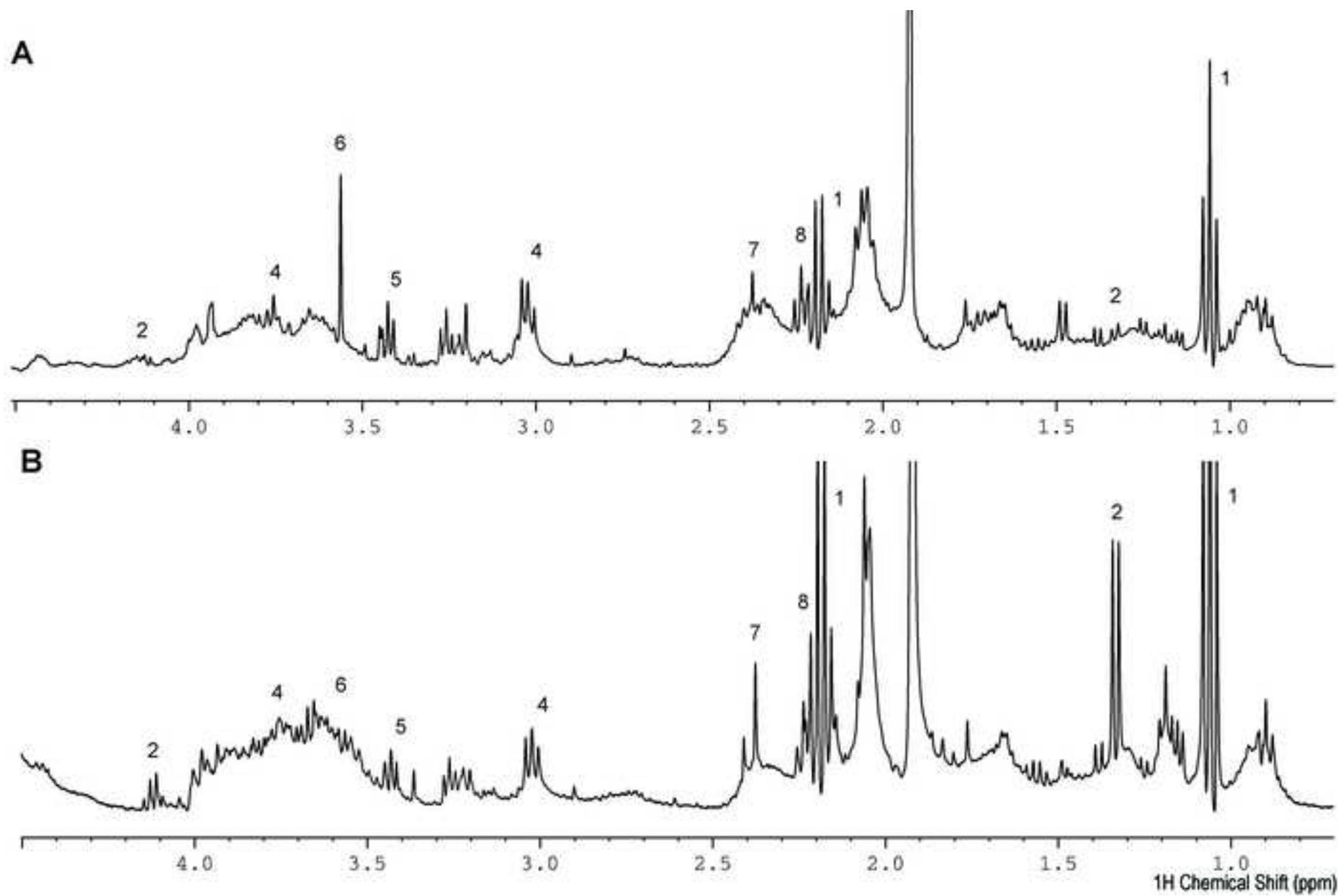


Table 1: Resonance assignments of unstimulated human saliva, its metabolite components ($p < 0.05$; ANOVA, Tukey's test) detectable in 400 MHz. $^1\text{H-NMR}$ spectra and comparison between primary, mixed and permanent dentition.

Metabolites	δ_{H} (ppm)	H	Multiplicity*	Dentitions	p -value
Gamma aminobutyric acid	1.88	β -CH ₂	m	Mixed>Primary Primary>Permanent	0.033 0.032
	2.29	α -CH ₂	t		
	3.02	γ -CH ₂	t		
Proline	2.07	α -CH ₂	m	Mixed >Primary	0.033
	2.07	β -CH ₂	m		
	2.35	β -CH ₂	m		
	3.40	δ -CH ₂	m		
	4.16	α -CH ₂	m		
Ethanol	1.21	CH ₃ -	t	Permanent>Primary	0.024
	3.66	CH ₂ OH	q	Permanent>Mixed	0.028
Propane-1,2-diol	1.18	CH ₃ -	d	Permanent>Primary Permanent>Mixed	0.036
	3.50	CHOH	d		
	3.86	CH ₂ OH CHOH	m		
Propionate	1.04	β -CH ₂	t	Permanent>Primary	0.037
	2.17	α -CH ₂	q		
Valine	0.97	CH ₃	d	Primary>Mixed	0.017
	1.02	β -CH ₂	m		
	2.28	β -CH	m		
	3.64	α -CH	d		

*Multiplicity indicates peak quantities in $^1\text{H-NMR}$ spectra (d-duplet, t- triplet, q- quartet and m- multiplet). δ_{H} – Chemical shift.

Table 2: Standard distance for primary, mixed and permanent dentition classification.

Primary dentition	Mixed dentition	Permanent dentition
4.97	7.96	3.86
6.55	5.39	2.68
11.61	3.81*	3.25
9.70	9.16	2.87
6.33	7.76	3.56
23.93	16.93	2.80
111.37	7.48	2.51
6.93	7.87	3.68
7.24	7.35	3.88
6.17	11.95	3.60
3.06*	7.83	3.71
9.89	4.22*	3.88
4.59	18.50	3.82
181.86	14.83	3.86
51.36	10.63	3.85
	6.49	3.87
	5.83	3.27
	145.60	
$29.70 \pm 50.75^{**}$	$16.64 \pm 32.44^{**}$	$3.47 \pm 0.48^{**}$

*Cut-off point = 4.48. *Indicates normal standard distance; ** Median \pm Standard deviation.*

Table 3: Resonance assignments of unstimulated human saliva, its metabolite components ($p < 0.05$) detectable in 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectra and comparison between caries-lesion and caries-lesion free child subjects.

Metabolites	^1H Chemical Shift	Multiplicity*	Assignment	Caries-lesion free	Caries lesion	p -value
Acetate	1.92	s	CH_3	↑	↓	0.020
α -galactose	3.70, 3.82, 3.82, 3.87, 3.97	m, m, dd, t, dd	$\text{H}_6, \text{H}_6, \text{H}_2, \text{H}_3, \text{H}_4$	↓	↑	$p < 0.001$
α -glucose	3.84, 3.82, 3.74, 3.71, 3.53, 3.41	m, m, m, t, dd, t	$\text{H}_6, \text{H}_5, \text{H}_6, \text{H}_3, \text{H}_2, \text{H}_4$	↓	↑	$p < 0.001$
Choline	3.21	s	$-\text{N}+(\text{CH}_3)_3$	↑	↓	0.008
Glutamine	3.81, 2.47, 2.14	t, m, m	$\alpha\text{-CH}, \gamma\text{-CH}_2, \beta\text{-CH}_2$	↓	↑	$p < 0.001$
Glutamate	2.10, 2.37, 3.79	m, m, t	$\beta\text{-CH}_2, \gamma\text{-CH}_2, \alpha\text{-CH}$	↓	↑	0.004
Glycerol	3.55, 3.63, 3.78	dd, dd, m	$-\text{C-CH}_2\text{OH}, -\text{C-CH}_2\text{OH}, \text{CHOH}$	↑	↓	0.033
Lactate	1.33, 4.13	d, q	CH_3, CH	↓	↑	$p < 0.001$
Lysine	1.49, 1.73, 1.90, 3.01, 3.76	m, m, m, t, t	$\gamma\text{-CH}_2, \delta\text{-CH}_2, \beta\text{-CH}_2, -\text{CH}_2, \alpha\text{-CH}$	↓	↑	0.002
Mannitol	3.67, 3.75, 3.79	dd, m, d	CH_2OH (C1/C6), H2 and H5, H-3 and H-4	↓	↑	$p < 0.001$
Propionate	1.04, 2.17	t, q	$\beta\text{-CH}_3, \alpha\text{-CH}_2$	↓	↑	$p < 0.001$
Provitamin B5	0.93, 1.78, 3.34, 3.49, 3.68, 4.01	s, m, t, s, t, s	$\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}, \text{CH}_2\text{NH}, -\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-CH}_2\text{OH}, \text{CH}_2\text{OH}, -\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-CHOH}(\text{CONH})$	↓	↑	0.003
N-caproate	0.83, 1.35, 1.58, 2.15	t, m, m, t	$-\text{CH}_3, \gamma, \delta\text{-CH}_2\text{'s}, \beta\text{-CH}_2, \alpha\text{-CH}_2$	↓	↑	0.001
N-valerate	0.85, 1.40, 1.58, 2.15	t, m, m, t	$\delta\text{-CH}_3, \gamma\text{-CH}_2, \beta\text{-CH}_2, \alpha\text{-CH}_2$	↓	↑	$p < 0.001$
4-hydroxyproline	2.23, 2.47, 3.47, 4.46	m, m, m, m	$\gamma\text{-CHOH}, \beta\text{-CH}_2, \delta\text{-CH}_2\text{-NH}, \alpha\text{-CH}$	↑	↓	0.001
Saturated fatty acid	0.86, 1.28, 1.53, 2.18	t, m, m, t	$\text{CH}_3, \text{CH}_3\text{CH}_2/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_n\text{-}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$	↓	↑	$p < 0.001$
Sodium dodecyl sulfate	0.92, 1.34, 1.71, 1.71, 4.00	t, m, m, m, t	$\text{CH}_3, \text{CH}_3\text{CH}_2/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_n\text{-}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSO}_3^-, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSO}_3^-$	↓	↑	$p < 0.001$

Sucrose	3.47, 3.56, 3.68, 3.76, 3.76, 3.76, 3.83, 3.83, 3.86, 3.89, 4.05, 4.22, 5.41	T, m, s, t, m, m, m, t, m, m, t, d, d	H ₄ , H ₂ , H ₁ ', H ₃ , H ₆ , H ₆ ', H ₆ '', H ₃ , H ₅ , H ₅ , H ₄ , H ₃ ', H ₁	↑	↓	0.006
Thymol	1.25, 2.18, 3.18, 6.61, 6.66, 6.99	d, s, m, dd, s, dd	(CH ₃) ₂ CH, CH ₃ -Ar, (CH ₃) ₂ CH, H ₆ , H ₂ , H ₅	↓	↑	p<0.001
3-D-hydroxybutyrate	4.13, 2.45, 2.34, 1.24	dd, dd, dd d	CH ₃ , CH ₂ , CH ₂ , CH	↑	↓	p<0.001
Ornithine	1.81, 1.95, 3.05, 3.80	m, m, t, t	γ-CH ₂ β-CH ₂ , δ-CH ₂ , α-CH	↓	↑	p<0.001
Xylitol	3.64, 3.64, 3.72, 3.80, 3.86	m, dd, dd, m, dd	H ₃ , CH ₂ OH (C1/C5), CH ₂ OH (C1/C5), H ₂ and H ₄ , CH ₂ OH (C1/C6)	↓	↑	p<0.001

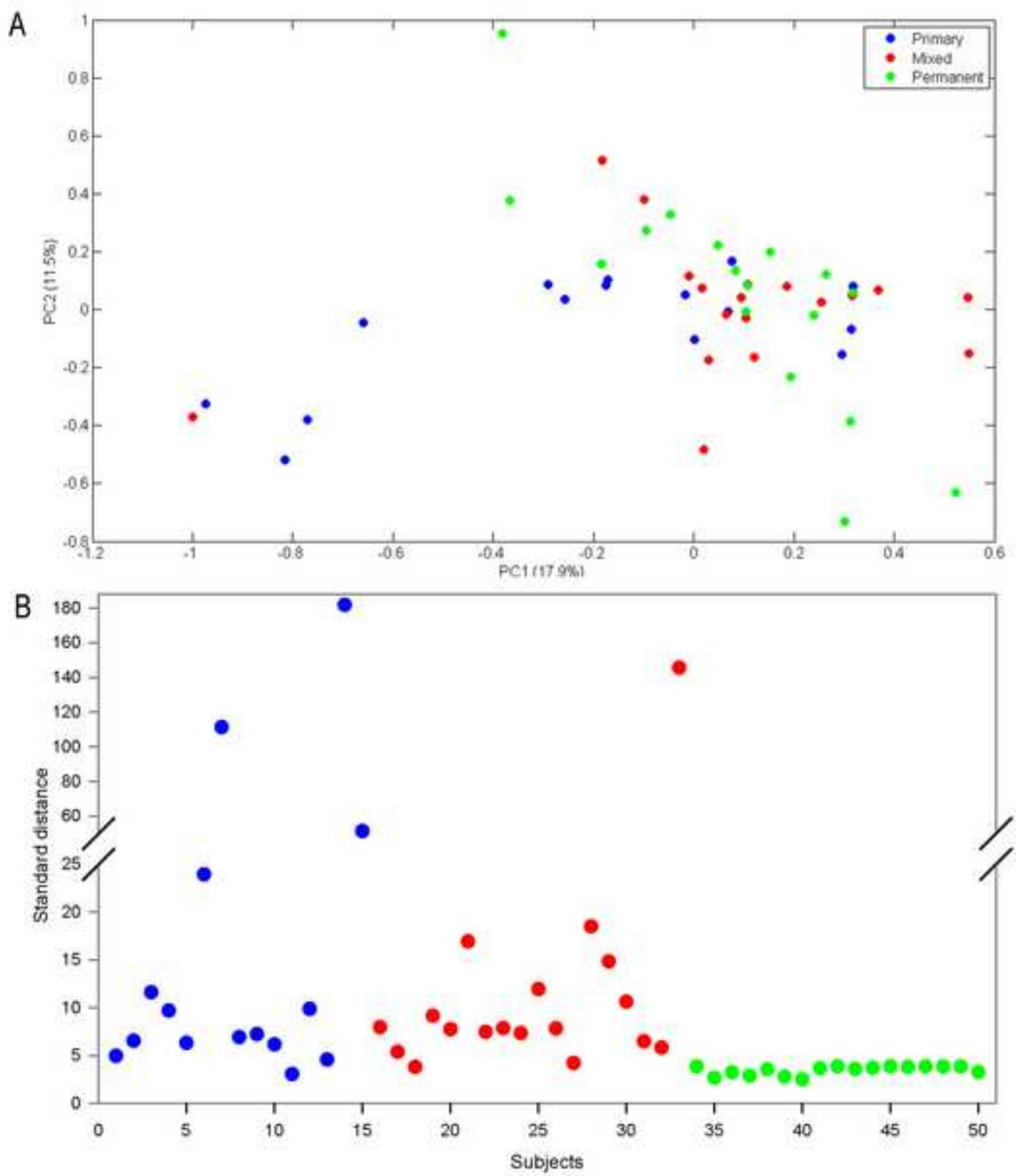
*Multiplicity indicates peak quantities in ¹H-NMR spectra (s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet). The 10 PCs used explained 86.13% of variation to find out precisely which regions of the NMR spectra have caused the separation between groups. The respective metabolites that presented statistical differences (p<0.05; F test) are indicated. The metabolite α-galactose was identified in all 10 PCs.

Table 4: The standard distance classifying caries-free lesion and caries-lesion individuals with respective dmft/DMFT index and number of teeth with caries-lesion.

Caries-lesion free	Caries-lesion	dmft/DMFT	Number of teeth with caries-lesion
3.99*	57.97	3	3
3.91	51.80	9	9
3.85	49.54	5	5
3.77	44.37	5	4
3.77	25.67	7	7
3.68	10.24	5	2
3.40	8.90	1	1
3.36	7.58	5	4
3.31	7.43	6	5
3.11	5.37	5	4
2.94	4.86	4	3
2.61	4.31	5	5
2.20	4.21	2	2
2.24	4.10	7	2
2.10	3.86**	5	4
1.98			
1.78			
1.30			
$2.96 \pm 0.85^{\S}$	$19.35 \pm 20.58^{\S}$	$4.92 \pm 2.14^{\S}$	$4.00 \pm 2.24^{\S}$

*Cut-off=3.98; *Upper than cut-off; **Lower than cut-off. [§]Median \pm Standard deviation*

Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)



9. Currículo

Nome: Renata Angeli

Nascimento: 22/11/1980

Naturalidade: Recife – PE

→ Formação Acadêmica

- Graduação em Biomedicina pela Universidade Federal de Pernambuco, março de 2000 a maio de 2004.
- Mestrado em Ciências Biológicas – Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco.
- Doutorado em Química Biológica – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

→ Comunicação em Congressos

- 15 comunicações em congressos nacionais
- 1 comunicação em congressos internacionais

→ Publicações

de Medeiros, L. N.; Angeli, R.; Sarzedas, C. G.; Barreto-Bergter, E.; Valente, A. P.; Kurtenbach, E.; Almeida, F. C.L. (2010). Backbone dynamics of the antifungal Psd1 pea defensin and its correlation with membrane interaction by NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 2:105-113. **doi:10.1016/j.bbamem.2009.07.013**

Angeli, R.; da Paz, N. V. N.; Maciel, J. C.; Araújo, F. F. B.; Paiva, P. M. G.; Calazans, G. M. T.; Valente, A. P.; Almeida, F. C. L.; Coelho, L. C. B. B.; Carvalho, L. B.; Silva, M. P. C.; Correia, M. T. S. (2009). Ferromagnetic Levan Composite: An Affinity Matrix to Purify Lectin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, p.1-7. **doi:10.1155/2009/179106**

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](#)