



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

ARIANE FERREIRA LACERDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS
DEFENSINAS RECOMBINANTES DE ERVILHA (Drr230a) E
CAFÉ (CD1) PRODUZIDAS EM *Pichia pastoris***

**NATAL
2015**

ARIANE FERREIRA LACERDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS
DEFENSINAS RECOMBINANTES DE ERVILHA (Drr230a) E
CAFÉ (CD1) PRODUZIDAS EM *Pichia pastoris***

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.
Orientadora: Maria Fátima Grossi de Sá.
Co-Orientadora: Kátia Castanho Scortecci

**NATAL
2015**

Seção de Informação e Referência

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Lacerda, Ariane Ferreira.

Avaliação da atividade antimicrobiana das defensinas recombinantes de ervilha (drr230a) e café (cd1) produzidas em *Pichia pastoris* / Ariane Ferreira Lacerda. – Natal, RN, 2015.

113f.

Orientadora: Maria Fátima Grossi de Sá.

Co-orientadora: Kátia Castanho Scortecci.

Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Bioquímica – Tese. 2. Defensinas vegetais - Tese. 3. *Pichia pastoris* - Tese. 4. *Phakopsora pachyrhizi* - Tese. 5. *Fusarium tucumaniae* – Tese. I. Sá, Maria Fátima Grossi de. II. Scortecci, Kátia Castanho. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 577

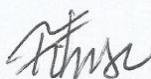
ARIANE FERREIRA LACERDA

Avaliação da atividade antimicrobiana das defensinas recombinantes de ervilha (drr230a) e café (cd1) produzidas em *Pichia pastoris*

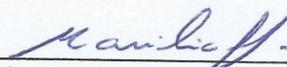
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em 30 de junho de 2015.

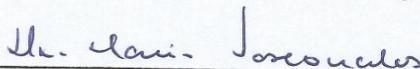
BANCA EXAMINADORA



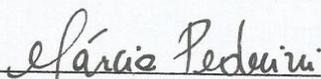
Profa. Dra. Maria Fátima Grossi de Sá
EMBRAPA/CENARGEN
Orientadora



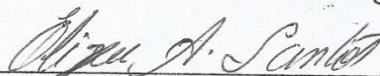
Profa. Dra. Marília Santos Silva
EMBRAPA/CENARGEN
Examinadora Externa à Instituição



Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará – UFC
Examinadora Externa à Instituição



Profa. Dra. Márcia Regina da Silva Pedrini
Departamento de Engenharia Química – UFRN
Examinadora Externa ao Programa



Prof. Dr. Elizeu Antunes dos Santos
Departamento de Bioquímica – UFRN
Examinador Interno

Dedico este trabalho aos meus pais Edilson Lacerda e Ruth Ferreira Lacerda, e ao meu irmão Cleber Lacerda, pelo apoio recebido durante toda a minha formação acadêmica. Obrigado por fazerem seus os meus momentos difíceis, por estarem presentes mesmo distantes e darem a esta conquista um sentido ainda maior.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por lembrar diariamente o seu cuidado por mim. A quem recorri e me sustentei durante todo o tempo. Quem me fez forte, quando estava fraco.

À Dra **Maria Fátima Grossi de Sá**, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe de trabalho. Por todo ensinamento adquirido na minha pós-graduação. Por todas as broncas e gritos construtivos que recebi. Com ela aprendi que não basta ser bom, é preciso provar.

À minha co-orientadora, **Kátia Castanho Scortecci**, pela amizade e pelo apoio durante todo o meu doutoramento. Pelas diversas vezes que me mostrou que Murphy existe, mas que no fim tudo dá certo.

Aos professores que compuseram a banca de qualificação **Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa, Adriana Ferreira Uchôa, e Susana Margarida Gomes Moreira** pela disponibilidade em avaliar o meu trabalho e pelas valiosas contribuições da escrita da tese.

À Dra e amiga **Marília Santos Silva**, pela amizade sincera, pelo apoio nos momentos difíceis e pelos valiosos ensinamentos fornecidos não somente no doutoramento, mas desde o início do mestrado. Por aceitar o convite de fazer parte da banca de defesa de doutorado e compartilhar comigo desta alegria.

Ao professor **Fernando Araripe** (UNB) pela ajuda e disponibilidade no uso das instalações do seu laboratório e a Dra. **Janice Lisboa de Marco** pela paciência e confiança no uso do Quix Stand durante todo meu doutoramento.

Ao Dr **Luciano Paulino**, pelo exemplo de dedicação a ciência, pela paciência em ensinar e por realizar os experimentos no espectrômetro de massas.

A Dra. **Ilka Vasconcelos**, pela disponibilidade em realizar o sequenciamento por Degradação de Edman na UFC e por aceitar o convite da banca de defesa de tese.

Aos professores **Octávio Luis Franco e Simoni Campos Dias** por conceder as instalações na UCB e me orientar durante os ensaios fúngicos e bacterianos.

Aos meus tios **Débora Jaime Ferreira e Fernando Luis Sousa**, a minha eterna gratidão. Não há palavras que possam expressar tamanha a gratidão por tudo que fizeram e fazem por mim.

A adorável amiga **Thássya Meneses**, que aceitou dividir seu apartamento comigo. Foram agradáveis momentos ao seu lado. Construímos uma bela e sincera amizade. Deus lhe retribua sempre em dobro tudo que fizeste por mim.

Aos amigos de equipe **Erico, Daiane e Athos**, pelas horas descontraídas e felizes que passamos juntos. Daiane, aprendi mais do que ensinei a você enquanto sua co-orientadora.

A adorável amiga **Loiane Alves de Lima**, pela inestimável ajuda nos ensaios fúngicos e bacterianos. Pela paciência e principalmente pela amizade que construímos durante esse tempo.

A eterna amiga **Vanessa Evangelista**. Pelo exemplo de garra, pela sincera e fraterna amizade. Pelos inesquecíveis momentos de convivência e aprendizado.

As amigas doidinhas **Paula Ivani, Ticiane e Virgínia**, pela adorável companhia durante o início do meu doutoramento, quando tudo ainda eram flores. Pelos divertidos almoços no “Pinga Fire” e no Pirandellos. A Tici por compartilhar comigo as dificuldades enquanto estivemos juntas (moramos) em Brasília. A Paulinha pela presença, apoio e conselhos na reta final da qualificação e defesa doutorado. Foram madrugadas divertidas juntas.

A todos os que me receberam no LBMG, em especial a amiga **Amanda Medeiros**. Obrigado pelo carinho atenção de sempre, pela paciência em ensinar o funcionamento e rotina do laboratório, por todos os dias que dividimos juntas.

Aos amigos da minha equipe de corrida BORA BORA, **Atanael, Isaura, Júlio Pires, Paula, Kyvia, Raquel, Torraca, Claudinha, Luciana, Eliana, Stelinha, Shirley, Marina, Eli, Paulo, Júlio e Robson** pelo apoio nos intensos quilômetros que percorremos juntos. Cruzei a linha de chegada e é sempre bom saber que tenho amigos a minha espera vibrando com a minha vitória. Obrigado por fazerem parte da minha vida nesta fase.

A todos os amigos e colegas do **Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I**, em especial **Leonardo, Carol, Roberta, Dijair, Fernando, Ana, Raquel, Regina, Dani, Rayssa, Hudson, Fabrício, Deisy e Júlia** pela amizade e pelas horas divertidas que compartilhamos juntos. A gente trabalha, mas a gente se diverte.

À **D. Margarida e Marcio Barros (*in memoriam*)**, o meu muito obrigado por todo carinho e atenção com que sempre se dispuseram a me auxiliar.

À secretária do LIMPP **Edna Bonfim**, e por todos os que passaram e contribuíram para o bom funcionamento e organização do laboratório: **Lecir, Sineide, Angélica e Sheyska**

À **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, a **Capes** e à **Universidade Federal do Rio Grande do Norte** pelo apoio financeiro.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

A ineficácia de pesticidas químicos no controle de fungos fitopatogênicos na agricultura e a frequente incidência de doenças humanas causadas por bactérias resistentes a antibióticos levam à busca por compostos antimicrobianos alternativos. Neste contexto, defensinas vegetais constituem uma promissora ferramenta no controle de agentes patogênicos tanto de plantas quanto de humanos. Defensinas de plantas são peptídeos catiônicos com aproximadamente 50 resíduos de aminoácidos, ricas em cisteínas e cuja estrutura tridimensional é bastante conservada entre as diferentes espécies vegetais. Estas moléculas de ação antimicrobiana representam um importante componente inato da resposta de defesa vegetal contra patógenos e são expressas em diversos tecidos da planta, como folhas, tubérculos, flores, vagens e sementes. O presente trabalho teve por finalidade a avaliação da atividade antimicrobiana de duas defensinas vegetais contra diferentes espécies de fungos fitopatogênicos e bactérias patogênicas ao homem. A defensina Drr230a, cujo gene foi isolado de ervilha (*Pisum sativum*) e a defensina CD1, cujo gene foi identificado no transcriptoma de café (*Coffea arabica*) foram subclonadas em vetor de expressão de levedura e expressas em *Pichia pastoris*. O gene cd1 foi subclonado em duas formas recombinantes: CD1tC, contendo uma sequência codificante para seis histidinas (6xHis) na região C-terminal do peptídeo e CD1tN, contendo sequência codificante para 6xHis na região N-terminal. No caso da defensina Drr230a, a sequência codificante para 6xHis foi inserida apenas na região N-terminal da proteína. Ensaio de atividade antimicrobiana das proteínas recombinantes purificadas rDrr230a e rCD1 contra *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática da soja, foram realizados para analisar a inibição da germinação de esporos *in vitro* e a severidade da doença causada pelo fungo *in planta*. As duas defensinas recombinantes testadas foram capazes de inibir a germinação de uredosporos de *P. pachyrhizi*, não havendo diferença entre a ação antimicrobiana de CD1tC e CD1tN. Ademais, rDrr230a e rCD1 reduziram drasticamente a severidade da ferrugem asiática da soja, conforme demonstrado em ensaios *in planta*. Apesar de rCD1 não ter sido capaz de inibir a proliferação das bactérias patogênicas humanas *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, rCD1 mostrou-se capaz de inibir o crescimento do fungo fitopatogênico *Fusarium tucumaniae*, causador da síndrome da morte súbita da soja. Os resultados obtidos mostram que tais defensinas vegetais são candidatas úteis para serem utilizadas em programas de engenharia genética de plantas para controlar doenças fúngicas impactantes na agricultura.

Palavras-chave: Defensina antifúngica, rDrr230a, rCD1, *Pichia pastoris*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Fusarium tucumaniae*.

ABSTRACT

The inefficiency of chemical pesticides to control phytopathogenic fungi in agriculture and the frequent incidence of human diseases caused by bacteria which are resistant to antibiotics lead to the search for alternative antimicrobial compounds. In this context, plant defensins are a promising tool for the control of both plant and human pathogenic agents. Plant defensins are cationic peptides of about 50 amino acid residues, rich in cysteine and whose tridimensional structure is considerably conserved among different plant species. These antimicrobial molecules represent an important innate component from plant defense response against pathogens and are expressed in various plant tissues, such as leaves, tubers, flowers, pods and seeds. The present work aimed at the evaluation of the antimicrobial activity of two plant defensins against different phytopathogenic fungi and pathogenic bacteria to humans. The defensin Drr230a, whose gene was isolated from pea (*Pisum sativum*), and the defensin CD1, whose gene was identified within coffee (*Coffea arabica*) transcriptome, were subcloned in yeast expression vector and expressed in *Pichia pastoris*. The gene *cd1* was subcloned as two different recombinant forms: CD1tC, containing a six-histidine sequence (6xHis) at the peptide C-terminal region and CD1tN, containing 6xHis coding sequence at the N-terminal region. In the case of the defensin Drr230a, the 6xHis coding sequence was inserted only at the N-terminal region. Assays of the antimicrobial activity of the purified recombinant proteins rDrr230a and rCD1 against *Phakopsora pachyrhizi*, causal agent of soybean Asian rust, were performed to analyze the *in vitro* spore germination inhibition and disease severity caused by the fungus *in planta*. Both recombinant defensins were able to inhibit *P. pachyrhizi* uredospore germination, with no difference between the antimicrobial action of either CD1tC or CD1tN. Moreover, rDrr230a and rCD1 drastically reduced severity of soybean Asian rust, as demonstrated by *in planta* assays. In spite of the fact that rCD1 was not able to inhibit proliferation of the human pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*, rCD1 was able to inhibit growth of the phytopathogenic fungus *Fusarium tucumaniae*, that causes soybean sudden death syndrome. The obtained results show that these plant defensins are useful candidates to be used in plant genetic engineering programs to control agriculture impacting fungal diseases.

Keywords: Antifungal defensin, rDrr230a, rCD1, *Pichia pastoris*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Fusarium tucumaniae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alinhamento da sequência de aminoácidos das defensinas vegetais antifúngicas.	20
Figura 2 : Estrutura tridimensional de seis defensinas vegetais.....	21
Figura 3 : Modelo dos mecanismos de ação propostos para as defensinas vegetai.	24
Figura 4: Levedura metilotrófica <i>Pichia pastoris</i>	28
Figura 5: Mapa da construção do vetor pGAPZ α B/CD1 para expressão heteróloga em <i>Pichia pastoris</i>	47
Figura 6: Sequência de aminoácidos obtidas para CD1tC e CD1tN..	49
Figura 7: Análise por TRICINA-SDS-PAGE 14% (a) e Western blot (b) da expressão de rDRR230a em <i>P. pastoris</i>	59
Figura 8: Análise por TRICINA-SDS-PAGE 14% (a) e Western blot (b) de rDRR230a após purificação por cromatografia de afinidade (Histrap FF crude).....	60
Figura 9: Análise da reação de PCR para a detecção da amplificação da defensina de café CD1..	61
Figura 10: Análise da digestão do plasmídeo pGAPZ α -B/CD1 com as enzimas de restrição <i>EcoRI</i> e <i>Sall</i>	62
Figura 11: Análise por TRICINA-SDS-PAGE 14% da expressão das proteínas recombinantes rCD1tN e rCD1tC.....	63
Figura 12: Análise por TRICINA-SDS-PAGE 14% da expressão de rCD1tN e rCD1tC após filtração tangencial (<i>QuixStand Benchtop System</i>).....	64
Figura 13: Análise por TRICINA-SDS-PAGE 14% (a) e Western blot (b) de rCD1tN após purificação por cromatografia de afinidade (Histrap FF crude).....	65
Figura 14: Análise por TRICINA-SDS-PAGE 14% (a) e Western blot (b) de rCD1tC após purificação por cromatografia de afinidade (Histrap FF crude).....	66
Figura 15: Cromatograma obtido após cromatografia de fase reversa em coluna C18 das formas recombinantes de CD1 em HPLC.	67
Figura 16: Espectros de massa das proteínas recombinantes rCD1tC e rCDtN adquiridos em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF.....	69
Figura 17: Comparação de sequências de aminoácidos das formas recombinantes rCD1tC e rCD1tN com as sequências preditas para as proteínas.....	70

Figura 18: Efeito de rDrr230a sobre a germinação de uredosporos do fungo <i>P.pachyrhizi</i>	71
Figura 19: Inibição da germinação de uredosporos do fungo <i>P. pachyrhizi</i> por rCD1tC e rCD1tN.	72
Figura 20: Análise da atividade da rDrr230a sobre folhas de soja infectadas com <i>P. pachyrhizi</i>	74
Figura 21: Análise da atividade da rCD1 sobre folhas de soja infectadas com <i>P. pachyrhizi</i>	75
Figura 22: Avaliação da atividade antifúngica da defensina recombinante rCD1tC contra <i>Fusarium tucumaniae</i>	76
Figura 23: Avaliação da atividade antifúngica da defensina recombinante rCD1tN contra o fungo fitopatogênico <i>Fusarium tucumaniae</i>	77
Figura 24: Avaliação da atividade antifúngica das defensinas recombinantes rCD1tN e rCD1tC contra o fungo fitopatogênico <i>Fusarium oxysporum</i>	77
Figura 25: Avaliação da atividade antifúngica da defensina recombinante rCD1tC e rCD1tN contra o fungo patogênico <i>Candida albicans</i>	78
Figura 26: Avaliação da atividade antibacteriana da defensina recombinante rCD1tC contra a bactéria patogênica <i>Klebsiella pneumoniae</i>	79
Figura 27: Avaliação da atividade antibacteriana da defensina recombinante rCD1tC contra a bactéria patogênica <i>Staphylococcus aureus</i>	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 : Defensinas vegetais e seu amplo espectro de atividades biológicas.....	23
TABELA 2: Defensinas vegetais expressas em <i>Pichia pastoris</i>	34
TABELA 3: Defensinas antifúngicas utilizadas para transformação genética de plantas	38
TABELA 4: Oligonucleotídeos desenhados para a subclonagem da região codificadora do peptídeo maduro codificado pelo gene <i>cd1</i> no vetor pGAPz α -B.....	46
TABELA 5: Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento do gene de defensina de café (<i>cd1</i>) subclonado no plasmídeo pGAPz α -B.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMPs** - *Antimicrobial peptides* (Peptídeos antimicrobianos)
- ROS** - *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)
- IMAC** - Cromatografia de afinidade com níquel imobilizado (*Immobilized metal affinity chromatography*)
- PR** - Proteínas relacionadas à patogênese (*Pathogenesis related protein*)
- PDB** - Banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank*)
- GlcCer** - Glicosilceramidas
- AOX1** - Álcool oxidase 1
- AOX2** - Álcool oxidase 2
- PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase
- dNTPs** - Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- OD_{600nm}** - Densidade celular óptica a 600 nm
- LB** - Meio de cultura Luria Bertani
- YPD** - *Yeast Extract Peptone Dextrose Medium* - Meio de cultura para levedura.
- YNB** - *Yeast Nitrogen Base* (Base nitrogenada de levedura)
- BMG** - Meio mínimo tamponado contendo glicerol
- BMM** - Meio mínimo tamponado contendo metanol
- TBS** - Tampão tris salino
- BSA** - Albumina Sérica Bovina
- PDB** - *Potato Dextrose Broth* (Difco™) – Meio agar batata dextrose
- MEV** - Microscopia Eletrônica de Varredura
- Drr230a** Disease resistance response gene family from pea
- CD1** - Coffea defensin 1
- CLSI** – Clinical and Laboratory Standards Institute

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	19
1.1 - Defensinas vegetais	19
1.2 - Sistemas heterólogos para a produção de proteínas recombinantes	25
1.3 - <i>Pichia pastoris</i> como sistema para expressão de proteínas heterólogas.....	28
1.4 - Expressão heteróloga de defensinas vegetais utilizando <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expressão.	31
1.5 - O potencial uso de defensinas vegetais como moléculas bioativas para controle de doenças de plantas e patógenos.....	34
1.6 - Projeto Genoma Café: Seleção de genes de defensina para controle biotecnológico.	39
2 - JUSTIFICATIVA	42
3 – OBJETIVOS	43
3.1 - Objetivo Geral	43
3.2 - Objetivos Específicos	43
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 - Expressão da defensina (Drr230a) de ervilha (<i>Pisum sativum</i>) na levedura <i>Pichia pastoris</i> e purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade.....	44
4.2 - Subclonagem de cd1 no vetor pGAPZ α -B para expressão constitutiva em <i>Pichia pastoris</i>	46
4.3 - Purificação das proteínas recombinantes rCD1tN e rCD1tC e detecção das proteínas purificadas por Western blot.....	51
4.4 - Análise da massa molecular e sequenciamento parcial das proteínas recombinantes CD1tN e CD1tC por espectrometria de massa.	52
4.5 - Sequenciamento do N-terminal das defensinas recombinantes (rCD1tN e rCD1tC) por degradação de Edman.....	53
4.6 – Avaliação da atividade antimicrobiana das defensinas recombinantes rDrr230a e rCD1	53
4.6.1 - Análise da atividade das defensinas recombinantes rDrr230a e rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre a germinação dos uredosporos do fungo <i>P. pachyrhizi</i>	53
4.6.2 - Análise da atividade das defensinas recombinantes rDrr230a e rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre o fungo <i>P. pachyrhizi</i> em ensaios <i>in planta</i>	54

4.6.3 - Análise da atividade da defensina recombinante rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre os fungos fitopatogênicos <i>Fusarium tucumaniae</i> e <i>Fusarium oxysporum</i>	55
4.6.4 - Análise da atividade antifúngica da defensina rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre o fungo patogênico <i>Candida albicans</i>	56
4.6.5 - Análise da atividade antibacteriana da defensina rCD1 (rCD1tC) sobre as bactérias patogênicas <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	57
4.7 – Análises estatísticas.....	57
5 - RESULTADOS.....	59
5.1 - Expressão da defensina (drr230a) de ervilha (<i>Pisum sativum</i>) na levedura <i>Pichia pastoris</i> e purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade.....	59
5.2 - Subclonagem de cd1 no vetor pGAPZα-B para expressão constitutiva em <i>Pichia pastoris</i>	60
5.3 - Expressão da defensina (cd1) de café (<i>Coffea arabica</i>) na levedura <i>Pichia pastoris</i> e detecção das proteínas recombinantes (rCD1tN e rCD1tC) por eletroforese em gel de poliacrilamida (TRICINA-SDS-PAGE).....	62
5.4 - Purificação das proteínas recombinantes e detecção das proteínas purificadas por Western blot.	64
5.5 - Análise da massa molecular e sequenciamento parcial das proteínas recombinantes CD1tN e CD1tC por espectrometria de massa.	68
5.6 - Sequenciamento do N-terminal das defensinas recombinantes rCD1tN e rCD1tC por Degradação de Edman.	70
5.7 – Avaliação da atividade antimicrobiana das defensinas recombinantes rDrr230a e rCD1	71
5.7.1 - Análise da atividade das defensinas recombinantes rDrr230a e rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre a germinação dos uredosporos do fungo <i>Phakopsora pachyrhizi</i> . 71	
5.7.2 - Análise da atividade das defensinas recombinantes rDrr230a e rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre o fungo <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em ensaios <i>in planta</i>	73
5.7.3 - Análise da atividade da defensina recombinante rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre os fungos fitopatogênicos <i>Fusarium tucumaniae</i> e <i>Fusarium oxysporum</i>	76
5.7.4 - Análise da atividade antifúngica da defensina rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre o fungo patogênico <i>Candida albicans</i>	78
5.7.5 - Análise da atividade antibacteriana da defensina rCD1 (rCD1tC) sobre as bactérias patogênicas <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	79

6 – DISCUSSÃO	81
7 - CONCLUSÃO	94
8 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
9- APÊNDICE	

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Defensinas vegetais

Desde 1990, quando foram descobertas em plantas de trigo e cevada, as defensinas passaram a ser alvo de interesse em diversos ramos da biologia e da medicina. Elas foram inicialmente nomeadas de γ -tioninas devido a semelhança no tamanho e no conteúdo de resíduos de cisteína encontrados em tioninas anteriormente reportadas. No entanto, estudos estruturais subsequentes revelaram que defensinas não eram relacionadas com tioninas. Devido a sua semelhança estrutural com defensinas de mamíferos e insetos, foram renomeadas e a partir de 1995 passaram a ser chamadas de defensinas de plantas (DE COONINCK *et al.*, 2013).

O nome defensina deriva do latim “*defendo*” que significa repelir (NG *et al.*, 2011). Essas proteínas pertencem a uma família de peptídeos antimicrobianos que desempenham um papel fundamental na imunidade inata de todas as espécies de planta, sendo expressas constitutivamente durante o seu desenvolvimento, ou induzidas em resposta ao ataque de patógenos. Além da indução por patógenos, as defensinas podem ser induzidas por fitormônios como o ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno que atuam como sinalizadores e indutores da expressão dessas proteínas, e ainda por fatores ambientais como seca, sal e frio (STOTZ *et al.*, 2009; VRIENS *et al.*, 2014).

Sua distribuição ampla é consistente com o seu papel de defesa, podendo ser encontrada em diversos tecidos da planta, incluindo folhas, tubérculos, flores, vagens e sementes. Além disso, estão presentes no xilema, parênquima, estômatos e outras áreas periféricas que são consideradas porta de entrada para patógenos em potencial (LACERDA *et al.*, 2014).

As defensinas compreendem uma família de peptídeos catiônicos com massa molecular de ~5 kDa, contendo de 45 a 54 resíduos de aminoácidos e ricas em cisteínas. Sua estrutura tridimensional é bastante conservada entre diferentes espécies, sendo caracterizadas por uma α -hélice e três folhas β antiparalelas. Essa estrutura tridimensional é estabilizada por um motivo típico, denominado *cysteine-stabilized α -helix (CS α / β)*, que consiste em duas pontes dissulfeto formadas entre duas cisteínas da α -hélice com duas cisteínas do C-terminal da folha β (Figura 1)

(KOBAYASHI *et al.*, 1991; ZHU *et al.*, 2005). Adicionalmente, dois motivos estão presentes na estrutura das defensinas: o domínio α -core compreendendo o *loop* que conecta a primeira folha β à estrutura de α -hélice, e o γ -core contendo o *loop* *harpin* que conecta a segunda e a terceira folha β ($L\beta 2\beta 3$) (Figuras 1 e 2) (YOUNT ;YEAMAN, 2004).

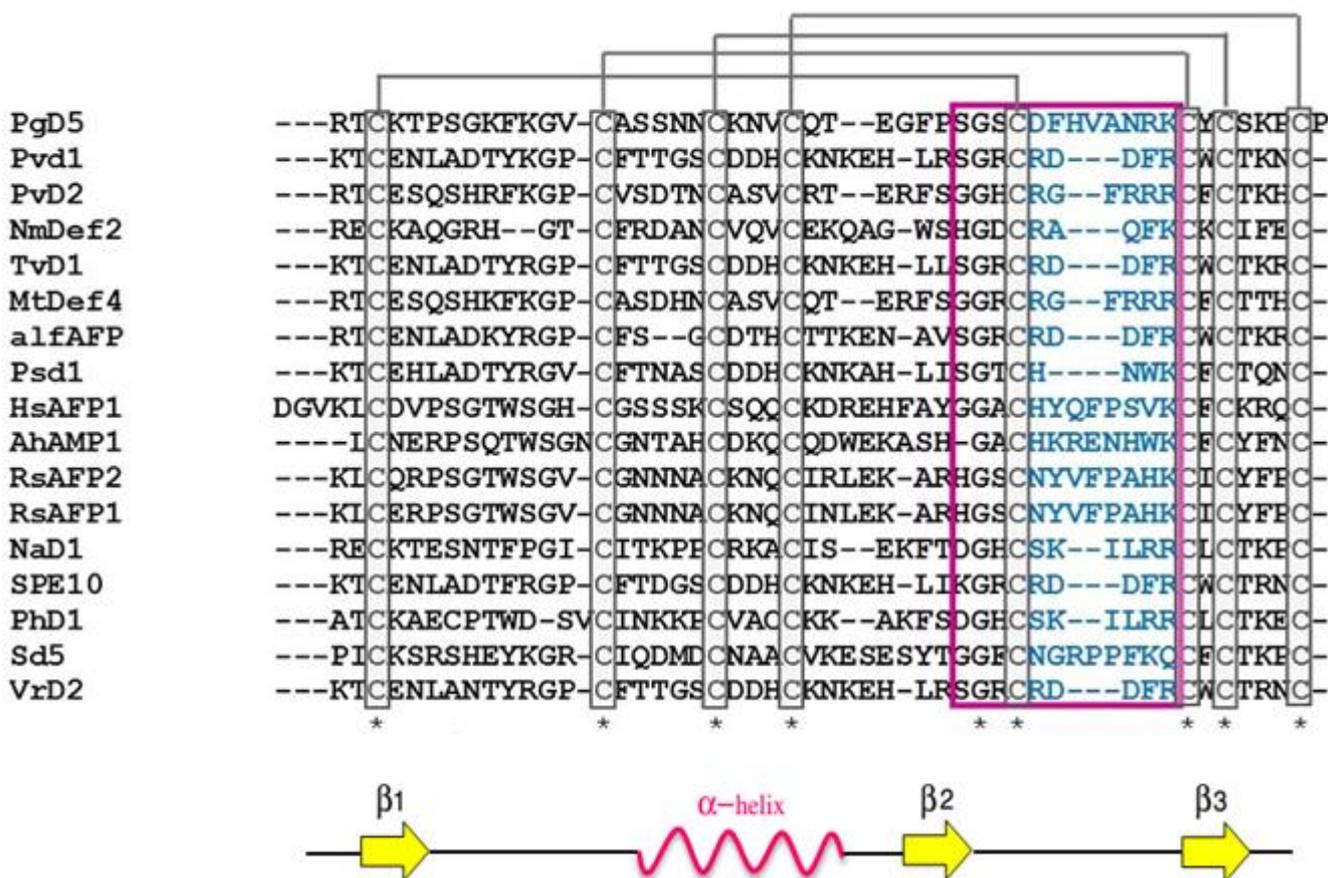


Figura 1: Alinhamento da sequência de aminoácidos das defensinas vegetais antifúngicas. **PgD5**: Defensina de *Picea glauca* (Acesso PDB: AAR84643); **Pvd1**: Defensina 1 de *Phaseolus vulgaris* (Acesso PDB: ADR30066); **PvD2**: Defensina 2 de *Phaseolus vulgaris* (Acesso PDB: ADR3006); **NmDef1**: Defensina de *Nicotiana megalosiphon* (Acesso PDB: ACR46857); **TvD1**: Defensina de *Tephrosia villosa* (Acesso PDB: AAX86993); **MtDef4**: Defensina 4 de *Medicago trunculata* ((Acesso PDB: 2LR3_A); **alfAFP**: Peptídeo antifúngico 1 de *Medicago sativa* (Acesso PDB: AAG40321); **Psd1**: Defensina 1 de *Pisum sativum* (Acesso PDB: 1JKZ_A); **HsAFP1**: Peptídeo antifúngico de *Heuchera sanguinea* (Acesso PDB: POC8Y5); **AhAMP1**: Peptídeo antimicrobiano de *Aesculus hippocastanum* (Acesso PDB: AAB34970); **RsAFP1**: Peptídeo antifúngico 1 de *Raphanus sativus* (Acesso PDB: 1AYJ_A); **RsAFP2**: Peptídeo antifúngico 2 de *Raphanus sativus* (Acesso PDB: P30230); **NaD1**: Defensina 1 de *Nicotiana glauca* (Acesso PDB: 4ABO_A); **SPE10**: Defensina de *Pachyrhizus erosus* (Acesso PDB: 3PSM_A); **PhD1**: Defensina 1 de *Petunia hybrida* (Acesso PDB: 1N4N_A); **Sd5**: Defensina 5 de *Saccharum officinarum* (Acesso PDB: 2KSK_A); **VrD2**: Defensina 2 de *Vigna radiata* (Acesso PDB: 2GL1_A). O asterisco e as caixas em cinza indicam os resíduos do aminoácido cisteína conservados entre as defensinas. Linhas em cinza representam as pontes dissulfeto entre os resíduos do aminoácido cisteína. Caixa em rosa e resíduos de aminoácidos em azul correspondem ao domínio γ -core. O alinhamento foi realizado utilizando a ferramenta Clustal W2 Tool. Adaptado de LACERDA *et al.* (2014)

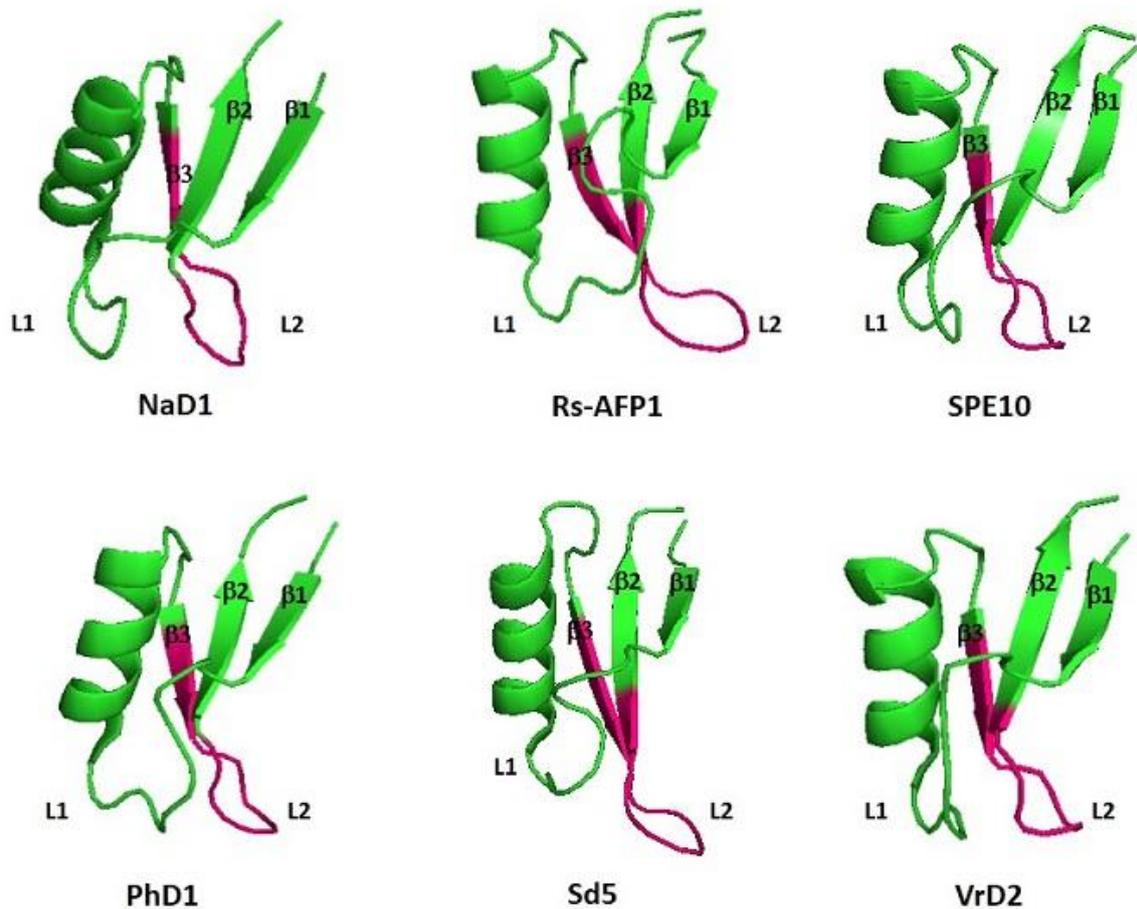


Figura 2 : **Estrutura tridimensional de seis defensinas vegetais.** A região em rosa destaca o motivo γ -core de cada peptídeo. β 1: Folha β 1; β 2: Folha β 2; β 3: Folha β 3; L1: Loop 1; L2: Loop 2; NaD1: Defensina 1 de *Nicotiana alata* (Acesso PDB: 4ABO_A); Rs-AFP1: Peptídeo antifúngico 1 de *Raphanus sativus* (Acesso PDB: 1AYJ_A); SPE10: Defensina de *Pachyrhizus erosus* (Acesso PDB: 3PSM_A); PhD1: Defensina 1 de *Petunia hybrida* (Acesso PDB: 1N4N_A); Sd5: Defensina 5 de *Saccharum officinarum* (Acesso PDB: 2KSK_A); VrD2: Defensina 2 de *Vigna radiata* (Acesso PDB: 2GL1_A). Todas as figuras foram desenhadas utilizando o programa de gráficos moleculares PyMOL versão 1.2r3pre, Schrödinger, LLC (LACERDA, *et al.*, 2014).

Apesar dessas proteínas apresentarem uma estrutura tridimensional conservada entre diferentes espécies, sua sequência primária não é conservada, restringindo-se a apenas alguns resíduos de cisteína e um resíduo de glicina posicionados na segunda folha β , conforme demonstrado na Figura 1, que apresenta o alinhamento de sequências de diversas defensinas vegetais (LACERDA *et al.*, 2014).

No entanto, algumas defensinas possuem estruturas diferenciadas. Defensinas isoladas de flores de *Petunia hybrida* (PhD1 e PhD2) apresentam em sua estrutura 10 resíduos de cisteína formando 5 pontes dissulfeto. A ponte dissulfeto adicional, localizada após a α -hélice e a primeira folha β não afeta a estrutura tridimensional típica da defensina. A quinta ponte dissulfeto parece reforçar uma ligação de hidrogênio conservada e conferir maior estabilidade termodinâmica à defensina (JANSSEN, *et al.*, 2003; LAY, *et al.*, 2003).

Além disso, defensinas de plantas com estruturas alternativas foram reportadas na literatura: defensina de tabaco NaD1 isolada de *Nicotiana glauca*, defensina ZmESR6 isolada a partir de grãos de milho em desenvolvimento e ainda as defensinas florais PhD1 e PhD2. Estas defensinas contêm um pró-domínio C-terminal ácido extra, cuja função ainda não é conhecida. No entanto, alguns autores sugerem estar envolvido no direcionamento vacuolar ou na eliminação de possíveis efeitos prejudiciais provocados pela natureza básica da defensina (DE CONINCK *et al.*, 2013).

As proteínas dessa família são ultra-estáveis em condições ambientais extremas. As defensinas resistem a temperaturas próximas do ponto de ebulição da água sem que a sua atividade e estrutura sejam prejudicadas. São capazes de resistir a ambientes ácidos, mesmo quando o pH é inferior a 2, o que é próximo ao pH do estômago. Devido a este fato, defensinas resistentes a proteases têm sido relatadas. Essa alta estabilidade encontrada nas defensinas vegetais é devido à grande quantidade de resíduos de cisteína que formam as pontes dissulfeto (YANG;LYU, 2008).

A baixa similaridade na sequência de aminoácidos encontrada nas defensinas reflete o amplo espectro de atividades biológicas que esses peptídeos apresentam. Pequenas alterações conformacionais na estrutura terciária contribuem para o amplo espectro de atividade dessas proteínas (CARVALHO;GOMES, 2009).

Diversas atividades já foram descritas, incluindo atividade antimicrobiana, inibidoras de enzimas como proteases e α -amilases de insetos, inibidoras da síntese de proteínas, bloqueadoras de canais iônicos e mediadoras de tolerância a zinco em plantas. Algumas defensinas vegetais exibem atividade antiproliferativa contra células cancerosas ou apresentam atividade inibitória contra a transcriptase reversa do vírus HIV1 (VAN DER WEERDEN;ANDERSON, 2013).

Embora apresente a capacidade de inibir o crescimento microbiano, apenas algumas defensinas vegetais têm sido mostradas ativas contra bactérias. A maioria das defensinas reportadas na literatura apresenta atividade antifúngica, sendo ativas contra diversos tipos de fungos patogênicos e fitopatogênicos, além de serem ativas contra leveduras (Tabela 1) (CARVALHO;GOMES, 2009 e 2011).

Tabela 1 : Defensinas vegetais e seu amplo espectro de atividades biológicas.

Atividade Biológica	Nome da defensina	Origem	Referência
Antifúngica	Rs-AFP1 e Rs-AFP2	<i>Raphanus sativus</i>	TERRAS, <i>et al.</i> , 1992
	NaD1	<i>Nicotiana glauca</i>	LAY, <i>et al.</i> , 2003
	PhD1, PhD2	<i>Petunia hybrida</i>	LAY, <i>et al.</i> , 2003
	SPE10	<i>Pachyrrhizus erosus</i>	SONG, <i>et al.</i> , 2005
	Zm-ESR6	<i>Zea mays</i>	BALANDIN, <i>et al.</i> , 2005
	Psd1	<i>Pisum sativum</i>	ALMEIDA, <i>et al.</i> , 2001
	AFP1	<i>Brassica juncea</i>	OGURO, <i>et al.</i> , 2014
Antibacteriana	Zm-ESR6	<i>Zea mays</i>	BALANDIN, <i>et al.</i> , 2005
	Sesquina	<i>Vigna sesquipedalis</i>	WONG ;NG, 2005
	Cp-tionina II	<i>Vigna unguiculata</i>	FRANCO, <i>et al.</i> , 2006
	Ns-D ₁ , Ns-D ₂	<i>Nigella sativa</i>	ROGOZHIN, <i>et al.</i> , 2011
Inibidor de α -amilase	γ -H (gama hordotionina)	<i>Hordeum vulgare</i>	MENDEZ, <i>et al.</i> , 1996
	VrD1	<i>Vigna radiata</i>	CHEN, <i>et al.</i> , 2004
	VuD1	<i>Vigna unguiculata</i>	PELEGRINI, <i>et al.</i> , 2008
	Defensina de feijão de corda (VUDEF)	<i>Vigna unguiculata</i>	CARVALHO, <i>et al.</i> , 2006
Tolerância a Zinco (Zn)	PDF1	<i>Arabidopsis halleri</i>	MIROUZE, <i>et al.</i> , 2006
Bloqueador de canais iônicos	γ 1-Z e γ 2-Z (PDC-1)	<i>Zea Mays</i>	KUSHMERICK, <i>et al.</i> , 1998
	MsDef1	<i>Medicago sativa</i>	SPELBRINK, <i>et al.</i> , 2004
Inibidor de transcriptase reversa do vírus HIV	RBAFP	<i>Adzuckia angularia</i>	YE ;NG, 2001
	Sesquina	<i>Vigna sesquipedalis</i>	WONG , <i>et al.</i> , 2005
	Vulgarinina	<i>Phaseolus vulgaris</i>	WONG ;NG, 2005

Apesar da ocorrência de muitos relatos na literatura sobre a atividade de defensinas de plantas, apenas algumas delas tiveram o seu mecanismo de ação elucidado. Devido ao seu caráter catiônico, sabe-se que essas moléculas interagem especificamente com compostos de membrana de carga negativa do patógeno, tais como receptores lipídicos de bactérias, fosfolipídios e esfingolipídeos de membranas fúngicas (WILMES *et al.*, 2011; VRIENS *et al.*, 2014).

Há dois modelos hipotéticos que tentam explicar o mecanismo de ação dessas moléculas: i) o modelo carpete, e ii) o modelo de poro toroidal (Figura 3). Em ambos os modelos, a defensina interage com moléculas carregadas negativamente na membrana celular do patógeno aumentando a permeabilidade da membrana celular, levando a desintegração e morte por necrose celular. No entanto, a forma como isso acontece é diferente nos dois modelos propostos. Enquanto, o modelo carpete propõe que a formação de poros na membrana ocorre na presença de vários peptídeos que se acumulam na superfície da bicamada lipídica formando um carpete e levando a disrupção da membrana, no modelo de poro toroidal é proposto que os peptídeos formam oligômeros, e, em seguida, formam poros multiméricos na membrana celular (Figura 3) (BROGDEN, 2005).

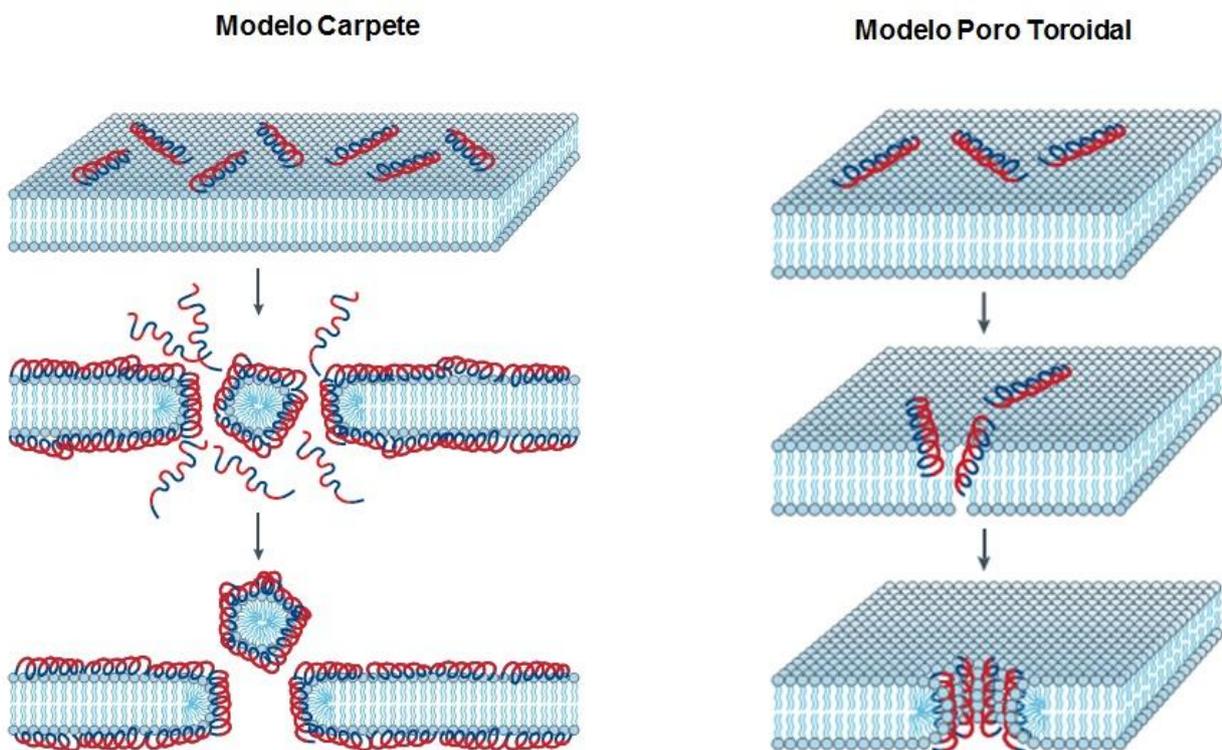


Figura 3 : Modelo dos mecanismos de ação propostos para as defensinas vegetais. No modelo carpete os peptídeos perturbam a membrana plasmática através da orientação paralela do peptídeo à superfície da bicamada de lípidos formando um carpete, com conseqüente formação do poro e disrupção da membrana. No modelo poro toroidal, os peptídeos ligados à membrana agregam-se e induzem ao dobramento da bicamada lipídica, resultando na formação de um poro revestido pelos próprios peptídeos. Regiões hidrofílicas do peptídeo são mostrados na cor vermelha e regiões hidrofóbicas do peptídeo são mostrados em azul. Retirado de BROGDEN (2005).

Uma hipótese alternativa a esses modelos propõe que a interação da defensina na célula alvo pode não danificar a membrana plasmática. Ao invés disso, a interação com os componentes da membrana conduz a uma permeabilidade iônica seletiva, formação de poros transientes e transporte da molécula para o interior da célula hospedeira. Uma vez presente no interior da célula, interagem com alvos intracelulares, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e desencadeando a morte celular programada (THEVISSSEN *et al.*, 2003; BROGDEN, 2005; HEGEDUS ;MARX, 2013). Tal mecanismo foi observado para as defensinas Psd1 (LOBO *et al.*, 2007), NaD1 (VAN DER WEERDEN *et al.*, 2008), (VAN DER WEERDEN, *et al.*, 2010) e MtDef4 (SAGARAM *et al.*, 2013) .

1.2 - Sistemas heterólogos para a produção de proteínas recombinantes

O surgimento da tecnologia do DNA recombinante no início da década de 70 provocou uma revolução na biologia molecular. O conjunto de técnicas desenvolvidas e utilizadas até então foram ainda mais reforçadas com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR), levando os cientistas à capacidade de explorar e compreender os processos essenciais para a vida de maneira mais fácil e simples. Com isso, foi demonstrado que o DNA eucariótico poderia ser propagado em microorganismos (*Escherichia coli*) e produtos funcionais poderiam ser sintetizados a partir de genes heterólogos clonados em plasmídeos bacterianos (ROSANO;CECCARELLI, 2014).

Desde então, pesquisadores têm aproveitado as potenciais aplicações dessas técnicas para direcionar a produção de proteínas de interesse biotecnológico em sistemas heterólogos. Diferentes tipos de organismos têm sido estudados a fim de compreender as características específicas do seu genoma e de sua maquinaria molecular para que seja feita a escolha do sistema de expressão adequado para a produção de proteína recombinante de interesse (VIANA *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, a produção de peptídeos tem sido objeto de intensos estudos, gerando avanços significativos no campo da biotecnologia. No entanto, este conhecimento produziu poucas melhorias no que diz respeito à escolha dos hospedeiros para a expressão desses peptídeos.

A grande mudança desde então se refere à quantidade de peptídeo produzida. Os sistemas de hoje são muito mais produtivos do que aqueles de duas décadas atrás. Isto surgiu principalmente devido às melhorias na composição dos meios de produção, particularmente nas estratégias de alimentação, resultando em células mais saudáveis por um período de tempo mais longo (HACKER, *et al.*, 2009).

A escolha de um sistema de expressão para a produção de uma proteína de interesse depende de muitos fatores. Estes incluem características de crescimento celular, os níveis de expressão, expressão intracelular e extracelular, modificações pós-traducionais e a atividade biológica da proteína de interesse, bem como questões relacionadas à regulação da produção (LIU *et al.*, 2013).

Além disso, deve se levar em consideração o tipo de proteína em questão, se são proteínas solúveis, proteína ligada à membrana, proteínas multidomínio, quantidade de pontes dissulfeto e a intenção de uso do produto final. As proteínas produzidas por métodos recombinantes geralmente são utilizadas em estudos estruturais, ensaios de atividade *in vitro* e *in vivo*, como antígenos para os anticorpos, como alvo para a geração de drogas ou propriamente como drogas (medicamentos). Estas diferentes aplicações requerem diferentes qualidades e quantidades do produto de interesse em questão (SORENSEN, 2010). As características citadas anteriormente, juntamente com a funcionalidade, velocidade de produção e produtividade da proteína são os fatores mais importantes a serem considerados na escolha do sistema de expressão mais adequado para a produção da proteína recombinante (DEMAIN;VAISHNAV, 2009). Atualmente, os sistemas de expressão mais utilizados são baseados em cultura de células de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, mamíferos, plantas, insetos (baculovírus) ou por meio de plantas e animais transgênicos (DEMAIN;VAISHNAV, 2009)

O primeiro microorganismo a ser utilizado para expressão de proteínas recombinantes foi uma enterobactéria, a *Escherichia coli*, há quase 40 anos (SORENSEN, 2010). Ainda hoje, o sistema de expressão em *E. coli* domina os sistemas bacterianos de expressão e continua a ser o preferido para investigações laboratoriais e etapas iniciais de desenvolvimento de atividades comerciais envolvendo proteínas recombinantes. Além disso, serve como uma referência útil para a comparação entre as várias plataformas de expressão (CHEN, 2012).

As vantagens do uso de *E. coli* como hospedeiro para produção de proteínas recombinantes são bem conhecidas. Trata-se de um versátil sistema de expressão, apresentando fácil manipulação e genética bastante conhecida; cinética de crescimento rápida, alta densidade celular, alta produtividade e baixo custo (DEMAIN;VAISHNAV, 2009; ROSANO;CECCARELLI, 2014).

Em *E. coli* as proteínas recombinantes são expressas no citoplasma bacteriano, podendo permanecer no local ou serem direcionadas para outros compartimentos celulares, sendo, na maioria das vezes, para o espaço periplasmático. Ainda, podem ser depositadas no interior ou exterior da membrana ou, em casos raros, secretada para o meio extracelular. Cada um desses compartimentos celulares apresenta características próprias que podem ser benéficas ou limitantes para a expressão da proteína recombinante (BERLEC ;STRUKELJ, 2013).

Embora este sistema possua algumas vantagens, algumas desvantagens limitam a sua escolha quando a proteína de interesse é de origem eucariótica. As altas densidades celulares alcançadas resultam na toxicidade devido à formação de acetato durante a fermentação. As proteínas que são produzidas como corpos de inclusão são frequentemente inativas, insolúveis e requerem renaturamento. Adicionalmente, há um problema com a produção de proteínas com muitas pontes dissulfeto. Este sistema não possui a capacidade de processamento pós-traducional e nesse caso o renaturamento torna-se extremamente difícil (DEMAIN;VAISHNAV, 2009). Atualmente, algumas estratégias têm sido utilizadas para superar esses desafios e assim alcançar uma eficiente expressão da proteína de interesse (ROSANO;CECCARELLI, 2014).

Muitas das vantagens de *E. coli* também são oferecidas por outros sistemas de expressão. As leveduras são organismos hospedeiros adequados para a produção de proteínas recombinantes uma vez que elas combinam a facilidade de manipulação genética, a alta produtividade, crescimento rápido, altas densidades celulares e a capacidade de processamento pós-traducionais com padrão de glicosilação semelhante ao de mamíferos (FICKERS, 2014).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro organismo eucariótico a ser utilizado como sistema de expressão de proteínas recombinantes, no início da década de 80. No entanto, problemas relacionados à instabilidade do plasmídeo,

baixo rendimento da produção e hiperglicosilação das proteínas secretadas (CELIK;CALIK, 2012) levaram a utilização de sistemas alternativos de expressão incluindo *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyvero myceslactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arxula adenivorans* e *Yarrowia lipolytica* (FICKERS, 2014). Dentre estes, destaca-se a levedura metilotrófica *P. pastoris* que, ao longo dos últimos 15 anos, tornou-se um dos organismos hospedeiros mais utilizados. Seu uso tem crescido consideravelmente e atualmente é considerado o segundo sistema mais utilizado para a expressão de proteínas recombinantes. Dados recentes da literatura mostram que o uso de *P. pastoris* como sistema de expressão aumentou de 4% para 17% do total de proteínas recombinantes de 1995 a 2009. Dentro do mesmo período, o uso de *E. coli* permaneceu constante com aproximadamente 60% das proteínas recombinantes (SORENSEN, 2010).

1.3 - *Pichia pastoris* como sistema para expressão de proteínas heterólogas

Pichia pastoris é uma levedura classificada como pertencente ao Reino Fungi, Divisão Eumycota, Subdivisão Ascomycotina, Classe Hemoascomycetes, Ordem Endomycetales, Família Saccharomycetaceae e Subfamília Saccharomycetoideae (Figura 4) (PHAFF;KNAPP,1956)

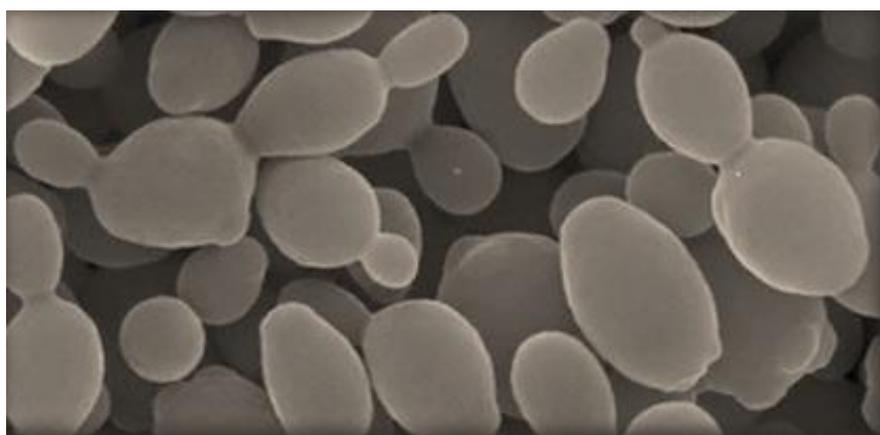


Figura 4: Levedura metilotrófica *Pichia pastoris*.
Fonte:<http://www.pichia.com/>

A aplicação inicial de *P. pastoris* ocorreu em 1960, quando foi escolhida para a produção de proteína de célula única (*Single Cell Protein*, SCP) por ser capaz de crescer eficientemente em meio contendo metanol, uma fonte de carbono relativamente barata, obtida a partir do metano presente no gás natural. No entanto, com a crise do petróleo em 1970 e com o aumento do cultivo da soja, a produção de SCP nesta levedura não se tornou economicamente viável. Em 1980, a empresa *Phillips Petroleum* juntamente com pesquisadores da *Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates Inc.* (SIBIA) desenvolveram uma linhagem de *P. pastoris* como um sistema de expressão de proteínas recombinantes (CEREGHINO;CREGG, 2000).

Ao longo dos últimos 20 anos, a levedura metilotrófica *P.pastoris* tornou-se um dos sistemas mais utilizados na produção e secreção de proteínas recombinantes e, portanto, utilizada para a produção de proteínas de diversas origens, como de humano, animal, plantas, fungos, bactérias e viral. São geralmente usadas para a produção de proteínas que não podem ser isoladas em quantidades suficientes a partir de suas fontes naturais. Atualmente, mais de 1.000 proteínas já foram clonadas e expressas em *P. pastoris* (DEMAIN;VAISHNAV,2009).

Este sistema tornou-se uma plataforma atraente para a produção de proteínas heterólogas por combinar diversas características com outras também apresentadas pelos organismos procarióticos. Assim como em *E. coli*, são de fácil manipulação genética, apresentam crescimento rápido e em altas densidades celulares, podendo alcançar até 130 g/L em meio relativamente simples (CEREGHINO;CREGG, 2000; CREGG, *et al.*, 2000)

Além destas vantagens, *P. pastoris* apresenta diversas outras vantagens, destacando-se a capacidade de complexas modificações pós-traducionais, como: processamento da sequência sinal, enovelamento e formação de pontes dissulfeto, secreção do produto recombinante para o meio extracelular, facilitando assim o processo de purificação, ausência de hiperglicosilação, produto recombinante livre de endotoxinas e também de DNA virais e oncogênicos (DEMAIN;VAISHNAV, 2009; DAMASCENO *et al.*, 2012).

Como todo sistema de expressão, as leveduras apresentam como principal desvantagem a presença de um padrão de glicosilação diferente ao dos humanos. O padrão de glicosilação consiste em muitos resíduos de manose que, em excesso,

podem levar a uma degradação mais rápida da proteína produzida e, conseqüentemente, em menor atividade (BERLEC;STRUKELJ, 2013).

O sucesso alcançado por *P. pastoris* na produção de proteínas recombinantes deve-se à presença de um forte promotor induzido por metanol, regulador da expressão do gene que codifica a primeira enzima da via de utilização do metanol, a álcool oxidase 1 (AOX1). A maioria dos promotores utilizados na produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* é derivada de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do metanol (álcool-oxidase AOX1, DHAS dihidroxiacetona sintase, formaldeído desidrogenase FLD1) (STADLMAYR *et al.*, 2010).

Dois genes codificam para a álcool oxidase 1, AOX1 e AOX2, sendo AOX1 responsável por 92% da atividade da célula. Ambos os genes são reprimidos por glicose, glicerol e etanol e fortemente induzidos na presença de metanol, podendo os níveis de AOX1 chegar a 30% do total de proteínas solúveis. Um dos maiores níveis de expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* foi alcançado com pAOX1, sendo 22 g/L de uma proteína intracelular e 15 g/L de uma proteína extracelular (CREGG *et al.*, 2000; VOGL ;GLIEDER, 2013).

A utilização do pAOX para a produção de proteínas é uma alternativa viável, pois neste caso as culturas podem ser primeiramente cultivadas a densidades celulares elevadas e, em uma segunda fase, a produção da proteína heteróloga pode ser iniciada pela indução por metanol. No entanto, o cultivo em duas etapas requer maior disponibilidade de tempo e esforços de manipulação maiores. Além disso, a indução com metanol, por ser considerado um composto tóxico e inflamável, é um inconveniente para a produção em larga escala (VOGL;GLIEDER, 2013).

Ainda com relação ao uso do metanol, o acúmulo desse composto no meio de cultura pode levar a uma diminuição da viabilidade celular e conseqüentemente redução da produção da proteína recombinante. Apesar do promotor pAOX1 ser um promotor forte e apresentar diversas vantagens principalmente para a produção de proteínas heterólogas que são tóxicas, promotores alternativos tem sido utilizados na tentativa de otimizar a produção dessas proteínas e contornar os obstáculos do uso de pAOX. Para contornar este obstáculo, promotores constitutivos são atualmente uma excelente opção para a produção de proteínas recombinantes em *P. pastoris*.

Em 1997, Waterham e colaboradores desenvolveram um vetor de expressão baseado no promotor do gene que codifica para a enzima glicolítica gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (pGAP), mostrando que este promotor é forte e constitutivo, atingindo níveis de expressão semelhantes aos alcançados por pAOX1. Devido ao fato da expressão ser constitutiva, não há a necessidade de indução, o que leva a redução do tempo de processo para a produção de proteína. Os níveis de expressão alcançados dependem da fonte de carbono utilizada para o crescimento celular. Quando as células são crescidas em meio contendo glicose, os níveis de expressão obtidos pelo promotor são significativamente maiores do que aqueles obtidos com o promotor pAOX1 na presença de metanol (WATERHAM *et al.*, 1997; VOGL;GLIEDER, 2013; FICKERS, 2014)

Apesar da força dos promotores pAOX1 e pGAP, esta característica nem sempre é a condição mais favorável para a produção da proteína heteróloga. Caso o dobramento correto da proteína ou o processamento na via secretora sejam fatores limitantes para altas quantidades do produto ativo, promotores com um nível de expressão mais fraco podem ser mais desejáveis. Ademais, com a finalidade da expressão simultânea de genes diferentes, outros promotores são utilizados, embora menos explorados que os demais. Dentre estes promotores, incluem pFLD1 (formaldeído desidrogenase), pPEX8 (peroxin 8), PYPT1 (GTPase), pAOX2 (álcool oxidase 2), pICL1 (isocitrato liase, ICL) e PGK1 (3-fosfoglicerato quinase) (WATERHAM *et al.*, 1997; DE ALMEIDA *et al.*, 2005; VOGL ;GLIEDER, 2013).

1.4 - Expressão heteróloga de defensas vegetais utilizando *P. pastoris* como sistema de expressão

Devido ao modo específico de atuação sobre as células microbianas e o seu amplo espectro de atividade, as defensas vegetais atualmente têm sido foco de interesse para o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos. O uso dessas moléculas em aplicações farmacêuticas ou biológicas requer uma quantidade significativa da molécula purificada. A obtenção dessas moléculas a partir de suas fontes naturais é complexo devido os baixos níveis de expressão e a

presença de uma variedade de outros compostos da planta (PADOVAN *et al.*, 2010).

Diferentes métodos são descritos na literatura para a produção de peptídeos antimicrobianos, tais como o isolamento direto do organismo que produz o peptídeo de interesse, síntese química e, como já foi dito anteriormente, a expressão recombinante através de sistemas heterólogos. O isolamento de peptídeos a partir de sua fonte natural é uma estratégia que não é economicamente sustentável para as empresas farmacêuticas, sendo restrita a universidades e laboratórios de bioprospecção. Esta técnica é importante para a descoberta de novos peptídeos, mas para a produção com fins terapêuticos e farmacológicos requer um longo tempo, e, muitas vezes, o peptídeo purificado é ineficiente (DE SOUZA CÂNDIDO *et al.*, 2014).

Embora a síntese química seja uma alternativa para a produção de peptídeos, moléculas com características estruturais complexas como as defensinas não são produzidas com êxito por este sistema. A agregação, produção de isoformas durante o processo de dobramento da molécula e o elevado custo de produção tornam este método desfavorável (OKUMURA *et al.*, 2014; VRIENS *et al.*, 2014).

Diante disso, fica evidente a busca por outros sistemas de expressão para a produção de proteínas como as defensinas vegetais. O alto teor de cisteínas requer um complexo dobramento da proteína, incluindo a formação de múltiplas pontes dissulfeto. Neste caso, a escolha por um sistema eucariótico de expressão é o preferido, e, nesse contexto, *P. pastoris* tem sido amplamente utilizada para a produção eficiente dessas moléculas.

Existem vários relatos da literatura que corroboram com a eficiência do sistema de expressão em *P. pastoris* para a produção de defensinas vegetais. A defensina AX2 é produzida em quantidades muito baixas nas folhas de beterraba e para estudar em maiores detalhes sua estrutura e função biológica, a levedura *P. pastoris* foi utilizada para a produção em grande escala. Ensaio de atividade biológica mostraram que a proteína recombinante produzida foi ativa contra *Cercospora beticola*, com IC₅₀ de 2,5 µg/ml (KRISTENSEN *et al.*, 1999).

ALMEIDA e colaboradores (2001) demonstraram, por meio de ressonância magnética nuclear, dicroísmo circular e fluorescência, que a proteína recombinante rPsD1 produzida em *P. pastoris* apresentou a mesma conformação e o mesmo

padrão na formação das pontes dissulfeto que a proteína na sua forma nativa. Quando comparada com a proteína nativa, a proteína recombinante foi eficientemente expressa na sua forma ativa, sendo significativamente efetiva contra os fungos *Neurospora crassa* e *Aspergillus versicolor*.

Mais recentemente, uma defensina de mostarda (*Brassica juncea*), nomeada AFP1, foi expressa em *P. pastoris*, sendo capaz de interagir com moléculas de glicosilceramida (GlcCer) da parede celular de *Candida albicans* e inibir o crescimento fúngico (OGURO *et al.*, 2014), assim como foi relatado para a defensina Rs-AFP2 (THEVISSSEN *et al.*, 2004; THEVISSSEN *et al.*, 2012). A defensina AFP1 compartilha 94% de identidade na sequência de aminoácidos com a defensina de rabanete Rs-AFP2 e, por esta razão, era provável que AFP1 interagisse com glicosilceramidas presentes na parede celular do fungo *Candida albicans*.

Além dessas proteínas, diversas outras defensinas já foram relatadas sendo eficientemente expressas em *P. pastoris* e ativas contra um amplo espectro de patógenos, conforme demonstrado na tabela 2. Diante da demonstração da atividade antimicrobiana das defensinas recombinantes produzidas em *P. pastoris*, fica evidente a eficácia desse sistema de expressão para a produção de defensinas vegetais com potencial uso no controle de doenças de plantas e patógenos humanos.

Tabela 2: Defensinas vegetais expressas em *Pichia pastoris*.

Nome da defensina	Origem	Alvo	IC ₅₀	Referência
AX2	<i>Beta vulgaris (beterraba)</i>	<i>Cercospora beticola</i>	2,5 µg/mL	KRISTENSEN, <i>et al.</i> , 1999
PsD1	<i>Pisum sativum (ervilha)</i>	<i>Neurospora crassa</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus versicolor</i>	10 µg/mL 25 µg/mL >100 µM >100 µM	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2001
PpDfn1	<i>Prunus persica (pêssego)</i>	<i>Penicillium expansum</i> <i>Botrytis cinerea</i>	- -	WISNIEWSKI <i>et al.</i> , 2003
VrD1	<i>Vigna radiata</i> line VC6089A (feijão mungo)	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium oxysporum</i> CCRC 35270	1 µM 3,4 µM	CHEN <i>et al.</i> , 2004
SPE10	<i>Pachyrrhizus erosus</i>	<i>Colletotrichum gloeosporides</i> <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersic</i> <i>Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum</i>	>20 µM	SONG <i>et al.</i> , 2005
NmDef02	<i>Nicotiana megalosiphon</i> (tabaco)	<i>Fusarium oxysporum</i>	1 µM	PORTIELES <i>et al.</i> , 2010
ZmDEF1	<i>Zea mays</i> (milho)	<i>Phytophthora parasitica var. nicotianae</i>	-	WANG <i>et al.</i> , 2011

1.5 - O potencial uso de defensinas vegetais como moléculas bioativas para controle de doenças de plantas e patógenos humanos

Como mencionado anteriormente, as defensinas são componentes inatos do sistema de defesa de plantas, e devido às suas propriedades físico-químicas e seu amplo espectro de atividade, esses peptídeos têm sido alvo de interesse e de grande aplicabilidade tanto na área biomédica como na agricultura.

A utilização dessas moléculas para fins terapêuticos e farmacológicos vêm aumentando consideravelmente nos últimos anos, tendo em vista os estudos relatados de defensinas ativas contra fungos patogênicos humanos, incluindo *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* e bactérias gram positivas e gram negativas, também patogênicas ao homem, tais como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Paratyphi, *Escherichia coli* e *Helicobacter pylori*. Ao longo desses anos, algumas patentes relacionadas com a aplicação médica das defensinas foram requeridas (YANG;LYU, 2008; RIGANO *et al.*, 2012; GUZMAN-RODRIGUEZ *et al.*, 2013).

As infecções fúngicas e bacterianas causadas pelos microorganismos *C. albicans*, *K. pneumoniae* e *S. aureus* estão entre os principais problemas relacionados às infecções hospitalares. A infecção relacionada à Assistência à Saúde (IrAS), ou mais comumente conhecida como infecção hospitalar é, segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), toda infecção adquirida em unidades hospitalares ou em qualquer outra instituição de assistência a saúde (ambulatórios, enfermarias e consultórios). Estas infecções podem ser diagnosticadas após 48 horas de hospitalização ou estadia em algum desses ambientes, ou, ainda, se manifestarem após a alta do paciente (CÔRREA, 2008).

Nos últimos anos, devido ao aumento da resistência dos patógenos aos agentes de tratamento, diversas medidas têm sido adotadas com o objetivo de diminuir e controlar essas infecções. É extensa a lista de bactérias e fungos que desenvolveram resistência a antibióticos e antifúngicos nos últimos anos. Estima-se que 70% das bactérias são resistentes a pelo menos um antibiótico prescrito (SPELLBERG *et al.*, 2004). Desde 1960, o surgimento da resistência aos fármacos é observado, incluindo os patógenos *S. aureus* e *C. albicans*, alvos de estudo desta tese (MADIGAN *et al.*, 2010).

O aumento da resistência dos microorganismos aos métodos de tratamento convencionais tem levado à busca por novos agentes terapêuticos que sejam mais seguros e eficazes no controle das infecções hospitalares. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs), incluindo as defensinas vegetais, constituem uma alternativa viável e promissora na busca por esses novos compostos (SPELLBERG *et al.*, 2004) por terem demonstrado alto potencial antifúngico e antibacteriano contra diversos patógenos humanos.

Algumas defensinas de plantas já foram reportadas na literatura sendo ativas contra *C. albicans*. Thevissen e colaboradores revelaram que as defensinas RsAFP2 e DmAMP1, quando testadas nas concentrações 2,5 μM e 5 μM , respectivamente, interagem com componentes específicos da membrana fúngica de *C. albicans* inibindo o seu crescimento (THEVISSSEN *et al.*, 2003). Posteriormente, GAMES *et al.* (2008) isolaram e caracterizaram uma defensina (PvD1) de sementes do feijão comum (*P. vulgaris* L.), ativa contra diversas espécies do gênero *Candida*, incluindo *C. albicans*. Além disso, mostraram que a mesma defensina foi capaz de inibir o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos.

Ensaio de inibição do crescimento e de viabilidade celular de *C. albicans* realizados com a defensina floral de tabaco (NaD1), mostraram que o crescimento do fungo foi inibido em baixas concentrações da proteína ($IC_{50} > 10 \mu M$) e apenas 50% das células se mantiveram viáveis na presença de $15 \mu M$ de NaD1. Adicionalmente, foi proposto nesse estudo o mecanismo de interação entre NaD1 e a superfície da célula fúngica, revelando que após interação da defensina com a superfície da membrana, ocorre a sua entrada no citoplasma, hiperprodução de espécies reativas de oxigênio e morte induzida por dano oxidativo (HAYES *et al.*, 2013). O mesmo mecanismo de ação foi identificado por Oguro e colaboradores para a defensina AFP1. AFP1 quando testada na concentração de $3,5 \mu g/ml$ induziu a permeabilização da membrana plasmática e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), inibindo em 50% o crescimento do fungo (OGURO *et al.*, 2014).

Embora a atividade antimicrobiana de defensinas de plantas serem relatadas, em sua maioria, sendo ativas contra fungos, alguns estudos reportaram a atividade contra bactérias, especialmente as espécies gram-positivas. Em 2006, Franco e colaboradores isolaram a partir de sementes de feijão caupi (*V. unguiculata*), a C-ptionina II. Ensaio de inibição do crescimento revelaram que a defensina apresentou significativa atividade bactericida contra a bactéria patogênica *S. aureus*. A concentração inibitória mínima (MIC) que apresentou atividade bactericida foi de $128 \mu g/ml$. Além de *S. aureus*, bactérias gram-negativas como *E. coli* e *Pseudomonas syringae* tiveram seu crescimento inibido na presença da defensina, entretanto, a concentração mínima inibitória (MIC) necessária foi menor quando comparada a *S. aureus* (FRANCO *et al.*, 2006).

Mais recentemente, uma defensina de abacate (*Persea americana* var. *drymifolia*), expressa em células endoteliais bovinas imortalizadas com o oncogene viral do papilomavírus humano tipo 16 mostrou atividade antibacteriana contra duas bactérias patogênicas ao homem. Ensaio de proliferação celular MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) utilizando a defensina *PaDef* mostraram que a viabilidade celular de *S. aureus* foi reduzida em 52-65% utilizando $100 \mu g/ml$ de proteína total (GUZMAN-RODRIGUEZ *et al.*, 2013).

Apesar do potencial uso de defensinas vegetais como substâncias terapêuticas no controle de doenças infecciosas, atualmente a principal aplicação das proteínas da família das defensinas vegetais está concentrada na agricultura no

controle de doenças de plantas. Estudos com plantas transgênicas expressando defensinas vegetais demonstram claramente o potencial que essas moléculas apresentam em fornecer resistência contra microorganismos fitopatogênicos e, ainda, reduzir a dependência de pesticidas químicos nos campos de produção, sendo assim de grande interesse para o agronegócio. Muitos trabalhos envolvendo a expressão heteróloga de peptídeos antimicrobianos em plantas, especialmente defensinas, com o objetivo de aumentar a resistência a fitopatógenos já foram relatados para muitas culturas de importância econômica (DE SOUZA CÂNDIDO *et al.*, 2014). Nesse contexto, as defensinas de plantas com atividade antifúngica foram as primeiras a serem escolhidas para o desenvolvimento de culturas transgênicas resistentes aos fitopatógenos.

A defensina de rabanete, Rs-AFP2, foi o primeiro peptídeo expresso em outra planta. Níveis elevados do peptídeo foram observados nas plantas de tabaco transformadas, conferindo resistência contra o fungo *Alternaria longipes* (TERRAS *et al.*, 1995). A mesma defensina foi utilizada quatro anos mais tarde para estudos de resistência em macieiras transgênicas. Plantas transformadas via *Agrobacterium* (*Agrobacterium tumefaciens*) foram selecionadas, a defensina expressa foi isolada e ensaios *in vitro* foram realizados, mostrando que o peptídeo recombinante foi capaz de inibir a germinação dos esporos de *Fusarium culmorum* (DE BONDT *et al.*, 1999). Linhagens de tomate também foram transformadas com a defensina Rs-AFP2. Nesse estudo, peptídeos expressos em folhas de tomateiro foram extraídos e testados contra os fungos *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans* e *Rhizoctonia solani*. Os ensaios demonstraram que o extrato bruto contendo a defensina de rabanete inibiu o crescimento de todos os fungos testados (PARASHINA *et al.*, 2000).

Plantas transgênicas de arroz (*Oryza sativa* L. cv. Pusa basmati) superexpressando a defensina Rs-AFP2 foram geradas via transformação via *agrobacterium*. A expressão constitutiva suprimiu o crescimento dos fungos *Magnaporthe oryzae* e *Rhizoctonia solani* em 77 e 45%, respectivamente. Esses dois fungos fitopatogênicos são causadores da brusone e da queima das bainhas, sendo responsáveis por grandes perdas econômicas na produção de arroz. A atividade inibitória *in vitro* conferida pelas plantas expressando Rs-AFP2 indicam

que a defensina produzida pela planta transgênica foi biologicamente ativa e capaz de controlar essas doenças em arroz (JHA;CHATTOO, 2010).

O trabalho mais recente sobre Rs-AFP2 foi publicado em 2011, quando Li e colaboradores demonstraram que plantas de trigo da linhagem Yangmai 12 geneticamente modificadas expressando Rs-AFP2 eram mais resistentes ao ataque dos fungos *Fusarium graminearum* e *Rhizoctonia cerealis* quando comparada à linhagem Yangmai 12 não transformada (LI, et al., 2011). Além desses, outros trabalhos utilizando defensinas antifúngicas como agente de resistência foram relatados na literatura conforme demonstrados na tabela 3.

Tabela 3: Defensinas antifúngicas utilizadas para transformação genética de plantas

Defensina	Origem	Planta transformada	Microorganismo alvo	Referências
Rs-AFP2	Rabanete	Tabaco Maça Tomate	<i>A. longipes</i> <i>F. culmorum</i> <i>A. solani</i> <i>F. oxysporum</i> <i>P. infestans</i> <i>R. solani</i>	TERRAS <i>et al.</i> , 1995 DE BONDT <i>et al.</i> , 1999 PARASHINA <i>et al.</i> , 2000
		Arroz	<i>M. oryzae</i> <i>R. solani</i>	JHA <i>et al.</i> , 2010
		Trigo	<i>F. graminearum</i> <i>R. cerealis</i>	LI <i>et al.</i> , 2011
alfAFP	Alfalfa	Batata	<i>V. dahliae</i>	GAO <i>et al.</i> , 2000
DmAMP1	Dália	Arroz	<i>M. oryzae</i> <i>R. solani</i>	ZHU <i>et al.</i> , 2007
ZmDEF1	Milho	Tabaco	<i>P. parasitica</i>	WANG <i>et al.</i> , 2011
BjD	Mustarda	Tabaco Amendoim	<i>F. moniliforme</i> <i>P. parasitica</i> <i>C. arachidicola</i> <i>P. personata</i>	SWATHI ANURADHA <i>et al.</i> , 2008
BSD1	Repolho chinês	Tabaco	<i>P. parasitica</i>	PARK <i>et al.</i> , 2002
WT1	Wasabi	Arroz Melão	<i>M. grisea</i> <i>A. solani</i> <i>F. oxysporum</i>	KANZAKI <i>et al.</i> , 2002 NTUI <i>et al.</i> , 2010
cdef1	Pimenta	Tomate	<i>P. infestans</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>C. gloeosporioides</i> <i>Curvularia sp.</i>	ZAINAL <i>et al.</i> , 2009
PhDef1 e PhDef2	Petúnia	Banana	<i>F. oxysporum f. sp. cubense</i>	GHAG <i>et al.</i> , 2012

Embora haja muitos estudos relatando o potencial uso de defensinas vegetais na produção de plantas transgênicas ou até mesmo na produção de fungicidas comerciais, não há disponível no mercado nenhuma planta transgênica resistente ou tolerante a fungos fitopatogênicos, nem mesmo contendo defensinas de planta como fator de resistência. De fato, há um maior interesse na produção e liberação de variedades que sejam resistentes à seca e insetos-praga, uma vez que os danos causados pelo ataque de fungos fitopatogênicos são considerados, até agora, menos prejudiciais do que as perdas ocasionadas por estresse hídrico e insetos pragas. Atualmente, há um grande número de empresas privadas e instituições públicas em todo o mundo empenhadas na transformação e produção de diferentes espécies com importância socioeconômica que venham a controlar essas adversidades e, conseqüentemente, gerar melhoria nas colheitas e aumento na produção no campo (LACERDA, *et al.*, 2014).

Há um longo processo necessário para a análise da eficiência, riscos ambientais e de biossegurança para que uma planta transformada seja liberada ao mercado para comercialização. Diante dos resultados já alcançados, é possível, que em um futuro próximo, agro-produtos comerciais baseados em defensinas antifúngicas sejam considerados essenciais para o controle de fitopatógenos e também para o aumento da produção agrícola.

1.6 - Projeto Genoma Café: Seleção de genes de defensina para controle biotecnológico

O café (*Coffea sp.*) é uma das culturas tropicais mais importantes do mundo, sendo fundamental para a economia e política de muitos países em desenvolvimento. O Brasil, em 2014, manteve sua posição de destaque no mercado mundial, permanecendo como o maior produtor e exportador mundial de café e de segundo maior consumidor do produto. Aproximadamente 45,34 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado foram produzidos no ano de 2014 pelos 15 estados produtores do Brasil, com destaque para o estado de Minas Gerais, responsável por 49,93% da produção nacional, seguido do Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Rondônia e Paraná (BRASIL, 2015).

A importância econômica do café levou o Brasil ao lançamento do Projeto Genoma Café. O Projeto foi criado em 2002, por meio de um acordo de cooperação entre o Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café), Embrapa Café, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e o Fórum Permanente das Relações Universidade-Empresa (UNIEMP). O projeto gerou o maior banco de dados do mundo sobre o genoma café, compondo mais de 200.000 “reads”, contendo 25.000 genes e representando em torno de 2/3 de todos os genes (VIEIRA, *et al.*, 2006). Atualmente, esse banco possui mais de 30 mil genes identificados e está à disposição das 45 instituições participantes e parceiras do Consórcio Pesquisa Café, coordenado pela Embrapa Café.

O principal objetivo do Projeto Genoma Café Brasileiro foi disponibilizar recursos da genômica moderna à comunidade científica e aos diferentes segmentos da cadeia produtiva do café. Para a construção do banco de dados de ESTs foram sequenciados 214.964 clones escolhidos aleatoriamente de 37 bibliotecas de cDNA de *Coffea arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*, de estágios específicos do desenvolvimento de células e de tecidos do cafeeiro, resultando em 130.792, 12.381 e 10.566 sequências de cada espécie, respectivamente. Após análise e montagem das sequências, os resultados de anotação foram armazenados em uma base de dados *on line* pertencente ao Laboratório de Genômica e Expressão–LGE, situado no Instituto de Biologia da UNICAMP e à disposição de pesquisadores brasileiros e do exterior envolvidos em projetos relacionados ao melhoramento da cultura do café. O endereço para acesso as sequências está disponível em <http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe>.

O sequenciamento do genoma funcional do café forneceu a base de dados para o sequenciamento genômico do cafeeiro, finalizado em 2010 e posteriormente publicado em 2014 (DENOEUDE, *et al.*, 2014). O sequenciamento completo do café (*Coffea canephora*) foi decorrente de um consórcio internacional composto por 11 países, incluindo o Brasil, o qual contou com a participação de um pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, envolvido anteriormente no sequenciamento realizado em 2004 do genoma funcional do café.

No presente trabalho, a biblioteca de cDNA do projeto genoma café (EMBRAPA/UNICAMP), obtido em 2004, foi utilizada como fonte de busca pelos genes de defensas de café, defensas essas até então não relatadas na literatura.

Como já dito anteriormente, as defensinas vegetais representam uma classe de peptídeos antimicrobianos com crescente interesse científico, terapêutico e biotecnológico e, portanto, tem sido considerada uma potencial ferramenta para o controle de pragas e patógenos na agricultura e no desenvolvimento de medicamentos na indústria farmacêutica.

Tendo isso em vista, esta tese mostra os resultados obtidos da avaliação da atividade antimicrobiana de duas defensinas vegetais contra diferentes espécies de fungos fitopatogênicos e bactérias patogênicas ao homem, a defensina Drr230a, cujo gene foi isolado de ervilha (*Pisum sativum*) e a defensina CD1, cujo gene foi identificado no transcriptoma de café (*Coffea arabica*). Ambas as defensinas foram subclonadas em vetor de expressão de levedura e expressas em *Pichia pastoris*.

2 - JUSTIFICATIVA

O uso de peptídeos antimicrobianos em programas biotecnológicos tem sido objeto de grande interesse, tendo em vista a sua vasta aplicabilidade na indústria farmacêutica e na agricultura. O crescente aumento da incidência de doenças infecciosas com resistência aos antibióticos, bem como a diminuição do número de aprovações de novos antibióticos no mercado tem levado as empresas pela busca por compostos antimicrobianos que possam ser utilizadas no desenvolvimento de novos medicamentos. No cenário agrícola, a ocorrência de pragas e doenças é um dos principais fatores responsáveis pela redução da produtividade no campo. A busca por moléculas bioativas que confirmam resistência a esses insetos-pragas e fitopatógenos visando o desenvolvimento de plantas transgênicas tem sido alvo de grande interesse entre produtores e empresas de pesquisa agropecuária.

Nesse contexto, avaliar a atividade antimicrobiana de moléculas como as defensinas vegetais é de fundamental importância, uma vez que comprovado o seu potencial antimicrobiano, constituem uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos produtos que possam ser utilizados no combate às doenças infecciosas. Além disso, são potenciais alvos para a produção de variedades transgênicas que confirmam resistência contra pragas e patógenos de importância econômica para o Brasil.

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de duas defensinas vegetais expressas na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, visando o controle de fungos fitopatogênicos de importância agrônômica, bem como de patógenos relevantes para a saúde humana.

3.2 - Objetivos Específicos

- 1- Expressar a defensina Drr230a de ervilha (*Pisum sativum*) na levedura *P. pastoris* e purificar a proteína recombinante por cromatografia de afinidade;
- 2- Avaliar a atividade antifúngica da defensina recombinante (rDrr230a) de ervilha contra o fungo fitopatogênico *Phakopsora pachyrhizi* causador da ferrugem asiática da soja;
- 3- Subclonar e expressar uma nova defensina (CD1) de café (*Coffea arabica*) na levedura *Pichia pastoris* e purificar a proteína recombinante
- 4- Determinar a massa molecular e sequência parcial de aminoácidos da CD1 por espectrometria de massa;
- 5 - Avaliar a atividade antifúngica da defensina CD1 contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *glycines* (*Fusarium tucumaniae*), *Fusarium oxysporum* e *Phakopsora pachyrhizi*;
- 6 - Avaliar a atividade antifúngica da defensina CD1 contra o fungo patogênico ao homem *Candida albicans*;
- 7 - Avaliar a atividade antibacteriana da defensina CD1 contra as bactérias patogênicas ao homem *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Expressão da defensina (Drr230a) de ervilha (*Pisum sativum*) na levedura *Pichia pastoris* e purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade

Para a expressão do gene de defensina de ervilha *drr230a*, originalmente isolado de ervilha (*Pisum sativum*) e subclonado no vetor induzível pPICZαA (LACERDA,2009;2015), um clone positivo contendo o gene de interesse, foi inoculado em 2 ml de meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de glicose; 2% peptona) e incubado a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 200 rpm, por 16 horas. Posteriormente, os 2 ml, referente ao pré inóculo, foram adicionados a 200 ml de meio BMG (1,34 % de YNB, 1% de glicerol, 4×10^{-5} % biotina, 100 mM de fosfato de potássio, pH 6,0). O inóculo foi incubado a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, com agitação de 200 rpm, até atingir $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 20, cerca de 24 horas. Após atingir a $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 20, o inóculo foi centrifugado a $1500 \times g$ durante 5 minutos, e as células ressuspensas em 200 ml de meio BMM (1,34 % de YNB, 4×10^{-5} % biotina, 100 mM de fosfato de potássio, pH 6,0 e 1% de metanol). Em seguida, a cultura foi incubada a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, com agitação de 220 rpm para expressão da proteína recombinante. A cada 12 horas, a cultura foi suplementada com metanol 1%, visando a indução da expressão, uma vez que o vetor de expressão utilizado era induzível. A cada 24 horas, alíquotas foram retiradas para análise da expressão da proteína. Após 48 horas de expressão, visando a renovação dos nutrientes no meio de cultura, o meio foi centrifugado a $1500 \times g$ e as células ressuspensas novamente em meio BMM e mantidas por mais 48 horas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, com agitação de 220 rpm, até completar 96 horas de expressão. Após o término, o meio de cultura foi centrifugado a $3000 \times g$, o pellet descartado e o sobrenadante, contendo a proteína, foi filtrado em membrana $0,22 \mu\text{m}$ (Millex-GV, Millipore) para posterior análise da expressão e purificação.

Para análise da proteína recombinante expressa, a proteína foi precipitada em Acetona/TCA 10% e separadas por eletroforese em gel desnaturante de duas fases, em presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE), conforme descrito por SCHAGGER e VON JAGOW (1987). As amostras (aproximadamente 20 μg de proteína) foram dissolvidas em tampão de amostra (50 mM de Tris-HCl pH 6,8, SDS 8,2 % (p/v), sacarose 2% (p/v), azul de bromofenol 0,001% (p/v)), fervidas e submetidas a

eletroforese durante aproximadamente 4 horas, a 70 V, em câmara fria. A eletroforese foi realizada usando-se o sistema *Mini Protean II Electroforesis Cell* (Bio-Rad). Após separação das proteínas no gel, estas foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0,22 μm (*Hybond C*, Amersham), de acordo com o manual de transferência do equipamento *Trans-blot[®] SD Semi Dry* (Bio Rad). Posteriormente, a membrana foi bloqueada com solução de gelatina 3% em TBS na concentração final de 1x durante 2 horas, sob agitação, a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo monoclonal Anti-6xHis produzido em camundongo (diluído 1:2000 em TBS/gelatina 1%) conjugado a fosfatase alcalina[®] (Invitrogen) durante 4 horas. Após a incubação, a membrana foi lavada com tampão TBS - Tween 0,05%. Para a detecção das proteínas, a membrana foi incubada na solução de revelação, conforme descrito pelo fabricante do substrato para fosfatase alcalina (*AP Conjugate Substrate Kit* - Bio Rad).

Para purificação e detecção da proteína recombinante, o sobrenadante contendo as proteínas foi centrifugado a 3000 x g, o pellet descartado e o sobrenadante filtrado em membrana millipore 0,22 μm . Em seguida, a amostra foi diluída na proporção 1:1 em tampão fosfato de sódio 40 mM pH 7,4 e NaCl 500 mM e submetida a cromatografia de afinidade com níquel, usando-se a coluna HisTrap FF crude 1.6 x 2.5 cm (5 ml), da GE Healthcare. A coluna foi equilibrada com 7 volumes (35 ml) da solução de equilíbrio (tampão fosfato de sódio 40 mM pH 7,4, NaCl 500 mM). A amostra foi aplicada na coluna em um fluxo de 4 ml/min e a fração não retida foi removida com 7 volumes (35 ml) da solução de lavagem (tampão fosfato de sódio 40 mM pH 7,4; NaCl 500 mM; Imidazol 20 mM). A fração retida na coluna foi eluída com 7 volumes (35 ml) da solução de eluição contendo tampão fosfato de sódio 40 mM, pH 7,4; NaCl 500 mM; Imidazol 500 mM). Alíquotas de cada fração foram coletadas para posterior análise em gel de poliacrilamida. O material eluído contendo a rDrr230a foi então dialisado contra H₂O, liofilizado e quantificado por densitometria em gel, utilizando-se Soro Albumina Bovina (BSA) como padrão.

4.2 - Subclonagem de *cd1* no vetor pGAPZ α -B para expressão constitutiva em *Pichia pastoris*

O gene da defensina *cd1* foi obtido diretamente de uma biblioteca de cDNA do Projeto Genoma Café – Unicamp/Embrapa (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>). Diversas *reads* contidas no banco continham seqüências com alto grau de similaridade com defensinas de plantas. A *read* CA00-XX-RT5-011-B03-JM.F, anotada como *Coffea Defensin 1* (CD1), foi selecionada para a subclonagem no vetor de expressão em levedura.

Para subclonagem da região codificadora do peptídeo maduro, codificado pelo gene *cd1* no vetor pGAPZ α -B, oligonucleotídeos específicos foram desenhados a fim de inserirem em *cd1* sítios de restrição para *EcoRI* e *SalI* na extremidade 5' e 3', respectivamente. Duas construções gênicas foram estabelecidas: uma delas contendo uma seqüência codificante para seis histidinas (6xHis) na região C-terminal do peptídeo, denominada CD1tC; e uma outra, cuja proteína resultante possuiria uma seqüência codificante para seis histidinas (6xHis) na região N-terminal, sendo então denominada CD1tN. A inserção da seqüência de seis histidinas (6xHis) teve por finalidade a purificação por cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC), bem como a imunodeteção da proteína recombinante com anticorpos Anti-His. As seqüências dos respectivos iniciadores são mostradas na tabela 4.

Tabela 4: Oligonucleotídeos desenhados para a subclonagem da região codificadora do peptídeo maduro codificado pelo gene *cd1* no vetor pGAPZ α -B.

Primers	Seqüência 5' - 3'	Sítio de restrição
CD1tCfwd	TAAGAATTCATAAATCTTGCCAGAAGCCTAGCA	<i>EcoRI</i>
CD1tCrev	TTAGTCGACACATTTGTAGCGACAGTAGCAAG	<i>SalI</i>
CD1tNfwd	TAAGAATTCATCATCATCATCATAAATCTTGCCAGAAGCCTAGCA	<i>EcoRI</i>
CD1tNrev	TTAGTCGACTCAACATTTGTAGCGACAGTAGCAAG	<i>SalI</i>

A fim de se manter o sítio de *EcoRI* na pauta de leitura correta, foi necessário adicionar uma histidina na região “upstream” à *cd1tc*, cujo primeiro aminoácido seria uma lisina. A escolha da histidina se deu a fim de se manter, da forma mais coerente possível, as características físico-químicas do primeiro aminoácido. A construção resultante é mostrada na Figura 5.

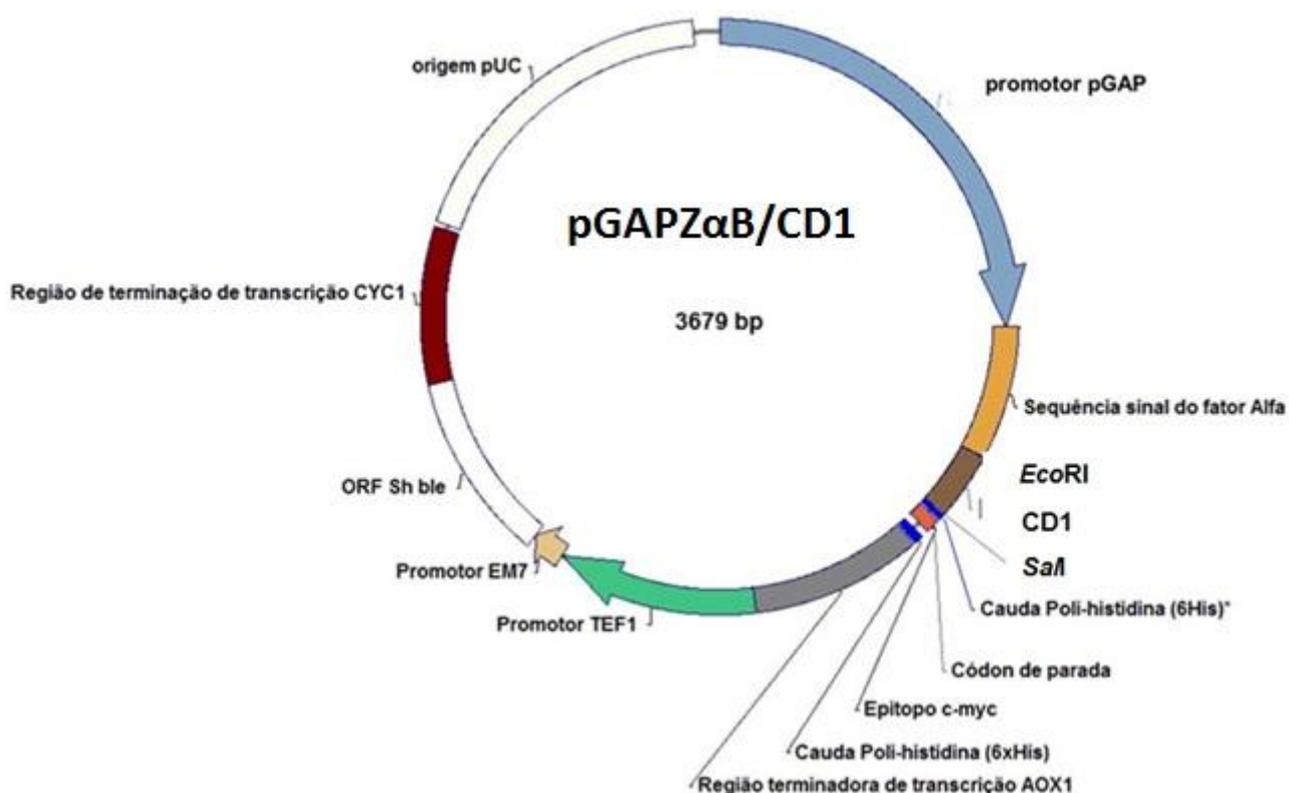


Figura 5: Mapa da construção do vetor pGAPZαB/CD1 para expressão heteróloga em *Pichia pastoris*

Para inserção dos sítios de restrição *EcoRI* e *SalI* nas extremidades 5' e 3' do gene foi realizada uma reação de PCR utilizando como DNA molde o vetor pSPORT 1 contendo o gene *cd1*. Na reação de amplificação foram utilizados 10 μM de cada iniciador (Tabela 4), 50 mM de MgSO₄, 10 mM de cada dNTP, tampão da polimerase (600 mM de Tris-SO₄ pH 8.9, 180 mM de Sulfato de Amônio) e 0,4 U/μl de *Taq* DNA polimerase de alta fidelidade (*Taq Platinum*[®] - Invitrogen, Co.). As condições para

amplificação foram as seguintes: 98°C durante 30 segundos; seguido de 20 ciclos de 10 segundos, a 98°C; 58°C durante 10 segundos; 72°C durante 35 segundos; com extensão final a 72°C, durante 5 minutos. Ao final da reação, o produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os fragmentos de DNA apresentaram o tamanho esperado de 180bp para *cd1tc* e 195 bp para *cd1tn*.

Posteriormente, os fragmentos de DNA foram excisados do gel e purificados utilizando o kit “GeneClean” II (Biolabs), conforme manual descrito pelo fabricante para ligação ao plasmídeo pGEM T-easy (Promega). A reação de ligação foi incubada durante 16 horas em banho de gelo, a uma temperatura de aproximadamente 15 ±1°C e, posteriormente, dialisada contra água para ser usada na transformação de células competentes de *E. coli* linhagem XL- I Blue, via eletroporação.

Na transformação foram utilizados 40 µL de células competentes, juntamente com 2 µL do sistema de ligação. Uma cubeta de eletroporação estéril de 0,1 cm foi usada em um eletroporador Bio-Rad Gene Pulser™ com os seguintes parâmetros: 1,8 kV de voltagem, 200 Ω de resistência e 25 µFD de capacitância. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1,0 ml de meio de cultura LB - Luria Bertani (Tryptona 1%, Extrato de Levedura 0,5%, Cloreto de Sódio 0,5%, pH 7,5) e incubadas durante 1 hora, a 37 ±1°C. Após esse período, as células foram transferidas para placas com meio LB-ágar contendo ampicilina 100 µg/ml e incubadas em estufa a 37 ±1°C, durante aproximadamente 16 horas. Os transformantes resistentes ao antibiótico foram selecionados e crescidos em meio LB líquido com ampicilina 100 µg/ml, durante 16 horas, a 37 ±1°C. O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o método da lise alcalina, conforme sugerido por (SAMBROOK;RUSSELL, 2001).

A presença do gene foi confirmada pela digestão do DNA plasmidial com as enzimas *EcoRI* e *SaII*. O DNA digerido foi analisado em gel de agarose 1,5% e os fragmentos de aproximadamente 200 pb (*cd1*) e 2,9 kb (pGAPZαB) foram excisados da matriz de agarose e purificados utilizando-se o kit “GeneClean” II (Biolabs). Para análise da integridade do gene, o DNA obtido foi encaminhado para sequenciamento e as sequências nucleotídicas obtidas foram utilizadas para gerar as sequências peptídicas mostradas na Figura 6.

CD1tC; Pi/Mw : 9.02 / 7344.20 (teórico)

GIHKSCQKPSKSWSGKCADKGC^{6xHis}CHNVCKSRDHADSGSCMWTGQGHQRHYAC^{Cys}CRYKCV^{Cys}DHHHHHH

CD1tN; Pi/Mw : 9.16 / 6992.84 (teórico)

GIHHHHHHKSCQKPSKSWSGKCADKGC^{6xHis}CHNVCKSRDHADSGSCMWTGQGHQRHYAC^{Cys}CRYKCV

Figura 6: Sequência de aminoácidos obtidas para CD1tC e CD1tN. As sequências peptídicas foram obtidas a partir da tradução direta das seqüências nucleotídicas utilizando a ferramenta de bioinformática "BLASTx", disponível no endereço eletrônico <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. As sequências sombreadas representam a sequênciã codificante para seis histidinas (6xHis) e aminoácidos inseridos no processo de clonagem. Em vermelho estão representadas os resíduos de cisteína.

Para a transformação de células competentes de *P. pastoris*, linhagem X33, com a construção *cd1/pGAPZ α B* (Figura 5), foram utilizados aproximadamente 10 μ g de DNA, previamente digeridos com a enzima *Bgl*III. Uma cubeta de eletroporação estéril de 0,2 cm foi usada em um eletroporador Bio-Rad Gene Pulser™ com os seguintes parâmetros: 1,5 kV de voltagem, 400 Ω de resistência e 25 μ FD de capacitância. Após a transformação por eletroporação, as células foram solubilizadas em 1 ml de sorbitol 1M, incubadas a 28 \pm 1°C durante 1 hora e, em seguida, semeadas em meio YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose) contendo 100 μ g/ml de Zeocina (Invitrogen, Co.). Os clones que apresentaram resistência ao antibiótico foram analisados por PCR de colônia, conforme sugerido por LINDER, *et al.* (1996), usando-se os iniciadores específicos do gene conforme especificado na tabela 4 ou os que anelam na região do promotor e terminador AOX1 (tabela 5)

Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento do gene de defensina de café (*cd1*) subclonado no plasmídeo pGAPZ α B

Oligonucleotídeos	Sequência
AOX 5' for	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'
AOX 3' rev	5'-AATGGCATTCTGACATCC-3'

Após confirmação dos clones PCR positivos, uma colônia contendo CD1tC/pGAPZ α -B e outra contendo CD1tN/pGAPZ α -B foram utilizadas em ensaios de expressão piloto. As colônias foram inoculadas em 100 ml de meio YPD e as culturas foram mantidas à 30 \pm 1°C por 3 dias. Após esse período, os 100 ml foram utilizados para inocular 1 L de meio YPD. As culturas foram mantidas à 30 \pm 1°C por 4 dias, quando, então, as células foram precipitadas por centrifugação e os sobrenadantes filtrados em membrana Millipore 0.2 μ m. Após análise da expressão por TRICINA-SDS-PAGE e confirmação da expressão da proteína, o clone foi selecionado para produção em larga escala em biofermentador (BioFlo®/CelliGen® 115).

Para a produção da proteína de interesse em larga escala, uma colônia contendo CD1tC/pGAPZ α -B e outra contendo CD1tN/pGAPZ α -B foram utilizadas para ensaios de expressão em biofermentador de 3 litros (BioFlo®/CelliGen® 115). Uma colônia foi inoculada em 3 frascos contendo 100 ml de meio YPD. As culturas foram mantidas a 30 \pm 1 °C, 220 rpm, por 3 dias. Após esse período, os 300 ml foram utilizados para inocular 1,5 L de meio de fermentação basal seguindo os seguintes parâmetros de fermentação: oxigênio dissolvido 30%; temperatura 30 \pm 1 °C; rotação 500 rpm, aeração 1 vvm e glicerol sendo acrescentados constantemente como fonte de carbono. A cultura foi mantida por 4 dias e a cada 24 horas uma alíquota foi retirada para análise em gel de poliacrilamida. Após 96 horas de expressão, as células foram precipitadas por centrifugação a 1500 x g, o sobrenadante filtrado em membrana Millipore 0,2 μ m e concentrado em um sistema de ultrafiltração tangencial (*QuixStand Benchtop System-GE Healthcare* – 3 kDa).

Após concentração no sistema de ultrafiltração tangencial, o rendimento da expressão das proteínas CD1tN e CD1tC foi determinado por densitometria em gel utilizando como padrão Soro Albumina Bovina (BSA).

Posteriormente, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel desnaturante de duas fases, em presença de Tricina (TRICINA-SDS-PAGE), conforme descrito por SCHAGGER e VON JAGOW (1987) para confirmação da expressão. O gel de duas fases (separação 14%, pH 8,9; concentração 4%, pH 6,8), foi desenvolvido com tampão do catodo contendo Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M e SDS 0,1 % (pH 8,25), e do anodo contendo Tris 0,2 M (pH 8,9).

Cada amostra, contendo 20 µL do sobrenadante proveniente da expressão, foi dissolvida em tampão de amostra (50 mM de Tris-HCl pH 6,8; SDS 8,2 % (p/v); sacarose 2% (p/v), azul de bromofenol 0,001% (p/v)) e fervida durante 10 minutos. As amostras foram submetidas a eletroforese durante aproximadamente 4 horas, a 70 V, em câmara fria. A eletroforese foi realizada usando-se o sistema *Mini Protean II Electroforesis Cell* (Bio-Rad).

4.3 - Purificação das proteínas recombinantes rCD1tN e rCD1tC e detecção das proteínas purificadas por Western blot

Os sobrenadantes provenientes da expressão e concentrados no sistema *QuixStand Benchtop System- GE Healthcare* – 3 kDa foram filtrados em membrana millipore 0,22 µm para purificação por cromatografia de afinidade e por cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). Primeiramente, a amostra foi diluída na proporção 1:1 em tampão fosfato de sódio 40 mM, pH 7,4 e NaCl 500 mM e submetida a cromatografia de afinidade com níquel, usando-se a coluna HisTrap FF crude 1.6 × 2.5 cm (5 ml), da GE Healthcare. A coluna foi equilibrada com 7 volumes (35 ml) da solução de equilíbrio (tampão fosfato de sódio 40 mM pH 7,4; NaCl 500 mM) e aplicada na coluna em um fluxo de 5 ml/min onde permaneceu em circulação por três dias. As proteínas recombinantes eram eluídas diariamente. A fração não retida foi removida com 7 volumes (35 ml) da solução de lavagem (tampão fosfato de sódio 40 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM). A fração retida na coluna foi eluída com 7 volumes (35 ml) da solução de eluição contendo tampão fosfato de sódio (40 mM, pH 7,4; NaCl 500 mM; Imidazol 500 mM). A fração eluída da cromatografia de metaloafinidade foi dessalinizada utilizando-se a coluna cromatográfica de dessalinização HiTrap Desalting™ (G.E. Healthcare). As amostras dessalinizadas foram liofilizadas para serem posteriormente submetidas à cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em fase reversa.

Para detecção das proteínas recombinantes purificadas, as amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (50 mM de Tris-HCl pH 6,8; SDS 8,2 % (p/v); sacarose 2% (p/v), azul de bromofenol 0,001% (p/v)), fervidas durante 10 minutos e submetidas a eletroforese (SDS-Tricina-PAGE) aproximadamente 4 horas, a 70 V,

em câmara fria. A eletroforese foi realizada usando-se o sistema *Mini Protean II Electroforesis Cell* (Bio-Rad). As proteínas separadas no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0,22 μm (*Hybond C*, Amersham), de acordo com o manual de transferência do equipamento *Trans-blot[®] SD Semi Dry* (Bio Rad). O gel foi feito em duplicata, sendo que o primeiro foi usado para a imunodeteção e o segundo para a coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1% (p/v) em 25% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de gelatina 3% em TBS na concentração final de 1x durante 2 horas, sob agitação, a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo monoclonal Anti-6xHis produzido em camundongo (diluído 1: 2000 em TBS/gelatina 1%) conjugado a fosfatase alcalina[®] (Invitrogen) durante 4 horas. Após a incubação, a membrana foi lavada com tampão TBS - Tween 0,05%. Para a detecção das proteínas, a membrana foi incubada na solução de revelação, conforme descrito pelo fabricante do substrato para fosfatase alcalina (*AP Conjugate Substrate Kit* - Bio Rad).

Posteriormente, os materiais liofilizados passaram por uma segunda etapa de purificação. As amostras foram submetidas a cromatografia líquida de alta Performance (HPLC). Cinco miligramas das amostras foram dissolvidos em 500 μl em solução de TFA 0,1% e filtrado em 0,22 μm . A amostra foi aplicada em uma coluna analítica C18 Phenomenex[™] previamente equilibrada com TFA 0,1% e acoplada a um sistema Prominence LC-20AT[™] Shimadzu, com fluxo de 2 ml/min. A eluição das amostras se deu através de um gradiente linear de 0,5 à 55% de acetonitrila em TFA 0,1% por cerca de 50 minutos. O acompanhamento da cromatografia foi realizado fotometricamente em A280. O pico contendo a proteína de interesse foi coletada manualmente em tubos de 1,5 ml e estocada a $-20 \pm 1^\circ\text{C}$ para posterior análise de suas massas moleculares e ensaios de atividade biológica.

4.4 - Análise da massa molecular e sequenciamento parcial das proteínas recombinantes CD1tN e CD1tC por espectrometria de massa

Amostras liofilizadas após cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foram ressuspensas em água Milli-Q e adicionados a uma solução saturada de matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) em uma proporção 1:3 (v/v). A solução de

CHCA foi preparada em H₂O/ACN/TFA (50/50/0,3, v/v/v) a 10 mg.ml⁻¹ (50 mmol.L⁻¹). As amostras foram homogeneizadas e aplicadas em triplicata em placa de MALDI-TOF/TOF e cristalizados à temperatura ambiente. Posteriormente, foram analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF em um espectrômetro Microflex (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) em modo linear positivo em na faixa de detecção 3.500-24.500 Da.

4.5 - Sequenciamento do N-terminal das defensinas recombinantes (rCD1tN e rCD1tC) por degradação de Edman

A fim de determinar a sequência dos aminoácidos das proteínas recombinantes, amostras foram enviadas para Universidade Federal do Ceará (UFC) para serem submetidas ao seqüenciamento da região amino terminal pelo método de Degradação de Edman (EDMAN, 1950), em um sequenciador automático do tipo Shimadzu PPSQ-10.

4.6 – Avaliação da atividade antimicrobiana das defensinas recombinantes rDrr230a e rCD1

4.6.1 - Análise da atividade das defensinas recombinantes rDrr230a e rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre a germinação dos uredosporos do fungo *P. pachyrhizi*

Os ensaios com o fungo *P. pachyrhizi* foram realizados com uredosporos coletados de plantas de soja infectadas, crescidas e mantidas sob condições controle em casa de vegetação na Embrapa Soja (Londrina-PR).

Para a análise da inibição da germinação dos uredosporos de *P. pachyrhizi* 50 µl de uma suspensão de esporos (10⁴ esporos/ml) em água estéril contendo 0,01% (v/v) tween 20 foram adicionados incubados em poços de microplacas contendo as proteínas recombinantes rDrr230a e rCD1 na concentração final de 3

µg/µl. Os ensaios foram realizados em um volume final de 100 µl. É importante destacar que os ensaios foram realizados separadamente para cada defensina. Posteriormente, as amostras foram incubadas em uma câmara úmida a 24 ±1°C durante a noite. Lactofenol (30 µl) foi adicionado após o período de incubação para paralisar a germinação dos uredosporos. Os esporos germinados foram contados em uma câmara de Neubauer ao microscópio ótico (Olympus Optical Co.). Os esporos foram considerados germinados quando o comprimento de seu tubo germinativo foi maior ou igual ao diâmetro do uredosporo. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, usando como controle negativo tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4.

4.6.2 - Análise da atividade das defensinas recombinantes rDrr230a e rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre o fungo *P. pachyrhizi* em ensaios *in planta*

Como o fungo *P. pachyrhizi* é um fungo biotrófico obrigatório, o qual necessita da planta viva para completar o seu ciclo, não é possível avaliar a atividade antifúngica das defensinas recombinantes sobre o crescimento do fungo em ensaios *in vitro*. Desta forma, a atividade das proteínas rDrr230a e rCD1 sobre o fungo *P. pachyrhizi* foi avaliada em bioensaios *in planta* (folha destacada), no qual a severidade da doença foi analisada diariamente de acordo com uma escala de severidade que varia de 0% até 100%, conforme estabelecido por GODOY *et al.* (2006).

Para isso, metade de folhas de soja foram inoculadas com 150 µl de uma suspensão de uredosporos (8×10^4 uredosporos/ml em água estéril contendo 0.01% (v/v) tween 20 por injúria do tecido sadio da planta (método de raspagem). Posteriormente, o mesmo local foi tratado com uma solução contendo as proteínas recombinantes a serem testadas na concentração final de 3 µg/µl. As amostras foram incubadas a 24 ±1°C durante 13 dias em uma câmara úmida. A severidade da doença foi avaliada diariamente. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, usando como controle negativo tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4.

Adicionalmente, 24 h após a inoculação, folhas infectadas foram perfuradas com tampa de microtubo e os discos foliares resultantes coletados para análise

microscópica da germinação dos uredosporos sob microscópio eletrônico de varredura. Para esse fim, os discos foliares foram imediatamente fixados em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2%; paraformaldeído 2% e sacarose 3% em meio tamponado com cacodilato de sódio 0,05M pH 7,2). Após lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,05 M pH 7,2, os discos foram fixados por uma hora em solução de ósmio (tetróxido de ósmio 0,5%; ferricianeto de potássio 0,8%; cloreto de cálcio 5 mM e cacodilato de sódio 0,05 M pH 7,2), lavados novamente em tampão cacodilato de sódio e fixados por 2 horas a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, protegidos da luz, em solução de uranila (acetato de uranila 0,5%). Após novas lavagens em tampão cacodilato de sódio, as amostras foram desidratadas em incubações de 15 minutos em soluções de concentração crescente de acetona (acetona 30%, 50%, 70%, 80%, 95 % e 100%). Em seguida, acetona presente nas amostras foi removida por secagem ao ponto crítico. Por fim, as amostras foram revestidas com ouro em metalizador, por pulverização de baixo vácuo, e em seguida, observadas e fotografadas sob microscópio eletrônico de varredura (Jeol).

4.6.3 - Análise da atividade da defensina recombinante rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre os fungos fitopatogênicos *Fusarium tucumaniae* e *Fusarium oxysporum*

Os ensaios para avaliar a atividade da rCD1 sobre os fungos fitopatogênicos *Fusarium tucumaniae* e *Fusarium oxysporum* foram realizados conforme descrito no Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo, disponível no CLSI M27-S3 (CLSI, 2008). Foram utilizados inóculos padrão de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium tucumaniae* pertencentes ao banco da Universidade Católica de Brasília-UCB.

Inicialmente, os isolados fúngicos foram cultivados em meio PDB – *Potato Dextrose Broth* (Difco™) a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ por 7 dias. Após esse período, os esporos foram coletados pela adição de 1 ml de água estéril as placas contendo os fungos crescidos previamente. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Newbauer e diluídos para uma concentração final de 10^4 esporos/ml.

Posteriormente, uma solução contendo 100 microlitros de esporos fúngicos (10^4 esporos/ml) foi adicionada ao meio RPMI 1840, juntamente com as proteínas

recombinantes a serem testadas. A solução final, contendo aproximadamente 150 µl, foram dispensadas em microplacas de 96 poços e incubadas a 28 ±1°C por 72 horas, sob leve agitação, em leitor do tipo Biotek (PowerWave™ HT Microplate Reader). A absorbância foi mensurada a 600 nm e as leituras realizadas a cada 2 horas. As duas formas recombinantes da defensina foram testadas na concentração de 52 µM (128 µg). Vale salientar que a concentração testada corresponde a um valor intermediário da curva de determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) que varia entre 2 µg/ml e 512 µg/ml.

Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, usando como controle positivo Anfotericina B (20 µg/ml) (concentração necessária para inibir 100% do crescimento fúngico) e tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 como controle negativo, uma vez que as proteínas foram solubilizados neste tampão.

4.6.4 - Análise da atividade antifúngica da defensina rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre o fungo patogênico *Candida albicans*.

O ensaio para análise da atividade da rCD1 sobre o fungo *Candida albicans* foi realizado conforme descrito no Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo, disponível no CLSI M27-S3 (CLSI, 2008). Foi utilizado inóculo padrão de *C.albicans* (ATCC:10231) gentilmente cedido pela Universidade Católica de Brasília.

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 4.6.3, entretanto o ensaio foi incubado a 28±1°C por 48 horas, tempo necessário para o crescimento do fungo. Assim como estabelecido no ensaio anterior, as duas formas recombinantes da defensina foram testadas na concentração de 52 µM. A absorbância foi mensurada a 600 nm e as leituras realizadas a cada 2 horas. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, usando como controle positivo anfotericina B (20 µg/ml) e tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 como controle negativo.

4.6.5 - Análise da atividade antibacteriana da defensina rCD1 (rCD1tC) sobre as bactérias patogênicas *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*

Os ensaios para análise da atividade da rCD1 sobre as bactérias patogênicas *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* foram realizados conforme a metodologia descrita no CLSI M07-A9 (CLSI, 2012) Os isolados bacterianos de *K. pneumoniae* (ATCC:13883) e *S. aureus* (ATCC:25923) foram gentilmente cedidos pela Universidade Católica de Brasília.

Inicialmente as bactérias foram cultivadas em meio ágar Mueller-Hinton (Sigma-Aldrich) por um período de 24 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período, 2 a 5 colônias isoladas foram selecionadas e incubadas em caldo de Mueller-Hinton. Posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 600 nm até se obter um intervalo de absorvância entre 0,08 e 0,10 de acordo com a escala 0,5 de MacFarland. Desse modo obteve-se uma concentração final de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, a qual foi diluída de modo a obter um inóculo final de 1×10^5 UFC/ml. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços, incubadas em leitor do tipo Biotek (PowerWave™ HT Microplate Reader) por um período 24 h, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e sobre agitação constante. A absorvância foi mensurada a 600 nm e leituras realizadas a cada 30 minutos.

Neste ensaio apenas uma das formas recombinantes de CD1 foi avaliada. Foram utilizados 40 μM de rCD1tC e todos os tratamentos foram realizados em triplicata, usando como controle positivo cloranfenicol (30 $\mu\text{g/ml}$) e tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 como controle negativo.

4.7 – Análises estatísticas

Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, expressos com média \pm DP (Desvio Padrão). A análise estatística (ANOVA) foi realizada pelo software Genes GraphPad Prism versão 6.05. Os tratamentos foram submetidos à análise

pelo Teste de Tukey para determinar a existência de diferenças significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

5 - RESULTADOS

5.1 - Expressão da defensina (drr230a) de ervilha (*Pisum sativum*) na levedura *Pichia pastoris* e purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade

De acordo com a análise das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-TRICINA-PAGE, na Figura 7a é possível observar a expressão de uma proteína com massa molecular de aproximadamente 6,52 kDa em todos os intervalos de expressão. A massa observada correspondente a estimada para a proteína recombinante Drr230a. As análises por Western blot com anticorpos anti-his detectaram a proteína recombinante confirmando a expressão da rDrr230a em todos os tempos de expressão (Figura 7b).

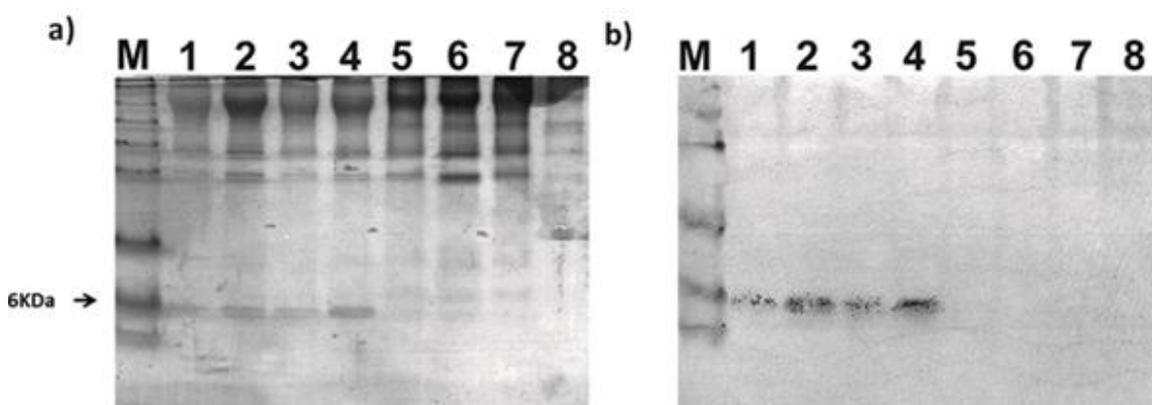


Figura 7: Análise por TRICINA-SDS-PAGE 14% (a) e Western blot (b) da expressão de rDrr230a em *P. pastoris*. M: Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard – Invitrogen; Linhas 1, 2, 3 e 4: 24, 48, 72 e 96 h de expressão; Linhas 5, 6, 7, 8: Controle negativo (Linhagem X33 não transformada) 24, 48, 72 e 96 h de expressão. Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Anticorpos Anti-histag diluído 1:2000 em TBS/gelatina 1% foram utilizados para a imunodeteção.

Após detecção da expressão da proteína recombinante o sobrenadante foi filtrado e submetido à purificação por cromatografia de afinidade com níquel imobilizado, utilizando a coluna HisTrap FF crude. A rDrr230a foi eluída com tampão contendo 0,5 M de imidazol. A fração eluída foi então analisada por TRICINA-SDS-PAGE 14% e detectada por Western blot utilizando anticorpos anti-histag.

A análise das proteínas separadas no gel revelou presença de uma banda de aproximadamente 6,52 kDa, correspondente à massa molecular esperada para a proteína recombinante rDrr230a (Figura 8a). A mesma proteína foi detectada por Western blot, comprovando, assim, que a proteína purificada detectada correspondia à proteína recombinante rDrr230a (Figura 8b). O rendimento após a expressão e purificação foi de 3,5 mg/L de proteína

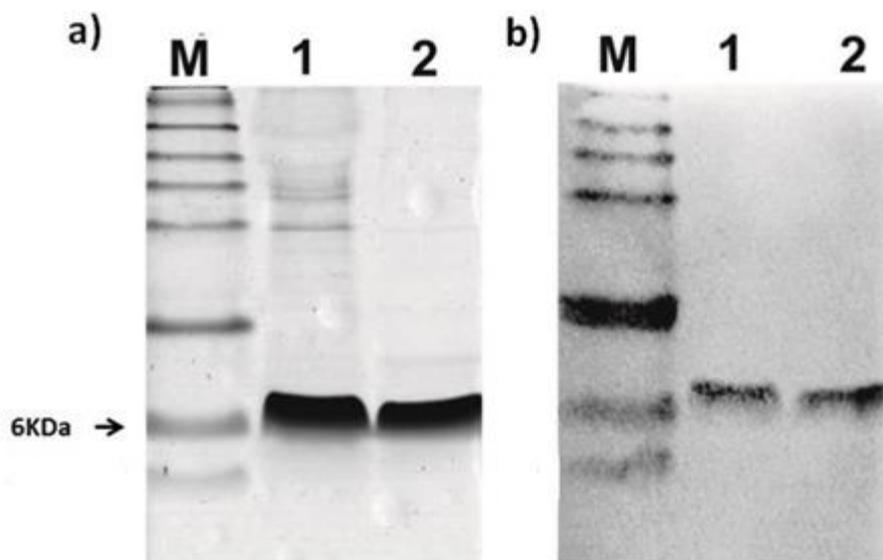


Figura 8: Análise por TRICINA-SDS-PAGE 14% (a) e Western blot (b) de rDrr230a após purificação por cromatografia de afinidade (Histrap FF crude). M: Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard – Invitrogen; Linha 1: Extrato total de *P. pastoris* contendo a rDrr230a após 96 horas de indução com metanol; 2: Fração eluída contendo a rDrr230a purificada. Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Anticorpos Anti-histag diluído 1:2000 em TBS/gelatina 1% foram utilizados para a imunodeteção.

5.2 - Subclonagem de cd1 no vetor pGAPZ α -B para expressão constitutiva em *Pichia pastoris*

Para subclonagem do gene *cd1* nas duas formas recombinantes (CD1tC e CD1tN) no vetor constitutivo pGAPZ α -B, oligonucleotídeos específicos foram desenhados a fim de inserirem em *cd1* sítios de restrição para *EcoRI* e *SaII* na extremidade 5' e 3' do gene, bem como uma sequência codificante para seis histidinas (6xHis). Reações de PCR foram realizadas utilizando como *template* o vetor pSPORT 1 contendo o gene *cd1*. Análise do produto de PCR em gel de

agarose 1,5% revelou fragmentos amplificados no tamanho esperado do gene referente a defensina cd1. A Figura 9 mostra a amplificação dos fragmentos de 180 pb para cd1tn (linha 1) e 195 pb para cd1tc (linha 2).

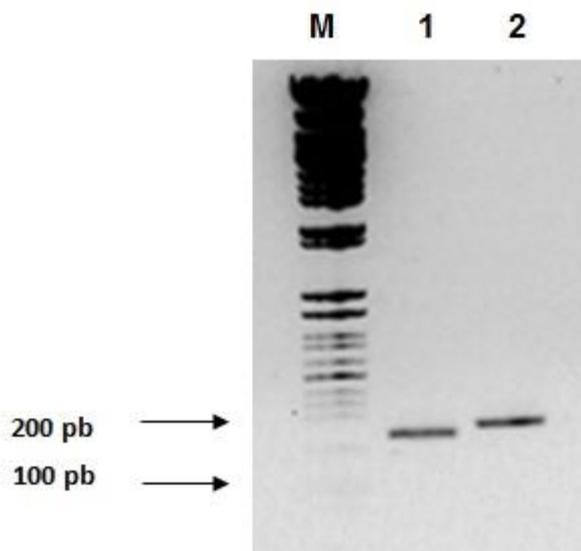


Figura 9: Análise da reação de PCR para a detecção da amplificação da defensina de café CD1. M: marcador (1 Kb plus® INVITROGEN); Linha 1: *cd1tn* (180 bp); Linha 2: *cd1tc* (195 bp). Gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio.

Para confirmação da subclonagem do gene *cd1* (*cd1tn* e *cd1tc*) no vetor de expressão em levedura pGAPZ α B, após ligação do gene ao vetor, o DNA foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SaI* e, posteriormente, analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5%. A análise da digestão mostra a liberação de um fragmento de aproximadamente 200 pb, juntamente com uma banda de cerca de 3600 pb. O fragmento liberado de 200 pb corresponde ao tamanho esperado para o gene de defensina *cd1*, já o fragmento de aproximadamente 3600 pb refere-se ao plasmídeo pGAPZ α B. A análise do DNA digerido com as enzimas *EcoRI* e *SaI* confirmou a presença do gene da defensina *cd1* em todos os clones testados (Figura 10).

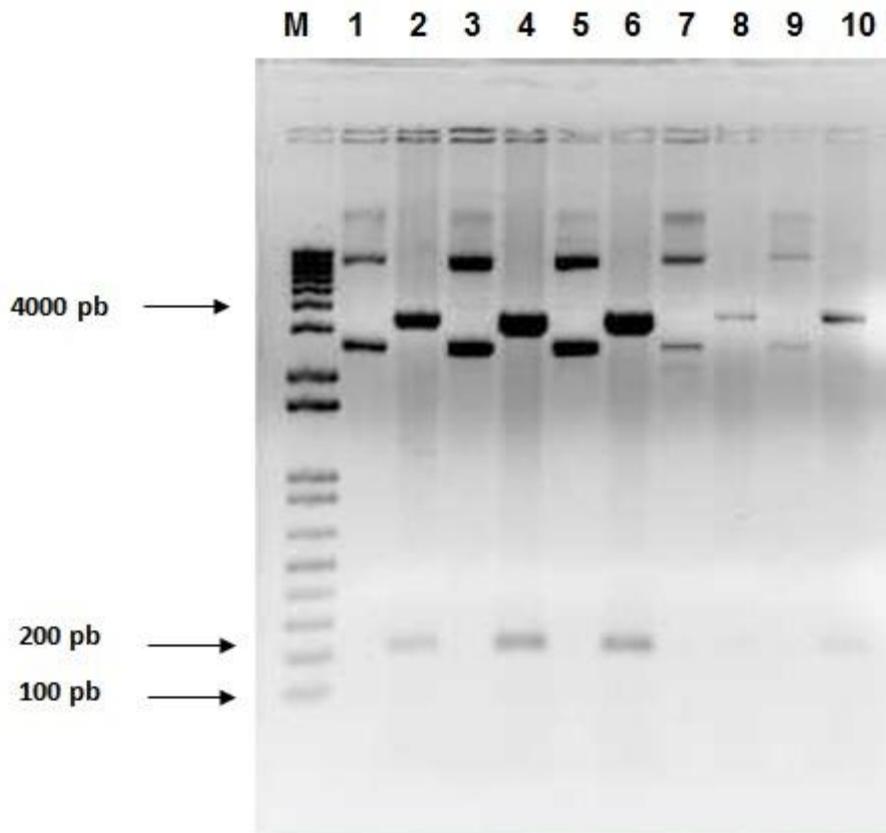


Figura 10: Análise da digestão do plasmídeo pGAPZ α -B/CD1 com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Sall*. Gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio. M: marcador (1 Kb plus® INVITROGEN); Linhas 2 e 4: clones positivos cd1tc; Linhas 6,8 e 10: Clones positivos cd1tn; Linhas 1,3,5,7,9: DNA plasmidial não digerido.

5.3 - Expressão da defensina (cd1) de café (*Coffea arabica*) na levedura *Pichia pastoris* e detecção das proteínas recombinantes (rCD1tN e rCD1tC) por eletroforese em gel de poliacrilamida (TRICINA-SDS-PAGE)

Após transformação das células de *P. pastoris* com o plasmídeo pGAPZ α B/CD1, ensaios de expressão em larga escala foram realizados em biofermentador. Após 96 h de expressão, as alíquotas que foram coletadas a cada 24 horas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida TRICINA-SDS-PAGE 14% e por Western blot.

Analisando as proteínas resolvidas no gel TRICINA- SDS-PAGE, foi possível observar que uma proteína com massa molecular aproximada de 7 kDa, estava

presente em todos os tempos analisados (24, 48, 72 e 96 h) (Figura 11a , Figura 11b).

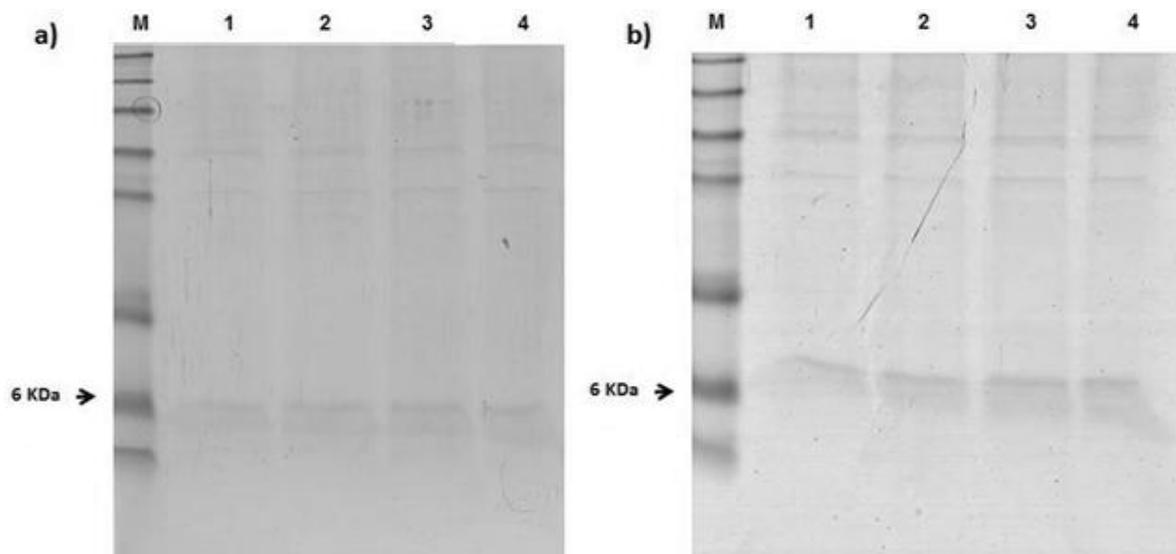


Figura 11: Análise por TRICINA-SDS-PAGE 14% da expressão das proteínas recombinantes rCD1tN e rCD1tC. (a) Expressão rCD1tN: M: Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard – Invitrogen; Linhas 1, 2, 3 e 4: 24, 48, 72 e 96 h de expressão; (b) Expressão rCD1tC: Linhas 1, 2, 3 e 4: 24, 48, 72 e 96 h de expressão. Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*

Posteriormente, o sobrenadante contendo a proteína recombinante foi concentrado em um sistema de ultrafiltração tangencial (QuixStand Benchtop System-GE Healthcare – 3 kDa) e novamente a presença da proteína foi confirmada (Figura 12). O rendimento da expressão das proteínas CD1tN e CD1Tc, após concentração, foi de aproximadamente 8 mg/l para CD1tN e 24 mg/l para CD1Tc.

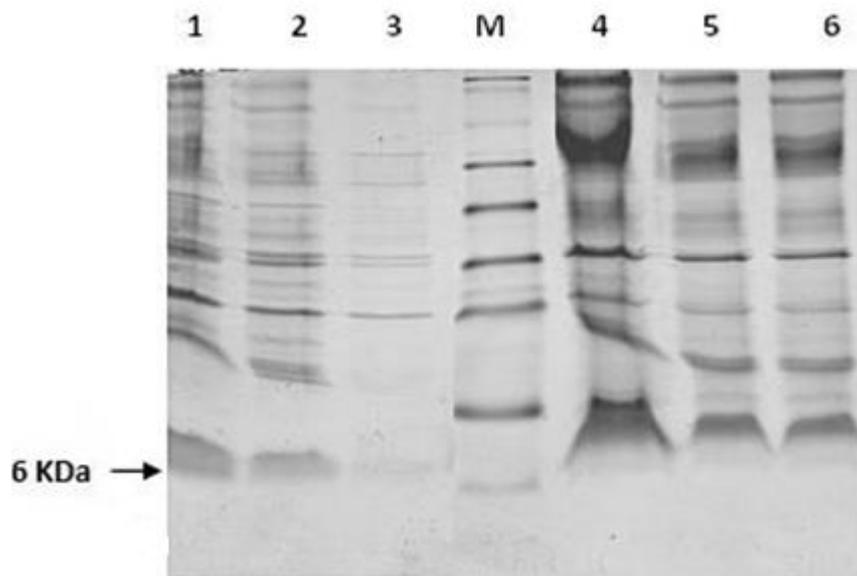


Figura 12: Análise por TRICINA-SDS-PAGE 14% da expressão de rCD1tN e rCD1tC após filtração tangencial (*QuixStand Benchtop System*). M: Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard – Invitrogen; Linhas 1, 2, 3: Expressão de rCD1tN após 96h; Linhas 4, 5, 6: Expressão rCD1tC após 96 h. Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*

5.4 - Purificação das proteínas recombinantes e detecção das proteínas purificadas por Western blot

Os sobrenadantes contendo as proteínas recombinantes rCD1tC e rCD1tN foram pré -purificados por cromatografia de afinidade, utilizando-se a coluna HisTrap FF crude. As proteínas recombinantes foram eluídas com tampão contendo 0,5 M de imidazol. A fração purificada foi analisada por TRICINA-SDS-PAGE, o qual revelou a presença de uma banda de aproximadamente 7 kDa correspondente à proteína recombinante *CD1* (Figura 13a e Figura 14a). A confirmação das proteínas purificadas foi realizada por Western blot utilizando anticorpos anti-histag. Uma única e intensa banda de aproximadamente 7 kDa foi detectada, o que implica afirmar que a proteína recombinante purificada corresponde a rCD1 (Figura 13b e Figura 14b).

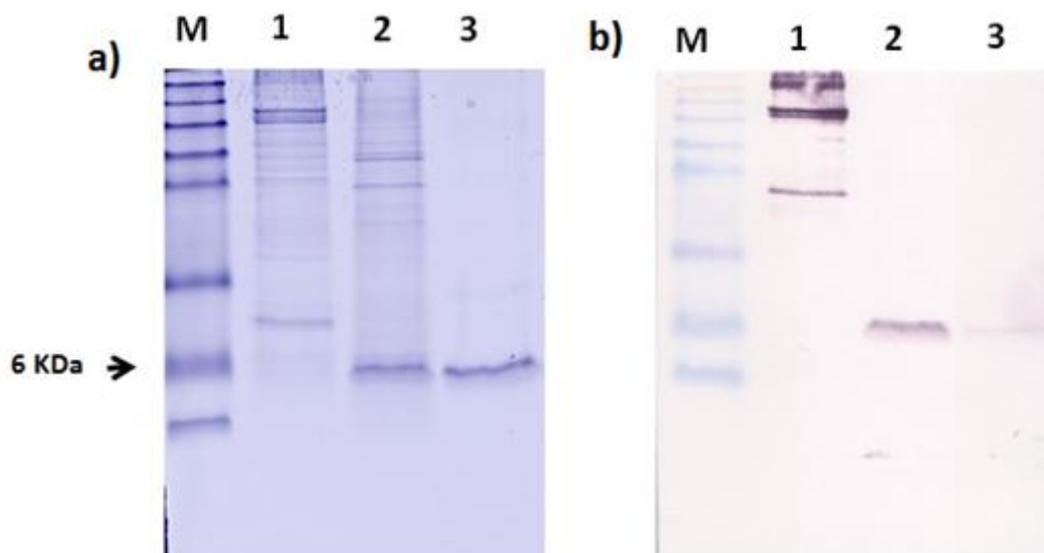


Figura 13: Análise por TRICINA-SDS-PAGE 14% (a) e Western blot (b) de rCD1tN após purificação por cromatografia de afinidade (Histrap FF crude. M: Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard – Invitrogen. 1: Controle positivo Cry8Ka5; 2 Extrato total contendo 1,5 µg de rCD1tN; 3: 2,5 µg de rCD1tN purificado. Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*..Anticorpos Anti-histag diluído 1:2000 em TBS/gelatina 1% foram utilizados para a imunodeteccção.

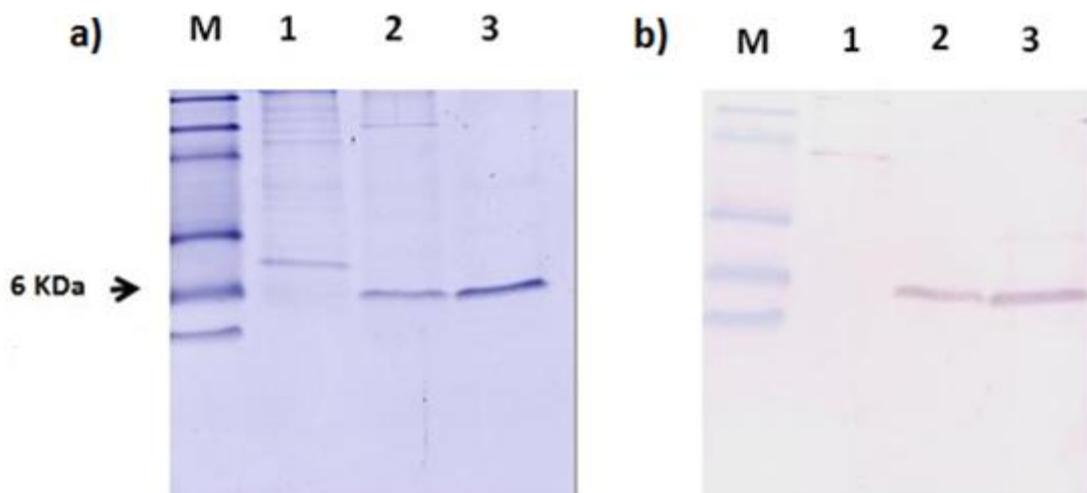
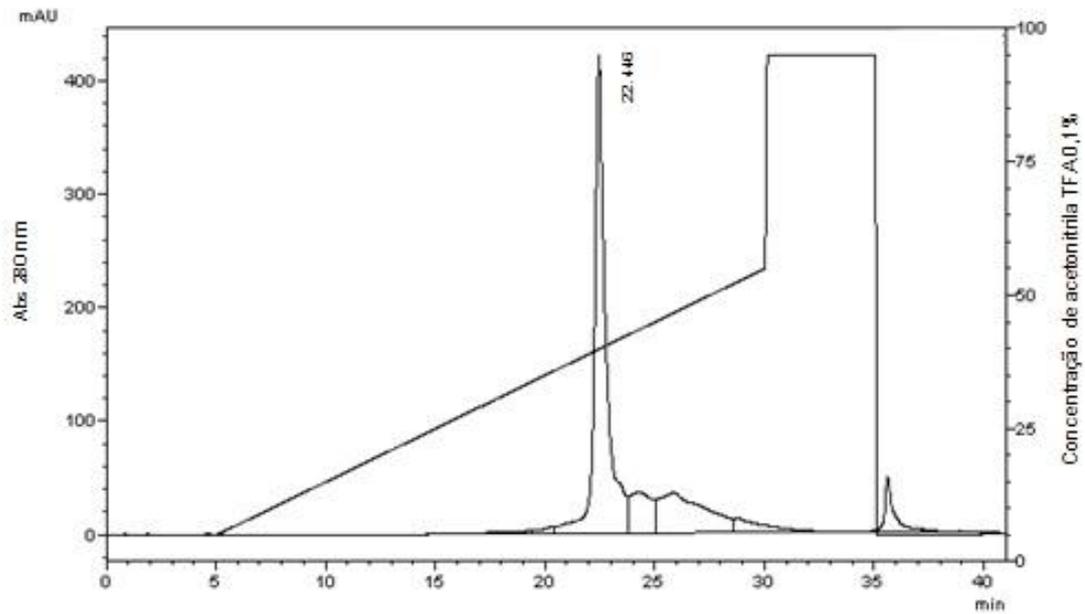


Figura 14: Análise por TRICINA-SDS-PAGE 14% (a) e Western blot (b) de rCD1tC após purificação por cromatografia de afinidade (Histrap FF crude). M: Marcador de massa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard – Invitrogen. 1: Controle positivo Cry8Ka5; 2 Extrato total contendo 1,5 µg de rCD1tC; 3: 2,5 µg de rCD1tC purificado. Gel corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* . e anticorpos Anti-histag diluído 1:2000 em TBS/gelatina 1% foram utilizados para a imunodeteção.

Posteriormente, a fração eluída proveniente da cromatografia de afinidade com níquel foi submetida a uma segunda etapa de purificação por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Análise do cromatograma mostrou a presença de apenas um pico majoritário para ambas as formas recombinantes. rCD1tC foi eluída com 40% de acetonitrila e rCD1tN com 38% de acetonitrila. Os tempos de retenção das duas formas recombinantes de CD1 estão apresentados na Figura 15a e 15b.

a)



b)

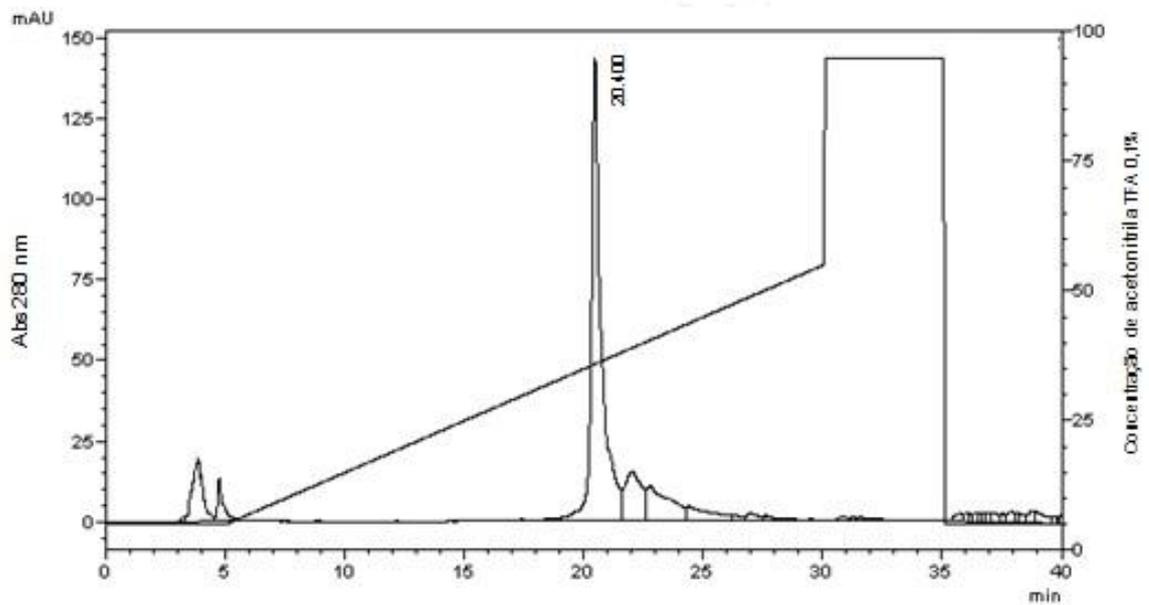


Figura 15: Cromatograma obtido após cromatografia de fase reversa em coluna C18 das formas recombinantes de CD1 em HPLC. (a) rCD1tC. A coleta da fração eluída iniciou-se aos 50 mAU. (b) rCD1tN. A coleta da fração eluída iniciou-se aos 20 mAU.

5.5 - Análise da massa molecular e sequenciamento parcial das proteínas recombinantes CD1tN e CD1tC por espectrometria de massa

Com o intuito de determinar as massas moleculares das proteínas recombinantes (rCD1tN e rCD1tC), bem como suas sequências parciais, amostras liofilizadas após cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foram dissolvidas em água Milli-Q e adicionadas a uma solução saturada de matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) em uma proporção 1:3 (v/v). Em seguida, as amostras foram analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF em um espectrômetro Microflex (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) e suas massas moleculares exatas determinadas. A Figura 16 mostra os espectros de massa obtidos por MALDI-TOF, os quais uma proteína majoritária com massa molecular de 7081 e 7600 Da para rCD1tN e rCD1tC é observada.

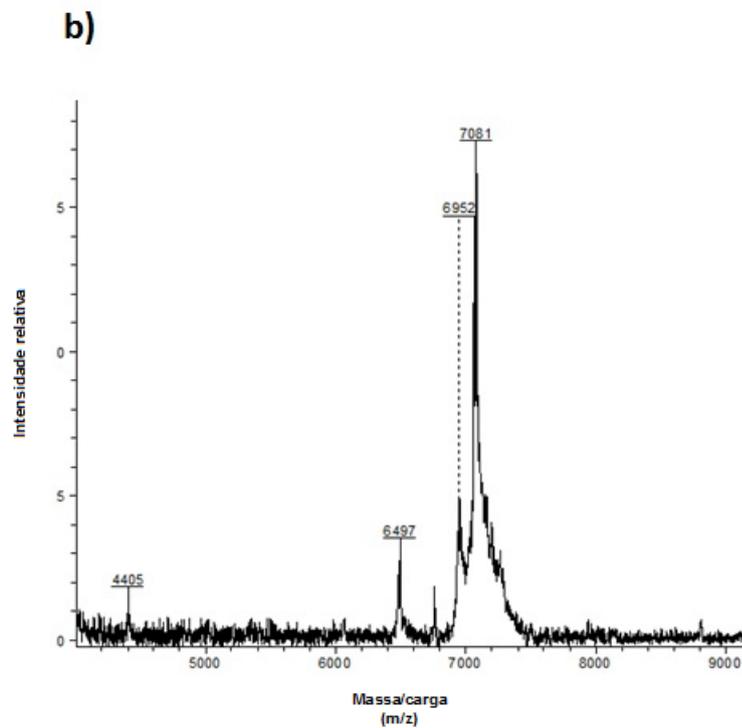
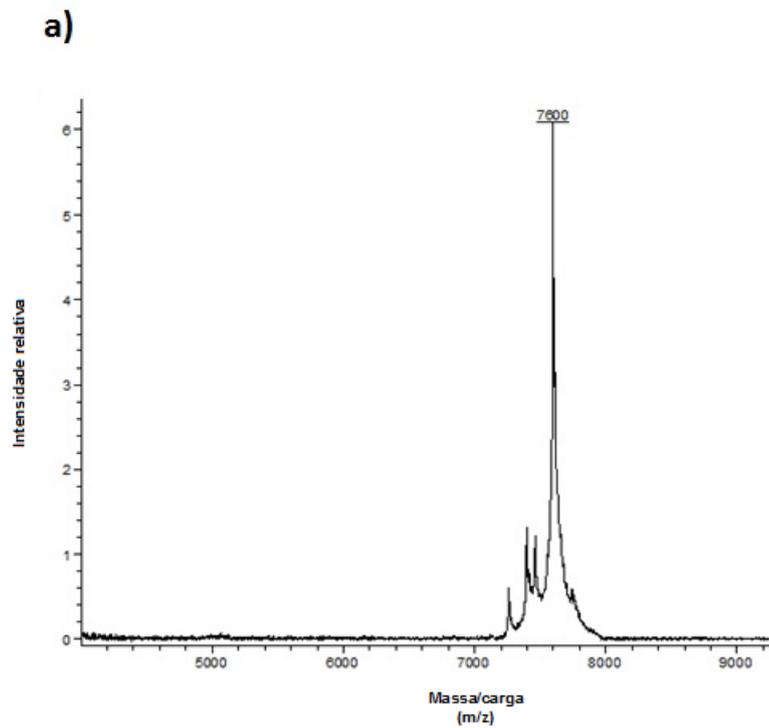


Figura 16: Espectros de massa das proteínas recombinantes rCD1tC e rCD1tN adquiridos em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF. (a) rCD1tC ;(b) rCD1tN. rCD1tN apresentou massa de 7081 Da e rCD1tC de 7600 Da.,rCD1tC- 7344.20 (predito)/ rCD1tN - 6992.84 (predito).

A fim de obter a sequência parcial das proteínas recombinantes, ambas as proteínas foram digeridas com tripsina e os fragmentos tripticos sequenciados por MALDi-ToF/ToF. A sequência “DHADSGSCMWTGQGHQR” presente em ambas as formas recombinantes confirmou a expressão da defensina rCD1 na levedura *P. pastoris*.

5.6 - Sequenciamento do N-terminal das defensinas recombinantes rCD1tN e rCD1tC por Degradação de Edman.

Após obtenção da sequência parcial das proteínas recombinantes por MALDi-ToF/ToF, análise dos aminoácidos presentes no N-terminal das proteínas recombinantes foi realizada por degradação de Edman. Os 27 primeiros resíduos de aminoácidos da forma recombinante rCD1tC e 23 resíduos da rCD1tN foram determinados. Os resíduos restantes foram gerados através da sequência parcial obtida por MALDi-ToF/ToF e por meio do sequenciamento de DNA após clonagem no vetor de expressão pGAPZαB (Figura 17a e 17b).



Figura 17: Comparação de sequências de aminoácidos das formas recombinantes rCD1tC e rCD1tN com as sequências previstas para as proteínas. A sequência de aminoácidos de Asp30 até Arg46 foram obtidas pelo sequenciamento parcial por MALDi-ToF/ToF. A sequência sublinhada corresponde ao obtido pela degradação de Edman. Os demais resíduos foram obtidos a partir da tradução direta das sequências nucleotídicas do sequenciamento de DNA. Asterisco (*) indica a substituição de resíduos de aminoácidos

5.7 – Avaliação da atividade antimicrobiana das defensinas recombinantes rDrr230a e rCD1

5.7.1 - Análise da atividade das defensinas recombinantes rDrr230a e rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre a germinação dos uredosporos do fungo *P. pachyrhizi*

O ensaio realizado para avaliar a atividade antifúngica das defensinas rDrr230a e rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre a germinação dos uredosporos do fungo *P. pachyrhizi* demonstrou que após 16 horas de incubação, utilizando-se 3 µg/µl das proteínas recombinantes, rDrr230a foi capaz de inibir em 100% a germinação dos uredosporos do fungo (Figura 18). No controle negativo, onde há ausência da proteína recombinante (rDrr230a), é possível visualizar a presença de uredosporos germinados (Figura 18a), caracterizados pela presença do tubo germinativo (setas em negrito) com tamanho maior ou igual ao tamanho do uredosporo, enquanto que na presença da proteína recombinante não é observada a formação do tubo germinativo (Figura 18b)

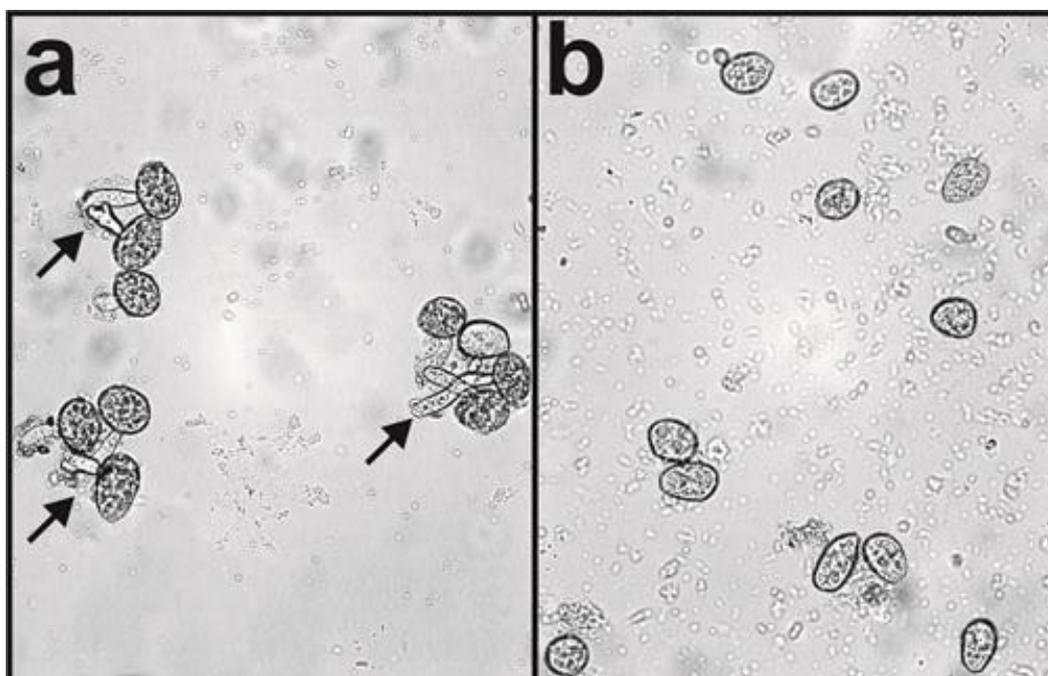


Figura 18: Efeito de rDrr230a sobre a germinação de uredosporos do fungo *P. pachyrhizi* (a) Germinação de uredosporos de *P.pachyrhizi* na ausência de rDrr230a, incubado com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 (controle negativo); (b) Inibição da germinação dos uredosporos de *P. pachyrhi* na presença de rDrr230a.

Os ensaios realizados com a defensina recombinante rCD1 mostraram que as formas recombinantes, rCD1tC e rCD1tN inibiram a germinação dos esporos em 26% e 18%, respectivamente, não havendo diferença significativa entre as duas formas recombinantes ($p > 0,05$). Ao comparar os tratamentos com o controle pode se perceber que houve diferença significativa entre eles ($p = 0,0029$) (Figura 19a). No controle negativo (Tris-HCl 20 mM pH 7,4) não foi observada inibição da germinação dos uredosporos (Figura 19b). As Figuras 19c e 19d mostram a inibição da germinação dos uredosporos por rCD1tC e rCD1tN.

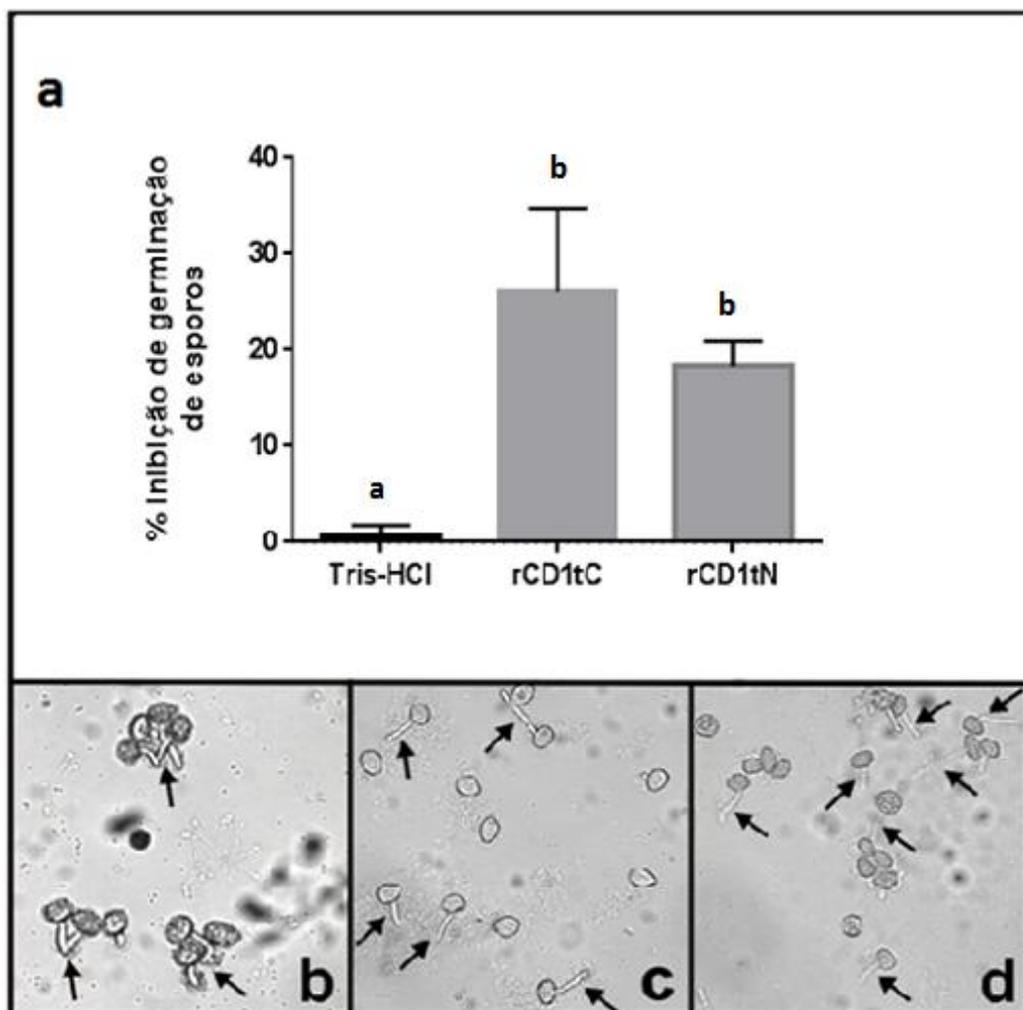


Figura 19: Inibição da germinação de uredosporos do fungo *P. pachyrhizi* por rCD1tC e rCD1tN. (a) Porcentagem de inibição dos uredosporos do fungo *P. pachyrhizi* na ausência e presença de rCD1; (b) Tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 (controle negativo);(c) e (d) Inibição da germinação dos uredosporos por rCD1tC e rCD1tN, respectivamente. Barras com letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$)

5.7.2 - Análise da atividade das defensas recombinantes rDrr230a e rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre o fungo *P. pachyrhizi* em ensaios *in planta*.

Como não é possível analisar a atividade das defensas recombinantes rDrr230a e rCD1 sobre o crescimento do fungo *P. pachyrhizi in vitro*, ensaios *in vivo* foram realizados por meio de ensaios *in planta*, utilizando folhas destacadas de plantas de soja infectadas com esse fungo

AO final do tratamento, após 14 dias, folhas infectadas com o fungo e na presença de 3 µg/µl das defensas recombinantes não apresentaram sintoma da doença, sendo considerado 0% de severidade (Figura 20a, Figura 21a e 21b). Folhas infectadas com o fungo e que não foram tratadas com as proteínas recombinantes rDrr230a e rCD1 apresentaram 80% de severidade da doença quando comparada com a escala proposta por GODOY *et al.* (2006) (Figura 20c e Figura 21c). Adicionalmente, folhas infectadas foram submetidas à análise por microscopia eletrônica de varredura para acompanhar o efeito da proteína sobre as estruturas da planta e do fungo. Após 24 horas de inoculação, as análises por microscopia mostraram que não houve germinação dos uredosporos nas folhas infectadas na presença de rDrr230a (Figura 20b). Todavia, pode se observar germinação dos esporos nas folhas nas quais a proteína rDrr230a não estava presente (Figura 20d). O mesmo pode ser observado com as proteínas recombinantes rCD1tN e rCD1tC.

Além disso, foi possível observar que as células epidérmicas das folhas infectadas, na ausência das duas proteínas recombinantes (rDrr230a, rCD1) encontraram - se danificadas (Figura 20d, Figura 21f).

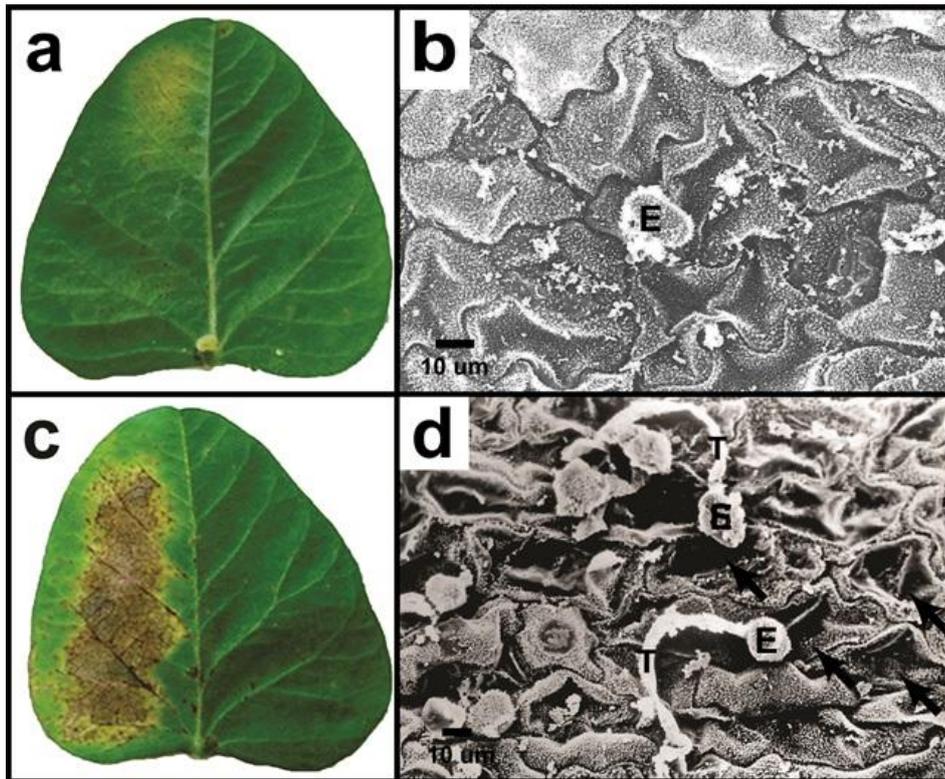


Figura 20: Análise da atividade da rDrr230a sobre folhas de soja infectadas com *P. pachyrhizi*. (a) Ausência de sintoma da ferrugem asiática na presença da rDrr230a (3 µg/µL) – 0% de severidade; (b) Micrografia representativa de uredosporos não germinados de *P. pachyrhizi* e células epidérmicas intactas na presença de 3 µg/µL de rDrr230a; (c) Sintoma da ferrugem asiática na ausência da rDrr230a (3 µg/µL) – 80% de severidade; (d) Micrografia representativa de uredosporos germinados de *P. pachyrhizi* e células epidérmicas danificadas na presença de 3 µg/µL de rDrr230a. E e T: uredosporo e tubo germinativo de *P. pachyrhizi*, respectivamente.

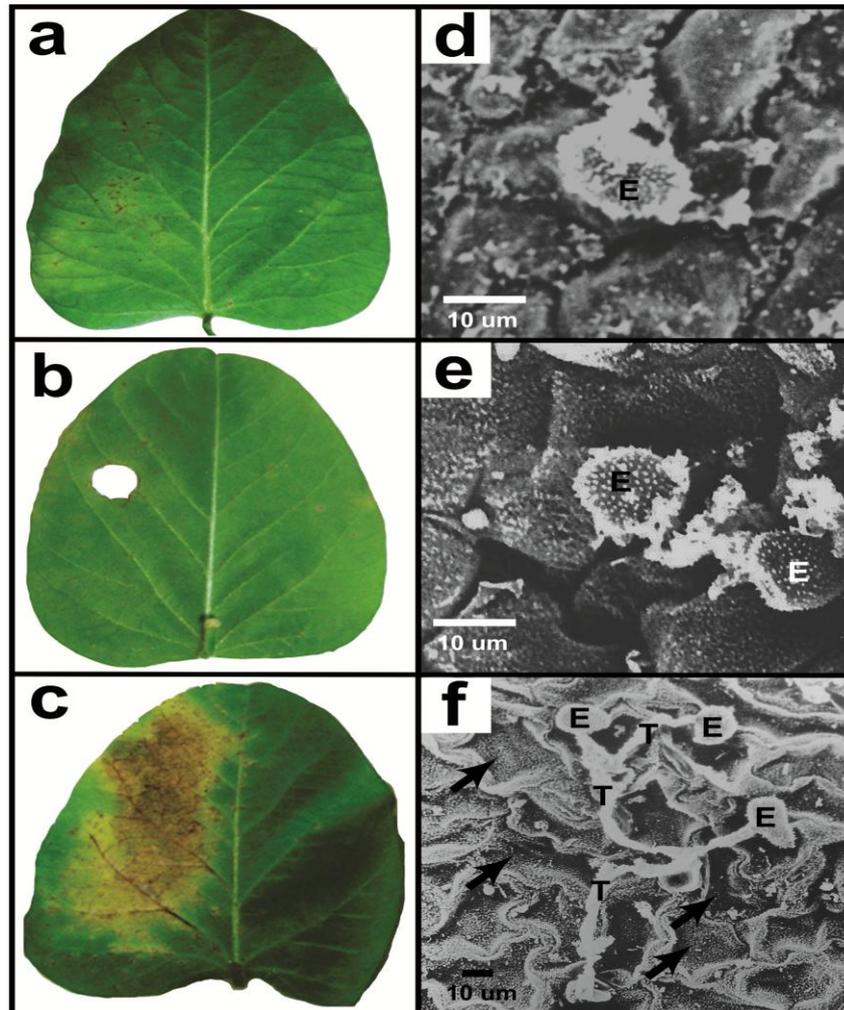


Figura 21: Análise da atividade da rCD1 sobre folhas de soja infectadas com *P. pachyrhizi* (a) Ausência de sintoma da ferrugem asiática na presença da rCD1tN (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) – 0% de severidade; (b) Ausência de sintoma da ferrugem asiática na presença da rCD1tC (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (c) Sintoma da ferrugem asiática na ausência da rCD1 (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) – 80% de severidade (d) e (e) Micrografias representativas de uredosporos não germinados de *P. pachyrhizi* e células epidérmicas intactas na presença de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de rCD1tN e rCD1tC, respectivamente; (f) Micrografia representativa de uredosporos germinados de *P. pachyrhizi* e células epidérmicas danificadas na presença Tris-HCl 20 mM pH 7,4. E e T: uredosporo e tubo germinativo de *P. pachyrhizi*, respectivamente.

5.7.3 - Análise da atividade da defensina recombinante rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre os fungos fitopatogênicos *Fusarium tucumaniae* e *Fusarium oxysporum*

Os ensaios realizados para avaliar a atividade antifúngica das formas recombinantes rCD1tN e rCD1tC sobre o fungo fitopatogênico *Fusarium tucumaniae* revelaram que a proteína recombinante rCD1tC foi responsável por 28% da inibição do crescimento fúngico quando testada na concentração de 52 μ M, sendo significativo quando comparado ao controle($p < 0,05$) (Figura 22). Na mesma concentração (52 μ M), CD1tN não foi capaz de inibir o crescimento micelial de *F. tucumaniae* (Figura 23).

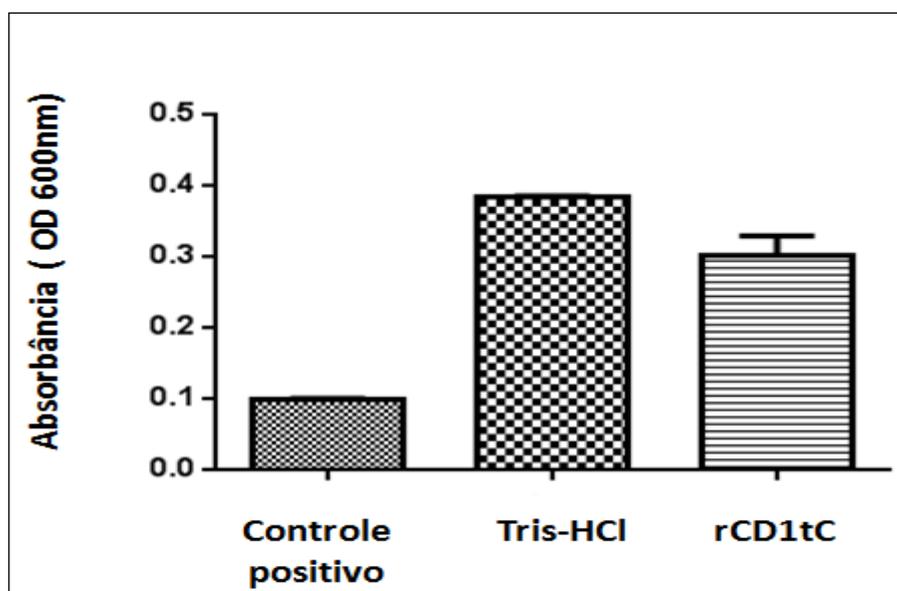


Figura 22: Avaliação da atividade antifúngica da defensina recombinante rCD1tC contra *Fusarium tucumaniae*. Anfotericina B (20 μ g/ml) e tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

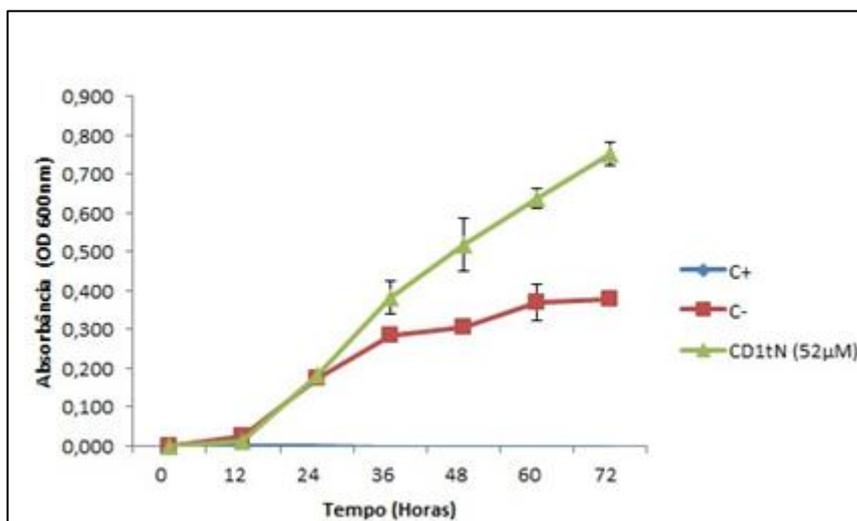


Figura 23: Avaliação da atividade antifúngica da defensina recombinante rCD1tN contra o fungo fitopatogênico *Fusarium tucumaniae*. A defensina recombinante foi testada na concentração de 52 µM. Anfotericina B (20 µg/ml) e tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

Em relação aos ensaios realizados com o fungo fitopatogênico *F. oxysporum*, os resultados obtidos mostraram que não houve inibição do crescimento quando as duas formas recombinantes (rCD1tC e rCD1tN) foram testadas na concentração de 52 µM (Figura 24a e 24b).

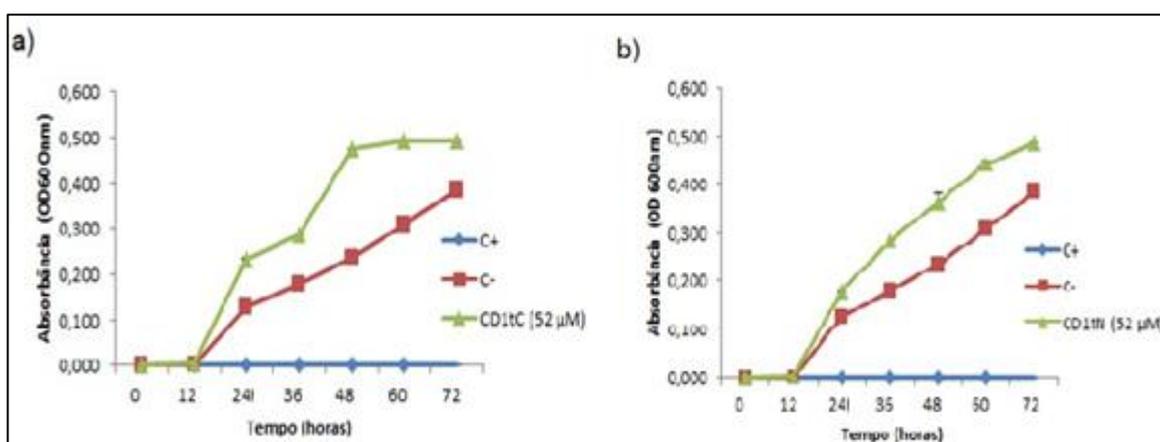


Figura 24: Avaliação da atividade antifúngica das defensinas recombinantes rCD1tN e rCD1tC contra o fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum*. (a) Análise do crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* na presença da defensina rCD1tC (52 µM); (b) Análise do crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* na presença da defensina rCD1tN (52 µM). Anfotericina B (20 µg/ml) e tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

5.7.4 - Análise da atividade antifúngica da defensina rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) sobre o fungo patogênico *Candida albicans*

O terceiro ensaio realizado para avaliar a atividade da defensina rCD1 quanto à inibição do crescimento foi contra o fungo patogênico *C. albicans*. A mesma metodologia utilizada para os fungos fitopatogênicos foi usada para análise da atividade da defensina contra *C. albicans*. Foi possível verificar que não houve inibição do crescimento fúngico quando as defensinas recombinantes (rCD1tC e rCD1tN) foram testadas na concentração de 52 μM , conforme demonstrado na Figura 25a e 25b.

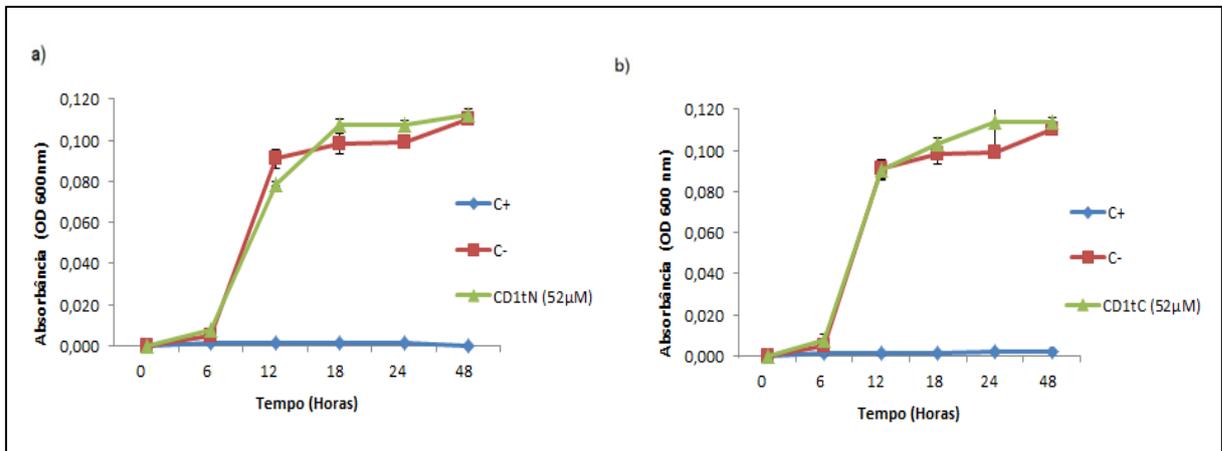


Figura 25: Avaliação da atividade antifúngica da defensina recombinante rCD1tC e rCD1tN contra o fungo patogênico *Candida albicans*. a) Análise do crescimento micelial na presença da defensina rCD1tC (52 μM); b) Análise do crescimento micelial na presença da defensina rCD1tN (52 μM). Anfotericina B (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente

5.7.5 - Análise da atividade antibacteriana da defensina rCD1 (rCD1tC) sobre as bactérias patogênicas *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*

Para analisar se a defensina recombinante rCD1 apresenta atividade antibacteriana, duas espécies de bactérias patogênicas ao homem e de interesse em saúde pública, foram selecionadas. Vale salientar que, neste ensaio, apenas uma das formas recombinantes da defensina foi testada (rCD1tC). Testes com a forma recombinante rCD1tN serão realizados nas mesmas condições que as descritas aqui. Neste ensaio, foram testados 40 μM de rCD1tC e todos os tratamentos foram realizados em triplicata, usando como controle positivo cloranfenicol (30 $\mu\text{g/ml}$ e tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 como controle negativo.

Nas Figuras 26 e 27 são mostradas as curvas de crescimento bacteriano, nas quais é possível verificar que não houve inibição do crescimento quando comparado ao controle negativo.

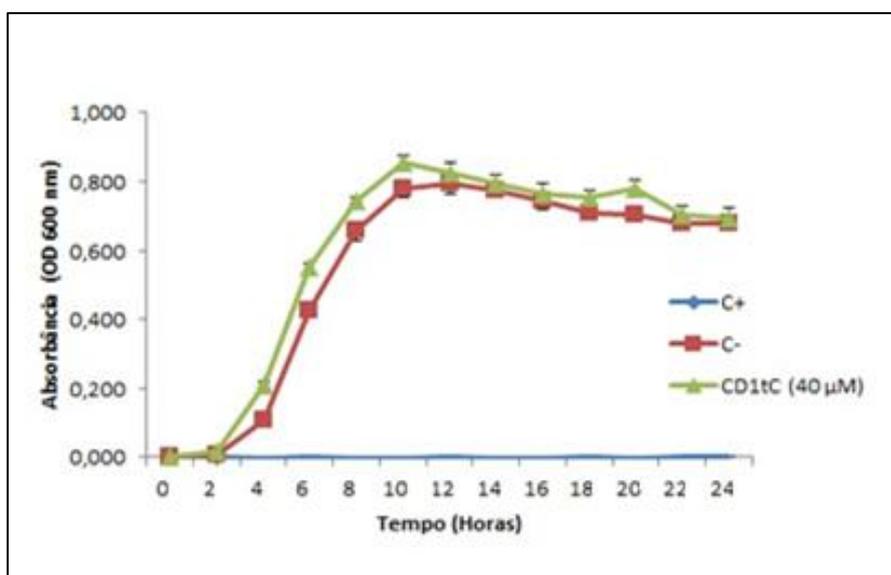


Figura 26: Avaliação da atividade antibacteriana da defensina recombinante rCD1tC contra a bactéria patogênica *Klebsiella pneumoniae*. Análise do crescimento bacteriano na presença da defensina rCD1tC (40 μM); Cloranfenicol (30 $\mu\text{g/ml}$) e tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

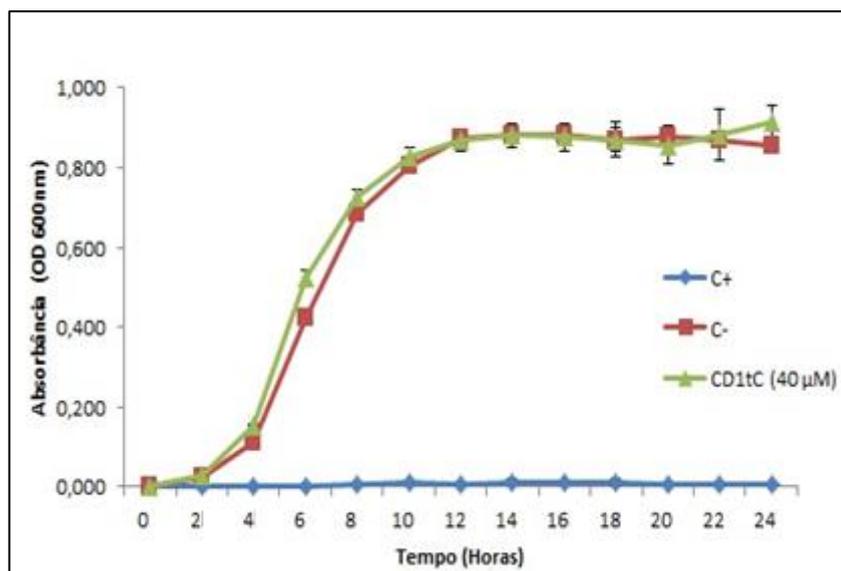


Figura 27: Avaliação da atividade antibacteriana da defesa recombinante rCD1tC contra a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*. Análise do crescimento bacteriano na presença da defesa rCD1tC (40 μM); Cloranfenicol (30 μg/mL) e tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

6 – DISCUSSÃO

A utilização de sistemas heterólogos para a produção de proteínas recombinantes é considerada uma excelente ferramenta na biologia molecular. Diversas áreas de aplicação têm experimentado avanços consideráveis graças à possibilidade de produzir grandes quantidades dessas proteínas pela crescente disponibilidade de organismos geneticamente manipulados (PALOMARES *et al.*, 2004).

Neste trabalho, foram demonstradas a expressão heteróloga de duas defensinas vegetais, nomeadas Drr230a e CD1, utilizando *P. pastoris* como sistema de expressão, bem como a purificação das proteínas recombinantes visando a utilização em bioensaios para determinação de suas atividades biológicas. Embora existam diversos sistemas disponíveis para a produção de defensinas vegetais, neste trabalho, *P. pastoris* foi escolhida como sistema de expressão por apresentar todas as características necessárias para o processamento adequado de uma proteína com as características apresentadas pelas defensinas. Como dito anteriormente, sistemas eucarióticos são mais eficientes na expressão de proteínas que necessitam realizar modificações pós-traducionais para se tornarem ativas, como por exemplo, a formação das pontes dissulfeto e glicosilação (DEMAIN;VAISHNAV, 2009).

A revisão da literatura relata diversas defensinas que foram expressas eficientemente utilizando *E. coli* como sistema de expressão (OLLI;KIRTI, 2006), (VIJAYAN *et al.*, 2008), (KOVALSKAYA;HAMMOND, 2009), (KANT *et al.*, 2009), (PICART *et al.*, 2012), (KOVALEVA *et al.*, 2011), (SAGEHASHI *et al.*, 2013) (SEO *et al.*, 2014), (SHENKAREV *et al.*, 2014), entretanto, a expressão em células procarióticas é quase sempre ineficiente, uma vez que as proteínas são produzidas como corpos de inclusão. Por não apresentar a capacidade de processamento pós-traducional, torna-se necessário a renaturação para que ela retorne às condições nativas e mantenha a sua atividade, tarefa essa extremamente difícil e muitas vezes não alcançada (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005) (DEMAIN;VAISHNAV, 2009).

Como exemplo, uma defensina isolada de feijão mungo (*Vigna radiata*), foi primeiramente expressa como proteína de fusão em *E. coli* (VrCRP) (CHEN *et al.*, 2002), todavia o nível de expressão alcançado não foi satisfatório. Posteriormente,

produção desta proteína em *P. pastoris*, (VrD1), resultou em maiores níveis de expressão (3 mg/L) e a atividade biológica foi similar à alcançada em *E. coli*. A defensina recombinante foi capaz de inibir o crescimento de fungos tais como *F. oxysporum*, *P.oryza*, *R. solani*, e *Trichophyton rubrum* e também o desenvolvimento larval de bruquídeos (*Callosobruchus chinensis*) (CHEN *et al.*, 2004).

Já no caso da defensina PDC1, isolada de milho, Kant e colaboradores (2009) demonstraram que ambos os sistemas eucariótico e procariótico foram eficientes para a produção da defensina. Entretanto, quando expressa na levedura *P. pastoris*, a proteína recombinante demonstrou ser mais ativa contra o fungo *F. graminearum* (IC₅₀ 7.5 µM). Foram necessários cerca de 4 vezes a quantidade de proteína utilizada para inibir o mesmo fungo quando a rPDC1 foi expressa em *E. coli* (IC₅₀ 30 µM) (KANT *et al.*, 2009).

No presente estudo, os resultados mostram que ambas as defensinas vegetais foram eficientemente expressas nas condições testadas. O gene da defensina Drr230a codifica para uma proteína de 6,52 kDa. Análises realizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (TRICINA-SDS-PAGE) do sobrenadante da expressão confirmaram a presença de uma proteína com a mesma massa molecular esperada para a defensina Drr230a. A proteína recombinante foi detectada e confirmada posteriormente por Western blot em todos os tempos analisados (24, 48, 72 e 96 h), provando, assim, que a proteína foi produzida após o processo de indução por metanol (Figura 7).

Diversas estratégias podem ser utilizadas para a purificação da proteína de interesse produzida por *P. pastoris*. Diversos trabalhos com defensinas vegetais mostraram a purificação por outros métodos cromatográficos. Neste trabalho, visando facilitar o processo de purificação, uma sequência que codifica para seis histidinas foi inserida no gene, para que pudesse ser utilizada a cromatografia de afinidade contendo níquel imobilizado (Hisrap FF Crude). Além do mais, tal estratégia possibilitaria a detecção da proteína recombinante por Western Blot utilizando anticorpos anti-histag, uma vez que não possuíamos anticorpos contra as defensinas.

Após detecção da expressão da proteína recombinante o sobrenadante foi submetido ao processo de purificação por cromatografia de afinidade. A análise através de eletroforese revelou a presença de uma banda de aproximadamente

6,52 kDa, correspondente a massa molecular esperada para a proteína recombinante rDrr230a (Figura 8a). Neste caso, a proteína foi visualizada tanto no extrato total de *P. pastoris*, o qual representa todas as proteínas secretadas, quanto no extrato purificado. A mesma proteína foi detectada por Western blot, comprovando assim, que, a proteína purificada corresponde a proteína recombinante rDrr230a (Figura 8b). De fato, *P. pastoris* secreta baixos níveis de proteínas endógenas. A baixa secreção dessas proteínas permite que as proteínas heterólogas secretadas constituam a maior parte da fração protéica do meio, facilitando assim a sua purificação (HIGGINS;CREGG, 1998) (CEREGHINO ;CREGG, 2000). O rendimento da expressão alcançado por rDrr230a (3,5 mg/ml) foi abaixo do alcançado para a defensina de ervilha (*Pisum sativum*) PsD1 clonadas no plasmídeo pPIC9 e também expressa em *P. pastoris*. A produtividade de rPsD1 foi de \approx 13.8 mg/L de cultura (ALMEIDA *et al.*, 2001). No entanto, resultados similares foram alcançados com a defensina VrD1, de feijão mungo em condições semelhantes de expressão. Uma média de 3 mg de rVrD1 purificada foi recuperada a partir de 1 L de meio de cultura (CHEN *et al.*, 2004).

Para a defensina de café CD1, optou-se pela expressão constitutiva utilizando o vetor pGAPZ α B ao invés do vetor pPICZ α A, utilizado na expressão da defensina de ervilha. Sendo o promotor constitutivo, não seria necessária a utilização de metanol para a indução da expressão da proteína em biofermentador. Embora seja possível, metanol é tóxico e inflamável, e, portanto inconveniente para a produção em larga escala (VOGL;GLIEDER, 2013).

Após expressão das proteínas CD1tN e CD1tC em fermentador uma proteína com massa molecular aproximada de 7 kDa foi observada por TRICINA- SDS-PAGE 14% em todos os tempos analisados (24, 48, 72 e 96 h) (Figura 11). As sequências preditas para as defensinas recombinantes CD1tN e CD1tC estimavam massas moleculares de 6,99 e 7,34 KDa, respectivamente.

Tendo em vista que a massa molecular esperada para a proteína recombinante correspondia ao visualizado em gel de poliacrilamida, o sobrenadante contendo a proteína de interesse foi submetida ao sistema de ultrafiltração tangencial *QuixStand Benchtop System- GE Healthcare* – 3 kDa, para concentração das proteínas presentes. Esta etapa teve por finalidade reduzir o volume proveniente da expressão e facilitar a posterior purificação das amostras. Desta forma, o volume

de expressão de 2 litros proveniente do biofermentador foram reduzidos para 150 ml, facilitando assim o volume a ser aplicado na coluna de purificação por cromatografia de afinidade (His Trap FF crude). Após esta etapa, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel (TRICINA-SDS-PAGE) para confirmar a presença da proteína, uma vez que durante o processo de ultrafiltração a proteína de interesse poderia ser perdida. Analisando as proteínas no gel, pode se observar a presença da defensina de café em meio as proteínas endógenas secretadas pela levedura *P. pastoris*, com a mesma massa molecular de 7 kDa anteriormente visualizada (Figura 12).

Neste estudo, expressão da defensina rCD1 alcançou níveis satisfatórios (8 mg/L para CD1tN e 24 mg/L para CD1Tc) quando comparado com a defensina Drr230a (3,5 mg/l). Poucos são os relatos de defensinas expressas utilizando biofermentadores. KRISTENSEN *et al.*, (1999) relataram a expressão eficiente de uma defensina de beterraba, denominada AX2 em biofermentador, assim como OGURO *et al.*, (2014) que reportaram a expressão de uma defensina de mostarda (AFP1). Entretanto os níveis de expressão alcançados não são mostrados. Almeida e colaboradores, utilizando outra abordagem metodológica em processos fermentativos obtiveram 63 mg da proteína secretada rPsd1 por litro de cultura (ALMEIDA *et al.*, 2003), valor bem acima do anteriormente alcançado ALMEIDA *et al.*, (2001).

Embora haja poucas proteínas secretadas endogenamente pela levedura *P. pastoris* (HIGGINS;CREGG, 1998;CEREGHINO ;CREGG, 2000), optou-se por fazer a purificação da proteína em dois passos cromatográficos, assim como foi relatado para outras defensinas vegetais (ALMEIDA *et al.*, 2001), (SONG *et al.*, 2005). Inicialmente, as proteínas foram submetidas a cromatografia por afinidade utilizando Níquel (His Trap FF Crude). Após esta etapa de purificação, as proteínas recombinantes CD1tN e CD1tC foram detectadas e confirmadas por Western blot. Uma única banda detectada com a massa molecular esperada de 7 KDa (Figura 13 e 14) confirma que a proteína purificada corresponde a proteína observada no extrato total analisado após expressão e filtração tangencial.

Posteriormente, a fração proveniente da cromatografia de afinidade foi submetida a segunda etapa de purificação por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna C18. Análise dos cromatogramas representados nas

Figuras 15a e 15b, mostram a presença de um pico majoritário em 38% de acetonitrila para a rCD1tN e 40% de acetonitrila para a forma recombinante rCD1tC.

Para análise das massas moleculares e obtenção das sequências parciais, as proteínas recombinantes purificadas foram dessalinizadas e analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. O espectro de massa de rCD1tC (Figura 16a) mostrou um pico majoritário com massa molecular de 7600 Da. Um pico similar e de mesma intensidade foi detectado no espectro de rCD1tN (Figura 16b), com massa molecular de 7081 Da. Outros picos foram observados nos espectros mostrados, no entanto estes não foram analisados por apresentarem sinal de menor intensidade. Ambas as formas recombinantes apresentaram massas moleculares maiores que a massa molecular predita (rCD1tC- 7344.20/ rCD1tN - 6992.84).

Análise da sequência primária das proteínas recombinantes obtidas (Figura 17a e 17b) mostra que houve a substituição de alguns resíduos de aminoácidos. No entanto, essa substituição não foi responsável pelo aumento da massa molecular, uma vez que foram substituídos por aminoácidos com massas moleculares próximas. Esses aminoácidos são considerados isobáricos, ou seja, aminoácidos que possuem a mesma, ou massas molares muito próximas. Isto sugere que o aumento observado na massa molecular predita pode ser devido a modificações pós-traducionais ocorridas durante o processamento e secreção da proteína. As modificações pós traducionais são processos que podem alterar o tamanho, a composição e a função das proteínas, além da localização dentro da célula (JENSEN, 2004; SEO;LEE, 2004; LARSEN *et al.*, 2006). De fato, modificações pós-traducionais e processamento de proteínas deve levar a um aumento ou diminuição da massa em relação àquela predita a partir da sequência nucleotídica. Por exemplo, a fosforilação de um resíduo de serina leva a um aumento da massa em 80 Da, aumentando, assim, a massa nominal deste resíduo de 87 para 167 Da (JENSEN, 2004). É provável que o aumento da massa observado na forma recombinante rCD1tC seja devido a alguma modificação pós-traducional que possa ter ocorrido durante a secreção da proteína.

Conforme descrito anteriormente, existem vários relatos na literatura de defensinas de plantas sendo expressas eficientemente em levedura (KRISTENSEN, *et al.*, 1999) (ALMEIDA *et al.*, 2001) (WISNIEWSKI *et al.*, 2003) (CHEN *et al.*, 2004) (SONG *et al.*, 2005) (PORTIELES *et al.*, 2010) (WANG *et al.*, 2011) (LAY *et al.*, 2012)

(OGURO *et al.*, 2014), (Tabela 2). Contudo, não há até o presente momento dados mostrando a expressão de uma defensina de café em sistema heterólogo. Desta maneira, os resultados descritos neste trabalho atestam a eficiência de *P. pastoris* como sistema heterólogo para a produção das defensinas recombinantes rDrr230a e rCD1. Os resultados alcançados permitiram que estudos posteriores das atividades biológicas das proteínas fossem realizados.

As doenças fúngicas são um dos maiores fatores que afetam a produtividade nas culturas agrícolas. Métodos de controle básicos, como rotação de cultura, controle biológico, escolha de cultivar mais adequada e controle químico, têm auxiliado os agricultores a superar muitas doenças de plantas comuns. No entanto, as perdas provocadas por fungos fitopatogênicos ainda ocorrem em muitos campos de produção.

Diversas medidas de controle da ferrugem asiática têm sido utilizadas visando minimizar as perdas ocasionadas na produtividade da soja. Desde o seu surgimento, em 2001, o controle vem sendo realizado por medidas de manejo conjuntas. Entretanto, o uso de fungicidas químicos ainda é o principal método de controle. O uso de fungicidas só é eficiente quando aplicado logo após o surgimento dos sintomas iniciais da doença na lavoura. A aplicação inadequada do produto, bem como o seu uso indevido, além de elevar o custo de produção podem levar a um controle deficiente da doença (YORINORI, *et al.*, 2005). Após estabelecimento da ferrugem, os fungicidas apresentam eficácia reduzida (FORCELINI, 2003). Estudos com fungicidas no campo realizados por ANDRADE; ANDRADE (2002) comprovaram que a aplicação do fungicida após sete dias de estabelecimento da doença foi suficiente para o aumento da desfolha em 82%, quando comparado ao que recebeu o produto durante o aparecimento da doença. Quando a pulverização do fungicida ocorreu 14 dias após o aparecimento dos sintomas, a desfolha aumentou em 155%, conforme relatado por AZEVEDO *et al.* (2004).

A utilização de cultivares resistentes seria o método mais viável no controle da doença. Embora existam algumas cultivares com resistência natural à ferrugem asiática, a estabilidade dessa resistência é preocupante devido à alta diversidade genética que o fungo possui, dificultando o desenvolvimento de cultivares que sejam efetivas por longo tempo. Atualmente, não existem cultivares com resistência completa ao patógeno, sendo a obtenção de cultivares de soja resistente à ferrugem

asiática um grande desafio para os pesquisadores. Ainda, vale salientar que não há relatos de cultivares disponíveis comercialmente utilizando peptídeos antimicrobianos como genes de resistência. Este fato reforça a necessidade da busca por novas moléculas com potencial uso no controle da ferrugem asiática.

Poucos são os relatos na literatura demonstrando compostos ou moléculas que apresentem atividade contra a ferrugem asiática. Em um recente estudo realizado por nosso grupo de pesquisa na Embrapa Recursos Genéticos e em parceria com a Embrapa Soja, uma proteína inibidora de xilanase similar a quitinase de café, denominada Cac1XIP (*Coffea arabica Chitinase-like Xylanase Inhibitor Protein*) foi identificada com potencial atividade no desenvolvimento do fungo causador da ferrugem asiática. Após clonagem e expressão heteróloga em *P. pastoris*, Cac1XIP mostrou-se capaz de inibir em 45% a germinação dos uredosporos de *P. pachyrhizi* quando os ensaios foram realizados na presença de 1,5 µg/µl da proteína (VASCONCELOS *et al.*, 2011).

SUBRAMANYAM K *et al.* (2012) demonstraram que plantas de soja cv. Pusa 16 geneticamente modificadas expressando uma osmotina de tabaco (Tbosm) conferiram resistência à ferrugem asiática da soja. Osmotinas (*Osmotin Like* proteíns ou OLPs), assim como as defensinas, são membros da família de proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas), que são produzidas em plantas sob diferentes estresses bióticos e abióticos (WEBER *et al.*, 2014). Neste estudo, folhas infectadas foram analisadas de acordo com o grau de infecção provocado pelo fungo, o qual foi dividido em quatro classes entre 0 e 4; 0: folhas saudáveis, sem infecção fúngica; 1: < 25% da superfície da folha com sintomas da doença; 2: < 50% da superfície da folha com sintomas da doença; 3: < 75% da superfície da folha com sintomas da doença; 4: ≥75% da superfície da folha com sintomas da doença. De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que as folhas das plantas de soja T1 expressando o transgene apresentaram níveis insignificantes da doença, com grau de infecção 1, enquanto as folhas de soja não transformada (NT) apresentaram sintomas severos da doença, classificado como grau 4.

No presente trabalho, as defensinas recombinantes rDrr230a e rCD1, ambas expressas em *P. pastoris* foram avaliadas quanto ao seu potencial de inibir os uredosporos de *P. pachyrhizi in vitro*, assim como de interferir na severidade da doença em ensaios *in planta*. Os resultados obtidos mostraram que rDrr230a inibiu

100% a germinação de esporos de *P. pachyrhizi* quando testada na concentração de 3 µg/µl (Figura 18). Com relação à defensina rCD1, a inibição da germinação dos uredosporos também foi observada, no entanto quando comparado a defensina recombinante rDrr230a, o fungo mostrou-se menos sensível à presença das formas recombinantes rCD1tN e rCD1tC, havendo inibição em 18% e 26%, respectivamente, não se observando diferença significativa entre as duas formas recombinantes testadas (Figura 19).

Em concentrações semelhantes, as defensinas recombinantes rDrr230a e rCD1 (rCD1tN e rCD1tC) foram capazes de reduzir drasticamente a severidade da doença *in planta*. Constatou-se que folhas não apresentaram nenhum sintoma da doença (0% severidade) quando tratadas com as defensinas recombinantes rDrr230a e rCD1. Além disso, foi observado por meio da MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) que folhas infectadas na ausência da rDrr230 e rCD1 apresentavam suas células epidérmicas alteradas (Figuras 20d, 21f). Fato este não observado nas folhas não tratadas com as proteínas recombinantes (Figura 20b, 21d, 21e). Estes resultados corroboram com aqueles anteriormente observado (Figura 18 e 19), mostrando que as defensinas vegetais rDrr230a e rCD1 afetam diretamente a germinação dos esporos de *P. pachyrhizi* e conseqüentemente no grau de severidade da doença.

A defensina Drr230a, alvo deste estudo, foi primeiramente estudada em plantas transgênicas por WANG *et al.* (1999), os quais constataram que plantas de canola (*Brassica napus*) expressando constitutivamente o gene que codifica para a Drr230a apresentavam resistência à doença canela preta, causada pelo fungo *Leptosphaeria maculans*. Posteriormente, expressa em canola, a defensina foi capaz de reduzir consideravelmente a mortalidade das plantas infectadas com o fungo biotrófico *Rhizoctonia solani* e diminuir as lesões das folhas inoculadas com o fungo *Sclerotinia sclerotium*, levando ao retardo do desenvolvimento da doença (WANG;FRISTENSKY, 2001)

LAI *et al.* (2002), provaram que a defensina Drr230a está realmente envolvida nos mecanismos de defesa vegetal, uma vez que foi detectada a presença do seu transcrito em diversas partes da planta, como folhas jovens e maduras, caule, raiz, radícula, flores e vagens. Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) expressando o transgene Drr230a foram analisadas quanto a sua capacidade de inibir o

crescimento de diversos fungos fitopatogênicos. Quando comparadas com plantas de tabaco não transformadas, extrato de plantas transgênicas de tabaco expressando Drr230a na concentração de 25 µg/µL reduziu o crescimento dos fungos *F.oxysporum* (≈ 60%), *Ascochyta pinodes* (≈ 56%), *Trichoderma reesei* (≈71%), *Fusarium solani* (≈ 51%), dentre outros.

A fim de analisar a atividade antifúngica da Drr230a contra doenças de importância agrônômica para o Brasil, nosso grupo de pesquisa na Embrapa Recursos Genéticos Biotecnologia também testou a defensina rDrr230a, expressa em *P. pastoris*, quanto a sua capacidade de inibir o crescimento dos fungos *Fusarium tucumaniae*, agente causal da síndrome da morte súbita em soja e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, responsável pela ramulose no algodoeiro. Nesse trabalho foi avaliada o seu potencial na inibição da germinação dos esporos, tendo sido observado que a defensina recombinante rDrr230a foi capaz de inibir a germinação dos esporos e o crescimento dos respectivos fungos. A IC₅₀ calculado contra *F. tucumaniae* foi de 7,67 µM e para *C. gossypii* var. *cephalosporioides* a IC₅₀ correspondeu a 0,84 µM. Já no ensaio de inibição da germinação de esporos, rDrr230a foi testada na concentração de 25 ng/µl e observou-se que após 12 horas de incubação a proteína recombinante foi capaz de inibir 100% a germinação dos esporos de ambos os fungos testados (LACERDA *et al.* 2015). É importante salientar que, até então, não havia sido reportada nenhuma defensina de planta ativa contra os fungos *F. tucumaniae* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, fungos de grande relevância para as culturas de soja e algodão, respectivamente. Não havendo controle químico satisfatório, nem tão pouco resistência natural contra esses fitopatógenos, estes resultados apontam para rDrr230a como uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de plantas transgênicas de soja e algodão, na perspectiva de se tornarem resistentes contra estes impactantes fungos fitopatogênicos.

No presente trabalho, foi claramente demonstrado que ambas as defensinas recombinantes reduziram em 100% a severidade da ferrugem asiática da soja em ensaios *in planta*. Pela primeira vez na literatura é reportado a atividade de defensinas vegetais ativas e eficazes no controle de um fungo biotrófico obrigatório como *P. pachyrhizi*. Embora tenha sido necessária uma concentração relativamente alta das defensinas (3 µg/µl), estas foram capazes de combater o surgimento dos

sintomas da ferrugem asiática da soja. Sendo esta doença controlada basicamente pelo uso de agrotóxicos químicos, a utilização destas defensinas, seja na produção de fungicidas ou no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, constitui uma excelente alternativa biotecnológica no controle de fitopatógenos, levando, assim, a redução do uso destes compostos químicos que afetam o meio ambiente, são prejudiciais à saúde e elevam os custos de produção nas lavouras.

As duas formas recombinantes (rCD1tN e rCD1tC) foram testadas contra fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium* e contra o fungo patogênico ao homem *C.albicans*. Apenas a forma recombinante rCD1tC foi capaz de inibir o crescimento do fungo *F. tucumaniae*. rCD1tC inibiu o crescimento do fungo em 28 % quando testada na concentração de 52 µM (Figura 22). Com relação ao fungo *F. oxysporum*, não foi observado inibição do crescimento fúngico para nenhuma das formas recombinantes quando testadas na mesma concentração de proteína (52 µM) (Figura 24).

A mesma concentração de proteína (52 µM) utilizada nos ensaios contra os fungos fitopatogênicos *F. tucumaniae* e *F. oxysporum* foi testada para o fungo *C. albicans*. No entanto nenhuma inibição do crescimento fúngico foi observada quando comparada com o controle positivo (Figura 22).

Os ensaios contra os fungos *F. tucumaniae*, *F. oxysporum*, *P. pachyrhizi* e *C. albicans* foram realizados com as duas formas recombinantes rCD1tC e rCD1tN. Como dito anteriormente, foi adotada a estratégia de expressar a defensina rCD1 nas duas formas recombinantes, baseada em dados da literatura que atestam que o N-Terminal e C-terminal dessas proteínas estão relacionados com sua atividade (KRISTENSEN *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2001; SPELBRINK *et al.*, 2004). Devido a este fato, a presença de seis resíduos de histidina (His-Tag) em uma dessas extremidades poderia alterar a atividade biológica da defensina rCD1.

No ensaio realizado com o fungo *P. pachyrhizi*, as duas formas recombinantes foram ativas na inibição da germinação dos uresdosporos do fungo e na capacidade de redução da severidade da ferrugem asiática da soja. A presença de seis resíduos de histidina (His-Tag) nas regiões carboxi e amino terminal não interferiu na atividade biológica da defensina rCD1. Não foi observada diferença significativa entre as duas formas recombinantes (rCD1tN e rCD1tC). Tal fato

provavelmente é devido ao mecanismo de ação diferenciado dessa defensina contra este fitopatógeno.

Embora o mecanismo de ação não tenha sido alvo deste estudo, sabe-se que essas moléculas apresentam mecanismos de ação e alvos específicos para cada patógeno (THEVISSSEN *et al.*, 1997; THEVISSSEN *et al.*, 2000; THEVISSSEN *et al.*, 2003). Dessa forma, há a hipótese de que o modo de ação específico contra este fungo não esteja relacionado as regiões carboxi e amino terminal da proteína.

rCD1tC foi capaz de inibir em 28% o crescimento fúngico de *F. tucumanie*. Do mesmo modo que a atividade da defensina sobre *P. pachyrhizi* parece não estar relacionada ao C-terminal da proteína, o mesmo pode ser atribuído para *F. tucumaniae*. A presença da His-Tag no C-terminal parece não ter interferido na atividade da defensina contra este patógeno. Dados obtidos por KANT *et al.* (2009) em bioensaios contra *Fusarium graminearum*, comprovaram que a presença ou ausência da His-tag nas extremidade C-terminal influencia na atividade da proteína. Neste estudo, a defensina recombinante PDC1 de milho expressa sem a sequência His-tag no C-terminal da proteína foi significativamente mais eficaz na inibição do crescimento de *F. graminearum*, em comparação com a rPDC1 com a sequência His-tag. Tal fato confirma a importância dessa região para a atividade da proteína, comprovando que essa molécula é sensível a modificações covalentes no C-terminal.

Outro estudo, reportado por SPELBRINK *et al.*, (2004) também relata a importância da extremidade C terminal com a atividade das defensinas. A caracterização da atividade antifúngica *in vitro* de uma quimera contendo diferentes porções de duas defensinas vegetais, MsDef1 e MtDef2, revelou que os principais determinantes da atividade antifúngica residia na região carboxi terminal (aminoácidos 31-45) da defensina MsDef1.

Com relação a defensina rCD1, a análise das massas molecular por Maldi-TOF das proteínas rCD1tC e rCD1tN revelou que ambas as formas recombinantes apresentaram massas moleculares maiores do que a esperada (Figura 16). Além disso, o sequenciamento do N-terminal mostrou que a sequência primária das proteínas foi diferente daquela que era predita (Figura 17). Foi observado que ambas as formas recombinantes apresentaram a adição de um resíduo de aminoácido (Glicina- Gly1) no N-terminal da proteína e a substituição de um resíduo de glicina por um resíduo de Alanina (Alanina – Ala2). Além disso, quatro resíduos

de aminoácidos foram substituídos (Lys8, Pro9, Ser10, Lys11) na região aminoterminal de rCD1tC (Figura 17). Os quatro aminoácidos foram substituídos respectivamente por treonina, glutamina, lisina e prolina. A adição do resíduo de glicina na região N-terminal de ambas as formas recombinantes pode ter levado à perda da atividade da defensina rCD1 contra os fungos *F. oxysporum* e *C. albicans*.

Levando em consideração que houve a substituição de quatro resíduos de aminoácidos na região N-terminal da forma recombinante rCD1tC, e, que dois resíduos eram carregados positivamente (Lisina-K), a perda desses dois resíduos pode ter levado a uma alteração na carga total da proteína e,consequentemente, interferido negativamente na sua atividade biológica. Sendo as defensinas vegetais de caráter catiônico e carregadas positivamente, sua interação com o patógeno é dependente das cargas positivas que interagem especificamente com as cargas negativas do patógeno.

Diferentemente do relatado para a defensina MsDef1, alguns autores mostram a importância do N-terminal na atividade da proteína. A defensina AX2, isolada de folhas de beterraba, inibiu o crescimento do fungo *Cercospora beticola*. Entretanto, a atividade biológica da AX2 recombinante, expressa em *P. pastoris*, foi menor quando comparada com a defensina original. Os autores atribuíram esta diferença a adição de um aminoácido na região N-terminal, aminoácido este adicionado como estratégia de clonagem. O resíduo de arginina no amino-terminal introduziu uma carga positiva adicional na proteína, interferindo negativamente na potencialidade antifúngica, possivelmente por enfraquecer as interações iônicas entre a proteína e o receptor específico no fungo (KRISTENSEN *et al.*, 1999).

ALMEIDA *et al.* (2001) demonstraram que a presença de um tetrapeptídeo no N-terminal (Glu-Ala-Glu-Ala) da defensina rPsD1 expressa em *P. pastoris* levou a uma diminuição do potencial antifúngico da proteína, reduzindo em 5 vezes a atividade para *F. tucumaniae* e *A. niger* quando comparada à proteína PsD1 nativa. No entanto, a atividade para *N. crassa* não foi afetada, o que sugere distinto mecanismo de ação desta defensina para os respectivos fungos citados.

Embora a atividade das defensinas vegetais seja mais pronunciada contra fungos, algumas bactérias, especialmente as Gram-positivas são sensíveis à ação destas defensinas. Neste sentido, a atividade antibacteriana da defensina de café foi avaliada contra duas bactérias patogênicas, por estarem relacionadas à infecção

hospitalar, sendo de grande relevância na saúde. Análise da curva de crescimento (Figura 26 e Figura 27) revelou que não houve inibição do crescimento bacteriano de *S. aureus* e *K. pneumoniae* quando rCD1Tc foi testada na concentração de 40 µM.

Poucos são os relatos de defensinas vegetais que apresentam atividade antifúngica e antibacteriana (CARVALHO;GOMES, 2009 e 2011), tal fato pode estar atribuído às diferenças estruturais nas membranas desses microorganismos, e conseqüentemente, alvos e mecanismos de ação diferentes dos relatados para as defensinas antifúngicas. Ainda é preciso realizar ensaios com a forma recombinante rCD1tN para assegurar que a defensina possui apenas atividade antifúngica. No entanto, os resultados encontrados até agora corroboram com os dados encontrados na literatura, os quais reportam que a maioria dessas defensinas é ativa contra fungos.

Sendo assim, os dados relatados neste trabalho e na literatura corroboram conjuntamente para provar que modificações covalentes na região amino e carboxi-terminal das defensinas vegetais podem levar a alterações na sua atividade biológica.

7 - CONCLUSÃO

O sucesso da expressão das defensinas rDrr230a e rCD1 usando *Pichia pastoris*, bem como a sua purificação e atividade antimicrobiana contra fungos fitopatogênicos impactantes para a agricultura foram reportados neste trabalho. As duas defensinas recombinantes testadas foram capazes de inibir a germinação dos uredosporos do fungo *P. pachyrhizi*, além de reduzir substancialmente a severidade da ferrugem asiática da soja em ensaios *in planta*. Adicionalmente, rCD1 inibiu o crescimento fúngico de *F. tucumaniae*, agente causal da síndrome da morte súbita de soja.

Conjuntamente, estes resultados revelam o potencial uso das defensinas rDrr230a e rCD1 como candidatas ao desenvolvimento biotecnológico de novas formulações para o controle de fungos fitopatogênicos de importância agronômica.

8 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. S., et al. cDNA cloning and heterologous expression of functional cysteine-rich antifungal protein Psd1 in the yeast *Pichia pastoris*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 395, n. 2, p. 199-207, 2001.

ANDRADE, P.; ANDRADE, D. **Ferrugem Asiática: uma ameaça à sojicultura brasileira**. Circular técnica nº11 - Embrapa Agropecuária Oeste, p. 11, 2002.

AZEVEDO, L. A. S., et al. **Programa Syntinela: Monitoramento da Dispersão de Phakopsora pachyrhizi e alerta contra a ferrugem asiática da soja**. Emopi Gráfica e Editora: Campinas: p. 24, 2004.

BALANDIN, M., et al. A protective role for the embryo surrounding region of the maize endosperm, as evidenced by the characterisation of ZmESR-6, a defensin gene specifically expressed in this region. **Plant Molecular Biology** v. 58, n. 2, p. 269-282, 2005.

BERLEC, A.; STRUKELJ, B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 40, n. 3-4, p. 257-274, 2013.

BRASIL. **Café no Brasil** Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais> >. Acesso em:
02/04/2015.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.

CARVALHO, A. O., *et al.*, Cloning and characterization of a cDNA encoding a cowpea seed defensin and analysis of its expression. **Protein Peptide Letters**, v. 13, n. 10, p. 1029-1036, 2006.

CARVALHO, A. O.; GOMES, V. Plant defensins – prospects for the biological functions and biotechnological properties. **Peptides**, v. 30, n. 5, p. 1007-1020, 2009.

CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Plant defensins and defensin-like peptides – biological activities and biotechnological applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 38, p. 4270-4293, 2011.

CELIK, E.; CALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1108-1118, 2012.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Fems Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.

CHEN, J. J., et al. Cloning and functional expression of a mungbean defensin VrD1 in *Pichia pastoris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2256-2261, 2004.

CHEN, K. C., et al. A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7258-7263, 2002.

CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1102-1107, 2012.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast**. 3.ed.; Clinical and laboratory Standards Institute: Wayne, PA, v. 28, 2008.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 9.ed.; Clinical and laboratory Standards Institute: Wayne, PA, v. 32, 2012.

CÔRREA, L., Impacto da prevenção das infecções relacionadas à assistência a saúde: segurança e redução de custos. v. 6, p 194-196, 2008.

CREGG, J., et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, p. 29, 2000.

DAMASCENO, L. M.; HUANG, C. J.; BATT, C. A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 31-39, 2012.

DE ALMEIDA, J. R.; DE MORAES, L. M.; TORRES, F. A. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 22, n. 9, p. 725-737, 2005.

DE BONDT, A., et al. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) for increased fungal resistance: in vitro antifungal activity in protein extracts of transgenic apple expressing Rs-AFP2 or Ace-AMP1. **Acta Horticulturae**, v. 484, p. 5, 1999.

DE CONINCK, B.; CAMMUE, B.; THEVISSSEN, K. Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. **Fungal biology reviews**, v. 26, p. 11, 2013.

DE SOUZA CÂNDIDO, E. et al. The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. **Peptides**, v. 55, p. 65–78, 2014.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297-306, 2009.

DENOEUDE, F., et al. The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. **Science**, v. 345, n. 6201, p. 1181-1184, 2014.

EDMAN, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 4, p. 10, 1950.

FICKERS, P. *Pichia pastoris*: a workhorse for recombinant protein production. **Current Research in Microbiology and Biotechnology**, v. 2, p. 9, 2014.

FORCELINI, C. A. A. Ferrugem pode ser manejada. **Atualidades agrícolas**, v. 3, p. 8-11, 2003.

FRANCO, O. L., et al. Identification of a cowpea gamma-thionin with bactericidal activity. **The FEBS Journal**, v. 273, n. 15, p. 3489-3497, 2006.

GAMES P.D, et al. Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Peptides**, v. 29, p. 2090-2100, 2008.

GAO, A. G., et al. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 12, p. 1307-1310, 2000.

GHAG, S. B.; SHEKHAWAT, U. K.; GANAPATHI, T. R. Petunia floral defensins with unique prodomains as novel candidates for development of fusarium wilt resistance in transgenic banana plants. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e39557, 2012.

GODOY, C. V.; KOGA, L. J.; CANTERI, M. G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 63-68, 2006.

GUZMAN-RODRIGUEZ, J. J., et al. Antibacterial activity of defensin PaDef from avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*) expressed in endothelial cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, p. 986273, 2013.

HACKER, D. L.; DE JESUS, M.; WURM, F. M. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - Where do we go from here? **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 1023-1027, 2009.

HAYES, B. M., et al. Identification and mechanism of action of the plant defensin NaD1 as a new member of the antifungal drug arsenal against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3667-3675, 2013.

HEGEDUS, N.; MARX, F. Antifungal proteins: More than antimicrobials? **Fungal biology reviews**, v. 26, p. 13, 2013.

HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. Introduction to *Pichia pastoris*. **Methods in Molecular Biology**, v. 103, p. 1-15, 1998.

JANSSEN, B. J., et al. Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. **Biochemistry**, v. 42, n. 27, p. 8214-8222, 2003.

JENSEN, O. N. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 1, p. 33-41, 2004.

JHA, S.; CHATTOO, B. B. Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. **Transgenic Research**, v. 19, n. 3, p. 373-384, 2010.

JHA, S., et al. Expression of Dm-AMP1 in rice confers resistance to *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani*. **Transgenic Research**, v. 18, n. 1, p. 59-69, 2009.

KANT, P.; LIU, W. Z.; PAULS, K. P. PDC1, a corn defensin peptide expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* inhibits growth of *Fusarium graminearum*. **Peptides**, v. 30, n. 9, p. 1593-1599, 2009.

KANZAKI, H., et al. Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. **TAG. Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, n. 6-7, p. 809-814, 2002.

KOBAYASHI, Y., et al. The cystine-stabilized alpha-helix – a common structural motif of ion-channel blocking neurotoxic peptides. **Biopolymers**, v. 31, n. 10, p. 1213-1220, 1991.

KOVALEVA, V., et al. Recombinant expression, affinity purification and functional characterization of Scots pine defensin 1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 1093-1101, 2011.

KOVALSKAYA, N.; HAMMOND, R. W. Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snak-in-1 and defensin recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 63, n. 1, p. 12-17, 2009.

KRISTENSEN, A. K., et al. Processing, disulfide pattern, and biological activity of a sugar beet defensin, AX2, expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 16, n. 3, p. 377-387, 1999.

KURTZMAN, C. P. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1435-1438, 2009.

KUSHMERICK, C., et al., Functional and structural features of gamma-zethionins, a new class of sodium channel blockers. **FEBS Letters**, v. 440, n. 3, p. 302-306. 1998.

LACERDA, A.F **Expressão heteróloga de defensina de ervilha (*Pisum sativum*) em *Pichia pastoris* e avaliação da atividade biológica contra fungos de importância agrônoma**, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brasil, 2009.

LACERDA, A., et al. Antifungal defensins and their role in plant defense. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 116, p. 10, 2014.

LACERDA, A., et al. The recombinant pea defensin Drr230a is active against impacting soybean and cotton pathogenic fungi from the genera *Fusarium*, *Colletotrichum* and *Phakopsora*. **3 Biotech**, 2015 (In press)

LAI, F. M., et al. Analysis of the DRR230 family of pea defensins: gene expression pattern and evidence of broad host-range antifungal activity. **Plant Science**, v. 163, n. 4, p. 2002.

LARSEN, M. R., et al. Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. **Biotechniques**, v. 40, n. 6, p. 790-798, 2006.

LAY, F., et al. Recombinant expression and purification of the tomato defensin TPP3 and its preliminary X-ray crystallographic analysis. **Acta Crystallographica Section F- Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 68, p. 3, 2012.

LAY, F. T., et al. The three-dimensional solution structure of NaD1, a new floral defensin from *Nicotiana glauca* and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP. **Journal of Molecular Biology**, v. 325, n. 1, p. 175-188, 2003.

LI, Z., et al. Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis*. **Functional & Integrative Genomics**, v. 11, n. 1, p. 63-70, 2011.

LINDER, S.; SCHLIWA, M.; KUBE-GRANDERATH, E. Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones. **Biotechniques**, v. 20, n. 6, p. 980-982, 1996.

LIU, L., et al. How to achieve high-level expression of microbial enzymes Strategies and perspectives. **Bioengineered**, v. 4, n. 4, p. 212-223, 2013.

LOBO, D. S., et al. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. **Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 987-996, 2007.

MACAULEY-PATRICK, S., et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249-270, 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V., CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12.ed.; ARTMED: São Paulo, v. 1, p. 1160, 2010.

MENDEZ, E., et al., Primary structure of omega-hordothionin, a member of a novel family of thionins from barley endosperm, and its inhibition of protein synthesis in eukaryotic and prokaryotic cell-free systems. **European Journal Biochemistry**, v. 239, n. 1. p. 67-73,1996.

MIROUZE, M., *et al.*, A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. **Plant Journal**, v. 47, n. 3. p. 329-342, 2006.

MURAD, A. M., *et al.* Novel findings of defensins and their utilization in construction of transgenic plants. **Transgenic Plant Journal**, v. 1, n. 1, p. 39-48, 2007.

NEVALAINEN, H.; PETERSON, R. Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

NG, T. B.; WONG, J. H.; FANG, E. F. Defensins and other biocidal proteins from bean seeds with medicinal activities. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 36, p. 5644-5654, 2011.

NTUI, V. O., *et al.* Stable integration and expression of wasabi defensin gene in "Egusi" melon (*Colocynthis citrullus* L.) confers resistance to *Fusarium wilt* and *Alternaria* leaf spot. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 9, p. 943-954, 2010.

OGURO, Y., *et al.* Antifungal activity of plant defensin AFP1 in *Brassica juncea* involves the recognition of the methyl residue in glucosylceramide of target pathogen *Candida albicans*. **Current Genetics**, v. 60, n. 2, p. 89-97, 2014.

OKUMURA, M.; SHIMAMOTO, S.; HIDAKA, Y. Chemical methods for producing disulfide bonds in peptides and proteins to study folding regulation. **Current Protocols in Protein Science**, v. 76, p. 28-7, 2014.

OLLI, S.; KIRTI, P. B. Cloning, characterization and antifungal activity of defensin Tfgd1 from *Trigonella foenum-graecum* L. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 278-283, 2006.

PADOVAN, L., *et al.* Techniques for plant defensin production. **Current Protein and Peptides Science**, v. 11, n. 3, p. 231-235, 2010.

PALOMARES, L. A.; S, E.-M.; T, R. O. **Production of Recombinant Proteins - Challenges and Solutions**, 2.ed.; Totowa, N.J.: Humana Press, United States, v. 267, 2004.

PARASHINA, E. V., et al. Genetic engineering of oilseed rape and tomato plants expressing a radish defensin gene. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 47, p. 6, 2000.

PELEGRINI, P. B., et al., Novel insights on the mechanism of action of alpha-amylase inhibitors from the plant defensin family. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, v. 73, n. 3. p. 719-729, 2008.

PARK, H. C., et al., Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin in Chinese cabbage. **Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 1. p. 59-69, 2002.

PHAFF, H. J.; KNAPP, E. P. The taxonomy of yeasts found in exudates of certain trees and other natural breeding sites of some species of *Drosophila*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 22, p. 117-130, 1956.

PICART, P., et al. Identification of defensin-encoding genes of *Picea glauca*: characterization of PgD5, a conserved spruce defensin with strong antifungal activity. **BMC Plant Biology**, v. 12, p. 180, 2012.

PORTIELES, R., et al. NmDef02, a novel antimicrobial gene isolated from *Nicotiana megalosiphon* confers high-level pathogen resistance under greenhouse and field conditions. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 6, p. 678-690, 2010.

RIGANO, M. M., et al. A novel synthetic peptide from a tomato defensin exhibits antibacterial activities against *Helicobacter pylori*. **Journal of Peptide Science**, v. 18, n. 12, p. 755-762, 2012.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.

ROGOZHIN, E. A., et al., Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 2. p. 131-137, 2011.

SAGARAM, U. S., et al. Structural and functional studies of a phosphatidic acid-binding antifungal plant defensin MtDef4: identification of an RGFRRR motif governing fungal cell entry. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82485, 2013.

SAGEHASHI Y, et al. Purification and cDNA cloning of a defensin in *Brassica juncea*, its functional expression in *Escherichia coli*, and assessment of its antifungal activity. **Journal of Pesticide Science**, v. 38, p. 6, 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SEO, H. H., et al. Overexpression of a defensin enhances resistance to a fruit-specific anthracnose fungus in pepper. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e97936, 2014.

SEO, J.; LEE, K. J. Post-translational modifications and their biological functions: Proteomic analysis and systematic approaches. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 35-44, 2004.

SHENKAREV, Z. O., et al. Heterologous expression and solution structure of defensin from lentil *Lens culinaris*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 451, n. 2, p. 252-257, 2014.

SONG, X., et al. cDNA cloning, functional expression and antifungal activities of a dimeric plant defensin SPE10 from *Pachyrrhizus erosus* seeds. **Plant Molecular Biology**, v. 57, n. 1, p. 13-20, 2005.

SORENSEN, H. P. Towards universal systems for recombinant gene expression. **Microbial Cell Factory**, v. 9, p. 27, 2010.

SPELBRINK, R. G., et al. Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. **Plant Physiology**, v. 135, n. 4, p. 2055-2067, 2004.

SPELLBERG, B., et al. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1279-1286, 2004.

STADLMAYR, G., et al. Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. **Journal of Biotechnology**, v. 150, n. 4, p. 519-529, 2010.

STOTZ, H. U.; THOMSON, J. G.; WANG, Y. Plant defensins: defense, development and application. **Plant Signal Behavior**, v. 4, n. 11, p. 1010-1012, 2009.

SUBRAMANYAM, K., et al. Overexpression of tobacco osmotin (Tbosm) in soybean conferred resistance to salinity stress and fungal infections. **Planta**, v. 236, n. 6, p. 1909-1925, 2012.

SWATHI ANURADHA, T., et al. Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 11, p. 1777-1786, 2008.

TERRAS, F. R., et al., Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 22, p. 15301-15309, 1992.

TERRAS, F. R., et al. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. **Plant Cell**, v. 7, n. 5, p. 573-588, 1995.

THEVISSSEN, K., et al. Specific, high affinity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* hyphae and microsomal. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 51, p. 32176-32181, 1997.

THEVISSSEN, K., et al., A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 17, p. 9531-9536, 2000.

THEVISSSEN, K., et al. Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1705-1712, 2003.

THEVISSSEN, K., et al. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 6, p. 3900-3905, 2004.

THEVISSSEN, K., et al. The plant defensin RsAFP2 induces cell wall stress, septin mislocalization and accumulation of ceramides in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 166-180, 2012.

VAN DER WEERDEN, N.; ANDERSON, M. Plant defensins: Common fold, multiple functions. **Fungal biology reviews**, v. 26, p. 10, 2013.

VAN DER WEERDEN, N. L.; HANCOCK, R. E.; ANDERSON, M. A. Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 48, p. 37513-37520, 2010.

VAN DER WEERDEN, N. L.; LAY, F. T.; ANDERSON, M. A. The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 21, p. 14445-14452, 2008.

VASCONCELOS, E. A., et al. A new chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) affects Soybean Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) spore germination. **BMC Biotechnology**, v. 11, n. 14, p. 8, 2011.

VIANA, A. A.; PELEGRINI, P. B.; GROSSI-DE-SA, M. F. Plant biofarming: novel insights for peptide expression in heterologous systems. **Biopolymers**, v. 98, n. 4, p. 416-427, 2012.

VIEIRA, L. G. E., et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 95-108, 2006.

VIJAYAN, S.; GURUPRASAD, L.; KIRTI, P. B. Prokaryotic expression of a constitutively expressed *Tephrosia villosa* defensin and its potent antifungal activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 6, p. 1023-1032, 2008.

VOGL, T.; GLIEDER, A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. **New Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 385-404, 2013.

VRIENS, K.; CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K. Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12280-12303, 2014.

WANG, B., et al., Maize defensin ZmDEF1 is involved in plant response to fungal phytopathogens. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 9, 2011.

WANG, Y., et al. Constitutive expression of pea defense gene DRR206 confers resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in transgenic canola (*Brassica napus*). **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 12, p. 410-418, 1999.

WANG, Y. P.; FRISTENSKY, B. Transgenic canola lines expressing pea defense gene DRR206 have resistance to aggressive blackleg isolates and to *Rhizoctonia solani*. **Molecular Breeding**, v. 8, n. 3, p. 263-271, 2001.

WATERHAM, H. R., et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. **Gene**, v. 186, n. 1, p. 37-44, 1997.

WEBER, R. L., et al. Expression of an osmotin-like protein from *Solanum nigrum* confers drought tolerance in transgenic soybean. **BMC Plant Biology**, v. 14, p. 343, 2014.

WILMES, M., et al. Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 8, p. 1350-1358, 2011.

WISNIEWSKI, M. E., et al. Characterization of a defensin in bark and fruit tissues of peach and antimicrobial activity of a recombinant defensin in the yeast, *Pichia pastoris*. **Physiologia Plantarum**, v. 119, n. 4, p. 563-572, 2003.

WONG, J.; NG, T., Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. **Peptides**, v. 26(7), p. 1120-1126, 2005.

YANG, Y. F.; LYU, P. C. The proteins of plant defensin family and their application beyond plant disease control. **Recent Patents on DNA and Gene Sequences**, v. 2, n. 3, p. 214-218, 2008.

YE, X. Y.; NG, T. B., Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-kDa protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, n. 2, p. 424-429, 2001.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 19, p. 7363-7368, 2004.

ZAINAL, Z., et al. Expression of the *Capsicum annum* (Chili) Defensin Gene in Transgenic Tomatoes Confers Enhanced Resistance to Fungal Pathogens. **American Journal of Plant Physiology**, v. 4, p. 9, 2009.

ZHU, S.; GAO, B.; TYTGAT, J. Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the CSalpha-beta superfamily. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 19-20, p. 2257-2269, 2005.

ZHU, Y. J.; AGBAYANI, R.; MOORE, P. H. Ectopic expression of *Dahlia merckii* defensin DmAMP1 improves papaya resistance to *Phytophthora palmivora* by reducing pathogen vigor. **Planta**, v. 226, n. 1, p. 87-97, 2007.

9 – APÊNDICE

9.1 - Publicações do Aluno:

9.1.1 - ARTIGOS RELACIONADOS À TESE

ACEITOS:

1 - Antifungal defensins and their role in plant defense

Frontiers in Microbiology

frontiers in
MICROBIOLOGY

REVIEW ARTICLE
published: 02 April 2014
doi: 10.3389/fmicb.2014.00116



Antifungal defensins and their role in plant defense

Ariane F. Lacerda^{1,2}, Érico A. R. Vasconcelos^{2,3}, Patrícia Barbosa Pelegni^{1,2} and Maria F. Grossi de Sa^{2,3}*

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

² Plant-Pest Interaction Laboratory, Embrapa – Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Brazil

³ Catholic University of Brasília, Brasília, Brazil

Edited by:

Tzi Bun Ng, The Chinese University of Hong Kong, China

Reviewed by:

Noton Kumar Dutta, Johns Hopkins University, USA

Dmitri Debabov, NovaBay Pharmaceuticals, USA

*Correspondence:

Maria F. Grossi de Sa, Plant-Pest Interaction Laboratory, Embrapa – Genetic Resources and Biotechnology, PqEB Avenue W5 Norte (final), P. O. BOX 02372, Brasília, DF 70770-917, Brazil
e-mail: fatima.grossi@embrapa.br

Since the beginning of the 90s lots of cationic plant, cysteine-rich antimicrobial peptides (AMP) have been studied. However, Broekaert et al. (1995) only coined the term “plant defensin,” after comparison of a new class of plant antifungal peptides with known insect defensins. From there, many plant defensins have been reported and studies on this class of peptides encompass its activity toward microorganisms and molecular features of the mechanism of action against bacteria and fungi. Plant defensins also have been tested as biotechnological tools to improve crop production through fungi resistance generation in organisms genetically modified (OGM). Its low effective concentration towards fungi, ranging from 0.1 to 10 μ M and its safety to mammals and birds makes them a better choice, in place of chemicals, to control fungi infection on crop fields. Herein, is a review of the history of plant defensins since their discovery at the beginning of 90s, following the advances on its structure conformation and mechanism of action towards microorganisms is reported. This review also points out some important topics, including: (i) the most studied plant defensins and their fungal targets; (ii) the molecular features of plant defensins and their relation with antifungal activity; (iii) the possibility of using plant defensin(s) genes to generate fungi resistant GM crops and biofungicides; and (iv) a brief discussion about the absence of products in the market containing plant antifungal defensins.

Keywords: plant defensins, antifungal, phytopathogens, peptide structure, peptide function, transgeny

INTRODUCTION

Plants are constantly exposed to several pests and pathogens in

of biological activities in these proteins. Only one amino acid substitution can change the spectrum of activity exhibited by these

2 - The recombinant pea defensin Drr230a is active against impacting soybean and cotton pathogenic fungi from the genera *Fusarium*, *Colletotrichum* and *Phakopsora*

Comprovante aceite de artigo: 3 -Biotech



Biotech Editorial Manager

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author Username: fatimagrossi

Submissions with an Editorial Office Decision for Author Maria Fátima Grossi de Sá, Ph.D.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	BTEC-D-15-00094	The recombinant pea defensin Drr230a is active against impacting soybean and cotton pathogenic fungi from the genera <i>Fusarium</i> , <i>Colletotrichum</i> and <i>Phakopsora</i>	13-04-2015	27-05-2015	Accept

Page: 1 of 1 (2 total completed submissions) Display 10 results per page.

The recombinant pea defensin Drr230a is active against impacting soybean and cotton pathogenic fungi from the genera *Fusarium*, *Colletotrichum* and *Phakopsora*.

Ariane Ferreira Lacerda^{1,2}; Rafael Perseghini Del Sarto^{1,4}; Marília Santos Silva¹; Erico Augusto Rosas de Vasconcelos¹; Roberta Ramos Coelho¹; Vanessa Olinto dos Santos^{1,2}; Claudia Vieira Godoy³; Claudine Dinali Santos Seixas³; Maria Cristina Mattar da Silva¹; Maria Fatima Grossi-de-Sa^{1,5 §}

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB Avenida W5 Norte (final), PO 02372, 70770-917, Brasília-DF, Brazil; ² Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Avenida Senador Salgado Filho 3000, Lagoa Nova, 59078-970, Natal-RN, Brazil; ³ Embrapa Soja, Rodovia Carlos João Strass, Distrito de Warta, PO Box 231, 86001-970, Londrina-PR, Brazil.

⁴ Centro Universitário do Distrito Federal, SEP/SUL EQ704/904 Conjunto A, 70390-045, Brasília-DF, Brazil. ⁵ Universidade Católica de Brasília, SGAN 916 Módulo B Avenida W5, 70790-160, Brasília-DF, Brazil.

Abstract

Plant defensins are antifungal peptides produced by the innate immune system plants have developed to circumvent fungal infection. The defensin Drr230a, originally isolated from pea, has been previously shown to be active against various entomopathogenic and phytopathogenic fungi. In the present study, the activity of a yeast-expressed recombinant Drr230a protein (rDrr230a) was tested against impacting soybean and cotton fungi. Firstly, the gene was subcloned into the yeast expression vector pPICZαA and expressed in *Pichia pastoris*. Resulting rDrr230a exhibited *in vitro* activity against fungal growth and spore germination of *Fusarium tucumaniae*, that causes soybean sudden death syndrome, and against *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, that causes cotton ramulosis. The rDrr230a IC₅₀ corresponding to inhibition of fungal growth of *F. tucumaniae* and *C. gossypii* var. *cephalosporioides* was 7.67 μM and 0.84 μM, respectively, demonstrating the moderate activity against *F. tucumaniae* and high potency against *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Additionally, rDrr230a at 25 ng/μl (3.83 μM) resulted in 100% inhibition of spore germination of both fungi, demonstrating rDrr230a affects fungal development since spore germination. Moreover, rDrr230a at 3 μg/μl (460.12 μM) inhibited 100% of *in vitro* spore germination of the obligatory biotrophic fungus *Phakopsora pachyrhizi*, which causes Asian soybean rust. Interestingly, rDrr230a substantially decreased the severity of Asian rust, as demonstrated by *in planta* assay. To our knowledge, this is the first report of a plant defensin active against a obligatory biotrophic phytopathogenic fungus. Results revealed the potential of rDrr230a as a candidate to be used in plant genetic engineering to control relevant cotton and soybean fungal diseases.

Keywords: Defensin, *Pisum sativum*, *Pichia pastoris*, *Fusarium tucumaniae*, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Phakopsora pachyrhizi*.

9.1.2 NÃO RELACIONADOS À TESE

1 - An Ultrasensitive Immunochromatographic test strip for the simultaneous detection of Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 in food products – Submetido a Food Analytical Methods.

Food Analytical Methods
An ultrasensitive immunochromatographic test strip for the simultaneous detection of Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 in food products
–Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	An ultrasensitive immunochromatographic test strip for the simultaneous detection of Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 in food products
Article Type:	Original Research
Keywords:	Aflatoxin; immunoassay; rapid test; food contaminants; AFB1 detection; AFM1 detection.
Corresponding Author:	Vanessa Santos BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Vanessa Santos

2 - Manuscrito em processo de submissão na Microbiological Research:

Antiparasitic peptides from arthropods and their biotechnological applications

Patrícia Barbosa Pelegrini^{1*}, Érico A. R. Vasconcelos^{1,2}, Ariane F. Lacerda³, Daiane Medeiros de Oliveira¹, Maria Fátima Grossi-de-Sá^{1,4}

¹Plant-Pest Interaction Laboratory, PBI, Genetic Resources and Biotechnology, Brazilian Agriculture Research Corporation (EMBRAPA), Brasília, Distrito Federal, Brazil.

²Department of Health Sciences, Integrated College of Educational Union's Central Plateau, Gama, Distrito Federal, Brazil.

³Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

⁴Post-Graduation Program in Genomics Science and Biotechnology, Catholic University of Brasília, Brasília, Brazil

ABSTRACT

Africa, Asia and Latin America are regions around the globe constantly affected by endemic diseases, such as Leishmaniasis, Malaria and Chagas' disease. They kill thousands of patients every year, once that there is still no cure for these illnesses and the medicaments used are inefficient against the pathogenic parasites. In Brazil, more than 29 million people live in endemic areas, being vulnerable to be infected by these diseases. During the life cycle of some parasitic protozoa, insects become the most important host and disseminator of the diseases triggered by these microorganisms. As they do not develop nocive symptoms, insects can carry the parasites for long time inside their body, enabling the microorganism to multiply and complete the main stages of its life cycle. Eventually, parasites infect a human being after insects transfer them through their saliva and/or feces. Hence, host insects and general arthropods, which developed a way to coexist with such microorganisms, are a promissory source for the prospection of antiparasitic compounds, with the aim of developing alternatives for the treatment of protozoa-related diseases. Among the molecules already isolated and investigated, there are proteins and peptides with high activity against parasites, which are able to inhibit their activity in different stages of development. Although studies are still taking their first steps, initial results are showing new perspectives on the treatment of parasitic diseases. Therefore, in this report, we described and discuss the most recent researches on the identification of proteins and peptides from host insect sources with activity against the three most endemic parasites: *Leishmania* sp, *Plasmodium* sp. and *Trypanosoma* sp. Moreover, we describe the future application of non-hosts insect transcriptomes on the prospection of novel molecules that can be used for the treatment of parasitic diseases.

Keywords: proteins, peptides, antiparasitic, host insects, tropical diseases.