



Denise da Silveira Lobo

**Análise da interação protéica da defensina
Psd1 de *Pisum sativum* com proteínas do
fungo *Neurospora crassa***

Tese de Doutorado

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção de título de Doutor Ciências – Química – Química Analítica.

Orientador: Reinaldo Calixto de Campos

Co-orientadora: Eleonora Kurtenbach

Rio de Janeiro
Agosto de 2006



Denise da Silveira Lobo

**Análise da interação protéica da defensina *Psd1* de
Pisum sativum com proteínas do fungo *Neurospora
crassa***

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química Analítica pelo programa de Pós-graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Reinaldo Calixto de Campos

Orientador
Departamento de Química – PUC-Rio

Profa. Eleonora Kurtenbach

Co-orientadora
Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ

Profa. Fátima Ventura Pereira Meirelles

Departamento de Química – PUC-Rio

Profa. Monica Montero Lomeli

Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Prof. Pedro Lagerblad de Oliveira

Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Prof. Alberto Felix Antonio da Nóbrega

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ

Prof. José Eugenio Leal

Coordenador Setorial do Centro
Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 22 de agosto de 2006

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e do orientador.

Denise da Silveira Lobo

Bacharelou-se em Física pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio), em 1982. Obteve o grau de Mestre em Biofísica pelo Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em 1985. Obteve o equivalente ao “Diplôme d’études approfondies” (DEA) em Bioquímica, pela Universidade de Paris VII, em 1986. Participou do curso “Advanced Bacterial Genetics” do Laboratório Cold Spring Harbor, Nova York, em junho 1988 e do curso “Microbial and Molecular Genetics” na Faculdade de Artes e Ciências da Harvard University, no segundo semestre de 1988 e início de 1989.

Ficha Catalográfica

Lobo, Denise da Silveira

Análise da interação protéica da defensina Psd1 de *Pisum sativum* com proteínas do fungo *Neurospora crassa* / Denise da Silveira Lobo ; orientadores: Reinaldo Calixto de Campos, Eleonora Kurtenbach. Rio de Janeiro : PUC-Rio, Departamento de Química, 2006.

160 f. : il. (col.) ; 30 cm

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química.

Inclui referências bibliográficas.

1. Química – Teses. 2. Defensina de planta. 3. *Pisum sativum*. 4. *Neurospora crassa*. 5. Duplo-híbrido. 6. Ciclina F. 7. Microscopia de fluorescência. 8. Migração nuclear. 9. Ciclo celular. I. Campos, Reinaldo Calixto de. II. Kurtenbach, Eleonora. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

À minha família.

Ao super médico e amigo:
Dr. Geraldo Xavier Pereira de Souza Filho.

À memória dos meus queridos e grandes mestres:
Prof. Carlos Chagas Filho e Prof. Luiz Renato Caldas.

Agradecimentos

Ao Prof. Reinaldo Calixto de Campos cujo pioneirismo e orientação científica em colaboração entre o Departamento de Química da PUC-Rio e o Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ possibilitaram a realização deste trabalho.

À Prof. Eleonora Kurtenbach, mestre sempre presente, cuja orientação científica é responsável pelo mérito deste trabalho.

Ao Prof. Rafael Linden cuja liderança permitiu abrir novas fronteiras na pesquisa dos modos de ação da defensina de planta em estudo.

À Lucianne Fragel-Madeira pelos experimentos com o modelo da retina de ratos neonatos.

Ao Iuri B. Pereira e Jane Faria pelos experimentos com microscopia de fluorescência.

Ao Luciano N. Medeiros pela expressão e purificação do peptídeo em estudo.

Ao Luiz M. Cabral pela experiência e orientação com o “GST pull-down”.

Ao Prof. Marcelo Fantappiè pela experiência e orientação com o sistema Duplo-Híbrido.

A todo o pessoal do laboratório da Profa. Eleonora Kurtenbach, em especial ao Prof. Marcius S. Almeida, à Tatiana Domitrovic, ao Roberto P. Campelo e à Daniela Del Rosário F. Rodrigues, pela orientação na bancada, ajuda com protocolos e participação com calorosas discussões que muito contribuíram para aperfeiçoar este trabalho.

Ao Luiz Eduardo D. Giménez pela contribuição com o gráfico artístico.

Ao Rui M. Domingues pelo excelente serviço técnico prestado.

À Fátima Almeida pela dedicação e carinho.

Aos amigos dos laboratórios do Prof. Pedro L. de Oliveira, do Prof. Orlando B. Martins e da Profa. Mônica M. Lomeli, como também, dos laboratórios da Profa. Adriana Hermely e do Prof. Vivaldo Moura-Neto, cuja cooperação em permitir utilizar materiais e equipamentos foi indispensável à realização deste trabalho.

Ao Departamento de Química da PUC-Rio e ao Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ.

Resumo

Lobo, Denise da Silveira. **Análise da interação protéica da defensina Psd1 de *Pisum sativum* com proteínas do fungo *Neurospora crassa***. Rio de Janeiro, 2006. 160p. Tese de Doutorado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Defensinas de planta, componentes inatos do sistema imune das plantas, são peptídeos antifúngicos, catiônicos, com estrutura primária rica em cisteína. Evidência dada pela literatura demonstrou que trechos de esfingolipídios complexos na membrana dos fungos, contendo manossilinositolfosforilceramida e glicosilceramida, são sítios de ligação seletivos para as defensinas de planta isoladas de *Dahlia merckii* e *Raphanus sativus*, respectivamente. Entretanto, desconhece-se se as defensinas de planta interagem direta ou indiretamente com alvos intracelulares dos fungos. A fim de identificar interações físicas e diretas do tipo proteína-proteína, um sistema de duplo-híbrido, em levedura, baseado no fator de transcrição GAL4, foi construído utilizando-se como “isca”, a defensina da planta *Pisum sativum*, Psd1 (“*Pisum sativum* defensin 1”). Proteínas “alvos”, capazes de interagirem com o peptídeo Psd1, foram detectadas através do rastreamento de uma biblioteca de cDNA do fungo *Neurospora crassa*. Do resultado deste rastreamento, nove dentre quinze candidatos, selecionados pelo método do duplo-híbrido, foram identificados como proteínas nucleares da *N. crassa*. Um clone, detectado com alta frequência neste rastreamento, apresentou homologia de seqüência com a proteína ciclina F, relacionada com o controle do ciclo celular. O ensaio de co-purificação utilizando a proteína conjugada a glutationa S-transferase (GST) validou *in vitro* o resultado obtido pelo sistema duplo-híbrido. Análise por microscopia de fluorescência da Psd1, conjugada a FITC, e, dos núcleos do fungo *Fusarium solani*, marcados com DAPI, demonstrou *in vivo* a co-localização da defensina de planta Psd1 com os núcleos do fungo. Para pesquisar o modo de ação da Psd1 ao nível do ciclo celular, utilizou-se o modelo multicelular da retina de ratos neonatais, em desenvolvimento. Neste

modelo, a migração nuclear intercinética, correlacionada com as transições de fase de S para M do ciclo celular, foi observada na presença da *Psd1*. Verificou-se que *Psd1* impediu a migração nuclear em neuroblastos, parando o ciclo celular na transição de S para G2. Estes resultados revelaram modos de ação da defensina de planta *Psd1* sobre a fisiologia nuclear.

Palavras-chave

Defensina de planta, *Pisum sativum*, *Neurospora crassa*, duplo-híbrido, ciclina F, microscopia de fluorescência, migração nuclear, ciclo celular.

Abstract

Lobo, Denise da Silveira. **Protein-protein interaction analysis of the defensin *Psd1* from *Pisum sativum* with *Neurospora crassa* proteins.** Rio de Janeiro, 2006. 160p. Tese de Doutorado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Plant defensins, innate components of the plant immune system, are cationic, antifungal peptides, with a cysteine-rich primary structure. Evidence from the literature demonstrated that fungus membrane patches containing complex sphingolipids, mannosyldiinositolphosphorylceramide and glucosylceramides, are selective binding sites for the plant defensins isolated from *Dahlia merckii* and *Raphanus sativus*, respectively. However, whether the plant defensins interact directly or indirectly with fungus intracellular targets is unknown. To identify direct physical protein-protein interactions, a GAL4-based yeast two-hybrid system was constructed, using the plant peptide, *Pisum sativum* defensin 1 (*Psd1*), as the bait protein. Target proteins, capable of interacting with the bait *Psd1*, were detected by screening a *Neurospora crassa* cDNA library. In this screening, nine out of fifteen two-hybrid candidates were identified as *N. crassa* nuclear proteins. One clone, detected with high frequency in the screening, presented sequence similarity to a *N. crassa* cyclin F, related to the cell cycle control. The GST pull-down co purification assay corroborated this two-hybrid result *in vitro*. Fluorescence microscopy analysis of FITC-conjugated *Psd1* and DAPI-stained *Fusarium solani* nuclei demonstrated *in vivo* the co-localization of the plant peptide *Psd1* and the fungus nuclei. We used the developing retina of neonatal rats as a multicellular model to study *Psd1* mode of action at the cell cycle level. In this model, we observed *in vivo* the interkinetic nuclear migration, correlated to the transitions from S to M-phase of the cell cycle, in the presence of

the *Psd1* peptide. It was shown that *Psd1* impaired nuclear migration of neuroblasts by arresting the cell cycle at the S to G2-phase transition. These results revealed modes of action of the plant defensin *Psd1* upon the nuclear physiology.

Keywords

Plant defensin, *Pisum sativum*, *Neurospora crassa*, two-hybrid, cyclin F, fluorescence microscopy, nuclear migration, cell cycle.

Sumário

1. Introdução	16
1.1. Peptídeos de defesa ou defensinas	16
1.2. Vias de sinalização para a síntese de defensinas na planta	19
1.3. Classificação das defensinas de planta	23
1.4. A estrutura tridimensional da defensina <i>Psd1</i> isolada da ervilha	24
1.5. Domínios de miristoilação em defensinas de planta	26
1.6. Interação entre defensinas de planta e fungos	29
1.7. Duas diferentes estratégias de ação antifúngica da defensina <i>Psd1</i>	33
1.8. Objetivo e justificativa do uso do sistema Duplo-Híbrido	34
2. Materiais e métodos	36
2.1. Expressão do peptídeo recombinante <i>Psd1</i> em <i>Pichia pastoris</i>	36
2.2. O sistema Duplo-Híbrido para o rastreamento da biblioteca de expressão de <i>N. crassa</i>	36
2.3. A biblioteca de expressão de <i>N. crassa</i>	39
2.4. Construção e verificação do plasmídeo “isca” pBD- <i>Psd1</i>	40
2.5. Análise das seqüências dos candidatos rastreados pelo sistema Duplo-Híbrido	41
2.6. Análise de co-localização por microscopia de fluorescência	42
2.7. Sistema de expressão em <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	42
2.8. <i>Psd1</i> marcada com [³⁵ S]-metionina em lisado de reticulócito de coelho	43
2.9. O ensaio de co-purificação por “GST pull-down”	44
2.10. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida	45
2.11. O modelo experimental da retina de rato em desenvolvimento	45
2.12. Preparação de explantes da retina de ratos neonatos	46
2.13. Cortes histológicos da retina	47
2.14. Imunohistoquímica para BrdU	47
2.15. Quantificação dos núcleos migrantes	50

3. Resultados	51
3.1. O sistema de varredura Duplo-Híbrido para detecção de interações entre o peptídeo <i>Psd1</i> e as proteínas do fungo <i>N. crassa</i>	51
3.2. Análise por microscopia de fluorescência do peptídeo <i>Psd1</i> e do núcleo de <i>F. solani</i>	77
3.3. Expressão da proteína Y1 marcada com GST em <i>E. coli</i>	79
3.4. Verificação “in vitro” da interação entre <i>Psd1</i> e Y1	82
3.5. <i>Psd1</i> afeta o ciclo celular medido por migração nuclear intercinética em neuroblastos da retina de ratos neonatos	85
4. Discussão	88
5. Referências Bibliográficas	96
6. Anexos	109
6.1. Anexo 1- Domínios de miristoilação	110
6.2. Anexo 2- Preparação de meios e reagentes	113
6.3. Anexo 3- Protocolo do Duplo-Híbrido em oito etapas	119
6.4. Anexo 4- Mapas dos vetores utilizados neste trabalho	143
6.5. Anexo 5- Candidato Y3 do Duplo-Híbrido	148
6.6. Anexo 6- Candidato Y9 do Duplo-Híbrido	154
6.7. Anexo 7- Candidato Y8 do Duplo-Híbrido	159

Lista de ilustrações

Figuras:

Figura 1 - Esquema simplificado mostrando as vias de sinalização na planta relacionadas com a síntese das defensinas (PDFs).	22
Figura 2 - Representação da estrutura tridimensional da <i>Psd1</i> .	25
Figura 3 - Representação de esfingolipídeo do tipo CMH (monohexosídeos ceramidas).	29
Figura 4 - Modelo de Shai-Matsuzaki-Huang ou “modelo do tapete”.	32
Figura 5 - Esquema simplificado da expressão dos genes repórteres do sistema Duplo-Híbrido baseado no fator de transcrição GAL4 em levedura.	38
Figura 6 - Método de imuniquímica da avidina biotinizada complexada à enzima peroxidase (ou Método “ABC”).	49
Figura 7 - Análise por eletroforese em gel de agarose de plasmídeos pAD-Yi de colônias de XLOLR selecionadas randomicamente por ampicilina.	53
Figura 8 - Análise do plasmídeo “isca” pBD- <i>Psd1</i> do sistema Duplo-Híbrido.	55
Figura 9 - Rastreamento de candidatos contendo a interação entre a proteína “isca” e uma proteína “alvo” medido pela expressão do gene repórter <i>LacZ</i> .	57
Figura 10 - Seleção de candidatos por rastreamento em sistema Duplo-Híbrido baseado no fator de transcrição GAL4 em levedura.	59

Figura 11 - Análise por eletroforese em gel de agarose dos plasmídeos contendo os insertos de cDNA Y1, Y2 e Y15 selecionados pelo Duplo-Híbrido em estudo.	73
Figura 12 - Análise por microscopia de fluorescência do peptídeo <i>Psd1</i> conjugado a FITC e dos núcleos de <i>F. solani</i> marcados com DAPI.	78
Figura 13 - Confirmação da presença do inserto de cDNA <i>EcoRI-XhoI</i> do candidato Duplo-Híbrido Y ₁ clonado no vetor pGEX-4T-1.	80
Figura 14 - Expressão do candidato Duplo-Híbrido Y1 marcado com GST em <i>E. coli</i> .	81
Figura 15 - Auto-radiografia das proteínas Luciferase e <i>Psd1</i> sintetizadas em lisado TNT de reticulócito de coelho sob controle do promotor T7 com [³⁵ S]-metionina.	83
Figura 16 - Ensaio de co-purificação por “GST pull-down”.	84
Figura 17 - A migração nuclear intercinética ao longo da camada neuroblástica (NBL) na retina de rato em desenvolvimento.	86
Figura 18 - Visualização da NBL com aumento de 40X.	87
Figura 19 - Esquema representativo resumindo os resultados referentes à literatura e a este estudo.	95
Tabelas:	
Tabela 1 - Domínios de miristoilação - Anexo 1	110
Tabela 2- Os quinze candidatos selecionados pelo Duplo-Híbrido em estudo.	60

Lista de abreviaturas

AD – domínio de ativação

3-AT - 3-aminotriazole

BD - domínio de ligação ao DNA

BLAST - “Basic Local Alignment Search Tool”

BrdU – 5-Bromo-2-deoxiuridina

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar

DAB – diaminobenzidina

DAPI - 4,6-diamidino-2-fenilindole

DmAMP - peptídeo antimicrobiano da *Dahlia merckii*

e-value – “expect value or background noise”, valor esperado

FGSC – “Fungal Genetic Stock Center”

FITC - fluoresceína isotiocianato

G1 – “gap 1”, intervalo 1 do ciclo celular

G2 - “gap 2”, intervalo 2 do ciclo celular

GST – Glutathione S-transferase

IPTG - isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo

M – fase de mitose do ciclo celular

MIPS – “Munich Information Center for Protein Sequences”

MTs – microtúbulos

NBL – “neuroblastic layer”, camada neuroblástica

OD – “optical density”, densidade ótica

OCT – “optimal cutting compound”, meio para corte histológico

PBS – tampão fosfato pH=7.4

PD – dextrose de batata

PRs – peptídeos relacionados à patogênese

Psd – “*Pisum sativum* defensin”

RsAFP - peptídeo antifúngico *Raphanus sativus*

S – fase de síntese do DNA no ciclo celular

SD – meio de cultura “Synthetic Dropout”

SDS – dodecil sulfato de sódio

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo