

1. Introdução

1.1. Peptídeos de defesa ou defensinas

O estresse biótico tanto em plantas quanto em animais é resultante da infecção por patógenos: vírus, bactérias, fungos, nematóides e insetos. Durante um estresse biótico, a célula hospedeira pode ativar a expressão diferencial de um conjunto de proteínas dependente das condições, interna e externa, da célula. Os genes responsáveis pela expressão de um conjunto de proteínas podem estar ativos em determinada condição e inativos ou silenciosos em outra. O conjunto de genes ativos que resume o transcriptoma codifica um proteoma específico num dado intervalo de tempo, dependente da condição, interna e externa, em que a célula se encontra (Pandey, A. e Mann, M., 2000).

A infecção de um tecido (um conjunto de células com uma determinada função), por fungo ou bactéria, é dada pela síntese de um proteoma no microorganismo patogênico com função de destruir o tecido do hospedeiro (planta ou animal). Desta maneira, os microorganismos se reproduzem e crescem, utilizando as proteínas, carboidratos e/ou lipídeos do tecido hospedeiro para a sua própria nutrição. Os vírus são casos à parte, pois utilizam toda a maquinaria de síntese de proteína da célula como também o conteúdo celular de aminoácidos e nucleotídeos para sua replicação.

Do ponto de vista do hospedeiro, a destruição do seu próprio tecido, pode induzir na célula hospedeira, uma resposta de defesa inata. Esta resposta consiste, entre outras, na síntese de um conjunto de peptídeos direcionados tanto à sua defesa, como também, ao ataque ao invasor (Green, T.R. e Ryan, C.A., 1972; Ryan, C.A., 1990, 2000). Nesta resposta imune inata, que pode ocorrer anteriormente à resposta imune adaptativa, peptídeos são produzidos por transcrição e tradução de genes específicos, disponibilizando função antimicrobiana na célula logo após uma infecção por um microorganismo patogênico ou um ferimento ou na presença de molécula capaz de induzir a síntese

deste proteoma de defesa, incluindo produtos da injúria do tecido animal ou vegetal (Broekaert, W.F. et al., 1997). Desta maneira, pode-se pensar que o genoma parece possuir genes antimicrobianos “SOS” do sistema imunológico, que podem ser ativados rapidamente em caso de necessidade.

Alguns peptídeos de defesa são expressos de modo constitutivo, podendo ser secretados em quantidades suficientes para inibir o crescimento de microorganismos, como por exemplo, durante o processo de germinação da planta, logo após o rompimento da casca da semente pela radícula (Terras, F.R.G. et al., 1995). Outro exemplo é o peptídeo HDB-1 (“Human Beta-Defensin 1”) que foi isolado na placenta e no cordão umbilical humano (Pazgiera, M. et al., 2006). Esta mesma defensina humana também é expressa de modo constitutivo no tecido epitelial e na cavidade oral (Chung, W.O. e Dale, B., 2004). Evidências experimentais mostram que peptídeos de defesa, em particular a defensina-alfa de mamíferos, têm um efeito inibidor do vírus HIV-1 e podem ser reguladoras do sistema imunológico adaptativo (Chang, T.L. e Klotman, M.E., 2004).

A infecção por microorganismos patogênicos tem sido apontada pela classe médica como a principal causa da mortalidade de pacientes com deficiência no sistema imunológico, como também, pacientes hospitalizados por longos períodos. Por outro lado, a classe de agricultores teme a devastação de suas plantações por microorganismos invasores, não somente antes ou durante a colheita, como também durante o armazenamento dos produtos agrícolas.

A escolha de um medicamento ou defensivo agrícola adequado para combater a infecção constitui um problema complexo, devido ao desenvolvimento de resistência ao medicamento ou ao agrotóxico, ao aparecimento de microorganismos emergentes e ao alto grau de toxicidade dessas drogas para o hospedeiro e o ecossistema. Deste modo, os tratamentos disponíveis até o momento não permitem o aumento da dosagem em casos de infecção sistêmica ou grave (Georgopapadakou, N.H., 2002).

Esta tese abrange a resposta inata apresentada por células vegetais quando infectadas por fungos. A infecção por fungos e bactérias induz na planta a síntese de uma importante classe de peptídeos relacionados à defesa, denominados defensinas ou peptídeos de defesa (PDFs), com ação antifúngica e/ou antibacteriana. Estes peptídeos de planta antimicrobianos apresentam um largo e distinto espectro de atividade contra diferentes tipos de fungos e/ou bactérias.

Estes antibióticos e/ou antimicóticos, e possivelmente antivirais, podem ser de grande valia para a fabricação de medicamentos naturais, principalmente em casos de infecções sistêmicas ou pandemias, como também para a substituição de agrotóxicos na proteção contra fungos aéreos em grandes plantações.

Por outro lado, situações como a disseminação de fungos via sementes contaminadas na agricultura, como o exemplo da cultura de algodão infectada por *Colletotrichum gossypu* var. *cephalosporioides* (ramulose), não são bem controladas com a aplicação de fungicidas (Cia, E. e Salgado, C.L., 1997; Goulart, A.C.P., 2001, 2002). Neste caso, o desenvolvimento de sementes transgênicas resistentes a fungos específicos poderia ser uma solução do problema.

O aprimoramento de vegetais resistentes a fungos invasores tem sido realizado através da transformação gênica de células vegetais com os genes da defensina e dos peptídeos relacionados à patogênese, resultando em plantas transgênicas fungos resistentes (Garcia-Olmedo, F. et al., 2001). Inúmeras evidências experimentais deste processo têm sido relatadas na literatura, tais como, o aumento da resistência da planta do tabaco ao fungo *Alternaria longipes* quando a planta foi transformada com o gene da defensina do rabanete *R_sAFP2* (“*Raphanus sativus* antifungal peptide”) (Broekaert, W.F. et al., 1995), e, o aumento da resistência da batata aos fungos *Verticillium dahliae*, *Alternaria solani* e *Fusarium culmorum*, a partir da superexpressão da defensina da alfafa *alfAFP* (“alfalfa antifungal peptide”) sob controle do promotor constitutivo 35S (Gao, A.G. et al., 2000), como também, a partir da expressão de um peptídeo catiônico químera (*MsrA1*), com um largo espectro de atividade antimicrobiana (Osusky, M. et al., 2000).

Desde que a primeira defensina antifúngica de planta foi encontrada em raízes e rizomas de urtiga (*Urtica dioica*) (Broekaert, W.F. et al., 1989), outros peptídeos similares têm sido isolados sucessivamente. Seguem-se alguns exemplos da literatura, em ordem cronológica, de isolados de diferentes espécies: do endosperma do trigo (*Triticum aestivum*) (Colilla, F.J., Rocher, A. e Mendez, E., 1990); do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) (Van Parijs, J. et al., 1991); da semente da planta tropical brasileira “maravilha curativa” (*Mirabilis jalapa*) (Cammue, B.P.A. et al., 1992); das sementes de amaranto (*Amaranthus caudatus*) (Broekaert, W.F. et al., 1992) e de rabanete (*Raphanus sativus*) (Terras, F.R. et al., 1992); do endosperma da cevada (*Hordeum vulgare*) (Bruix, M. et al., 1993); das

sementes da castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum*) e da dália (*Dahlia merckii*) (Osborn, R.W. et al., 1995); das flores de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Brandstadter, J., Rossbach, C. e Theres, K., 1996) e do fruto do pimentão amarelo (*Capsicum annuum*) (Meyer, B. et al., 1996); da semente do bálsamo (*Impatiens balsamina*) (Tailor, R. et al., 1997); das folhas do espinafre (*Spinacia oleracea*) (Segura, A. et al., 1998) e da primeira planta cujo genoma foi completamente sequenciado, arábida (*Arabidopsis thaliana*) (Thomma, B.P.H.J. e Broekaert, W. F., 1998); da semente de ervilha (*Pisum sativum*) (Almeida, M.S. et al., 2000); dos grãos do milho (*Zea mays*) (Serna, A. et al., 2001); do nabo (*Brassica rapa*) (Park, H.C. et al., 2002); da flora brasileira “fumo-de-jardim” (*Nicotiana glauca*) e da petúnia (*Petunia hybrida*) (Lay, F.T., Brugliera, F. e Anderson, M. A., 2003); da alfafa (*Medicago sativa*) (Hanks, J.N. et al., 2005). Ou seja, as defensinas podem ser encontradas nas sementes e grãos, nas raízes, caules e seiva, folhas, flores e frutos dos vegetais.

1.2. Vias de sinalização para a síntese de defensinas na planta

A planta, quando possui a habilidade genética de reduzir ou impedir a infecção por um certo patógeno, esta contém um gene de resistência R específico ao patógeno. Por outro lado, um microorganismo patogênico sem a capacidade de atacar uma determinada planta é classificado avirulento para esta planta. Um gene Avr específico está relacionado à capacidade do patógeno atacar a planta.

Na planta *Arabidopsis thaliana*, dois tipos de genes R da planta R¹ e R² mostraram ser responsáveis pela defesa vegetal (Baker, B. et al., 1997) (Ver a Figura 1). Estes genes R¹ e R² codificam proteínas capazes de interagirem com componentes do microorganismo invasor ativando vias de sinalização na célula vegetal. Cada via de sinalização induz a síntese de proteoma específico abrangendo diversas classes de peptídeos antimicrobianos (Garcia-Olmedo, F. et al., 1998).

Os microorganismos patogênicos podem ser divididos em dois grupos: aqueles que necessitam do hospedeiro vivo para completarem seu ciclo de vida

(biotróficos) e aqueles que usufruem o conteúdo do hospedeiro, matando-o (necrotróficos). Fungos e bactérias podem ser classificados em ambos grupos (Dangl, J.L e Jones, J.D. G., 2001).

O reconhecimento de um microorganismo patogênico biotrófico é governado por interações entre produtos do conjunto de genes do patógeno denominado de avirulência (Avr), e os produtos do conjunto de genes da planta denominado de resistência (R¹). Quando ambos os conjuntos de genes, Avr (patógeno) e R¹ (planta), estão presentes, resulta a resistência à doença. Se um destes conjuntos de genes que define um loci Avr no patógeno ou um loci R¹ na planta está ausente ou inativo, a doença se instala, o que resulta na morte do vegetal hospedeiro. Esta foi uma das importantes contribuições à biologia de planta, dada por Flor, H.H., em artigo na “Phytopatology”, em 1955, que denominou esta relação de gene a gene, sugerindo uma relação biunívoca onde para cada gene de resistência R¹ da planta corresponde um gene Avr do fungo. A interação entre produtos do gene Avr e do gene R¹ seria responsável por desencadear uma resposta imediata hipersensitiva (HR) no local da infecção, responsável pela morte celular programada da planta (apoptose) (Dangl e Jones, 2001).

Paralelo à resposta HR, uma via de sinalização cujo principal componente é o ácido salicílico é acionada também no local da infecção. Esta via, que pode interferir no processo HR, por outro lado, induz a expressão de vários peptídeos relacionados à patogênese (PRs). PR1 (família de peptídeos de 15 -17 kDa com função desconhecida) (Alexander, D. *et al.*, 1993), PR2 (família das glucanases com a função de hidrolisar a parede celular do fungo) (Kauffmann, S. *et al.*, 1987) e PR5 (família das taumatinas, AP24 ou osmotinas causam a lise da parede celular do fungo) (Liu, D. *et al.*, 1994), são sintetizados, tanto no local de infecção, como também, em toda a planta, passando pelo processo de resistência sistêmica adquirida (SAR). Na literatura são demonstrados três casos de direta relação gene Avr - gene R¹: em tomate-*Pseudomas* (Tang, X. *et al.*, 1996) em arroz-*Magnaporthe* (Jia, Y. *et al.*, 2000) e arabisopsis-vírus TCV (“turnip crinkle vírus”) (Ren, T., Qu, F. e Morris, T. J., 2000).

Já o reconhecimento de um microorganismo patogênico necrotrófico ou o reconhecimento de moléculas elíctas (E) por receptores R² resulta em outras duas vias de sinalização distintas, que não requerem a presença de um loci Avr no

microorganismo patogênico. A primeira é dada através dos principais componentes jasmonato e etileno no local de infecção e a segunda pelo processo de resistência sistêmica induzida (ISR) em toda a planta (Figura 1). Ambas vias induzem no local de infecção e em toda a planta a expressão de peptídeos PRs, PR-1b e PR-5, cuja indução sinérgica foi observada na planta do tabaco, (Xu, Y. Et al., 1994), PR3 (família das quitinases com a função de hidrolisar e degradar a parede celular do fungo) e PR4 (de baixo peso molecular como as PR1). Concomitantemente aos genes PRs, também são acionados os genes PDFs relacionados à defesa da planta, peptídeos de 2-9 kDa. Estes genes PDFs são denominados de defensinas por terem atividade antimicrobiana e estrutura similares às defensinas anteriormente caracterizadas em outros organismos (Baker, B. et al., 1997; Feys, B.J. e Parker, J.E., 2000; Thomma, B.P.H.J. et al., 2002).

Das sementes da ervilha de jardim (*Pisum sativum*), Almeida, M.S. et al. (2000) isolaram e purificaram duas defensinas (PDFs), denominadas *Psd1* e *Psd2*, e sugeriram que estas pertencessem a uma nova classe de defensinas de planta. Ambos peptídeos *Psd1* e *Psd2*, com aproximadamente 5 kDa, exibiram atividade antifúngica aumentada contra os fungos filamentosos *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Fusarium moliniforme* e *Fusarium solani*. Mas não apresentaram atividade antifúngica contra outras espécies de fungos, tais como *Fusarium oxysporum*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichophyton mentagrophytes* (Almeida, M.S. et al. 2001). No presente trabalho será interesse de estudo esta classe das defensinas de planta, em particular, a defensina da ervilha *Psd1* (*Pisum sativum* defensin 1).

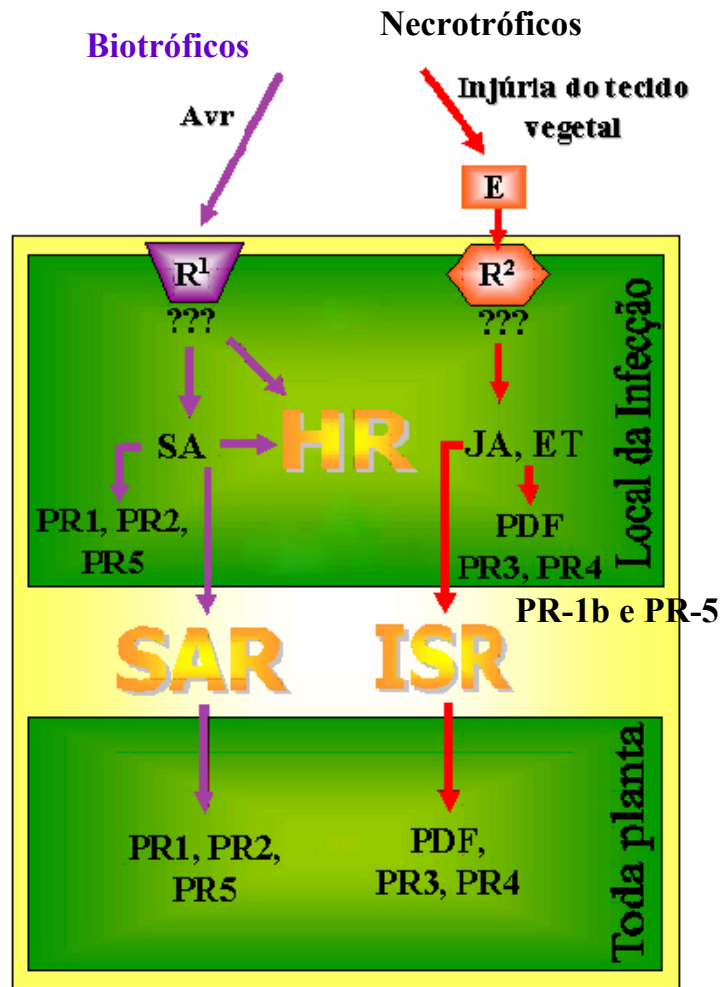


Figura 1 – Esquema simplificado mostrando as vias de sinalização na planta relacionadas com a síntese das defensinas (PDFs). Os produtos do gene *Avr* (liberados pelo patógeno) interagem com os receptores da planta do tipo R^1 . Moléculas elícticas *E* ao receptor R^2 (que podem ou não ser compostos resultantes da injúria do tecido vegetal), são reconhecidas na membrana da planta a partir da interação destas com produtos do gene vegetal R^2 . ???- mecanismos desconhecidos, **HR** – resposta hipersensitiva, SA – ácido salicílico, JA – jasmonato e ET – etileno, **SAR** – resistência sistêmica adquirida e **ISR** – resistência sistêmica induzida. PRs- peptídeos relacionados à patogênese e , PDFs- peptídeos de defesa (ou defensinas).

1.3. Classificação das defensinas de planta

As defensinas de planta são peptídeos catiônicos, derivados de precursores maiores, com dois a dez resíduos de cisteína em posições específicas em sua estrutura primária, formando pontes dissulfeto intramoleculares. Sua estrutura terciária, caracterizada por dois segmentos em fita- β antiparalelos nas extremidades N e C-terminal, é organizada em setores catiônicos e setores hidrofóbicos distintos (Zasloff, M., 2002a).

Estes peptídeos de planta foram classificados em quatro grupos (Osborn, R.W. et al., 1995; De Samblanx, G.W. et al., 1997; Segura, A. et al., 1998; Almeida, M.S., 2001). O grupo I inibe o crescimento do fungo *Fusarium culmorum*, causando alterações morfológicas na membrana do fungo, reduzindo o alongamento e ramificações das hifas, como por exemplo, a defensina do rabanete (*Raphanus sativus*) RsAFP2. O grupo II apresenta atividade antifúngica contra este mesmo fungo sem alterar sua morfologia, como exemplos a citar: as defensinas isoladas da dália (*Dahlia merckii*) DmAMP1 e da castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum*) AhAMP1. O grupo III é composto de defensinas que não apresentam atividade antifúngica, como por exemplo: as defensinas isoladas do Sorgo (*Sorghum bicolor*). O grupo IV é composto por peptídeos com atividade antifúngica e antibacteriana, também chamados de peptídeos antimicrobianos (AMPs), tal como a defensina isolada da semente da planta medicinal tropical “maravilha curativa” (*Mirabilis jalapa*).

1.4. A estrutura tridimensional da defensina *Psd1* isolada da ervilha

A análise da estrutura tridimensional do peptídeo *Psd1* (Ver Figura 2), feita por Almeida, M.S., et al (2001), mostra que as regiões N e C-terminal desta defensina apresentam:

- (i) Dois segmentos em fita- β antiparalelos nas extremidades N e C-terminal: Thr2-Leu6 (N-terminal) e Lys39-Asn45 (C-terminal),
- (ii) Um terceiro segmento central em fita- β , Ser32-His36 e
- (iii) Uma α -hélice entre os resíduos Asn17 e Lys27.

De particular importância, são os resíduos hidrofóbicos Phe15, Val13 e Trp38 na superfície da defensina. Tais “garras hidrofóbicas” podem representar prováveis sítios de interação com a membrana dos fungos.

As pontes dissulfeto no peptídeo *Psd1* foram identificadas por espectrometria de RMN. Em particular, a ponte dissulfeto Cys3- Cys46 liga as fitas- β antiparalelas dos N e C terminais e estabiliza uma estrutura terciária característica de defensinas encontradas em outros tipos de organismos, incluindo insetos e o organismo humano (Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A. e Thevissen, K., 2002; Broekaert, W.F. et al., 1997). A ponte dissulfeto Cys14- Cys35 aproxima as garras hidrofóbicas Phe15 e Trp13, anteriores à α -hélice, à fita- β central, enquanto as pontes Cys20- Cys40 e Cys24- Cys42 aproximam a fita- β no terminal-C com a α -hélice.

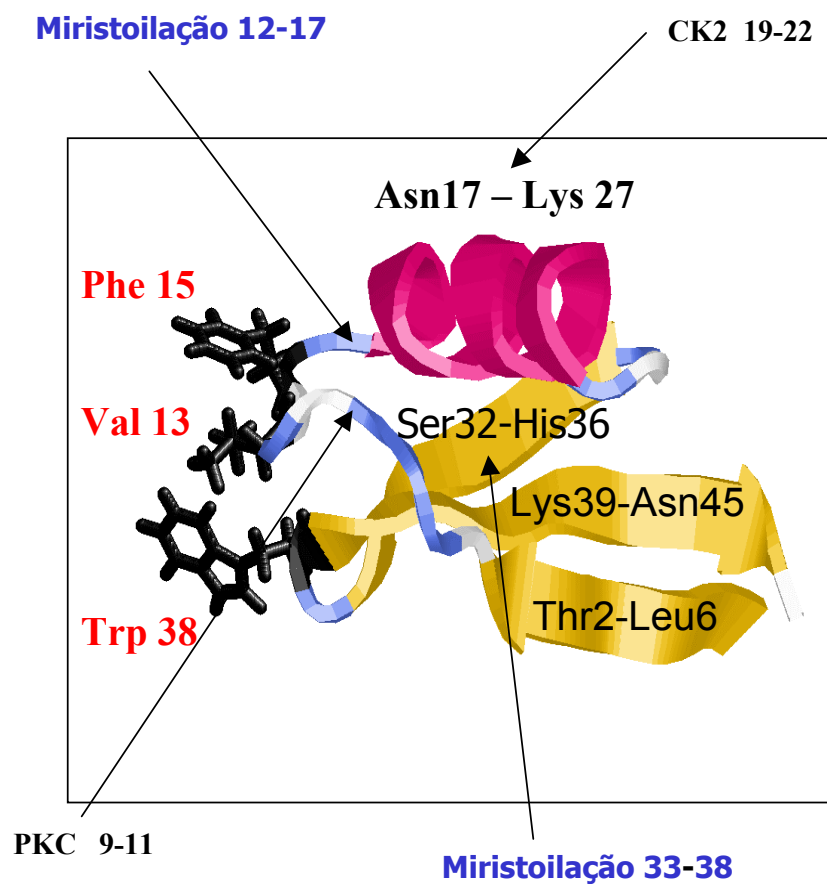


Figura 2 – Representação da estrutura tridimensional da *Psd1*. Os resíduos hidrofóbicos Phe15, Val13 e Trp38 (garras em preto), os domínios de miristoilação e os sítios de fosforilação pela proteína quinase C (PKC) e pela caseínaquinase 2 (CK2) estão apontados na estrutura. As estruturas secundárias são indicadas pelas cores: amarela – fita β e rosa - α -hélice.

1.5. Domínios de miristoilação em defensinas de planta

A análise da sequência primária do peptídeo *Psdl*, através do escaneamento em Prosite (Motif Scan, Prosite patterns, frequent match producers), identificou, por homologia de domínios específicos, sítios prováveis de glicosilação, fosforilação e miristoilação, como mostrado abaixo.

Sequência primária do peptídeo *Psdl* com 46 aminoácidos:

KTCEHLADTYRGVCFTNASCDDHCKNKAHLISGTCHNWKCFCTQNC

ScanProsite:

Sequence: [P81929](#) (PSD1_PEA) Defense-related peptide 1 (Defensin 1) (Antifungal protein *Psdl*) [*Pisum sativum* (Garden pea)] (46 AA).

PROSITE Release 18.11, of 30-Oct-2003

>[PDOC00001](#) [PS00001](#) ASN_GLYCOSYLATION N-glycosylation site [pattern] [Warning: pattern with a high probability of occurrence]. [PDB: [1jkz](#)]

17 NASC 20

>[PDOC00005](#) [PS00005](#) PCK_PHOSPHO_SITE Protein kinase C phosphorylation site [pattern] [Warning: pattern with a high probability of occurrence]. [PDB: [1jkz](#)]

9 TyR 11

>[PDOC00006](#) [PS00006](#) CK2_PHOSPHO_SITE Casein kinase II phosphorylation site [pattern] [Warning: pattern with a high probability of occurrence]. [PDB: [1jkz](#)]

19 SCdD 22

>[PDOC00008](#) [PS00008](#) MYRISTYL N-myristoylation site [pattern]
[Warning: pattern with a high probability of occurrence]. [PDB: [1jkz](#)]

12 GVCfTN 17

33 GTchNW 38

Observa-se por homologia de domínios específicos, através do escaneamento em Prosite, que a defensina *Psd1* apresentou duas prováveis seqüências específicas de miristoilação (Ver Figura 2).

A miristoilação do N-terminal de proteínas em eucariotos é a transferência de uma cadeia lipídica (o miristato) pela enzima coA-miristoil : proteína N-miristoil transferase (NMT) para o aminoácido glicina do terminal-N de uma determinada seqüência na proteína. Evidências experimentais mostram que esta reação de transferência promove a associação de proteínas específicas entre si, como também com domínios na membrana, incluindo uma variedade de cascatas de transdução de sinal (Farazi, T.A., Waksman, G. e Gordon, J.I., 2001).

Como evidenciada na literatura, a miristoilação de proteínas, produtos dos genes *Avr* e *R*¹, pode fazer parte de uma sinalização primária que dirige estas proteínas para um mesmo sítio de ligação na membrana celular (Boisson, B., Giglione, C. e Meinel, T.; 2003). Deste modo, esfingolipídios poderiam se ligar covalentemente ao aminoácido Glicina: da posição 12 (seqüência: 12-17) e da posição 33 (seqüência: 33-38) na seqüência da *Psd1*.

Dados de dinâmica molecular da defensina *Psd1*, utilizando experimentos de relaxação longitudinal e transversal além de HetNOE, mostraram mudanças conformacionais significativas das alças não estruturadas Thr09-Ala18 e His36-Trp38. A primeira alça apresenta um ponto de grande flexibilidade no resíduo Gly12, altamente conservado entre as defensinas de plantas e pertencente ao domínio de miristoilação (12 a17). Como demonstrado por variação de deslocamento químico, os resíduos Cys14, Phe15, Asn17 e His36 de *Psd1*, todos contidos em sítios de miristoilação, parecem estar envolvidos na interação da *Psd1* com vesículas formadas de fosfatidilcolina mais monohexosídeo ceramida (CMH isolado de *F. solani*), quando em contato com estas vesículas (Medeiros, L.N., 2004).

Pesquisando homologias de domínios específicos em outras defensinas de outras espécies de plantas, também pelo escaneamento em Prosite (Motif Scan, Prosite patterns, frequent match producers), observou-se que domínios de miristoilação estão presentes em quase todas as seqüências analisadas, listadas na Tabela 1 encontrada no Anexo 1. Esses domínios de miristoilação são ricos no aminoácido G (glicina) e variam quanto ao número nas seqüências analisadas. A quantidade destes domínios na seqüência das defensinas poderia significar uma forma de classificação das defensinas, menos restrita do que a já existente, na qual algumas defensinas não se incluem, tal como as defensinas isoladas da ervilha *Psd1* e *Psd2* (Almeida, M.S. et al., 2000). Observa-se que as defensinas *Psd1* e *Psd2* representam um sistema adequado para estudar o papel destes domínios, pois a defensina *Psd1* apresentou dois domínios de miristoilação, enquanto a defensina *Psd2* não apresentou nenhum domínio de miristoilação. Esta última apresentou somente os domínios de N-glicosilação e fosforilação por proteína kinase, tal como a *Psd1*. Curiosamente, na última linha da Tabela 1 no Anexo 1, observa-se que a defensina de inseto, denominada Formicina, apresentou três domínios de miristoilação, mostrando também conter tais domínios, mesmo sendo uma defensina não-vegetal.

1.6. Interação entre defensinas de planta e fungos

Os monohexosídeos ceramidas (CMHs) são uma classe de glicosfingolípídeos (GSLs) cuja parte hidrofóbica, a ceramida, está ligada a um monossacarídeo, geralmente glicose ou galactose (Figura 3). A ceramida consiste de duas longas cadeias apolares: a esfingosina, que é uma longa cadeia de carbono saturada, com um grupo amino (NH_2) no carbono 2, duas hidroxilas (OH) nos carbonos 1 e 3, e uma cadeia de ácido graxo insaturada ligada ao nitrogênio no carbono 2 da esfingosina. Glicosfingolípídeos são também chamados de cerebrosídeos. Dois tipos de monohexosídeos ceramidas (CMH A e C) isolados do fungo *Magnaporthe grisea* apresentaram atividade indutora do mecanismo de defesa da planta do arroz, diversificando a resistência deste vegetal contra vários fungos (Koga, J. et al., 1998; Umemura, K. et al., 2000). Logo, estes CMHs mostraram ser moléculas capazes de eliciar o proteoma de defesa da planta do arroz.

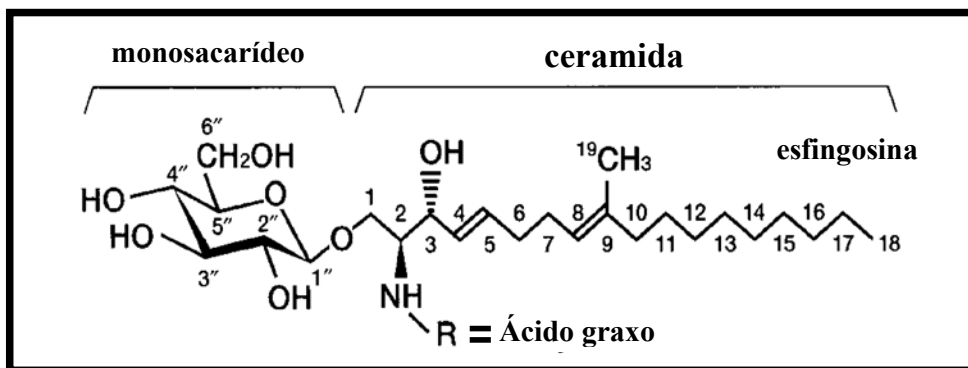


Figura 3 – Representação de esfingolípídeo do tipo CMH (monohexosídeos ceramidas). A parte hidrofílica com carga elétrica negativa = monossacarídeo e parte hidrofóbica neutra = ceramida = ácido graxo + esfingosina

Glicosíngolípídeos estão envolvidos em diversos processos celulares, tais como de sinalização e transporte de proteínas para a membrana citoplasmática (Bagnat, M. et al., 2000), de resposta em morte celular programada (Malisan, F. et al., 1999), de adesão de fungos na membrana do hospedeiro (Ghannoum, M. et al., 1987; Jimenez-Lucho, V. et al., 1990; Koga, J. et al., 1998; Umemura, K. et al., 2000), como também, esfingolípídeos em microdomínios da membrana foram apontados como os responsáveis pela mudança de conformação de proteínas em doenças causadas pelo vírus HIV, por prions e Alzheimer (Raulin, J., 2002; Mahfoud, R. et al., 2002).

Em relação à interação entre defensinas de planta e microdomínios da membrana de fungos, tem sido mostrada na literatura (Thevissen, K et al., 1999, 2003) uma série de respostas específicas de membrana na presença das defensinas isoladas da dália *DmAMP1* e do rabanete *RsAFP2*, tal como, a permeabilização da membrana do fungo *Neurospora crassa*, resultando no aumento da entrada de cálcio e da saída de potássio da célula.

Thevissen, K. et al. (2000 a e b) observaram que o produto de um gene de *Saccharomyces cerevisiae* IPT1 confere ação antifúngica a defensina *DmAMP1*. Tal gene (IPT1) foi identificado no genoma do *S. cerevisiae*, codificando uma enzima inositol fosfotransferase, que catalisa a última etapa da síntese de uma classe de esfingolípídeo de membrana denominado manosil diinositolfosfato ceramida [M(IP)₂C]. Recentemente, Aerts, A.M. et al. (2006) correlacionaram a atividade antifúngica da defensina *DmAMP1* com a presença destes esfingolípídeos complexos na membrana de leveduras. Desta maneira, esfingolípídeos na membrana de fungos parecem ser alvos da estratégia de defesa da planta. Entretanto, a interação entre a defensina do rabanete *RsAFP2* e outra classe de esfingolípídeos, as glicosilceramidas, na membrana citoplasmática da levedura *Pichia pastoris* demonstrou ser condição necessária, mas insuficiente, para a inibição do crescimento do fungo, sugerindo o envolvimento de outros alvos para a atividade antifúngica (Thevissen, K. et al., 2003). Ao utilizar uma variante da defensina *RsAFP2* (*RsAFP2*(Y38G)), Thevissen, K. et al. (2004) demonstraram que esta variante desprovida de atividade antifúngica é capaz de se ligar a glicosilceramidas, mas não causa permeabilização da membrana de *P. pastoris*. Estes experimentos sugeriram uma interação específica entre as defensinas com esfingolípídeos complexos na membrana do fungo, no entanto,

esta poderia apenas representar uma porta de entrada para as defensinas se direcionarem a alvos citoplasmáticos.

Um modelo que une vários resultados experimentais e explica a atividade antimicrobiana da maioria das defensinas é o modelo de Shai-Matsuzaki-Huang (Zasloff, M., 2002b), um modelo no qual há a formação de um tapete de defensinas na membrana externa do invasor, como ilustrado na Figura 4.

A estrutura de diversas famílias de defensinas de diferentes espécies apresenta carga elétrica resultante positiva concentrada, o que sugere uma atração eletrostática forte com esfingolipídios ácidos cuja parte hidrofílica apresenta carga elétrica negativa apontada para o exterior da membrana citoplasmática (fase a). Assim, este modelo sugere que as defensinas cobrem a membrana externa como um tapete, provocando a alteração da estrutura da membrana, com deslocamentos de lipídeos e afinamento da sua espessura (fase b). Em seguida, ocorre uma transição de fase da membrana, com formação de poros transientes e inserção da defensina na membrana (fase c). A membrana se refaz e algumas defensinas conseguem passar para a parte interna da membrana (fase d). Esta fase d pode resultar em dois distintos tipos de mecanismos de ação das defensinas: a difusão das defensinas para o citoplasma e possível interação com alvos intracelulares (fase e) ou a ruptura violenta da membrana associada à interação entre as defensinas e componentes da membrana (fase f) (Zasloff, M., 2002b).

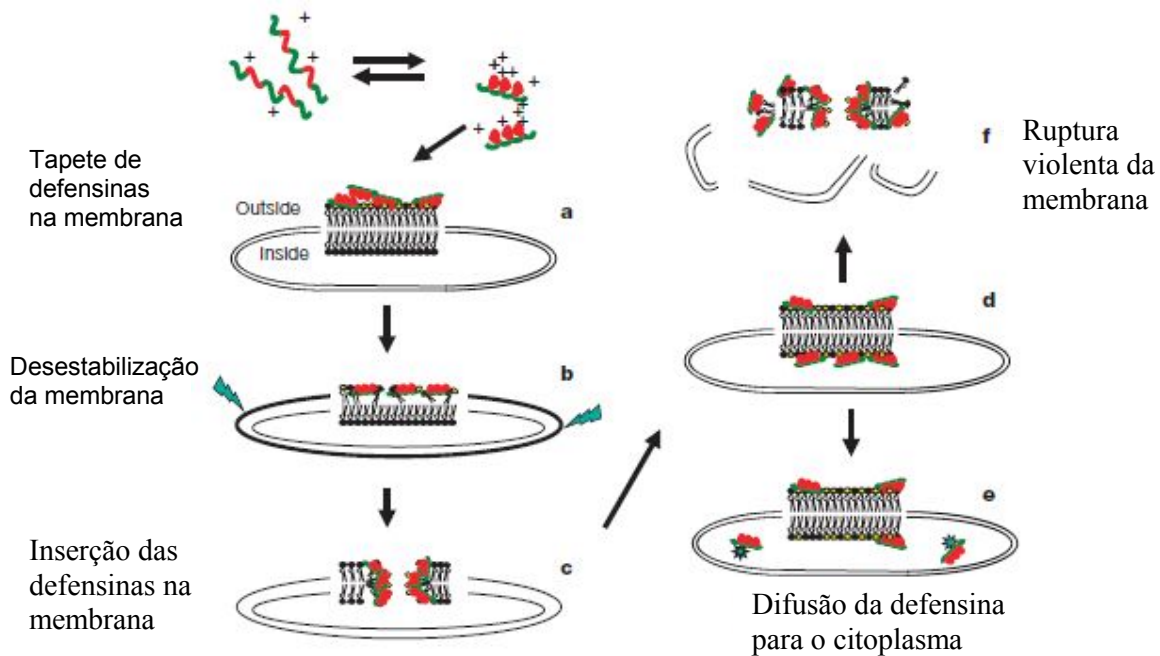


Figura 4 - Modelo de Shai-Matsuzaki-Huang ou também chamado “modelo do tapete”. (a) Interação eletrostática entre domínios de carga positiva na estrutura da defensina e cabeças de carga negativa de esfingolípídios na membrana. (b) Desestabilização da membrana. (c) Inserção das defensinas na membrana. (d) Transporte das defensinas para a parte interna da membrana. (e) Difusão da defensina da membrana interna para o citoplasma e interação com alvos intracelulares. (f) Ruptura da membrana e extravasamento do material citoplasmático para o exterior. Adaptado de Zasloff, M., 2002b.

1.7. Duas diferentes estratégias de ação antifúngica da defensina *Psd1*

Os dois mecanismos alternativos de ação antifúngica no modelo teórico de Shai-Matsuzaki-Huang, descrito acima (fase e ou f no diagrama acima), foram identificados experimentalmente e especificamente para a defensina *Psd1* em imagens de microscopia de contraste interdifereencial e por fluorescência (Cabral K.M., 2003). Estes mecanismos, aparentemente desacoplados, resultaram na observação de dois fenômenos distintos: o primeiro implicando na difusão da defensina para o interior do fungo (fase e), e o segundo, na ruptura violenta da membrana do fungo na região apical (fase f).

Na fase e, observou-se a difusão da defensina *Psd1* para o interior da hifa madura: a defensina *Psd1* é internalizada para dentro da hifa do fungo, onde neste caso, não há ruptura dos limites celulares. Esta defensina atravessou a parede celular e a membrana citoplasmática do fungo, podendo possivelmente interagir com alvos internos.

Na fase f, observou-se a ruptura da membrana na região do ápice da hifa em crescimento: esta ação antifúngica da *Psd1* decorreu duma explosão violenta da região apical, com o extravasamento do conteúdo citoplasmático do fungo para o meio exterior. Esta explosão pode estar relacionada com o fato das defensinas de planta interagirem com lipídeos da membrana. De fato, Rodrigues, M. L. et al (2000), examinando a distribuição de lipídeos complexos na superfície de células de *Cryptococcus neoformans*, mostraram por microscopia confocal que, em particular, os monohexosídeos ceramidas se localizam na região do ápice de células, em processo de divisão celular.

Estes experimentos puderam distinguir os dois mecanismos alternativos de ação antifúngica das defensinas isoladas da ervilha: um de ruptura da membrana tal como detergentes e outro, sem a ruptura da membrana citoplasmática, a defensina é internalizada e possivelmente interage com alvos intracelulares. Defensinas de planta parecem ter evoluído múltiplas e paralelas estratégias de ação contra a infecção por fungos. Uma questão importante é como a interação entre a defensina de planta e esfingolipídios complexos está envolvida com as

propriedades líticas nas membranas de fungos ou com o processo de entrada do peptídeo para o interior das hifas e efeitos intracelulares.

1.8. Objetivo e justificativa do uso do sistema Duplo-Híbrido

Este trabalho focalizará a estratégia de ação intracelular da defensina de planta *Psd1*, tendo como objetivo identificar possíveis interações proteína-proteína específicas entre a defensina *Psd1* e proteínas de fungo.

Como ainda não foram identificadas proteínas de fungo, alvos intracelulares das defensinas de planta, o sistema Duplo-Híbrido baseado em GAL4 para a levedura foi escolhido como modelo experimental, com a finalidade de investigar se proteínas do fungo *Neurospora crassa* interagem fisicamente com a defensina de planta *Psd1*.

No sistema Duplo-Híbrido, baseado em GAL4, a interação proteína-proteína é monitorada através da expressão, de genes característicos, chamados repórteres, que estão sob controle de elementos de sequência do promotor específico para o fator de transcrição GAL4 na levedura. Este sistema é constituído de um método genético para a detecção de interações do tipo proteína-proteína baseado no fator de transcrição GAL4 que pode ser fragmentado em dois domínios separados e distintos: o domínio de ligação ao DNA (BD="Binding Domain") e o domínio de ativação da transcrição (AD="Activation Domain"). Deste modo, este sistema surgiu da idéia de que se duas proteínas X e Y interagem fisicamente, então, obtendo-se, separadamente, a proteína (X) híbrida ao domínio de ligação ao DNA (BD) e a outra (Y) híbrida ao domínio de ativação (AD), estas em sua forma híbrida serão capazes de manter fisicamente a interação. Como, na verdade, são duas proteínas híbridas que estão interagindo fisicamente entre si, o método é chamado de Duplo-Híbrido. Somente haverá transcrição do gene repórter na levedura se ambas as proteínas híbridas X e Y interagirem fisicamente.

Fields, S. e Song, O.K. (1989) descreveram o primeiro sistema Duplo-Híbrido, assumindo as seguintes premissas:

1. As proteínas devem ser capazes de manterem sua integridade estrutural na forma híbrida.
2. A afinidade entre as proteínas híbridas é suficiente para reconstituir o sinal de transcrição.
3. O domínio de ativação deve estar acessível para a maquinaria de transcrição, mesmo quando presente em proteínas híbridas.
4. A interação deverá ocorrer no núcleo da levedura onde estão os genes repórteres; portanto, é de se esperar que proteínas não-nucleares possam ser direcionadas para o núcleo. Hoje em dia, é possível construir vetores sintéticos que carregam sinais que induzem a localização nuclear.

Este sistema, não só revela uma interação entre duas proteínas “face a face”, como também, permite fazer um rastreamento ou varredura em uma biblioteca de cDNA (biblioteca de expressão) ou em uma biblioteca genômica, utilizando uma proteína conhecida (X) como “isca” para detectar proteínas expressas pela biblioteca, capazes de formarem interações físicas e diretas com esta proteína X. Não só a interação é identificada, como também o cDNA ou gene codificando a proteína interagente fica disponível para estudos subsequentes. Vale ressaltar que o projeto genoma do fungo *Neurospora crassa* foi finalizado em 2003 e seu genoma encontra-se seqüenciado e disponível em bancos de dados. Desta maneira, escolhemos para rastrear uma biblioteca de expressão da fase conidial da *N. crassa*, a fim de detectar proteínas desconhecidas alvos da defensina de planta *Psd1* durante a fase inicial do crescimento do fungo. Se o peptídeo *Psd1* interage diretamente com uma proteína desconhecida expressa pela biblioteca, estas provavelmente integram direta ou indiretamente um mesmo conjunto de funções ou informações correlacionadas.