

3. Resultados

3.1. O sistema de varredura Duplo-Híbrido para detecção de interações entre o peptídeo *Psd1* e as proteínas do fungo *N. crassa*

Para identificar as proteínas do fungo, *Neurospora crassa*, capazes de interagirem diretamente com a defensina antifúngica de planta *Psd1*, foi utilizado o sistema de rastreamento por Duplo-Híbrido baseado no fator de transcrição GAL-4 em levedura. O peptídeo *Psd1* serviu de “isca” para possíveis “alvos” intracelulares do fungo. Estas proteínas-alvos, capazes de interagirem fisicamente com o peptídeo *Psd1*, foram expressas de uma biblioteca de cDNA de *N. crassa* representativa do transcriptoma relativo a fase conidial do fungo. Esta biblioteca foi construída pelo FGSC empacotada em fago Lambda (λ) em vetor HybriZAP 2.1, a qual foi convertida em uma biblioteca de plasmídeos pAD-GAL4-2.1 contendo insertos (Y_i) de cDNA do fungo *N. crassa* fusionados ao domínio de ativação da transcrição (AD – “Activation Domain”), do fator de transcrição GAL4, conforme descrito na seção 2.3 do “Materiais e Métodos”.

A conversão da biblioteca de fago λ de cDNA de *N. crassa* no vetor HybridZAP-2.1 para uma biblioteca de fagemídeos em pAD-GAL4-2.1 recombinantes foi realizada com a ajuda de um fago denominado “Helper”, contendo as proteínas necessárias para a excisão e empacotamento do plasmídeo pAD-GAL4-2.1 recombinante. A biblioteca de fagemídeos foi convertida em uma biblioteca ou “pool” de plasmídeos, utilizando-se a cepa *E. coli* XLORL. O fago “Helper” não pode crescer em bactéria XLORL e estas células também são resistentes à infecção por fago λ , garantindo que não haja lise por algum fago λ residual.

O “pool” de plasmídeos representando uma biblioteca de cDNA de *N. crassa* em pAD-GAL4-2.1 foi obtido amplificando a biblioteca de “fagemídeos” em 500 mL de cultura de XLORL em meio líquido LB na presença de ampicilina

e isolando-se o DNA plasmidial do pellet das células por lise alcalina (Vide Anexo 2 e 3 – Protocolo do Duplo-Híbrido).

Os insertos de cDNA foram clonados nos sítios únicos *EcoRI* e *XhoI* do vetor pAD-GAL4 2.1. Algumas colônias resgatadas em placa de agar LB-ampicilina foram selecionadas randomicamente e seus DNAs isolados, prosseguindo a análise do plasmídeo recombinante por digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* (Figura 7). Alguns plasmídeos recombinantes podem conter sítios *EcoRI* e *XhoI* dentro da sequência de cDNA do inserto, evidenciando limitações do método, como demonstrado na penúltima coluna da Figura 7b, onde 2.500 bp é a soma dos fragmentos encontrados.

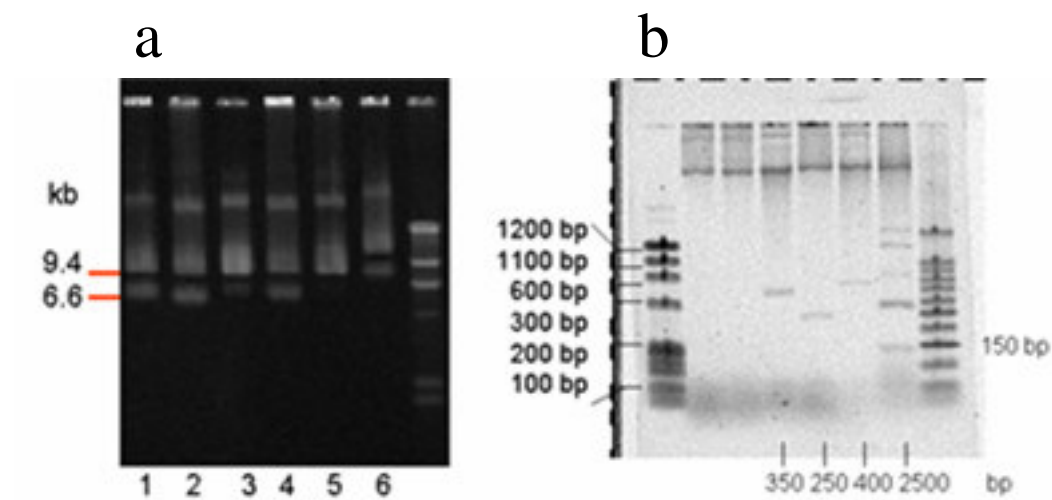


Figure 7 - Análise por eletroforese em gel de agarose de plasmídeos pAD-Yi de colônias de XLRLR selecionadas randomicamente por ampicilina. Em (a) DNA plasmidial não digerido (1 a 6). Em (b) DNA plasmidial das colônias selecionadas em (a) de 1 a 6, digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*.

O plasmídeo “isca” foi construído pela fusão do cDNA da defensina de planta *Psd1* com a sequência do domínio de ligação (BD) ao DNA nos sítios únicos *EcoRI* e *SalI* do vetor pBD-GAL4 Cam. Primeiramente, a levedura YRG-2 foi transformada com este plasmídeo “isca”, denominado pBD-*Psd1*.

O plasmídeo “isca” foi digerido com *EcoRI* e *SalI* (Figura 8a), como também foi analisado por PCR com os oligonucleotídeos dos terminais N e C da *Psd1* (Figura 8b), mostrando conter um fragmento com 150 bp, equivalente ao tamanho do gene codificando o peptídeo *Psd1*.

Com o intuito de verificar se as células de levedura YRG-2 transformadas com pBD-*Psd1* expressavam o peptídeo *Psd1* com função ativa, um ensaio antifúngico contra o fungo *N. crassa* foi realizado em monocamadas de leveduras. Cresceram-se, então, monocamadas de células de levedura YRG-2 transformadas com pBD-*Psd1* ou YRG-2 transformadas com pBD-WT (controle), em meio sólido adequado, em placa de Petri, e estas foram infectadas com conídios do fungo *N. crassa* na região central. Observou-se, na monocamada de células controle (Figura 8c), que o fungo espalhou-se radialmente por toda a placa, enquanto, na monocamada de células YRG-2 transformadas com o plasmídeo pBD-*Psd1* (Figura 8d), o crescimento do fungo não ocorreu. As células YRG-2 transformadas com o plasmídeo pBD-*Psd1* ficaram protegidas da infecção com o fungo *N. crassa*, indicando a expressão do peptídeo *Psd1* com função antifúngica ativa nestas células.

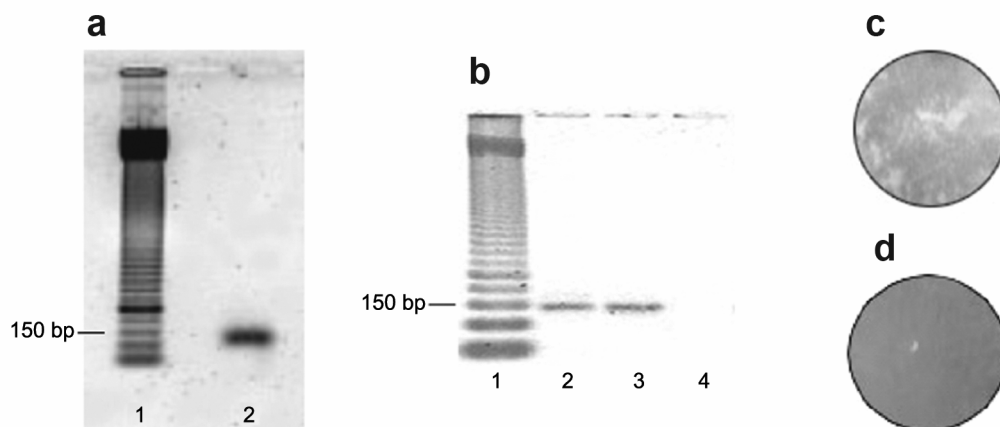


Figura 8 - Análise do plasmídeo “isca” pBD-*Psd1* do sistema Duplo-Híbrido.

Encarte (a) Por digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SalI*: Marcador padrão de 50 bp (coluna 1) e fragmento *EcoRI* - *SalI* correspondendo ao cDNA da *Psd1* (coluna 2). Encarte (b) Por amplificação do DNA por PCR utilizando os iniciadores dos terminais 5' e 3' da *Psd1*: Marcador padrão de 50 bp (coluna 1), produto de 150 bp do plasmídeo “isca” pBD-*Psd1* (coluna 2), produto de 150 bp do plasmídeo pPIC9K-*Psd1* (coluna 3 - controle positivo) e com o vetor parental pBD-GAL4 (coluna 4 - controle negativo). Tamanho 150 bp está indicado nos encartes a e b. Encartes (c) e (d): Crescimento radial do fungo *N. crassa* em monocamadas de células YRG-2: Encarte (c) monocamada de células controle contendo o plasmídeo pBD-WT não expressam *Psd1* e permitem o espalhamento radial do fungo. Encarte (d) monocamada de células YRG-2 contendo o plasmídeo “isca” pBD-*Psd1* mostrou completo impedimento do crescimento do fungo, indicando a expressão do peptídeo *Psd1* com função antifúngica ativa.

A levedura YRG-2, contendo os genes repórteres *LacZ* e *HIS3*, foi transformada simultaneamente com o plasmídeo pBD-*Psd1* e a biblioteca de cDNA de *N. crassa*. Desta co-transformação resultaram aproximadamente 2×10^6 transformantes em meio SD - Leu⁻ e Trp⁻. Ao testar a atividade da β -galactosidase, deve-se ter as colônias de leveduras organizadas para melhores resultados; assim, colônias foram repassadas para novas placas de meio SD - Leu⁻ e Trp⁻, garantindo a presença dos plasmídeos “isca” e “alvo”, e em seguida, detectar a atividade da β -galactosidase como primeiro critério de rastreamento por Duplo-Híbrido por meio do ensaio em papel de filtro (Figura 9).

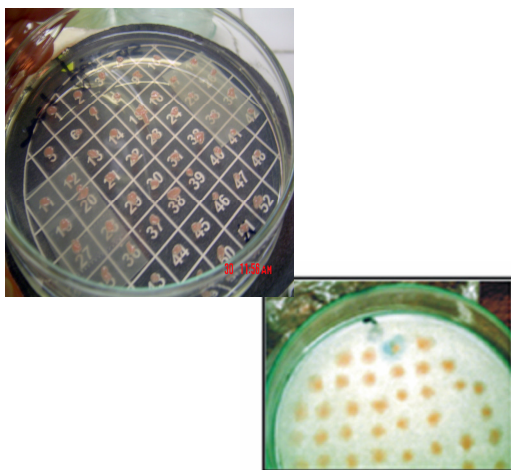


Figura 9 - Rastreamento de candidatos contendo a interação entre a proteína “isca” e uma proteína “alvo” medido pela expressão do gene repórter *LacZ*. Colônias de YRG-2 contendo os plasmídeos “isca” e “alvo”, em meio SD - Trp⁻ e Leu⁻, foram analisadas para detecção da atividade da enzima β -galactosidase pelo ensaio em papel de filtro embebido com o substrato X-gal. Observa-se nesta placa, uma colônia azul contendo a interação.

Quinze colônias azuis foram detectadas pela expressão do gene repórter *LacZ* (Figura 10 - 1º critério). Seguindo o segundo critério de detecção de interação proteína-proteína, estes quinze transformantes foram replaqueados em meio sólido SD - Leu⁻, Trp⁻ e His⁻, confirmando os quinze candidatos contendo interações fortes pela expressão do gene repórter HIS3 (Figura 10 – 2º critério).

Como explicado anteriormente, a expressão em baixos níveis do gene repórter HIS3 pode ocorrer na ausência de interação entre os domínios BD e AD do fator de transcrição GAL4, apontando outra limitação do método. Desta maneira, como terceiro critério de seleção, foram adicionadas variadas concentrações de 3-AT nas placas de meio SD⁻, Leu⁻, Trp⁻ e His⁻, com o objetivo de inibir o vazamento de expressão dado pelo gene repórter HIS3. Como mostrado na literatura, concentrações de 3-AT menores ou igual a 5 mM não apresentaram toxicidade para a levedura (Faure, J.D., Gingerich, D. e Howell, S. H., 1998; Ssoellick, T.R. et al., 2000; Ohkura, N. Et al., 2001). Apesar de concentrações maiores do que 5 mM inibirem o crescimento da levedura, na concentração de 15 mM de 3-AT, pode-se distinguir crescimento mais intenso de algumas colônias em relação a outras (Figura 10 – 3º critério). Interações mais fortes diferenciadas com 15 mM de 3-AT, tais como Y₁, Y₂ e Y₁₅ estão listadas a seguir na Tabela 2. No entanto, este 3º critério não apresentou uma seleção bem definida, de modo que a análise dos quinze candidatos crescendo na condição de 5 mM 3-AT foi encaminhada para re-confirmação.

Os plasmídeos “alvos” de cada candidato foram isolados da levedura YRG-2 em quantidades suficientes para transformação em *E. coli* (Ver o protocolo do Duplo-Híbrido no Anexo 3).

Para re-confirmar as interações, co-transformações individuais da levedura YRG-2 foram realizadas com os plasmídeos “isca” e cada um dos quinze “alvos” isolados separadamente, como quarto critério de detecção de interação proteína-proteína. Estas leveduras, cada qual contendo um inserto alvo selecionado, foram crescidas em meio SD⁻, Leu⁻, Trp⁻ e His⁻ suplementado com 5 mM de 3-AT, seguido dos controles de interação positivo C1 e de interação negativo C2, como remarcado na figura 10 (4º critério).

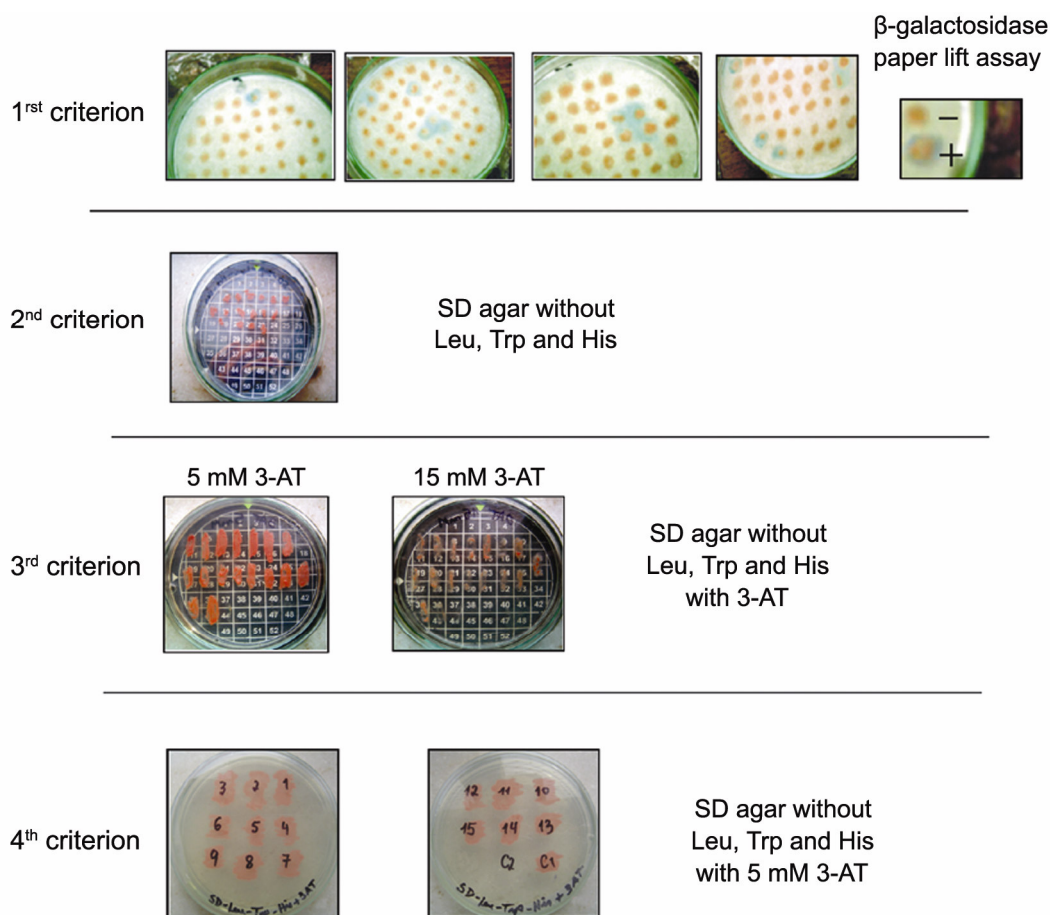


Figura 10 - Seleção de candidatos por rastreamento em sistema Duplo-Híbrido baseado em levedura. 1^o critério: expressão do gene reporter *LacZ* detectado por ensaio da atividade de β- galactosidase em papel de filtro embebido com o substrato X-gal. Pequena imagem a direita mostra os controles: positivo (+) e negativo (-) para este ensaio. 2^o critério: expressão do gene repórter *HIS3* nas quinze colônias selecionadas pelo critério anterior. 3^o critério: expressão do gene repórter *HIS3* na presença de 5 mM e 15 mM de 3-AT. 4^o critério: co-transformação de YRG-2 com o plasmídeo “isca” pBD-*Psd1* e cada um dos plasmídeos selecionados pAD-Yi (i = 1 a 15), seguidos dos controles de interação positivo (C1) e negativo (C2).

Insertos (cDNA)	BLASTN	e-value BLASTN	BLASTX	e-value BLASTX	Localização da proteína	Função da proteína	Tamanho (aa)
Y ₁	nc004 196 h20	5.5e-53	4nc448 040	0,14	nuclear	Cyclin F-box/WD-repeat	1010
Y ₂	nc004 196 h20	1.1e-52	4nc448 040	0,15	nuclear	Cyclin F-box/WD-repeat	1010
Y ₃	nc004 045 i17	2.6e-92	29e8 260	0,95	nuclear	Zn-finger like PHD finger	948
Y ₄	nc004 196 i23	3.4e-49	7nc605 250	0,0064	membrana	desconhecida	683
Y ₅	-	-	2nc610 340	0,97	nuclear	Uni-Zap clone A1H06NP5'	713
Y ₆	nc004 051 f19	0.00064	3nc310 110	0,15	nuclear	desconhecida	103
Y ₇	nc004 196 i23	1.8e-48	7nc605 250	0,0064	membrana	desconhecida	683
Y ₈	nc004 178 m02	1.0e-48	1nc400 220	0,05	nuclear	Similar a YGR280c	369
Y ₉	nc004 125 f22	1.1e-32	b16b8 350	1,4e-23	nuclear	desconhecida	587
Y ₁₀	-	-	-	-	-	-	-
Y ₁₁	-	-	-	-	-	-	-
Y ₁₂	nc004 017 e03	8.4e-26	4nc570 330	0,36	nuclear	Uni-Zap clone C1D03NP5'0.0	518
Y ₁₃	-	-	-	-	-	-	-
Y ₁₄	-	-	-	-	-	-	-
Y ₁₅	nc004 196 h20	2.7e-39	4nc448 040	0,14	nuclear	Cyclin F-box/WD-repeat	1010

Tabela 2 - Os quinze candidatos selecionados pelo Duplo-Híbrido em estudo. Suas seqüências foram analisadas por MIPS WU-BLAST 2.0 Similarity Search against *N. crassa* databases (http://mips.gsf.de/cgi-bin/blast/blast_page?genus=Ncrassa). Traço (-) refere-se a nenhuma similaridade com seqüências de *N. crassa*.

Todos os quinze candidatos tiveram seus plasmídeos alvos isolados e sequenciados por Eton Biosciences Inc.. Suas seqüências foram analisadas por MIPS WU-BLAST 2.0 Similarity Search against *N. crassa* databases (http://mips.gsf.de/cgi-bin/blast/blast_page?genus=Ncrassa).

Como mostrado na Tabela 2, onze candidatos selecionados pelo sistema Duplo-Híbrido em questão exibiram similaridades com seqüências de nucleotídeos e aminoácidos de *N. crassa* como analisado por BLASTN (nucleotídeo para nucleotídeo) e/ou BLASTX (nucleotídeo para proteína) nos bancos de dados de *N. crassa* por MIPS. Quatro candidatos não apresentaram similaridades com nenhuma seqüência de *N. crassa*, sendo descartados deste estudo. Nove seqüências dentre os onze candidatos selecionados apresentaram similaridades com proteínas nucleares da *N. crassa*. Os insertos de cDNA: Y₁, Y₂ e Y₁₅ (Tabela 2) mostraram serem seqüências muito próximas, repetindo três vezes o mesmo resultado da pesquisa do banco de dados da *N. crassa* dado por MIPS. Sendo identificada a mesma seqüência três vezes em um rastreamento por biblioteca em sistema Duplo-Híbrido, pôde-se inferir que a probabilidade deste candidato ser um falso positivo reduziu-se consideravelmente.

A seguir, encontram-se os alinhamentos das três seqüências de cDNA Y₁, Y₂ e Y₁₅ analisadas pelo programa LALIGN em pares: Y₁ e Y₂ com 98,4% de similaridade e Y₁ e Y₁₅ com 98,3% de similaridade, mostrando serem seqüências muito próximas e codificando a mesma proteína.

ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS Y1 e Y2:

```

      1                                     60
Y1 ACTGCGTTTACTTAAGCTTATGCACATATCCCGAGCCAGCAAGAGCAGGATAAAGAAGGA
Y2 ACTGCGTTTACTTAAGCTTATGCACATATCCCGAGCCAGCAAGAGCAGGATAAAGAAGGA

      61                                     120
Y1 CAAGAAGGAGCCTGTTGCCAACCAAGACCCCGTTTCTCCAAGTCTGGTACAAGGAAGGAT
Y2 CAAGAAGGAGCCTGTTGCCAACCAAGACCCCGTTTCTCCAAGTCTGGTACAAGGAAGGAT

      121                                     180
Y1 AGTGAAGCCAAACAATAACAACATGCCAGCAGTGACGATGGCCTGGAGCACAACAAAAT
Y2 AGTGAAGCCAAACAATAACAACATGCCAGCAGTGACGATGGCCTGGAGCACAACAAAAT

      181                                     240
Y1 CCAGAATGGCAAAGCCCCCAGGGATCCTGTGACTGAAAAGTGTGTTTCAGGGAGAGGAGAA
Y2 CCAGAATGGCAAAGCCCCCAGGGATCCTGTGACTGAAAAGTGTGTTTCAGGGAGAGGAGAA

      241                                     300
Y1 GGAGAGCTCCAATGACTCCACCTCAGTCAGTGCTGTTGCCTCTAATATGAGAGATGATGA
Y2 GGAGAGCTCCAATGACTCCACCTCAGTCAGTGCTGTTGCCTCTAATATGAGAGATGATGA

```

301 360
Y1 AATAACCCAGGATGAAAACACAGTTTCCACTTCCCTGGGCCATTCCAAAGATGAGAACTC
Y2 AATAACCCAGGATGAAAACACAGTTTCCACTTCCCTGGGCCATTCCAAAGATGAGAACTC

361 420
Y1 TAAGCAAACATGCATCAGAATTGGCACCAAGACCCCCAAAAAGTGACTCATGTACCCCAAC
Y2 TAAGCAAACATGCATCAGAATTGGCACCAAGACCCCCAAAAAGTGACTCATGTACCCCAAC

421 480
Y1 TAATACCACCGTGGAGGTAGTGGGGTCTTCAGGTCAGAATGGAGATGAAAAGCAGAATAT
Y2 TAATACCACCGTGGAGGTAGTGGGGTCTTCAGGTCAGAATGGAGATGAAAAGCAGAATAT

481 540
Y1 TGTAGCCCGCAAGATTGTGAAGATGACTAAGCAGCCTGCAAAAAAGAAGCCTCCTCCTTC
Y2 TGTAGCCCGCAAGATTGTGAAGATGACTAAGCAGCCTGCAAAAAAGAAGCCTCCTCCTTC

541 600
Y1 CCGGGAAAAGAAAGTCACCAGGACAATCTTGGCTATTTAATCTAGAGGGCCCGTTTAAAC
Y2 CCGGGAAAAGAAAGTCACCAGGACAATCTTGGCTATTTAATCTAGAGGGCCCGTTTAAAC

601 660
Y1 CCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCC
Y2 CCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCC

661 720
Y1 CGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAATGAGGA
Y2 CGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAATGAGGA

721 780
Y1 AATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGA
Y2 AATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGA

781 840
Y1 CAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAAGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCT
Y2 CAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAAGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTA

841 900
Y1 TGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCACGCGCCCTGTAG
Y2 TGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCACGCGCCCTGTAG

901 960
Y1 CGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG
Y2 CGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

961 1020
Y1 CGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTCTCGCCACGTTGCGCGGGC
Y2 CGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTCTCGCCACGTTGCGCGG-C

1021 1080
Y1 TTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGG
Y2 TTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGG

1081 1130
Y1 CACCTCGACCCCCAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACGTANGG----CATCGCCCTG
Y2 CACCTCGACCCCCAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCCCGTAGTGGGGCCATCGCCCTG

1151
Y1 ATAGACGGTTTTCGCCCTT
Y2 ATAGACGGTTTTCCGCCCTT

ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS Y1 e Y15:

```

1                                     60
Y1 AACTGCGTTTACTTAAGCTTATGCACATATCCCGAGCCAGCAAGAGCAGGATAAAGAAGG
Y15 AACTGCGTTTACTTAAGCTTATGCACATATCCCGAGCCAGCAAGAGCAGGATAAAGAAGG

61                                     120
Y1 ACAAGAAGGAGCCTGTTGCCAACCAAGACCCCGTTTCTCCAAGTCTGGTACAAGGAAGGA
Y15 ACAAGAAGGAGCCTGTTGCCAACCAAGACCCCGTTTCTCCAAGTCTGGTACAAGGAAGGA

121                                     180
Y1 TAGTGAAGCCAAACAATAACAACATGCCAGCAGTGACGATGGCCTGGAGCACAAACAAA
Y15 TAGTGAAGCCAAACAATAACAACATGCCAGCAGTGACGATGGCCTGGAGCACAAACAAA

181                                     240
Y1 TCCAGAATGGCAAAGCCCCCAGGGATCCTGTGACTGAAAAGTGTGTTTCAGGGAGAGGAGA
Y15 TCCAGAATGGCAAAGCCCCCAGGGATCCTGTGACTGAAAAGTGTGTTTCAGGGAGAGGAGA

241                                     300
Y1 AGGAGAGCTCCAATGACTCCACCTCAGTCAGTGCTGTTGCCTCTAATATGAGAGATGATG
Y15 AGGAGAGCTCCAATGACTCCACCTCAGTCAGTGCTGTTGCCTCTAATATGAGAGATGATG

301                                     360
Y1 AAATAACCCAGGATGAAAACACAGTTTCCACTTCCCTGGGCCATTCCAAAGATGAGAACT
Y15 AAATAACCCAGGATGAAAACACAGTTTCCACTTCCCTGGGCCATTCCAAAGATGAGAACT

361                                     420
Y1 CTAAGCAAACATGCATCAGAATTGGCACCAAGACCCCCAAAAAGTGACTCATGTACCCCAA
Y15 CTAAGCAAACATGCATCAGAATTGGCACCAAGACCCCCAAAAAGTGACTCATGTACCCCAA

421                                     480
Y1 CTAATACCACCGTGGAGGTAGTGGGGTCTTCAGGTCAGAATGGAGATGAAAAGCAGAATA
Y15 CTAATACCACCGTGGAGGTAGTGGGGTCTTCAGGTCAGAATGGAGATGAAAAGCAGAATA

481                                     540
Y1 TTGTAGCCCGCAAGATTGTGAAGATGACTAAGCAGCCTGCAAAAAGAAGCCTCCTCCTT
Y15 TTGTAGCCCGCAAGATTGTGAAGATGACTAAGCAGCCTGCAAAAAGAAGCCTCCTCCTT

541                                     600
Y1 CCCGGGAAAAGAAAGTCACCAGGACAATCTTGGCTATTTAATCTAGAGGGCCCGTTTAA
Y15 CCCGGGAAAAGAAAGTCACCAGGACAATCTTGGCTATTTAATCTAGAGGGCCCGTTTAA

601                                     660
Y1 CCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCC
Y15 CCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCC

661                                     720
Y1 CCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAGTGCCTTTCCTAATAAAATGAGG
Y15 CCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAGTGCCTTTCCTAATAAAATGAGG

721                                     780
Y1 AAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGG
Y15 AAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGG

781                                     840
Y1 ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTA
Y15 ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTA

841                                     900
Y1 TGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCACGCGCCCTGTAG
Y15 TGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCACGCGCCCTGTAG

901                                     960
Y1 CGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG
Y15 CGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

961                                     1020
Y1 CGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCACGTTTCGCCGGCTT
Y15 CGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCACGTTTCGCCGGCTT

1021                                     1080
Y1 TCCCCTGTCGAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGTTCCGATTAGTGCTTACGGCA
Y15 TCCCCTGTCGAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGTTCCGATTAGTGCTTACGGCA

```

```

      1081                                     1140
Y1  CCTCGACCCCAAAAACCTGATTAGGGTGATGGTTCACGTANGG  CATC  GCCCTGATAGA
Y15 C-TCGACCC  -- AAAACT  GAT-A - GGTGATGAT  CACGTATGGGCATCCGCCCTGAAGA

      1141                                     1164
Y1  CGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGG  AGT
Y15 CGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGGAGT

```

Ao pesquisar por homologias de sequência em *N. Crassa* MIPS BLAST nucleotídeo para nucleotídeo, teve-se o seguinte resultado para a sequência Y1, similar também às sequências Y2 e Y15:

```

>nc004_196_h20.q1ca.exp
Length = 793

```

Plus Strand HSPs:

Score = 1278 (197.8 bits), Expect = 5.5e-53, P = 5.5e-53
 Identities = 264/269 (98%), Positives = 264/269 (98%), Strand = Plus / Plus

```

Query:
888  ACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCG
947

```

```

Sbjct:
524  ACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCG
583

```

```

Query:
948  CTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCA 1007

```

```

Sbjct:
584  CTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCA 643

```

```

Query:
1008CGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTA
1067

```

```

Sbjct:
644  CGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTA 703

```

```

Query:
1068  GTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTGATTAGGGTGATGGTTCACGTA  NGG  C 1127

```

```

Sbjct:
704  GTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTGATTAGGGTGATGGTTCACGTA  GNGG  GGC 763

```

```

Query: 1128 ATCGCCCTGATAGACGGTTTT  CGCCCTT 1156

```

```

Sbjct: 764 ATCGCCCTGATAGACGGTTTT  CGCCCTT 792

```

O BLASTX da sequência de nucleotídeos, listada acima, em *N. Crassa* MIPS BLAST nucleotídeo para proteína, apresentou similaridade com maior número de probabilidade e identidade à sequência, codificando a proteína dada por Whitehead code NCU04540.1/ 4nc448_040 (seqüências disponíveis em: http://mips.gsf.de/genre/proj/ncrassa/Search/sequence_view_nc.cgi.jsp?entry=4nc448_040).

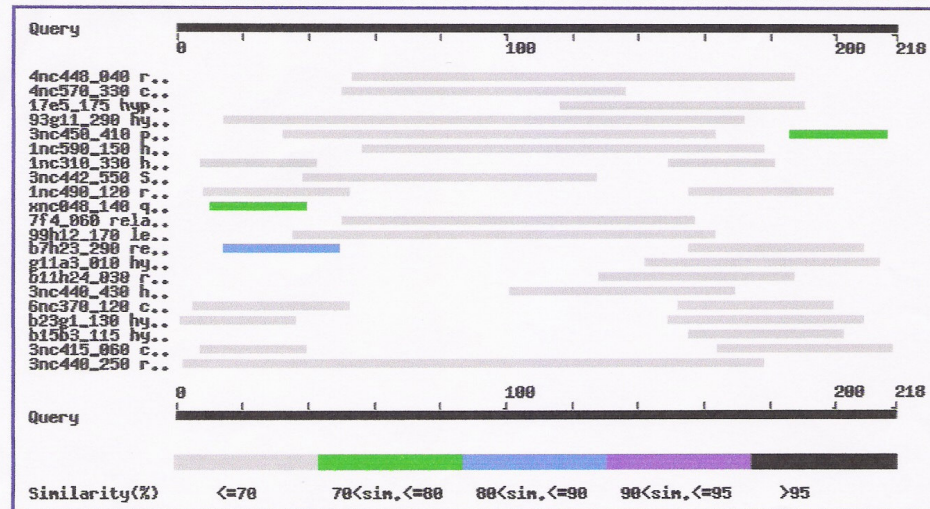
Este resultado, como mostrado a seguir, apresentou 54% de similaridade em 46 aminoácidos (e-value BLASTX = 0,15) com uma proteína nuclear pertencente à família das ciclinas, com domínio F (F-box) e domínio de repetições dos aminoácidos triptofano e aspartato (WD-repeat), cuja função está relacionada ao ciclo celular.

BLASTX sequence query of A1

Página 1 de 8

ANOstra 1 BLAST mt → PTN

BLASTX sequence query of A1

18/08/02
mips

BLASTX 2.OMP-WashU [09-Sep-2002] [decunix4.0-ev56-I32LPF64 2002-09-09T17:45:09]

Copyright (C) 1996-2002 Washington University, Saint Louis, Missouri USA.
All Rights Reserved.Reference: Gish, W. (1996-2002) <http://blast.wustl.edu>
Gish, Warren and David J. States (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. Nat. Genet. 3:266-72.

Notice: statistical significance is estimated under the assumption that the equivalent of one entire reading frame in the query sequence codes for protein and that significant alignments will involve only coding reading frames.

Query= A1
(218 letters)

Translating both strands of query sequence in all 6 reading frames

Database: Ncrassa.prot

9356 sequences; 4,819,102 total letters.

Searching....10....20....30....40....50....60....70....80....90....100% done

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Probability P(N)	Smallest Sum
			N
4nc448_040 related to F-box/WD-repeat protein	67	0.14	1
4nc570_330 conserved hypothetical protein	59	0.40	1
17e5_175 hypothetical protein	51	0.65	1
93g11_290 hypothetical protein	55	0.73	1
3nc450_410 probable protein kinase CHM1	49	0.74	2
1nc590_150 hypothetical protein	56	0.80	1
1nc310_330 hypothetical protein	41	0.87	2
3nc442_550 Stel2-like transcription factor	54	0.92	1
1nc490_120 related to LIM homeobox protein	37	0.99	2

http://mips.gsf.de/cgi-bin/tools/common_blast.pl

18/08/05

BLASTX sequence query of A1

Página 2 de 8

xnc048_140 questionable protein	39	0.994	1
7f4_060 related to CELL DIVISION CYCLE 2-RELATED PROTEIN ...	53	0.997	1
99hl2_170 leucine--tRNA ligase precursor, mitochondrial	52	0.998	1
b7h23_290 related to protein kinase SWE1	37	0.9992	2
g1la3_010 hypothetical protein	46	0.9996	1
b1lh24_030 related to microfibril-associated protein	48	0.9996	1
3nc440_430 hypothetical protein	51	0.9999	1
6nc370_120 conserved hypothetical protein	36	0.99991	2
b23g1_130 hypothetical protein	35	0.99993	2
b15b3_115 hypothetical protein	40	0.99994	1
3nc415_060 conserved hypothetical protein	40	0.99994	2
3nc440_250 related to glucan 1,4-alpha-glucosidase	52	0.99995	1

>4nc448_040 related to F-box/WD-repeat protein
Length = 1010

Plus Strand HSPs:

Score = 67 (28.6 bits), Expect = 0.15, P = 0.14
Identities = 17/46 (36%), Positives = 25/46 (54%), Frame = +2

Query: 53 RDRYTCQRPASRSFRFLP-FLSRHVRRLSPSSSKSGAPFRVPI*CF 187
RD C PS+R +P +L +H+ LS +K+G P P+ CF
Sbjct: 35 RDASPCAHPSSRQASDIPWLIQHISGLS-MENKTGWPSFSPVSCF 79

>4nc570_330 conserved hypothetical protein
Length = 518

Plus Strand HSPs:

Score = 59 (25.8 bits), Expect = 0.52, P = 0.40
Identities = 12/30 (40%), Positives = 18/30 (60%), Frame = +2

Query: 50 QDRYTCQ-RPSARSFRFLPFLSRHVRRLS 136
Q D YT + +P+A +F P H+RR+S
Sbjct: 294 QADNYTKRAQPAAEPMKFKPATREHIRRIS 323

>17e5_175 hypothetical protein
Length = 134

Plus Strand HSPs:

Score = 51 (23.0 bits), Expect = 1.1, P = 0.65
Identities = 13/28 (46%), Positives = 15/28 (53%), Frame = +2

Query: 116 RHVRRL---SPSSSKSGAPFRVPI*CFT 190
R RR +P S SG+PFR P C T
Sbjct: 45 RRARRYVTSAPRESDSGSPFRHPSTCVT 72

>93g11_290 hypothetical protein
Length = 488

Plus Strand HSPs:

Score = 55 (24.4 bits), Expect = 1.3, P = 0.73

http://mips.gsf.de/cgi-bin/tools/common_blast.pl

18/08/05

DNA VIEWER

PROTEIN VIEWER

[Report help](#)

[Report](#)
[ProtSeq](#)
[DnaSeq](#)
[Aln](#)
[BLOCKS](#)
[PROSITE](#)
[PFAM](#)
[INTERPRO](#)
[3D](#)
[SCOP](#)
[AUTOFUNCAT](#)
[COGs](#)
[BLASTP](#)
[INTERGENOME COMPARISON](#)
[INTRAGENOME COMPARISON](#)
[est](#)

[Compare genomes starting from this gene](#)

Title: 4nc448_040 related to F-box/WD-repeat protein

General properties

Length [aa]	1010
Molecular weight [Da]	111481.0
Isoelectric point	7.6
Manually edited	yes
Classification	similarity to known protein
Contig name	LGIV:4nc448
Position	[15823] 15823-18855 [18855]
GC content [%]	56.5
Classification_Blast_Hit	F-box protein Fbw1A (FBW1A) mRNA, Homo sapiens, TREMBL:AF129530_1
EMBLST_Accessions	AI399541;AI399494
PSORT_Localisation	nuclear
Whitehead_code	NCU04540.1
Sequence cluster	cluster63
REMARKS	no similarity at N- and C-terminal parts

Protein function

Closest homologue (BLASTP)	PIR:T16607 hypothetical protein K10B2.1 - Caenorhabditis elegans 6e-49
*EST	AI399494.1 _ NCSP6B6T3 SUBTRACTED PERITHECIAL NEUROSPORA CRASSA CDNA CLONE SP6B6 5' 1e-138
Functional categories	10.03.01 mitotic cell cycle and cell cycle control
Automatically derived functional categories	10 CELL CYCLE AND DNA PROCESSING 0.0 - N.crassa 10.03 cell cycle 0.0 - N.crassa 10.03.01 mitotic cell cycle and cell cycle control 0.0 - N.crassa
	COG2319 WD40 repeat protein 1e-91

http://pedant.gsf.de/cgi-bin/wwwdbp.pl?Db=Ncrassa_annotations&Alias=Ncrassa_ANN... 09/03/06

COGs	COG1520 Uncharacterized proteins of WD40-like repeat family 2e-23
PFAM domains	PF00646 F-box domain 6.8e-06 PF00400 WD domain, G-beta repeat 2.9e-05
BLOCKS	IPB001680 G-protein beta WD-40 repeats
PROSITE motifs	PROSITE:WD_REPEATS_1
INTERPRO domains	IPR001680 G-protein beta WD-40 repeat (23) IPR001810 Cyclin-like F-box (3)
Automatically derived PIR superfamilies	PIR:B48088 unassigned WD repeat proteins 5e-48 PIR:B48088 WD repeat homology 5e-48
Automatically derived EC numbers	SWISSPROT:KMHB_DICDI 2.7.1.129 myosin-heavy-chain kinase 9e-22 SWISSPROT:LI23_CAEEL developmental protein 1e-48 SWISSPROT:LI23_CAEEL cell cycle 1e-48 SWISSPROT:LI23_CAEEL cell division 1e-48 SWISSPROT:LI23_CAEEL ubl conjugation pathway 1e-48 SWISSPROT:LI23_CAEEL repeat 1e-48
Automatically derived keywords	SWISSPROT:LI23_CAEEL wd repeat 1e-48 SWISSPROT:FW1A_HUMAN alternative splicing 4e-48 PIR:B48088 duplication 5e-48 SWISSPROT:SCOB_EMENI transcription regulation 3e-22 SWISSPROT:KMHB_DICDI transferase 9e-22 SWISSPROT:KMHB_DICDI serine/threonine-protein kinase 9e-22 SWISSPROT:KMHB_DICDI atp-binding 9e-22

Protein structure

Known3D	gi 2098450 pdb 1TBG A Chain A, Beta-Gamma Dimer Of The Heterotrimeric G-Protein Transducin pdb 1TBG B Chain B, Beta-Gamma Dimer Of The Heterotrimeric G-Protein Transducin pdb 1TBG C Chain C, Beta-Gamma Dimer Of The Heterotrimeric G-Protein Transducin pdb 1TBG D Chain D, Beta-G gi 9955108 pdb 1ERJ B Chain B, Crystal Structure Of The C-Terminal Wd40 Dom Of Tup1 pdb 1ERJ C Chain C, Crystal Structure Of The C-Terminal Wd40 Domain C Tup1 pdb 1ERJ A Chain A, Crystal Structure Of The C-Terminal Wd40 Domain C Tup1 gi 4139469 pdb 1A0R B Chain B, Heterotrimeric Complex Of PhosducinTRANSDUCIN BETA-Gamma gi 2392720 pdb 2TRC B Chain B, PhosducinTRANSDUCIN BETA-Gamma Compl pdb 1B9X A Chain A, Structural Analysis Of Phosducin And Its Phosphorylation-Regulated Interaction With Transducin pdb 1B9Y A Chain A, Structural Analysis Of Phosducin And Its Phosphorylation- Regulated Int
SCOP domains	d1gxra_ b.69.4.1 (A:) Groucho/tle1, C-terminal domain {Human (Homo sapiens)} d1tbga_ b.69.4.1 (A:) beta1-subunit of the signal-transducing G protein heterotrimer {Cow (Bos taurus)}
Structural class	Alpha_Beta
Low complexity	12.5%

Sequence [MAGFPPRNQQHIQPDGYSIEDPLNPQANSSCLKSRDASPCAHPSSRQASDIPFWLI](#)

http://pedant.gsfc.de/cgi-bin/wwwdbp.pl?Db=Ncrassa_annotations&Alias=Ncrassa_ANN... 09/03/06

http://pedant.gsf.de/cgi-bin/wwwdbp.pl?Db=Ncrassa_annotations&Alias=Ncrassa_ANN... 09/03/06

Export

http://pedant.gsf.de/cgi-bin/wwwdbp.pl?Db=Ncrassa_annotations&Alias=Ncrassa ANN... 09/03/06

Como mostrado acima, a análise BLASTX de nucleotídeo para proteína apresentou a possibilidade de homologia com outras proteínas de tamanho menor do que a ciclina F (código do MIPS: 4nc448_040) e com “e-values” mais altos.

Os insertos de cDNA Y₁, Y₂ e Y₁₅ mostraram ter o mesmo tamanho, em torno de 3 Kb (Figura 11), como esperado para a sequência de nucleotídeos de 3033 bp da ciclina F 4nc448_040, aumentando a probabilidade de Y₁, Y₂ e Y₁₅ representarem a sequência 4nc448_040 (Disponível em:

http://mips.gsf.de/genre/proj/ncrassa/singleGeneReport.html?entry=4nc448_040).

A análise de sequências homólogas pelo banco de dados SIMAP (Disponível em:

http://mips.gsf.de/genre/proj/ncrassa/singleGeneReport.html?entry=4nc448_040)

mostrou similaridades desta ciclina F de *N. crassa* 4nc448_040 (MIPS) com outras ciclinas F de mamíferos, como listado a seguir: 53,99% similaridade (35.80% identidade) com a proteína humana Q9Y297 (Uniprot), 53.8% similaridade (35.85% identidade) com *Cannis familiaris* XP_861929 (NCBI) e 53.99% similaridade (35.81% identidade) com *Bos taurus* XP613703 (NCBI).

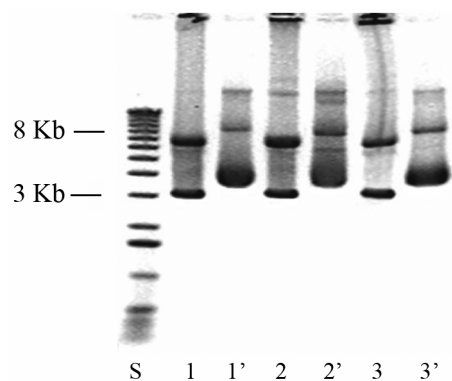


Figura 11 - Análise por eletroforese em gel de agarose dos plasmídeos contendo os insertos de cDNA Y1, Y2 e Y15 selecionados pelo Duplo-Híbrido em estudo. Plasmídeos pAD-Yi (i = 1, 2 e 15, respectivamente) digeridos com *EcoRI* e *XhoI* (colunas 1, 2 e 3). DNA não-digerido (colunas 1', 2' e 3'). Fragmentos *EcoRI* - *XhoI* encontrados em Y₁ (1), Y₂ (2) e Y₁₅ (3) de aproximadamente 3Kb. Plasmídeo parental pAD-GAL4 2.1 (aproximadamente 7,7 Kb).

Dois outros candidatos selecionados pelo sistema Duplo-Híbrido em estudo, Y₄ e Y₇ (Tabela 2), tiveram 99,5% de alinhamento entre suas seqüências de cDNA dado pelo programa LALIGN.

Ao pesquisar por homologias de seqüência em *N. Crassa* MIPS BLAST, nucleotídeo para nucleotídeo, teve-se o seguinte resultado para as seqüências Y₄ e Y₇:

>nc004_196_l23.q1ca.exp

Length = 796

Score = 1194 (185.2 bits), Expect = 3.4e-49, P = 3.4e-49

Identities = 262/279 (93%), Positives = 262/279 (93%), Strand = Plus / Plus

Quer 872 GGCTCTAGGGGGTATCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTG 931
Sbjct: 256 GCCTGAATGGCGAATGCGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTG 314

Query 932 GTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTTC 991
Sbjct: 315 GTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTTC 374

Query: 992 TTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGGCTC 1050
Sbjct: 375 TTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGGCTC 434

Query: 1051 CCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCC -AAAAACT -GATTAGG-T 1106
Sbjct: 435 CCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCNAAAAACTTGATTAGGGT 494

Query: 1107 GATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCC -TGAAAAGACGGT 1144
Sbjct: 495 GATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATA-GACGGT 532

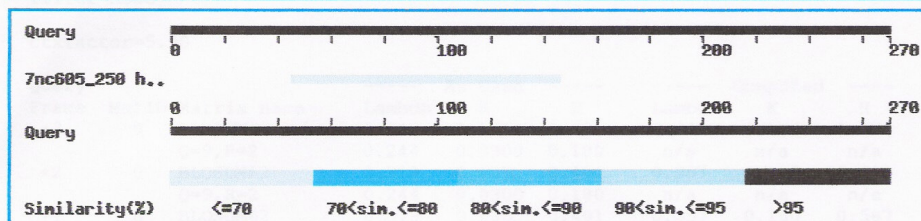
Como mostrado a seguir, o BLAST da seqüência de nucleotídeos Y₄ e Y₇ em *N. Crassa* MIPS BLAST nucleotídeo para proteína, apresentou similaridade com a proteína hipotética 7nc605_250:

Length [aa]	685
Molecular weight [Da]	74733,4
Isoelectric point	11,2
Manually edited	no
Classification	no similarity to known protein
Contig name	LGIV:7nc605
Position	[85870] 85870-87343, 87410-87735, 87804-88061
[88061]	
GC content [%]	58,2
Target	Mitochondrial (signal sequence 115aa)
PSORT_Localisation	plasma membrane
Whitehead_code	NCU05798.1

BLASTX sequence query of A7

Página 1 de 2

BLASTX sequence query of A7



BLASTX 2.0MP-WashU [09-Sep-2002] [decunix4.0-ev56-I32LPF64 2002-09-09T17:45:09]

Copyright (C) 1996-2002 Washington University, Saint Louis, Missouri USA.
All Rights Reserved.

Reference: Gish, W. (1996-2002) <http://blast.wustl.edu>
Gish, Warren and David J. States (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. Nat. Genet. 3:266-72.

Notice: statistical significance is estimated under the assumption that the equivalent of one entire reading frame in the query sequence codes for protein and that significant alignments will involve only coding reading frames.

Query= A7
(270 letters)

Translating both strands of query sequence in all 6 reading frames

Database: Ncrassa.prot

9356 sequences; 4,819,102 total letters.

Searching....10....20....30....40....50....60....70....80....90....100% done

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum P(N)	Probability N
7nc605_250 hypothetical protein	80	0.0063	1

>7nc605_250 hypothetical protein
Length = 685

Minus Strand HSPs:

Score = 80 (33.2 bits), Expect = 0.0064, P = 0.0063
Identities = 21/39 (53%), Positives = 24/39 (61%), Frame = -2

Query: 146 GERGEKGREES---ERSGR*G--AGKCSGHAARNHHTRR 45
GER E+ RE S RSGR G AG SGH +R H +RR
Sbjct: 352 GERSERRREGSGGRSRSGRSGTGAGAGSGHGSRGHSRR 390

Parameters:

cpus=1
putenv="WUBLASTFILTER=/home/app/bio/wublast/filter"
E=1e-1

http://mips.gsf.de/cgi-bin/tools/common_blast.pl

08/10/05

A sequência Y7 apresentou 61% de similaridade em 39 aminoácidos (e-value BLASTX = 0,0064) com uma proteína hipotética localizada na membrana citoplasmática do fungo contendo uma sequência sinal de 115 aminoácidos para localização mitocondrial. Esta interação, detectada duas vezes, também reduz a probabilidade de falso positivo e poderá ser reconfirmada futuramente em sistema Duplo-Híbrido baseado em membrana.

Outros candidatos detectados pelo sistema Duplo-Híbrido em questão, Y₃, Y₅, Y₆, Y₈, Y₉ e Y₁₂ listados na Tabela 2, apresentaram similaridades com proteínas nucleares da *N. crassa*.

A sequência Y₃, contendo a maior probabilidade de similaridade às sequências de nucleotídeos de *N. crassa* nesta análise (e-value BLASTN = 2.6e-92), apresentou um ruído muito alto, com valor esperado 0,95, como resultado do MIPS BLASTX, de nucleotídeo para proteína. Esta sequência apresentou homologia com uma proteína nuclear desconhecida contendo um domínio do tipo “Zn-finger-like”, que está envolvida em interações com ambas as moléculas de RNA e DNA (Ver Anexo 5).

A sequência Y₉ apresentou como resultado do MIPS BLASTX, de nucleotídeo para proteína, o maior valor esperado (e-value BLASTX = 1.4e-23) com 100% de homologia em 55 aminoácidos. Esta sequência representou uma proteína nuclear hipotética cuja função ainda não foi classificada (Ver Anexo 6).

A sequência Y₈ apresentou 41% de similaridade em 131 aminoácidos (e-value BLASTX = 0,05), com uma proteína nuclear com função molecular desconhecida homóloga à proteína YGR280c do *Saccharomyces cerevisiae*, contendo um domínio “G-patch” de interação com a molécula de RNA (Ver Anexo 7). As sequências Y₅ e Y₁₂ representaram proteínas nucleares também com função molecular desconhecida, mas que já foram encontradas em clones de bibliotecas Uni-Zap da Stratagene.

Observa-se que a maioria dos candidatos detectados pelo sistema Duplo-Híbrido em questão codifica para proteínas nucleares (Tabela 2). Para acumular evidências do possível envolvimento da defensina de planta *Psd1* com o núcleo, resolveu-se então observar se o peptídeo *Psd1* poderia estar localizado no núcleo das células.

3.2. Análise por microscopia de fluorescência do peptídeo *Psd1* e do núcleo de *F. solani*

Para verificar *in vivo* a permeabilização do peptídeo *Psd1* e sua localização no núcleo, os compostos fluorescentes FITC (cor verde) e DAPI (cor azul) foram utilizados para localizar o peptídeo *Psd1* e os núcleos respectivamente. O fungo *F. solani* foi utilizado neste experimento, por já existirem protocolos anteriores estabelecidos para este organismo (Cabral, K.M., 2003). De fato, as experiências por microscopia confocal haviam demonstrado que *Psd1* conjugado com FITC era internalizado em hifa de *F. solani*, que não sofreram ruptura da membrana do fungo. Sabe-se que pequenas quantidades da ordem de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ do peptídeo *Psd1* foram necessárias para a inibição de 50% do crescimento de ambos os fungos *N. crassa* e *F. solani*, mostrando a alta sensibilidade destes fungos ao peptídeo *Psd1* (Almeida, M.S. et al., 2000).

Na Figura 12, imagens por microscopia de fluorescência em campo específico foram capturadas separadamente para os fluoróforos FITC e DAPI em tempos curto (3 min) e longo (5 horas) de exposição do fungo *F. solani* com *Psd1* conjugado a FITC. Em seguida, os núcleos foram marcados com DAPI por 5 min. Como demonstrado anteriormente, o peptídeo *Psd1* conjugado a FITC internalizou nas hifas de *F. solani* (Figura 12 – coluna 1). Por outro lado, o composto fluorescente DAPI revelou a posição de inúmeros núcleos presentes dentro das hifas do fungo *F. solani* (Figura 12 - coluna 2). As imagens de fluorescência foram superpostas e a localização do peptídeo *Psd1* conjugado a FITC nos núcleos das hifas foi detectada (Figura 12 – coluna 3). Este resultado mostrou que o peptídeo *Psd1*, ao entrar na hifa, é direcionado para e localizado nos núcleos.

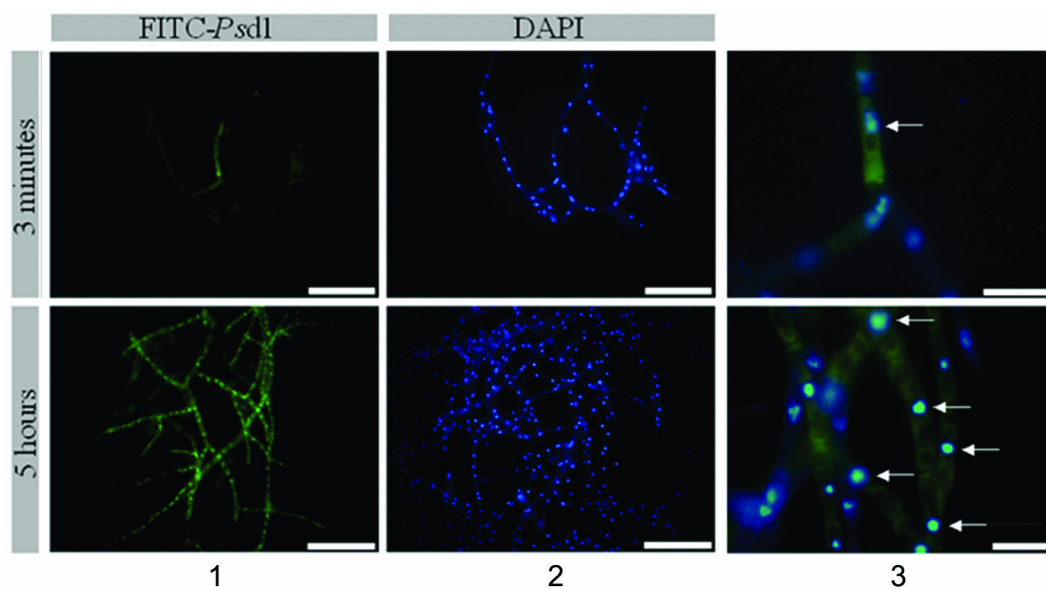


Figura 12 - Análise por microscopia de fluorescência do peptídeo *Psd1* conjugado a FITC e dos núcleos de *F. solani* marcados com DAPI. Hifas foram incubadas por 3 min ou 5 horas com 20 μ M de *Psd1*-FITC (coluna 1 - marcação verde), em seguida, fez-se o tratamento com DAPI por 5 min para visualizar os núcleos (coluna 2 - marcação azul). Co-localização do peptídeo *Psd1* com os núcleos do fungo (coluna 3 - setas brancas). Barras brancas representam 50 μ m (colunas 1 e 2) e 10 μ m (coluna 3).

3.3. Expressão da proteína Y1 marcada com GST em *E. coli*

A sequência denominada Y1 com similaridade a proteína nuclear ciclina F de *N. crassa* 4nc448_040, detectada por rastreamento pelo sistema Duplo-Híbrido, foi escolhida para estudo subsequente.

Primeiramente, construiu-se o plasmídeo pGEX-Y1 transferindo o inserto cDNA Y1 contido nos sítios *EcoRI* e *XhoI* do plasmídeo pAD-Y1 para o vetor pGEX-4T-1. O peptídeo GST de peso molecular 27 kDa, dado pelo vetor de expressão pGEX-4T-1, é utilizado para fusionar a proteína de interesse Y1 após indução de sua expressão por IPTG em pGEX-Y1. A realização do experimento de “GST- pull down” exige a utilização de proteínas híbridas ao peptídeo GST de forma a se ligarem em matriz de Gluthatione Sepharose 4B, como descrito na seção 2.9 em “Material e Métodos”.

A construção pGEX-Y1 foi confirmada por digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*, como mostrado na Figura 13, por eletroforese em gel de agarose 1%. Em seguida, a proteína Y1 híbrida à “cauda” GST foi produzida com a adição de IPTG por 2 horas em *E. coli* BL-21(DE3) pLysS.

As proteínas totais sintetizadas neste sistema de expressão foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida como descrito na seção 2.10 em “Material e Métodos”.

A Figura 14 representa o perfil eletroforético das proteínas sintetizadas por *E. coli* BL-21(DE3) pLysS durante zero horas (Figura 14 – coluna 1) e duas horas (Figura 14 – coluna 2) de expressão na presença de IPTG. Nesta figura, pode-se observar um único polipeptídeo de peso molecular de aproximadamente 138,5 kDa (Figura 14 – coluna 2) que não foi detectado tanto no controle de zero horas (Figura 14 – coluna 1) como também em *E. coli* transformada com o vetor parental pGEX-4T-1 (Figura 14 – coluna 4). O peso molecular da proteína ciclina F 4nc448_040 é de 111,481 kDa, somado ao peso molecular da cauda GST (27 kDa), resulta em um polipeptídeo de peso molecular aproximadamente 138,5 kDa, como o observado.



Figura 13 - Confirmação da presença do inserto de cDNA *EcoRI-XhoI* do candidato Duplo-Híbrido Y₁ clonado no vetor pGEX-4T-1. Análise por eletroforese em gel de agarose 1% do DNA plasmidial digerido com *EcoRI* e *XhoI* (coluna 1) e não-digerido (coluna 2). À esquerda, marcação equivalente a 3Kb referente ao padrão de 1Kb (S).

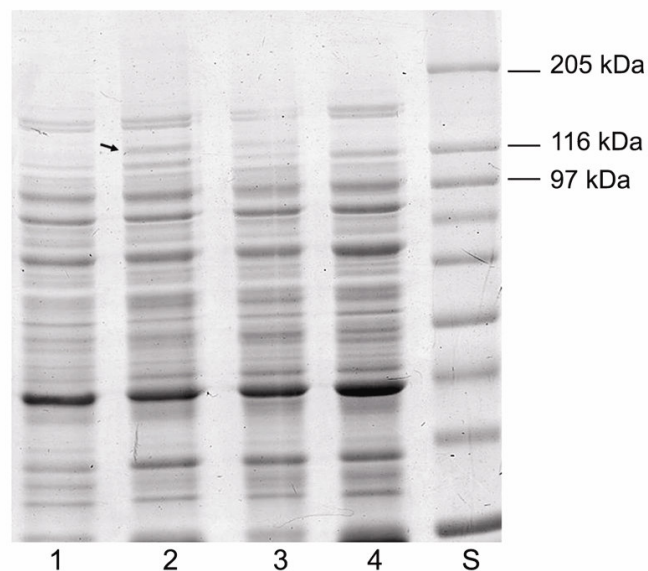


Figura 14 - Expressão do candidato Duplo-Híbrido Y1 marcado com GST em *E. coli*.

Controle negativo zero horas de indução com IPTG (coluna 1), duas horas de expressão na presença de 1 mM de IPTG (coluna 2), duas horas de expressão na ausência de IPTG (coluna 3) e duas horas de expressão do vetor parental pGEX-4T-1 na presença de 1 mM de IPTG (coluna 4). A pequena seta aponta a proteína Y1 marcada com GST, de aproximadamente 138,5 kDa.

3.4. Verificação *in vitro* da interação entre *Psd1* e o candidato Y1

A sequência de nucleotídeos da defensina de planta *Psd1* foi transferida do plasmídeo pBD-*Psd1* para os sítios únicos *EcoRI* and *SalI* do vetor de expressão pCITE-4a(+) e o peptídeo *Psd1* marcado com metionina L radioativa -[³⁵S] foi expresso em sistema TNT de transcrição e tradução acoplados de lisado de reticulócito de coelho como descrito na seção 2.8 em “Material e Métodos”. O controle de expressão positiva suplementado com o sistema foi o gene da Luciferase (Figura 15). Este experimento foi um primeiro teste a fim de certificarmos se o sistema TNT de transcrição e tradução acoplados de lisado de reticulócito de coelho estava funcionando e o peptídeo *Psd1* era expresso de pCITE-*Psd1* radioativo.

A confirmação *in vitro* da interação *Psd1*-Y1 foi realizada por ensaio de “GST-pull down”. A matriz de Glutathione Sepharose 4B foi incubada com o produto do sistema de expressão em *E. coli* BL-21(DE3) pLysS contendo a proteína Y1 fusionada a GST ou o peptídeo GST controle para em seguida ser incubada com o sistema TNT de expressão contendo o peptídeo *Psd1* marcado com metionina L[³⁵S]. Após extensivas lavagens, o complexo protéico ligado a matriz foi eluído por desnaturação e separado por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, conforme seção 2.10 do “Material e Métodos”. O resultado da exposição do gel ao filme de auto-radiografia é mostrado na Figura 16. Este experimento de co-purificação por “GST – pull down” confirmou *in vitro* a interação detectada *in vivo* no experimento do Duplo-Híbrido entre o peptídeo *Psd1* e o candidato Y1, cuja sequência apresentou homologia com a proteína de *N. crassa* ciclina F relacionada ao controle do ciclo celular (Figura 16 – coluna 2 (+)). O peptídeo *Psd1* não interagiu com a cauda GST controle, como mostra a ausência de marcação radioativa na coluna 3 (-) da figura 16. Pela primeira vez foi detectada *in vitro* a interação entre uma proteína intracelular com a defensina de planta *Psd1*.

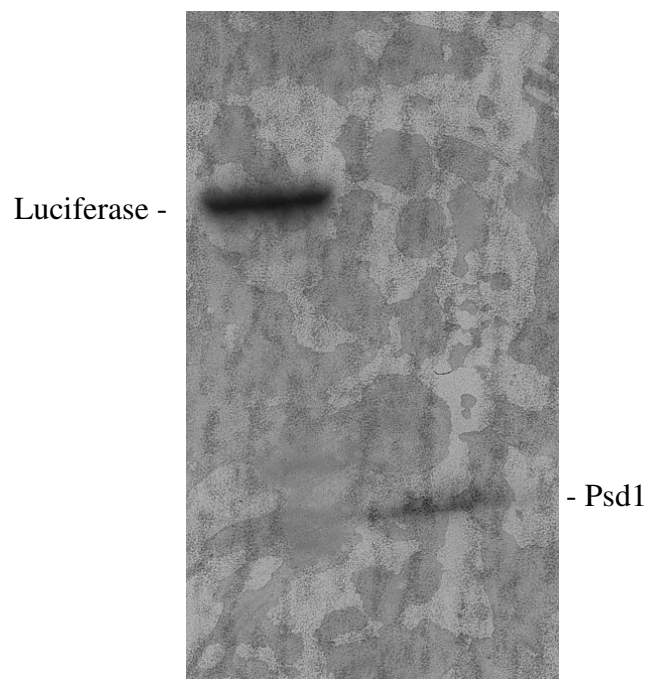


Figura 15 - Auto-radiografia das proteínas Luciferase e *Psd1*, sintetizadas em lisado TNT de reticulócito de coelho, sob controle do promotor T7 com [³⁵S]-metionina. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e exposição do gel ao filme de auto-radiografia dos produtos radioativos sintetizados pelo sistema TNT na presença dos plasmídios: controle (Luciferase – 61,5 kDa) ou pCITE-*Psd1* (*Psd1*- 5 kDa).

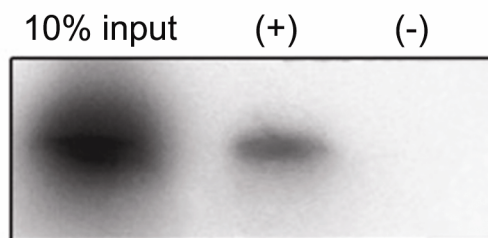


Figura 16 - Ensaio de co-purificação por “GST pull-down”. 10% “input” do peptídeo *Psd1* marcado com metionina-[^{35}S] pela expressão em lisado TNT de reticulócito de coelho sob controle do promotor T7 (coluna 1). A interação *in vitro* entre o peptídeo *Psd1* radioativo e a proteína Y1 fusionada a GST (coluna 2 – sinal positivo) ou GST puro como controle negativo (coluna 3).

3.5. *Psd1* afeta o ciclo celular medido por migração nuclear intercinética em neuroblastos da retina de ratos neonatos

Dos resultados apresentados com o sistema Duplo-Híbrido em estudo, foram encontradas proteínas nucleares da *N. crassa*, alvos da defensina de planta *Psd1*, sendo destacado para estudo um dos candidatos do Duplo-Híbrido, uma proteína relacionada ao ciclo celular, a ciclina F. Dados da literatura mostram que a expressão da ciclina F humana ocorre em levedura durante a passagem do ciclo celular entre as fases S/G2/M. (Bai, C., Richman, R. e Elledge, S.J., 1994; Arooz, T. et al., 2000). Com o objetivo de avaliar se a *Psd1* tem influência sobre o ciclo celular durante este período S/G2/M, a retina de rato em desenvolvimento foi tratada com diversas concentrações de *Psd1* por 3 horas. A duração das transições de fases S/G2/M leva, no total, aproximadamente 3 horas, na retina de ratos neonatos. Assim, o tratamento com o peptídeo *Psd1* por 3 horas permite a passagem dos núcleos da fase S através de G2, parando em M ao alcançar a margem mais externa da NBL, como descrito na seção 2.11 em “Material e Métodos”. Os núcleos marcados com BrdU que alcançaram o terço externo da NBL são considerados migratórios (Fragel-Madeira, L., 2000; Hayes, N.L. e Nowakowski, R.S., 2000).

A ausência de núcleos no terço externo da NBL, após as três horas de tratamento com a *Psd1*, demonstrou que o peptídeo *Psd1* foi capaz de inibir a migração nuclear intercinética e, conseqüentemente, o progresso do ciclo celular, bloqueando a transição da fase S para a G2 (Figura 17, comparar a com b). A propriedade de migração nuclear intercinética mostrou-se dependente da dose do peptídeo *Psd1* adicionada. A concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *Psd1* inibiu a migração de 50% dos núcleos marcados com BrdU ao longo do terço externo da NBL (Figura 17c).

Como a indução de morte celular implica na redução do número de células que incorporaram BrdU durante a fase S, quantificou-se o total de núcleos marcados com BrdU tanto no grupo de explantes controle como no tratado com *Psd1*. Não foi detectada diferença entre os números totais de núcleos do grupo controle e tratado com *Psd1*, como pode ser constatado na Figura 18 (comparar A com B), com uma visão de um campo maior.

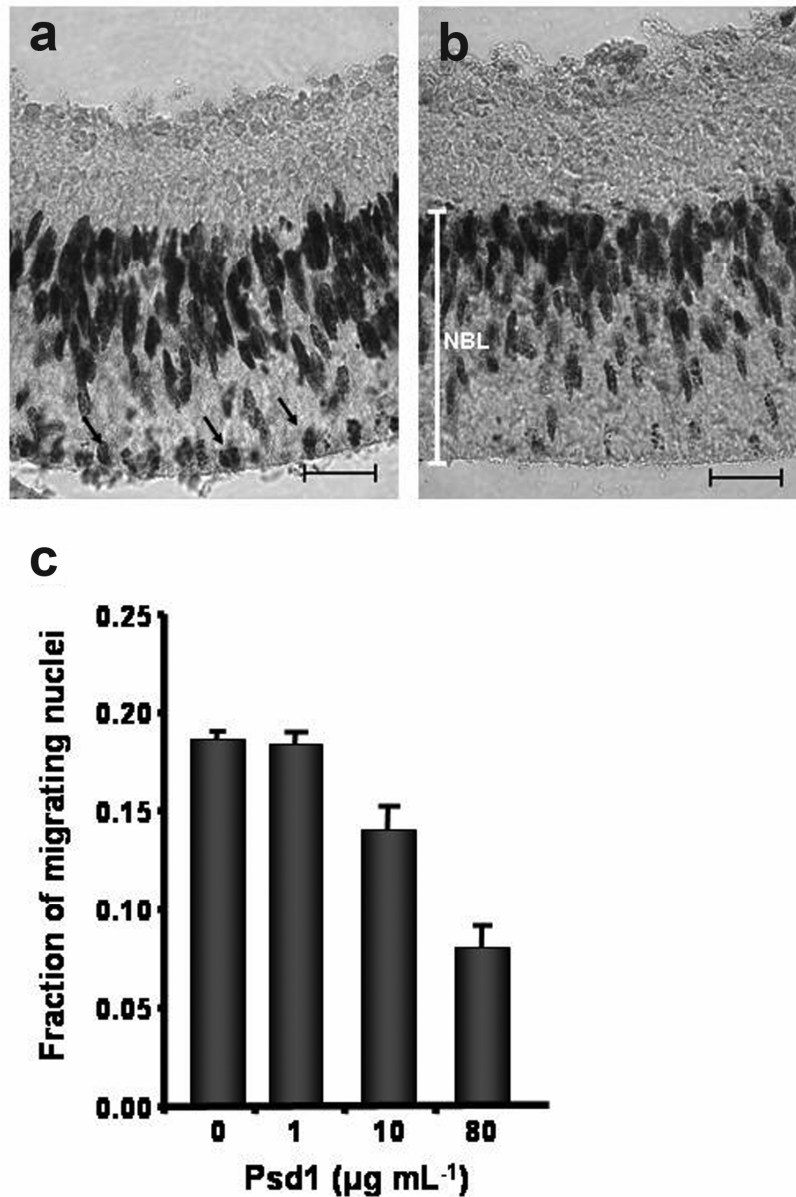


Figura 17 - A migração nuclear intercinética ao longo da camada neuroblástica (NBL) na retina de rato em desenvolvimento. Na ausência (a) ou na presença (b) de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *Psd1*. Imunohistoquímica usando anticorpo anti-BrdU demonstrou que, na ausência de *Psd1* (a), os núcleos procederam em direção a zona mais externa da NBL (setas pretas indicando núcleos na base inferior da figura a). Enquanto, na presença de *Psd1* (b), a migração nuclear intercinética foi inibida quando núcleos encontravam-se na transição de fase de S para G2. NBL está indicada por uma barra branca em (b). Em (c), a migração nuclear intercinética mostrou-se dose dependente do peptídeo *Psd1* como medido pela fração de núcleos marcados com BrdU que migraram para o terço mais externo da NBL. Inibição de 50% foi estimada na presença de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *Psd1*.

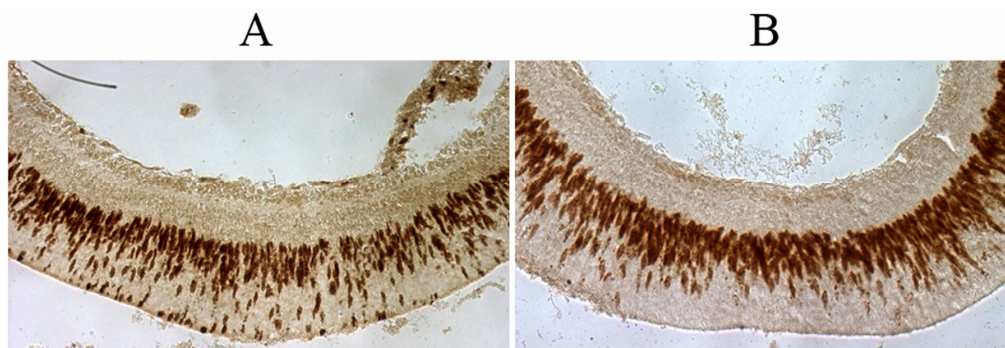


Figura 18 - Visualização da NBL com aumento de 40x. O número total de núcleos nos dois grupos, não-tratados (A), e tratados (B), com $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *Psd1*, permanece constante. Não foi detectado perfil apoptótico.