

MEIRE DE OLIVEIRA BARBOSA

PROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS  
DE SOJA (*Glycine max*) UTILIZANDO  
FERRAMENTAS PROTEÔMICAS

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica Agrícola,  
para obtenção do título de *Doctor  
Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B238p  
2008

Barbosa, Meire de Oliveira, 1975-

Prospecção de peptídeos antimicrobianos de soja  
(*Glycine max*) utilizando ferramentas proteômicas  
/ Meire de Oliveira Barbosa. – Viçosa, MG, 2008.  
xvi, 99f.: il. ; 29cm.

Orientador: Maria Cristina Baracat-Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Soja - Semente - Peptídeos. 2. Soja - Semente -  
Prospecção. 3. Proteômica - Análise. 4. Cromatografia  
líquida. 5. Espectrometria de massa. 6. Banco de dados.  
7. Clonagem molecular. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

CDD 22.ed. 572.65

MEIRE DE OLIVEIRA BARBOSA

PROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS  
DE SOJA (*Glycine max*) UTILIZANDO  
FERRAMENTAS PROTEÔMICAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de setembro de 2008.

---

Prof. Luciano Gomes Fietto  
(Co-Orientador)

---

Prof.<sup>a</sup> Claudine Márcia Carvalho

---

Prof. Marcelo Matos Santoro

---

Dra. Maura Vianna Prates

---

Prof.<sup>a</sup> Maria Cristina Baracat-Pereira  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, em primeiro lugar, pela presença em todos os momentos da minha vida;

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso;

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/DBB da Universidade Federal de Viçosa, pelo auxílio constante;

A CAPES, pelo auxílio financeiro;

À Professora Maria Cristina Baracat Pereira, pela orientação, apoio, amizade e presença constante no decorrer deste treinamento;

À Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes/DBB, pelo apoio e por ter disponibilizado o seu laboratório para a realização deste projeto;

Ao Professor Reginaldo da Silva Romeiro/DFP/UFV, pela ajuda durante a realização do trabalho, especialmente na realização dos testes de atividade antimicrobiana;

Ao Professor Luciano Gomes Fietto, pelo apoio dedicado na realização dos trabalhos de clonagem;

Aos professores Everaldo Gonçalves de Barros/DBG e Maurílio Alves Moreira/DBB coordenadores do Programa de Melhoramento da Soja, pela doação das sementes para o desenvolvimento dos experimentos;

Ao Professor Marcelo Matos Santoro/UFMG, pela colaboração nas análises de espectrometria de massa, e sugestões ao trabalho;

Ao Professor Adriano M. de Castro Pimenta e a todos do Núcleo de Biomoléculas/UFMG, pelo grande auxílio prestado nas análises de espectrometria de massa;

Aos membros da banca de avaliação da tese o Prof.a. Claudine Márcia Carvalho e a Dra Maura Vianna Prates, pela colaboração;

Aos Professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/ UFV, pelo apoio científico;

Ao Eduardo Monteiro, por todo o cuidado, por ter me ajudado tanto e por todo o carinho;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de

Plantas/BIOAGRO/UFV;

Ao amigo Flavio Augusto, do Laboratório de Bacteriologia /DFP/UFV, pela imensa ajuda na realização dos ensaios de atividade antimicrobiana;

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas/UFMG, em especial ao Agenor Valadares, pelo apoio;

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores, pelo auxílio nos trabalhos de clonagem e expressão, em especial ao Sidmar Sossai;

Aos alunos do Laboratório de Proteômica, pelo espírito de equipe, pela amizade, pela agradável convivência dentro e fora do laboratório: Hebréia Almeida, Paulo Wagner, Patrícia Games, Rubens Magalhães, Mariana Boroni, Lanna Carrijo, Thiago Lopes, Tânus Pereira, Nayara Tessarollo, José Fabiano Netto, Ana Emerlinda e Marcos Jorge;

Ao meu filho Vinícius sempre muito presente em todos os momentos;

Ao meu marido Paulo Otávio, pelo companheirismo durante a realização deste curso;

Aos meus queridos pais José Jorge e Irene e ao meu irmão Márcio, por todo apoio e incentivo;

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização desse trabalho.

## **BIOGRAFIA**

MEIRE DE OLIVEIRA BARBOSA, filha de José Jorge Barbosa e Irene de Oliveira Barbosa, nasceu em 12 de setembro de 1975, em Ubá – Minas Gerais.

Iniciou o curso de Nutrição na Universidade Federal de Viçosa em Fevereiro de 1996, pelo qual se graduou Nutricionista em Outubro de 2000.

Atuou como Nutricionista pela SAPORE - Restaurante para Coletividades durante o período de Outubro de 2000 a Janeiro de 2003.

Em Março de 2003 ingressou no Mestrado pelo Programa de Bioquímica Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em Julho de 2004.

Em Agosto de 2004 iniciou o Doutorado pelo Programa de Bioquímica Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a tese em Setembro de 2008.

# SUMÁRIO

Página

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xii
<b>RESUMO</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xv
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL</b>	3
2.1. Proteoma – Histórico e definições	3
2.1.1. Princípios e Metodologias aplicadas a Proteômica	4
2.1.1.1. Eletroforese bidimensional	4
2.1.1.2. Cromatografia líquida multidimensional	5
2.1.1.3. Espectrometria de massa na identificação de proteínas	6
2.2. Proteoma em plantas	7
2.3. Peptidômica	9
2.4. Peptídeos antimicrobianos na defesa de plantas	9
2.5. Peptídeos recombinantes e organismos transgênicos	12
2.6. Aplicações dos peptídeos	13
2.7. Soja	14
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	15
<b>4. CAPÍTULO 1 - Peptídeos Antibacterianos estão Presentes em Sementes de Soja em Germinação</b>	22
4.1. Resumo	22
4.2. Introdução	23
4.3. Material e Métodos	25

4.3.1. Material biológico	25
4.3.2. Preparo de extratos protéicos	25
4.3.3. Obtenção de frações enriquecidas em peptídeos	26
4.3.4. Espectrometria de massa	27
4.3.5. Eletroforese dos peptídeos em gel de poliacrilamida de três fases na presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE)	27
4.3.6. Atividade antibacteriana	28
4.4. Resultados e Discussão	28
4.5. Conclusões	37
4.6. Referências Bibliográficas	38
<b>5. CAPÍTULO 2 - Bioprospecção de Peptídeos Antimicrobianos de Sementes de Soja Germinadas</b>	<b>42</b>
<b>5.1. CAPÍTULO 2: PARTE 1: Metodologia Peptidômica para a Bioprospecção de Peptídeos Antimicrobianos Resistentes visando Aplicação Biotecnológica</b>	<b>42</b>
5.1.1. Resumo	42
5.1.2. Introdução e objetivos	44
5.1.3. Material e Métodos	45
5.1.3.1. Material vegetal e microrganismos	45
5.1.3.2. Extração e purificação dos peptídeos de sementes germinadas de soja	45
5.1.3.3. Testes de inibição dos patógenos	46
5.1.3.4. Determinação da massa molecular por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF	47
5.1.3.5. Eletroforese dos peptídeos em gel de poliacrilamida de três fases na presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE)	47
5.1.4. Resultados	48
5.1.5. Discussão	54
5.1.6. Conclusões	58

5.1.7. Referências Bibliográficas	60
<b>5.2. CAPÍTULO 2: PARTE 2 – Resistant Antibacterial Peptides are Probably Involved in the Constitutive Primary Defense in Soybean Seeds Under Germination</b>	<b>63</b>
5.2.1. Abstract and abbreviations	64
5.2.2. Introduction	65
5.2.3. Materials and methods	66
5.2.3.1. Biological materials	66
5.2.3.2. Peptide extraction and purification	66
5.2.3.3. Peptide electrophoresis in the presence of SDS and Tricine	67
5.2.3.4. Antimicrobial assays	68
5.2.3.5. Mass spectrometry analysis	68
5.2.4. Results	68
5.2.4.1. Obtaintion of the peptide-enriched fractions	68
5.2.4.2. Antimicrobial activity against plant-pathogenic bacteria and fungus	70
5.2.4.3. SDS-Tricine-PAGE and mass spectrometry analysis	71
5.2.5. Discussion and conclusions	72
5.2.6. References	77
<b>6. CAPÍTULO 3: Identificação de Defensinas de Soja em Banco de Dados e Clonagem para Expressão Heteróloga em <i>Pichia pastoris</i></b>	<b>80</b>
6.1. Resumo	80
6.2. Introdução, Revisão de literatura e Objetivos	81
6.3. Material e Métodos	85
6.3.1. Material Vegetal	85
6.3.2. Identificação de seqüências codificadoras de defensinas em banco de dados	85
6.3.3. Clonagem do cDNA e expressão funcional do peptídeo purificado	86

6.3.3.1. Isolamento de RNA total, RT-PCR e clonagem	86
6.3.3.2. Construção do plasmídeo de expressão	87
6.3.3.3. Seleção dos transformantes <i>His</i> <sup>+</sup> e análise de PCR para avaliação da integração no genoma da <i>Pichia pastoris</i>	88
6.3.3.4. Expressão da defensina recombinante	88
6.3.3.5. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em presença de tricina (SDS -Tricina-PAGE)	89
6.4. Resultados e Discussão	89
6.4.1. Identificação de defensinas em banco de dados	89
6.4.2. Clonagem do cDNA	91
6.4.3. Construção do plasmídeo de expressão	91
6.4.4. Seleção dos transformantes <i>His</i> <sup>+</sup> e análise de PCR para avaliação da integração no genoma da <i>Pichia pastoris</i>	93
6.4.5. Expressão da defensina recombinante	93
6.5. Conclusões	94
6.6. Perspectivas	94
6.7. Referências Bibliográficas	95
<b>7. CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>98</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>99</b>

## LISTA DE FIGURAS

Página

### Capítulo 1

- Figura 1.** Cromatografia de troca aniônica de extratos de sementes de soja não germinadas (A) e germinadas por 48 h (B) após precipitação salina, aquecimento e diálise. 29
- Figura 2.** Cromatografias de fase reversa em coluna C18-HPLC dos *pools* catiônicos obtidos de SSNG (A) e SSG48 (B). 31
- Figura 3.** SDS-Tricina-PAGE em gel de três fases obtidas após a separação por RP-HPLC dos *pools* catiônicos obtidos de SSNG (A) e SSG48 (B). 33
- Figura 4.** Ensaio de biorrevelação contra *Ralstonia solanacearum* da fração catiônica do extrato de SSG48 fracionada em SDS-Tricina-PAGE, em condições nativas e desnaturantes. 34
- Figura 5.** Cromatografias de fase reversa em coluna C18-HPLC dos *pools* catiônicos obtidos de SSNG (A) e SSG48 (B). 36

### Capítulo 2: Parte 1

- Figura 1.** Cromatografia de exclusão molecular, em Sephadex G50 e separação em SDS-Tricina-PAGE das frações obtidas após a cromatografia. 49
- Figura 2.** Cromatografia de exclusão molecular em coluna Protein Pak 60A/HPLC (CEM), eletroforese em SDS-Tricina-PAGE e cromatografia C18 RP-HPLC. 50
- Figura 3.** Testes de inibição do crescimento de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (A) e *Ralstonia solanacearum* (B), utilizando a diferentes concentrações de acetonitrila (ACN10%, ACN20% e ACN60%) e acetonitrila aquecida por 2 horas em temperatura de ebulição (ACN10%A, ACN20%A e ACN60%A). 52

### Capítulo 2: Parte 2

- Figure 1.** a) Molecular exclusion chromatography (MEC) in a Protein Pak 60A column / HPLC of the fraction containing proteins with low molecular weight (1-30 kDa) of SGS48, after the ultrafiltration procedure. b) Three-phase SDS-Tricine-PAGE of the fractions after MEC. 69
- Figure 2.** a) Reversed phase chromatography in a C18 column (C18 RP-HPLC) of the P1 fraction (fraction of 2 and 3 in Fig. 1). b) Three-phase SDS-Tricine-PAGE of the fractions after C18 RP-HPLC. 70
- Figure 3.** Antimicrobial activity of the fractions of SGS48 eluted from the C18 RP-HPLC against the plant pathogenic bacteria (a) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, (b) *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and (c) *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. 71

### Capítulo 3

- Figura 1.** Alinhamento múltiplo de seqüências protéicas de defensinas (CLUSTAL W (1.83)) 91
- Figura 2.** Gel de agarose 1% do cDNA após PCR utilizando *primers* específicos 92
- Figura 3.** Gel de agarose 1% após clonagem em pCR2.1 TOPO, miniprep e digestão do vetor utilizando a enzima de restrição EcoRI. 92
- Figura 4.** Gel de agarose 1% do produto de PCR utilizado *primers* específicos com sítios de restrição e ancora para digestão 92
- Figura 5.** Gel de agarose 1% do produto da digestão do vetor de expressão com Xho1 e EcoRI. 93
- Figura 6.** Gel de agarose 0,8% em TAE após PCR utilizando os *primers* 5'OAX e 3' OAX (*primers* do vetor); e utilizando os *primers* 5' e 3' da defensina. 94

## **LISTA DE TABELAS**

**Página**

### **CAPÍTULO 2: Parte 1**

Tabela 1. Inibição do crescimento bacteriano em 12h e massas moleculares das frações peptídicas após RP-HPLC, eluídas em diferentes concentrações de acetonitrila.	53
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### **CAPÍTULO 2: Parte 2**

Table 1. Low-molecular weight values determined by a MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometer in peptide enriched-pools (P1.10 to P1.16) obtained from extracts of soybean germinated seeds by 48 hours.	72
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPs: peptídeos antimicrobianos (do inglês, *antimicrobial peptides*)
- BCA: ácido bicinconínico (do inglês, *bicinchoninic acid*)
- BIS: N,N'-metileno-bis-acrilamida
- BSA: albumina sérica bovina (do inglês, *bovine serum albumin*)
- DEAE: Dietilaminoetil
- EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
- ESI: ionização por eletro-pulverização (do inglês, *electron spray ionization*)
- FPLC: do inglês, *Fast Protein Liquid Chromatography*
- HPLC: cromatografia líquida de alto desempenho (do inglês, *high-performance liquid chromatography*)
- MALDI: ionização / dessorção a laser com auxílio de matriz (do inglês, *matrix assisted laser desorption / ionization*)
- MDLC: cromatografia líquida multidimensional (do inglês, *Multi-dimensional liquid chromatography*)
- MM: massa molecular
- MS: espectrometria de massa (do inglês, *mass spectrometry*)
- Offline-TDLC: cromatografia líquida não acoplada em duas dimensões (do inglês *non-sequential (offline) Two-dimensional Liquid Chromatography* (offline-TDLC))
- PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
- PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila (do inglês, *phenylmethanesulphonyl fluoride*)
- pv.: classificação taxonômica subespecífica patovar
- subsp: subespécie
- SSG48- sementes de soja germinadas por 48 horas
- SSNG – sementes de soja não germinadas
- SDS: dodecilsulfato de sódio
- TFA: ácido trifluoracético (do inglês, *trifluoroacetic acid*)
- TRICINA: N-Tris(Hidroximetil)metilglicina
- TRIS: Tris(Hidroximetil)aminometano
- TOF: tempo de voo (do inglês, *time-of-flight*)
- U.A.: unidade de absorvância

## RESUMO

BARBOSA, Meire de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2008. **Prospecção de peptídeos antimicrobianos de soja (*Glycine max*) utilizando ferramentas proteômicas.** Orientadora: Maria Cristina Baracat-Pereira. Co-orientadores: Elizabeth Pacheco Batista Fontes, Luciano Gomes Fietto e Reginaldo da Silva Romeiro.

Técnicas baseadas em separações por cromatografia líquida bidimensional (TDLC) ou multidimensional (MDLC), acopladas à espectrometria de massa (MS), têm sido utilizadas nas separações de proteínas e de peptídeos para estudos de bioprospecção de atividade antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi a prospecção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) de soja (*Glycine max*) utilizando ferramentas proteômicas. Extratos de sementes de soja não germinadas (SSNG) e de sementes de soja germinadas por 48 horas (SSG48) foram submetidos ao fracionamento salino, aquecimento seletivo, diálise, cromatografia de troca aniônica (CTI) e de fase reversa (C18 RP-HPLC), seguindo-se análises de MS. Comparações dos perfis cromatográficos (CTI e RP-HPLC) de SSNG e SSG48 sugeriram que diferentes peptídeos estão sendo sintetizados, já que massas moleculares (MM) menores que 10 kDa foram identificadas por MS. Ensaio de biorrevelação com a fração catiônica das SSG48 mostrou que compostos com MM abaixo de 14 kDa foram capazes de inibir o crescimento da bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum*. Assim, objetivando conhecer melhor as características do conjunto de AMPs de SSG48, foram avaliadas diferentes metodologias utilizando diferentes técnicas de clareamento e de purificação, e um novo protocolo para a prospecção de peptídeos foi proposto, contendo as seguintes etapas: extração, fracionamento com sulfato de amônio (35-75% sat.), ultrafiltração (membranas com volume de exclusão de 30 e 1 kDa), TDLC (cromatografia de exclusão molecular - CEM e C18 RP-HPLC). As frações obtidas após a C18 RP-HPLC foram aquecidas à ebulição para a remoção dos solventes e utilizadas para ensaios de atividade antimicrobiana, SDS-Tricina-PAGE e MS. Diferentes frações eluídas da C18 RP-HPLC, após o aquecimento, foram ativas contra cinco bactérias fitopatogênicas, tendo sido identificadas MM inferiores a 10 kDa nessas frações. A avaliação da síntese ou da expressão diferencial de AMPs em SSNG e SSG48 evidenciou que SSG48 apresenta um potencial para a identificação de peptídeos de grande importância funcional, possivelmente envolvidos nos processos de defesa. O ajuste de protocolo permitiu um enriquecimento das amostras em AMPs em SSG48, resistentes à alta temperatura e ao contato com acetonitrila e TFA,

ainda não descritos, podendo essas características ser exploradas para aplicação biotecnológica na agroindústria. Paralelamente, utilizando ferramentas de bioinformática, foram realizadas buscas em banco de dados (NCBI) visando à identificação de seqüências de DNA que codificam para AMPs em soja. Uma seqüência de uma provável defensina foi obtida e clonada em *Escherichia coli*. O plasmídeo de expressão (pPIC 9) contendo a defensina foi linearizado e utilizado para a transformação de *Pichia pastoris*, um transformante His<sup>+</sup> foi utilizado para avaliar a expressão da defensina recombinante, e SDS-Tricina-PAGE para verificar a expressão. A avaliação por SDS-Tricina-PAGE não permitiu confirmar a expressão da defensina até o momento, sob as condições utilizadas. A identificação e clonagem de uma possível defensina foram realizadas com sucesso, e sua expressão vem sendo buscada, o que provavelmente possibilitará sua caracterização para aplicações biotecnológicas diversas.

## ABSTRACT

BARBOSA, Meire de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, september, 2008. **Prospection of antimicrobial peptides from soybean (*Glycine max*) using proteomics tools.** Adviser: Maria Cristina Baracat-Pereira. Co-AdviserS: Elizabeth Pacheco Batista Fontes, Luciano Gomes Fietto and Reginaldo da Silva Romeiro.

The techniques based on the separation by two-dimensional liquid chromatography (TDLC) or multi-dimensional (MDLC), coupled with mass spectrometry analysis, have been used in separation of proteins and peptides for bioprospection of antimicrobial activities. This work aimed to bioprospect antimicrobial peptides (AMPs) of soybean (*Glycine max*) by using proteomics tools. Peptides from non-germinated (NGSS) and germinated for 48 hours (GSS48) soybean seeds were extracted and fractionated by salt and heating, followed by dialysis, anion-exchange (AEC) and reversed phase (C18 RP-HPLC) chromatographic steps, and mass spectrometry analysis (MS). The comparisons of the chromatographic profiles (AEC and RP-HPLC) from NGSS and GSS48 suggested that different peptides are synthesized, showing molecular weight (MW) lower than 10 kDa by MS analysis. A bioassay that used the cationic fraction obtained from GSS48 showed that compounds with MW lower than 14-kDa were able to inhibit the bacterium *Ralstonia solanacearum* growth. Thus, to improve knowledge about GSS48AMPs' characteristics, different techniques for clearance and purification of the extracts were evaluated, and a new protocol to bioprospect the peptides was proposed, composed by the following steps: extraction, ammonium sulfate fractionation (35-75% sat.), ultrafiltration (membrane of 30 and 1 kDa cut-off) and TDLC (molecular exclusion chromatography - MEC and C18 RP-HPLC). The fractions obtained after the C18 RP-HPLC were heated by two hours for solvent removal, and the recovered fractions were used for antimicrobial assays, SDS-Tricine-PAGE and MS analysis. Various fractions, obtained after the C18 RP-HPLC after heating were active against five plant-pathogens. Molecules with MW below 10-kDa were present in these fractions. The comparison of the differential synthesis of AMPs in NGSS and in GSS48 showed that the germinated seeds present a potential for the identification of peptides with great functional importance, that are probably involved in the defense processes in plants. The adjustment of this protocol allowed an enrichment of AMPs in the GSS48 samples, which are resistant to high temperature and to the contact with acetonitrile and TFA, that were not yet described in the literature. These characteristics could be

exploited for biotechnological application in agribusiness. Simultaneously, by using bioinformatic tools, searches were conducted in the database NCBI in order to identify DNA sequences coding for AMPS in soybean. A sequence of a putative defensin was recovered and used as a template for cloning in *Escherichia coli*. The obtained plasmid of expression (pPIC 9) was linearized and used for the transformation of *Pichia pastoris*. A His<sup>+</sup> (*P. pastoris*) transformed colony was used for evaluation of the defensin expression and for SDS-Tricine-PAGE, in order to check their expression. The assessment by SDS-Tricine-PAGE failed to confirm the expression of defensin so far, under the conditions used. The identification of a putative defensin and the cloning procedure were carried-out successfully, and its expression is being evaluated aiming to develop various characterizations, which probably will provide different biotechnological applications for the peptides.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O proteoma de uma célula, organismo ou tecido pode ser definido como o conjunto completo de proteínas expressas por um genoma em um momento específico. Devido à natureza dinâmica do proteoma e à complexidade gerada pelo grande número de proteínas e peptídeos presentes nas amostras a serem analisadas, técnicas de alta sensibilidade e resolução são necessárias na purificação e na análise destas proteínas. Sabe-se que pequenos estímulos podem levar a alterações na expressão protéica, e que essas modificações, muitas vezes mínimas, devem ser precisamente detectadas em células e tecidos. À semelhança, a peptidômica refere-se ao conjunto de peptídeos expressos (1-20 kDa) presentes em uma amostra biológica (tecidos biológicos, células ou fluidos) em uma dada situação celular.

Em plantas, um grande número de peptídeos vem sendo identificados por meio de estudos bioquímicos e genéticos com funções biológicas diversas como sinalização e defesa. Em geral, os peptídeos envolvidos em sinalização de rotas metabólicas e de defesa são originados de precursores maiores (polipeptídeos), que sofrem proteólise e, em alguns casos, modificações para se tornarem funcionais.

Um mesmo organismo pode produzir diferentes classes de peptídeos com funções variadas, incluindo-se os peptídeos com diferentes especificidades de ação antimicrobiana, ou peptídeos que trabalham em sinergia entre si contra microrganismos específicos, ou que possuem também outras atividades biológicas complementares à atividade antimicrobiana. A síntese/biossíntese de peptídeos antimicrobianos (AMPs), por diferentes organismos consistem em uma estratégia de defesa ancestral, eficiente e econômica para o organismo que a realiza, pois consome baixa energia e biomassa, já que um mesmo precursor pode servir a expressão de vários AMPs.

Em plantas, dez famílias de peptídeos antimicrobianos (AMPs) foram identificadas até o momento como componentes da barreira de defesa constitutiva. Entretanto, os peptídeos podem também ser induzidos sob situações de estresse. A maioria atua em baixas concentrações (na faixa micromolar), e vêm sendo identificados em camadas celulares periféricas de sementes e de tecidos vegetativos, localização que está de acordo com sua função de defesa primária de tecidos vulneráveis. A família das defensinas de plantas corresponde aos peptídeos mais bem caracterizados.

Os AMPs em geral, estão presentes em pequenas concentrações nos organismos o que dificulta a sua recuperação para o emprego em diversos ensaios como a avaliação da atividade antimicrobiana (contra fungos, bactérias, vírus, nematóides etc.), e as caracterizações bioquímicas e estruturais. Com o aumento do número de genomas seqüenciados, bem como de seqüências de várias defensinas postadas em bancos de dados, um grande número de defensinas tem sido deduzidas com base na seqüência de DNA, apesar da limitada conservação de seqüência, restrita basicamente a 8 cisteínas, com grande importância estrutural. Assim, utilizando expressão heteróloga e organismos transgênicos, várias defensinas, bem como outros peptídeos, vêm sendo estudados e caracterizados como agentes naturais promissores a serem explorados para a defesa de plantas pela agroindústria. Alguns AMPs vêm também sendo avaliados como agentes terapêuticos para animais e humanos, à semelhança dos antibióticos em uso. Esses peptídeos têm atraído o interesse de companhias farmacêuticas e biotecnológicas no mundo, objetivando a produção de agentes de defesa tópicos e de amplo espectro a serem comercializados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL

### 2.1. Proteoma – Histórico e definições

O conhecimento de toda a seqüência de DNA de um organismo representa uma riqueza de informações para o entendimento da função de células vivas em nível molecular (Monti et al., 2005). A proteômica por sua vez busca descrever o conjunto completo de proteínas como produto da expressão gênica (James, 1997). O conceito de proteoma foi proposto pela primeira vez por Wilkins (1995), tendo sido conceituado como a proteína equivalente do genoma. Entretanto foi verificado posteriormente que o genoma constitui um elo entre os genes e as proteínas (Cobon et al., 2002), sendo o proteoma da célula o reflexo do ambiente celular. Assim, a definição anterior de proteômica (Wilkins et al., 1995) considerou a natureza altamente dinâmica do proteoma (de Hoog e Mann, 2004; Newton et al., 2004), refere-se sim ao equivalente do genoma expresso.

No período entre 1995 e 2000, os projetos desenvolvidos em proteômica tinham como objetivos separar e detectar o maior número de proteínas possível de uma fonte, permitindo que essas fossem catalogadas computacionalmente para estudo por técnicas analíticas, sendo denominada Proteômica Estrutural. Em um segundo momento, com um objetivo mais amplo, a ciência proteômica, denominada Proteômica Funcional, buscou entender a funcionalidade das proteínas diferencialmente expressas, avaliando o seu envolvimento em rotas metabólicas, ou de defesa, ou em mecanismos diversos que permitam avanços em termos de genômica funcional (Newton et al., 2004; Agrawal et al., 2005).

Embora diversos genomas tenham sido identificados, a primeira grande diferença entre a análise do genoma e do proteoma é que o genoma apresenta uma natureza estática, enquanto o proteoma de cada célula é dinâmico. Mudanças no padrão de expressão protéica podem ocorrer durante o ciclo celular, em resposta a estado metabólico da célula, à percepção de sinais intra e extracelulares (temperatura, estresse, sinais apoptóticos). A ocorrência de processamento (*splicing*) alternativo e modificações pós-transcripcionais reforça que o paradigma de “um gene dá origem a uma proteína”, não reflete a real natureza do proteoma celular (Mann e Jensen, 2003; Monti et al., 2005). Assim, o genoma não permite predizer proteoma funcional da célula, uma vez que não podemos inferir quais genes são expressos e em que

momento específico do ciclo de vida. Além disso, muitas proteínas expressas podem sofrer modificações pós-transducionais, tendo descritas mais de 200 alterações possíveis (Godovac-Zimmermann e Brown, 2001; Jansen et al., 2002; Mann e Jensen, 2003). A segunda grande diferença entre genômica e proteômica refere-se à possibilidade de detecção em relação ao genoma e ao proteoma. Frequentemente muitas proteínas são expressas em baixa concentração, com um rápido “turnover”, o que dificulta e limita a capacidade de identificação, aspecto crítico especialmente para proteínas que estão envolvidos nos processos dinâmicos da célula, como por exemplo, mecanismos de transdução de sinal. Ainda podemos citar ainda uma terceira dificuldade no estudo do proteoma, onde o contexto da análise proteômica tem apenas caráter qualitativo, ou seja, deseja-se determinar a presença ou a ausência de proteínas de interesse.

Apesar dos problemas acima mencionados, o interesse na área de proteômica de plantas tem aumentado rapidamente nos últimos anos. Áreas de interesse específico têm incluído o estudo da expressão de proteínas em diferentes órgãos vegetais, como resposta às variações fisiológicas (Newton et al., 2004). A proteômica funcional em plantas vem crescendo e objetiva o monitoramento e a análise espacial e temporal dos fluxos moleculares das células (Monti et al., 2005), a elucidação de funções biológicas de proteínas desconhecidas e a definição de mecanismos celulares em nível molecular.

### **2.1.1. Princípios e metodologias aplicadas a proteômica**

As técnicas cromatográficas e eletroforéticas, especialmente bi ou multidimensionais, permitem separar misturas complexas de proteínas, combinadas características e propriedades físico-químicas das proteínas. As dimensões selecionadas devem explorar duas ou mais propriedades da proteína, compatíveis aos mecanismos de separação (Isaak et al., 2005).

#### **2.1.1.1. Eletroforese bidimensional**

Na eletroforese bidimensional (2-DE), as proteínas são submetidas a duas dimensões consecutivas de separação, baseadas em diferentes e independentes propriedades físico-químicas das proteínas. Na primeira dimensão, a separação de

proteínas é baseada em seu ponto isoelétrico (pI), e na segunda dimensão em sua massa molecular (MM) (Isaaq et al., 2005). A separação ocorre pelo movimento migratório de proteínas carregadas sob a influência de um campo elétrico. A velocidade de migração das proteínas depende da força do campo elétrico aplicado, da sua carga líquida, do seu tamanho, bem como da força iônica, da viscosidade e da temperatura do meio de suporte para a separação (Rocha et al., 2005). Devido à independência entre as duas dimensões de separação, géis contendo numerosos *spots*, em geral, bem definidos e separados podem ser obtidos. Cada um desses *spots* corresponde a uma proteína ou a uma forma protéica, a qual pode ser analisada por técnicas espectrométricas, a exemplo (Westermeyer, 2001).

A 2-DE é o método mais utilizado em análises proteômicas de misturas complexas de proteínas. Uma das suas principais vantagens é a sua capacidade de permitir comparar a expressão de proteínas nas células sob diferentes condições ambientais ou de tratamentos (Dhingra et al., 2005; Isaaq et al., 2005). Ao separar as proteínas, é possível obter informações sobre pI, MM, expressão e abundância relativa. Perfis gerados pela 2-DE em geral não representam a totalidade do proteoma, uma vez que esta técnica apresenta restrições quanto à detecção de proteínas com extremos de MM e pI, proteínas de membrana e proteínas expressas em baixas concentrações (Gygi et al., 2000, Resing e Ahn, 2005; Ye et al., 2007), além de inconvenientes como dificuldades relativas à coloração dos géis, baixa eficiência da extração e a possibilidade de proteólise da proteína em gel. Devido a esses fatores, a cromatografia líquida multidimensional (MDLC-HPLC) tem sido sugerida como substituto a 2-DE em muitos casos (Newton et al., 2004; Ye et al., 2007). Um dos mais recentes equipamentos oferecidos para a separação de proteínas utiliza uma associação das técnicas de separação, sendo a eletrofocalização (IEF) na primeira dimensão, seguida por técnicas cromatográficas em HPLC, uma vez que é possível a recuperação da amostra após a IEF em meio líquido (equipamento OFFGEL - Agilent) (Horth et al., 2006; Lam et al, 2007; Chenau et al., 2008)

#### **2.1.1.2. Cromatografia líquida multidimensional**

Apesar dos recentes progressos em 2-DE no que se refere à reprodutibilidade, à automação e à quantificação, os vários inconvenientes citados anteriormente ainda estão por serem solucionados (Nagele et al., 2004; Ye et al., 2007).

A combinação ortogonal de diferentes princípios de separação pela técnica de cromatografia líquida (LC), especialmente a de alta eficiência (HPLC), tem sido descrita com sucesso para separar proteínas intactas ou misturas de peptídeos, seja por separação bidimensional (2D-LC ou TDLC) ou multidimensional (MDLC) (Shi et al., 2004). Para analisar amostras de alta complexidade (células ou tecidos lisados) e de baixa concentração de proteínas, em geral, se utilizam análises por MDLC *offline*. Essa forma vem sendo a mais indicada, possibilitando que as amostras separadas na primeira dimensão sejam recolhidas e em seguida injetadas no cromatógrafo em uma próxima dimensão. A cada dimensão, as frações coletadas podem ser analisadas quanto à atividade biológica para a localização de frações protéicas de interesse específico. Após a última dimensão, estas frações protéicas são identificadas, em geral por espectrometria de massa (Moritz et al., 2003; Miller et al., 2004; Nagele et al., 2004; Neverova et al., 2005). Para a primeira dimensão de separação colunas de exclusão molecular, afinidade ou troca iônica, dentre outras, têm sido usadas. Para a segunda dimensão, a cromatografia de fase reversa é necessária para o preparo da amostra para as análises espectrométricas.

A técnica de separação por MDLC, especialmente *offline*, apresenta vantagens em relação às separações eletroforéticas, pois um maior número de proteínas pode ser analisado a partir de um mesmo extrato, e ainda favorece a análise de proteínas em baixas concentrações na mistura. A MDLC também se aplica com sucesso à purificação de proteínas hidrofóbicas, como as de membrana, que são freqüentemente alvos de drogas, e as proteínas de baixa MM ou peptídeos são melhor separados pelos princípios cromatográficos do que por 2-DE. Portanto, o uso da MDLC tem sido uma alternativa eficiente para superar as limitações encontradas nas separações utilizando a eletroforese bidimensional (Lanças et al., 2003).

### **2.1.1.3. Espectrometria de massa na identificação de proteínas**

A técnica de espectrometria de massa (MS) tornou-se indispensável na pesquisa associada às Ciências Biológicas, mostrando-se uma importante ferramenta não só pela sua notável sensibilidade, mas também pela qualidade e número de informações fornecidas pela técnica. Constantes refinamentos em sensibilidade, seletividade, precisão, acurácia, resolução e medição de massa têm melhorado a qualidade dos resultados obtidos na espectrometria de massa que consiste em é uma

técnica analítica para determinação da relação massa/carga com base no movimento de partículas carregadas em um campo elétrico e/ou magnético. As moléculas da amostra são convertidas em íons na fase gasosa e separadas de acordo com as suas relações de massa/carga ( $m/z$ ) (Westermeier e Naven, 2002). A ionização das proteínas na MS ocorre por dois métodos distintos: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation* (MALDI) e ionização por electrospray (ESI). O analisador é a parte do instrumento que separa os íons obtidos pela fonte ionizadora. Todos os analisadores podem ser utilizados para trabalhar com proteínas e peptídeos, mas os mais usados são o quadrupolo, o TOF e o *ion trap*, que podem ser utilizados sozinhos ou acoplados (Canas et al., 2006). A identificação das proteínas utilizando os dados de MS é realizada por comparação entre os mapas de peptídeos por *peptide mass fingerprint* (impressão digital da proteína ou peptídeo). Os valores de MM (proteínas digeridas ou não) obtidos são utilizados nas buscas em banco de dados teóricos sendo comparados com resultados de digestão *in silico* das proteínas existentes nestes, por meio de softwares específicos. Outra forma de identificação de proteínas é o sequenciamento, pelo uso da Espectrometria de Massa Sequencial, ou *in tandem* (MS/MS). Um peptídeo do espectro é selecionado, fragmentado (câmara de fragmentação do MS) e o espectro gerado é então analisado pela diferença de MM entre os picos e essa diferença é associada à MM dos 20 aminoácidos que compõe as proteínas, intactas ou modificadas, fornecendo informações de identificação da seqüência (Westermeier e Naven, 2002).

## **2.2. Proteoma em plantas**

Em termos de estratégias adotadas, a abordagem do estudo proteômico em plantas é semelhante às realizadas em sistemas animais e de microrganismos. Considerando a alta sensibilidade das técnicas envolvidas na análise de proteínas, observando-se que pequenos estímulos podem levar a alterações na expressão da proteína, vale ressaltar que modificações na expressão ou síntese protéica em tecidos ou células podem ser precisamente detectadas, pois análises comparativas de diferentes estados metabólicos ou de desenvolvimento podem ser avaliadas (Newton et al., 2004).

Análises proteômicas em plantas vêm utilizando a eletroforese bidimensional. Skylas et al., (2001) compararam os padrões de *spots* obtidos por 2-DE a partir de

sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.), com o objetivo de desenvolver métodos para discriminar cultivares. Em outro estudo utilizando 2-DE, Gallardo et al., (2003) demonstraram a ocorrência de alterações na expressão de várias proteínas em fases específicas de enchimento de sementes em *Medicago truncatula*, e 84 delas foram identificadas por meio da impressão digital do peptídeo em MALDI-TOF/MS. Mudanças no padrão *mass fingerprint* da LTP (Proteína de transferência de lipídeos) foram observadas durante a germinação de *Euphorbia lagascae*, em 2-DE (Eklund e Edqvist, 2003). A análise proteômica da compatibilidade da interação entre *Peronospora viciae* e *Pisum sativa*, permitiu a identificação de diferentes proteínas. Dentre as proteínas identificadas podem-se citar proteínas de resposta a estresse, proteínas induzidas por patógenos, proteínas fotossintéticas, proteínas de ligação a RNA ricas em glicina e duas gliceraldeído 3-fosfato desidrogenases (citosólica e cloroplástica), as quais poderão ser utilizadas no desenvolvimento de novas plantas com uma melhor resistência a estresses bióticos e abióticos (Amey et al. 2008).

Visando o estabelecimento de mapas de referência, análises proteômica de folhas de soja foram realizadas utilizando 2-DE combinada a MALDI-TOF-MS e LC-MS/MS, e verificou-se que esta combinação foi adequada e sensível para a separação e a identificação de proteínas de folhas de soja. Neste estudo foram identificadas 119 proteínas que poderão compor o mapa de referência da fisiologia foliar de soja (Xu et al., 2006). Xu et al., (2007), utilizando 2-DE, avaliaram o impacto da radiação da luz solar ultravioleta - B (UV-B) sobre o proteoma da folha de soja, buscando investigar o papel protetor de flavonóides contra UV-B, em duas isolinhas de soja (produção de níveis normais e reduzido de flavonóides). Estes autores verificaram redução de enzimas envolvidas no metabolismo primário de carbono e de nitrogênio, enquanto houve um aumento de proteínas relacionadas com a fotossíntese e de flavonóides, para a isolinha com produção de níveis normais de flavonóides. Os resultados sugerem que níveis elevados de flavonóides estão correlacionados a uma redução da sensibilidade UV-B. Outros estudos de proteoma de soja vêm sendo desenvolvidos visando à identificação de proteínas envolvidas na resposta a vários estresses (abióticos e bióticos) como: alagamento (Shi et al., 2008), presença de cádmio (Sobkowiak et al., 2006), salino (Aghaei et al., 2008).

### **2.3. Peptidômica**

O termo peptidômica foi descrito pela primeira vez por Schoofs (Clynen et al., 2001; Verhaert et al., 2001). Em função do maior reconhecimento da importância dos peptídeos no organismo e limitadas técnicas de identificação destes, surge uma nova área de trabalho - a Peptidômica, um ramo da proteômica que tem sido desenvolvido ao longo dos últimos 5 anos, e aplicado principalmente a estudos de peptídeos em animais e a neuropeptídeos. Peptidômica, à semelhança de proteômica, refere-se ao conjunto de peptídeos expressos (1-20 kDa) presentes em uma amostra biológica (tecidos biológicos, células ou fluidos) em uma dada situação celular. É uma metodologia relativamente rápida, eficiente e passível de detectar mudanças transitórias além de identificar modificações pós-traducionais (Ivanov e Yatskin, 2005; Cramer et al., 2005; Farroki et al., 2008).

Análises peptidômicas podem utilizar uma ou múltiplas etapas de cromatografia líquida para a separação de grandes complexos peptídicos, com o objetivo de facilitar o processo de fragmentação e de identificação por MS em seqüência (*tandem*) (MS/MS). As diferenças entre a proteômica e a peptidômica não se restringem aos baixos valores de massas moleculares dos peptídeos. Uma importante diferença é que, em geral, os peptídeos não necessitam de modificações químicas ou digestão enzimática, sendo sua identificação obtida na forma nativa (Farroki et al., 2008). Embora essas vantagens sejam uma oportunidade para a busca e a identificação de novos peptídeos, a peptidômica possui algumas limitações, como a baixa concentração das moléculas em estudo (Fricker et al., 2006). Além disso, a presença de enzimas proteolíticas nas células pode aumentar a complexidade do *pool* peptidômico. Em plantas, um grande número de peptídeos vem sendo identificado por meio de estudos bioquímicos e genéticos, com funções diversas, dentre elas, componentes de defesa (Farroki et al., 2008).

### **2.4. Peptídeos antimicrobianos na defesa de plantas**

Os AMPs são considerados de grande importância na defesa de plantas, como parte da barreira constitutiva pré-existente, e também como resposta induzida por infecção (García-Olmedo et al., 1998; 2001) e apresentam um grande potencial

enquanto compostos a serem explorados comercialmente como agentes antimicrobianos naturais, especialmente antifúngicos (Knight et al., 1997).

Baseado na similaridade da estrutura primária, AMPs de plantas podem ser classificados em 10 famílias, com massas moleculares que variam de 2 a 9 kDa, sendo denominadas: Tioninas, Defensinas, Proteínas de Transferência de Lipídios, Peptídeos semelhantes-à-haveína, Peptídeos semelhantes-a-nós, MBP1, IbAMP, Snakinas, Sheferdinas e Peptídeos macrocíclicos (Garcia-Olmedo et al., 2001).

As Tioninas correspondem ao primeiro grupo de peptídeos identificados com atividade antimicrobiana (Fernandez de Caleyá et al., 1972). Estes peptídeos são altamente básicos, ricos em cisteína, contendo 45 a 47 resíduos de aminoácidos. Elas podem ser encontradas em vários órgãos de plantas após ataque por patógenos. São tóxicas para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, leveduras ou diferentes tipos de células de mamíferos (Thevissen et al., 1996).

As proteínas de transferência de lipídios não específicas (nsLTPs) correspondem a uma família de peptídeos de cerca 7 a 9 kDa, contendo de 70 a 95 resíduos de aminoácidos, são encontradas em diversos tecidos de muitas espécies de mono e dicotiledôneas e estão envolvidas em mecanismos de defesa de plantas contra patógenos (Terras et al., 1992; Carvalho et al., 2001; Diz et al., 2006; Lin et al., 2007).

Peptídeos semelhante-a-haveína possuem 43 resíduos de aminoácidos e são ricos em cisteína/glicina (Broekaert et al., 1992). Os AMPs com padrão de enovelamento semelhante-a-nós (*Knotin-like*), denominadas knotinas, possuem de 36 a 37 resíduos de aminoácidos e três ligações dissulfeto (Broekaert et al., 1990). Ambas as famílias de peptídeos inibem o crescimento de uma ampla gama de fungos e de bactérias Gram-positivas *in vitro*, e suas atividades são revertidas por cátions bivalentes (Cammue et al., 1992). Duas outras famílias de AMPs contendo quatro ligações dissulfeto foram relatadas: MBP-1, com 33 resíduos de aminoácidos e extraído do milho, e o grupo de peptídeos de 20 resíduos de aminoácidos, Ib-AMPs, isolados de sementes de *Impatiens balsamina*, popularmente conhecida como beijo-de-frade, bálsamo-de-jardim, não-me-toques (Tailor et al., 1997). Snakinas (St-SN1), extraído de batatas, representam outra família de AMPs com 63 resíduos de aminoácidos e seis ligações dissulfeto, ativos contra fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Segura et al., 1999). A família das Sheferdinas é composta por peptídeos lineares ricos em glicina/histidina, isoladas de raízes de

*Capsella bursa-pastoris* (conhecida como bolsa-de-pastor, bucho-de-boi, chapéu-de-frade, panacéia), possuem de 28 a 38 resíduos de aminoácidos e são ativas contra bactérias e fungos (Park et al., 2000). Os peptídeos macrocíclicos, outra famílias de AMPs, foram purificados de diferentes plantas das famílias *Rubiaceae* (como membros dessa família podemos citar o café, gardênia, mata-pasto etc) e *Violaceae*(como membro mais conhecido dessa família podemos citar a violeta), possuem de 28 a 37 resíduos de aminoácidos, três ligações dissulfeto e são ativos contra bactérias Gram-positivas e moderada ação contra fungos (Tam et al., 1999; Craik et al., 2006; Mulvenna et al., 2006).

As defensinas de plantas são outra família de AMPs e representam a família melhor caracterizada. São peptídeos ricos em cisteína, com carga líquida positiva e massa molecular em torno de 5 kDa, apresentam propriedades estruturais e funcionais semelhantes às das defensinas de insetos e de mamíferos e um amplo espectro de ação contra fungos e/ou bactérias. São classificadas em quatro grupos de acordo com sua atividade antimicrobiana, atuam numa faixa de concentração micromolar e possuem em geral, baixa toxicidade para células de animais e de plantas (García-Olmedo et al., 1998).

O mecanismo de ação das defensinas vegetais, bem como de outros peptídeos com atividade antimicrobiana, ainda não é completamente entendido, embora vários estudos indiquem que a ação de AMPs ocorre, em geral, por alteração da permeabilidade de membranas (Thevissen et al., 2000). Os AMPs são catiônicos em sua maioria, anfipáticos, e a maior parte é capaz de destruir as bactérias por permeabilizar sua membrana celular e/ou formar canais. A carga positiva dos peptídeos facilita interações com os fosfolipídios de membrana, negativamente carregado e/ou o conteúdo ácido da parede celular, que são características da célula bacteriana, enquanto o caráter anfifílico possibilita a permeabilização na membrana (Papagianni, 2003). O aumento da permeabilidade da célula bacteriana possibilita a passagem de uma grande variedade de moléculas, incluindo peptídeos antimicrobianos, o que leva à sua morte (Liang e Kim, 1999; Zasloff, 2002). Peptídeos ainda podem ser translocados através da membrana e atuar em alvos intracelulares, impedindo a síntese de metabólitos importantes para o microrganismo. Por atuarem em diferentes compartimentos celulares, esses compostos tornam-se candidatos promissores ao desenvolvimento de drogas importantes no combate a patógenos resistentes aos antibióticos convencionais (Lohner, 2001; Zasloff, 2002).

Ainda vale ressaltar a sua especificidade contra procariontes, já que as células eucarióticas apresentam baixo potencial de membrana, altos níveis de colesterol e uma quantidade modesta de lipídeos aniônicos, o que dificulta a ação dos AMPs (Zasloff, 2002).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, o esfingolipídio manosilinositofosforilceramida M(IP)<sub>2</sub>C, foi demonstrado como o possível alvo de ligação para a defensina Dm-AMP1 promovendo a permeabilização da membrana e posterior inibição do crescimento do fungo. O gene IPT1 (gene que codifica para uma enzima envolvida no último passo da síntese de esfingolipídio M(IP)<sub>2</sub>C) parece estar envolvido na constituição do sítio de ligação. Um segundo gene SKN1, é um homólogo do gene KRE6, relacionado a biossíntese de β-1,6-glucanases, também parece estar relacionado a esse mecanismo. Mutantes que não expressavam os genes IPT1 ou SKN1, tiveram reduzida a presença de M(IP)<sub>2</sub>C na membrana e também a sensibilidade a DmAMP1. Quando estes mutantes foram reestabelecidos com os genes IPT1 ou SKN1, a sensibilidade DmAMP1 era observada, bem como os níveis de M(IP)<sub>2</sub>C, comparáveis ao tipo selvagem. Estes resultados mostraram que SKN1, juntamente com IPT1, estão envolvidos em biossíntese de esfingolipídios em *S. cerevisiae*, que constituem o sítio de ligação de defensinas (Thevissen et al., 2000; 2003; 2005)..

## **2.5. Peptídeos recombinantes e organismos transgênicos**

A expressão heteróloga tem se mostrado eficiente para produção de AMPs (Almeida et al.; 2001; 2002; Song et al., 2004; 2005; Jin et al., 2006; Xu et al., 2008), obtendo-se uma boa relação custo-benefício, com um rendimento de peptídeos nativos que permite caracterizações diversas escala laboratorial, bem como um sistema potencial de expressão em larga escala para uma possível aplicação comercial, como potenciais agentes de defesa.

AMPs também vêm sendo avaliados após a expressão por manipulações genéticas. Plantas de tabaco expressando constitutivamente defensinas de rabanete tiveram sua resistência aumentada para o fungo patogênico *Alternaria longipes* (Terras et al., 1995), e de maneira similar, plantas de tomate para *Alternaria solani* (Parashina et al., 2000). Canola (*Brassica napus*) expressando constitutivamente defensinas de ervilha mostrou um aumento da resistência contra a doença causada

pela *Leptosphaeria maculans* (Wang et al., 1999). Em plantas de batatas expressando defensinas de alfafa, foi demonstrado um grande aumento de resistência contra o fungo *Verticillium dahliae* em experimento de campo (Gao, et al., 2000). Ainda em plantas de batata a expressão de um gene sintético codificando peptídeos catiônicos com amino-terminal modificado (cecropina-melitina - MsrA1), permitiu aumento da resistência dessas plantas contra a bactéria *Erwinia sp*, bem como para os fungos *Fusarium e Phytophthora sp*. (Osusku et al., 2000). Banzet et al., (2002) transformaram plantas de tabaco utilizando defensinas de insetos (Drosomicina e Heliomicina) que apresentam alta similaridade estrutural com as defensinas de plantas e, em ensaios de atividade antimicrobiana “*in vitro*” estes peptídeos se mostraram ativos contra *Botrytis cinera e Saccharomyces cerevisiae*. Para as plantas transgênicas de tabaco que expressavam estes peptídeos, houve um aumento parcial da resistência para *Cercospora nicotianae*.

## **2.6. Aplicações dos peptídeos**

Farroki et al., (2008) relataram que diversos peptídeos em plantas vêm sendo identificados e caracterizados, e são candidatos promissores para diversas aplicações, tais como: lunasina (peptídeo de soja e cevada com 43 resíduos de aminoácidos) e tioninas que apresentam propriedades anticarcinogênicas; ciclotides, uma classe de pequenos peptídeos de planta que apresentou atividade inseticida, anti-HIV e anticitotóxica, indicando o potencial dos peptídeos de planta para o desenho racional de drogas para animais e plantas (Gunasekera et al., 2006, Marcos et al., 2008). As defensinas apresentam atividade antimicrobiana contra uma gama de microrganismos e corresponde a uma classe de peptídeos promissores para o desenvolvimento de drogas à semelhança de antibióticos. A síntese química, após identificação de domínios específicos curtos desses peptídeos que desempenhem a atividade biológica desejada, mostra-se como alternativa viável ao uso destes peptídeos como agentes terapêuticos, o que é evidenciado e buscado por laboratórios farmacêuticos e biotecnológicos.

Um maior conhecimento sobre os AMPs em plantas (biossíntese, mecanismos de ação, mecanismos genéticos envolvidos na expressão), poderá auxiliar na construção de organismos geneticamente modificados visando aumento da

resistência a doenças específicas, além do grande potencial apresentado pelos AMPs para agroindústria como compostos naturais a serem utilizados na defesa de plantas.

## 2.7. Soja

A soja (*Glycine max* (L) Merrill) é uma planta da família das fabáceas (leguminosas) de maior importância econômica no mundo. Atualmente são produzidos anualmente aproximadamente 200 milhões de toneladas de soja em todo o mundo. Nesse contexto, o Brasil aparece como o segundo maior produtor mundial, com produção de 58 milhões de toneladas na safra 2006/07, aproximadamente ¼ de toda produção mundial. Além disso, a soja lidera os produtos agropecuários na pauta de exportação do Brasil. A soja é um alimento rico em proteínas e lipídeos e sua inclusão na alimentação humana no mundo ocidental tem se tornado cada vez maior.

Além da importância econômica e nutricional, semente da planta é, em geral, o órgão responsável pela sua propagação e dispersão, e por isso carrega toda a informação genética necessária para a formação de um novo indivíduo (Xavier-Filho, 1993). Assim, acredita-se que o período de germinação seja muito crítico, e que todos os mecanismos de defesa estejam bastante ativos para assegurar sua propagação, incluindo uma importante ativação/expressão de peptídeos antimicrobianos. Barbosa, (2004) verificou que quando comparados os perfis cromatográficos de C18RP-HPLC dos extratos obtidos para os diferentes tempos de germinação (24, 48, 72 e 96 horas), apenas as sementes germinadas por 48 h foram capazes de sintetizar/expressar diferencialmente dois conjuntos protéicos. Os extratos protéicos parcialmente purificados das sementes germinadas por 48 horas foram capazes de o crescimento de duas importantes bactérias fitopatogênicas *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Gram-positiva) e *Ralstonia solanacearum* (Gram-negativa) e massas moleculares menores que 10 kDa foram identificadas nas frações obtidas da C18RP-HPLC.

Considerando que, em geral, muitos AMPs apresentam amplo espectro de ação antimicrobiana e baixa toxicidade para células de mamíferos, o objetivo deste trabalho foi a bioprospecção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) de soja (*Glycine max*) utilizando ferramentas proteômicas.

### 3. Referências bibliográficas

- Aghaei, K; Ehsanpour, A. A.; Shah, H.; Komatsu, S. (2008) Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. *Amino Acids*. DOI 10.1007/s00726-008-0036-7
- Agrawal, G.K.; Yonekura, M.; Iwahshi, Y.; Iwashii, H.; Rakwal, R. (2005) System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants: Part III: Unraveling the proteomes influenced by the environment, and at the levels of function and genetic relationships. *J. Chromatogr B*, 815:137-145.
- Alberts B. (1998) The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* 92:291–294.
- Almeida, M.S.; Cabral, K.S.; Medeiros, L.N.; Valente, A.V.; Almeida, F.C.; Kurtenbach, E. (2001) cDNA Cloning and Heterologous Expression of Functional Cystein-Rick Antifungal Protein PSD1 in the Yeast *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 395 (15):199-207.
- Almeida, M.S.; Cabral, K.S.; Kurtenbach, E.; Almeida, F.C., Valente, A.V.; (2002) Solution structure o *Pisum sativum* defensin1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. *J. Mol. Biol.* 315: 749-757.
- Amey, R. C.; Schleicher, T.; Slinn, J.; Lewis, M.; Macdonald, H.; Neill, S. J.; Spencer-Phillips, P. T. N. (2008) Proteomic analysis of a compatible interaction between *Pisum sativum* (pea) and the downy mildew pathogen *Peronospora viciae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 122:41–55.
- Banzet, N.; Latorse, M.P.; Bulet, P.; François, E.; Derpierre, C. ; Dubals, M. (2002) Expression of insect cysteine-rich antifungal peptides in transgenic tobacco enhances resistance to a fungal. *Plant Sc.* 162: 995- 1006.
- Barbosa, M.O. (2004) Purificação e atividade antibacteriana de peptídeos sintetizados durante a germinação de sementes de soja (*Glycine max* [L.] Merrill) Dissertação, Universidade Federal de Viçosa.
- Broekaert, W.F.; Terras, F.R.G.; Cammue, B.P.A.; Vanderleyden, J. (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol. Lett.*, 69: 55-60.
- Broekaert, W.F.; Mariën, W.; Terras, F.R.G.; De Bolle, M.F.C.; Proost, P.; Damme, J.V.; Dillen, L.; Claeys, M.; Rees, S.B.; Vanderleyden, J.; Cammue, B.P.A. (1992) Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*, 31: 4308-4314.
- Cammue, B.P.A.; De Bolle, M.F.C.; Terras, F.R.G.; Proost, P.; Damme, J.V.; Rees, S.B.; Vanderleyden, J.; Borekaert, W.F. (1992) Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.*, 267: 2228-2233.

- Canas, B.; Lópes-Ferrer, D.; Ramos-Fernández, A.; Camafeita, E.; Calvo, E. (2006) Mass spectrometry technologies for proteomics. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 4(4): 295-320.
- Carvalho, A.O.; Machado, O.L.T.; Cunha, M.D.; Santos, I.S.; Gomes, V.M. (2001) Antimicrobial peptides and immunocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiol. Biochem.*, 39: 137-146.
- Chenau, J.; Michelland, S.; Sidibe, J.; Seve, M., (2008) Peptides OFFGEL electrophoresis: a suitable pre-analytical step for complex eukaryotic samples fractionation compatible with quantitative iTRAQ labeling. *Proteome Science*, 6:9 doi:10.1186/1477-5956-6-9
- Clynen, E.; Baggerman, G.; Veelaert, D.; Cerstiaens, A.; Van der Horst, D.; Harthoorn, L.; Derua, R.; Waelkens, E.; De Loof, A.; Schoofs, L. (2001) Peptidomics of the pars intercerebralis-corpora cardiaca complex of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Eur. J. Biochem.*, 268:1929–1939.
- Cobon, G.S.; Verrills, N.; Papakostopoulos, P.; Eastwood, H.; Linnane, A.W. (2002) The proteomics of ageing. *Biogerontology* 3:133–136.
- Cramer, R.; Schulz-Knappe, P.; Zucht, H.D. (2005) The future of post-genomic biology at the proteomic level: an outlook. *Combinatorial Chem. High Throughput Screening*, 8:807-810.
- Dhingra, V.; Gupta, M.; Andacht T.; Fu, Z.F. (2005) New frontiers in proteomics research: A perspective. *Int. J. Pharm.* 299:1–18
- Craik, D.J.; Cemazar, M.; Wang, C.K.; Daly, N.L. (2006) The cyclotide family of circular miniproteins: nature's combinatorial peptide template. *Biopolymers*, 84:250–266.
- Diz, M.S.; Carvalho, A.O.; Rodrigues, R.; Neves-Ferreira, A.G.; Da Cunha, M.; Alves, E.W.; Okorokova-Facanha, A.L.; Oliveira, M.A.; Perales, J.; Machado, O.L.; Gomes, V.M. (2006) Antimicrobial peptides from chili pepper seeds cause yeast plasma membrane permeabilization and inhibit the acidification of the medium by yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 1760:1323–1332.
- Eklund, D.M.; Edqvist, J. (2003) Localization of non-specific lipid transfer proteins correlate with programmed cell death responses during endosperm degradation in *Euphorbia lagascae* seedlings. *Plant Physiol.*, 132:1249–1259.
- Farrokhi, N.; Whitelegge, J.P.; Brusslan J.A. (2008) Plant peptides and peptidomics. *Plant Biotechnol. J.*, 6:105–134.
- Fernandez de Caleyra, R.; Gonzales-Pascual, B.; Garcia-Olmedo, F.; Carbonero, P. (1972) Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothins in vitro. *Appl. Microbiol.*, 23:998-1000.
- Fricker, L.D.; Lim, J.; Pan, H.; Che, F.Y. (2006) Peptidomics: identification and quantification of endogenous peptides in neuroendocrine tissues. *Mass Spectrom. Rev.*, 25:327– 344.

- Gallardo, K.; Le Signor, C.; Vandekerckhove, J.; Thompson, R.D.; Burstin, J., (2003) Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. *Plant Physiol.* 133:664–682.
- Gao, A.G.; Hakimi, S.M.; Mittanck, C.A.; Wu, Y.; Woerner, B.M.; Starck, D.M.; Shah, D.M.; Liang, J.; Rommens, C.M. (2000) Fungal Pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.* 18: 1307- 1310.
- García-Olmedo, F.; Molina, A.; Alamillo, J.M.; Rodríguez-Palenzuela, P. (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers*, 47:479-491.
- García-Olmedo, F.; Rodríguez-Palenzuela, P.; Molina, A.; Alamillo, J.M.; López-Solanilla, E.; Berrocal-Lobo, M.; Poza-Carrión, C. (2001) Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Lett.*, 498: 219-222.
- Godovac-Zimmermann J, Brown LR. (2001) Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass Spectrom Rev.*, 20:1– 57.
- Gunasekera, S., Daly, N.L., Anderson, M.A. and Craik, D.J. (2006) Chemical synthesis and biosynthesis of the cyclotide family of circular proteins. *IUBMB Life*, 58:515–524.
- Gygi, S.P.; Corthals, G.L.; Zhang, Y.; Rochon, Y.; Aebersold, R. (2000) Evaluation of two-dimensional electrophoresis based proteome analysis technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9390–9394.
- Isaak, H.J.; Chan, K.C.; Janini, G.M.; Conrads, T.P.; Veenstra T.D. (2005) Multidimensional separation of peptides for effective proteomic analysis. *J. Chromatogr. B*, 817:35–47
- Hancock, R.E.W.; Lehrer, R. (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnol.*, 16:82-88.
- Hancock, R.E.W.; Diamond, G. (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *TRENDS in Microbiol.*, 8: 402-410.
- de Hoog, C.L.; Mann, M. (2004) Proteomics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 5:267–293.
- Ivanov, V.T.; Yatskin, O.N. (2005) Peptidomics: a logical sequel to proteomics. *Expert Rev. Proteomics*, 2:463-73.
- James, P. (1997) Protein identification in the post-genomic era: the rapid rise of proteomics. *Q. Ver. Biophys.* 30(4): 279-331.
- Jin, F.; Xu, X.; Zhang, W.; Gu, D. (2006) Expression of recombinant hybrid peptide cecropinA(1–8)–magainin2(1–12) in *Pichia pastoris*: Purification and characterization. *Protein Expression Purif.* 50:147–156.
- Knight, S.C.; Anthony, V.M.; Brady, A.M.; Greenland, A.J.; Heaney, S.P.; Murray, D.C.; Powell, K.A.; Schulz, M.A.; Spinks, C.A.; Worthington, P.A.; Youle, D.

- (1997) Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 35:349-372.
- Lam, H.T.; Josserand, J.; Lion, N.; Girault, H.H. (2007) Modeling the isoelectric focusing of peptides in an OFFGEL multicompartement cell. *J Proteome Res.* 6(5):1666-76.
- Lanças, F.M. (2003) The Role of the Separation Sciences in the 21th Century. *J. Braz. Chem. Soc.* 14(2):183-197, 2003.
- Lin, P.; Xia, L.; Ng, T.B. (2007) First isolation of an antifungal lipid transfer peptide from seeds of a *Brassica* species. *Peptides*, 28:1514–1519.
- Liang, J.F.; Kim, S.C.J. (1999) Not only the nature of peptide but also the characteristics of cell membrane determine the antimicrobial mechanism of a peptide. *Peptide Res.*, 53:518-522.
- Lohner, K. (2001) The role of membrane lipid composition in cells targeting of antimicrobial peptides. In “Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies. Lohner, K. (Ed), Horizon Scientific Press, England, pp. 149-165.
- Mann, M.; Jensen, O.N. (2003) Proteomic analysis of posttranslational modifications. *Nat. Biotechnol.*, 21:255–261.
- Mansfield, J.W. (1983). Antimicrobial compounds. In *Biochemical Plant Pathology*, J.A. Callow, ed (Chichester, UK: John Wiley and Sons).
- Marcos; J.F; Muñoz, A.; Pérez-Paía, E.; Misra, S.; López-Garcia, B. (2008) Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:273–301.
- Miller, C. A., Meza, J. E., Perkins, P. D. (2004) Evaluation of Multidimensional Strategies for the Analysis of Complex Proteomics Samples. Poster–ASMS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA.
- Monti, M.; Orru, S.; Pagnozzi, D.; Pucci P. (2005) Functional proteomics. *Clin. Chim Acta* 357:140–150.
- Moritz, R., Nagele, E., Vollmer, M., Horth, P. (2003) Off-line Multi Dimensional LC/MS as Effective and Flexible Tool for Proteomics Research. Agilent Technologies, 51st ASMS Conference, Montreal, Canadá.
- Mulvenna, J.P.; Mylne, J.S.; Bharathi, R.; Burton, R.A.; Shirley, N.J.; Fincher, G.B.; Anderson, M.A.; Craik, D.J. (2006) Discovery of cyclotide-like protein sequences in graminaceous crop plants: ancestral precursors of circular proteins? *Plant Cell*, 18:2134–2144
- Nagele, E.; Vollmer, M.; Horth, P.; Vad, C. (2004) 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Expert Rev. Proteomics*, 1:37 – 46.

- Neverova, I.; Van Eykb, J.E. (2005) Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *J. Chromatogr. B*, 815: 51–63.
- Newton, R.P.; Brenton, A.G.; Smith, C.J.; Dudley E. (2004) Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry* 65:1449–1485.
- Osusky, M.; Zhou, G.; Osusky, L.; Hancock, R.E.; Kay, W.W.; Misra, S. (2000) Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nat. Biotechnol.*, 18: 1162 – 1166.
- Papagianni, M. (2003) Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Adv.* 21: 465-499.
- Parashina, E.V.; Serdobinskii, L.A.; Kalle, E.G.; Lavorova, N.V.; Avetisov, V.A.; Linin, V.G.; Naroditskii, B.S. (2000) Genetic engineering of oilseed rape and tomato plants expressing a radish defensin gene. *Rus. J. Plant Physiol.* 47: 417-423.
- Horth, P.; Miller, C.A.; Preckel, T; Wenz, C. (2006) Efficient Fractionation and Improved Protein Identification by Peptide OFFGEL. *Electrophoresis Mol. Cell. Proteomics* 5:1968–1974.
- Park, C.J.; Park, C.B.; Hong, S.S.; Lee, H.S.; Lee, S.Y.; Kim, C.(2000) Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. *Plant. Mol. Biol.*, 44:187-197.
- Resing, K.A.; Ahn, N.G. (2005) Proteomics strategies for protein identification. *FEBS Lett.* 579:885–889.
- Rocha, T.L.; Alves-Costa, P.H.; Magalhães, J.C.C.; Evaristo, R.C.S.; Rosas-Vasconcelos, E.A.; Coutinho, M.V.; Paes, N.S.; Mattar-Silva, M.C.; Grossi-de-Sá, M.F. (2005) Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas. Comunicado Técnico 136. ISSN 9192-0099. Brasília, DF.
- Segura, A.; Moreno, M.; Madueño, F.; Molina, A.; García-Olmedo, F. (1999) Snakin-1 a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Molec. Plant-Microbe Int.*, 12:16-23.
- Shi, F.; Yamamoto, R.; Shimamura, S.; Hiraga, S.; Nakayama, N.; Nakamura, T.; Yukawa, K.; Hachinohe, M.; Matsumoto, H.; Komatsu, S. (2008) Cytosolic ascorbate peroxidase 2 (cAPX 2) is involved in the soybean response to flooding. *Phytochemistry* 69:1295–1303
- Shi, Y.; Xiang, R.; Horv'ath, C.; Wilkins, J.A. (2004) The role of liquid chromatography in proteomics *J. Chromatogr A*, 1053:27–36
- Sobkowiaka, R.; Deckertb, J. (2006) Proteins induced by cadmium in soybean cells. *J. Plant Physiol.* 163: 1203-1206

- Song, X.; Zhou, Z.; Wang, J.; Wu, F. (2004) Purification, characterization and crystallographic studies of a novel defensin from *Pachyrrhizus erosus* seeds. *Acta Cryst. D* 60:1121-1124.
- Song, X.; Wang, J.; Wu, F.; Li, X.; Teng, M.; Gong, W. (2005) cDNA cloning, functional expression and antifungal activities of a dimeric plant defensin SPE10 from *Pachyrrhizus erosus* seeds. *Plant Mol. Biol.*, 57:13-20.
- Taylor, R.H.; Acland, D.P.; Attenborough, S.; Cammue, B.P.A.; Evans, I.J.; Osborn, R.W.; Ray, J.A.; Rees, S.B.; Broekaert, W.F. (1997) A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J. Biol. Chem.*, 272: 24480-2448.
- Tam, J.P.; Yi-An, L.; Jin-Long, Y.; Koiu-Wei, C. (1999) An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:8913-8918.
- Terras, F.R.G.; Schoofs, H.M.E.; De Bolle, M.F.C.; Leuven, F.V.; Rees, S.B.; Vanderleyden, J.; Cammue, B.P.A. and Broekaert, W.F. (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.*, 267:15301-15309.
- Terras, F.R.G.; Eggermont, K.; Kovaleva, V.; Raikhel, N.V.; Osborn, R.W.; Kester, A.; Rees, S.B.; Torrekens, S.; Leuven, F.V.; Vanderleyden, J.; Cammue, P.A.; Broekaert, W.F. (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from Radish: Their role in host defense. *Plant Cell*, 7:573-588.
- Thevissen, K.; Ghazi, A.; De Samblanx, G.W.; Brownlee, C.; Osborn, R.W.; Broekaert, W.F. (1996) Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.*, 271:15018-15025.
- Thevissen, K.; Cammue, B.P.A.; Lemaire, K.; Winderickx, J.; Dickson, R.C.; Lester, R.L.; Ferket, K.K.A.; Even, F.V.; Parret, A.H.A.; Broekaert, W.F. (2000) A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 15: 9531-9536.
- Thevissen, K.; François, I.E.J.A.; Takemoto, J.Y.; Ferket, K.K.A.; Meert, E.M.K.; Cammue, B.P.A. (2003) DmAMP1, an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*) interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae* *FEMS Microbiol Lett*, 226:169-173.
- Thevissen, K.; Baldys J.I.; Im Y.J.; Takemoto J; François, I.E.J.A; Ferket, K.K.A.; Aerts, A.M.; Meerta, E.M.K.; Winderickx, J.; Roosens, J.; Cammue, B.P.A. (2005) SKN1, a novel plant defensin-sensitivity gene in *Saccharomyces cerevisiae*, is implicated in sphingolipid biosynthesis *FEBS Lett.* 579:1973–1977.
- Verhaert, P.; Uttenweiler-Joseph, S.; de Vries, M.; Loboda, A.; Ens, W.; Standing, K.G. (2001) Matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry: an elegant tool for peptidomics. *Proteomics*, 1:118–131.

- Wang, Y.P.; Nowak, G.; Culley, D. Hadwiger, L.A.; Frietensky, B. (1999) Constitutive expression of a pea defense gene DRR206 confers resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in transgenic canola (*Brassica napus*). *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 410-418.
- Westermeyer, R. (2001) *Electrophoresis in practice: A guide to methods and applications of DNA and proteins separations.* 3<sup>rd</sup> ed. Weinheim: Wiley-VHC. 349p.
- Wilkins, M.R.; Gasteiger, E.; Tonella, L.; Ou, K.; Tyler, M.; Sanchez, J.C.; Gooley, A.A.; Walsh, B.J.; Bairoch, A.; Appel, R.D.; Williams, K.L.; Hochstrasser, D.F.; (1998) Protein identification with N and C terminal sequence tags in proteome projects. *J. Mol. Biol.* 278:599–608.
- Ye, M.; Jiang, X.; Feng, S.; Tian, R.; Zou, H. (2007) Advances in chromatographic techniques and methods in shotgun proteome analysis. *Trends Anal. Chem.* 26(1):80-84
- Xu, F.; Meng, K.; Wang, Y.; Luo, H.; Yang, P.; Wu, N.; Fan, Y.; Yao, B. (2008) Eukaryotic expression and antimicrobial spectrum determination of the peptide tachyplesin II. *Protein Expression Purif.* 58:175–183
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389-395.

## 4. CAPÍTULO 1

### PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS ESTÃO PRESENTES EM SEMENTES DE SOJA EM GERMINAÇÃO

#### 4.1. Resumo

Técnicas baseadas em separações por TDLC ou MDLC, acopladas à espectrometria de massa (MS), têm sido utilizadas nas separações protéicas/peptídicas, para estudos de bioprospecção de proteínas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a síntese/expressão diferencial de peptídeos de sementes de soja não germinadas (SSNG) e germinadas por 48 horas (SSG48), utilizando ferramentas peptidômicas. Peptídeos de SSNG e SSG48 foram extraídos em tampão de extração contendo inibidores de proteases, seguido de fracionamento salino, aquecimento seletivo, diálise (1.000 Da) e cromatografia de troca aniônica e C18RP-HPLC. Ensaio de biorevelação foi realizado com a fração catiônica de SSG48 após cromatografia de troca aniônica. As etapas iniciais de purificação favoreceram o enriquecimento das amostras em peptídeos (< 10 kDa). A comparação do peptidoma (catiônico e aniônico) de SSNG e de SSG48 após cromatografia de troca aniônica mostrou um maior número de tipos de proteínas ou peptídeos para SSG48. Para as SSNG foi observada a predominância de proteínas aniônicas. Os perfis cromatográficos após C18RP-HPLC evidenciam um maior número de frações protéicas hidrofílicas para as SSNG, enquanto para SSG48 foram evidenciados frações protéicas mais hidrofóbicas. A SDS-Tricina-PAGE das frações obtidas após C18RP-HPLC mostraram a presença de bandas peptídicas para SSNG e SSG48. Peptídeo(s) catiônicos de SSG48 foram capazes de inibir o crescimento da bactéria fitopatogênea *Ralstonia solanacearum* em ensaio de biorrevelação. As análises de MS das frações de SSNG e de SSG48 após RP-HPLC identificaram massas moleculares entre 3-9 kDa. Esses resultados sugerem uma síntese peptídica ou protéica diferencial entre essas duas condições fisiológicas, evidenciando para SSG48 um potencial para identificação de importantes peptídeos expressos envolvidos nos processos de defesa.

## 4.2. Introdução

Para o entendimento da função do conjunto de genes em um organismo, é necessário conhecer não só quais genes são expressos, quando e onde, mas também quais são os produtos de sua expressão e em que condições essas proteínas ou esses peptídeos são sintetizados nos tecidos. Pode-se definir o proteoma como o conjunto completo de proteínas expressas por um genoma em um momento fisiológico específico, incluindo-se isoformas e modificações pós-traducionais ocorridas nas proteínas (de Hoog and Mann, 2004; Newton, et al., 2004). Embora os genomas de diversos organismos tenham sido identificados na última década, a informação por eles gerada, em geral, não reflete o estado funcional das células ou dos tecidos. Sabe-se que o genoma apresenta uma natureza estática enquanto o proteoma de cada célula é dinâmico. Assim, mudanças no padrão de expressão protéica certamente ocorrem em função de mudanças do estado fisiológico, da presença de metabólitos, ou de sinais intra e extracelulares, como temperatura, estresse, sinais apoptóticos, e outros (Monti, et al., 2005; Mann e Jensen, 2003).

Na análise proteômica dos organismos, tecidos, células ou organelas, em geral, são desenvolvidas etapas sucessivas para se obter a identificação de um proteoma, tais como: o preparo de extratos protéicos, o pré-fracionamento, a separação e/ou purificação das proteínas ou peptídeos por eletroforese bidimensional (2D), cromatografia líquida em duas dimensões (TDLC) ou multidimensional (MDLC), seguindo-se a espectrometria de massa. Essa proposta de etapas não é rígida, numa concepção universal, considerando que as diferentes amostras protéicas requerem ajustes particulares para o estudo do proteoma. O peptidoma, à semelhança do proteoma, refere-se ao conjunto de peptídeos expressos/sintetizados em uma amostra biológica, sejam tecidos, células ou fluídos, em uma dada situação celular. O estudo do peptidoma tem o objetivo, ainda, de elucidar estruturas e propriedades biológicas destes peptídeos, e seu envolvimento no metabolismo celular.

Técnicas baseadas em separações por TDLC ou MDLC, acopladas à espectrometria de massa (MS), têm sido desenvolvidas com uma resolução comparável à obtida por 2-DE (Shi et al., 2004). O uso da TDLC ou MDLC *offline* tem gerado significativos ganhos na resolução das separações protéicas, a partir de amostras complexas, facilitando a identificação de um maior número de proteínas, mostrando-se apropriada para a bioprospeção de proteínas ou peptídeos específicos,

muitas vezes presentes em baixas concentrações nas amostras (Moritz et al., 2003; Miller et al., 2004; Nagele et al., 2004; Neverova et al., 2005).

Embora seja a técnica mais utilizada em proteômica, a eletroforese bidimensional é limitada para a detecção de peptídeos, conforme amplamente relatado (Resing e Ahn, 2005; Ye et al., 2007). Portanto a identificação do peptidoma é em geral realizada por TDLC ou por MDLC. A separação de proteínas ou peptídeos utilizando TDLC/HPLC é favorecida pela combinação de diferentes colunas cromatográficas, permitindo o uso de diferentes fases estacionárias e diferentes princípios de separação para a obtenção de maiores resoluções nas separações (Ye et al., 2007). Dentre as vantagens dos procedimentos multidimensionais em HPLC estão a possibilidade de serem automatizados, além de serem sensíveis, reprodutíveis, rápidos, quantitativos e, especialmente, permitem a recuperação de amostras nativas em quantidades suficientes para o desenvolvimento de análise funcionais. Separações de proteínas ou peptídeos por HPLC ainda podem ser conjugadas com diferentes sistemas de detecção e de identificação, como espectrofotometria por ultravioleta (UV) e espectrometria de massa (MS).

Em plantas, um grande número de peptídeos vem sendo identificados por meio de estudos bioquímicos e genéticos. Os peptídeos extracelulares podem exercer várias funções, incluindo sinalização e defesa, enquanto que os intracelulares exercem funções fisiológicas variadas. Nos últimos anos, novos peptídeos com atividade antimicrobiana têm sido isolados de plantas e, em particular, de sementes (Carvalho et al., 2001). Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são, em sua maioria, menores que 10 kDa, têm carga líquida positiva, e 50% de seus aminoácidos são hidrofóbicos (Hancock et al., 2000). Os AMPs foram divididos em famílias, com base em seu tamanho, estruturas secundárias e terciária, e na presença ou ausência de pontes dissulfeto (Reddy et al., 2004). Apesar do seu pequeno tamanho e aspectos físico-químicos comuns, em geral os AMPs têm estrutura tridimensional complexa (aqueles que apresentam ligações de enxofre ou em meio hidrofóbico), sendo formados por associações de folhas  $\beta$ , estabilizadas por duas a quatro ligações dissulfeto e muitas vezes associadas a um domínio em  $\alpha$ -hélice. Em vegetais, foram identificadas dez famílias de peptídeos antimicrobianos que fazem parte da barreira constitutiva ou induzida para a defesa da planta, com massas moleculares variando de 2 a 9 kDa. Como principais características destes AMPs, podem ser citadas a baixa toxicidade, o baixo impacto ambiental e a compatibilidade com o manejo

integrado de pestes, o que é de especial importância para o controle de pragas e de doenças de plantas (García-Olmedo et al., 1998; 2001). Os produtos naturais diversos, podendo-se incluir aqui os AMPs, representam uma rica fonte de compostos a serem explorados na seleção de novos agentes de defesa para a agroindústria (Knight et al., 1997).

Assim, a análise peptidômica, ou simplesmente peptidômica, é de grande importância na identificação de peptídeos expressos em diferentes situações fisiológicas, incluindo-se os mecanismos de defesa de plantas, bem como no entendimento dos mecanismos moleculares específicos de ação desses peptídeos (Mamone et al., 2004). A soja (*Glycine max* (L). Merr.) é a leguminosa de maior importância econômica no mundo, é também um alimento rico em proteínas e lipídeos e sua inclusão na alimentação humana no mundo ocidental tem se tornado cada vez maior. Assim, este trabalho visou à identificação da síntese/expressão diferencial de peptídeos antimicrobianos em sementes de soja germinadas por 48h quando comparadas com sementes não germinadas, utilizando ferramentas peptidômicas.

### **4.3. Material e Métodos**

#### **4.3.1. Material biológico**

Sementes de soja da variedade UFV16, gentilmente cedidas pelo Programa de Melhoramento de Soja do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), na UFV, foram germinadas por 48 horas (SSG48) em câmara de germinação, a 28 °C.

A bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum* (importante bactéria fitopatogênica - Gram negativa) utilizada para o teste de inibição foi cedida pelo Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico, UFV. A bactéria foi mantida em estoque de glicerol (- 80 °C) e crescida em meio LB líquido, a 28 °C.

#### **4.3.2. Preparo dos extratos protéicos**

Os extratos protéicos das sementes não germinadas e germinadas de soja foram obtidos conforme descrito por Teixeira et al. (2006), com modificações. As

sementes não germinadas (SSNG) foram moídas (Moinho Pulverisette 14, marca Fritsh), enquanto que as SSG48 foram trituradas em liquidificador, na presença de nitrogênio líquido. Ambas foram adicionadas de 2,5 volumes de tampão de extração Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo EDTA 10 mM, PMSF 1 mM e benzamidina 1 mM. Os homogenatos obtidos foram agitados por 2 h a 4 °C, centrifugados a 20.300 g / 4 °C / 30 min. Os sobrenadantes obtidos foram precipitados com 35 % de saturação de sulfato de amônio sólido por 2 h / 4 °C, sob agitação lenta. Após centrifugação, os sobrenadantes resultantes foram aquecidos a 80 °C por 15 min e novamente centrifugados, seguindo-se diálise em membrana de exclusão molecular de 1.000 Da. Os extratos protéicos de SSNG e SSG48 foram filtrados (0,22 µm) e utilizados como amostra nas etapas cromatográficas de purificação.

#### **4.3.3. Obtenção das frações enriquecidas em peptídeos**

Os extratos de SSNG e SSG48 obtidos após aquecimento e diálise foram submetidos à cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose (D = 1,8 cm x C = 30,5 cm), sob baixa pressão, em temperatura ambiente, em coluna equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, eluída isocraticamente ao fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. O eluato protéico foi avaliado por A<sub>214</sub> e A<sub>280</sub>. Para cada extrato protéico, foram realizadas três corridas cromatográficas. A fração protéica catiônica não ligada à coluna, eluída em tampão de equilíbrio, foi enriquecida nos peptídeos catiônicos de interesse. As proteínas ligadas à coluna foram eluídas no tampão de equilíbrio em presença de 1 M de NaCl, representando a fração de proteínas aniônicas, que foram reservadas para posterior avaliação. Foram coletadas frações de 1,0 mL. O *pool* catiônico foi dessalinizado em membrana de diálise com limite de exclusão de 1.000 Da e concentrado, as frações ricas em peptídeos catiônicos foram separadas em uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub>-Shim Pack (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão), previamente equilibrada em TFA 0,1% (solução A), ao fluxo constante de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e à temperatura ambiente, em equipamento HPLC (Waters Corporation, MA, USA). As proteínas foram eluídas em gradiente descontínuo de acetonitrila (10 a 100%), utilizando a solução B composta por TFA 0,1% e acetonitrila 80%. A eluição dos peptídeos da coluna foi monitorada nos comprimentos de onda de A<sub>214</sub> e A<sub>280</sub> e as frações peptídicas obtidas foram separadas por SDS-Tricina-PAGE e utilizadas para determinar as massas moleculares (MM).

#### **4.3.4. Espectrometria de Massa**

Análises de espectrometria de massa foram realizadas no Núcleo de Biomoléculas do ICB/UFMG, com a co-orientação do Prof. Marcelo Mattos Santoro, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da UFMG. As análises foram realizadas em um espectrômetro do tipo ESI-Q-TOF (electrospray-quadrupolo com tempo-de-vôo) com um Q-TOF Micro™ (Micromass) e a fonte de ionização por eletrodispersão (*electrospray*) foi operada em modo de ionização positiva ou negativa. A voltagem capilar utilizada foi de 3,0-3,5 kV, e para as amostras de 40-60 V. As amostras foram diluídas em solução 50% acetonitrila / 0,1 % TFA em água Milli-Q e injetadas diretamente no espectrômetro, utilizando uma seringa com o fluxo de 5 - 10  $\mu$  L.min<sup>-1</sup>.

#### **4.3.5. Eletroforese dos peptídeos em gel de poliacrilamida de três fases na presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE)**

Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE) foi realizada segundo Judd (1994), em um gel de três fases, composto por um gel de concentração (5,12% T e 2,6% C), um gel intermediário (9,9% T e 3,0% C) e um gel de separação (16,5% T e 3,0% C). Para o gel intermediário e de separação, utilizou-se uma solução 49,5% T (p/v) e 3,0% C (p/p), a partir da solução composta por acrilamida:N,N'-bis-metileno acrilamida (48,0:1,5). Para o gel de concentração, foram utilizadas as soluções 30,8% T (p/v) e 2,6% C (p/p), a partir da solução acrilamida:N,N'-bis-metileno acrilamida (30,0:0,8). O gel de separação foi preparado a 16,5% T, em Tris-HCl 1 M, pH 8,9, e 0,1% de SDS. O gel intermediário foi preparado a 10,0% T, em Tris-HCl 1 M, pH 8,9, com 0,1% de SDS. O gel de concentração foi preparado a 5,0%T, em Tris-HCl 0,13 M, pH 6,8. As frações protéicas de sementes não germinadas e germinadas, obtidas após RP-HPLC, foram utilizadas como amostra. Os géis foram revelados pelo método da prata (Pharmacia-Biotech (2000)). Para a fração catiônica obtida após a cromatografia de troca aniônica dos extratos de SSG48, o gel foi revelado pelo método do Commassie Brilliant Blue G250. A eletroforese foi desenvolvida a 100 V por 15 min, a 80 V por

20 min, e a 60 V até o final do procedimento, perfazendo 6,5 h. Foram utilizados os marcadores de massas moleculares de ampla e de baixa faixa (BioRad).

#### **4.3.6. Atividade antibacteriana**

A atividade antimicrobiana da fração catiônica de GS48 foi determinada pelo método de biorrevelação, de acordo com Bhunia et al. (1987) modificado, utilizando *Ralstonia solanacearum* como o microrganismo indicador. Uma camada de meio LB semi-sólido contendo o microrganismo indicador ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>), foi colocada em uma placa de Petri, e sobre este meio foi disposto o gel de poliacrilamida (SDS-Tricine-PAGE), contendo a fração catiônica de GS48 e revelado com o coomassie blue, e a placa foi incubada a 30 °C por 12 h. A presença de halos de inibição do crescimento do microrganismo indicador foi avaliada em torno de bandas de proteínas no gel. As amostras foram submetidas a três tratamentos antes da separação no gel: continham 0,4% de SDS e 20% de β-mercaptoetanol, ou somente SDS ou a ausência de ambos.

#### **4.4. Resultados e Discussão**

A precipitação por sal e o aquecimento seletivo utilizados como etapas iniciais da purificação favoreceram o enriquecimento de peptídeos de MM baixas (inferiores a cerca de 20 kDa), e termorresistentes (submetidos a 80 °C por 15 min), características que foram evidenciadas ao longo dos ensaios aos quais essas frações foram submetidas.

A comparação do peptidoma presente nos extratos de SSNG com o peptidoma de SSG48, pela avaliação dos perfis cromatográficos de troca aniônica (Figura 1), evidenciou a presença de peptídeos e proteínas diferencialmente sintetizados nesses extratos. Observou-se a predominância de proteínas aniônicas nos extratos de SSNG, quando comparados com SSG48. Para SSNG, houve eluição de proteínas entre 60 e 100 min, que estão ausentes no perfil de SSG48.

A eluição das frações catiônicas obtidas para SSNG e SSG48 ocorreu entre 20 e 60 minutos (Figuras 1A e 1B). Pela avaliação da  $A_{214}$ , que observa-se essencialmente peptídeos, houve maior eluição de proteínas entre 30 e 45 min para SSNG, e entre 35 e 50-55 min para SSG48. Para 280 nm, observou-se um pico único

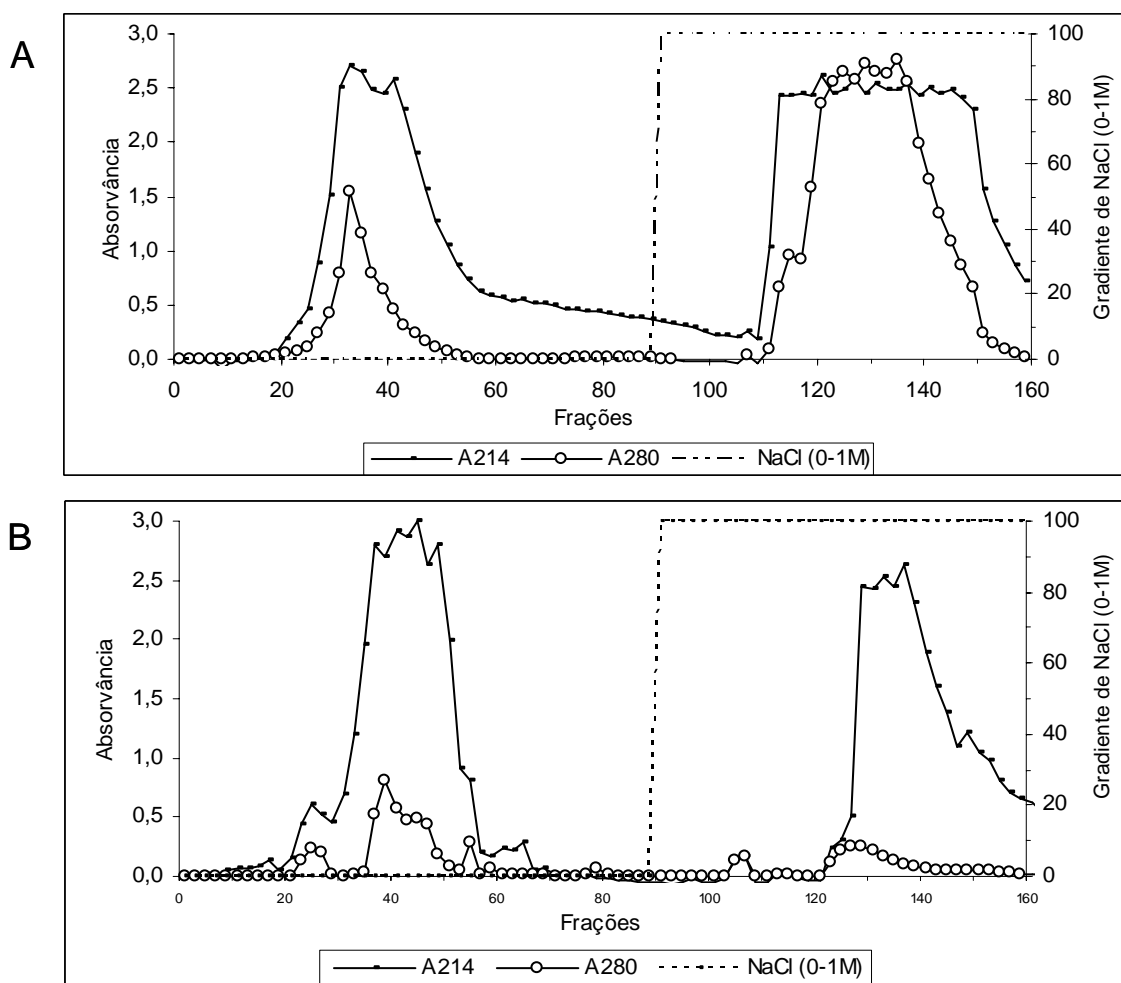


Figura 1. Cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose de extratos de sementes de soja não germinadas (A) e germinadas por 48 h (B) após precipitação salina, aquecimento e diálise. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, e as proteínas catiônicas foram eluídas em tampão de equilíbrio, enquanto as proteínas ligadas à coluna foram eluídas no tampão de equilíbrio em presença de 1 M de NaCl, ambas ao fluxo de  $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , sob baixa pressão e em temperatura ambiente. O eluato protéico foi avaliado por  $A_{214}$  e  $A_{280}$ .

com o valor máximo de absorvância em cerca de 35 min para SSNG, e dois picos com máximos em 25 e 40 min para SSG48 (Figuras 1A e 1B). A eluição das proteínas catiônicas em tempos de eluição maiores para SSG48 sugere a presença de um grupo protéico com menor caráter catiônico do que os observados para SSNG.

Esses resultados podem indicar que a SSNG, por possuir um alto teor protéico, pode armazenar grande concentração de proteínas e peptídeos, que seriam possivelmente mobilizados durante o processo de germinação, revertendo-se em menor número de tipos protéicos nos extratos de SSG48, quando comparado com SSNG, especialmente para a fração aniônica. Deve-se salientar que volumes iguais

de extratos foram cromatografados e comparados, e que as SG48, por conter maior teor de água do que as SSNG dão origem a extratos com menores concentrações de proteínas (Figura 1). Observar que, embora os valores de absorvância sejam altos, certamente as áreas obtidas sob as curvas não devem ser comparadas para se obter as concentrações protéicas das amostras.

Para que a germinação das sementes se desenvolva de forma satisfatória, é necessário que ocorram diversos processos celulares sob condições favoráveis. Neste processo, a primeira etapa na seqüência de eventos é a embebição, que culmina com a retomada do crescimento do embrião (emissão da radícula) (Bewley e Black, 1994). Com a absorção de água, inicia-se uma série de processos físicos, fisiológicos e bioquímicos no interior da semente viva, que, na ausência de outro fator limitante, resulta na emergência da plântula (Popinigis, 1985), representada neste trabalho pela SG48. As sementes de soja contêm de 35 a 45% de proteínas com base na matéria seca. Cerca de 70% das proteínas das sementes de soja são as proteínas de reserva (Hill e Breidenbach, 1974). As outras, presentes em altos teores em comparação às proteínas metabólicas, perfazem, geralmente, cerca de 2 a 5% do total de proteína. Uma das mais importantes proteínas de reserva, a glicinina (350 kDa) é composta por 6 polipéptidos ácidos e 5 básicos que se associam de modo específico, por meio de ligações de enxofre, geralmente entre uma subunidade ácida e uma básica, tendo uma subunidade básica ligada a duas subunidades ácidas (A5A4B3) (Moreira et al., 1979, Staswick et al., 2001), o que pode refletir em um maior teor de proteínas ácidas ou negativamente carregadas.

Os dois *pools* enriquecidos com as proteínas catiônicas, obtidos dos extratos de SSNG e SSG48 (Figuras 1A e 1B, respectivamente) foram liofilizados e utilizados como amostra C18RP-HPLC. Os perfis cromatográficos obtidos corroboram a sugestão de que o extrato de SSNG apresenta-se mais complexo em número de proteínas, predominando moléculas mais hidrofílicas nas amostras originadas das SSNG (Figura 2A) do que das SG48 (Figura 2B). Além disso, a comparação entre os tempos de eluição dos picos protéicos a serem avaliados, apontados por setas na Figura 2, evidencia uma síntese diferencial intensa de proteínas e peptídeos entre essas duas situações fisiológicas das sementes de soja. Esse fato justifica fortemente esse estudo em busca de peptídeos antimicrobianos e de proteínas expressas durante a germinação, que possam estar envolvidas especialmente em processos de defesa.

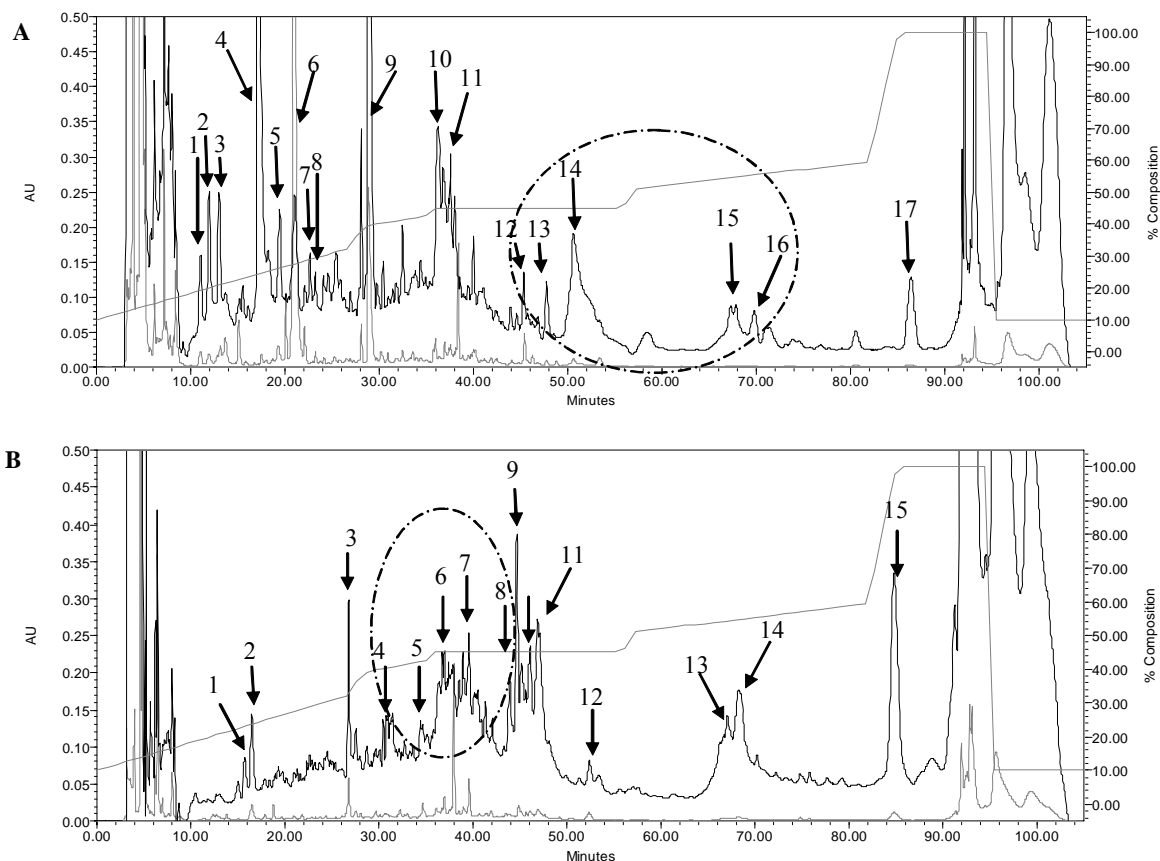


Figura 2 - Cromatografias de fase reversa em coluna C18RP-HPLC dos *pools* catiônicos obtidos de SSNG (A) e SSG48 (B). A coluna foi equilibrada em 10% do solvente B e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo crescente de acetonitrila (8 a 80%) (linha cinza), a um fluxo de  $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Solvente A: TFA 0,1% (v/v); solvente B: TFA 0,1% e acetonitrila 80% (v/v). Linha superior: A<sub>214</sub>. Linha inferior: A<sub>280</sub>. As setas indicam as frações que foram analisados por SDS-Tricina-PAGE. Os círculos em A e B indicam as regiões que apresentaram bandas peptídicas.

As proteínas foram cromatografadas em um gradiente descontínuo de acetonitrila, previamente ajustado, com ênfase na região de eluição de peptídeos de defesa vegetais. Observou-se eluição especialmente entre 20 e 50 % (v/v) de acetonitrila. Conforme intensivamente relatado, os peptídeos antimicrobianos catiônicos, em geral, têm cerca de 50% dos resíduos aminoácídicos apolares e são eluídos em concentrações de acetonitrila entre 20 e 40% (v/v) (Terras et al., 1992; Almeida et al., 2000; Carvalho et al., 2001, Fogaça et al., 2004). Para SSNG, pôde-se verificar uma grande concentração de frações protéicas ou peptídicas eluídos até 30 min de separação, que coincidem com a região mais hidrofílica do gradiente de acetonitrila (entre 10 e 45% da solução B, ou 8 a 36% de acetonitrila). Para SSG48,

houve um maior número de frações eluídas entre 26 e 50 minutos (que correspondeu a 24 a 40 % de acetonitrila), mostrando a síntese de conjuntos de proteínas e/ou peptídeos mais hidrofóbicos, que podem corresponder a peptídeos de defesa. A maioria das frações eluídas em SSNG até os 30 minutos não estão presentes em SSG48. À semelhança, a região em que houve eluição protéica a partir dos extratos de SSG48, não apresenta frações correspondentes em SSNG.

Durante a germinação, proteínas com diversas funções são sintetizadas e também mobilizadas a partir da degradação de proteínas de reserva de sementes por proteólise para síntese de novo. A proteólise é responsável pela liberação de componentes responsáveis pelo crescimento e pelo desenvolvimento da nova planta, bem como compostos de defesa durante a germinação e o crescimento inicial (Tan-Wilson et al., 1996).

A metodologia utilizada permitiu boa separação de peptídeos a partir das amostras complexas iniciais. SDS-Tricine-PAGE de frações após RP-HPLC mostraram especialmente a presença de bandas peptídicas para SSNG e SSG48 (Figura 3). Para SSNG (Figura 3a), as bandas peptídicas foram detectadas nas frações 13 a 16, as quais foram eluídas entre 36 e 45% de acetonitrila, enquanto que para SSG48 (Figura 3b) bandas peptídicas foram observadas nas frações 4 a 8, eluídas entre 32 e 36% de acetonitrila.

De acordo com Hancock et al. (1998), os peptídeos antimicrobianos de plantas são tipicamente catiônicos, com carga líquida positiva variando de +2 a +7. Esses peptídeos podem ser produzidos constitutivamente ou induzidos somente após infecção ou injúria. Em geral, pelo menos 50% dos aminoácidos são hidrofóbicos, um fato refletido pela necessidade de interação dos peptídeos com a membrana celular das bactérias como parte do mecanismo de ação.

Em geral, os peptídeos envolvidos em sinalização em rotas metabólicas e de ativação de defesa são originados de precursores maiores (polipeptídeos), sofrem proteólise e, em alguns casos, modificações para se tornarem funcionais (Farroki et al., 2008), além de ser prontamente sintetizados de maneira flexível, com baixo consumo de energia e biomassa, em função do seu pequeno tamanho e por possuir um ou poucos precursores capazes de codificar vários peptídeos diferentes (Broekaert et al., 1995; Borregaard et al., 2000). Por meio de cascatas de transduções de sinais intra e intercelulares, podem ser geradas respostas celulares de ativação de

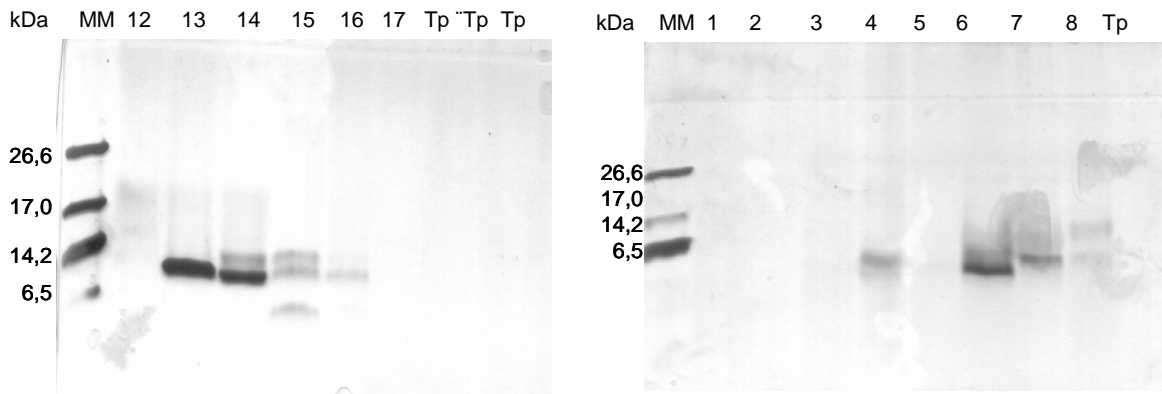


Figura 3. SDS-Tricina-PAGE em gel de três fases das frações após a separação por RP-HPLC dos *pools* catiônicos obtidos de SSNG (A) e SSG48 (B). Em A as frações 14 a 17 (Figura 2 A) e em B as frações 1 a 8 (Figura 2 B) foram analisadas, sendo utilizados 20  $\mu$ l de cada fração. O gel foi revelado pela prata. Para ambos os géis: Canaleta 1 – MM, 5 $\mu$ l (Marcador molecular de baixo peso (BioRad)). Tp indica canaletas em que foram utilizadas apenas o tampão de amostra (30  $\mu$ l).

genes envolvidos na síntese de proteínas de defesa, que atuam em diferentes vias bioquímicas (Bals, 2000; Hultmark, 2003). Os peptídeos envolvidos em defesa podem atuar ativando rotas metabólicas ou atuando diretamente sobre o patógeno, como os peptídeos antimicrobianos (Farroki et al., 2008).

Dados prévios de nosso laboratório mostraram que extratos parcialmente purificados de SSNG e SSG48 (fração catiônica após cromatografia de troca aniônica) apresentavam atividade antibacteriana contra *R. solanacearum* (Gram negativa) e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Gram positiva) (Nascimento, 2002; Barbosa, 2004). A atividade antimicrobiana “in situ” da fração catiônica após cromatografia de troca aniônica foi observada para SSG48 (Figura 4), evidenciando que peptídeo(s) foram capazes de inibir o crescimento de *R. solanacearum*. Almeida et al. (2007; 2008) verificaram que extratos de folhas de berinjela enriquecidos com peptídeos foram capazes de inibir o crescimento de *R. solanacearum* e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, em ensaio em microplacas. Xavier-Filho (1993) descreveu a germinação das sementes como um período crítico para sua propagação e formação de um novo indivíduo, sugerindo que diversos mecanismos de defesa das plantas estejam bastante ativos, incluindo uma importante ativação/expressão de peptídeos antimicrobianos. Broekaert et al. (1997) sugerem que as defensinas vegetais, dentre outros peptídeos antimicrobianos, desempenham função importante

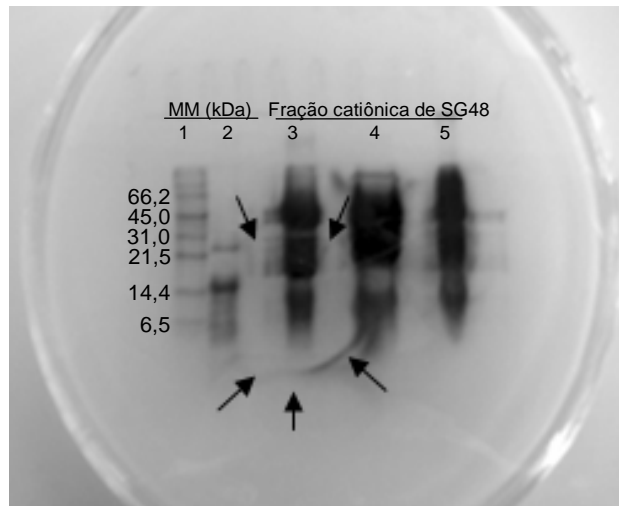


Figura 4. Ensaio de biorevelação contra *Ralstonia solanacearum* da fração catiônica do extrato de SSG48 (Figura 1B) fracionada em SDS-Tricine-PAGE, em condições nativas e desnaturantes. As amostras foram adicionadas de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol (canaleta 3), apenas SDS (canaleta 4), ou na ausência de ambos (canaleta 5). O gel foi revelado com Coomassie Blue, disposto em uma placa de Petri e coberto com uma camada de meio LB semi-sólido contendo o microrganismo indicador. As placas foram incubadas a 30 °C durante 12 h, e o círculo observado corresponde ao halo de inibição do crescimento da bactéria (setas). Canaleta 1 – MM, 5 $\mu$ l (Marcador molecular de ampla faixa (BioRad)). Canaleta 2 – MM, 5 $\mu$ l (Marcador molecular de baixa massa (26,6, 17,0, 14,2 e 6,5 kDa - BioRad)). O experimento foi realizado em três repetições.

na proteção de tecidos de plantas durante o estágio inicial de emergência, o que contribui fortemente para o aumento das taxas de sobrevivência das plantas após a germinação. Experimentos com sementes de rabanete demonstraram um aumento de 30% na síntese de defensinas em relação à produção das demais proteínas liberadas durante a germinação e que a defensina (aproximadamente 1  $\mu$ g/semente) produzida poderia inibir o crescimento de fungos, um efeito que poderia contribuir para o aumento da taxa de germinação e sobrevivência da nova plântula (Terras et al. 1995). Yang et al., 2007, relataram que vários peptídeos têm sido isolados de sementes em germinação em várias espécies de plantas e, em alguns casos, mostram similaridade de sequência com proteínas de armazenamento. Quando estes peptídeos foram testados contra patógenos, apresentou atividades antifúngicas e antibacterianas, um papel em defesa durante a germinação de sementes.

Análises de espectrometria de massa foram realizadas com 6 frações de SSNG e 8 frações de SSG48 eluídas entre 15 e 47% de acetônitrila após uma nova

separação das frações catiônicas por RP-HPLC, em um gradiente de acetonitrila diferente, visando melhor separação (Figura 5). Para a fração eluída em 26,4 % de acetonitrila a partir de extratos de SSNG (Figura 5A), seis valores de MM entre 7 e 9 kDa foram identificadas, e para as frações eluídas em 30,4 e 37,6% de acetonitrila foram identificadas MM de 9.263,99 e 8.527,57 Da, respectivamente. Para os extratos de SSG48 (Figura 5B), foram identificadas MM em duas frações, sendo uma de 3.3876,29 Da (eluída em 40,8 % de acetonitrila) e outra de 8.134,54 Da (eluída em 36,8 % de acetonitrila). Embora diversas frações tenham sido analisadas, apenas alguns permitiram a identificação de massas tendo sido apontada a possibilidade de dificuldade de ionização por algumas moléculas presentes nessas amostras.

Esses resultados mostram que a metodologia adotada foi capaz de identificar peptídeos, os quais podem estar envolvidos na defesa de plantas. As massas identificadas podem corresponder a peptídeos antimicrobianos, uma vez que estes valores estão na faixa de peptídeos descritos em plantas (2-9 kDa) (García-Olmedo et al., 1998; 2001). A família nsLTP (proteínas de transferência de lipídeos não-específico) possui oito resíduos de cisteínas altamente conservados formando quatro ligações de enxofre. As nsLTPs são divididas em duas subfamílias com MM de 9 kDa (LTP1s) e 7 kDa (LTP2s) (Kader, 1996; Douliez et al., 2000). As nsLTPs podem interagir com uma variedade de lipídios e catalisar a transferência de moléculas nas membranas *in vitro*. Além disso, diversas funções biológicas, incluindo a biossíntese de cutina, que atua na defesa contra agentes patogênicos e tem participação na resposta a estresses abióticos resultantes de condições de temperatura ou seca também têm sido atribuídas às LTPs. Egorov et al. (2005), utilizando técnicas cromatográficas associadas à espectrometria de massa, identificou vários peptídeos antimicrobianos em trigo, podendo ser citados Tk-AMP-X1, com MM de 3.857,6, similares à MBP-1. Dois peptídeos antimicrobianos foram descritos em trigo com MM de 3.879 Da (Fa-AMP1) e 3.906 Da (FaAMP2) (Fujimura et al. 2003).

O uso da proteômica e da peptidômica pode gerar informações relacionadas às vias de sinalização celular, à identificação de proteínas e de peptídeos reguladores, às modificações pós-traducionais, dentre diversas outras elucidaciones sobre proteínas e peptídeos. Pode ainda gerar informações cada vez mais completas sobre estados

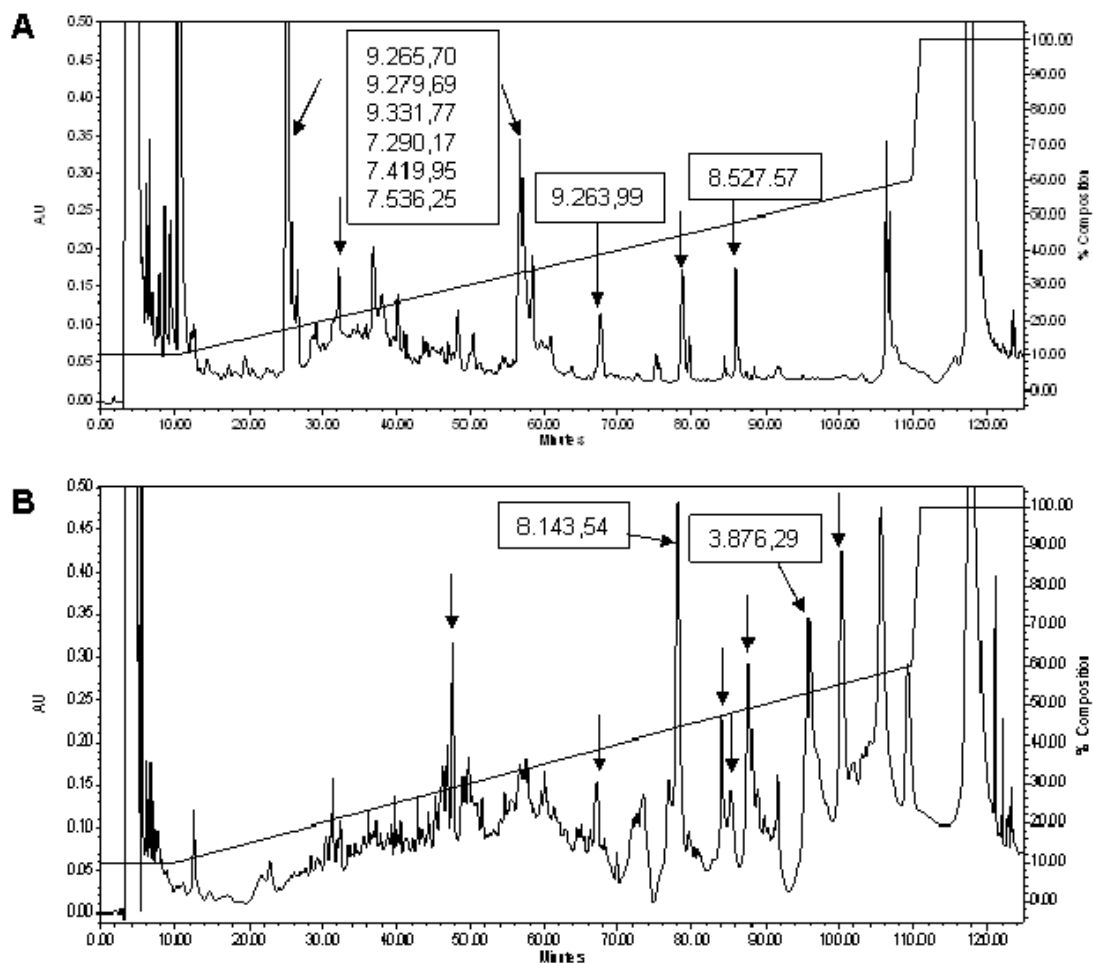


Figura 5. Cromatografias de fase reversa em coluna C18RP-HPLC dos *pools* catiônicos obtidos de SSNG (A) e SSG48 (B) (Figura 1). A coluna foi equilibrada em 10% do solvente B e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo crescente de acetonitrila (8 a 80%) (linha crescente), a um fluxo de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e monitorada a 214 nm. Solvente A: TFA 0,1% (v/v); solvente B: TFA 0,1% e acetonitrila 80% (v/v) e monitoradas em absorbância de  $A_{214}$ . As setas indicam as frações que foram analisadas por MS.

fisiológicos e fitopatológicos das células, tecidos e organismos associados às expressões de proteínas e de peptídeos específicos (Suresh et al., 2005), com implicações diretas em vários campos da biologia celular, da bioquímica e da biotecnologia. Já a identificação de moléculas bioativas nos extratos biológicos tem grande potencial no desenvolvimento de medicamentos e de produtos comerciais na área agrônoma, alimentícia, de cosméticos (Lanças et al., 2003).

#### 4.5. Conclusões

As ferramentas peptidômicas utilizadas para a caracterização da expressão peptidômica diferencial de SSNG e SSG48 se mostraram adequadas, uma vez que as MM identificadas encontram-se na faixa descrita para peptídeos antimicrobianos de plantas (cerca de 2 a 9 kDa). A análise comparativa de extratos de SSNG e SSG48 evidenciou a síntese ou expressão diferencial de peptídeos entre os dois estados fisiológicos (Figura 1 e 2) indicou intensa mudança no padrão peptídico nas sementes em germinação. A atividade antimicrobiana observada *in situ* para SG48 indica que peptídeos antimicrobianos estão sendo sintetizados como importantes moléculas para a defesa das sementes durante a germinação. Esse resultado associado a resultados prévios do nosso laboratório reforçam que a germinação das sementes de soja por 48 horas corresponde a uma situação fisiológica potencialmente importante e promissora para a identificação de importantes peptídeos relacionados à defesa durante a exposição dos tecidos externos da semente. O intenso metabolismo de sementes em germinação altera o perfil protéico, o que inclui a síntese ou expressão diferencial de proteínas e de peptídeos, possivelmente envolvidos na defesa primária de sementes germinadas por 48 h, momento este em que seus tecidos internos estão sendo expostos a condições adversas do solo.

#### 4.6. Referências Bibliográficas

- Almeida HO, Teixeira FR, Romeiro RS, Silva DJH, Pereira PRG, Fontes EPB, Baracat-Pereira MC (2008) Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de folhas de berinjela na inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Summa Phytopathol. 34:62-64
- Almeida HO, Mattos EC, Barbosa MO, Teixeira FR, Magalhaes RDM, Romeiro RS, Fontes EPB, Baracat-Pereira MC (2007) Peptide Fraction Inhibiting Plant Pathogen Growth Predominated in Cell Wall Extracts from Young Plants or in Soluble Cell Fraction from Expanded leaves from Eggplants. J. Phytopathol. 155:735-737
- Almeida MS, Cabral KMS, Zingali RB, Kurtenbach E (2000) Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. Arch. Biochem. Biophys. 378 (2):278-286
- Bals R (2000) Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. Resp. Res. 1:141–50
- Barbosa MO (2004) Purificação e atividade antibacteriana de peptídeos sintetizados durante a germinação de sementes de soja (*Glycine max* [L.] Merrill) Dissertação, Universidade Federal de Viçosa
- Bewley JD, Black M (1994) Seeds: physiology of development and germination. New York: Plenum
- Bhunja AK, Johnson MC, Ray B (1987) Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Ind. Microbiol. 2:319-322
- Borregaard N, Elsbach P, Ganz T, Garred P (2000) Innate immunity: from plants to humans. Immunol. Today 21: 68-70
- Broekaert WF, Cammue BPA, De Bolle MFC, Thevissen K, De Samblanx GW, Osborn RW (1997) Antimicrobial peptides from plants. Crit. Rev. Plant Sc. 16: 297-323
- Carvalho A O, Machado OLT, Cunha MD, Santos IS, Gomes VM (2001) Antimicrobial peptides and immunocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. Plant Physiol. Biochem. 39:137-146
- de Hoog CL, Mann M (2004) Proteomics. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 5:267–293
- Douliez, J .P.; Michon, T. ; Elmorjani, K.; Marion, D. (2000) Structure, Biological and Technological Functions of Lipid Transfer Proteins and Indolines, the Major Lipid Binding Proteins from Cereal Kernels J. Cereal Sci. 32 (1):1-20
- Egorov TA, Odintsova TI, Pukhalsky VA, Grishin EV (2005) Diversity of wheat anti-microbial peptides. Peptides 26:2064–2073

- Farrokhi N, Whitelegge JP, Brusslan A (2008) Plant peptides and peptidomics. *Plant Biotechnol. J.* 6:105-134
- Fogaça AC, Lorenzini DM, Kaku LM, Esteves E, Bulet P, Daffre S (2004) Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Dev. Comp. Immunol* 28:191–200
- Fujimura M, Minami Y, Watanabe K, Tadera K (2003) Purification, Characterization, and Sequencing of a novel type of antimicrobial peptide, *FaAMP1* and *FaAMP2*, from seeds of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (8):1636-1642
- García-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodríguez-Palenzuela P (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers* 47: 479-491
- García-Olmedo F, Rodríguez-Palenzuela P, Molina A, Alamillo JM, López-Solanilla E, Berrocal-Lobo M, Poza-Carrión C (2001) Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxyxynitrite in plant defense. *FEBS Lett.* 498: 219-222
- Hancock REW, Lehrer R (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnol.* 16: 82-88
- Hancock REW, Diamond G (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiol.* 8: 402-410
- Hill JE, Breidenbach RW (1974) Proteins of soybean seeds II. Accumulation of the major protein components during seed development and maturation. *Plant Physiol.* 53:747-751
- Hultmark D (2003) *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 12–19
- Judd RC (1994) Electrophoresis of peptides. In: Walker JM (ed.), *Methods in Molecular Biology, Vol. 32, Basic Protein and Peptide Protocols.* Totowa, Humana Press Inc., pp. 49–57
- Kader JC (1996) Lipid transfer proteins in plants *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:627-654
- Knight SC, Anthony VM, Brady AM, Greenland AJ, Heaney SP, Murray DC, Powell KA, Schulz MA, Spinks CA, Worthington PA, Youle D (1997) Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:349-372
- Lanças FM (2003) The Role of the Separation Sciences in the 21th Century. *J. Braz. Chem. Soc.* 14(2):183-197
- Mamone G, Addeo F, Chianese L, Di Luccia A, De Martino A, Nappo A, Formisano A, De Vivo P, Ferranti P (2004) Characterization of wheat gliadin protein by combined two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Proteomics* 5:2859-2865

- Mann M, Jensen ON (2003) Proteomic analysis of posttranslational modifications. *Nature Biotechnol.* 21:255–261
- Miller CA, Meza JE, Perkins PD (2004) Evaluation of Multidimensional Strategies for the Analysis of Complex Proteomics Samples. Poster–ASMS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA.
- Monti M, Orru S, Pagnozzi D, Pucci P (2005) Functional proteomics. *Clinica Chimica Acta* 357:140–15
- Moreira MA, Hermadson MA, Larkins BA (1979) Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin. *J. Biol. Chem.* 254:9921-9926
- Moritz R, Nagele E, Vollmer M, Horth P (2003) Off-line Multi Dimensional LC/MS as Effective and Flexible Tool for Proteomics Research. Agilent Technologies, 51st ASMS Conference, Montreal, Canadá.
- Nagele E, Vollmer M, Horth P, Vad C (2004) 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Expert Rev. Proteomics* 1:37 – 46
- Nascimento DG (2003) Purificação, Caracterização Bioquímica e Atividade Antimicrobiana de Peptídeos de Semente de Soja (*Glycine max* [L.] Merrill) Dissertação Universidade Federal de Viçosa
- Neverova I, Van Eykb JE (2005) Role of Chromatographic Techniques in Proteomic Analysis. *J. Chromatogr. B* 815: 51–63
- Newton RP, Brenton AG, Smith CJ, Dudley E (2004) Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry* 65:1449–1485
- Popinigis F (1985) Fisiologia da semente. Brasília, DF: Agiplan, 289 p.
- Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Agents* 24: 536–547
- Resing, K.A.; Ahn, N.G. (2005) Proteomics strategies for protein identification. *FEBS Lett.* 579:885–889.
- Shi Y, Xiang R, Horvath C, Wilkins JA (2004) The role of liquid chromatography in proteomics *J. Chromatogr. A* 1053:27–36
- Staswick PE, Hermadson MA, Nielsen NC (1981) Identification of the acidic and basic subunits complexes of glycinin. *Agric. Biol. Chem.* 256: 8752-8755
- Suresh S, Mohan SS, Mishra G, Hanumanthu GR, Suresh M, Reddy R, Pandey A (2005) Proteomics resources: Integrating biomedical information in humans. *Gene* 364:13-18
- Tan-Wilson AL, Liu X, Chen R, Qi X, Wilson KA (1996) An acidic amino acid-specific protease from germinating soybeans. *Phytochemistry* 42(2): 313-319

- Teixeira FR, Lima MCO, Almeida HO, Romeiro RS, Silva DJH, Pereira PRG, Fontes EPB, Baracat-Pereira MC (2006) Bioprospection of cationic and anionic antimicrobial peptides from bell pepper leaves for inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. *J. Phytopathol.* 154:18–421
- Terras FRG, Schoofs HME, De Bolle MFC, Leuven FV, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 15301-15309
- Terras FRG, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Leuven FV, Vanderleyden J, Cammue PA, Broekaert WF (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from Radish: Their role in host defense. *Plant Cell* 7: 573-588
- Xavier-Filho J, Sales MP, Fernandes KVS, Gomes VM (1996) A resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Collosobruchus maculatus*) is due to the association of variant vicilins (7S storage proteins) to chitinous structures in insect's midgut. *Arq. Biol. Technol.* 39: 693-699
- Yang X, Xiao Y, Wang X, Pei Y (2007) Expression of a novel small antimicrobial protein from the seeds of motherwort (*Leonurus japonicus*) confers disease resistance in tobacco. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 939–946
- Ye M, Jiang X, Feng S, Tian R, Zou H (2007) Advances in chromatographic techniques and methods in shotgun proteome analysis. *Trends Anal. Chem.* 26(1):80-84
- Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415(6870): 389-395

## 5. CAPÍTULO 2

### BIOPROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE SEMENTES DE SOJA GERMINADAS

#### 5.1. PARTE 1

#### METODOLOGIA PEPTIDÔMICA PARA A BIOPROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS RESISTENTES VISANDO APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

##### 5.1.1. Resumo

Em função da grande diversidade de peptídeos em sistemas vivos e seu envolvimento nos principais processos regulatórios e de defesa, tem surgido a necessidade do aperfeiçoamento das técnicas para prospecção e identificação destes peptídeos. O objetivo deste trabalho foi ajustar metodologias capazes de localizar e identificar peptídeos antibacterianos resistentes a condições adversas para aplicação biotecnológica, utilizando sementes de soja germinadas por 48 horas (SSG48). SSG48 foram trituradas, maceradas em tampão de extração contendo inibidores de proteases, seguindo-se fracionamento salino, aquecimento seletivo, cromatografia de exclusão molecular (CEM) e de fase reversa (RP) em HPLC. SDS-Tricina-PAGE das amostras após CEM, que foram submetidas ao aquecimento seletivo (etapa anterior) sugerem agregação de peptídeos, quando comparadas com amostras que nas quais foi realizada a etapa de aquecimento seletivo. Melhor fracionamento e enriquecimento das frações peptídicas foram obtidos a partir das frações da CEM na presença de NaCl 0,2 M. Quando comparados os perfis de RP-HPLC, a melhor separação das frações (em número e intensidade) também foi verificada quando se utilizou frações da CEM na presença de NaCl. As frações recuperadas após HPLC foram aquecidas em temperatura de ebulição por 2 h e então utilizadas para ensaios de atividade antibacteriana e para análises de espectrometria de massa (MS). Os valores de inibição do crescimento de até 83 % e 98% foram observados para as bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum* (Gram negativa) e *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (Gram positiva), respectivamente. Análises de MS identificaram massas moleculares de 2-9 kDa, para as frações com atividade

antibacteriana. A metodologia utilizada para o isolamento de peptídeos antibacterianos SSG48 se mostrou adequada para avaliação do peptidoma da germinação, e ainda poderá servir como método de base para estudos em peptidômica. Além disso, foi possível verificar a presença de várias frações peptídicas com atividade antibacteriana resistentes a condições adversas, as quais poderão ser utilizadas pela agroindústria, na defesa de plantas.

### 5.1.2. Introdução e objetivos

Doenças de plantas podem ser causadas por vírus, bactérias e fungos que afetam diferentes culturas e são responsáveis por perdas significativas, diminuição da qualidade e falta de segurança dos produtos agrícolas devido ao intenso uso de defensivos. Nas últimas décadas, muitos esforços têm sido realizados no sentido de se elucidar quais mecanismos de resistência são utilizados pelas plantas para se defenderem ou para evitarem o ataque por parte de seus agressores (Cornelissen e Melchers, 1993; Agrios, 2005). Diversos mecanismos de defesa são ativados em resposta ao ataque de agressores em plantas denominados defesas induzidas. As plantas possuem também as defesas pré-existentes ou constitutivas que fazem parte do seu desenvolvimento normal (García-Olmedo et al., 1998; 2001). Os mecanismos de defesa em plantas incluem enzimas hidrolíticas (Mauch et al. 1988), peptídeos fitormônios envolvidos na sinalização de defesa como a sistemina (ataque de inseto), o peptídeo AtPep1 que induz a expressão das defensinas PDF1 e PR1, em *A. thaliana* (Huffaker e Ryan, 2007) pequenas proteínas ou peptídeos com atividade antimicrobiana contra fitopatógenos (Van Loon et al., 2006; Montesinos, 2007). Estudos recentes sugerem que proteínas relacionadas à defesa, podem representar de 2 -3 % dos genes preditos no genoma vegetal (Silverstein et al, 2007).

Peptídeos com propriedades antimicrobianas estão presentes em todas as espécies de plantas, podendo ocorrer em todos os órgãos vegetais, incluindo sementes. Peptídeos antimicrobianos (AMPs) tem sido objeto de estudo nos últimos anos como moléculas candidatas à proteção de plantas. Os AMPs em geral possuem massa molecular < 10 kDa, são produzidos de maneira rápida e flexível com baixo consumo de energia e são uma primeira linha de defesa em plantas e animais (García-Olmedo et al., 2001; Montesinos, 2007). Dada a grande diversidade de peptídeos em sistemas vivos e seu envolvimento nos principais processos regulatórios, tem surgido a necessidade do aperfeiçoamento das técnicas para identificar peptídeos (Schulz-Knappe et al., 2005), e um novo conceito, o da peptidômica, o qual permite a detecção e a análise de pequenos polipeptídeos (1-20 kDa) (Crameri et al., 2005). A cada amostra, um novo protocolo deve ser desenvolvido para cada ensaio e é essencial utilizar estratégias de extração em que se use o menor número de aditivos, bem como, o conhecimento da natureza destes e sua possível influência nas etapas posteriores de análise (Newton et al., 2004). Assim o

objetivo deste trabalho foi ajustar metodologias peptidômicas para a bioprospecção de peptídeos antimicrobianos resistentes em sementes de soja germinadas por 48 horas, para aplicação biotecnológica.

### **5.1.3. Material e Métodos**

#### **5.1.3.1. Material vegetal e microrganismos**

Sementes de soja da variedade UFV16 foram gentilmente cedidas pelo Programa de Melhoramento de Soja, UFV. As sementes de soja foram germinadas a 28°C por 48 horas de germinação, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. As bactérias fitopatogênicas *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Ralstonia solanacearum* utilizadas para os testes de inibição foram cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico, UFV.

#### **5.1.3.2. Extração e purificação dos peptídeos de sementes germinadas de soja**

A extração dos peptídeos de sementes germinadas de soja foi realizada conforme descrito por Teixeira et al. (2006). As SSG48 foram trituradas em liquidificador (N<sub>2</sub> líquido), maceradas em tampão de extração Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, PMSF 1 mM e benzamidina 1 mM (2h/ 4°C), sob agitação e centrifugadas a 20.300g e 4°C, em centrífuga refrigerada Beckman Avanti 30. O sobrenadante obtido foi precipitado com 35% de saturação de sulfato de amônio sólido por 2 h, e centrifugado. O sobrenadante resultante foi submetido a aquecimento seletivo (80 °C por 15 min) e, então, novamente centrifugado nas mesmas condições. À semelhança outra extração foi realizada, sem a etapa de aquecimento seletivo. Os sobrenadantes obtidos (com e sem a etapa de aquecimento) foram fracionados em cromatografia de exclusão molecular (CEM), em Sephadex G50 (limite de exclusão de 1-30 kDa), em colunas com volumes de 270 e 145mL, em baixa pressão e em FPLC, respectivamente. Foram utilizados 13 e 7 mL de extrato como amostra (aproximadamente 5% do volume de cada coluna). Os eluatos obtidos foram utilizados para SDS-Tricina-PAGE.

Em uma segunda etapa, outra extração foi realizada (sem a etapa de aquecimento) e utilizada fracionamento salino de 35-75%. O sobrenadante (35% de

sat. de sulfato de amônio) foi precipitado com 75% de saturação de sulfato de amônio sólido por 12 h em banho de gelo a 4° C, centrifugado (mesmas condições anteriores) e o pellet foi ressuscitado em tampão Tris HCl 25 mM pH 7,0. O extrato (600µL) foi utilizado para cromatografia de exclusão molecular realizada em coluna Protein Pack (7,8x300mm, limite de exclusão de 2–20 kDa) (Waters Corporation), utilizando-se equipamento HPLC semi-preparativo, BREEZE™ HPLC System (Waters Corporation, MA, USA). A coluna foi equilibrada com Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, e as proteínas foram eluídas na presença e ausência de NaCl 0,2 M, a um fluxo isocrático de 0,25 mL.min<sup>-1</sup>, monitoradas a 214 e 280 nm e frações de 1 mL foram coletadas. As frações enriquecidas em peptídeos foram separadas em uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub>-Shim Pack (CLC-ODS, 25 cm, Shimadzu Corporation-Tokyo, Japan), previamente equilibrada em TFA 0,1% (solução A), ao fluxo constante de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e à temperatura ambiente, em equipamento HPLC. As proteínas foram separadas em gradiente descontínuo de acetonitrila (10 a 80%), utilizando a solução B composta por TFA 0,1% e acetonitrila 80%. A eluição dos peptídeos da coluna foi monitorada simultaneamente pelos valores de A<sub>214</sub> e A<sub>280</sub> mn. As frações obtidas da C<sub>18</sub>RP-HPLC foram fervidas por 120 minutos em temperatura de ebulição e foram concentradas em Speed Vac (Savant SP1010). Essas frações foram então utilizadas para os ensaios de atividade antibacteriana contra fitopatógenos e determinação das massas moleculares.

### 5.1.3.3. Testes de inibição dos patógenos

A avaliação da inibição de bactérias fitopatogênicas foi realizada pelo Teste de Leitura de Microplacas conforme Teixeira et al. (2006). Culturas em meio líquido das bactérias *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Gram-positiva) e *R. solanacearum* (Gram-negativa) com a A<sub>560</sub> entre 1,0 e 1,2, foram utilizadas nos testes de inibição dos patógenos. As bactérias foram cultivadas em microplacas de 96 poços, de fundo plano, estéreis, em temperatura de 28°C. A cada poço da microplaca, foram adicionados 50 µL de meio de cultivo concentrado (2X), 10 µL de uma suspensão de bactéria e 40µL dos peptídeos a serem testados. A absorvância a 560 nm foi determinada em leitor de microplacas modelo Titertek Multiskan Plus MKII, marca Uniscience do Brasil, no início do ensaio (tempo zero) e em períodos de 2 em

2h de incubação até 12 h, para as duas bactérias, traçando-se as curvas de crescimento de cada bactéria.

A inibição foi determinada pela diferença entre as curvas de crescimento na presença e na ausência dos peptídeos. O controle da cultura correspondeu ao cultivo das bactérias na ausência de peptídeos (90  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo 1X e 10  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de bactérias), e o controle do meio na ausência de ambos (100  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo 1X). Os ensaios foram feitos em duplicatas.

#### **5.1.3.4. Determinação da massa molecular por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF**

As análises de espectrometria de massa foram realizadas no Núcleo de Biomoléculas do ICB/UFMG, com a co-orientação do Prof. Marcelo Mattos Santoro, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da UFMG. A determinação das massas moleculares dos peptídeos foi obtida em um espectrometro do tipo MALDI-TOF/TOF, modelo Autoflex III Smartbean (Bruker Daltonics<sup>®</sup>). Amostras protéicas selecionadas foram reduzidas e alquiladas. Para cada fração selecionada foram adicionados 20  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,4 M, Uréia 8 M, a 50  $\mu\text{L}$  da amostra, seguida da adição de 5  $\mu\text{L}$  DTT 45 mM e incubados 50 °C/ 15 minutos. A cada amostra foram acrescentados 5  $\mu\text{L}$  de iodoacetamida 100 mM, novamente incubada por 15 min a temperatura ambiente e protegidas da luz. As amostras então foram dessalinizadas e concentradas em microcolunas de fase reversa Zip Tip (Millipore).

A seguir, 1  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi adicionada a 1  $\mu\text{L}$  de matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em 50% de acetonitrila e TFA 0,1%) nos poços da placa de aço MTP Anchor Chip<sup>™</sup> 600/384 TF (Bruker Daltonics<sup>®</sup>) do espectrômetro de massa. Também foi utilizado 1  $\mu\text{L}$  de padrão para calibração externa (“*Peptide calibration standard II*” - Bruker Daltonics<sup>®</sup>).

#### **5.1.3.5. Eletroforese dos peptídios em gel de poliacrilamida de três fases na presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE).**

A eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE) foi desenvolvida segundo Judd (1994), em um gel de três

fases, composto por um gel de concentração (5.12% T and 2.6% C), um gel intermediário (9.9% T and 3.0% C) e um gel de separação (16.5% T and 3.0% C). Para o gel intermediário e de separação, utilizou-se uma solução 49,5% T (p/v) e 3,0% C (p/p), a partir da solução de acrilamida: N,N'-bis-metileno acrilamida (48,0 : 1,5). Para o gel de concentração, foram utilizadas as soluções 30,8% T (p/v) e 2,6% C (p/p), a partir da solução acrilamida: N,N'-bis-metileno acrilamida (30,0 : 0,8).

O gel de separação foi preparado a 16,5% T, em Tris-HCl 1 M, pH 8,9, e 0,1% de SDS. O gel intermediário foi preparado a 10,0% T, em Tris-HCl 1 M, pH 8,9, com 0,1% de SDS. O gel de concentração foi preparado a 5,0% T, em Tris-HCl 0,13 M, pH 6,8. As frações protéicas de sementes não germinadas e germinadas, obtidas após RP-HPLC foram utilizadas como amostra. Os géis foram revelados pelo método da prata, Pharmacia-Biotech (2000). Para a fração catiônica obtida após a separação cromatográfica dos extratos de SSG48 foi utilizado o método de coloração Commassie Blue R250.

A eletroforese foi desenvolvida a 100 V por 15 min, a 80V por 20 min, e a 60 V até o final da corrida, perfazendo 6,5 h. Foram utilizados marcadores de massas moleculares de ampla e de baixa faixa (BioRad).

#### **5.1.4. Resultados**

O aquecimento seletivo do extrato de SSG48 sugere agregação de peptídeos, entre si ou, sugere-se especialmente, com outras proteínas de massas moleculares maiores, o que foi evidenciado após fracionamento dos extratos por cromatografia de exclusão molecular (CEM) (Figura 1). SDS-Tricina-PAGE das frações obtidas após CEM mostraram a presença de bandas de proteínas de baixa massa molecular (MM) (menores que 14 kDa) em frações onde era esperada a presença de proteínas com MM maiores (Figura 1a). Observou-se a presença de proteínas de baixa MM na canaleta 1 (frações 62+64) e na canaleta 2 (frações 68+72) com intensidade semelhante à apresentada na região esperada para eluição de peptídeos, na canaleta 7 (frações 94+96); na canaleta 8 (frações 108+110) e canaleta 9 (frações 116+118). Numa segunda etapa, visando maior recuperação da fração peptídica, a etapa de aquecimento seletivo foi omitida do protocolo de purificação. SDS-Tricina-PAGE

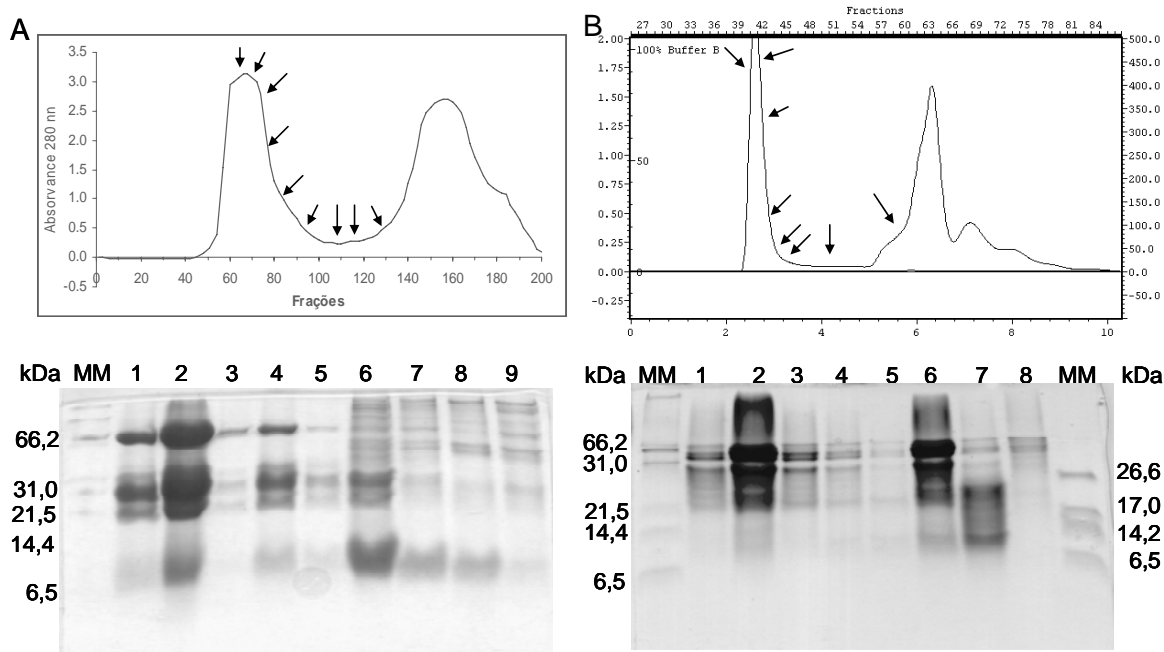


Figura 1. Cromatografia de exclusão molecular, em Sephadex G50 e separação em SDS-Tricina-PAGE das frações obtidas após a cromatografia. Em A, o procedimento de extração foi: extração, fracionamento salino e aquecimento, em B, extração e fracionamento salino, antes da cromatografia. Foram aplicados 13 mL e 7 mL de amostra na cromatografia, para A e B, respectivamente, diferentes alíquotas das frações eluídas foram utilizadas de acordo com a absorvância. A = canaletas de 1 a 5 (50  $\mu$ L), e de 6-9 (1.000  $\mu$ L). B = canaletas de 1(200  $\mu$ L), 2- 5(100  $\mu$ L), 6 (200  $\mu$ L), 7 (500  $\mu$ L) e 8 (1.000  $\mu$ L).

das frações obtidas da CEM, mostrou que as bandas peptídicas estavam ausentes na região inicial de eluição (canaleta 1- fração 40 e canaleta 2- fração 41) (Figura 1b) e presentes na região esperada (canaleta 6 - fração 45 e canaleta 7 - *pool* das frações 46 a 55).

Considerando a complexidade do extrato protéico de SSG48 e a necessidade de etapas de clareamento, que favorecem o enriquecimento e a recuperação do *pool* peptídico, a etapa de fracionamento salino foi modificada (35 - 75% de sat. de sulfato de amônio), o que possibilitou a recuperação dos peptídeos de interesse em menor volume e mais concentrados. Nesta etapa o extrato de SSG48 também foi fracionado por CEM (HPLC). As proteínas e peptídeos foram eluídos na presença e na ausência de 0,2 M de NaCl adicionados ao tampão de eluição (Figura 2), e a comparação na eluição evidenciou melhor separação na presença de NaCl. Pôde-se observar que, na ausência de sal, as frações protéicas foram eluídas entre 10 min e 40 min, enquanto que na presença de NaCl 0,2 M, a eluição dos picos foi entre 20 min e 90 min. A

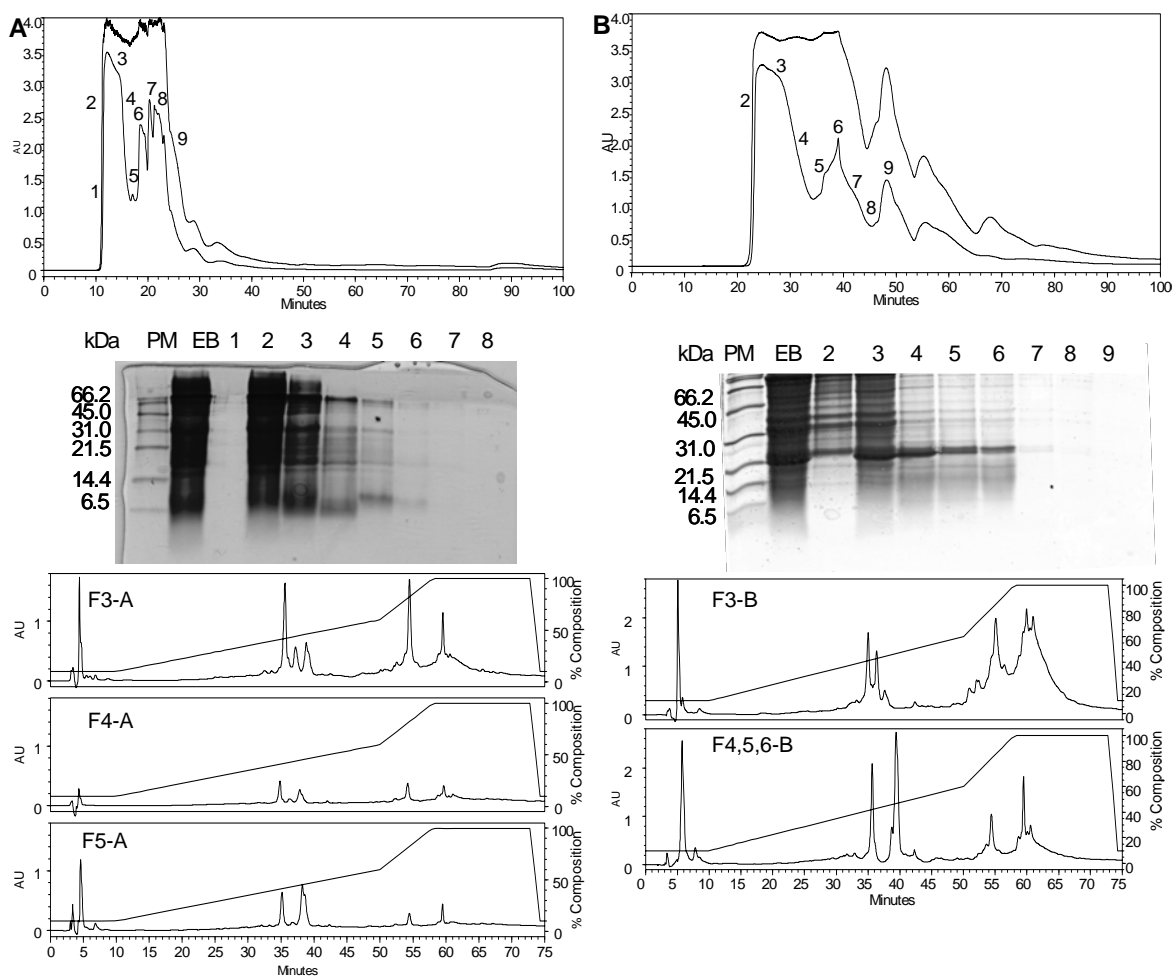


Figura 2. Cromatografia de exclusão molecular em coluna Protein Pak 60A/HPLC (CEM), eletroforese em SDS-Tricina-PAGE e cromatografia C18RP-HPLC. Em A cromatografia de exclusão molecular utilizando Tris HCl 0,05 M, pH 7,0 na ausência de 0,2 M de NaCl e B na presença de 0,2M de NaCl. Eletroforese foi desenvolvida com o extrato bruto (EB) e frações eluídas CEM, na presença e ausência de sal (indicadas pelos números), sendo utilizados 5  $\mu$ L de MM, 4  $\mu$ L de EB e 10  $\mu$ L das frações. Para cromatografia de fase reversa (RP) foram utilizadas 500  $\mu$ L das frações após CEM.

SDS-Tricina-PAGE das frações obtidas da CEM, para comparação dos procedimentos adotados, mostrou uma melhor separação de SSG48 na presença de NaCl. Pode-se observar ainda que a eluição na presença de NaCl, para as primeiras frações (2 e 3) evidenciaram uma maior concentração das proteínas com massa molecular superior a 20 kDa, conforme esperado. Nas demais frações, observou-se uma maior concentração das proteínas com massas moleculares menores que 20 kDa (Figura 2b). Esta relação não pôde ser observada para a eluição protéica na ausência de sal. As frações enriquecidas com peptídeos de ambas as cromatografias

denominadas F3-A, F4-A e F5-A (frações eluídas na CEM na ausência de NaCl) e frações F3-B e F4,5,6-B (frações eluídas na CEM, na presença de NaCl), foram submetidas a cromatografias de fase reversa em HPLC (C18RP-HPLC). A comparação dos perfis de eluição após C18RP-HPLC para as três frações oriundas das CEM na ausência de NaCl (F3-A, F4-A e F5-A), mostraram perfis semelhantes entre si, basicamente com mudanças na absorvância dos picos eluídos, com poucas variações. Para as duas frações eluídas da CEM na presença de NaCl (F3-B e F4,5,6-B), foi verificado um maior número de frações diferencialmente eluídos na C18RP-HPLC, e com altos valores de absorvância.

Ensaio de atividade antibacteriana, utilizando apenas os solventes de eluição da RP-HPLC como amostra em diferentes concentrações foi realizado como controle. Foram utilizadas 4 concentrações de acetonitrila e TFA na presença e na ausência de aquecimento (Figura 3). A avaliação das curvas de crescimento utilizando acetonitrila e TFA sem aquecimento (concentrações 10, 20, 40 e 60%) mostrou que a bactéria *C. michiganensis* subsp *michiganensis* (Gram-positiva) foi mais sensível a estes solventes, com inibição do crescimento próximo a 100% para todas as concentrações testadas, enquanto que para *R. solanacearum* (Gram negativa), a inibição do crescimento foi de cerca de 80%. Para o ensaio acetonitrila e TFA (mesmas concentrações anteriores) após aquecimento, foi verificado um crescimento bacteriano semelhante ao crescimento do controle da cultura (bactéria em meio de cultura) quando comparados. Houve apenas pequenas reduções no crescimento bacteriano nas primeiras horas de cultivo, mostrando que o aquecimento volatilizou os solventes, e que ocorreu baixa inibição das bactérias no início do crescimento após a referida etapa de aquecimento.

A atividade antibacteriana contra *R. solanacearum* e *C. michiganensis* subsp *michiganensis* foi verificada pela curva de crescimento quando utilizadas frações obtidas após C18RP-HPLC enriquecidas com peptídeos, com os percentuais de inibição após 12 horas de ensaio estando sumarizados na Tabela 1. Inibições expressivas do crescimento bacteriano puderam ser observadas, com valores de 83 e 98 % para *R. solanacearum* e *C. michiganensis* subsp *michiganensis*, respectivamente. Pôde-se verificar que as maiores inibições foram obtidas com as frações após RP-HPLC eluídas entre 8 e 48% de acetonitrila.

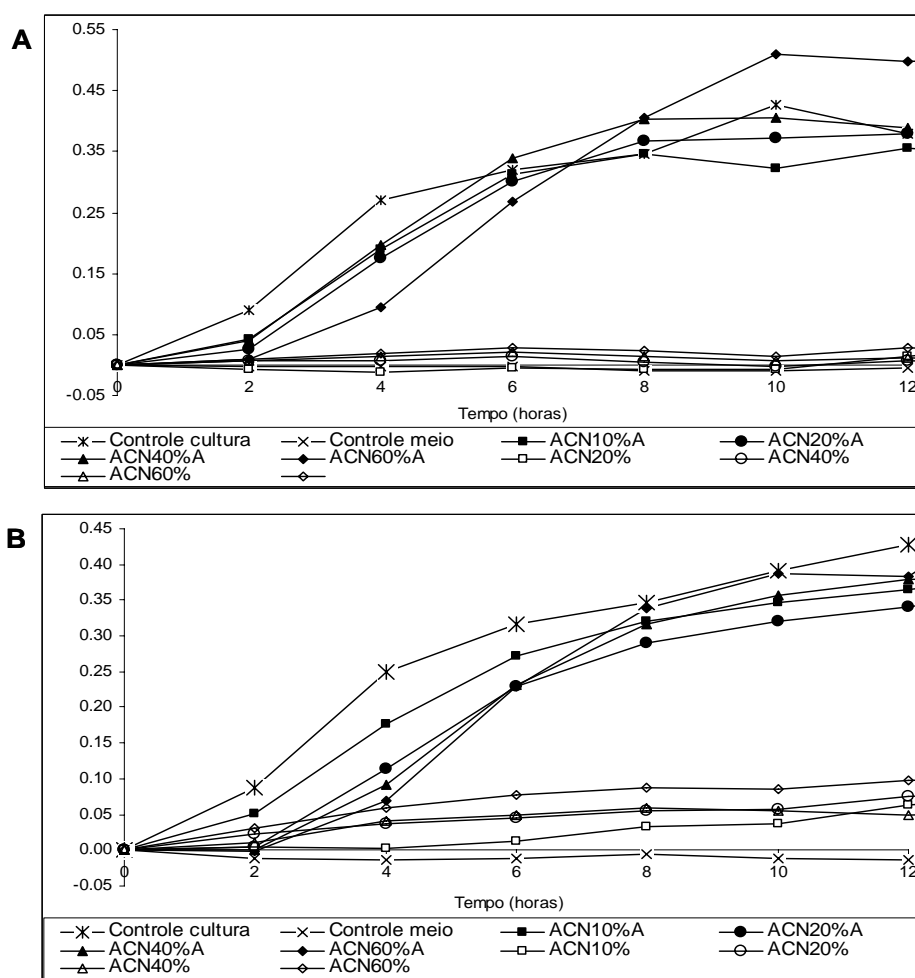


Figura 3. Testes de inibição do crescimento de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (A) e *Ralstonia solanacearum* (B), utilizando a diferentes concentrações de acetonitrila (ACN10%, ACN20% e ACN60%) e acetonitrila aquecida por 2 horas em temperatura de ebulição (ACN10%A, ACN20%A e ACN60%A). O controle da cultura corresponde ao cultivo do microrganismo na ausência da amostra-teste e o Controle do meio ao cultivo na ausência da amostra-teste e da bactéria.

Análises de espectrometria de massa foram realizadas com oito frações da C18RP-HPLC após CEM na ausência de NaCl, e com seis frações da C18RP-HPLC após CEM na presença de NaCl, ambas com atividade antibacteriana superior a 20% (Tabela 1). Para as duas condições (14 análises), várias massas moleculares de peptídeos foram identificadas, sendo a maioria das massas moleculares menores que 10 kDa.

**Tabela 1. Inibição do crescimento bacteriano em 12h e massas moleculares das frações peptídicas após RP-HPLC, eluídas em diferentes concentrações de acetonitrila.**

Frações obtidas da RP-HPLC após CEM (Fig 2A e 2B)	Gradiente de Eluição na RP-HPLC		Porcentagem de inibição do crescimento microbiano em 12 h de cultivo		Massas Moleculares (Da)
	%B <sup>1</sup>	% ACN <sup>2</sup>	<i>C. michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i>	<i>R. solanacearum</i>	
<b>F14-RP-F4-A</b>	<b>40</b>	<b>32</b>	<b>35</b>	<b>-12</b>	<b>7.875,404</b>
<b>F22-RP-F4-A</b>	<b>77</b>	<b>61,6</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>943,482; 1.338,026; 1.442,101; 1.486,155</b>
<b>F23-RP-F4-A</b>	<b>99</b>	<b>79,2</b>	<b>9</b>	<b>76</b>	<b>3.200,853; 6.667,896; 10.013,723; 19.998,863</b>
<b>F4-RP-F5-A</b>	<b>40</b>	<b>32</b>	<b>18</b>	<b>22</b>	<b>4.273,694; 7.301,573; 7.527,948; 7.793,172; 8.340,161</b>
<b>F5-RP-F5-A</b>	<b>40</b>	<b>32</b>	<b>22</b>	<b>17</b>	<b>2.471,661; 4.273,694; 7.137,729; 7.604,438; 8.340,161</b>
<b>F11-RP-F6-A</b>	<b>57</b>	<b>45,6</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>4.629,701; 9.261,182</b>
<b>F12-RP-F6-A</b>	<b>63</b>	<b>50,4</b>	<b>13</b>	<b>22</b>	<b>1.131,941 6.774,93;13.551,000</b>
<b>F14-RP-F6-A</b>	<b>80</b>	<b>64</b>	<b>16</b>	<b>20</b>	<b>6.809,608; 9.991,096; 13.540,578; 19.993,235</b>
-----	-----	-----	-----	-----	-----
F6-RP-F3-B	10	8	31	83	1.271,209; 2.543,118; 3.698,262; 4.471,077; 5.078,386
F9-RP-F3-B	19	15,2	97	74	2.368,207; 2.781,160; 2.910,115; 3.269,044; 3.397,048
F11-RP-F3-B	27	21,6	98	77	7.321,781
F13-RP-F3-B	37	29,6	31	21	1.493,991; 1.889,142; 2.131,242; 2.387,299 7.145,333; 7.541,720
F20-RP-F3-B	44	35,2	28	21	927,805; 1.133,025
F21-RP-F3-B	50	40	31	25	9.992,013
F24-RP-F3-B	60	48	22	23	860,608;1.065,840 6.657,422; 9.987,430; 19.986,309

<sup>1</sup> O solvente B era composto por 80% de acetonitrila e 0,1% de TFA;

<sup>2</sup> % de Acetonitrila.

### 5.1.5. Discussão

Este trabalho descreve a combinação de técnicas de extração e de pré-fracionamento de amostra associadas à cromatografia líquida em duas dimensões (TDLC) para a identificação de peptídeos de sementes germinadas de soja (SSG48), resistentes a condições adversas, para aplicação biotecnológica. Resultados prévios em nosso laboratório sugeriram que sementes de soja germinadas por 48 horas apresentavam peptídeos antimicrobianos com características de interesse para a aplicação biotecnológica, pois mantinham a capacidade antimicrobiana após submissão a condições inóspitas, como aquecimento e contato com acetonitrila e TFA. Considerando a complexidade do extrato protéico de SSG48 as etapas do processo de extração e de purificação foram realizadas em baixa temperatura e utilizando inibidores de proteases. Vale ressaltar que devida à baixa ou moderada abundância dos peptídeos, a proteólise endógena pode dificultar a identificação desses peptídeos (Fricker et al., 2006). Considerando que proteases estão presentes nas células, cuidados devem ser empregados para minimizar a proteólise, evitando que o *pool* peptídico a ser identificado, torne-se ainda mais complexo. Assim, todas as etapas de preparo de amostras para isolamento dos peptídeos devem ser realizadas a 4 °C ou menos, adicionado de inibidores de protease e agentes quelantes como EDTA (Farroki et.al. 2008).

No estudo de peptídeos em geral, o aquecimento seletivo vem sendo utilizado como uma técnica de fracionamento simples e de baixo custo. Entretanto, o aquecimento dos extratos de SSG48 a 80 °C por 15 min, promoveu agregação de peptídeos, possivelmente, por associação com outras moléculas de massas moleculares maiores. Essas moléculas ao serem expostas aos agentes desnaturantes e redutores (SDS,  $\beta$ -mercaptoetanol) das soluções utilizadas na eletroforese e ao aquecimento no tampão de amostra desagregaram (Figura1), entretanto estes não constituiriam amostra de trabalho. Vale ressaltar ainda que, muitos peptídeos podem ter se aglomerado a proteínas maiores e precipitado nesta etapa, sendo perdidos. Apesar de, em geral, os peptídeos possuírem ligações de enxofre que lhes conferem estabilidade, o alto número de resíduos hidrofóbicos e o alto teor protéico da amostra, podem ser os responsáveis pela agregação. O alto teor protéico, de 30 a 46% (matéria seca) das sementes de soja (Hill and Breidenbach, 1974), pode ter favorecido essa condição durante o aquecimento, o que ocasiona uma menor

recuperação da fração de interesse. Resultados posteriores, neste trabalho, utilizando amostras em estágio de purificação avançado mostraram que o aquecimento de frações peptídicas não indisponibilizam essas moléculas, que mantêm suas atividades biológicas após aquecimento à ebulição por 120 min.

A CEM tem sido a metodologia de escolha para o fracionamento dos pequenos peptídeos do restante da amostra, após obtenção do extrato protéico e pôde-se observar em nossos resultados que a adição de NaCl ao tampão de eluição da amostra melhorou a separação. A seleção do tampão bem como a sua concentração e pH devem estar de acordo com as características de estabilidade das proteínas de interesse a serem recuperadas. O uso de 0,15 M de NaCl é, em geral, recomendado para evitar interações não específicas com a resina (matriz da coluna) e ainda algumas proteínas podem precipitar em soluções com baixa força iônica (Pharmacia). O uso de colunas com limite de exclusão entre 10-30 kDa tem favorecido a obtenção de peptídeos, os quais têm sido detectados por diversas técnicas, tais como bioensaio, imunensaio ou absorvância a 280 e 214 nm, o que contribui para distingui-los de outros conjuntos de proteínas que não sejam de interesse, bem como de metabólitos secundários presentes nas plantas (Clynen et al., 2003). Esta primeira separação por tamanho enriquece o *pool* peptídico, mas devido ao seu elevado nível de complexidade, ainda não permite a identificação de peptídeos via espectrômetro de massa; portanto, assim uma segunda dimensão é ainda necessária (Farroky et al 2008).

O fracionamento do *pool* peptídico obtido da CEM por RP-HPLC, possibilitou a recuperação das frações de menor complexidade e mais enriquecidas em peptídeos. A utilização do aquecimento, para frações após RP-HPLC, objetivou a remoção do solvente das amostras com baixo custo, já que a acetonitrila e o TFA possuem ponto de ebulição de 82 e 72° C, respectivamente, devendo, portanto ser volatilizadas em temperatura de ebulição. Nossos resultados mostraram que o aquecimento foi o suficiente para remover a acetonitrila e TFA, uma vez que os ensaios de avaliação da eficiência do processo (figura 3) evidenciaram um crescimento semelhante das bactérias na presença de acetonitrila aquecida quando comparados ao controle da cultura (bactéria + meio de cultivo). Assim, as inibições do crescimento bacteriano puderam ser correlacionadas aos peptídeos presentes nas amostras e que o aquecimento não interferiu na função biológica dos peptídeos. Os melhores resultados de inibição foram observados para as frações provenientes da

RP-HPLC após CEM, na presença de NaCl, o que sugere que a melhor separação favoreceu ao enriquecimento da fração peptídica com peptídeos antimicrobianos, os quais nesta condição foram eluídos em concentrações entre 8 e 48% de acetonitrila, faixa de eluição que está de acordo com a literatura (Almeida et al., 2000; Carvalho et al., 2001, Fogaça et al., 2004). As bactérias utilizadas como microrganismos-teste, são fitopatógenos que acometem culturas de grande importância comercial gerando enormes prejuízos. A bactéria *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* é causa da doença murcha e cancro em tomate (Gartemann et al, 2003); e *R. solanacearum*, pode causar murcha em importantes espécies vegetais, incluindo batata, tabaco, tomate, banana e amendoim (Yao et al, 2006). O controle dessas bactérias é de grande importância na agricultura, já que as doenças por elas causadas levam perda de lavouras de importância comercial. As bacterioses de plantas são responsáveis por grandes perdas na produção de hortaliças, tanto durante o cultivo como em pós-colheita. Em muitos casos, pode-se afirmar que as bacterioses têm importância relativa superior à das doenças fúngicas, que são em maior número. Se para as doenças fúngicas existe um arsenal de fungicidas modernos e eficazes para o seu controle, com novas moléculas sendo disponibilizados para uso a cada ano, os bactericidas, de eficácia incerta, permanecem praticamente os mesmos há décadas. Além disso, bacterioses apresentam alta taxa de multiplicação, principalmente em hortaliças, que são irrigadas com frequência e normalmente contêm alto teor de água em seus tecidos (Lopes et al., 2007).

Várias frações peptídicas de SSG48, identificadas neste trabalho se mostraram promissoras, para aplicações biotecnológicas no controle das doenças. Esses peptídeos, mesmo quando submetidos a condições adversas como eluição em solventes (acetonitrila e TFA), ao aquecimento (2h em temperatura de ebulição) e detergente aniônico e agentes redutores (dados não apresentados) foram ativos contra bactérias de importância agrônômica. Lindorff-Larsen and Winther (2001), descreve uma LTP1 de cevada (peptídeo antimicrobiano com cerca de 90 resíduos de aminoácidos), altamente estável a agentes desnaturantes e proteases, e temperaturas de até 100 °C não são o suficiente para a perda de sua função. Esta alta estabilidade foi correlacionada a sua importante função biológica.

A maioria das massas moleculares obtidas após RP-HPLC está de acordo com as massas moleculares das 10 famílias de peptídeos antimicrobianos de plantas descritas (García-Olmedo, 2001). Essas massas moleculares podem corresponder a

diferentes famílias de peptídeos antimicrobianos de plantas como as das defensina, Knotina-Like, Haveína-Like, MBP1, nsLTP (LTP1 e LTP2), o que sugere que diferentes peptídeos estão sendo sintetizados durante a germinação da semente de soja e que estes podem corresponder à defesa primária da semente. Egorov et. al. (2005) relataram a ocorrência de diversas famílias de peptídeos antimicrobianos em trigo obtidas utilizando técnicas cromatográficas associadas a espectrometria de massa. As análises foram baseadas na similaridade de seqüência e *motifs* de cisteínas dos peptídeos parcialmente seqüenciados. Estes foram atribuídos a 7 famílias de peptídeos antimicrobianos: Defensinas (Grupo I: 4.970 Da; 4.980 Da; 5.089 Da; 5.150 Da; 5.691 Da; 5.735 Da; Grupo II: 5.141 Da; 5.250 Da; 5.265 Da; Grupo III: 5.342 Da; 5.346 Da); tioninas ( $\beta$ -purotionina 4.918 Da;  $\alpha$ -purotionina 4.921 Da); LTPs (LTP1: 9.501 Da e LTP2 6.972 Da), Peptídeos semelhantes a haveína (4.434 Da; 4.590 Da), peptídeos semelhantes a knotinas (2.759,7 Da; 2.672,4 Da; 3.187,9 Da), peptídeos ricos em glicina (4.294 Da; 4.360 Da; 4.375 Da; 4.603 Da; 4.668 Da; 4.750 Da; 4.844 Da) e homólogos a MBP1 (3.518,3 Da; 3.857,6 Da; 3.895,9 Da; 4.023 Da, 4.151 Da). As massas moleculares maiores que 10 kDa identificadas nas SSG48 podem corresponder a proteínas relacionadas a defesa de plantas como purioindoline (13194 Da) (Egorov et al., 2005) ou a proteínas relacionadas a defesa ou simplesmente produtos da degradação de proteínas de reserva, já que a SSG48 encontra-se em um momento fisiológico de intenso metabolismo. Os peptídeos de plantas são moléculas protéicas, em geral menores que 10 kDa, e podem ser divididos em duas categorias: peptídeos bioativos que são produzidos pela ação seletiva de peptidases em proteínas precursoras maiores (Fricker et al., 2006), e peptídeos que resultam da atividade das enzimas proteolíticas durante o *turnover* protéico celular. Embora ambos os grupos sejam produtos de proteólise, eles diferem na forma como agem no interior da célula. O primeiro grupo tem papéis fundamentais em vários aspectos do crescimento das plantas por meio da regulação da sinalização célula-célula, da resistência contra pragas e agentes patogênicos, dos eliciadores e dos desintoxicadores (Farroki et al., 2008). Em contrapartida, o segundo grupo não tem efeitos celulares pronunciados, mas pode desempenhar um papel importante como o fornecimento de aminoácidos para a síntese “de novo”. Os peptídeos antimicrobianos ainda podem ser prontamente sintetizados de maneira flexível, com baixo consumo de energia e de biomassa, em função do seu pequeno

tamanho, já que um mesmo precursor pode servir a expressão de vários AMPs. (Broekaert et al., 1995; Borregaard et al., 2000).

#### **5.1.6. Conclusões**

A adequação do protocolo à amostra reflete a qualidade dos resultados. Modificações e cuidados durante o processo de purificação são sempre requeridos para a recuperação de amostras peptídicas enriquecidas e com potencial de exploração. Apesar da termoestabilidade aparente de muitos AMPs, o aquecimento seletivo como técnica para o enriquecimento da amostra em proteínas de baixas MM e peptídeos não indicou ser adequado (Figura 1). A TDLC (CEM seguida de RP), que explorou as propriedades químicas das proteínas/peptídeos bioprospectados, se mostrou adequados no enriquecimento da amostra em peptídeos, sendo que o melhor resultado obtido nessa combinação foi após a adição de NaCl 0,2 M ao tampão de eluição da primeira dimensão (Figura 2b). Várias frações peptídicas apresentaram altas atividades antibacterianas contra importantes fitopatógenos, e nessas frações foram identificados peptídeos que estão de acordo com as MM de peptídeos antimicrobianos descritos em vegetais, e já caracterizados (2-9 kDa), ou ainda relacionados a proteínas de defesa em plantas (Tabela1). Esses resultados são de extrema importância uma vez que os ensaios de atividade antibacteriana foram realizados com frações após RP-HPLC, aquecidas em temperatura de ebulição por 2h. As diferentes massas moleculares identificadas nas frações ativas contra as bactérias-teste podem corresponder a diferentes peptídeos, o que evidencia a síntese/expressão diferencial de peptídeos altamente resistentes durante o período de germinação de sementes de soja, podendo estes constituir a defesa primária das SSG48. Assim, o processo de germinação de soja corresponde a um momento fisiológico de intenso metabolismo, ativação da expressão protéica e proteólise específica, indicando tratar-se de uma situação fisiológica de grande interesse para a identificação de peptídeos relacionados à defesa, podendo ser considerado como “o peptidoma da germinação de soja”.

O protocolo utilizado para o isolamento de peptídeos antimicrobianos altamente resistentes às condições adversas em SSG48 poderá ainda servir como método de base para estudos diversos em peptidômica.

Além disso, essas frações peptídicas de SSG48 apresentam importantes características biotecnológicas as serem exploradas para o controle de bacterioses, visando aplicação comercial futura das frações contendo peptídeos antimicrobianos resistentes a condições adversas. A metodologia de purificação poderia ser modificada para obtenção das frações peptídicas em quantidades adequadas para uso como defensivo agrícola. A CEM (metodologia analítica) poderia ser substituída por ultrafiltração na presença de NaCl (que possibilita trabalho com maiores volumes a um menor custo), utilizando membranas com limite de exclusão que permitam a recuperação de frações entre 1 e 10 kDa para purificação em RP-HPLC preparativa. Para eliminação dos solventes da RP-HPLC poderia se utilizar rota-vapor para a otimização desta etapa. Assim, essas frações poderiam ser utilizadas como medida de prevenção ao ataque bacteriano na pós-colheita, aumentando a vida de prateleira de hortaliças, por exemplo. A identificação desses peptídeos ainda poderia possibilitar a expressão heteróloga e a metodologia acima descrita poderia ser utilizada para a purificação do peptídeo em questão, ou esses peptídeos poderiam ser utilizados a para expressão em plantas.

### 5.1.7. Referências bibliográficas

- Agrios, G.N. (2005) Plant diseases caused by prokaryotes: bacteria and mollicutes. (In G.N. Agrios Plant pathology. pp.615-704, 5th ed. San Diego: Academic Press.
- Almeida, M.S., Cabral, K.M.S., Zingali, R.B., Kurtenbach, E., 2000. Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. Arch. Biochem. Biophys. 378 (2), 278-286.
- Borregaard, N., Elsbach, P., Ganz, T., Garred, P., 2000. Innate immunity: from plants to humans. Immunol. Today 21, 68-70.
- Broekaert, W.F., Terras, F.R.G., Cammue, B.P.A., Osborn, R.W., 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant Physiol., 108, 1353-1358.
- Carvalho, A.O., Machado, O.L.T., Cunha, M.D., Santos, I.S., Gomes, V.M., 2001. Antimicrobial peptides and immunocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. Plant Physiol. Biochem, 39, 137-146.
- Clynen, E., Baggerman, G., Veelaert, D., Cerstiaens, A., Van der Horst, D., Harthoorn, L., Derua, R., Waelkens, E., De Loof, A., Schoofs, L., 2001. Peptidomics of the pars intercerebralis-corpora cardiaca complex of the migratory locust, *Locusta migratoria*. Eur. J. Biochem. 268, 1929–1939.
- Cornelissen, B.J.C., Melchers, L.S., 1993. Strategies for control of fungal disease with transgenic plants. Plant Physiol., 101, 709-712.
- Cramer, R., Schulz-Knappe, P., Zucht H.D., 2005. The future of post-genomic biology at the proteomic level: an outlook. Combinatorial Chem. & High Throughput Screening, 8, 807-810.
- Egorov, T.A., Odintsova, T.I., Pukhalsky, V.A., Grishin, E.V., 2005. Diversity of wheat anti-microbial peptides. Peptides 26, 2064–2073.
- Farrokhi, N., Whitelegge, J.P., Brusslan J.A., 2008. Plant peptides and peptidomics. Plant Biotechnol. J. 6, 105–134.
- Fogaça, A.C., Lorenzini, D.M., Kaku, L.M., Esteves, E., Bulet, P., Daffre, S., 2004. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. Dev. Comp. Immunol. 28,191–200.
- Fricker, L. D., Lim, J., Pan, H., Che, F.Y., 2006. Peptidomics: identification and quantification of endogenous peptides in neuroendocrine tissues. Mass Spectrometry Rev. 25, 327– 344.
- García-Olmedo, F.; Molina, A.; Alamillo, J.M.; Rodríguez-Palenzuela, P., 1998. Plant defense peptides. Biopolymers, 47, 479-491.

- García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J.M, López-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M., Poza-Carrión, C., 2001. Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Lett.*, 498, 219-222.
- Gartemann, K. H.; Kirchner, J. E.; Grafen, I.; Eichenlaub, R. and Burgere, A., 2003. *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of gram-positive phytopathogenic bacterium. *J. Biotechnology*, 106, 179-191.
- Hill, J.E., Breidenbach, R.W., 1974. Proteins of soybean seeds II. Accumulation of the major protein components during seed development and maturation. *Plant Physiol.* 53,747-751.
- Huffaker, A., Ryan, A.C., 2007. Endogenous peptide defense signals in Arabidopsis differentially amplify signaling for the innate immune response *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 10 732–10 736.
- Judd, R.C. 1994. Electrophoresis of peptides. In: Walker JM (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 32, Basic Protein and Peptide Protocols. Totowa, Humana Press Inc., pp. 49–57.
- Kader, J. C., 1996. Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. *Trends Plant Sc.* 2, 66-70.
- Lopes, C. A., Duval, A.M.Q., 2007. Epidemiologia e Controle das bacterioses em hortaliças In: Zambolim, L., Lopes, C. A., Picanço, M.C., Costa, C. Manejo integrado de doenças e pragas – Hortaliças pp.115-162, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Lindorj-Larsen, K., Winther, J.R., 2001. Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS Lett.* 488, 145-148.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., Boller, T., 1988. Antifungal hidrolases in pea tissue. Inhibition of fungal growth by combination of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 399-429.
- Montesinos, E., 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiol. Lett.* 270, 1–11.
- Newton, R. P., Brenton, A. G., Smith, C. J., Dudley E., 2004. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry* 65, 1449–1485
- Pharmacia Biotech. Gel Filtração - Principles and Methods, Ed. AL18-1022-18 GE-Amershan Bioscience.
- Silverstein, K.A.T., Moskal, W.A, Wu, H.C., Underwood, B.A., Graham, M.A., 2007. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been underpredicted in plants. *Plant J.* 51, 262–80.

- Schulz-Knappe, P., Schrader, M., Zucht, H.D., 2005. The peptidomics concept  
Combinatorial Chem. High Throughput Screening 8, 697-704.
- Teixeira, F.R., Lima, M.C.O, Almeida, H.O., Romeiro, R.S., Silva, D.J.H., Pereira, P.R.G., Fontes, E.P.B., Baracat-Pereira, M.C., 2006. Bioprospection of cationic and anionic antimicrobial peptides from bell pepper leaves for inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. J. Phytopathol. 154,18–421.
- Van Loon L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu. Rev. Phytopathol. 44, 135–62.
- Yao, J., Allen, C. 2006. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. J. Bacteriol. 188, 3697–3708.

## 5.2. CAPÍTULO 2: PARTE 2

### RESISTANT ANTIBACTERIAL PEPTIDES ARE PROBABLY INVOLVED IN THE CONSTITUTIVE PRIMARY DEFENSE IN SOYBEAN SEEDS UNDER GERMINATION

Meire de Oliveira Barbosa<sup>1, 2</sup>; Hebréia Oliveira Almeida<sup>1, 2</sup>; José Fabiano Sena Netto<sup>1, 2</sup>; Patrícia Dias Games<sup>1, 2</sup>; Paulo Wagner Pereira Antunes<sup>1, 2</sup>; Elizabeth Pacheco Batista Fontes<sup>1, 2</sup>; Reginaldo da Silva Romeiro<sup>3</sup>, Marcelo Matos Santoro<sup>4</sup>, and Maria Cristina Baracat-Pereira<sup>1, 2\*</sup>

#### **Authors' addresses**

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, <sup>2</sup>Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, 36,570-000, Viçosa - MG, Brazil. <sup>3</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36,570-000, Viçosa - MG, Brazil. <sup>4</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, 31.270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil.

#### **\*Corresponding address**

Maria Cristina Baracat-Pereira

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – BIOAGRO, UFV  
36,570-000 Viçosa – MG, Brazil.

Phone number: +55 (31) 3899-2919

Fax number: +55 (31) 3899-2864

E-mail: baracat@ufv.br

#### **Keywords**

Antimicrobial peptide; Germinated seeds; *Glycine max*; Mass spectrometry; Peptidomics; Plant defense.

### 5.2.1. Abstract

The synthesis of antimicrobial peptides corresponds to a defense strategy in several organisms, including plants and animals. They seem to have a great potential for application in agribusiness as antimicrobial natural agents. This work aimed to bioprospect the antimicrobial peptide activity detected in extracts from soybean seeds germinated for 48 h, for biotechnological application. Soluble extracts were prepared by triturating the seeds, and samples were macerated and fractionated by salt and ultrafiltration procedures. The recovered protein fractions (1-30 kDa) after separation by molecular exclusion chromatography produced two peptide-enriched pools (P1 and P2), that were fractionated in a reversed phase chromatography. Each recovered fraction was boiled (water-bath, 2 h) for the solvent elimination, since acetonitrile and trifluoroacetic acid which can be toxic. The fractions P1.10 to P1.18 showed growth inhibition rate up to 52% (at the evaluated conditions) against the plant pathogenic bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, and no-inhibition growth was observed against the fungus *Alternaria solani*. The presence of purified or partially purified peptides (up to 10 kDa) in these antimicrobial fractions was observed by electrophoresis in the presence of Tricine and by mass spectrometry analysis, confirming that soybean seeds germinated for 48 h present very resistant-peptides, smaller than 8,1 Da, not yet described or evaluated, for biotechnological application in agribusiness.

#### Abbreviations

AMPs – antimicrobial peptides;

MALDI-TOF/TOF – matrix assisted laser desorption / ionization associated with double time-of-flight mass spectrometer;

MEC - molecular exclusion chromatography;

MS – mass spectrometry;

SGS48 – soybean germinated seeds by 48 hours;

TDLC - two-dimensional liquid chromatography;

TFA - trifluoroacetic acid;

Tricine - N-tris[hydroxymethyl]methylglycine;

Tris - tris(hydroxymethyl)aminomethane.

### 5.2.2. Introduction

Plant diseases cause significant losses or decrease the quality and safety of agricultural products, requiring the use of chemicals for control as well as to meet world food needs. However, the emergence of resistant plant pathogens, the limited spectrum of action, and the negative long-term repercussions on human health and the environment have propelled the search for new alternatives as substitutes for the chemicals currently in use (Montesinos, 2007; Marcos et al., 2008). AMPs have been the object of attention in the last years as candidates for plant-protection alternative molecules. They are being pointed as important components of the constitutive or induced defense in several organisms, being considered the first line of defense in plants and animals (García-Olmedo et al., 2001; Zhang et al., 2006a, b; Montesinos, 2007). AMPs are short molecules (from 2 to 10 kDa) that are reported in living systems and that can be synthesized quickly and with low expense of energy for the organisms (Zasloff, 2002). They can act at small concentrations, with low environmental impact (García-Olmedo et al., 2001; Lay and Anderson, 2005), and their mechanisms of action against the target-microorganism differ from the way of action employed by the commercially available defensives (Montesinos, 2007). In this way, they are being reported as exhibiting a great potential for commercial application in the agribusiness as natural defense agents (Castro and Fontes, 2005).

The soybean is the legume of greater economical importance globally. These grains are a rich food in proteins and lipids, and the soybean protein concentrate present a highlight position in the feeding of chickens, swine, bovine, and other animals, as a protein supplement (Gepts et al., 2005). As a bioactive food, the soybean seeds have antihypertensive, anti-cholesterol and antioxidant activities (De Mejia, 2006). AMPs have been isolated from germinating seeds of various plant species including legumes, but not from soybean. The germination process causes important changes in the biochemical, nutritional and sensory characteristics of these seeds, including in proteins and AMPs (Terras et al, 1995; Kuo et al., 2004). When the peptides were tested against pathogens, they showed antifungal and antibacterial activities, suggesting an important role in defense during the germination (Terras et al., 1995; Yang et al., 2007).

The improved understanding of the biological systems that involves peptides could lead to improved crops, medicinal foods (nutraceuticals), pharmaceutical

products, and other biotechnological products (Montesinos, 2007; Farroki et al., 2008). AMPs represent candidate molecules to help the germination since they are synthesized quickly and effectively. This work aimed to bioprospect antimicrobial peptides present in soybean germinated seeds for biotechnological uses, especially in agribusiness.

### **5.2.3. Materials and methods**

#### **5.2.3.1. Biological materials**

Soybean seeds (*Glycine max* [L.] Merrill, var. UFV16), obtained from the “Soybean Improvement Program” at BIOAGRO / UFV, were germinated by 48 h, added of liquid nitrogen and storage at -80 °C. The microorganisms were obtained from the Departamento de Fitopatologia, UFV. The bacteria was grown on solid LB medium (Gerhardt, 1994) at 28 °C, and the fungus in potato-dextrose-agar (PDA) at 25 °C.

#### **5.2.3.2. Peptide extraction and purification**

The soybean germinated seeds by 48 h (SGS48) were weighed and extracted (Teixeira et al., 2006). The seeds were triturated in a blender added of liquid nitrogen, and macerated in 2.5 volumes of 100 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), pH 7.5, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and 1 mM benzamidine, by 2 h at 4 °C under agitation. After centrifugation (30 min, 20,300 g, 4 °C), the supernatant was fractionated with 35-70 % sat. ammonium sulfate. The recovered pellet was resuspended in 5 mM Tris, pH 7.0. For the enrichment of the extract, the ultrafiltration technique was carried out by using the Cell-Filtration 8400 (AMICON<sup>®</sup>/Millipore) apparatus, with two membranes (30 kDa and 1 kDa cut-off). Two protein groups were recovered: one with MW superior to 30 kDa, which was reserved, and another with molecules between 1 and 30 kDa, which was submitted to a molecular exclusion chromatography (MEC) in a Protein Pak 60<sup>™</sup> A (7,8 x 300 mm) column, in a HPLC (Waters Corporation, MA, USA) apparatus. The column was equilibrated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, added of 200

mM NaCl. Proteins were eluted at  $0.25 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  and monitored at 214 and 280 nm. The AMPs-enriched fractions were recovered and submitted to a reversed phase chromatography on a C18-column ( $5 \mu\text{m}$ ,  $250\times 4.6 \text{ mm}$ , Shimadzu, Japan) (C18 RP-HPLC), by using a discontinuous gradient of acetonitrile (0-80%, v/v) in the presence of 0.1% TFA, at  $1.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . The separation was monitored at 214 and 280 nm. To remove the mobile phase, the eluted samples were boiled for 2 h, and concentrated on a Speed Vac (Savant SP1010, USA). These fractions were analyzed for the action against plant pathogens. Total protein was determined in the fractions obtained after RP-HPLC by using the bicinchoninic acid method (Smith et al., 1985), adjusted as a micromethod. Bovine serum albumin was the standard protein, and assays were done in three replicates.

#### **5.2.3.3. Peptide electrophoresis in the presence of SDS and Tricine**

The levels of the peptide purification after the chromatographic steps were checked by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) and Tricine (SDS-Tricine-PAGE) (Judd, 1994). The peptide-samples were boiled (10 min) in a loading buffer and carried out in three-phase gels: a separating gel (16.5 % T, 3.0 % C), a spacer gel (9.9 % T, 3.0 % C) and a staking gel (5.12 % T, 2.6 % C), at 100 V (15 min), 80 V (20 min) and 60 V (150 min). The cathode-running buffer was 0.1 M Tris, 0.1 M N-tris[hydroxymethyl]methylglycine (Tricine) and 0.1% SDS, pH 8.25, and the anode counterpart consisted of 0.2 M Tris, pH 8.9. For analysis of the samples eluted from de MEC, the Broad range MW Markers (Bio-Rad) was used. Peptide bands were stained with Coomassie Brilliant Blue (Meyer and Lamberts, 1965). For samples eluted from the C18RP-HPLC, the Ultra-low MW Markers (Bio-Rad) was used and the peptide bands were stained with the silver nitrate technique (Heukeshoven et al., 1986).

#### **5.2.3.4. Antimicrobial assays**

The inhibitory activity of the fractions named P1.1 to P1.20 and P2.1 to P2.20 was evaluated against the bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, and the fungus *Alternaria solani*. For the antibacterial assays, it was used the Microplate Test

(Teixeira et al., 2006). Bacterial cell suspension ( $A_{560} = 1.2$ ) from liquid LB culture medium was grown at 28 °C, and 10  $\mu\text{l}$  was transferred to disposable sterile polystyrene plates (96-well, high binding, covered, flat bottom) containing 50  $\mu\text{l}$  of liquid LB medium (double strength) and 40  $\mu\text{l}$  of the fraction. The plates were incubated at 28 °C and the bacterial growth was monitored at  $A_{560}$ . Only sterile culture medium and bacterial liquid cultures was, respectively, the medium-control and the bacterial-control. The assays were carried out in three replicates. For plot presentation, initial culture  $A_{560}$  values were standardized in zero for all assays. For antifungal activity, the assay was carried out in Petri dishes containing PDA. A mycelia suspension was distributed over the growth medium-agar inside the plate, and 50  $\mu\text{l}$  of each peptide-fraction or water (control) was added to each well (Romeiro, 2007). The plates were incubated at 25 °C for 7 days and the presence of inhibition-circles was observed. Assays were done in three replicates.

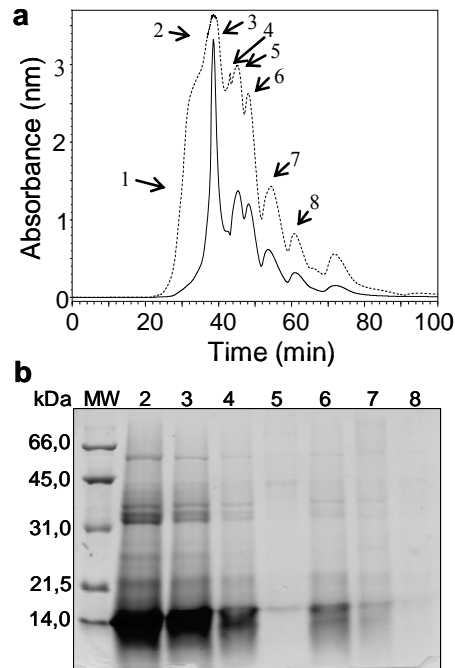
#### **5.2.3.5. Mass spectrometry analysis**

For mass spectrometry (MS) analysis, the fractions obtained after C18RP-HPLC were reduced and alkylated. The mass determinations were performed by using an UltraFlex III Smartbean, MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA) in the. ICB/UFMG. Chromatographic fractions were dissolved in an  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix solution (1:1, v:v), spotted onto a MALDI target plate and dried at room temperature for 15 min. The peptide monoisotopic mass was obtained in reflector mode with external calibration, using the Peptide Calibration Standard for Mass Spectrometry calibration mixture (up to 4,000 Da mass range, Bruker Daltonics).

### **5.2.4. Results**

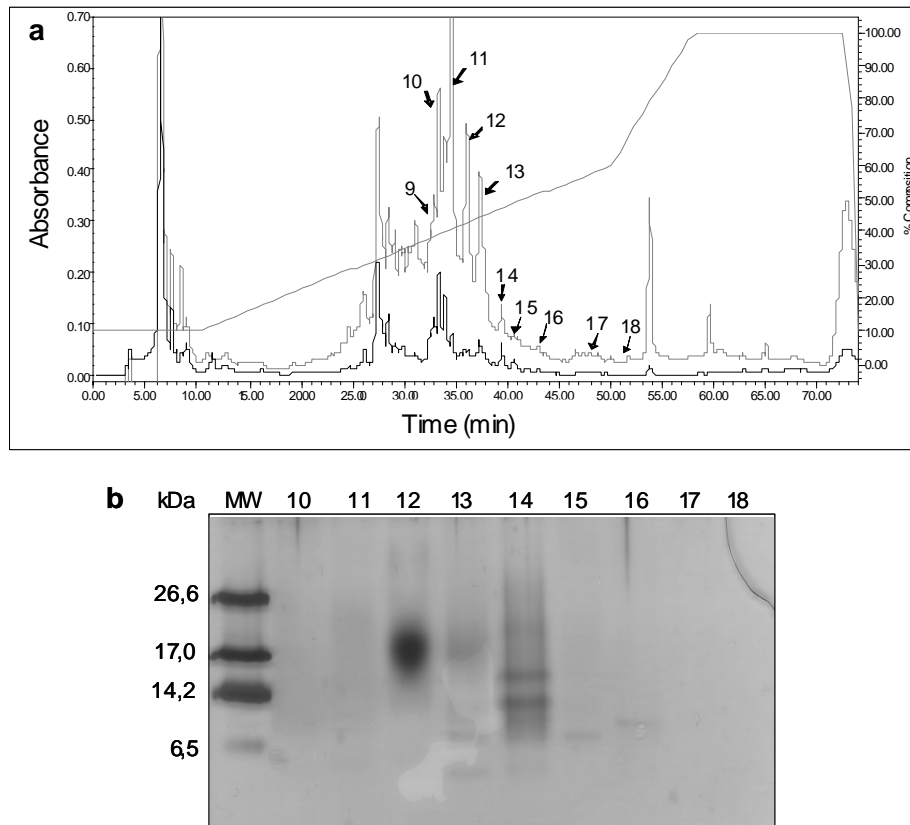
#### **5.2.4.1. Obtaintion of the peptide-enriched fractions**

The purification of peptides from SGS48 involved the use of a simple protocol, and it was successfully developed. The protein extracts were submitted to the steps of salt fractionation, ultrafiltration and offline-two-dimensional liquid chromatography (offline-TDLC) (Figs. 1a and 2a), and purified or partially-purified



**Fig. 1.** a) Molecular exclusion chromatography (MEC) in a Protein Pak 60A column / HPLC of the fraction containing proteins with low molecular weight (1-30 kDa) of SGS48, after the ultrafiltration procedure. The arrows indicate the fractions that were analyzed by SDS-Tricine-PAGE. The elution was monitored at 214 nm (dashed line) and 280 nm (black line). b) Three-phase SDS-Tricine-PAGE of the fractions after MEC. The gel samples were: MW (line 1, 5  $\mu$ L of Broad Range Molecular Weight Markers); lines 2 to 8, 20  $\mu$ L of the fractions obtained from the MEC. The protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R250.

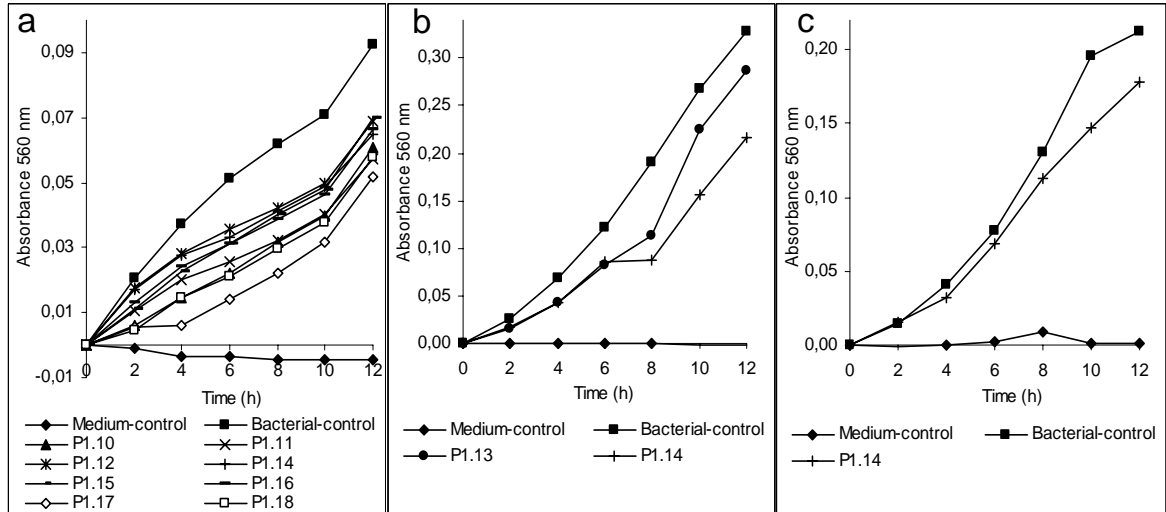
fractions were submitted to SDS-Tricine-PAGE (Figs. 1b and 2b), antimicrobial analysis (Fig. 3) and to the mass spectrometry technique (Table 1). The salt fractionation removed pigments and non-protein molecules, which were considered contaminants that should be eliminated previously to the mass spectrometry analysis. The ultrafiltration procedure allowed the obtention of two protein fractions, which were separately analyzed. The low-MW fraction that contains the proteins between 1 and 30 kDa was submitted to the MEC, and two peptide-enriched pools (P1 and P2, composed by the fraction 2-3 and 4-5, respectively – Fig. 1a) were recovered. This peptide-enrichment was confirmed by SDS-Tricine-PAGE (Fig. 1b). The fractionation of P1 and P2 by a C18RP-HPLC produced 40 fractions (P1.1 to P1.20) (Fig. 2a) and (2.1 to 2.20) (data not shown), and the peptide enrichment in the fractions P1.10 to P1.18 was analyzed by SDS-Tricine-PAGE (Fig. 2b, lines named as 10-18, respectively).



**Fig. 2.** a) Reversed phase chromatography in a C18 column (C18 RP-HPLC) of the P1 fraction (fraction of 2 and 3 in Fig. 1). The elution was monitored at 214 nm (gray line, upper) and 280 nm (black line). The arrows indicate the fractions that were analyzed by SDS-Tricine-PAGE and also submitted to antimicrobial assays against plant pathogenic bacteria (Fig. 3). b) Three-phase SDS-Tricine-PAGE of the fractions after C18RP-HPLC. The gel samples were: MW (line 1, 5  $\mu$ l of Ultra Low Molecular Weight Markers); lines 2 to 10, 5  $\mu$ g (protein) of the fractions 10 to 18 obtained from the C18RP-HPLC. The protein bands were stained with silver nitrate.

#### 5.2.4.2. Antimicrobial activity against plant pathogenic bacteria and fungus

Antimicrobial assays using the 40 recovered fractions (obtained from P1 and P2 after C18RP-HPLC separations) showed that the fractions P1.10 to P1.18 caused reduction in the bacteria growth with variable rates, with inhibition grades of up to 52%, if compared with the culture-control, at 12 h of growth time (Figs. 3a to 3c). It was also observed the fractions P2.1 to P2.20 caused no-inhibitions of the microorganisms' growth. P1.14 was the only fraction capable of inhibiting the growth of all evaluated bacteria (Figs. 3a to 3c). Except for P1.13, all above mentioned fractions caused *P. syringae* pv. *tomato* growth inhibition. For *E. carotovora* ssp. *carotovora*, the P1.14 presented the highest inhibition rate, followed



**Fig.3.** Antimicrobial activity of the fractions of SGS48 eluted from the C18RP-HPLC against the plant pathogenic bacteria (a) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, (b) *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and (c) *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. It was used 0,04  $\mu\text{g}$  of each fraction. Bacterial-control was the bacterial liquid culture. Medium-control was the sterile culture medium only. The plates were incubated at 28  $^{\circ}\text{C}$ . Bacterial growth was followed by the absorbance at 560 nm.

by P1.13. *X. axonopodis* pv. *phaseoli* growth were partially inhibited only by the P1.14. No inhibition activity was detected against the fungus *A. solani* under the evaluated conditions.

#### 5.2.4.3. SDS-Tricine-PAGE and mass spectrometry analysis

SDS-Tricine-PAGE evidenced a high purification degree in the fraction P1.10 to P1.18 obtained from the RP-HPLC (labeled as 10 to 18, respectively), when bands between 6 and 16 kDa were identified (Fig. 2b). MS analysis detected MW values between 1 and 8 kDa in these fractions (Table 1).

Table 1 - Low-molecular weight values determined by a MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometer in peptide enriched-pools (P1.10 to P1.16) obtained from extracts of soybean germinated seeds by 48 hours.

<b>Fractions</b>	<b>Molecular weight values (Da)</b>
<b>P1.10</b>	7,400.733
<b>P1.11</b>	7,455.150
<b>P1.12</b>	7,346.695; 7,462.290; 7,841.091
<b>P1.13</b>	859.933; 942.613; 5,750.336; 7,460.579; 7,836.011; 8,144.202
<b>P1.14</b>	926.518; 1,169.870
<b>P1.15</b>	1,132.017; 1,610.253
<b>P1.16</b>	1,033.345; 1,153.839; 1,199.729; 1,287.801; 1,380.108; 7,462.542

### **5.2.5. Discussion**

The SGS48 produced very complex extracts. The offline two- or multi-dimensional liquid chromatography (TDLC or MDLC, respectively) corresponds to the main technique in the peptidomics, used for isolation of molecules present in low concentration in complex samples, such as AMPs. The obtaintion of good is directly related with the preparation of fractioned extracts in groups of molecules of interest. The extracts of SGS48 are composed by molecules with different mass values, including natural non-protein compounds for defense in plants that need to be removed previously to the antimicrobial assays. Thus, the fractionation previously to the chromatography's steps, by using salting out, followed by the two stages of ultrafiltration (cut-off 30 kDa and 1kDa) allowed, quickly and successfully, the clarification, the fractionation and the concentration of the samples. The ultrafiltration permitted the obtaintion of peptide enriched fractions to be used as samples for MEC. Since AMPs are highly effective compounds (García-Olmedo et al., 2001; Lay and Anderson, 2005), they are generally present in low concentrations in the tissues.

Although the chromatography steps are slower and hard, the MEC was used successfully instead of the ultrafiltration procedures (10 kDa cut-off), because previous results indicated the presence of peptides (close to 10 kDa). MEC allowed the enrichment in antimicrobial activity of the P1 fraction (Fig. 1), generating fractions P1.10 to P1.18 (Fig. 2a), which are peptide-enriched fractions eluted around

32-52 % acetonitrile (Fig. 2a). These concentration values are similar to acetonitrile concentrations described for AMPs (Fogaça et al., 2004, Pelegrini et al., 2008).

Despite the importance of the soybean worldwide as a culture of economic focus and as a protein rich food, no reports were yet identified about the presence of AMPs related to the germination process of these seeds. This work shows the synthesis of AMPs as molecules with high resistance to adverse conditions that are present during the soybean seed germination, which is a result of extreme importance given the stability of the molecule and the probable use of this knowledge in a biotechnological application. AMPs have been considered as important molecules in several types of plant because of their involvement in response to the stress situations (Lindorf-Larsen and Winther, 2001). Since they seem to be ubiquitous in the nature, they probably are involved in the primary line for defense during the seed germination. It is stated that the AMPs have molecular simplicity, versatility demanding low energy for their synthesis (Terras et al., 1995), characteristics that are in agreement with the rapid synthesis for the plant defense during the seed germination. The knowledge about the presence of peptides during the seed germination is still unclear. It should be considered that seeds germination is a critical point for the survival and dissemination of the species (Cots and Widmer, 1999). Experiments with radish seeds have demonstrated that defensins, an important class of AMPs, represent over than 30% of the proteins released during the radish germination. Defensins are present at about 1 µg for one seed that is an enough amount for fungal inhibition contributing to the survival of seedling (Terras et al., 1995). Yang et al. (2007) reported the identification of defense peptides especially from seeds in germination for various plant species, when some sequences have been identified as having some similarity to proteins of booking. When the peptides were tested against pathogens by these authors, it was detected antifungal and antibacterial activities, suggesting a role in the defense during seed germination.

Carvalho et al. (2001) identified the presence of LTP in seeds of different cultivars of cowpea and in other legume, including *Vigna vexillata*, *Canavalia ensiformis* and *Phaseolus vulgaris*, by Western blotting with anti-nsLTP serum. However, these authors did not found the presence of nsLTPs in seeds of *Adenanthera pavonina*, *Albizia* sp. and *Glycine max*. Several studies have reported the identification of AMPs in seeds of different crops of commercial importance as pea (Almeida et al., 2000), rice (Liu et al., 2002), maize (Castro et al., 2003), wheat

(Egorov et al., 2005), guava (Pelegriani et al., 2008), and others. The MW values that were determined by MS (Table 1) are in accordance with the size of the antimicrobial peptides described for plants (Garcia-Olmedo et al., 2001), smaller than 9 kDa. For the fractions P1.15 and P1.16, just a peptide band (smaller than 10 kDa) was viewed in the gel. However, values close to 1-kDa were detected by MS in these two fractions. For sure, since gels are not the best way to evaluate peptides regarding their size. For the fractions P1.12, P1.13 and P1.14, peptide bands were viewed in the gel and also by MS analysis, which correspond to interesting peptide fractions for bioprospection (Fig. 2b). For P1.10 and P1.11, it was identified just a single MW, although the gel has not allowed the focalization of the peptide bands. While the SDS- Tricine-PAGE technique has shown bands between 6 and 16 kDa in fraction P1.14, and close to 9 kDa to P1.15, mass values with just around 1 kDa were identified by MS, probably by limitations of these two techniques. Except for P1.14 and P1.15, the analyzed fractions presented molecules between 5 and 8 kDa, highlighting MW that can match with defensins and Lipid-Transport Proteins (LTP) (Table 1), two important classes of AMPs.

In this work, the presence of peptides was confirmed (Fig. 2b and Table 1) in several peptide-enriched fractions (P1.10 to P1.18) of SGS48 that showed significant antibacterial activity (Fig. 3), suggesting the involvement of peptides in the soybean seed germination process, probably with a line of defense. The levels of inhibition detected are of great importance in the control of plant pathogens, since a large amount of agricultural chemicals is not effective against bacteria. Molina et al. (1993) have isolated four different LTPs from leaves of barley, and one from leaves of *Z. mays*, and all of them presented biological activity against the bacteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum*, and against the fungus *Fusarium solani*.

Although the fractions P2.1 to P2.20 were not able to decrease microbial growth of the chosen bacteria or fungus, under the mentioned growth conditions, the use of different conditions for assays, as increased amounts of peptide fractions, could provide the control of the microorganism growth. Previous results in our laboratory have shown that the ability of fractions enriched in antimicrobial peptides obtained from extracts of eggplant are dependent on the concentration of the molecules to inhibiting *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth (Almeida et al., 2007; 2008). The control of plant diseases is

usually very hard, and certain bacterial diseases are worrying, not only by the high incidence and severity in crops of economical value but because they are difficult to control and also for the spread easiness of microorganisms. Often, it is required a combination of methods to combat or to prevent the infections, such as the removal and burning of infected plants, disinfestations of working tools, rotation of crops, use of resistant varieties, chemical and biological control. Studies have shown that the expression of AMPs in transgenic plants may be an excellent strategy of defense for plants, providing different degrees of protection against plant pathogens, including bacteria (Montesinos, 2007). Furthermore, production of agricultural containing antimicrobial peptides could represent a new way to assist in the control of plant diseases.

The gram-negative bacteria here used for antimicrobial activity tests of the peptide fractions (Fig. 3) correspond to microbial genera that cause serious diseases in plants, with significant losses in crops. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* causes bacterial speck in tomato, while *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* cause soft rots of numerous fleshy fruits, vegetable and ornamental plants (Agrios, 2005), and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* could cause common bacterial blight (Mohan and Mohan, 1983). The ability to control some of the bacterial growth, as observed for the different extracts that inhibit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* growth, indicating that promises extracts were isolated in this work, to be evaluated for new applications as a natural component for plant defense, to be used for instance in the tomato crop.

The high resistance demonstrated by these peptides, after the contact with adverse conditions, either by simple contact with acetonitrile and TFA or by boiling during two hours, could correspond to a starting point for studies aiming to the biotechnological application of those molecules in the agribusiness. Some isolated peptide fractions (10 to 18, Fig. 2) presented a significant antibacterial activity, feature that makes the AMPs special candidates for the development of commercial defense agents (Fig. 3). Previous results obtained by our research team showed the occurrence of antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum*, when fractions partially purified from extracts of SGS48 were submitted to a SDS-Tricine-PAGE, followed by an *in situ* antimicrobial assay. In these assays, gel was overlaid with the culture medium inoculated with the bacterium, and inhibition circles were observed around the peptide bands in the gel (data not shown). Interestingly, and corroborating

with the shown results, the antibacterial activity was only observed in the line of the gel where the extracts were submitted to denaturant conditions by contact with SDS and beta-mercaptoethanol, confirming the resistance of the antimicrobial peptide molecules that are present in this extract. It should yet be noted that this antibacterial activity, under the analyzed conditions, was only detected in the line where the extract contacted the adverse conditions, suggesting that the denaturation process (at least in part) is necessary for the development of antimicrobial activity of these molecules.

Thus, the presented results allow our team to propose that these detected antimicrobial fractions, containing the resistant antimicrobial activity, should be extensively studied with a view to future applications in the development of products for defense in agribusiness. Among possible commercial applications of this knowledge, it could be mentioned the control of plant pathogens growth inside the greenhouses (for hydroponic or soil cultivations), either for the control of fungus growth in commercial seeds, or to avoid the microbial contamination of post-harvest agricultural products in the order allow the long term storage of fruits and vegetables, and also for the microbial topic control in wounds of domestic animals, among many other applications in agribusiness. Besides these possible applications in bacterial infection control as formulated products, the knowledge of the basis of the defense mechanisms by which these plants respond to attacks by pathogens is a fundamental step towards the development of suitable control methods, as well as towards the understanding of the interactions between host and pathogens (Carvalho et al., 2001). Broadly, the identification of AMPs, and the evaluation of the potential application of these antimicrobial activities against plant pathogens, including bacteria, fungi and nematodes, enables the use of these peptide fractions, partial or totally purified, as natural defense compounds to be used in agribusiness as well as for plant protection by means of genetically modified plants.

### **Acknowledgments**

Authors thank to the Brazilian agencies FAPEMIG, CNPq, FINEP, and CAPES by the financial support.

## 5.2.6. References

- Agrios, G.N. (2005). Plant diseases caused by prokaryotes: bacteria and mollicutes. (In G.N. Agrios Plant Pathology (pp.615-704), 5th ed. San Diego: Academic Press.
- Almeida, H. O., Mattos, E. C., Barbosa, M. O., Teixeira, F. R., Magalhães, R. D. M., Romeiro, R. S., et al. (2007). Peptide fraction inhibiting plant pathogen growth in cell wall extracts from young plants or in soluble cell fraction from expanded leaves from eggplants. *Journal of Phytopathology*, 155, 735–737.
- Almeida, H. O., Teixeira, F. R., Romeiro, R. S., Silva, D. J. H., Pereira, P. R. G., Fontes, E. P. B., et al. (2008). Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de folhas de berinjela no controle do crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Summa Phytopathologica*, 34, 62-64.
- Almeida, M. S., Cabral, K. M. S., Zingali, R. B., & Kurtenbach, E. (2000). Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 378, 278-286.
- Carvalho, A. O., Machado, O. L. T., Cunha, M. D., Santos, I. S., & Gomes, V. M. (2001). Antimicrobial peptides and immunocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 137-146.
- Castro, M. S., Gerhardt, I. R., Piero-Puccid, S. O., & Bloch Jr. C. (2003). Purification and characterization of a small (7,3 kDa) putative lipid transfer protein from maize seeds. *Journal of Chromatography B*, 794, 109–114
- Castro, M. S., & Fontes, W. (2005). Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein & Peptide Letters*, 12, 13–18.
- Cots, J., & Widmer, F. (1999). Germination, senescence and pathogenic attack in soybean (*Glycine max.* L.): identification of the cytosolic aconitase participating in the glyoxylate cycle. *Plant Science*, 149, 95–104.
- De Mejia, E. & De Lumen, B. O. (2006). Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic diseases. *Sexuality, Reproduction and Menopause*, 4(2), 91-95.
- Egorov, T. A., Odintsova, T. I., Pukhalsky, V. A., & Grishin, E. V. (2005). Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides* 26, 2064–2073.
- Farrokhi, N., Whitelegge, J. P., Brusslan, J. A. (2008). Plant peptides and peptidomics. *Plant Biotechnology Journal*, 6, 105-134.
- Fogaça, A. C., Lorenzini, D. M., Kaku, L. M., Esteves, E., Bulet, P., & Daffre S. (2004). Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Developmental & Comparative Immunology*, 28, 191–200.

- García-Olmedo, F., Palenzuela, R. P., & Molina A. (2001). Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Letters*, 498, 219–222.
- Gerhardt, P. (1994). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington, USA, American Society for Microbiology.
- Gepts, P., Beavis, W. D., Brummer, E. C., Shoemaker, R. C., Stalker, H. T., Weeden, N.F., et al. (2005). Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology* 137, 1228-1235.
- Heukeshov, J., Dermick, R., & Radola BJ (1986) (ed) In: Electrophoreses – Forum’86, (pp 22-27).
- Judd, R. C. (1994). Electrophoresis of peptides. (In: Walker J. M. (ed.), *Methods in Molecular Biology, Basic Protein and Peptide Protocols*, pp. 49–57, v. 32, Totowa: Humana Press Inc).
- Kuo, Y. H., Pascale, R., Lambein, F., Frias, J., & Vidal-Valverde C. (2004). Effects of different germination conditions on the contents of free protein and non-protein amino acids of commercial legumes *Food Chemistry* 86, 537–545.
- Lay, F. T., & Anderson, M. A. (2005). Defensins - Components of the innate immune system in plants. *Current Protein & Peptide Science*, 6, 85–101.
- Lindorj-Larsen, K., & Winther, J. R. (2001). Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS Letters*, 488, 145-148.
- Liu, Y. J., Samuel, D., Lin, C. H., & Lyu, P. C. (2002). Purification and characterization of a novel 7-kDa non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294, 535–540.
- Marcos, J. F., Muñoz, A., Pérez-Paía, E., Misra, S., & López-García, B. (2008). Identification and Rational Design of Novel Antimicrobial Peptides for Plant Protection. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 273–301.
- Meyer, T. S. & Lamberts, B. L. (1965). Use of coomassie brilliant blue R 250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochimica et Biophysica Acta*. 107, 144-145.
- Mohan, S. T., & Mohan, S. K. (1983). Novas linhagens do feijoeiro resistentes ao cretamento bacteriano comum. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 18, 1117-1120.
- Molina, A., Segura, A., & Garcia-Olmedo, F. (1993). Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Letters*, 316, 119–122.

- Montesinos E. (2007). Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiology Letters*, 270, 1–11.
- Pelegriani, P. B., Murad, A. M., Silva, L. P., Santos, R. C. P., Costa, F. T., Tagliari, P. D., et al. (2008). Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria. *Peptides*, 29, 1271 – 1279.
- Romeiro, R. S. (2007). Controle Biológico de enfermidades de plantas: procedimentos. Viçosa, Editora UFV, pp. 95-100.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 15, 76-85.
- Teixeira, F. R., Lima, M. C. O., Almeida, H. O., Romeiro, R. S., Silva, D. J. H., Pereira, P. R. G., et al. (2006). Bioprospection of cationic and anionic antimicrobial peptides from bell pepper leaves for inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. *Journal of Phytopathology*, 154, 418–421.
- Terras, F. R. G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W., Kester, A., et al. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell* 7, 573-588.
- Yang, X., Yuan, X., & Pei, Y. (2007). Expression of a novel small antimicrobial protein from the seeds of motherwort (*Leonurus japonicus*) confers disease resistance in tobacco. *Applied and Environmental Microbiology*, 3, 939–946.
- Zhang, W., Becker, D., & Cheng, Q. (2006a). A mini-review of recent W.O. patents (2004-2005) of novel anti-fungal compounds in the field of anti-infective drug targets. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 1, 225-30.
- Zhang K., McKinlay C., Hocart C. H., & Djordjevic M. A. (2006b). The *Medicago truncatula* small protein proteome and peptidome. *Journal of Proteome Research*, 5, 3355–3367.
- Zaslhoff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395.

## 6. CAPÍTULO 3

### IDENTIFICAÇÃO DE DEFENSINA DE SOJA EM BANCO DE DADOS E CLONAGEM PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *Pichia pastoris*

#### 6.1. Resumo

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) representam uma estratégia de defesa ubíqua, rápida e econômica para os organismos. Diversas defensinas já foram isoladas de sementes de várias espécies de mono e dicotiledôneas. Na segunda metade da década de 90, foi observado que a família de defensinas de plantas apresentava composição aminoacídica e atividade biológica bastante diversificadas. Os AMPs estão presentes em baixas concentrações na célula e, para sua caracterização, a expressão heteróloga vem sendo desenvolvida. Assim, utilizando ferramentas de bioinformática, este trabalho teve como objetivo identificar em banco de dados (NCBI), seqüências similares à defensinas em soja, para a clonagem e expressor em *Pichia pastoris*, visando posterior caracterização bioquímica, estrutural, da atividade antimicrobiana. Utilizando uma seqüência de defensina previamente identificada, foram realizadas buscas em banco de dados. Para a etapa de clonagem, o RNA total de cotilédones foi extraído, seguindo-se a confecção de cDNA e a clonagem em *Escherichia coli*. O plasmídeo de expressão obtido, contendo a defensina (pPIC 9), foi linearizado e utilizado para a transformação de *Pichia pastoris*. Um transformante His<sup>+</sup> foi utilizado para a avaliação da expressão da defensina recombinante e SDS-Tricine-PAGE para a verificação da expressão. Embora tenha sido identificada uma seqüência codificadora para uma possível defensina de soja, a qual foi clonada em *P. pastoris*, não foi possível até o momento identificar a presença da defensina em gel por SDS-Tricine-PAGE. Este resultado sugere que a defensina pode não ter sido expressa ou expressa em baixa concentração. Vale ressaltar que foi selecionada apenas uma colônia para a indução da expressão da defensina, e que novas tentativas de expressão da defensina serão realizadas. A utilização de ferramentas de bioinformática para a identificação de seqüências de AMPs em bancos de dados se mostra promissora, uma vez que poderá possibilitar a clonagem e a expressão de AMPs ainda não caracterizados.

## 6.2. Introdução, revisão de literatura e objetivos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) representam uma estratégia de defesa antiga e muito difundida, podem ser prontamente sintetizados de uma maneira flexível e com um consumo mínimo de energia e de biomassa, em função do seu tamanho pequeno (Broekaert et al., 1995). Os AMPs são considerados de grande importância na defesa das plantas à infecção, e fazem parte tanto da barreira constitutiva como da resposta induzida. Os AMPs podem ser produzidos pela transcrição e tradução de um único gene, e/ou ativados por proteólise a partir de proteínas específicas, podendo ser sintetizados rapidamente após uma infecção e exibir atividade diferencial contra diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e envelopes viróticos (Thevissen et al., 1996; Borregaard et al., 2000; Thomma et al.; 2001).

Evidências sugerem a participação ativa de AMPs na defesa de plantas sendo que a super-expressão de alguns peptídeos promove aumento na tolerância das plantas a patógenos. Ainda, patógenos mutantes sensíveis-aos-peptídeos apresentam virulência significativamente menor nos tecidos das plantas em que os peptídeos estão presentes (García-Olmedo et al., 1998). Avaliando-se a diversidade de AMPs de origem vegetal e sua função de defesa na planta, vários aspectos devem ser considerados: a atividade antimicrobiana *in vitro*, a distribuição do peptídeo, a concentração do peptídeo no plasma antes e após a infecção, a expressão gênica e as correlações entre nível de expressão, o controle de sintomas ou diferenças de resistência dos patógenos aos peptídeos em relação à virulência. Um progresso considerável tem sido alcançado na identificação de AMPs em plantas com base nestes critérios (García-Olmedo et al., 1998).

Dez famílias de peptídeos antimicrobianos, com massas moleculares variando de 2 a 9 kDa foram identificadas em plantas. Estes peptídeos correspondem a Tioninas, Defensinas, Proteínas de Transferência de Lipídios (LTPs), Peptídeos semelhantes-à-*Heveina*, Peptídeos semelhantes-a-nós, MBP1, IbAMP, Snakinas, Sheferdinas e Peptídeos macrocíclicos (García-Olmedo et al., 1998).

A resposta imune de plantas é considerada como um importante sistema de defesa e é capaz de exibir atividade diferencial contra diferentes tipos de microrganismos (Thomma et al., 2001). Como componentes da resposta inata,

apenas as defensinas, uma das classes de AMPs, são aparentemente conservadas entre as plantas, os invertebrados e os vertebrados. As defensinas foram inicialmente caracterizadas em insetos e mamíferos, e posteriormente em plantas (Broekaert et al., 1995; García-Olmedo et al., 1998). Foram descritas no início da década de 1990, tendo sido isoladas pela primeira vez em grãos de trigo e cevada (Colilla et al., 1990; Mendez et al., 1996), denominadas inicialmente como  $\gamma$ -tioninas por apresentarem tamanho de 5 kDa e quatro ligações dissulfeto, assim como as  $\alpha$ - e  $\beta$ -tioninas (Broekaert et al., 1995). Análises posteriores da estrutura demonstraram, contudo, que  $\gamma$ -tioninas não estavam relacionadas às tioninas (Bruix et al., 1993). Devido à sua similaridade com a estrutura de defensinas de mamíferos e insetos,  $\gamma$ -tioninas foram renomeadas como defensinas (Terras et al., 1995).

Diversas defensinas já foram isoladas de sementes de várias espécies de mono e dicotiledôneas (Terras et al., 1993; Osborn et al., 1995, Almeida et al., 2001, Egorov et al., 2004). As defensinas de plantas possuem de 45 a 54 resíduos de aminoácidos, com clara e limitada conservação na sua seqüência (Broekaert et al., 1995). Esses peptídeos apresentam um padrão de estrutura tridimensional complexo estabilizado por cisteínas, possuem quatro ligações dissulfeto e são enovelados de forma globular, predominando estruturas folhas  $\beta$  antiparalelas e uma  $\alpha$ -hélice em paralelo às folhas  $\beta$  (Bruix et al., 1993; Thevissen et al., 1996; Almeida et al., 2002). A estrutura tridimensional das defensinas de plantas assemelha-se muito à estrutura de defensinas de insetos, exceto que estas últimas não possuem o domínio folha  $\beta$ -amino terminal que está presente nas defensinas de plantas (Broekaert et al., 1995; Segura et al., 1998). Esta numerosa classe envolve peptídeos diferindo no comprimento, número de cisteínas ou padrão de enovelamento (Boman, 1995). Estes peptídeos podem desenvolver outras atividades como o estímulo ao reparo de ferimentos (Borregaard et al., 2000).

Na segunda metade da década de 90, foi observado que a família de defensinas de plantas apresentava uma composição aminoacídica e atividade biológica bastante diversificada. Com base na seqüência e na correlação de atividades biológicas, as defensinas foram agrupadas em dois grupos (25% de similaridade) e estes foram subdivididos em 4 grupos (cada grupo com até 45% de similaridade entre si) (Harrinson et al., 1997). Desde então, um grande número de defensinas têm sido deduzidas com base na seqüência de DNA, apesar da limitada conservação de

seqüência, restrita basicamente a 8 cisteínas, com grande importância estrutural (Thomma et al., 2002). Utilizando o algoritmo Clustal-W para alinhamento múltiplo de seqüências, mais de 80 defensinas, de diferentes plantas foram identificadas. Com base nessas informações, foi construída uma árvore filogenética, que evidenciou os dois grandes grupos das defensinas, como mencionado. Entretanto, para os subgrupos, essa informação não foi tão clara. Em função das seqüências pouco conservadas, a contribuição da árvore filogenética é limitada. Por exemplo, as defensinas de rabanete se apresentam bem agrupadas, o que sugere recente diversificação, enquanto que, para defensinas de *Arabidopsis thaliana*, este fato não ocorre, pois os 13 possíveis genes de defensinas identificados nesta espécie se encontram distribuídos em toda árvore filogenética (Harrison et al., 1997). As possíveis seqüências protéicas de defensinas de *A. thaliana*, quando contrastadas com as informações da árvore filogenética, foram classificadas em duas famílias. A primeira família foi composta de sete peptídeos (PDF1.1 a 1.5), com alta similaridade para cinco membros. A segunda família é composta por cinco peptídeos (PDF2.1 a 2.6), que mostraram maiores variações nas seqüências aminoacídicas. Estudos prévios utilizando cinco genes de defensinas de *A. thaliana* (PDF1.1, 1.2, 2.1, 2.2 e 2.3) evidenciaram padrões de expressão órgão-específicos distintos. Enquanto um gene (PDF1.2) é induzido em folhas após ataque de patógenos, os outros genes são expressos constitutivamente. Estas informações sugerem que peptídeos individuais podem ser expressos em circunstâncias ou em locais específicos, bem como constitutivamente (Thomma et al., 2002).

Com a identificação de diferentes classes estruturais de AMPs, incluindo-se as defensinas, em diversos tipos de organismos, cresce o otimismo de que alguns destes compostos possam ser empregados em terapias de humanos (Ganz e Lehrer, 1999). Broekaert et al. (1997) sugerem que as defensinas vegetais possam desempenhar função importante na proteção de tecidos de plantas durante o estágio inicial de emergência, o que contribui fortemente para o aumento das taxas de sobrevivência das plantas após a germinação. As novas classes de fungicidas em desenvolvimento incluem os produtos naturais, como os AMPs. Vale ressaltar em especial a família das defensinas que, em geral, apresenta amplo espectro de ação, atua em baixas concentrações e em geral não tóxicas para células de mamíferos (Terras et al., 1992; 1993; 1995; Moreno et al., 1994; Osborn et al., 1995).

Um maior conhecimento sobre o conjunto dos AMPs permitirá a identificação dos seus genes e o estudo de seus mecanismos de ação, o que poderá auxiliar os programas de manipulação gênica (Knight et al., 1997). Entretanto, os AMPs, em geral, estão presentes em pequenas concentrações nos organismos o que dificulta diversos ensaios de atividade antimicrobiana (fungos, bactérias, vírus, nematóides etc.), caracterizações bioquímicas, estruturais. Assim, a expressão heteróloga tem se mostrado eficiente na produção de material para a caracterização destes peptídeos.

A expressão em bactérias geralmente é o preferido, já que possuem crescimento muito mais rápido e são de fácil manipulação. Entretanto, geralmente apresentam problemas ao expressar proteínas muito grandes (formação de corpos de inclusão), proteínas tóxicas, além de não realizarem modificações pós-traducionais. Recentemente, novos vetores de expressão para AMPs, novos *tags* para facilitar a expressão de proteína na fração solúvel, vêm sendo desenvolvidas e utilizadas (Cipakova et al., 2004; Pazgier e Lubkowski, 2006; Peti e Page, 2006; Guerreiro et al., 2008), visando superar as limitações do sistema.

As leveduras por sua vez, apesar de crescerem mais lentamente, vêm sendo utilizadas com maior frequência para expressão de AMPs e de outras proteínas como as de membranas, já que estas possuem mecanismos que possibilitam a expressão da molécula em sua forma ativa e com modificações pós-traducionais. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um excelente modelo, mas para a expressão heteróloga de proteínas tem sua utilização limitada por diferentes aspectos, entre eles a baixa capacidade secretória, a hiperglicosilação de proteínas e o baixo rendimento de biomassa (Jin et al., 2006; Jahic et al., 2006).

Nos últimos anos, a levedura *Pichia pastoris* tem sido utilizada como um excelente sistema para a expressão, visando suprir limitações de expressão em *E. coli* e *S. cerevisiae*, além do potencial de síntese de diferentes proteínas em grande escala. O sistema de expressão em *P. pastoris* inclui vantagens uma vez que possui um forte promotor indutível (AOX1) o qual pode ser utilizado para a expressão controlada dos genes heterólogos. Este promotor possui alta regulação e é reprimido no meio de cultura contendo glicerol e é induzido em presença de metanol como única fonte de carbono. *P. pastoris* pode ser cultivada até alta densidade celular com maior rendimento de biomassa, não é considerada fermentadora, é relativamente insensível à limitação de oxigênio, tem uma boa capacidade de secreção de proteínas, pode ser cultivada em meio de sais minerais simples e secreta poucas proteínas endógenas, o

que simplifica a recuperação e a purificação da proteína expressa. Além disso, *P. pastoris* pode expressar proteínas em níveis elevados nos meios intra ou extracelulares, realizar modificações pós-traducionais específicas dos eucariotos, tais como glicosilação, ligações de enxofre, processamento proteolítico e enovelamento correto (Jin et al. 2006).

Em estudos de bioprospecção, os AMPs vêm sendo identificados e seqüenciados por espectrometria de massa e seqüenciamento automático. Com a disponibilidade de seqüências de DNA (genomas completos e seqüências ESTs) postadas em bancos de dados, surgiu uma nova alternativa na identificação de novos AMPs. Assim, utilizando ferramentas de bioinformática, este trabalho teve como objetivo identificar em banco de dados (NCBI) seqüência similar à de defensina em soja, para clonar e expressar em *Pichia pastoris* visando posterior caracterização bioquímica, estrutural, atividade antimicrobiana e outras.

### **6.3. Material e Métodos**

O projeto foi executado na Universidade Federal de Viçosa (UFV), nos Laboratórios de Proteômica e de Biologia Molecular de Plantas no BIOAGRO, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular / UFV.

#### **6.3.1. Material vegetal**

Sementes de soja (*Glycine max* [L.] Merr.) da variedade UFV 16 foram cedidas pelo Programa de Melhoramento da Soja / UFV, sob coordenação dos Professores Maurílio A. Moreira/UFV e Everaldo G. de Barros/UFV. Cerca de 40 sementes de soja foram plantadas e os cotilédones, após 18 dias de germinação, foram coletados e armazenados a -80 °C para posterior extração de RNA.

#### **6.3.2. Identificação de seqüências codificadoras de defensinas em banco de dados**

Utilizando a seqüência de DNA de uma defensina de *Arabidopsis thaliana* e uma seqüência protéica de ervilha (*Pisum sativum*) como protótipo, foram realizadas

buscas em bancos de dados disponíveis. Por meio de pesquisa de análises de seqüência, usando o National Center for Biotechnology Information (NCBI) como banco de dados, e programas como Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) e CLUSTAL W, foram obtidas seqüências de DNA e/ou protéicas de defensinas em soja, similares às defensinas de outras espécies vegetais. Uma vez identificadas seqüências com alta similaridade, foram desenhados *primers* complementares às seqüências candidatas.

### **6.3.3. Clonagem do cDNA e expressão funcional do peptídeo purificado**

Esta etapa foi desenvolvida conforme descrito por Almeida et al. (2001), adaptado.

#### **6.3.3.1. Isolamento de RNA total, RT-PCR e clonagem**

O RNA total foi extraído de aproximadamente 100 mg de tecido vegetal (colítédones de soja), em triplicata. O tecido vegetal, previamente macerado em nitrogênio líquido foi homogeneizado com 1 mL do reagente Trizol (conforme especificações do fabricante - Invitrogen). Clorofórmio foi adicionado e a mistura submetida à centrifugação a 12.000 g / 10 min / 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionado de isopropanol na proporção 1,2 : 1 (sobrenadante : isopropanol), respectivamente e deixado a temperatura ambiente por 10 min. Após centrifugação a 12.000 g / 10 min, o RNA precipitado foi lavado com etanol 75% (v/v) e centrifugado a 9.500 g / 10 min. Em seguida, os microtubos contendo os RNAs, foram secos à temperatura ambiente por aproximadamente 10 min e o precipitado ressuspenso em 50 µL de água livre de RNase e estocados a -20°C. A integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% em NBC 1X (Acido bórico 1M, Citrato de Sódio 20 mM, Hidróxido de Sódio 100 mM, pH 7,5), corado com brometo de etídeo 0,1 µg.mL<sup>-1</sup>. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria em espectrofotômetro DU 650 BECKMAN com comprimento de onda de 260 nm, e sua concentração expressa em µg.mL<sup>-1</sup>. A síntese do cDNA cadeia simples foi desenvolvida com o Kit First-Strand cDNA Synthesis usando M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). O cDNA resultante foi amplificado por PCR, utilizando *primers* direto R5'

ATGGAGAAGAAATCAATAGCTGGG3' e reverso  
F5'ACAGTTTTTGGTGCACCAACAGC3'. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador nas condições descritas: desnaturação inicial por 3 min seguida de 35 ciclos de desnaturação da fita dupla a 94 °C/ 30 segundos, anelamento a 50 °C / 20 segundos, extensão a 72 ° C / 30 segundos, encerrando o último ciclo a 72 °C por 5 minutos. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) e corado com brometo de etídeo 0,1 µg.mL<sup>-1</sup>. O fragmento obtido foi purificado utilizando QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), e ligado no vetor pCR2.1 Topo – TA Cloning Kit (Invitrogen). As bactérias *E. coli* DH5α foram transformadas com o vetor contendo o fragmento, por choque térmico, e plaqueadas em LB contendo antibiótico Ampicilina 100 µg.mL<sup>-1</sup>, para a seleção. As colônias transformadas foram crescidas em meio líquido (LB Ampicilina), o vetor foi purificado utilizando o kit QIAprep Miniprep (QIAGEN) e submetido à análise de seqüência de DNA em um seqüenciador automático.

### 6.3.3.2. Construção do plasmídio de expressão

O vetor contendo a defensina foi amplificado com novos *primers* direto R5'CCCCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCIATGGAGAAGAAATCAATAGC TGGG3' e reverso F5'GGGGAATTCCTAACAGTTTTTGGTGCACCAACAGCG3', com sítios de restrição para XhoI e EcoRI e 3 bases adicionais para serem utilizadas como “âncora” na digestão para clonagem direta. As condições para amplificação foram semelhantes à descrita no item 6.3.3.1, modificando apenas a temperatura de anelamento para 58 °C. O produto do PCR obtido foi digerido com as enzimas de restrição (XhoI e EcoRI - Invitrogen) e a defensina foi ligada (em *frame*) ao vetor pPIC9 (previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição), com o sinal de secreção do fator de acasalamento α, e sob o controle do promotor da álcool oxidase. As bactérias *E. coli* DH5α foram transformadas com o vetor de expressão (pPIC9) por choque térmico e plaqueadas em LB contendo antibiótico Ampicilina 100 µg.mL<sup>-1</sup> para seleção. As colônias transformadas foram crescidas em meio líquido (LB Ampicilina) o vetor foi purificado utilizando o QIAprep Miniprep (QIAGEN) e digerido para confirmação da inserção do fragmento. Após a confirmação as

bactérias transformadas com o vetor de expressão foram crescidas em 300 mL de meio líquido (LB AMP100) e o vetor extraído utilizando o Kit MAXprep TIP 500 (QIAGEN) para obtenção de DNA em quantidade adequada para transformação de *P. pastoris*. Após quantificação em gel, o vetor foi linearizado com *SalI* (Promega) para favorecer a integração no locus *his4*. Cerca de 10 µg de DNA linearizado foram utilizados para transformação de *P. pastoris* (cepa KM71), por eletroporação, conforme o “Manual of Methods for Expression of Recombinant Protein in *P. pastoris*”(Invitrogen).

#### **6.3.3.3. Seleção dos transformantes *His*<sup>+</sup> e análise de PCR para avaliação da integração no genoma da *Pichia pastoris***

A seleção dos transformantes *His*<sup>+</sup> foi realizada com o uso de meio seletivo MD (YNB, 1,34%; biotina, 0,00004%; dextrose, 1%; ágar, 1,5%) e 10 colônias *His*<sup>+</sup> foram selecionadas. O DNA genômico de 6 colônias *His*<sup>+</sup> foi extraído e amplificado utilizando *primers* do vetor (pPIC9) e do fragmento (defensina). Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose 0,8% em TAE 1x e corados por brometo de etídeo.

#### **6.3.3.4. Expressão da defensina recombinante**

Uma colônia de *P. pastoris*, após confirmação por PCR foi selecionada e cultivada em 4 mL de meio BMG (fosfato de potássio, 100 mM, pH 6,0; YNB, 1,34%; biotina, 0,00004%; glicerol, 1%) por cerca de 18h a 30°C sob agitação constante. Alíquotas da cultura ativada foram transferidas para 5 erlenmeyers de 2L contendo 600 mL de meio BMG e incubadas por 24h a 30°C, até que a DO (660 nm) atingisse de 2 a 6. O meio foi centrifugado (5000 x g por 10 min) e a massa celular ressuspendida em 300 mL de meio BMM (fosfato de potássio, 100 mM, pH 6,0; YNB, 1,34%; biotina, 0,00004%; metanol 0,5%). As culturas foram suplementadas com 1% de metanol (3mL) a cada 24 h, durante 96h. Alíquotas de 1mL foram retiradas a cada 24h e submetidas a SDS-Tricina PAGE, visando avaliar o melhor tempo para a expressão da defensina .

### **6.3.3.5. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em presença de Tricina (SDS -Tricina-Page)**

A eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE) foi desenvolvida segundo Judd (1994). O gel de separação foi preparado a 16,5% T, em Tris-HCl 1 M, pH 8,9, e 0,1% de SDS. O gel intermediário foi preparado a 10,0% T, em Tris-HCl 1 M, pH 8,9, com 0,1% de SDS. O gel de concentração foi preparado a 5,0% T, em Tris-HCl 0,13 M, pH 6,8. As frações protéicas obtidas durante a purificação foram ressuspensas em tampão de amostra e aquecidas por 10 min em temperatura de ebulição e então aplicadas no gel. Os géis foram preparados em um sistema para eletroforese vertical em mini-géis, modelo MiniProtean III Cell, marca BIORAD. As corridas eletroforéticas se desenvolveram por cerca de 5 h; a 100 V por 15 min (gel de concentração), 80 V por 30 min (gel intermediário) e 60 V (gel de separação) até completar a corrida. Os marcadores de massa molecular utilizados foram os de ampla faixa e de baixa faixa (Bio-Rad). Os géis foram revelados pelo método do Coomassie Brilliant Blue G250.

## **6.4. Resultados e Discussão**

### **6.4.1. Identificação de defensinas em banco de dados**

Por meio de pesquisa e análises de seqüência em banco de dados (NCBI) e programas BLAST e CLUSTAL W, foram obtidas seqüências de defensinas de soja similar a de outras espécies. As pesquisas iniciaram-se utilizando seqüências de defensinas de *A. thaliana* como molde, uma vez que esta planta possui genoma seqüenciado e já foram identificadas várias defensinas. Apesar deste potencial, a identificação de seqüências similares em soja não foi obtida. Utilizando-se uma seqüência protéica de uma defensina de ervilha já descrita (gi|20139322, P81929) (Almeida et al., 2000), foi identificada uma seqüência de DNA em ervilha denominada pI39 e que a partir dessa seqüência foram identificadas seqüências de possíveis defensinas em soja. Chiang e Hadwiger, (1991) descreveram 2 genes em ervilha (pI39 - gi|22208744|emb|X52224.1|[22208744] e pI230) que eram induzidos por *Fusarium solani*. Os genes codificavam proteínas com massas moleculares de 8,2

e 8 kDa, respectivamente. Ambas as proteínas tinham uma seqüência sinal clivada gerando a proteína madura de 5 kDa, um conteúdo de 17% de resíduos cisteína de e o potencial para formar quatro ligações de enxofre. Vale ressaltar que as primeiras defensinas de planta foram descritas no início da década de 90 como  $\gamma$ -tioninas (Colilla et al. 1990; Mendez et al. 1990), sendo classificadas como defensinas por Terras et al. (1995).

As seqüências de DNA de soja similares a pI39 foram traduzidas e o alinhamento de suas seqüências protéicas preditas foi contrastado com defensinas conhecidas pela análise de BLAST X. Pôde-se observar que a seqüência gbIBI321308.1 apresentou similaridade com defensina, entretanto, a seqüência parece não representar o gene completo que codifica para a defensina. Assim a partir destes dados, foi verificado que apenas uma seqüência (gbIBI321179) apresentava alta similaridade com várias defensinas já caracterizadas, sendo esta seqüência selecionada.

O alinhamento de várias seqüências de defensinas obtidas a partir de banco de dados (dedução de seqüência de DNA ou seqüência aminoacídica obtida por espectrometria de massa) mostrou que a seqüência identificada provavelmente é de uma defensina. A análise da seqüência protéica da defensina de soja (gbIBI321179) predita mostra que esta possui 8 cisteínas, como em todas as defensinas descritas. Comparando as seqüências aminoacídicas obtidas por MS (defensina “madura”) e a possível defensina de soja, observou-se a presença adicional de 28 aminoácidos que podem corresponder a um peptídeo sinal, clivado no peptídeo “maduro” (Figura 1). A seqüência selecionada possui 487pb, sua tradução gera uma proteína de 75 aminoácidos (225 pb, frame +2) e com 28 primeiros aminoácidos que podem corresponder a um peptídeo sinal e os 47 aminoácidos finais à defensina “madura” (141pb). Utilizando um programa para a identificação de sítios de restrição (NEBcutter) foram verificados os possíveis sítios de restrição nesta seqüência da defensina de soja, para evitar um clivagem da seqüência durante a clonagem, pelas enzimas de restrição selecionadas (EcoRI e XhoI).

· Alinhamento múltiplo de seqüências protéicas de defensinas (CLUSTAL W (1.83))

Possível sítio de clivagem  
do peptídeo sinal

gi   18146788   dbj   BAB8245.3.1	--MEKKS-LAGLCFLFLVLFVAQEVVVQ--	TEAKTCENLANTYRGPCFT 44
gi   15000365   gb   BI321179.1   BI 32	--MEKKS-IAGLCFLFLVLFVAQEVVVQ--	TEAKTCENLADTYRGPCFT 44
gi   49458097_1-74	--MEKKS-LAALCFLFLVLFVAQEI VV---	TEAKTCENLADTFRGPCFT 43
gi   50659050   gb   AAT80338.1	-----	KTCEENLADTFRGPCFT 16
gi   83776796_1->75	--MAGKS-LITGFCFI LLLLVAQEMVVQ--	SEAATCENLADTYRGPCFT 44
gi   20139322   sp   P81929   PSD1_PEA	-----	KTCEHLADTYRGCFT 16
gi   533692   gb   AAC97524.1	--MSRSVPLVSTICVLLLLLVATEMMGPIMVAEARTCESQSHRFKGPCLS	48
gi   18748   emb   CAA78359.1	MEMRKSC---GFFFLLLLLVFAQQV---VQTEGRVCESSQSHGFHGLCNR	44
		. ** : . : * *
gi   18146788   dbj   BAB8245.3.1	TGSCDDHCKNKEHLRSGRCR--DDFRCWCTRNC	75
gi   15000365   gb   BI321179.1   BI 32	TGSCDDFCRNKEHLLRGRCR--DDFRCWCTKNC	75
gi   49458097_1-74	NGACDDHCKNKEHLVSGRCR--DDFRCWCTRNC	74
gi   50659050   gb   AAT80338.1	DGSCDDHCKNKEHLIKGRCR--DDFRCWCTRNC	47
gi   83776796_1->75	TGSCDDHCKNKEHLLSGRCR--DDFRCWCTRNC	75
gi   20139322   sp   P81929   PSD1_PEA	NASCDDHCKNKAHLISGICH-N-WKCFCTQNC	46
gi   533692   gb   AAC97524.1	DTNCGSVCRT-ERFTGGHCRGFRRRCFCCTKHC	79
gi   18748   emb   CAA78359.1	DHNCALVCRN-EGFSGGRCK-RSRRCFCTR.IC	74
	* * : . : * * : * : * : * : *	

Defensina de soja

Defensina de ervilha

#### 6.4.2. Clonagem do cDNA

A análise dos produtos da reação de PCR (Figura 2) e a digestão do vetor (Figura 3) mostraram a presença de uma banda única de 225 pb e 240 pb, respectivamente, o que está de acordo com o esperado, indicando que deve ser a seqüência de interesse.

#### 6.4.3. Construção do plasmídeo de expressão

Os produtos de PCR amplificados com os *primers* para clonagem direta foram visualizados em gel de agarose, com cerca de 280 pb conforme esperado (Figura 4). Após ligação do fragmento (defensina) e a clonagem no vetor pPIC9 (previamente digerido com enzimas de restrição adequadas) a transformação foi confirmada por digestão e visualizada em gel de agarose (Figura 5).

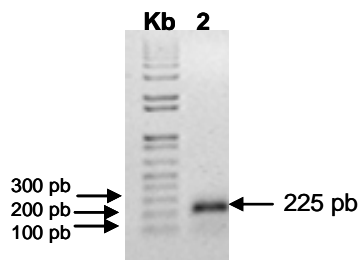


Figura 2. Gel de agarose 1% do cDNA após PCR utilizando *primers* específicos. Canaleta 1 – 1  $\mu$ L de marcador 1 Kb Plus DNA Ladder™ (100 bp to 12 kb -Invitrogen), canaleta 2- 2  $\mu$ L da reação de PCR.

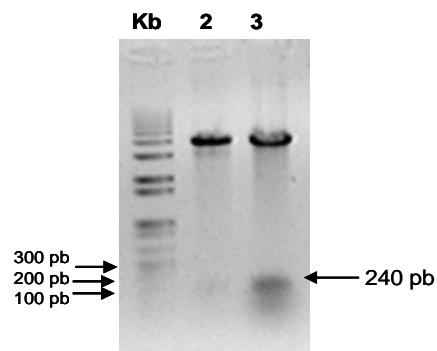


Figura 3. Gel de agarose 1% após clonagem em pCR2.1 TOPO, miniprep e digestão do vetor utilizando a enzima de restrição EcoRI. Canaleta 1 – 1  $\mu$ L de marcador 1 Kb Plus DNA Ladder™ (100 bp to 12 kb -Invitrogen), canaleta 2 e 3 - 20  $\mu$ L do produto da digestão do vetor contendo o fragmento de duas colônias diferentes.

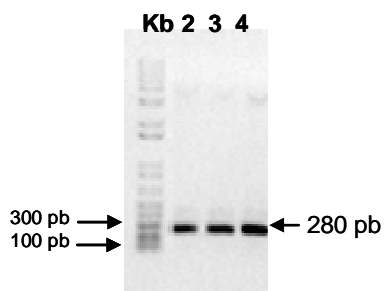


Figura 4. Gel de agarose 1%. Canaleta 1 – 1  $\mu$ L de marcador 1 Kb Plus DNA Ladder™ (100 bp to 12 kb -Invitrogen), canaleta 2 a 4 - 2  $\mu$ L produto de PCR utilizado *primers* específicos com sítios de restrição e ancora para digestão

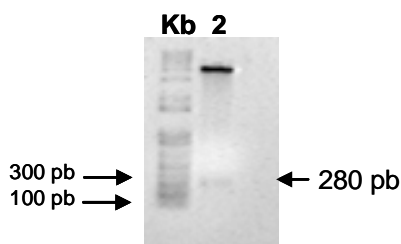


Figura 5. Gel de agarose 1%. Canaleta 1 – 1  $\mu$ L de marcador 1 Kb Plus DNA Ladder™ (100 bp to 12 kb -Invitrogen), canaleta 2 - 20  $\mu$ L produto de digestão do vetor de expressão com XhoI e EcoRI.

#### 6.4.4. Seleção dos transformantes *His*<sup>+</sup> e análise de PCR para avaliação da integração no genoma de *Pichia pastoris*.

Utilizando meio seletivo (MD), 10 colônias foram identificadas e 6 foram selecionadas para a confirmação da clonagem por PCR (DNA genômico). Para avaliar a integração do vetor ao DNA genômico da levedura foi desenvolvida eletroforese em gel de agarose (Figura 6). Houve amplificação para as colônias 1 a 3 para os dois pares de *primers* do vetor (aproximadamente 620 pb = 400 pb + 225 pb da defensina) e da defensina (225 pb defensina). Houve também amplificação para as colônias 4 e 6 após PCR somente para os *primers* da defensina. Os produtos de amplificação de 620 e 225 pb para os *primers* do vetor e da defensina, respectivamente estão de acordo com o esperado. Estes resultados indicaram a inserção do DNA de interesse no genoma da *Pichia pastoris*.

#### 6.4.5. Expressão da defensina recombinante

Após a confirmação da integração do DNA da defensina, a colônia 1 de *P. pastoris* recombinante (canaleta 2- Figura 5), foi selecionada e utilizada para indução da expressão da defensina conforme metodologia descrita anteriormente. Entretanto não foi possível identificar a presença da defensina em gel SDS-Tricine-PAGE. Este resultado sugere a defensina pode não ter sido expressa ou expressa em baixa concentração. Vale ressaltar que foi selecionada apenas uma colônia para indução da expressão da defensina e que novas tentativas de expressão da defensina serão realizadas com as demais colônias que foram confirmadas como positivas,



## 6.7. Referências

- Almeida, M.S.; Cabral, K.M.S.; Zingali, R.B.; Kurtenbach, E. Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* **378** (2): 278-286, 2000.
- Almeida, M.S.; Cabral, K.S.; Medeiros, L.N.; Valente, A.V.; Almeida, F.C.; Kurtenbach, E. cDNA Cloning and Heterologous Expression of Functional Cystein-Rick Antifungal Protein PSD1 in the Yeast *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **395**:15199-207, 2001.
- Almeida, M.S.; Cabral, K.S.; Kurtenbach, E.; Almeida, F.C., Valente, A.V.; Solution structure o *Pisum sativum* defensin1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with diferente mechanisms of action. *J. Mol. Biol.* **315**: 749-757, 2002.
- Boman, H.G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **13**: 61-92, 1995.
- Borregaard, N.; Elsbach, P.; Ganz, T.; Garred, P. Innate immunity: from plants to humans. *Immunology Today*, **21**: 68-70, 2000.
- Broekaert, W.F.; Terras, F.R.G.; Cammue, B.P.A.; Osborn, R.W. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.*, **108**: 1353-1358, 1995.
- Broekaert, W.F.; Cammue, B.P.A.; De Bolle, M.F.C.; Thevissen, K.; De Samblanx, G.W. and Osborn, R.W. Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sc.*, **16**: 297-323, 1997.
- Bruix, M.; Jiménez, M.A.; Santoro, J.; González, C.; Colilla, F.J.; Méndez, E. and Rico, M. Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by <sup>1</sup>H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry*, **132**: 715-724, 1993.
- Chiang, C.C., Hadwiger, L.A. The *Fusarium solani*-induced expression of a pea gene family encoding high cysteine content proteins. *Mol Plant Microbe Interact.* **4**(4):324-31, 1991.
- Cipakova, I.; Hostinova, E.; Gasperik, J.; Velebny, V. High-level expression and purification of a recombinant hBD-1 fused to LMM protein in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purif.* **37**: 207–212, 2004.
- Colilla, F.J., Rocher, A., Mendez, E. gamma-Purothionins:amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett* **270**:191–194, 1990.
- Egorov, T.A.; Odintsova, T.I.; Pukhalsky, V.A.; Grishin, E.V., Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides* **26**: 2064–2073, 2005.

- Ganz, T., Lehrer, R.I. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Molec. Medicine Today*, **5**: 292-297, 1999.
- García-Olmedo, F.; Molina, A.; Alamillo, J.M.; Rodríguez-Palenzuela, P. Plant defense peptides. *Biopolymers*, **47**: 479-491, 1998.
- Guerreiro, C.I.P.D.; Fontes, C.M.G.A.; Gama, M.; Domingues, L. *Escherichia coli* expression and purification of four antimicrobial peptides fused to a family 3 carbohydrate-binding module (CBM) from *Clostridium thermocellum*. *Protein Expression Purif.* **59**: 161–168, 2008.
- Harrinson, S.J.; Marcus, J.P.; Gouter, K.C.; Green, J.L.; Maclean, D.J.; Manners, J.M. An antimicrobial peptide from the Australian native *Hardenbergia violacea* provides the first functionally characterised member of a subfamily of plant defensins *Aust. J. Plant Physiol.* **24**: 571-578, 1997.
- Jahic, M.; Veide, A.; Charoenrat, T.; Teeri, T.; Enfors, S.O. Process Technology for Production and Recovery of Heterologous Proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Prog.* **22**: 1465-1473, 2006.
- Jin, F.; Xu, X.; Zhang, W.; Gu, D. Expression of recombinant hybrid peptide cecropinA(1–8)– magainin2(1–12) in *Pichia pastoris*: Purification and characterization. *Protein Expression Purification* **50**: 147–156, 2006.
- Judd, R. C., Electrophoresis of peptides. In: *Methods in Molecular Biology, vol. 32: Basic Protein and Peptide Protocols*, Ed. J. M. Walker Copyright, Humana Press Inc, Totowa, NJ, 1994. P. 49-57.
- Knight, S.C.; Anthony, V.M.; Brady, A.M.; Greenland, A.J.; Heaney, S.P.; Murray, D.C.; Powell, K.A.; Schulz, M.A.; Spinks, C.A.; Worthington, P.A. and Youle, D. Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **35**: 349-372, 1997.
- Mendez, E.; Rocher, A.; Calero, M.; Girbes, T.; Citores, L.; Soriano, F. Primary structure of omega-hordothionin, a member of a novel family of thionins from barley endosperm, and its inhibition of protein synthesis in eukaryotic and prokaryotic cellfree systems. *Eur J Biochem* **239**:67–73, 1996.
- Moreno, M.; Segura, A. and García-Olmedo, F. Pseudothionin, a potato peptide active against potato pathogens. *Eur. J. Biochem.*, **223**: 135-139, 1994.
- Osborn, R.W.; De Samblanx, G.W.; Thevissen, K.; Goderis, I.; Torrekens, S.; Leuven, F.V.; Attenborough, S.; Rees, S.B. and Broekaert, W.F. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Hippocastanaceae* and *Saxifragaceae*. *FEBS Lett*, **368**: 257-262, 1995.
- Pazgier, M.; Lubkowski, J. Expression and purification of recombinant human - defensins in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif.* **49**: 1–8, 2006.

- Peti, W.; Page, H.R. Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expression Purification* xxx (2006) xxx-xxx
- Segura, A.; Moreno, M.; Molina, A. and García-Olmedo, F. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Lett*, **435**:159-162, 1998.
- Terras, F.R.G.; Schoofs, H.M.E.; De Bolle, M.F.C.; Leuven, F.V.; Rees, S.B.; Vanderleyden, J.; Cammue, B.P.A. and Broekaert, W.F. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.*, **267**: 15301-15309, 1992.
- Terras, F.R.G.; Torrekens, S.; Leuven, F.V.; Osborn, R.W.; Vanderleyden, J.; Cammue, P.A. and Broekaert, W.F. A new family of basic cysteine-rich plant antifungal protein from Brassicaceae species. *FEBS Lett.*, **316**: 233-240, 1993.
- Terras, F.R.G.; Eggermont, K.; Kovaleva, V.; Raikhel, N.V.; Osborn, R.W.; Kester, A.; Rees, S.B.; Torrekens, S.; Leuven, F.V.; Vanderleyden, J.; Cammue, P.A. and Broekaert, W.F. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense *Plant Cell.*, **7**: 573-588, 1995.
- Thevissen, K.; Ghazi, A.; De Samblanx, G.W.; Brownlee, C.; Osborn, R.W. & Broekaert, W.F. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.*, **271**: 15018-15025, 1996.
- Thomma, B.P.H.J., Penninckx, I.A.; Broekaert, W.F, Cammue, P.A.; The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.* **13**: 63-68, 2001.
- Thomma, B.P.H.J.; Cammue, B.P.A.; Thevissen, K. Plant defensins. *Panta* **216**: 193-202, 2002.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

As ferramentas peptidômicas utilizadas para o estudo dos peptídeos diferencialmente sintetizados em sementes de soja não germinadas (SSNG) e germinadas por 48 h (SSG48) se mostraram adequadas, pois evidenciaram a presença de massas moleculares (MM) na faixa descrita para peptídeos antimicrobianos de plantas (cerca de 2 a 9 kDa), e frações enriquecidas em peptídeos apresentaram atividade contra cinco bactérias fitopatogênicas analisadas por ensaios de microplacas. Assim, confirmou-se a síntese ou a expressão diferencial de peptídeos entre os dois estados fisiológicos dessas sementes. O material biológico escolhido como fonte de peptídeos para o estudo visando aplicação biotecnológica mostra-se promissor para a exploração biotecnológica de peptídeos de interesse comercial. Peptídeos antimicrobianos altamente resistentes ao aquecimento (ebulição por duas horas) e ao contato com acetonitrila e TFA foram detectados, e reafirmou-se que o intenso metabolismo de sementes em germinação ocasiona a síntese diferencial de proteínas e peptídeos em relação às sementes não germinadas, possivelmente envolvidos na defesa dos tecidos. A germinação como situação fisiológica é de grande interesse para a identificação de peptídeos relacionados à defesa, podendo ser considerado como “o peptidoma da defesa durante a germinação de soja”.

Para o ajuste do processo de purificação para a recuperação de amostras peptídicas enriquecidas e com potencial de exploração comercial, a cromatografia líquida bidimensional (TDLC), por exclusão molecular (CEM) seguida por fase reversa (RP), se mostrou adequadas. As altas atividades antibacterianas contra importantes bactérias fitopatogênicas (quando comparadas com o controle da curva de crescimento), apresentadas por frações peptídicas resistentes a condições adversas, indicaram que a metodologia permitiu o isolamento de frações peptídicas para realizar ensaios funcionais, o que é desejável para proposta de peptidômica funcional, que é o objetivo desse trabalho.

O protocolo aqui utilizado para o isolamento de peptídeos antimicrobianos altamente resistente poderá servir como método de base para estudos diversos em peptidômica da defesa de plantas, e essas frações apresentam importantes características biotecnológicas as serem exploradas para o controle de bacterioses vegetais. Assim, essas frações enriquecidas em peptídeos ou os peptídeos purificados

poderiam ser utilizados como medida de prevenção do ataque bacteriano no pós-colheita, aumentando a vida de prateleira de hortaliças, na proteção de sementes contra ataques microbianos, dentre tantas aplicações no agronegócio. Esses resultados poderiam também possibilitar a expressão heteróloga de algumas formas peptídicas, e a metodologia acima descrita utilizada para a purificação do peptídeo em questão, ou para expressão em plantas.

A proposta de identificação de uma possível defensina em banco de dados, e sua clonagem para a expressão em modelo heterólogo, também teve sua metodologia ajustada com sucesso. As análises em Banco de Dados do GenBank permitiu identificar e clonar uma provável defensina de soja. Essa metodologia poderá ser utilizada a partir de amostras diversas postadas em bancos de dados, permitindo a escolha de um material vegetal de interesse como agente de defesa de plantas.

## **8. PERSPECTIVAS**

- Dar ênfase aos estudos da fração enriquecida em peptídeos que apresentou-se resistente a condições adversas, visando um conhecimento que permita avaliar a possibilidade de sua aplicação como princípio ativo para agentes de defesa diversos;

- Isolar peptídeos antimicrobianos e identificar e caracterizar por meio de técnicas peptidômicas, incluindo-se espectrometria de massa e seqüenciamento de peptídeos;

- Obter diversas frações enriquecidas em peptídeos em quantidades preparativas, visando ensaios antimicrobianos, estruturais, toxicológicos e outros para a caracterização de peptídeos de interesse comercial;

- Realizar ensaios in vivo com peptídeos potencialmente ativos na defesa de plantas, visando determinar o potencial biológico contra fitopatógenos de interesse comercial;

- Dar continuidade aos trabalhos de clonagem e expressão de defensinas de soja, pois trata-se de uma classe caracterizada como de interesse para uso biotecnológico.