

BIOMEDICINA

IDENTIFICAÇÃO DE DEFENSINAS PUTATIVAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA* EM BANCOS DE DADOS

IDENTIFICATION OF PUTATIVE DEFENSINS
OF *ARABIDOPSIS THALIANA* IN DATABASES



SIMPÓSIO DE TCC

SIMPÓSIO DE TRABALHOS DE CONCLUSÃO DE CURSO

SEMINÁRIO DE IC

SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

NEILA BATISTA DAMACENO
ÁLLAN PIRES
OCTÁVIO LUIZ FRANCO
JACQUELINE COIMBRA

Resumo

Infecções fúngicas causadas por cepas resistentes tem dificultado o tratamento por meio dos agentes antifúngicos convencionais. Os peptídeos antimicrobianos (PAM's), em especial as defensinas de plantas (CS α β defensinas), emergem como moléculas em potencial para o desenvolvimento de fármacos contra essas micoses. Devido ao crescente número de informações dispostos nos bancos de dados após a era genômica e ao aparecimento de ferramentas computacionais, tornou-se possível a identificação de defensinas utilizando metodologias como busca por expressão regular (REGEX). Neste trabalho foi utilizado REGEX em sequências não caracterizadas no proteoma da *Arabidopsis thaliana*. Três sequências não caracterizadas foram identificadas, sendo as mesmas definidas por A0MJU5, A7REG2 e A7REG4, e avaliadas estruturalmente através de modelagem e dinâmica molecular. Os resultados mostraram que as três estruturas são estabilizadas por quatro pontes dissulfeto e possuem estrutura de CS α β defensinas. Nenhuma das sequências possui a assinatura GXC ou CXG característica no loop que forma o γ -core, o qual pode ser associado à atividade antimicrobiana. Entretanto as sequências A7REG2 e A7REG4 foram preditas como antimicrobianas, embora testes *in vitro* seriam necessários para a validação da predição.

Palavras-Chave: peptídeos antimicrobianos; CS α β defensinas; predição estrutural; expressão regular; *Arabidopsis thaliana*.

Abstract

Fungal infections caused by resistant strains have complicated the treatment by means of conventional antifungal agents. The antimicrobial peptides (AMP's), in particular plant defensins (CS α β defensins), emerge as potential molecules for developing drugs against these mycoses. Due to the increasing of information in the sequence databases after the post-genomic era and the emergence of computational tools, it became possible to identify defensins using computational approaches, such as search by regular expression (REGEX). In this work REGEX was used in uncharacterized sequences in the *Arabidopsis thaliana* proteome. Three uncharacterized sequences were identified, A0MJU5, A7REG2 and A7REG4, and structurally evaluated through modeling and molecular dynamics. The results showed that the three structures are stabilized by four disulfide bridges and have CS α β defensins structure. Nevertheless none of the sequences have signatures GXC or CXG characteristic in the γ -core loop, which is commonly associated with antimicrobial activity. However, the sequences A7REG2 and A7REG4 were predicted as antimicrobial, although *in vitro* tests would be needed to validate the prediction.

Keywords: Antimicrobial Peptides; CS α β defensins; Structural Prediction; Regular Expression; *Arabidopsis thaliana*.

INTRODUÇÃO

Cerca de 50% das espécies conhecidas de fungos podem desenvolver patologias em humanos¹. Apesar disso, a maioria dessas espécies apresenta hábito oportunista, infectando somente pacientes imunodeprimidos, representando alto risco em ambientes hospitalares². No Brasil, por exemplo, cerca de 5 a 15% dos pacientes em unidades de terapia intensiva contraem algum tipo de infecção fúngica durante o período de internação³.

O fato de algumas cepas apresentarem resistência a uma série de agentes antimicrobianos pode ser outro agravante, pois a resistência dificulta o tratamento e aumenta os custos de internação^{4,5}. Esta resistência, em parte, se deve a vasta utilização dos agentes antifúngicos tanto por prescrições inadequadas, quanto pelo uso sem prescrição médica⁶. Dentre os mecanismos de resistência presentes em fungos podem ser citadas as modificações de enzimas alvo seja pela alteração da enzima, diminuindo a afinidade pela droga, ou superprodução das mesmas, como a lanosterol 14 α -desmetilase e C-5 esterol, as quais participam da biossíntese do ergosterol⁷; bem como o desenvolvimento de bombas de efluxo, diminuindo a concentração da droga na célula alvo⁴.

Devido à dificuldade de tratamento de

infecções causadas por microrganismos resistentes aos agentes antifúngicos convencionais, a descoberta e desenvolvimento de novas moléculas antimicrobianas são necessárias. Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAM's) revelam-se como uma alternativa no controle de infecções, podendo ser promissores contra microrganismos resistentes⁸. Naturalmente, essas moléculas participam da primeira linha de defesa do hospedeiro, estando presentes em vários organismos, como plantas, animais e os próprios fungos⁹, e possuem amplo espectro de atividade⁸.

Dentre os peptídeos antimicrobianos envolvidos na resposta antifúngica as CS α β -defensinas de plantas são uma das classes com maior potencial para o desenvolvimento de fármacos, pois além da atividade antifúngica, são biodegradáveis e, por serem estabilizadas por pontes dissulfeto, resistem a variações de ambiente como temperatura. As defensinas NaD1 e RsAFP2, por exemplo, demonstraram eficácia em testes *in vitro* e *in vivo* contra *Candida albicans*^{10,11,12}. CS α β defensinas são peptídeos de 50-60 resíduos de aminoácidos que apresentam uma α -hélice e uma folha β formada por duas ou três β -fitas¹³ interligadas por dois motivos conservados adicionais incluindo o α -core, que consiste em um *loop* que liga a primeira fita β à α -

hélice, e o γ -core, que consiste em um *loop* em gancho que liga a segunda e a terceira fita- β ^{14,15}. O γ -core está presente não apenas em CS $\alpha\beta$ defensinas, mas em outras classes de peptídeos estabilizados por pontes dissulfeto como heveínas¹⁶, ciclótides¹⁷ e kinotinas¹⁸. Atualmente, as CS $\alpha\beta$ defensinas podem ser divididas em três

subclasses incluindo: (i) defensinas de invertebrados, *ancient invertebrate-type defensins* (AITD's); (ii) defensinas de insetos, *classical insect-type defensins* (CITD's); e (iii) defensinas de plantas/insetos, *plant/insect-type defensins* (PITD's)^{19,20}. As classes e suas características estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição das características estruturais das diferentes subclasses de CS $\alpha\beta$ defensinas.

Classe	Padrão de Pontes	Característica Estrutural	Referência
Defensinas de invertebrados (<i>Ancient invertebrate-type defensins</i> - AITD's)	Cys ¹ -Cys ⁴ , Cys ² -Cys ⁵ e Cys ³ -Cys ⁶	Estrutura caracterizada por um <i>loop</i> curto no N-terminal e formação $\alpha\beta\beta$.	21
Defensinas de insetos (<i>Classical insect-type defensins</i> - CITD's)	Cys ¹ -Cys ⁴ , Cys ² -Cys ⁵ e Cys ³ -Cys ⁶	Estrutura caracterizada por um <i>loop</i> longo no N-terminal com formação $\alpha\beta\beta$.	22
Defensinas de plantas/insetos (<i>Plant/insect-type defensins</i> - PITD's)	Cys ¹ -Cys ⁸ , Cys ² -Cys ⁵ , Cys ³ -Cys ⁶ e Cys ⁴ -Cys ⁷ ou Cys ¹ -Cys ¹⁰ , Cys ² -Cys ⁵ , Cys ³ -Cys ⁷ , Cys ⁴ -Cys ⁸ e Cys ⁶ -Cys ⁹ em defensinas de <i>Petunia hybrida</i>	Estrutura caracterizada pela formação de uma fita β adicional no N-terminal com formação $\beta\alpha\beta\beta$.	23, 24

No que tange a identificação de novas defensinas, a maioria dos relatos baseia-se na utilização de extratos naturais, que são purificados para obtenção da proteína alvo, seguido da análise por espectrometria de massa²⁵. Entretanto, o processo de purificação demanda tempo e ainda se limita a poucas proteínas alvo^{26,27}. Por outro lado, na era pós-genômica, uma grande quantidade de dados biológicos encontra-se depositada em bancos de dados públicos, disponibilizando sequências de todas as funções celulares essenciais, incluindo defesa contra patógenos²⁸. Alguns trabalhos têm evidenciado a possibilidade de identificação de defensinas por meio de sequências dispostas nos bancos de dados^{29,30}. Em 2008, por exemplo, Zhu²⁰ identificou CS $\alpha\beta$ defensinas de fungos por meio de expressões regulares (REGEX), localizando motivos conservados nas sequências. De forma semelhante, Porto e colaboradores utilizaram REGEX para identificação de sequências não anotadas presentes no proteoma do inseto *Mayetiola destructor*²⁸.

Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo a identificação de defensinas não caracterizadas de *Arabidopsis thaliana*, organismo modelo de estudos em plantas, utilizando ferramentas computacionais para buscas em bancos de dados.

Material e Métodos

Busca por expressão regular e análise das sequências

O sistema de busca está descrito na Figura 1. Inicialmente foi obtido o proteoma de *A. thaliana* no banco de proteínas UniProt (*Universal Protein Resource* - //http://www.uniprot.org/proteomes).

Nesse grupo de sequências, foi realizada uma busca por meio da expressão regular: CX₂₋₁₈CX₃CX₂₋₁₀[GAPSIDERYW]X₁CX₄₋₁₇CXC, onde em cada posição os aminoácidos são representados por seu código de uma letra; "X" representa um coringa, que indica qualquer aminoácido proteínogênico naquela posição; e os colchetes indicam uma região ambígua, onde apenas um daqueles aminoácidos entre os colchetes pode ocupar aquela posição, elaborada por Zhu²⁰. Das sequências resultantes, foram selecionados todos os peptídeos com: 130 resíduos de aminoácidos ou menos e ausência de validação funcional. Foram consideradas sem validação sequências com as anotações: *hypothetical*, *uncharacterized*, *unnamed* e *unknown*. Do grupo remanescente foram retiradas todas as sequências fracionadas, sem peptídeo sinal (PS) ou com regiões transmembranares (TM). As predições de presença de peptídeo sinal e regiões transmembranares foram feitas pelo Phobius (<http://phobius.sbc.su.se>³¹). As sequências restantes foram avaliadas quanto a presença de domínios conservados através dos programas InterPro Scan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>³²) e CDD (*Conserved Domains Database*; www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd) e quanto à similaridade com proteínas de estrutura resolvida depositadas no *Protein Data Bank* (PDB; www.rcsb.org/pdb). Para tal foi utilizada a ferramenta BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov³³) utilizando o PDB como banco. Sequências com identidade maior que 30% foram descartadas³⁴. Todas as etapas descritas foram realizadas por meio de *scripts* em PERL.

Modelagem Molecular

A seleção dos moldes estruturais foi realizada utilizando o servidor HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>³⁵) baseando-se no alinhamento gerado pelo servidor. Em seguida os peptídeos foram modelados através do MODELLER 9.16³⁶. Foram construídos 100 modelos para cada sequência, sendo o melhor modelo selecionado pelo DOPE (*Discrete Optimized Protein Structure*) score que indica o modelo mais aceitável. Os modelos selecionados foram ainda avaliados pelo Prosa II³⁷, que analisa a qualidade do modelo comparando-o com proteínas presentes no PDB; e PROCHECK³⁸, que avalia a qualidade estereoquímica através do mapa de Ramachandran. A visualização dos modelos foi feita pelo PyMOL (www.pymol.org).

Dinâmica Molecular

As simulações de dinâmica molecular foram conduzidas pelo software GROMACS 4, utilizando o campo de força GROMOS96 43A1³⁹. Cada estrutura foi imersa em uma caixa cúbica de água, com distância de 8 Å para os limites da caixa. A caixa foi preenchida com o modelo de água *single point charge*⁴⁰. Íons cloro foram adicionados aos sistemas para neutralizar as cargas positivas dos peptídeos. A geometria das moléculas de água foi forçada através do algoritmo SETTLE⁴¹, as ligações atômicas foram feitas através do algoritmo LINCS⁴², e as correlações eletrostáticas foram calculadas pelo algoritmo *Particle Mesh Ewald*⁴³, com um limiar de 1,4 nm para minimizar o tempo computacional. O mesmo limiar foi aplicado para interações de van der Waals. O algoritmo de *steepest descent* foi aplicado para minimizar a energia do sistema por 50.000 passos. Após a minimização de energia, a temperatura (conjunto NVT) e a pressão (conjunto NPT) do sistema foram normalizadas para 300 K e 1 bar, respectivamente, por 100 ps cada. A simulação completa do sistema foi feita por 300 ns utilizando o algoritmo *leap-frog* como integrador.

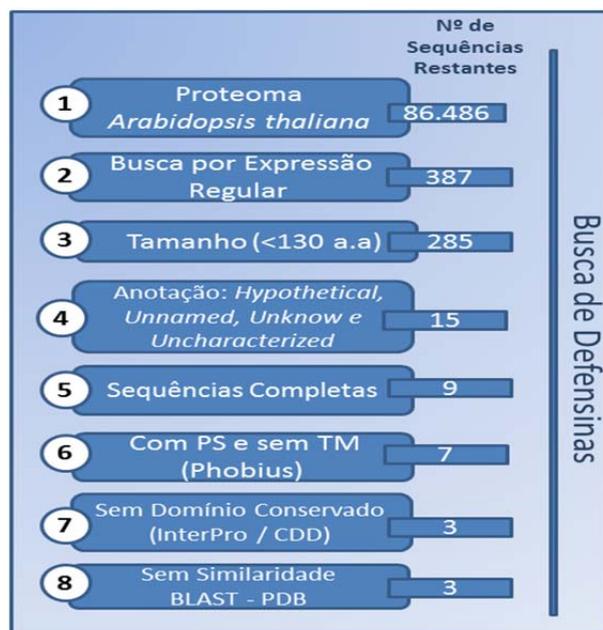


Figura 1. Fluxograma da metodologia aplicada para a busca de defensinas. O número de sequências resultante está descrito ao lado da etapa respectiva.

Análise das Simulações de Dinâmica Molecular

As simulações foram avaliadas quanto ao desvio de raiz quadrada média (RMSD), e flutuação média da raiz quadrada por resíduo (RMSF) dos peptídeos ao longo da simulação por meio das ferramentas *g_rms* e *g_rmsf* do pacote GROMACS, respectivamente. Os cálculos de RMSD foram feitos em relação à estrutura inicial a 0 ns de simulação. Os peptídeos também foram avaliados quanto à conservação estrutural por meio do DSSP 2.0, utilizando a ferramenta *do_dssp* do GROMACS.

Predição da atividade antimicrobiana

As sequências foram submetidas à predição de atividade antimicrobiana em dois programas: *Collection of Antimicrobial Peptides* (CAMP) (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/index.php>;⁴⁴) o qual é dividido em quatro algoritmos: *Support Vector Machine* (SVM), *Randon Forest* (RF), e *Discriminat Analysis* (DA); e CS-AMPPred, para peptídeos estabilizados por pontes dissulfeto⁴⁵. Utilizando os parâmetros padrões.

Resultados

Identificação de Defensinas

Diversas sequências resultantes de anotações automáticas e sem anotação funcional estão presentes nos bancos de dados de sequências biológicas, deste modo, podem ser uma fonte de defensinas não caracterizadas. A partir de 86.486 sequências presentes no proteoma da *A. thaliana* (passo 1, Figura 1) foi feita busca por REGEX obtendo-se 387 sequências (passo 2, Figura 1). Destas, 285 possuíam até 130 resíduos de aminoácidos (passo 3, Figura 1). Dentre 285 sequências, um *script* em PERL foi utilizado para selecionar aquelas com as anotações: *hypothetical*, *unknow*, *unnamed* e *uncharacterized* (passo 4, Figura 1), restando um total de 15 sequências, sendo que seis foram incompletas e foram retiradas (passo 5, Figura 1). Das nove sequências restantes, as que não apresentavam PS ou continham domínios TM foram excluídas (passo 6, Figura 1). As sequências que exibiam domínio conservado (passo 7, Figura 1) e ainda aquelas com >30% de identidade com proteínas resolvidas presentes no PDB (passo 8, Figura 1) também foram excluídas, chegando a um número final de três sequências descritas na Figura 2.

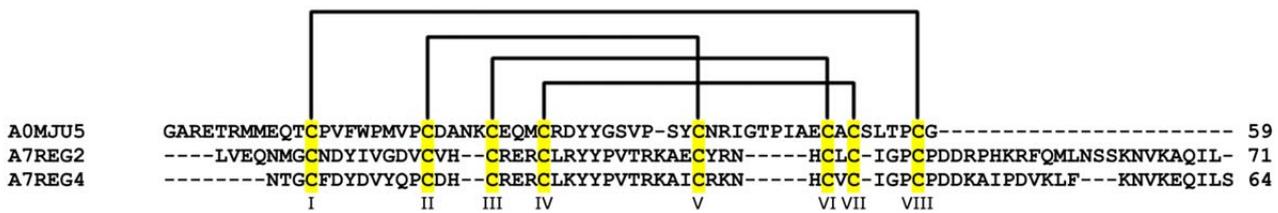


Figura 2. Alinhamento das seqüências maduras de defensinas obtidas ao final da busca automática. Sequências com ID no UniProt: A0MJU5, A7REG2 e A7REG4. As cisteínas estão destacadas em amarelo e as linhas acima do alinhamento indicam o padrão de pontes entre as mesmas. Os números ao final do alinhamento indicam o tamanho das seqüências maduras. Nenhuma das seqüências apresenta o γ -core característico GXCX₃₋₉C, entre as cisteínas IV e VI.

Modelagem Molecular

A escolha dos moldes para cada seqüência

foi feita com base na cobertura entre o molde e a seqüência alvo. Os modelos selecionados foram avaliados quanto a sua qualidade através dos softwares ProSA II e PROCHECK. Ambos os três modelos foram considerados de boa qualidade, apresentando 90% dos resíduos ou mais nas regiões favoráveis e permitidas e o Z-score equivalente a estruturas resolvidas por NMR do PDB (Tabela 2).

Tabela 2. Sumário de avaliação da qualidade dos modelos

ID no UniProt	ID do molde no PDB	Dope Score	Prosa II Z-score	Mapa de Ramachandran (%)		
				Regiões Favoráveis	Regiões Permitidas	Regiões Proibidas
A7REG4	2KPY	-4332,84	-4.33	91,8%	6,5%	1,6%
A7REG2	2KSK	-4451,89	-2.91	88,4%	5,8%	5,8%
A0MJU5	1B3C	-4616,94	-5.14	87,7%	8,8%	3,5%

As estruturas das seqüências A0MJU5 e A7REG2 apresentaram a formação $\beta\alpha\beta\beta$, comum a defensinas de plantas (PITD's), enquanto a estrutura da seqüência A7REG4 não apresentou a primeira fita β , sendo composta apenas pela α -hélice interligada a segunda e terceira fitas β . Porém, todas as seqüências contêm as quatro pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura, possuindo como padrão as ligações entre Cys¹-Cys⁸, Cys²-Cys⁵, Cys³-Cys⁶ e Cys⁴-Cys⁷ (Figura 3).

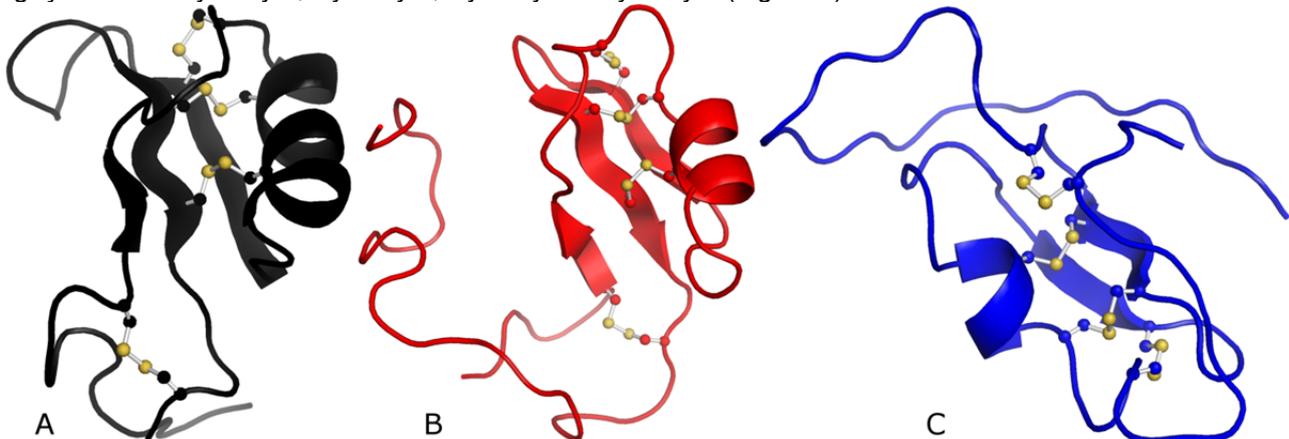


Figura 3. Modelos moleculares tridimensionais das seqüências (A) A0MJU5, (B) A7REG2 e (C) A7REG4. As pontes dissulfeto foram destacadas em esferas e varetas.

Dinâmica Molecular

Os modelos gerados foram então submetidos a simulações de dinâmica molecular de 300 ns. O RMSD indicou uma variação em até 8 Å para as estruturas de A7REG4 e A7REG2, e 7,5 Å para a estrutura A0MJU5. O RMSF mostrou uma variação de até 4 Å entre os resíduos 12-50 das estruturas. As maiores variações se deram no N-terminal e C-terminal. Na estrutura A7REG4 os resíduos do C-terminal chegaram a uma variação de 8 Å, na estrutura A7REG2 a variação foi de 5 Å tanto para os resíduos do N-terminal, quanto do

C-terminal, a estrutura A0MJU5 foi a que mais variou, chegando a 8 Å as variações dos resíduos do N-terminal e C-terminal (Figura 4). Provavelmente essa movimentação dos terminais possa ter ocasionado a elevação do RMSD. A análise do DSSP mostrou que o motivo CS $\alpha\beta$ se manteve estável nas três seqüências durante toda a simulação de dinâmica molecular, apenas a seqüência A7REG2 teve alteração em relação à estrutura inicial, formando três β -fitas adicionais no C-terminal ao final da simulação (Figura 5).

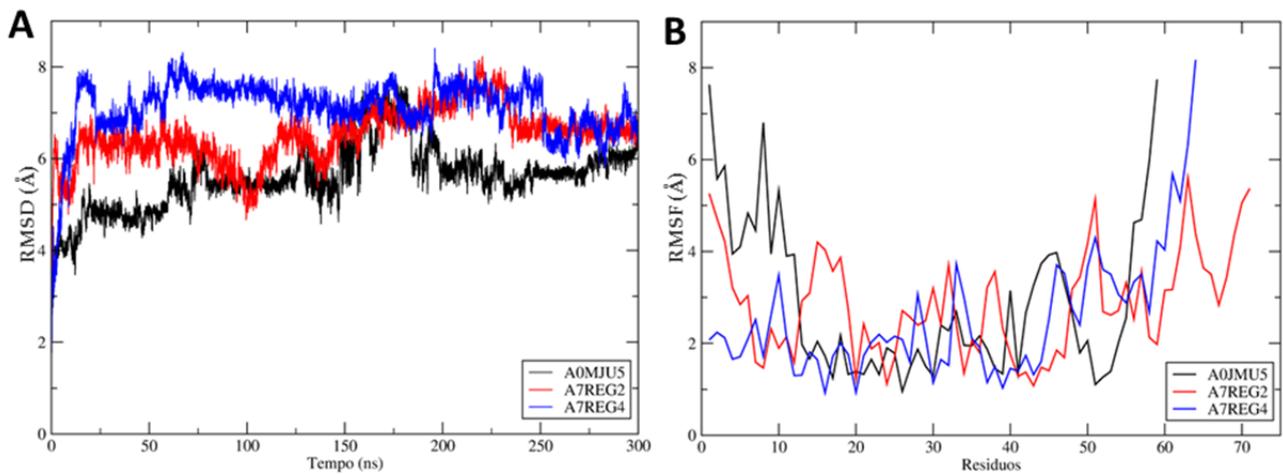


Figura 4. Avaliação da dinâmica molecular das estruturas teóricas de A0MJU5, A7REG2 e A7REG4. (A) Desvio da raiz quadrada média (RMSD), mostrando a variação média das posições das cadeias principais dos aminoácidos no decorrer do tempo, e **(B)** Flutuação média da raiz quadrada por resíduo (RMSF), mostrando as variações das posições de cada resíduo de aminoácido durante a dinâmica.

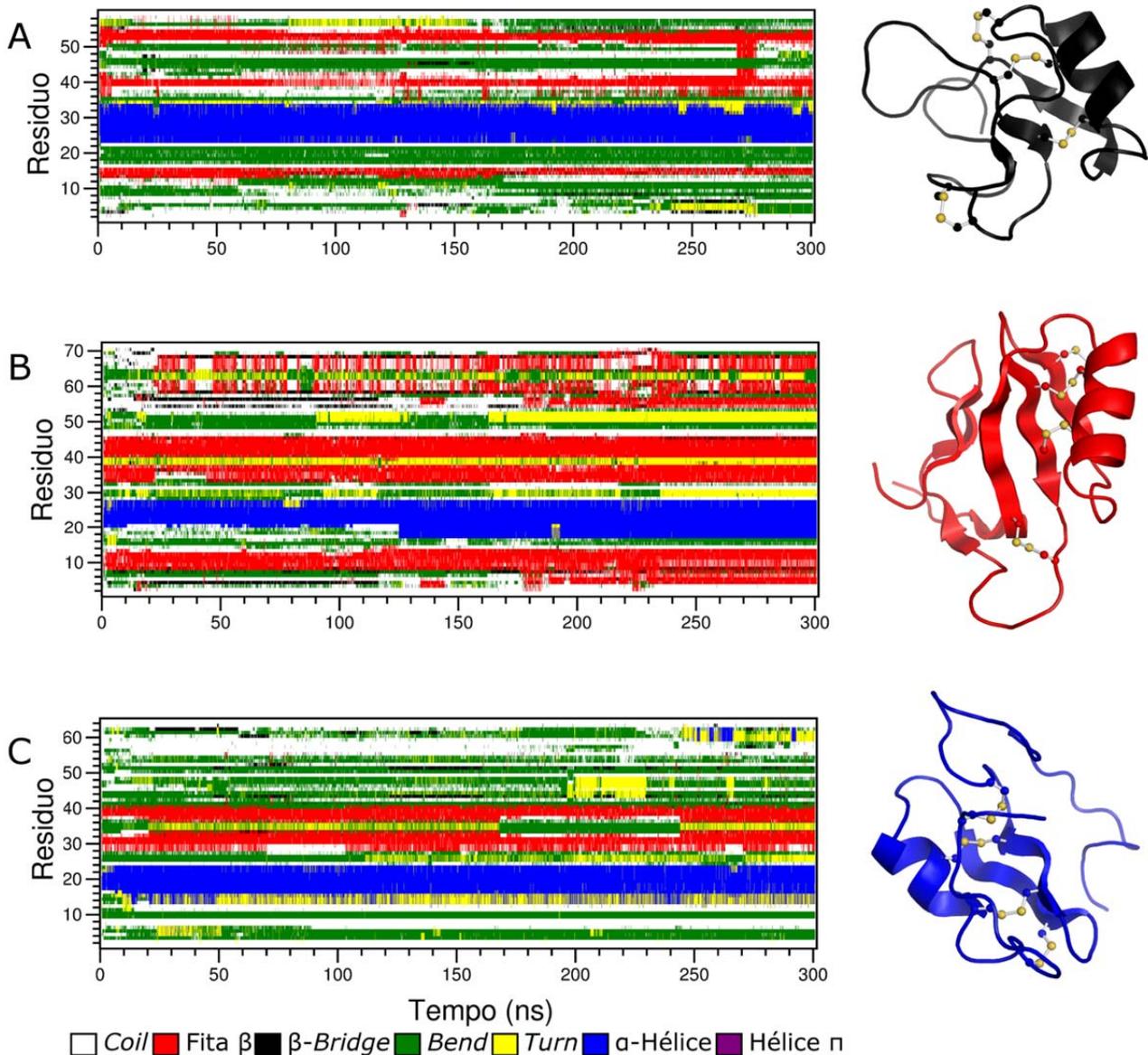


Figura 5. Análises dos gráficos de evolução da estrutura secundária (DSSP) e modelos tridimensionais das sequências (A) A0MJU5, (B) A7REG2 e (C) A7REG4 após a dinâmica molecular. Pontes dissulfeto foram representadas em esferas e varetas.

Predição da Atividade Antimicrobiana

Ao final de todas as etapas, as sequências foram submetidas à predição de atividade antimicrobiana em dois preditores diferentes (CAMP e CS-AMPPred). As sequências A7REG2 e A7REG4 foram preditas como PAMs pelos dois

programas utilizados, pois provavelmente possuem características físico químicas semelhantes às de PAM's. Entretanto a sequência A0MJU5 não foi predita como PAM em nenhum dos dois programas (Tabela 3).

Tabela 3. Sumário da predição antimicrobiana das estruturas.

Sequência	CAMP						CS-AMPPred	
	SVM		RF		DA		Score	Predição
	Score	Predição	Score	Predição	Score	Predição		
A0MJU5	0,138	Não PAM	0,364	Não PAM	0,204	Não PAM	-0,547	Não PAM
A7REG2	0,777	PAM	0,302	Não PAM	0,618	PAM	-0,011	PAM
A7REG4	0,754	PAM	0,69	PAM	0,973	PAM	-0,004	PAM

Discussão

Defensinas de plantas são caracterizadas por possuírem uma folha β composta por três fitas β , interligadas a uma α -hélice, estabilizadas por quatro ou cinco pontes dissulfeto (Tabela 1). Neste trabalho, essas características foram utilizadas para a identificação de defensinas em sequências anotadas como *hypothetical*, *uncharacterized*, *unnamed* e *unknown* no proteoma da *A. thaliana*, a qual foi escolhida por ser organismo modelo, o que faz com que a quantidade de dados genômicos e proteômicos dessa espécie seja maior em comparação a outras espécies de plantas.

O tamanho de até 130 resíduos de aminoácidos foi usado como critério, pois no geral, peptídeos antimicrobianos possuem até 100 resíduos de aminoácidos em sua cadeia madura⁴⁶. A primeira parte da sequência foi composta pelo peptídeo sinal, que possui aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos, o qual pode ser responsável pelo endereçamento da defensina ao retículo endoplasmático e após, ao meio extracelular⁴⁷, (Figura 1). Após a exclusão das sequências sem peptídeo sinal, as sequências remanescentes foram submetidas à análise quanto a presença de domínio conservado, isso porque proteínas são agrupadas conforme o domínio que apresentam, CS $\alpha\beta$ defensinas fazem parte das γ -tioninas⁴⁸. Logo, a presença do domínio conservado indicaria qual a provável estrutura da sequência, deste modo, a sequência não estaria completamente descrita (Figura 1).

Ao final do processo de busca, três sequências obedeciam a todos os parâmetros: A0MJU5, A7REG2 e A7REG4, contendo 59, 71 e 64 resíduos de aminoácidos em sua cadeia madura, respectivamente (Figura 2). Metodologias semelhantes foram utilizadas por Porto, o qual encontrou uma nova defensina de *Mayetiola destructor* (*MdesDEF-2*) em meio a doze sequências classificadas como *hypotetica*²⁸; e por Zhu, na identificação de 25 novas defensinas a partir de 18 genes de 25 espécies

de fungos²⁰. Todas as sequências encontradas neste trabalho são estabilizadas por quatro pontes dissulfeto com padrão de ligação idêntico ao padrão de PITD's (Tabela 1). Todos os moldes escolhidos para as três sequências possuíam formação estrutural $\beta\alpha\beta\beta$. As sequências A0MJU5 e A7REG2 apresentaram estrutura de PITD's, com uma α -hélice ligada paralelamente a três fitas β (Figura 3). As estruturas de A7REG2 e A7REG4 possuíam ainda, uma região formada por um grande loop no C-terminal: ⁴⁶PCPDDRPHKRFQMLNSSKNVKAQILS⁷¹ e ⁴⁴PDDKAIPDVKLFKNVKEQILS⁶⁴, respectivamente (Figura 2). Essas regiões não foram consideradas pró-domínio, pois de acordo com Lay & Anderson⁴⁹, o pró-domínio do C-terminal apresenta carga negativa, não correspondendo a carga das regiões em questão. Além disso, defensina Sd5 de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) também apresenta um loop no C-terminal⁵⁰.

Para avaliar a flexibilidade, movimento e formação de estrutura secundária dos modelos, foi feita a dinâmica molecular com 300 ns. O gráfico do RMSF (Figura 4B) mostra que os resíduos no N-terminal e C-terminal são os que sofrem maior variação, geralmente, esses terminais são compostos por *loops*, os quais ficam livres na estrutura e deste modo, sofrem maior movimentação que os motivos compactos dentro da estrutura. Essas variações no RMSF podem ser as responsáveis pelas variações acima de 4 Å no RMSD (Figura 4A), como mostrado por Porto²⁸. Entretanto, mesmo com grandes variações no RMSD, os gráficos da evolução da estrutura secundária (DSSP) (Figura 5), mostraram que as estruturas A0MJU5 e A7REG4 (Figura 5, A e C) se mantiveram no decorrer da simulação, não havendo ganho ou perda de estrutura. Apenas a sequência A7REG2 apresentou ganho de estrutura no C-terminal, onde anteriormente formava um *loop* (Figura 5B).

Em relação à atividade antimicrobiana, apenas a estrutura A0MJU5 não foi predita como

PAM (Tabela 3). Nenhuma das três sequências possui o γ -core em nenhuma de suas formas, seja ela dextromérica ou levomérica¹⁴. O motivo GXC presente nas sequências está entre as cisteínas VII e VIII (Figura 2), normalmente, este motivo que faz parte do γ -core se encontra entre as cisteínas IV e VI, compondo o *loop* que liga a segunda fita β com a terceira^{51,52}.

Conclusão

Neste trabalho, ferramentas computacionais foram utilizadas para a identificação de novas defensinas de *A. thaliana*. Essa metodologia reforça o fato de que os bancos de dados podem ser a fonte para encontrar defensinas não caracterizadas, mesmo em organismos estudados extensamente como tem sido o caso da *A. thaliana*. Duas das três sequências encontradas aqui, apesar de não conterem o γ -core, foram preditas com atividade antimicrobiana, predição que pode ser validada por meio de testes *in vitro*. Caso o resultado dos testes sejam positivos, essas moléculas tornam-se promissoras para o desenvolvimento de fármacos antifúngicos.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, que em sua infinita bondade, permitiu que tudo isso acontecesse. À grande Luciana Ramalho por ter feito a ponte, acreditando sempre que eu conseguiria caminhar por ela; à Zonate Almeida por me ajudar a sustentar a ponte, mesmo quando parecia que tudo iria desmoronar; e ao William Farias Porto pela honestidade, companheirismo e dedicação durante toda a travessia.

Referências

1. MADIGAN, Michael T. *et al.* **Microbiologia de brock**. Artmed Editora, 2009.
2. PAULA, Claudete Rodrigues *et al.* Infecção hospitalar fúngica: experiência em hospitais públicos de São Paulo. **Prática hospitalar**, v. 52, p. 63-6, 2007.
3. VIDIGAL, Pedrina Gonçalves; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet. Leveduras nos tratos urinário e respiratório: infecção fúngica ou não?. **J. bras. patol. med. lab.**, v. 45, n. 1, p. 55-64, 2009.
4. KANAFANI, Zeina A.; PERFECT, John R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120-128, 2008.
5. MACHADO, A. *et al.* Prevenção da infecção hospitalar. **Projeto Diretrizes: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, 2001.
6. WANNMACHER, Lenita. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004.
7. SANGLARD, Dominique *et al.* Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 241-253, 1998.
8. PUSHANATHAN, Muthurulan; GUNASEKARAN, Paramasamy; RAJENDHRAN, Jeyaprakash. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. **International journal of peptides**, v. 2013, 2013.

9. PORTO, William F. *et al.* Screening and Functional Prediction of Conserved Hypothetical Proteins from *Escherichia coli*. **Journal of Proteomics & Bioinformatics**, v. 2014, 2014.
10. AERTS, An M. *et al.* The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. **FEBS letters**, v. 583, n. 15, p. 2513-2516, 2009.
11. HAYES, Brigitte ME *et al.* Identification and mechanism of action of the plant defensin NaD1 as a new member of the antifungal drug arsenal against *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3667-3675, 2013.
12. TAVARES, Patricia M. *et al.* In vitro activity of the antifungal plant defensin RsAFP2 against *Candida* isolates and its in vivo efficacy in prophylactic murine models of candidiasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 12, p. 4522-4525, 2008.
13. LACERDA, Ariane F. *et al.* Antifungal defensins and their role in plant defense. **Frontiers in microbiology**, v. 5, 2014.
14. YOUNT, Nannette Y.; YEAMAN, Michael R. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 19, p. 7363-7368, 2004.
15. YOUNT, Nannette Y. *et al.* The γ -core motif correlates with antimicrobial activity in cysteine-containing kaliocin-1 originating from transferrins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 11, p. 2862-2872, 2007.
16. PORTO, William F. *et al.* In silico identification of novel hevein-like peptide precursors. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 127-136, 2012.
17. PORTO, William F. *et al.* High-performance computational analysis and peptide screening from databases of cyclotides from poaceae. **Peptide Science**, 2015.
18. CAMMUE, B. P. *et al.* Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 4, p. 2228-2233, 1992.
19. DIMARCO, Jean-Luc *et al.* Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. **Peptide Science**, v. 47, n. 6, p. 465-477, 1998.
20. ZHU, Shunyi. Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CS $\alpha\beta$ defensins. **Molecular immunology**, v. 45, n. 3, p. 828-838, 2008.
21. GUEGUEN, Yannick *et al.* Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas* Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 1, p. 313-323, 2006.
22. NYGAARD, Mads Kristian Erlin *et al.* The insect defensin lucifensin from *Lucilia sericata*. **Journal of biomolecular NMR**, v. 52, n. 3, p. 277-282, 2012.
23. VRIENS, Kim *et al.* The radish defensins RsAFP1 and RsAFP2 act synergistically with caspofungin against *Candida albicans* biofilms. **Peptides**, v. 75, p. 71-79, 2016.
24. JANSSEN, Bert JC *et al.* Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. **Biochemistry**, v. 42, n. 27, p. 8214-8222, 2003.
25. ALMEIDA, Hebréia Oliveira. **Identificação de peptídeos antimicrobianos de folhas de berinjela para o controle de patógenos de plantas**. 2007. Tese

de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

26. PELEGRINI, Patricia B. *et al.* Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria. **peptides**, v. 29, n. 8, p. 1271-1279, 2008.
27. MANDAL, Santi M. *et al.* Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water. **Peptides**, v. 30, n. 4, p. 633-637, 2009.
28. PORTO, William F.; FENSTERSEIFER, Guilherme M.; FRANCO, Octavio L. In silico identification, structural characterization, and phylogenetic analysis of MdesDEF-2: a novel defensin from the Hessian fly, *Mayetiola destructor*. **Journal of molecular modeling**, v. 20, n. 7, p. 1-8, 2014.
29. ZHU, S.; GAO, B.; TYTGAT, Jan. Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the CS α superfamily. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 62, n. 19-20, p. 2257-2269, 2005.
30. SILVERSTEIN, Kevin AT *et al.* Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. **The Plant Journal**, v. 51, n. 2, p. 262-280, 2007.
31. KÄLL, Lukas; KROGH, Anders; SONNHAMMER, Erik LL. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl 2, p. W429-W432, 2007.
32. QUEVILLON, Emmanuel *et al.* InterProScan: protein domains identifier. **Nucleic acids research**, v. 33, n. suppl 2, p. W116-W120, 2005.
33. ALTSCHUL, Stephen F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
34. TOMCZAK, Aurelie *et al.* 3D profile-based approach to proteome-wide discovery of novel human chemokines. **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. e36151, 2012.
35. SÖDING, Johannes; BIEGERT, Andreas; LUPAS, Andrei N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic acids research**, v. 33, n. suppl 2, p. W244-W248, 2005.
36. ESWAR, N. *et al.* Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Protein Sci**, 2007.
37. WIEDERSTEIN, Markus; SIPPL, Manfred J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl 2, p. W407-W410, 2007.
38. LASKOWSKI, Roman A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of applied crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.
39. HESS, Berk *et al.* GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Journal of chemical theory and computation**, v. 4, n. 3, p. 435-447, 2008.
40. BERENDSEN, Herman JC *et al.* Interaction models for water in relation to protein hydration. In: **Intermolecular forces**. Springer Netherlands, 1981. p. 331-342.
41. MIYAMOTO, Shuichi; KOLLMAN, Peter A. SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of computational chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952-962, 1992.
42. HESS, Berk *et al.* LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of computational chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463-1472, 1997.
43. DARDEN, Tom; YORK, Darrin; PEDERSEN, Lee. Particle mesh Ewald: An N² log (N) method for Ewald sums in large systems. **The Journal of chemical physics**, v. 98, n. 12, p. 10089-10092, 1993.
44. WAGHU, Faiza Hanif *et al.* CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. **Nucleic acids research**, p. gkv1051, 2015.
45. PORTO, William F.; PIRES, Allan S.; FRANCO, Octavio L. CS-AMPPred: an updated SVM model for antimicrobial activity prediction in cysteine-stabilized peptides. **PLoS one**, v. 7, n. 12, p. e51444, 2012.
46. YOUNT, Nannette Y.; YEAMAN, Michael R. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1277, n. 1, p. 127-138, 2013.
47. NELSON, David L.; COX, Michel M. Princípios de bioquímica de Lehninger. In: **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Artmed, 2011.
48. CÂNDIDO, E. S. *et al.* Structural and functional insights into plant bactericidal peptides. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Formatex**, p. 951-960, 2011.
49. LAY, F. T.; ANDERSON, M. A. Defensin-components of the innate immune system in plants. **Current Protein and Peptide Science**, v. 6, n. 1, p. 85-101, 2005.
50. DE PAULA, Viviane Silva *et al.* Portrayal of complex dynamic properties of sugarcane defensin 5 by NMR: multiple motions associated with membrane interaction. **Structure**, v. 19, n. 1, p. 26-36, 2011.
51. DE CONINCK, Barbara; CAMMUE, Bruno PA; THEVISSSEN, Karin. Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 109-120, 2013.
52. YOUNT, Nannette Y.; YEAMAN, Michael R. Structural congruence among membrane-active host defense polypeptides of diverse phylogeny. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1373-1386, 2006.