



## Produção da defensina recombinante de *Vigna unguiculata* L. Walp. fusionada à proteína verde fluorescente e estudo da interação do peptídeo com *Saccharomyces cerevisiae*

Yan Luiz Nunes, Valdirene Moreira Gomes, André de Oliveira Carvalho

Peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) são pequenas moléculas protéicas isoladas de diferentes organismos e possuem características em comum como pequeno tamanho, carga positiva em pH fisiológico e anfipaticidade. Estes AMPs tem grande interesse biológico devido a ampla atividade inibitória contra microrganismos e em relação ao mecanismo de ação que causa a inibição destes, muito pouco se sabe. Alguns estudos mostram que os AMPs perturbam a estrutura de membranas celulares. Também já foi mostrada a entrada no citoplasma e/ou a ligação dos AMPs com alvos intracelulares. Isto pode indicar que existem outros alvos além da membrana e a interação com estes alvos disparam mecanismos mais sofisticados de ação. O objetivo deste projeto é fusionar a defensina de *Vigna unguiculata* L. Walp. (*Vu-Def*) com a proteína verde fluorescente (GFP) e monitorar a interação deste AMP marcado com células de *Saccharomyces cerevisiae*. Conjuntos de iniciadores foram desenhado especialmente para fusionar a *Vu-Def* à GFP, em duas posições, no N-terminal e no C-terminal da *Vu-Def*. PCRs foram feitos separadamente amplificando os fragmentos de interesse. A GFP foi amplificada a partir do vetor pRSET/EmGFP (Invitrogen). Os fragmentos amplificados serão tratados com a enzima de restrição *Bam* HI. Os fragmentos tratados serão purificados com kit Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega) e então reunidos de acordo com cada estratégia e ligados com a enzima T4 DNA ligase (Life Technologies). Estas construções serão ligadas ao vetor de superexpressão pET-32 EK/LIC e o AMP fusionado à GFP (*Vu-Def-GFP*) será expresso e purificado em coluna de Ni<sup>+</sup>-NTA-agarose (Qiagen). A atividade do *Vu-Def-GFP* será comparada à da *Vu-Def* para mostrar que a fusão não interferiu com a atividade biológica através de um ensaio de inibição do crescimento da levedura *S. cerevisiae*. Após este ensaio somente a *Vu-Def-GFP* será usada no ensaio para monitoramento de sua interação com a célula da levedura e também com marcadores fluorescentes para núcleo (DAPI) e mitocôndria (rodamina 123). Entre os resultados esperados pretendemos responder se *Vu-Def-GFP* entra ou não no citoplasma e se entra para qual compartimento celular é endereçada. Todos estes resultados serão analisados de forma abrangente para se tentar entender melhor o mecanismo de inibição do crescimento deste microrganismo, aumentando o conhecimento atual na área de AMPs e seus mecanismos de ação.

Palavras-chave: defensina de planta, Mecanismos de Ação, Biologia Molecular.

Instituição de fomento: CNPq, FAPERJ, UENF.