

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

LUDIER KESSER SANTOS SILVA

**PRODUÇÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL
DE UMA LEGUMAÍNA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**SÃO CARLOS
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

LUDIER KESSER SANTOS SILVA

**PRODUÇÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL
DE UMA LEGUMAÍNA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas), área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

***Orientador: Prof. Dr. Flavio Henrique Silva
Co-orientadora: Profa. Dra. Andrea Soares da
Costa Fuentes***

**SÃO CARLOS
2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S586pr

Silva, Ludier Kesser Santos.

Produção recombinante e caracterização funcional de
uma legumaina de cana-de-açúcar / Ludier Kesser Santos
Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

148 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2012.

1. Enzimas. 2. Cisteíno peptidase. 3. Cistatina. 4. Cana-
de-açúcar. I. Título.

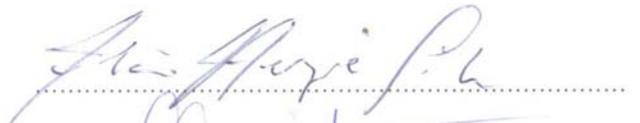
CDD: 574.1925 (20^a)

“Produção Recombinante e Caracterização Funcional de uma
Legumaina de Cana-de-açúcar”

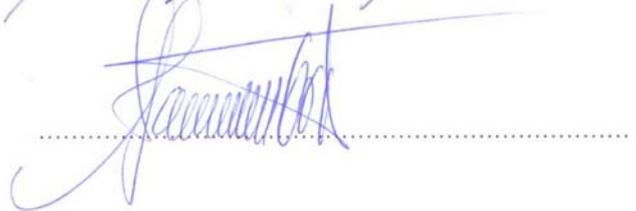
Tese de Doutorado de
LUDIER KESSER SANTOS SILVA

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Flavio Henrique Silva



Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes



Profa. Dra. Helaine Carrer



Profa. Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona



Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira



Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia



A minha mãe, Lourdes, pelo amor incondicional.

Ao meu pai, Euter, e ao meu irmão Weter, por fazerem parte da minha história.

Ao meu esposo Renes, pelo amor, carinho, incentivo e paciência.

Aos que acreditaram ser possível esta conquista.

A Realidade pode ser dolorida, mas a Consciência a torna acolhedora...e o sabor da descoberta é único para quem recebe.

(Ludier Kesser Santos Silva)

SÚMULA CURRICULAR

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Doutora em Ciências, Bioquímica e Biologia Molecular. Tese: Produção recombinante e caracterização funcional de uma legumina de cana-de-açúcar. Orientador: Flavio Henrique da Silva; Co-orientadora: Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes. Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos (em andamento). Período sanduíche na Universidade Politécnica de Madri de 1 Março a 30 Junho de 2011 (Orientadora: Isabel Diaz).

Mestre em Ciências Biológicas área de Concentração Biologia Celular e Molecular. Dissertação: Esterol metiltransferase do fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis*: isolamento do cDNA, caracterização, expressão funcional e inibição. Orientadora: Maristela Pereira. Programa de Pós-graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás (2005-2007).

Graduação em Farmácia. Universidade Federal do Mato Grosso, Instituto Universitário do Araguaia (2005).

PUBLICAÇÕES

Medeiros, A.H., Franco, F.P., Matos, J.L., de Castro, P.A., **Santos-Silva, L.K.**, Henrique-Silva, F., Goldman, G.H., Moura, D.S., Silva-Filho, M.C. Sugarwin: A sugarcane insect-induced gene with antipathogenic activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012. (In press)

Cruz, A.H.S., Brock, M., Zambuzzi-Carvalho, P.F., **Santos-Silva, L.K.**, Troian, R.F., Góes, A.M., Soares, C.M.A., Pereira, M. Phosphorylation is the major mechanism regulating isocitrate lyase activity in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *The FEBS Journal*, v. 278, p. 2318-2332, 2011.

Pereira, M., Song, Z., **Santos-Silva, L. K.**, Richards, M.H., Nguyen, T.T.M., Liu, J., Soares, C.M.A., Cruz, A.H.S., Ganapathy, K., Nes, W.D. Cloning, mechanistic and functional analysis of a fungal sterol C24-methyltransferase implicated in brassicasterol biosynthesis. *Biochimica and Biophysica Acta: Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1801, p. 1163-1174, 2010.

Zambuzzi-Carvalho, P.F., Cruz, A.H.S., **Santos-Silva, L.K.**, Goes, A.M., Soares, C.M.A., Pereira, M. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* PB01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. *Medical Mycology*, v. 47, p. 734-744, 2009.

Souza, I.L., **Santos-Silva, L. K.**, Venere, P.C., Moreira-Filho, O. Molecular cytogenetics of *Salminus* fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. *Micron*, v. 39, p. 1036-1041, 2008.

Venere, P.C., Souza, I.L., **Santos-Silva, L. K.**, Dos Anjos, M.B., De Oliveira, R.R., Galetti, P.M. Recent chromosome diversification in the evolutionary radiation of the

freshwater fish family Curimatidae (Characiformes). *Journal of Fish Biology*, v. 72, p. 1976-1989, 2008.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela maravilhosa oportunidade: a Vida.

Ao prof. Dr. Flavio Henrique da Silva pela valiosa orientação, amizade, confiança e oportunidade. Por ter incentivado a busca constante de conhecimento. Pelo aprendizado profissional e pessoal adquirido durante esses anos em seu laboratório.

À Profa. Dra. Andrea Soares Costa Fuentes, pela co-orientação, auxílio e amizade. Por todas as vezes em que prontamente se dispôs a auxiliar e esclarecer minhas dúvidas.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da UFSCar, pelo suporte e auxílio na realização deste trabalho.

À CAPES, pelo financiamento da minha bolsa de estudos e à FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos professores Dr. Lee Tseng e Dra. Silvana pela colaboração nos experimentos realizados na cana-de-açúcar e pela boa vontade com que sempre se dispuseram a nos auxiliar.

À professora Dra. Isabel Diaz, pela colaboração nos ensaios de localização e interação por BiFC e pela gentileza com que me recebeu em seu laboratório. Aos seus alunos Inés Cambra, Estrella e David pela amizade e auxílio durante meu estágio na UPM.

Aos professores Dr. Manuel Martinez e Dr. Pablo Melendi pelo auxílio durante meu estágio na UPM.

Aos amigos Fernando e Wilson pelo conhecimento compartilhado e bons momentos de risadas quando o Sr. Wilson estava com a pulga atrás da orelha e o Animal com os dentinhos de coelho.

Às colegas Danyelle e Adelita pelo auxílio nos momentos de necessidade quase urgente, pela amizade e boa convivência.

Aos colegas de laboratório pelos momentos que pudemos conviver, aprender juntos e pelo auxílio: Darlan, Danilo, Wesley, Rafael, Letícia, Natália, Lucas,

Augusto, Gabriel, Daniela, Mariana, Ana Lúgia, Francine, Vanessa, Rafaela, Taíse, Priscila, Bianca. Todo auxílio foi importante, do pequeno ao grande.

Às amigas Renata e Johara pela divertida amizade e pelas boas risadas e conversas no lab e durante nossas “conferências”. Pelo auxílio nos momentos decisivos antes da defesa.

À Julia Mara pela amizade, pelos brownies e outros lanches.

Às amigas Mariana Beatriz e Natália Nichele pelos bons momentos juntas.

Aos que gentilmente me hospedaram logo que cheguei a São Carlos: Juedi (e família) e Marilene (e família).

Aos amigos da UDV de Barra de Garças, Piracicaba e Madri pelas palavras de incentivo e carinho.

À “minha” família, que conheci em São Carlos: Cristiane, Luciano e minha irmã mais nova Clarissa, pelo carinho, amizade, atenção e paciência.

À Tia Néia, Elizeu, Cleber e Daniel pelo carinho, incentivo e confiança.

À minha vovó Maria, pelo carinho e orações.

A todos que contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade, desconhecidos, conhecidos, amigos e familiares.

RESUMO

As legumaínas de plantas, também denominadas enzimas de processamento vacuolar (VPEs), são cisteíno-peptidases que atuam nos processos de maturação de sementes, germinação, senescência, resposta a estresse e morte celular programada durante o desenvolvimento da planta ou em resposta a patógenos. Apesar do crescente número de estudos com legumaínas de plantas, a maioria dos estudos está relacionada às legumaínas de dicotiledôneas e suas funções em sementes. No presente trabalho, foi realizada a caracterização de uma legumaína de cana-de-açúcar, denominada CaneLEG. A caracterização cinética da CaneLEG recombinante produzida em *Pichia pastoris* mostrou que esta enzima possui as características comuns de legumaínas de plantas, como a auto-ativação e atividade ótima em pH ácido. Além disso, a atividade da CaneLEG foi fortemente inibida pela cistatina de cana-de-açúcar denominada CaneCPI-3. A interação *in vivo* legumaína-cistatina foi observada para as proteínas de cevada, indicando que as legumaínas podem ser inibidas por cistatinas na planta. Além disso, foi analisada a expressão dos genes da CaneLEG e CaneCPI-3 durante o desenvolvimento da cana e em plântulas tratadas com fitohormônios. A partir destes resultados, foi observado que estes genes apresentam um padrão de expressão temporal tecido-específica, com forte acúmulo de transcritos da CaneLEG durante o desenvolvimento do entrenó. A superexpressão dos genes CaneLEG e CaneCPI-3 em plântulas tratadas com ABA sugere que as proteínas por eles codificadas devem estar envolvidas na resposta a estresse, sendo possível que a CaneCPI-3 atue na regulação de cisteíno-peptidases endógenas. Nossos resultados sugerem a CaneCPI-3 como um inibidor endógeno da CaneLEG e o possível envolvimento dessas proteínas na resposta a estresse regulada por ABA. Além disso, o aumento gradual na expressão da CaneLEG em entrenó sugere a atuação desta enzima no desenvolvimento deste tecido de reserva. Os resultados obtidos neste trabalho servirão como base inicial para auxiliar no entendimento das funções desempenhadas pela CaneLEG e CaneCPI-3 na cana-de-açúcar.

ABSTRACT

Plant legumains, also termed vacuolar processing enzymes (VPEs), are cysteine peptidases that play key roles in seed maturation, germination, senescence, stress response, programmed cell death during development and defense against pathogens. Despite the increasing number of reports on VPEs, most of studies are on dicotyledonous legumain and their role in seeds. In this study, it was performed the characterization of sugarcane legumain, named CaneLEG. Kinetic characterization of the recombinant CaneLEG expressed in *Pichia pastoris* revealed that this enzyme has the main characteristics of VPEs, such as self-activation and activity under acidic pH. CaneLEG activity was strongly inhibited by the sugarcane cystatin named CaneCPI-3. *In vivo* interaction between legumain and cystatin was observed to barley proteins, indicating that legumains might be inhibited by cystatins in the plant. Furthermore, the CaneLEG and CaneCPI-3 gene expression was analyzed throughout sugarcane development and in plantlets treated with phytohormones. From these results, it was observed that these genes showed a tissue-specific expression pattern, with the strong accumulation of CaneLEG transcripts throughout the internode development. The up-regulation of CaneLEG and CaneCPI-3 genes in plantlets treated with ABA suggests that these proteins encoded by these genes may be involved in stress response and CaneCPI-3 may act on endogenous cysteine peptidase regulation. Our results suggest the CaneCPI-3 as the endogenous inhibitor of CaneLEG and the involvement of these proteins on the ABA-regulated stress response. Further, the gradual increase on CaneLEG expression in internode suggests the action of this enzyme on the development of this storage tissue. The results obtained in this work will serve as an initial tool to understand the roles played by CaneLEG and CaneCPI-3 on sugarcane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Foto ilustrativa da cana-de-açúcar plantada no campo	2
Figura 1.2. Estágios de desenvolvimento da cana-de-açúcar	3
Figura 1.3. Modelo de interação peptidase-substrato protéico	7
Figura 1.4. Estrutura tridimensional da papaína ligada ao inibidor E-6.....	9
Figura 1.5. Mecanismo de ação das cisteíno-peptidases	10
Figura 1.6. Estrutura tridimensional da caspase-1 (família C14)	11
Figura 1.7. Estrutura das legumainas e local de remoção dos pró-peptídeos em plantas	12
Figura 1.8. Representação esquemática da atuação das VPEs (legumainas) na semente...	16
Figura 1.9. Representação da estrutura tridimensional da cistatina e da interação entre a cistatina e a cisteíno-peptidase.....	20
Figura 3.1. Determinação da atividade enzimática pela liberação do composto fluorescente MCA presente nos substratos utilizados neste estudo.....	44
Figura 3.2. Esquema representativo das mutações realizadas nas proteínas CaneLEG e CaneCPI3.....	48
Figura 3.3. Procedimento realizado para obtenção dos clones mutantes utilizando o sistema <i>GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis</i> (Invitrogen)	49
Figura 3.4. Estrutura básica do plasmídeo psmRS-GFP_CD3 e variantes utilizados para os ensaios de localização celular e BiFC.....	52
Figura 3.5. Esquema da construção dos plasmídeos CD-327 e variantes contendo os genes das legumainas e das cistatinas	54
Figura 3.6. Esquema transformação de células vegetais utilizando o sistema PSP-1000/He (BIO-RAD)	56
Figura 3.7. Análise da eficiência da reação de qPCR pelo método de diluição	66
Figura 4.1. Sequência de nucleotídeos e proteína predita da CaneLEG	70
Figura 4.2 Possível sítio de glicosilação da CaneLEG	71
Figura 4.3. Alinhamento das legumainas CaneLEG, <i>Sorghum bicolor</i> , <i>Hordeum vulgare</i> HvVPE3, LeCP <i>Solanum lycopersicum</i> e γ VPE de <i>Arabidopsis thaliana</i>	74
Figura 4.4. Amplificação da ORF da legumaina da cana-de-açúcar (CaneLEG).....	75
Figura 4.5. Análise em SDS-PAGE 15% da expressão heteróloga da CaneLEG em <i>E. coli</i> .	77
Figura 4.6. Análise em SDS-PAGE 15% da solubilidade da CaneLEG recombinante.....	78
Figura 4.7. Indução CaneLEG em <i>E. coli</i> à 20°C	79
Figura 4.8. Recuperação da CaneLEG presente na fração insolúvel de SDS-PAGE, expressa utilizando o vetor pET29a.....	79

Figura 4.9. Plasmídeo recombinante pPICZ α A-CaneLEG linearizado.....	81
Figura 4.10. PCR das colônias de KM71H transformadas com o plasmídeo recombinante pPICZ α A-CaneLEG	81
Figura 4.11. Expressão da CaneLEG recombinante em <i>P. pastoris</i>	82
Figura 4.12. Detecção da CaneLEG recombinante produzida em <i>P. pastoris</i>	84
Figura 4.13. Expressão heteróloga e purificação da CaneLEG	86
Figura 4.14. Detecção da CaneLEG recombinante produzida em <i>P. pastoris</i>	87
Figura 4.15. Detecção da CaneLEG recombinante produzida em <i>P. pastoris</i>	89
Figura 4.16. Expressão da proteína mutante CLEG Δ C ²¹² em <i>P. pastoris</i> após 144h de indução com metanol.....	90
Figura 4.17. Processamento da CaneLEG Δ C ²¹² pela CaneLEG	91
Figura 4.18. Determinação do pH ótimo de atividade da CaneLEG	92
Figura 4.19. Determinação da temperatura ótima e estabilidade térmica da CaneLEG recombinante.....	93
Figura 4.20. Inibição da CaneLEG por iodoacetamida e inibidor de caspase-1.....	95
Figura 4.21. Inibição da CaneLEG pela CaneCPI-3	97
Figura 4.22. Análise em SDS-PAGE 15% da expressão heteróloga das formas mutantes da CaneCPI-3 em <i>E. coli</i>	98
Figura 4.23. Inibição da CaneLEG pelas formas mutantes da CaneCPI-3	99
Figura 4.24. Localização da GFP (controle) em células da epiderme de cebola	100
Figura 4.25. Localização CaneLEGwcp em células da epiderme de cebola.....	101
Figura 4.26. Localização CLEG Δ C ²¹² em células da epiderme de cebola	102
Figura 4.27. Localização HvLEG-2 em células da epiderme de cebola.....	103
Figura 4.28. Localização HvLEG-2wcp em células da epiderme de cebola.....	104
Figura 4.29. Análise da interação HvLEG-2wcp-HvCPI-4 por BiFC em células da epiderme de cebola.....	106
Figura 4.30. Avaliação da expressão por qPCR dos genes da <i>CaneLEG</i> e <i>CaneCPI-3</i> durante a fase de germinação e estabelecimento da cana-de-açúcar (25 DAP).....	107
Figura 4.31. Avaliação da expressão por qPCR dos genes da <i>CaneLEG</i> e <i>CaneCPI-3</i> durante o perfilhamento da cana-de-açúcar (90 DAP)	108
Figura 4.32. Avaliação da expressão por qPCR dos genes da <i>CaneLEG</i> e <i>CaneCPI-3</i> durante a fase de crescimento dos colmos da cana-de-açúcar (180 DAP)	109
Figura 4.33. Avaliação da expressão por qPCR dos genes da <i>CaneLEG</i> e <i>CaneCPI-3</i> durante o início da fase de maturação dos colmos da cana-de-açúcar (270 DAP)	110

Figura 4.34. Expressão dos genes <i>CaneLEG</i> e <i>CaneCPI-3</i> em plântulas de cana-de-açúcar tratadas com fitohormônios.....	112
Figura 5.1. Representação esquemática da estrutura da <i>CaneLEG</i> , ativação <i>in vitro</i> e processamento da forma mutante $CLEG\Delta C^{212}$ pela <i>CaneLEG</i>	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento do clone SCBFRT1071E03.	30
Tabela 3.2. Características básicas dos vetores de expressão utilizados.....	31
Tabela 3.3. Oligonucleotídeos utilizados para clonagem da CaneLEG nos vetores de expressão pET29a e pPICZαA	32
Tabela 3.4 Oligonucleotídeos utilizados para mutagênese sítio dirigida	50
Tabela 3.5. Oligonucleotídeos utilizados para clonagem da CaneLEG e CaneCPI3 nos vetores CD3-327 e variantes	51
Tabela 3.6. Oligonucleotídeos utilizados para clonagem da HvLEG-2 nos vetores CD3-327 e variantes.....	54
Tabela 3.7. Composição dos meios de cultivo para obtenção das plântulas de cana-de-açúcar.....	60
Tabela 3.8. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR.....	64
Tabela 4.1. Identidade entre a sequência de aminoácidos da CaneLEG e legumainas de outras plantas	72
Tabela 4.2. Massa molecular das formas precursoras, madura e recombinante da CaneLEG	83
Tabela 4.3. Valores das constantes de inibição (K _i) de inibidores de cisteíno-peptidase e caspase-1 contra a CaneLEG	95
Tabela 4.4. Valores das constantes de inibição (K _i) da CaneCPI-3 contra a CaneLEG.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λ_{em}	comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	comprimento de onda de excitação
μE	microEinsteins
μF	micro Farad
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micromêtro
μM	micromolar
$^{\circ}C$	graus Celsius
ABA	ácido abscísico
Ac-YVAD-CHO	Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehyde
AJ	ácido jasmônico
AS	ácido salicílico
ATP	adenosina trifosfato
BAP	6-benzilaminopurina
BiFC	<i>bimolecular fluorescence complementation</i>
cDNA	DNA complementar
cm	centímetro
CP	cisteíno-peptidase
Ct	<i>cycle threshold</i>
DAP	dias após tratamento
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	desoxirribonuclease
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfato
DO	densidade óptica
DTT	ditiotreitól
dTTP	trifosfato de timina
dUTP	trifosfato de uracila
E-64	transepoxi-succinil-L-leucilamido-(4-guanidino)butano
EDTA	ácido etileno-diamino-tetra-acético
EST	<i>expressed sequence tag</i>
g	grama
g	unidade de força centrífuga relativa
GA3	ácido giberélico

GFP *green fluorescent protein*
h hora
ha hectare
IPTG isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
Kb quilobase
kcat constante catalítica
kDa kilodalton
K_i constante de inibição
K_{iap} constante de inibição aparente
K_m constante de Michaelis-Menten
m metro
M molar
MCA 7-amido-4-metilcoumarina
MCP morte celular programada
mg miligrama
min minuto
mL mililitro
mM milimolar
mm milímetro
mRNA RNA mensageiro
MW *molecular weight* (massa molecular)
NBT/BCIP nitro-blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate
NCBI National Center for Biotechnology Information
ng nanograma
nm nanômetro
nM nanomolar
nt nucleotídeo
ORF *open reading frame* (fase aberta de leitura)
pb pares de bases
PBS solução salina tamponada com fosfato
PCR Polimerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
pH potencial de hidrogênio
psi libra por polegada quadrada
PVDF polivinilideno difluorido
qPCR PCR quantitativo

RNA ácido ribonucléico
RNase ribonuclease
rpm rotações por minuto
s segundo
SDS sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE eletroforese em gel de poliacrilamida sódio dodecil sulfato
T_m temperatura de desnaturação
U unidade enzimática
UAF unidade arbitrária de fluorescência
UDG uracil-DNA-glicosilase
UV ultravioleta
V volts
vs versus
X vezes
Z-A-A-N-MCA carbobenzoxicarbonil-Ala-Ala-Asn-7-amido-4-metilcoumarina
Z-V-A-N-MCA carbobenzoxicarbonil-Val-Ala-Asn-7-amido-4-metilcoumarina

SUMÁRIO

SÚMULA CURRICULAR	i
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A Cana-de-açúcar.....	1
1.2. Enzimas proteolíticas classificação geral e principais características.....	5
1.2.1. Cisteíno-peptidases: principais famílias e características.....	8
1.2.1.1 Legumainas e suas funções em plantas	12
1.3. Cistatinas: Inibidores naturais de cisteino-peptidases	19
1.3.1 Fitocistatinas	21
1.4. Fitohormônios: GA, ABA, AJ e AS	24
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Obtenção do clone contendo a ORF da legumaina e sequenciamento	30
3.2. Análise <i>in silico</i> da CaneLEG	30
3.3. Clonagem da legumaina nos vetores de expressão heteróloga	31
3.4. Expressão heteróloga da CaneLEG em <i>E. coli</i>	34
3.5. Produção de anticorpos policlonais anti-CaneLEG e <i>western blotting</i>	36
3.6. Transformação de células competentes de <i>P. pastoris</i> com o vetor de expressão contendo o gene da CaneLEG.....	37
3.7. Expressão heteróloga em <i>P. pastoris</i> e purificação da proteína recombinante	41
3.8. Caracterização cinética da rCaneLEGhis.....	43
3.8.1. <i>Determinação do pH ótimo</i>	43
3.8.2. <i>Determinação da temperatura ótima e estabilidade térmica</i>	44
3.8.3. <i>Cálculo da constante de Michaelis Menten (K_m) e da eficiência catalítica (k_{cat}/K_m)</i>	45
.....	45
3.9. Ensaio de inibição da atividade catalítica da CaneLEG	46
3.10. Mutagênese sítio dirigida	47
3.11 Localização de proteínas fusionadas a GFP em células vegetais e análise da interação legumaina-cistatina por BiFC	50

3.11.1 Clonagem e sequenciamento dos plasmídeos utilizados	50
3.11.2 Preparo das partículas de ouro recobertas com DNA para bombardeamento das células vegetais	55
3.11.3 Transformação de células da epiderme de cebola e análise da expressão transitória	55
3.12. Análise da expressão dos genes CaneLEG e CaneCPI-3 em diferentes tecidos da cana-de-açúcar e em plântulas tratadas com fitohormônios	57
3.12.1 Condições de crescimento, tecidos e fases do desenvolvimento da cana-de-açúcar..	57
3.12.2 Tratamento de plântulas de cana-de-açúcar com fitohormônios	59
3.12.3 Extração de RNA total de cana-de-açúcar	60
3.12.4. Síntese do DNA complementar (cDNA)	62
3.12.5 Análise quantitativa de transcritos por PCR (qPCR).....	62
3.12.6 Critérios para desenho dos oligonucleotídeos e padronização da reação de qPCR....	64
3.12.7. Análise dos dados de qPCR	66
4. RESULTADOS	69
4.1 Análise <i>in silico</i> da sequência da CaneLEG	69
4.2. Expressão heteróloga da CaneLEG em <i>E. coli</i> e produção de anticorpos policlonais	75
4.3 Expressão heteróloga em <i>P. pastoris</i> e purificação da CaneLEG recombinante	80
4.4 Expressão heteróloga e processamento da CaneLEG mutante	88
4.5 Caracterização cinética da CaneLEG recombinante produzida em <i>P. pastoris</i>	92
4.5.1 Determinação do pH e temperatura ótimos e ensaios de termoestabilidade	92
4.5.2. Determinação da constante de Michaelis Menten e Especificidades de substrato da CaneLEG.....	94
4.6 Ensaios de inibição da atividade da CaneLEG <i>in vitro</i> por iodoacetamida e pelo inibidor de caspase-1	94
4.7 Inibição da CaneLEG pela cistatina de cana-de-açúcar (CaneCPI-3)	95
4.8 Atividade inibitória das formas mutantes da CaneCPI-3 contra a CaneLEG	97
4.9. Localização de legumainas fusionadas à GFP, em células vegetais.....	99
4.10. Interação de uma legumaina com uma cistatina C-terminal estendida em células vegetais	104
4.11. Análise da expressão gênica da <i>CaneLEG</i> e <i>CaneCPI-3</i> durante o desenvolvimento da cana de açúcar	106
4.12. Análise da expressão gênica da <i>CaneLEG</i> e <i>CaneCPI-3</i> em plântulas tratadas com fitohormônios	110
5. DISCUSSÃO	113
5.1. Caracterização da CaneLEG recombinante	113

5.2. Inibição da CaneLEG recombinante pela cistatina de cana-de-açúcar.....	118
5.3. Localização das VPEs de cana e cevada e interação VPE-cistatina em células vegetais	120
5.4. Padrão de expressão gênica da <i>CaneLEG</i> e do inibidor <i>CaneCPI-3</i> durante o desenvolvimento da cana-de-açúcar	123
5.5. Padrão de expressão gênica da <i>CaneLEG</i> e <i>CaneCPI-3</i> em resposta ao tratamento com fitohormônios	126
6. CONCLUSÕES	131
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133

1. INTRODUÇÃO

1.1. A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma monocotiledônea da família Poaceae, cujas variedades comerciais atualmente cultivadas são resultado do cruzamento de várias espécies originadas na Oceania (Nova Guiné) e na Ásia (DANILES e ROACH, 1987). A introdução do cultivo da cana-de-açúcar no Brasil coincidiu com o início da colonização portuguesa, tornando-se o principal produto cultivado no país. Como principais produtos da cana-de-açúcar destacam-se o açúcar, o álcool e os subprodutos gerados como o bagaço, cinzas, torta de filtro e o melaço (SOUSA *et al.*, 1998).

A cana-de-açúcar é uma planta perene, na forma nativa, e de hábito ereto (Figura 1.1). Esta planta forma touceiras cujo crescimento dos colmos em altura prossegue até que ocorra alguma limitação no suprimento de água, baixas temperaturas ou florescimento (DIOLA e SANTOS, 2010). O colmo da cana é cilíndrico, de coloração variável, subdividido em nós e entrenós e composto internamente por feixes fibrovasculares envolvidos por tecido parenquimático, onde a sacarose é armazenada. Na região basal do entrenó encontra-se a bainha da raiz (*root band*), composta por pontos pequenos a partir dos quais serão formadas as raízes primordiais. As gemas laterais estão localizadas na bainha da raiz, podendo cada uma dar origem a um novo colmo principal. O topo do colmo possui um ponto de crescimento, o meristema apical, envolto por um conjunto de folhas jovens denominado cartucho foliar (*leaf roll*). As folhas, que estão dispostas de forma alternada sobre o colmo, são simples, estreito-lanceoladas e podem ser divididas em bainha e limbo. O sistema radicular é composto por raízes finas e altamente

ramificadas, originadas da bainha da raiz do tolete, e por raízes secundárias mais grossas e vigorosas, que emergem da bainha da raiz do colmo em desenvolvimento. Em certas condições de desenvolvimento, o meristema apical sofre uma alteração de estágio vegetativo para estágio reprodutivo, isto é, parando de formar folhas jovens para formar a inflorescência (VAN DILLEWIJN, 1952).



Figura 1.1. Foto ilustrativa da cana-de-açúcar plantada no campo experimental da UFSCar, *campus* de Araras. Foto tirada em 14 de julho de 2010 por L.K. Santos-Silva.

A cana-de-açúcar é propagada, em grande escala, de forma assexuada por meio do plantio de toletes, que são pedaços do colmo contendo de três a cinco gemas laterais, que uma vez colocados nos sulcos de plantio adubados sofrem indução para brotamento das gemas para formação da nova planta. O cultivo da cana pode durar de 12 a 18 meses, dependendo da época escolhida para plantio. O

estágio de desenvolvimento da cana pode ser dividido em quatro fases principais (Figura 1.2).

Em torno de 20 a 30 dias após o plantio (DAP) ocorre o brotamento das gemas presentes no tolete. Após o brotamento, ocorre o estabelecimento inicial da planta em desenvolvimento através da formação das raízes dos perfilhos primários, secundários e assim sucessivamente. A fase de perfilhamento inicia-se por volta de 40 DAP podendo durar até 120 dias. Neste período ocorre o aumento do número de colmos da planta. Os estágios finais do desenvolvimento da cana são o crescimento (ou alongação) dos colmos, que começa a partir de 120 DAP durando até 270 DAP, e a fase de intensa produção e acúmulo de açúcar nos entrenós, também denominada fase de maturação dos colmos, que começa de 270 - 360 DAP (DIOLA e SANTOS, 2010).

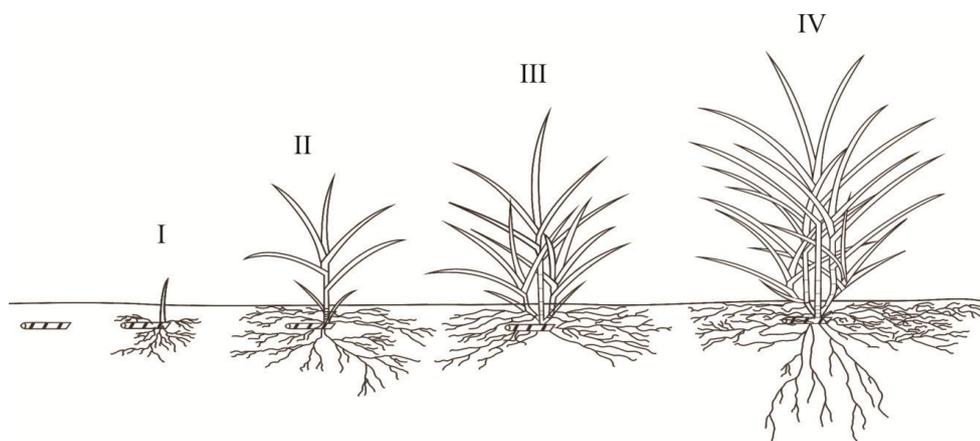


Figura 1.2. Estágios de desenvolvimento da cana-de-açúcar. I: fase de brotamento do tolete e estabelecimento. II: fase de perfilhamento. III: fase de crescimento (ou alongação) dos colmos. IV: fase de maturação dos colmos. Figura adaptada de SOUSA *et al.*, 1998.

A grande importância econômica da cana-de-açúcar está relacionada à sua capacidade de armazenar altas concentrações de sacarose no colmo, podendo acumular mais de 600 mM de sacarose (MANNERS e CASU, 2011). Atualmente, o Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de cana, açúcar e álcool,

respondendo por 44% do comércio mundial de açúcar (CONAB, 2011). O cultivo de cana ocupa cerca de 7 milhões de hectares, aproximadamente 2% do solo do País. As regiões de cultivo são Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste. Dessa forma, a exportação do setor sucroalcooleiro movimenta aproximadamente 40 bilhões de dólares por ano (DIEESE, 2007). Os dados da safra de 2009/2010 indicaram uma produção de 612 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, correspondendo a uma área de cana colhida estimada de 7.531 mil hectares, sendo a região Centro-Sul do país responsável por aproximadamente 549 milhões de toneladas, provenientes de aproximadamente 4.101,4 mil ha (CONAB 2009). O interesse pela cana-de-açúcar vem aumentando devido ao seu uso na produção de etanol para utilização como combustível renovável e pouco poluente, em substituição ao petróleo.

Devido ao grande valor econômico da cana-de-açúcar e sua importância no cenário econômico nacional e internacional, diversos estudos vem sendo realizados visando à obtenção de variedades mais produtivas e diminuição da perda de produção, seja por fatores bióticos ou abióticos. Na área de biologia molecular, destacam-se os trabalhos que descrevem o sequenciamento de sequências transcritas (ESTs - *Expressed Sequence Tags*), que constituem uma forma útil e relativamente rápida para identificação de novos genes (CARSON *et al.*, 2002; VETTORE *et al.*, 2003;). O projeto SUCEST (*Sugarcane EST Project*, FAPESP) realizou o sequenciamento de aproximadamente 240.000 ESTs, que foram agrupadas em mais de 43.000 prováveis transcritos. Acredita-se que este projeto tenha sequenciado mais de 90% do genoma expresso da cana. Vale ressaltar que o projeto SUCEST sequenciou ESTs de vários tecidos de diferentes variedades de cana em vários estágios de desenvolvimento. Também foram analisadas bibliotecas

de *calli* submetidos a estresse térmico (frio ou calor) e de plantas inoculadas com bactérias endofíticas (VETTORE *et al.*, 2003).

De forma complementar, foram realizados estudos para identificar o perfil de expressão gênica durante condições ou estágios de desenvolvimento que pudessem auxiliar na compreensão dos processos fisiológicos da cana como acúmulo de sacarose, maturação do colmo, metabolismo da parede celular, resposta a fitohormônios, estresse biótico e abiótico (CARSON *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2007; CASU *et al.*, 2007; PAPINI-TERZI *et al.*, 2009; GUPTA *et al.*, 2010; PRABU *et al.*, 2011). Embora esses estudos tenham facilitado a descoberta de genes associados com os processos estudados, ainda são poucos os trabalhos nos quais os genes descritos foram caracterizados quanto às suas funções nos processos fisiológicos nos quais estão envolvidos.

Os dados resultantes dos estudos de ESTs têm possibilitado a identificação, classificação e análise da expressão *in silico* de determinados genes ou classes de proteínas que desempenham funções importantes em plantas. Correa e colaboradores (2001), após análise no banco de dados do projeto SUCEST, identificaram diversos *clusters* de cisteíno-peptidases da cana-de-açúcar que foram então classificados e seu padrão de expressão gênica analisado. No entanto, até o momento não foi descrita a caracterização enzimática de cisteíno-peptidases desta planta.

1.2. Enzimas proteolíticas classificação geral e principais características

As peptidases são hidrolases que atuam na hidrólise de ligações peptídicas (EC 3.4), também denominadas de enzimas proteolíticas. Estas enzimas são amplamente distribuídas entre os organismos vivos, representando cerca de 2% de

todo produto gênico (IUBMB, 1992; RAWLINGS e BARRETT, 1999). As peptidases são divididas em exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases removem um, dois ou três resíduos de aminoácidos na extremidade amino-terminal (aminopeptidases) ou carboxi-terminal (carboxipeptidases) de um peptídeo ou proteína. As endopeptidases por sua vez hidrolisam ligações presentes no interior da cadeia polipeptídica (BARRETT, 1994).

Os vários tipos de peptidases diferem quanto à sua localização celular, função fisiológica, inibidores e especificidade de substrato. O estudo da estrutura do sítio ativo das peptidases indicou que este encontra-se localizado em um sulco na superfície da proteína entre domínios estruturais adjacentes. A especificidade do substrato está relacionada à capacidade de ligação de seus aminoácidos aos sítios dispostos ao longo do sulco, em um ou ambos os lados, do sítio catalítico da enzima responsável pela hidrólise do substrato. Considerando isto, Schechter e Berger (1967) propuseram um modelo de especificidade peptidase-substrato, para a enzima papaína, no qual subsítios específicos (denominados S) presentes no sítio catalítico da enzima acomodam os resíduos de aminoácidos do substrato (denominados P), com cada subsítio acomodando um resíduo de aminoácido do substrato (Figura 1.3). Os subsítios são numerados do sítio catalítico da enzima para região amino-terminal (S1, S2, S3, Sn) ou carboxi-terminal (S1', S2', S3', Sn') do substrato. Os aminoácidos do substrato que interagem com cada subsítio são designados de forma semelhante (P1, P2, P3, Pn ou P1', P2', P3', Pn'). Atualmente, este modelo é utilizado para qualquer classe de peptidases.

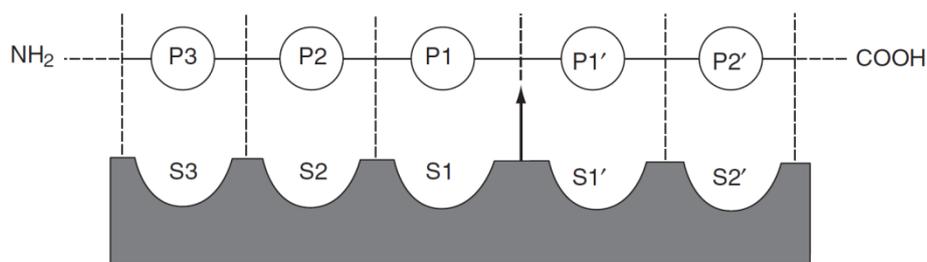


Figura 1.3. Modelo de interação peptidase-substrato protéico (SCHECHTER e BERGER, 1967). O esquema mostra os subsítios específicos da enzima e as características complementares do substrato. A seta indica o sítio de clivagem do substrato pela peptidase. Fonte: BARRET, 2000.

As peptidases são divididas em sete classes principais, baseado nos resíduos de aminoácidos catalíticos presentes no sítio ativo da enzima. As principais classes são: serino-peptidases (EC 3.4.21) que possuem no centro ativo um resíduo de serina envolvido no processo catalítico, as treonino-peptidases (EC 3.4.25) possuem como resíduo catalítico a treonina, as aspartil-peptidases (EC 3.4.23), que possuem um ou dois resíduos de ácido aspártico necessários para sua atividade catalítica. As metalo-peptidases (EC 3.4.24) utilizam um íon metálico, geralmente o Zn^{2+} , em seu mecanismo catalítico. As asparagina-peptidases utilizam resíduos de asparagina em seu mecanismo catalítico. As cisteíno-peptidases (EC 3.4.22) possuem um resíduo de cisteína em seu sítio ativo e as glutamil-peptidases, utilizam como resíduo catalítico primário o ácido glutâmico. As peptidases cujo sítio ativo e mecanismo catalítico ainda não foram determinados são agrupadas na classe de peptidases de tipo catalítico desconhecido (RAWLINGS *et al.*, 2012).

As cisteíno, serino e treonino-peptidases possuem um nucleófilo catalítico presente na cadeia lateral de um aminoácido como grupo reativo. Nas cisteíno-peptidases o nucleófilo catalítico é o grupo sulfidril presente no resíduo de cisteína, enquanto as serino e treonino-peptidases utilizam como nucleófilo um grupamento

hidroxila presente na cadeia lateral dos resíduos catalíticos serina e treonina, respectivamente. Nas metalo e aspartil-peptidases o nucleófilo é geralmente uma molécula de água ativada. Nas metalo-peptidases o íon metálico gera uma forte atração eletrofílica que auxilia no ataque à molécula de água. Nas aspartil-peptidases a molécula de água é ligada diretamente às cadeias laterais dos resíduos de ácido aspártico. As glutamil-peptidases utilizam os resíduos ácido glutâmico e glutamina para ativação da molécula de água, que irá atacar a ligação peptídica a ser clivada para formar o intermediário tetraédrico durante a catálise (FUJINAGA *et al.*, 2004; RAWLINGS *et al.*, 2008).

Além das formas de classificação descritas acima, as classes de peptidases ainda são agrupadas de acordo com suas similaridades estruturais. Acredita-se que esta classificação possa refletir as características evolutivas dessas proteínas. Dessa forma, as peptidases podem ser agrupadas em famílias e clãs. As famílias correspondem a grupos de enzimas nos quais cada membro possui relação evolutiva, seja na sequência completa ou pelo menos na região da sequência responsável pela atividade catalítica, com pelo menos outra proteína da mesma família. Os clãs agrupam famílias que, apesar da ausência de similaridade de sequência significativa, apresentam indícios de relação evolutiva como, por exemplo, a ordem linear dos resíduos catalíticos na estrutura terciária da proteína (RAWLINGS e BARRETT, 1999).

1.2.1. Cisteíno-peptidases: principais famílias e características

Em plantas, as enzimas proteolíticas atuam em vários processos biológicos. Dentre as principais funções estão a degradação, maturação de proteínas,

senescência, formação de xilema, embriogênese, eventos relacionados à morte celular programada e resposta a estresse biótico e abiótico (MOSOLOV e VALUEVA, 2006). Uma vez que a enzima em estudo neste trabalho pertence à classe das cisteíno-peptidases (CP), esta classe será abordada de forma mais detalhada, com ênfase nas CP de plantas.

A classe das CP é composta por 72 famílias agrupadas em 8 clãs. A maioria das cisteíno-peptidases de plantas pertence à família C1 e C13, sendo a primeira família a mais estudada. A família C1, pertencente ao clã CA, tem a papaína, extraída do látex de *Carica papaya*, como seu principal representante. A papaína possui uma estrutura de dois domínios, domínio L (*left*) e domínio R (*right*), entre os quais está localizado o sítio ativo da enzima (Figura 1.4) (RAWLINGS *et al.*, 2008).

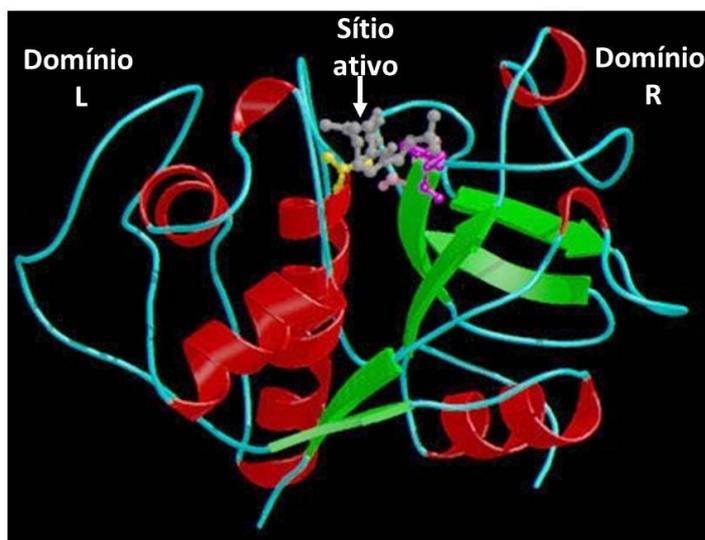


Figura 1.4. Estrutura tridimensional da papaína ligada ao inibidor E-64. Resíduo de cisteína catalítico (amarelo), histidina (violeta) e asparagina (rosa). Inibidor E-64 ligado ao sítio ativo da enzima está representado em cinza. Figura adaptada de RAWLINGS *et al.*, 2008.

As enzimas da família C1, também denominada família da papaína, além de apresentarem similaridade estrutural com a papaína possuem os resíduos catalíticos cisteína (Cys), histidina (His) e asparagina (Asn) dispostos nesta ordem. Estas

enzimas são sintetizadas como precursores pouco ativos ou inativos contendo um peptídeo sinal, uma pró-sequência, que atua como um inibidor da peptidase, e a proteína madura, contendo de 220 a 260 aminoácidos (WIEDERANDERS, 2003).

O primeiro passo do mecanismo catalítico das enzimas da família C1 envolve a ligação da enzima livre com o substrato, formando o intermediário tetraédrico. Em seguida, ocorre a acilação da enzima com a formação e liberação do primeiro produto enzimático, o grupo amina R'NH₂. No passo seguinte, a acil-enzima reage com uma molécula de água levando à formação do segundo produto enzimático (RCOOH), fase na qual ocorre a deacilação da enzima. A liberação deste produto leva à regeneração da enzima livre (Figura 1.5) (STORER e MÉNARD, 1994).

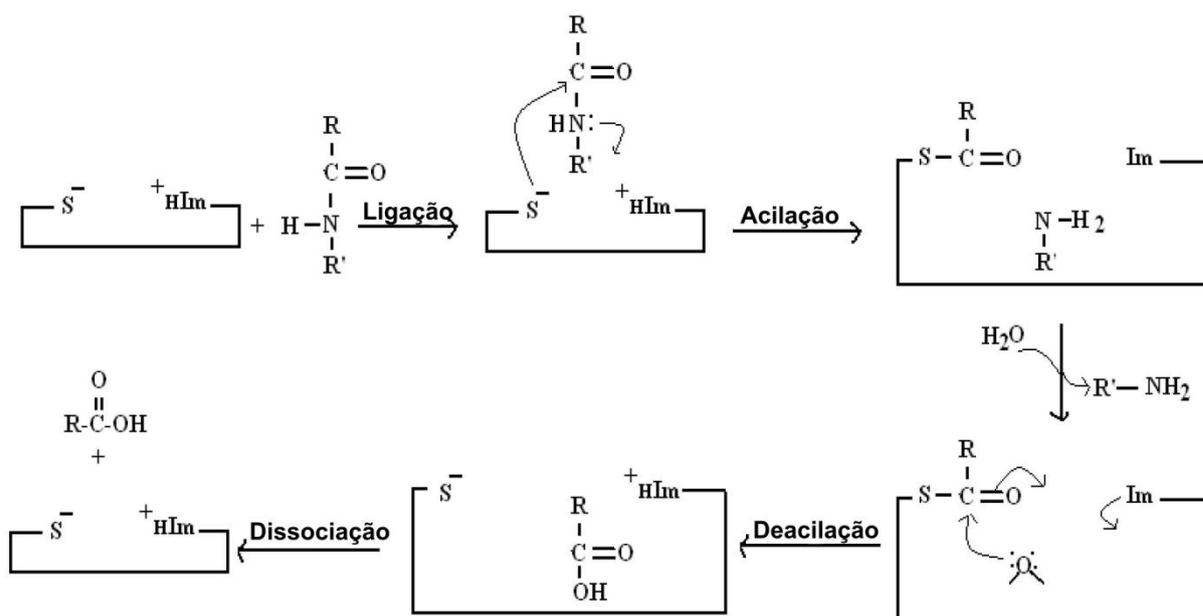


Figura 1.5. Mecanismo de ação das cisteíno-peptidases. S: átomo de enxofre do resíduo de cisteína do sítio ativo da enzima. Im e ⁺HIm: grupo imidazol e imidazol protonado, respectivamente, da cadeia lateral do resíduo de histidina presente no sítio ativo. Figura adaptada de MAHAJAN e BADGUJAR, 2010.

A família C13, também conhecida como família da legumaina, pertence ao clã CD de CP (RAWLINGS *et al.*, 2008). As enzimas desta família foram primeiramente

isoladas de sementes maduras de *Ricinus communis*, de cotilédones de *Glycine max* e de sementes maduras de *Canavalia ensiformis* (HARA-NISHIMURA *et al.*, 1991; SCOTT *et al.*, 1992; ABE *et al.*, 1993). Essas enzimas são caracterizadas pela sua especificidade em clivar ligações peptídicas no lado C-terminal de um resíduo de asparagina, ou ácido aspártico (HARA-NISHIMURA *et al.*, 1991; HIRAIWA *et al.*, 1999), porém seu mecanismo catalítico ainda não foi descrito.

A estrutura terciária das enzimas da família C13 ainda não foi determinada. No entanto, Chen *et al.* (1998a) relataram similaridades da sequência e estrutura secundária ao redor dos resíduos do sítio ativo dessas enzimas com as enzimas da família das caspases (C14), sugerindo um enovelamento similar entre as enzimas da família da legumaína e as caspases (Figura 1.6). As enzimas da família C13 apresentam os resíduos catalíticos cisteína e histidina, dispostos na ordem His-Cys, precedidos por um bloco de quatro aminoácidos hidrofóbicos presentes nas fitas β que suportam os resíduos catalíticos cisteína e histidina, comum às CP (CHEN *et al.*, 1998a; RAWLINGS *et al.*, 2008).

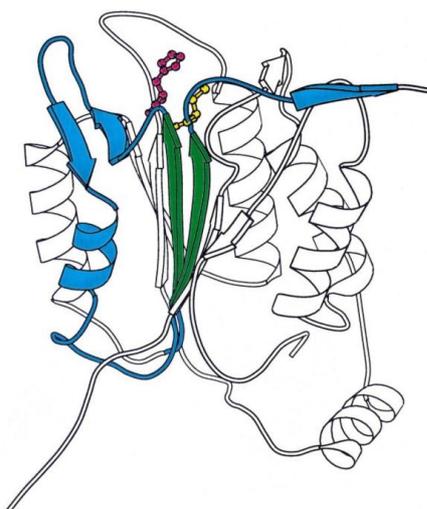


Figura 1.6. Estrutura tridimensional da caspase-1 (família C14). As fitas β que suportam os resíduos catalíticos cisteína (amarelo) e histidina (rosa) estão representadas em verde. Em azul está destacada a região adicional utilizada para comparação da sequência e estrutura secundária entre as enzimas da família C13 e C14. Fonte: CHEN *et al.*, 1998a.

As legumainas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (RER) como um polipeptídeo precursor contendo um peptídeo sinal, que é removido ainda no RER, e dois pró-peptídeos, um na região N-terminal e outro na região C-terminal (MÜNTZ e SHUTOV, 2002). A pró-legumaina é transportada para o vacúolo em sua forma inativa. A ativação da enzima depende da remoção dos pró-peptídeos, ou pelo menos do pró-peptídeo C-terminal, como observado em *Ricinus communis*. (Figura 1.7) (HIRAIWA *et al.*, 1999). O processamento da pró-legumaina é realizado no seu sítio de destino de forma auto-catalítica e dependente do pH do meio, uma vez que os sítios de clivagem dos pró-peptídeos são flanqueados por resíduos de asparagina ou ácido aspártico (HIRAIWA *et al.*, 1999; KUROYANAGI *et al.*, 2002).

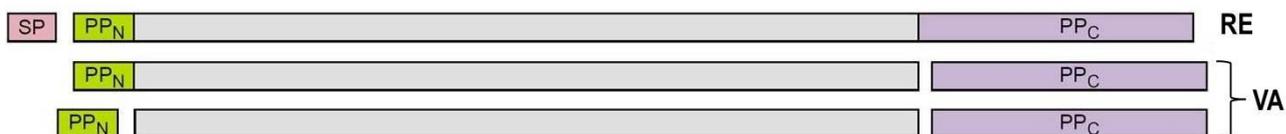


Figura 1.7. Estrutura das legumainas e local de remoção dos pró-peptídeos em plantas. SP: peptídeo sinal; PP_N: pró-peptídeo N-terminal; PP_C: pró-peptídeo C-terminal. A região da proteína madura está representada em cinza. RE: retículo endoplasmático; VA: vacúolo. Figura adaptada de MÜNTZ e SHUTOV, 2002.

1.2.1.1 Legumainas e suas funções em plantas

As legumainas, em plantas também conhecidas como enzimas de processamento vacuolar (*Vacuolar Processing Enzyme*, VPE), distinguem-se das enzimas da família da papaína pela sua insensibilidade ao inibidor E-64 e pela sua especificidade em clivar ligações peptídicas flanqueadas por resíduos de asparagina ou ácido aspártico. Após síntese, as VPEs são primariamente direcionadas para os vacúolos, com exceção da nucelaína, uma VPE de cevada, cuja localização foi

observada na parede celular de células do nucelo (LINNESTAD *et al.*, 1998; MÜNTZ *et al.*, 2002).

Após análise da expressão das quatro VPEs de *Arabidopsis*, essas enzimas foram inicialmente classificadas como vegetativas ou de sementes, de acordo com os tecidos onde são mais expressas. Embora a expressão de VPEs vegetativas tenha sido observada em sementes, a classificação das VPEs ainda continua a ser utilizada com base nas funções que essas enzimas desempenham na planta (KINOSHITA *et al.*, 1999; GRUIS *et al.*, 2004). As VPEs vegetativas estão envolvidas principalmente nos processos de senescência, resposta a estresse e morte celular programada (MCP) durante o desenvolvimento da planta ou resposta a patógenos (HATSUGAI *et al.*, 2004; ROJO *et al.*, 2004; DONNISON *et al.*, 2007). As VPEs de sementes estão envolvidas no processamento e mobilização de proteínas de reserva e no processo de MCP durante o desenvolvimento da semente (SHIMADA *et al.*, 2003; NAKAUNE *et al.*, 2005; RADCHUK *et al.*, 2011). O estudo da expressão dos promotores dos genes de VPEs de *Arabidopsis* indicou que a VPE de semente, β VPE, foi expressa principalmente em sementes secas, eixo embrionário e cotilédones, enquanto as VPEs vegetativas (α VPE e γ VPE) foram mais expressas em tecidos em processo de MCP, raízes e folhas senescentes (KINOSHITA *et al.* 1999). A expressão da δ VPE, outra VPE de semente, foi observada em sementes em desenvolvimento (GRUIS *et al.* 2002; NAKAUNE *et al.*, 2005).

Os vacúolos de plantas são organelas multifuncionais que ocupam uma grande parte do volume celular. Essas organelas atuam na manutenção da pressão de turgor, homeostase do protoplasma, armazenamento de produtos metabólicos, captação de xenobióticos e digestão de componentes celulares. Além disso, o

vacúolo está envolvido na defesa contra microorganismos e insetos herbívoros. Os vacúolos podem ser classificados em vacúolos líticos (VL) e de armazenamento de proteínas (VAP). Os VAP contêm grandes quantidades de proteínas incluindo proteínas de defesa e proteínas de reserva que servem como fonte de carbono, nitrogênio e enxofre para a germinação da semente e crescimento da planta jovem. Os vacúolos líticos contêm enzimas hidrolíticas para a degradação de material celular, como observado, por exemplo, durante o processo de morte celular programada (HERMAN e LARKINS, 1999; HARA-NISHIMURA e HATSUGAI, 2011).

Durante o desenvolvimento da semente há um acúmulo de proteínas nos VAP que mais tarde, durante a germinação, servirão como fonte de nutrientes para desenvolvimento da planta. Algumas proteínas de reserva são sintetizadas como precursores que são processados na sua forma madura tão logo se acumulam nos vacúolos (HIGGINS 1984; SHEWRY *et al.*, 1995). As proteínas de reserva 11S, denominadas globulinas, após sua síntese no retículo endoplasmático rugoso e clivagem do peptídeo sinal, são organizadas em trímeros. Esses trímeros são posteriormente transportados para os VAPs onde são processados para sua forma madura. A clivagem dos trímeros ocorre após o resíduo de asparagina da ligação Asn-Gly, levando à formação de hexâmeros que são depositados nos VAPs (DICKINSON *et al.*, 1989). As VPEs são responsáveis pela maturação dos precursores de proteínas de reserva, incluindo a clivagem dos trímeros de globulina que leva à formação dos hexâmeros (JUNG *et al.*, 1998).

Em *Arabidopsis* foi observado que o acúmulo de precursores de proteínas de reserva, globulinas 12S e albuminas 2S, nas sementes de plantas mutantes era resultado de alterações no gene β VPE. Embora outras VPEs, α VPE e γ VPE,

atuassem de forma compensatória nas plantas mutantes, a maior parte da atividade enzimática de VPE nas sementes era resultante da atuação da enzima β VPE (SHIMADA *et al.*, 2003). De modo similar, Gruis *et al.* (2004) observaram que plantas de *Arabidopsis* mutantes para os quatro genes de VPE acumularam formas não-processadas das proteínas de reservas e polipeptídeos processados de modo alternativo, com massas moleculares similares às proteínas processadas pelas VPEs. Em arroz uma mutação no gene de uma VPE resulta no acúmulo de grandes quantidades de pró- glutelina. Além disso, o não processamento da glutelina levou à alteração da forma dos VAP contendo glutelina e ao atraso do crescimento da folha primária, indicando que o processamento desta proteína influencia o desenvolvimento inicial da planta jovem (WANG *et al.*, 2009; KUMAMARU *et al.*, 2010).

Alguns estudos têm demonstrado que as VPEs também estão envolvidas na degradação/mobilização das proteínas de reserva, durante a germinação da semente e desenvolvimento da planta jovem (HARA-NISHIMURA *et al.*, 1998; SCHLERETH *et al.*, 2000). As VPEs atuam no processamento de pró-CP do tipo papaína, envolvidas na degradação das proteínas de reserva (OKAMOTO e MINAMIKAWA, 1999). Em alguns casos, ocorre a interação entre enzimas do tipo papaína e legumaína no processamento das proteínas de reserva, sendo necessária a atuação inicial de uma classe para que a outra possa atuar (ZAKHAROV *et al.*, 2004). A figura 1.8 é uma representação esquemática da atuação das VPEs no processamento e degradação de proteínas de reserva.

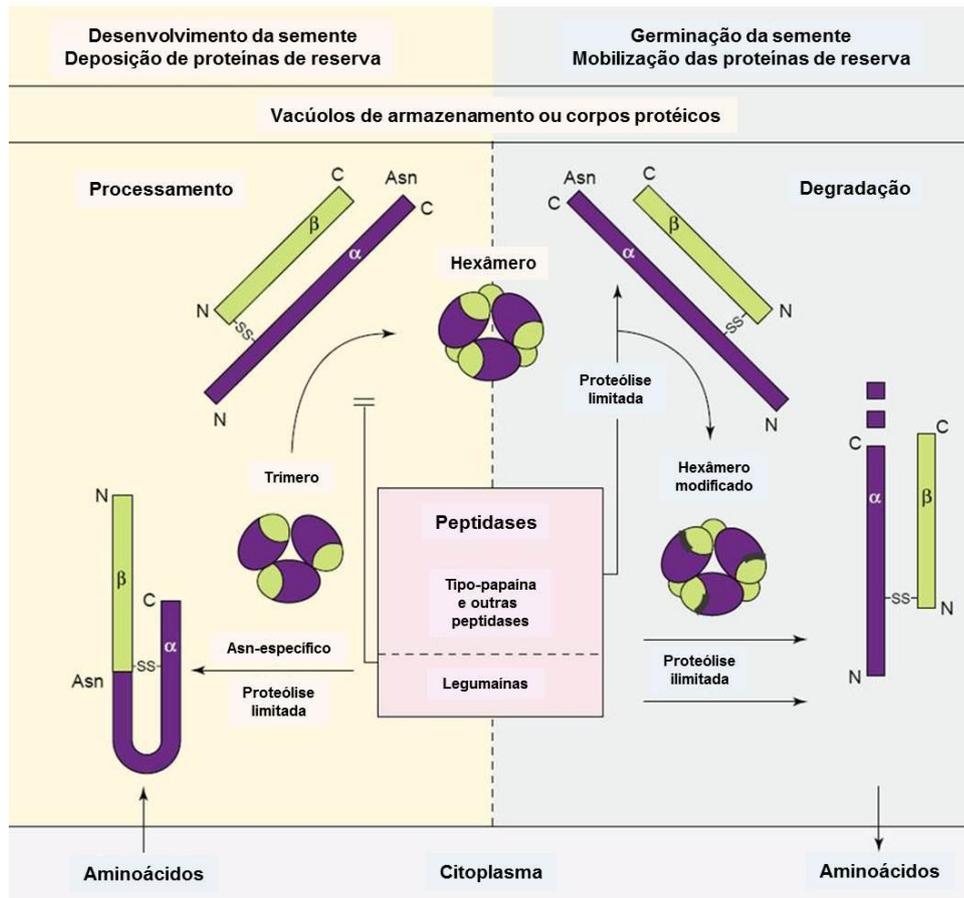


Figura 1.8. Representação esquemática da atuação das VPEs (legumainas) na semente. Figura adaptada de MÜNTZ e SHUTOV, 2002.

Durante a senescência da folha ocorre a degradação das proteínas por peptidases e sua reutilização em partes não-senescentes da planta. A exposição de folhas de batata-doce (*Ipomoea batatas*) a agentes indutores de senescência provocou um acúmulo de transcritos de VPE e um aumento na expressão da respectiva enzima principalmente nos últimos estágios de senescência (CHEN *et al.*, 2004). Os dados obtidos por esses autores concordam com aumento da expressão de genes de VPEs vegetativas (α VPE e γ VPE) em tecidos senescentes de *Arabidopsis* e em pétalas senescentes de *Ipomoea nil* (KINOSHITA *et al.*, 1999; YAMADA *et al.*, 2009), sugerindo a atuação das VPEs na senescência. Além disso, foi observada que a degradação de uma invertase vacuolar em folhas senescentes

resulta da atividade proteolítica da enzima γ VPE, uma vez que nas plantas mutantes *γvpe* os níveis de invertase foram mantidos mesmo após início da senescência (ROJO *et al.*, 2003).

Quando em contato com patógenos, as plantas desencadeiam uma resposta que ocasiona uma morte celular rápida e localizada no local de infecção, a fim de evitar que o fitopatógeno se espalhe pela planta. Este mecanismo de defesa, denominado resposta hipersensível, possui algumas semelhanças com o processo de apoptose que ocorre em animais. Durante a MCP em plantas e animais pode ser observado a condensação da cromatina, fragmentação do DNA em fragmentos nucleossômicos e o envolvimento de caspases (PENNELL e LAMB, 1997; REAPE e McCABE, 2008).

As caspases são CP com especificidade para resíduos de ácido aspártico, pertencentes à família C14 e ao clã CD. Estas enzimas estão envolvidas na iniciação e execução do mecanismo de MCP em animais, atuando no processamento e ativação de enzimas envolvidas na MCP (SHI, 2002; KUMAR, 2007). Embora não tenha sido detectada a presença de caspases em plantas, o uso de substratos sintéticos para essas enzimas em células durante MCP tem indicado a presença de atividade enzimática do tipo-caspase em plantas (DE JONG *et al.*, 2000; DANON *et al.*, 2004). Rojo *et al.* (2004) observaram que a enzima γ VPE de *Arabidopsis* pode estar envolvida na atividade tipo-caspase-1 desempenhada durante a resposta hipersensível, desencadeada durante exposição à *Pseudomonas syringae*. Além disso, foi observado que a deficiência na enzima VPE levou à supressão da morte celular desencadeada durante infecção com o vírus do mosaico do tabaco, em tabaco, e pela toxina do fungo *Fusarium moniliforme* em *Arabidopsis*.

A atividade desempenhada pela VPE durante a MCP está provavelmente relacionada à sua atividade tipo-caspase. A atividade da VPE parece ser crucial para desencadear a desintegração da membrana vacuolar, necessária para que ocorra a degradação do conteúdo citoplasmático resultando na morte celular (HATSUGAI *et al.*, 2004; KUROYANAGI *et al.*, 2005).

Além de ser crucial na resposta hipersensível, a MCP é necessária durante o desenvolvimento da planta em processos como formação de elementos do xilema, aerênquima, formação de flores unissexuadas, morfogênese da folha e desenvolvimento da semente (NAKAUNE *et al.*, 2005; GUNAWARDENA, 2008; RADCHUK *et al.*, 2011). Enzimas do tipo-caspase são ativadas durante a MCP desencadeada pelo mecanismo de auto-incompatibilidade, que evita auto-fertilização em plantas com flores (BOSCH e FRANKLIN-TONG, 2007). Recentemente foi descrita a caracterização uma VPE de pólen de *Papaver rhoeas* que possui, além de atividade tipo-caspase-1, ligeira atividade tipo-caspase-3 e 8. Ensaio de localização demonstraram que a enzima localiza-se nos vacúolos dos tubos polínicos, indicando o envolvimento desta VPE no mecanismo de auto-incompatibilidade (BOSCH *et al.*, 2010). Além disso, durante o desenvolvimento de sementes de *Arabidopsis*, camadas de células são removidas por MCP para formação do tegumento externo da semente. Nakaune *et al.* (2005) demonstraram que a δ VPE, que também possui atividade tipo-caspase-1, está envolvida no processo de MCP para remoção das camadas internas, necessária para a formação do tegumento externo da semente. De modo semelhante, as VPEs parecem estar envolvidas no mecanismo de MCP durante a fase de crescimento do endosperma de sementes de cevada (RADCHUK *et al.*, 2011).

1.3. Cistatinas: Inibidores naturais de cisteíno-peptidases

As cistatinas são inibidores de cisteíno-peptidases que atuam como pseudo-substratos formando um complexo reversível com as CP-alvos, bloqueando assim o acesso do substrato específico ao sítio ativo da enzima (TURK e BODE, 1991; BENCHABANE *et al.*, 2010). Diversos estudos descrevem as cistatinas como inibidores de CP da família da papaína (TURK e BODE, 1991; ARAI *et al.*, 2002; OLIVA *et al.*, 2004). No entanto, foi descrito que algumas cistatinas também inibem enzimas da família da legumaína, em um sítio reativo distinto do utilizado para inibição de CP do tipo papaína (ALVAREZ-FERNANDEZ *et al.*, 1999; CHENG *et al.*, 2006).

A estrutura tridimensional da maioria das cistatinas é composta por uma folha β dobrada, contendo cinco fitas β antiparalelas, organizada em volta de uma α hélice de cinco voltas (Figura 1.9a). A inibição, das enzimas da família da papaína, se dá por meio da interação entre três regiões conservadas das cistatinas e a CP-alvo. Na região N-terminal, está localizado o resíduo de glicina que interage com o subsítio S2 da enzima em uma conformação que impede que a cistatina seja clivada pelo sítio ativo da enzima. O motivo Gln-X-Val-X-Gly, altamente conservado entre as cistatinas, localizado no *loop* 1 e a região contendo um resíduo de triptofano, localizado no *loop* 2, apresentam tamanhos e formas que se encaixam nos subsítios S1' e S2' do sítio ativo da enzima (TURK e BODE 1991; BENCHABANE *et al.*, 2010) (Figura 1.9b).

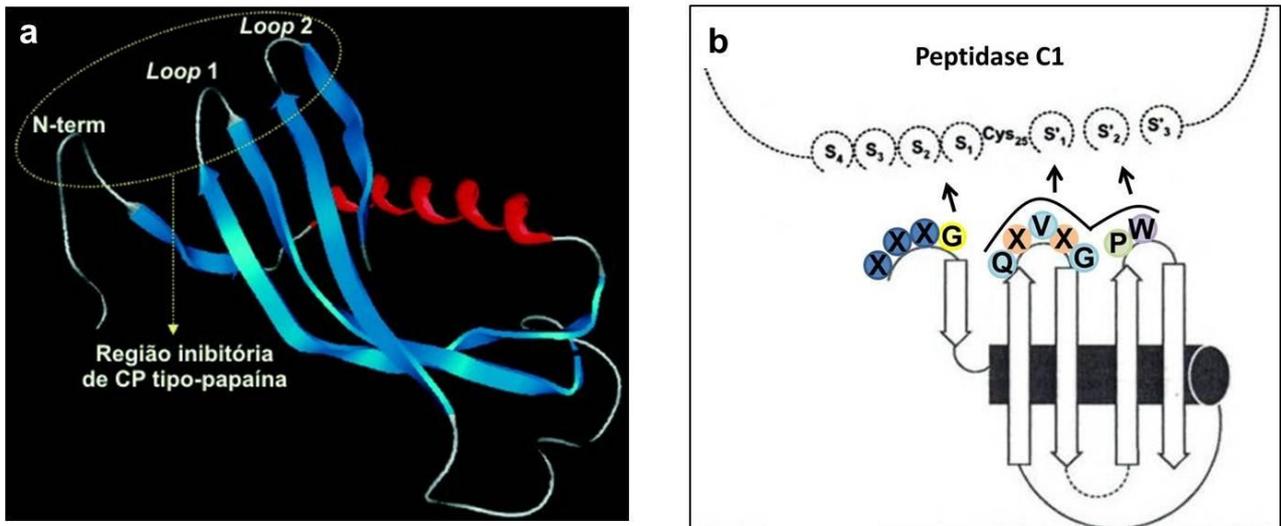


Figura 1.9. Representação da estrutura tridimensional da cistatina e da interação entre a cistatina e a cisteíno-peptidase. (a) Representação da estrutura tridimensional da cistatina C humana. (b) Esquema da interação entre uma cistatina e uma cisteíno-peptidase tipo papaína. Os subsítios da enzima estão representados por S_n ou S'_n . Figuras adaptadas de ALVAREZ-FERNANDEZ *et al.* 1999 e ALVAREZ-FERNANDEZ E ABRAHAMSON, 2006.

Devido ao grande número de cistatinas descritas, esses inibidores foram organizados em uma superfamília subdividida, inicialmente, em três famílias de cistatinas (BARRETT *et al.*, 1986). Análises de similaridade das sequências primárias, massas moleculares, número de ligações dissulfeto e localização subcelular foram utilizados para a classificação das cistatinas em famílias. A família 1, conhecida como família das estefinas, inclui inibidores com massas moleculares de aproximadamente 11 kDa, não-glicosilados, sem peptídeo sinal e ligações dissulfeto. Esta família também caracteriza-se pela presença do loop Gln-Val-Val-Ala-Gly presente na região central da molécula (TURK e BODE, 1991).

A família 2, ou família das cistatinas, é composta por proteínas de cadeia simples com massa molecular de aproximadamente 14 kDa, contendo um peptídeo sinal, o motivo central Gln-X-Val-X-Gly e ligações dissulfeto na região C-terminal da proteína. A família 3, ou família dos cininogênios, inclui cistatinas de massas moleculares altas (60-120 kDa), que formam ligações dissulfeto, são glicosiladas e

secretadas. Estas proteínas contêm três domínios de cistatinas da família 2, dos quais dois possuem atividade inibitória contra CP (TURK e BODE, 1991).

Kondo *et al.* (1991) sugeriram a inclusão de uma nova família contendo as cistatinas de plantas, ou fitocistatinas. As fitocistatinas possuem algumas características similares à família das estefinas, como ausência de ligações dissulfeto e resíduos de cisteína, e à família das cistatinas, como o tamanho e a similaridade na sequência primária. No entanto, as fitocistatinas possuem de modo exclusivo a sequência consenso L-A-R-[FY]-A-[VI]-x(3)-N. Além disso, a análise da árvore filogenética de cistatinas animais e de plantas mostrou o agrupamento das fitocistatinas em um único ramo, distinto das cistatinas das famílias 1 e 2 (MARGIS *et al.*, 1998).

1.3.1 Fitocistatinas

As fitocistatinas têm sido identificadas em diversas plantas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas. A primeira fitocistatina descrita foi isolada de sementes de arroz (ABE *et al.*, 1987). Desde então, já foram caracterizadas cistatinas em plantas como milho (YAMADA *et al.*, 2000), cana-de-açúcar (SOARES-COSTA *et al.*, 2002; GIANOTTI *et al.*, 2006), batata (ANNADANA *et al.*, 2003), feijão (DIOP *et al.*, 2004), trigo (CORRE-MENGUY *et al.*, 2002), entre outras. As fitocistatinas foram inicialmente descritas por sua capacidade inibitória contra enzimas da família da papaína. No entanto, foi descrita a inibição de enzimas da família da legumaina pela cistatina de cevada com massa molecular de 23 kDa, contendo uma região C-terminal estendida (MARTINEZ *et al.*, 2007).

A estrutura tridimensional da cistatina de arroz, orizacistatina I, apresenta o enovelamento típico observado para as cistatinas animais (ver Figura 1.9a). Embora as fitocistatinas contendo a extensão C-terminal apresentem enovelamento de sua região N-terminal similar a orizacistatina I, a estrutura tridimensional de sua região C-terminal estendida ainda não foi determinada (CHU *et al.*, 2011).

Diversos estudos apontam o envolvimento das fitocistatinas na regulação de CP endógenas durante a maturação de sementes, *turnover* de proteínas nos órgãos de reserva, crescimento e proliferação celular, senescência e MCP (SOLOMON *et al.*, 1999; SUGAWARA *et al.*, 2002; HWANG *et al.*, 2009; WEEDA *et al.*, 2009; TIAN *et al.*, 2009). No entanto, pouco é conhecido a respeito de quais CP endógenas são alvos desses inibidores. A interação de fitocistatina com CP do tipo-papaína *in vivo* foi confirmada após a purificação de uma cistatina de milho com sua peptidase alvo, sendo necessário o tratamento do complexo com SDS para liberação da fitocistatina e ativação da peptidase (YAMADA *et al.*, 2000). Em trigo, foi observada a interação da cistatina WC5 com duas proteínas presentes em extratos protéicos da semente, no entanto a sequência das peptidases não foi determinada (CORRE-MENGUY *et al.*, 2002).

Além disso, as fitocistatinas atuam na defesa da planta em resposta a ferimentos ou ataque por patógenos e insetos. Alguns fitopatógenos e insetos secretam CP para facilitar o processo de patogênese e degradação de proteínas da planta (HABIB e FAZILI, 2007). Ensaio *in vitro* indicaram que as fitocistatinas são capazes de inibir CP digestivas de insetos e o crescimento de microorganismos fitopatogênicos (ZHAO *et al.*, 1996; YANG e YEAH, 2005; CARRILLO *et al.*, 2011). Além disso, foi observado que as cistatinas são super-expressas em condições de

estresse abiótico como condições extremas de salinidade, seca, oxidação e frio (PERNAS *et al.*, 2000; DIOP *et al.*, 2004). Com base nisso, o uso de fitocistatinas para produção de plantas transgênicas mais resistentes a patógenos, insetos e estresse abiótico vem se tornando cada vez mais crescente (URWIN *et al.*, 2003; HAQ *et al.*, 2004; HABIB e FAZILI, 2007; ZHANG *et al.*, 2008).

As fitocistatinas de cana-de-açúcar foram descritas pela primeira vez por Reis e Margis (2001). Após análise no banco de dados do projeto SUCEST os autores identificaram *in silico* 25 prováveis fitocistatinas, que foram organizadas em 4 grupos baseado em uma análise filogenética. As cistatinas do grupo I caracterizam-se pela presença das regiões características da superfamília das cistatinas e da sequência consenso N-terminal exclusiva das fitocistatinas, o motivo L-A-R-[FY]-A-[VI]-x(3)-N. No grupo II estão as cistatinas com as mesmas características do grupo I contendo uma extensão na região C-terminal. O grupo III inclui as cistatinas que possuem as regiões características da superfamília das cistatinas, no entanto não possuem a sequência consenso N-terminal das fitocistatinas. As cistatinas do grupo IV não possuem o motivo QXVXG característico da superfamília (REIS e MARGIS, 2001).

A primeira cistatina de cana-de-açúcar, denominada CaneCPI-1, e outras três cistatinas desta planta, CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4 foram caracterizadas em nosso laboratório (SOARES-COSTA *et al.*, 2002; GIANOTTI *et al.* 2006; GIANOTTI *et al.*, 2008). Estas fitocistatinas foram capazes de inibir de forma eficiente catepsinas humanas, assim como outras CP (OLIVA *et al.*, 2004; GIANOTTI *et al.*, 2006). Soares-Costa *et al.* (2002) observaram que a CaneCPI-1 apresentou atividade antifúngica contra contra *Trichoderma reesei*, indicando que esta cistatina pode estar envolvida na defesa da planta contra patógenos. Ainda, foi

descrita a presença de uma cistatina contendo uma região C-terminal estendida em cana-de-açúcar (CanePI-3), que provavelmente pode estar relacionada à inibição de legumina (GIANOTTI *et al.*, 2006). Além disso, foi observado que a CaneCPI-4 reduziu a capacidade invasiva de células tumorais *in vitro* (GIANOTTI *et al.*, 2008). Recentemente foi descrito que esta mesma fitocistatina foi capaz de inibir o desenvolvimento de melanoma *in vivo* e diminuir a angiogênese *in vitro* e *in vivo* (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Estes resultados indicam o potencial deste inibidor no tratamento de tumores. Contudo, ainda não foi descrita a provável função destas cistatinas na planta. Logo, a caracterização das funções destas fitocistatinas pode ajudar na elucidação dos mecanismos de regulação da proteólise e defesa da cana-de-açúcar. A análise de expressão gênica durante o desenvolvimento da planta, em condições de estresse e exposição a fitohormônios, juntamente com estudos do perfil inibitório dessas proteínas, têm se mostrado importantes na caracterização inicial e entendimento da função das fitocistatinas na planta.

1.4. Fitohormônios: GA, ABA, AJ e AS

Os hormônios de plantas, denominados fitohormônios, são substâncias orgânicas sintetizadas pela planta que, em baixas concentrações, atuam no controle de processos fisiológicos como crescimento, diferenciação celular, desenvolvimento, regulação dos níveis de nutrientes, resposta a estresse biótico e abiótico (DAVIES, 2004; RUBIO, 2009). Os fitohormônios podem levar à indução ou repressão de genes envolvidos em determinados processos fisiológicos, para efetivação e/ou propagação de uma resposta desencadeada frente a alterações no desenvolvimento da planta ou estímulos externos (CLELAND, 1999).

A giberelina, ou ácido giberélico (GA), foi primeiramente isolada do fungo *Gibberella fujikuroi*, agente causador de uma doença em arroz que leva ao crescimento excessivo das plantas, que se tornam fracas e morrem. O GA, presente em plantas, é um fitohormônio envolvido na promoção da elongação do caule, pecíolos e flores. Além disso, o GA está envolvido na indução da germinação de sementes, estimulando a produção e ativação de enzimas envolvidas na hidrólise de proteínas de reserva para o desenvolvimento da planta jovem (CLELAND, 1999; DAVIES, 2004). Sabe-se que durante a germinação ocorre a indução de CP do tipo-papaína e a repressão de genes de cistatinas. De acordo com isto, diversos autores observaram a indução de transcritos de CP do tipo-papaína e a repressão dos transcritos de cistatinas em sementes tratadas com GA3 (MARTINEZ *et al.*, 2003; HONG *et al.*, 2007; KIYOSAKI *et al.*, 2007).

O ácido abscísico (ABA), conhecido como hormônio do estresse, está envolvido na regulação de resposta à seca, salinidade e frio. O ABA promove o fechamento dos estômatos, evitando assim a perda de água por transpiração e a entrada de microorganismos. Em resposta a estresse biótico, este hormônio pode atuar tanto como um regulador positivo, aumentando a defesa da planta, quanto como um regulador negativo, reduzindo a resistência à determinados patógenos. Em resposta a ferimentos ou estresse abiótico, o ABA induz a transcrição de inibidores de peptidases, incluindo cistatinas, provavelmente envolvidos nos mecanismos de defesa. O ABA atua também na manutenção da dormência de sementes, controle da germinação e indução de síntese de proteínas de reserva durante a maturação da semente (HOOYKAAS *et al.*, 1999; DAVIES, 2004; BARI e JONES, 2009).

O ácido jasmônico (AJ) e seu principal derivado, o metiljasmonato (MeJA), são fitohormônios que atuam ativando a transcrição de genes envolvidos na defesa da planta em resposta a ferimento, herbivoria e patogênese. Dentre as principais vias reguladas pelos jasmonatos, a via de resposta a ferimentos é a mais estudada (AVANCI *et al.*, 2010). Os jasmonatos também atuam em processos fisiológicos como amadurecimento dos frutos, crescimento das raízes, desenvolvimento de flores, senescência e resposta a estresses abióticos como seca, frio e salinidade (WASTERACK, 2007).

O ácido salicílico (AS) tem sido estudado principalmente devido à sua função na resposta local e sistêmica da planta na defesa contra patógenos. O AS induz a expressão de genes de proteínas relacionadas à patogênese (PR, *Pathogenesis Related*) e a repressão de inibidores de peptidases (DOARES *et al.*, 1995; AN e MOU, 2011). Contudo, a resposta de resistência a patógenos pode ainda ser regulada por vias independentes de AS, ou ainda como resultado da interação do AS com outros fitohormônios (DURNER *et al.*, 1997; AN e MOU, 2011). Além disso, diversos trabalhos indicam a atuação do AS em processos como germinação, crescimento vegetativo, fotossíntese, respiração, termogênese, formação de flor, produção de semente e MCP não relacionada à resposta hipersensível (RIVAS-SAN VICENTE e PLASENCIA, 2011). Considerando a importância dos fitohormônios na regulação de diversos processos fisiológicos da planta, estes compostos vêm sendo amplamente utilizados para análise do perfil de expressão gênica e complementação da caracterização funcional de genes, em condições que mimetizam os processos que ocorrem naturalmente nas plantas.

Até o momento não há descrição das funções de legumainas em cana-de-açúcar. Considerando isto, a caracterização de peptidases recombinantes somada à análise de sua inibição por cistatinas endógenas e ao estudo da expressão gênica, durante o desenvolvimento da planta e em condições de exposição a fitohormônios, constituem uma etapa inicial na elucidação do papel destas enzimas na planta.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos gerais caracterizar uma legumaína de cana-de-açúcar, avaliar a inibição desta enzima por uma cistatina endógena, avaliar a localização e interação das proteínas cistatina e legumaína *in vivo* e, além disso, analisar o perfil de expressão dos genes destas proteínas durante o desenvolvimento da planta e após tratamento com fitohormônios. Nesse sentido, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Isolamento e caracterização de um clone proveniente do SUCEST contendo a ORF de uma provável legumaína
- Clonagem da ORF da legumaína em vetores para expressão em bactéria e levedura
- Expressão heteróloga em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*
- Produção de anticorpos policlonais contra a legumaína recombinante
- Purificação da proteína recombinante
- Determinação das condições ótimas de pH, temperatura e estabilidade térmica da enzima recombinante
- Caracterização cinética da enzima recombinante
- Ensaio de inibição da atividade enzimática da legumaína utilizando inibidores sintéticos e a cistatina de cana-de-açúcar CaneCPI-3
- Construção dos mutantes da CaneCPI-3 e de sua região C-terminal estendida e análise da atividade inibitória contra a legumaína

- Localização da legumaina ativa e da enzima mutante, fusionadas à GFP, em células vegetais
- Localização da CaneCPI-3 fusionada à GFP em células vegetais
- Análise da interação legumaina-cistatina em células vegetais utilizando a técnica de BiFC
- Análise da expressão dos genes da legumaina e *CaneCPI-3* por meio da técnica de PCR quantitativo durante o desenvolvimento da cana-de-açúcar
- Análise da expressão dos genes da legumaina e cistatina em plântulas tratadas com fitohormônios

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção do clone contendo a ORF da legumaína e sequenciamento

Após análise no banco de dados do projeto SUCEST e com base em informações descritas por Correa *et al.* (2001), o clone SCBFRT1071E03 que possui a região que codifica uma legumaína de cana-de-açúcar foi escolhido para estudo neste trabalho por apresentar a região 5' da ORF completa. O clone SCBFRT1071E03 foi obtido do banco de dados do projeto SUCEST junto ao *Brazilian Clone Collection Center* (BCCC), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus Jaboticabal.

O plasmídeo contendo o cDNA que codifica a legumaína de cana-de-açúcar, denominada CaneLEG, foi sequenciado para obtenção da ORF completa utilizando os oligonucleotídeos InterLEG-F, InterLEG-R e os oligonucleotídeos universais T7 promoter e SP6, específicos para o vetor pSPORT1 (Tabela 3.1). O método de sequenciamento utilizado foi o de terminação de cadeia utilizando o sequenciador Megabace Flexyble 1000 (GE Healthcare UK).

Tabela 3.1. Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento do clone SCBFRT1071E03

Nome	Sequência 5' – 3'
InterLEG-F	GCTGGGGTTCCAAAGGCATTACA
InterLEG-R	GAGACGGGTGGGACATCCCTTC
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	GATTTAGGTGACTATAG

3.2. Análise *in silico* da CaneLEG

Após sequenciamento completo do clone, a proteína predita CaneLEG foi analisada usando os programas Compute pI/Mw (GASTEIGER *et al.*, 2005), que determina a massa molecular e provável ponto isoelétrico da proteína, SignalP

(BENDTSEN *et al.*, 2004), que permite localizar na sequência protéica o provável peptídeo sinal, e NetNGlyc (GUPTA, 2004), que analisa a presença de possíveis sítios de N-glicosilação. As análises de similaridade da CaneLEG com outras legumainas foram realizadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o programa BLASTX (ALTSCHUL *et al.*, 1997). O alinhamento de sequência foi realizado utilizando o programa MultAlin (CORPET, 1988) e a figura foi gerada no programa ESPript 2.2 disponível em <http://esprpt.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>.

3.3. Clonagem da legumaina nos vetores de expressão heteróloga

Após obtenção da ORF da *CaneLEG* (item 3.1), foram desenhados oligonucleotídeos contendo sítios de restrição para amplificação por PCR da ORF da *CaneLEG*, sem o peptídeo sinal, para clonagem em vetores de expressão. Oligonucleotídeos direto, contendo o sítio de restrição para *EcoRI* (Pharmacia), e reverso, contendo o sítio de restrição para a enzima *NotI* (Pharmacia), foram utilizados para amplificação da ORF para clonagem nos vetores de expressão pET29a, pET28a, pET32a (Novagen) e pPICZαA (Invitrogen). As características básicas de cada vetor expressão estão descritas na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Características básicas dos vetores de expressão utilizados neste trabalho

Vetor	Resistência	Cauda de histidinas	Outros peptídeos de fusão
pET29a	canamicina	C-terminal	<i>S-tag</i>
pET28a	canamicina	N-terminal	<i>T7-tag</i>
pET32a	ampicilina	N-terminal	<i>Trx-tag</i> e <i>S-tag</i>
pPICZαA	zeocina	C-terminal	Fator α e <i>c-myc</i>

Para amplificação da ORF da *CaneLEG* e posterior clonagem nos vetores pET29a e pPICZαA, foram utilizados os oligos CLEG-F e CLEG-R. A ORF da *CaneLEG* sem o peptídeo sinal também foi clonada no vetor pPICZαA com uma cauda de histidina (*His-tag*) adicional, na região N-terminal da proteína, utilizando os oligos CLEG_{his}-F e CLEG-R. Os oligos CLEG-F e CLEG_{stop}-R foram utilizados para clonagem da *CaneLEG* nos vetores pET28a e pET32a. Os oligos utilizados para amplificação da ORF da *CaneLEG* estão listados na tabela 3.3.

Tabela 3.3. Oligonucleotídeos utilizados para clonagem da *CaneLEG* nos vetores de expressão

Nome	Sequência 5' – 3'*
CLEG-F	CGGAATTCCGCCACGCCTCGAGCCGAC
CLEG-R	AAATATGCGGCCGCGGCGCTAAAACCCTTGTCG
CLEG _{stop} -R	AAATATGCGGCCGCTTAGGCGCTAAAACCCTTGT
CLEG _{his} -F	CGGAATTCCATCATCATCATCATCGGCCACGCCTCGAGCCGACCATC

A PCR foi realizada num volume final de 25 µL contendo 10 ng de DNA, tampão de reação 1X (75 mM Tris-HCl pH 8,8 , 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (Promega), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo (Tabela 3.3) e 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas). O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial de 94°C por 3 min, seguida por 35 ciclos de 94°C 90 s (desnaturação), 52°C 2 min (hibridização), 72°C 90 s (extensão) e uma extensão final a 72°C por 10 min. Após a reação, os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% e visualizados sob luz UV.

O produto de PCR correspondente à *CaneLEG* foi purificado do gel de agarose utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega). Aproximadamente 4 µg do material purificado foi digerido com as enzimas de

restrição *EcoRI* e *NotI* para obtenção do fragmento correspondente à *CaneLEG* contendo extremidades coesivas, as quais permitiram a posterior clonagem direcional nos vetores de expressão previamente clivados com as mesmas enzimas de restrição.

Nas reações de clivagem para obtenção do fragmento da *CaneLEG* e dos vetores de expressão contendo extremidades coesivas foram utilizados 3 µg de DNA, 15 U *EcoRI* (Pharmacia), 10 U *NotI* (Pharmacia), tampão H 1X (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM NaCl), 0,01% BSA, 0,01% Triton X-100, em um volume final de 60 µL. As reações de clivagem foram mantidas a 37°C por 2 h para os vetores de expressão e *overnight* para a clivagem do produto de PCR da *CaneLEG*. Posteriormente, as reações de clivagem foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1% e os fragmentos correspondentes à *CaneLEG* e aos vetores de expressão foram recuperados do gel de agarose, com kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega), e utilizados nas reações de ligação. As reações de ligação foram realizadas em volume de 10 µL contendo 60 ng de inserto, 30 ng de vetor, tampão de reação 1X (40 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP) e 2,5 U de T4 DNA ligase (Fermentas), incubada por 16 h a 16°C.

Quatro µL das reações de ligação foram utilizados para transformar, por choque térmico, células de *Escherichia coli* DH5α competentes pelo método de cloreto de cálcio (CaCl₂) (SAMBROOK, 1989). As bactérias transformadas com as construções contendo o gene de interesse foram selecionadas em meio LB ágar (1% tripton, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7,0) contendo 25 µg/mL do antibiótico correspondente (ver Tabela 3.2) para os vetores pET29a, pET28a e

pET32a ou em meio LB ágar *low salt* (LB contendo 0,5% NaCl) com 25 µg/mL de zeocina, para o vetor pPICZαA. Para confirmar que o plasmídeo recebido pela bactéria continha o gene de interesse, foi realizado PCR das colônias. Dez colônias, de cada vetor de expressão, foram escolhidas e repicadas com palitos de dente estéreis em dez tubos de 0,2 mL contendo mistura para PCR e prosseguiu-se com a amplificação, como descrito acima. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1% e visualizados em luz UV.

Após confirmação por PCR, duas colônias positivas de cada construção foram crescidas por 16 h em 10 mL de meio de cultivo líquido, LB para vetores pET-*CaneLEG* e LB *low salt* para vetor pPICZαA-*CaneLEG*, contendo antibiótico. O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) e os plasmídeos recombinantes foram sequenciados para confirmação da ligação da ORF em correta fase de leitura com as regiões reguladoras dos plasmídeos de expressão.

3.4. Expressão heteróloga da CaneLEG em *E. coli*

Os vetores pET utilizados neste trabalho permitem a subclonagem direcional da ORF em fase com uma sequência que codifica uma “cauda” de seis histidinas (*His-tag*) na extremidade N-terminal ou C-terminal da proteína. Esta *His-tag* facilita a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade em resina contendo níquel. Além disso, os vetores escolhidos possuem outros peptídeos adicionais (tabela 3.2) utilizados para aumentar a solubilidade da proteína recombinante ou facilitar sua detecção por *immunoblotting*. Os peptídeos S (*S-tag*) e T7 (*T7-tag*), presente em alguns dos vetores permite detectar a proteína

recombinante por *Western blotting* utilizando os anticorpos específicos. A *Trx-tag*, presente no vetor pET32a, facilita a formação de ligação dissulfeto no citoplasma da célula bacteriana.

A cepa bacteriana escolhida para a expressão heteróloga da CaneLEG recombinante foi a *E. coli* Rosetta (DE3). Esta cepa possui o fragmento DE3 que codifica a RNA polimerase do bacteriófago T7, que permite a transcrição do gene subclonado nos vetores pET sob controle do promotor T7. A presença de uma mutação no gene da enzima lactose permease (*lacY1*) possibilita a entrada uniforme de IPTG na célula, ajustando o nível de expressão protéica. Além disso, esta cepa contém genes para tRNAs codificados em plasmídeo resistente a cloranfenicol, específicos para os códons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC e GGA, raramente utilizados pela *E.coli*, permitindo a expressão neste hospedeiro de genes heterólogos que possuam esses códons.

Para expressão da CaneLEG recombinante em *E. coli* os vetores pET-CaneLEG foram introduzidos, por choque térmico, em células Rosetta (DE3) CaCl₂ competentes. Uma colônia transformada foi crescida por 16 h em 10 mL de meio LB líquido contendo 25 µg/mL do antibiótico correspondente. Esta cultura foi utilizada para inocular 500 mL de LB líquido, contendo 25 µg/mL do antibiótico correspondente, que foi incubado a 37°C com uma agitação de 200 rpm até alcançar uma densidade óptica (DO_{600nm}) de 0,6. A indução da proteína recombinante ocorreu após a adição de 0,2 mM de isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG - Invitrogen) durante 3 h. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 15.000 g 4°C por 5 min, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 25 mL de tampão de lise (10 mM Tris, 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 8,0). A indução da proteína foi

confirmada por análise em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE 15%. As células foram lisadas a 0°C em um sonicador Sonic Dismembrator model 500 (Fisher Scientific) por 6 min com 20% de amplitude, pulsos de 59,9 s e intervalos de 30 s entre cada pulso. Após a lise, o material foi centrifugado a 20.000 g, 4°C por 15 min e o sobrenadante foi filtrado em membrana de PVDF 0,45 µm (Millipore). O sobrenadante recuperado após a lise das células bacterianas foi denominado de fração solúvel enquanto os restos celulares (*pellet*) constituem a fração insolúvel. A presença da proteína no sobrenadante foi verificada em SDS-PAGE 15%.

3.5. Produção de anticorpos policlonais anti-CaneLEG e *Western blotting*

Para produção de anticorpos policlonais, camundongos foram imunizados com proteína recombinante produzida em *E. coli*, utilizando o vetor de expressão pET29a. A proteína recombinante foi eletroeluída de gel de poliacrilamida. Após separação das proteínas da fração insolúvel em SDS-PAGE, o gel foi corado com azul de *comassie* R-250 e a banda correspondente à legumina foi recortada e colocada em membrana de diálise 14.000 MW (Pierce) contendo tampão de corrida 1X (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS). A membrana foi colocada em cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão do interior da membrana e submetida a 100 V por 5 h para remoção da proteína do gel (JENÖ e HORST, 1996). A quantidade de proteína eletroeluída foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) usando o reagente Bradford (Sigma).

A primeira imunização do camundongo foi realizada através da injeção inicial de aproximadamente 50 µg da proteína recombinante eletro-eluída, em adjuvante completo de Freund (Sigma). Após 45 dias, foram realizadas duas imunizações, com

intervalo de uma semana entre elas, através da injeção de aproximadamente 50 µg da proteína recombinante eletroeluída em adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Os anticorpos foram coletados dos animais uma semana após a última imunização. O sangue foi centrifugado a 1.500 g por 10 min a 4°C e o soro coletado e centrifugado novamente. Um µL de azida sódica 2% foi adicionado para cada µL de soro recuperado que, em seguida, foi armazenado a 4°C.

As amostras a serem analisadas por *Western blotting* foram previamente separadas em SDS-PAGE 15% ou 12% e transferidas para uma membrana de PVDF (Pierce) com tampão de transferência (20 mM Tris, 55 mM Glicina, 20% metanol) durante 2 h, a 150 mA, utilizando o sistema Mini Trans-Blot (BIO-RAD). Para avaliar a eficiência da transferência a membrana foi corada com solução de Ponceau S (0,5% Ponceau S, 0,1% ácido acético) e descorada com água destilada. A membrana foi bloqueada por 1 h em TBS 1X (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0) contendo 5% de leite Mólico desnatado (Nestlé). Após o bloqueio, a membrana foi lavada por 3 vezes (5 min cada) com TBS 1X e incubada durante 90 min com o anticorpo primário diluído 1:5.000 em TBS 1X. Em seguida, a membrana foi lavada como descrito anteriormente e incubada por 90 min com o anticorpo secundário anti-mouse IgG (Sigma), conjugado com a enzima fosfatase alcalina, numa diluição de 1:10.000. A membrana foi lavada e a interação antígeno anticorpo foi revelada utilizando o reagente 1-Step NBT/BCIP (Pierce).

3.6. Transformação de células competentes de *P. pastoris* com o vetor de expressão contendo o gene da CaneLEG

A levedura *P. pastoris* tem se mostrado um sistema eficiente para a expressão heteróloga de proteínas. Este sistema permite, quando comparado com

E. coli, um melhor enovelamento e processamento de proteínas eucarióticas e, ainda, torna possível a realização de glicosilação em proteínas secretadas, que não é obtida em sistemas de expressão procarióticos. Além disso, a possibilidade de integração dos vetores de expressão ao genoma da levedura aumenta a estabilidade das linhagens utilizadas na expressão heteróloga.

P. pastoris é uma levedura metilotrófica capaz de metabolizar o metanol como única fonte de carbono. O primeiro passo na metabolização do metanol é sua oxidação a formaldeído utilizando oxigênio molecular pela enzima álcool oxidase. Como a álcool oxidase tem uma baixa afinidade pelo O₂ a levedura produz uma grande quantidade desta enzima. O promotor que regula a expressão da enzima álcool oxidase é um dos utilizados para a expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris*. Esta levedura possui dois genes que codificam álcool oxidase o gene AOX1 e o AOX2, sendo que o primeiro desempenha maior parte da atividade de álcool oxidase na célula.

Para produção da proteína recombinante foi utilizada a linhagem de *P. pastoris* KM71H (*his4 arg4 aox1Δ::ScARG4*). A linhagem KM71H possui o *locus aox1* mutante, esta mutação resulta no fenótipo de crescimento lento na presença de metanol. Embora a linhagem KM71H possua baixa capacidade de metabolizar metanol, esta linhagem retém a capacidade de induzir uma alta expressão do promotor AOX1 na presença de metanol. Nas construções pPICZαA-*CaneLEG* e pPICZαA-*CaneLEG_{his}*, a ORF da legumina está sob controle da região promotora do gene AOX1, que permite a produção da proteína heteróloga em meio de cultivo contendo metanol como fonte de carbono. Além disso, a sequência foi clonada em fusão com o peptídeo sinal fator α, que permite a secreção da proteína no meio de

cultivo, com uma (pPICZ α A-*CaneLEG*) ou duas (pPICZ α A-*CaneLEG*_{his}) caudas de histidinas, para purificação em resina de níquel, e o peptídeo c-myc, para detecção da proteína por *Western blotting*.

Para transformação da linhagem de *P. pastoris* KM71H, os plasmídeos descritos acima foram linearizados com a enzima de restrição *PmeI* (New England Biolabs) para facilitar a recombinação homóloga com o genoma da levedura. A integração do vetor de expressão no genoma da levedura aumenta a estabilidade do transformante que, após seleção e confirmação do clone recombinante, não precisa ser mantido em meio seletivo. Para linearização foram utilizados 10 μ g de plasmídeo em uma reação com volume de 100 μ L contendo tampão-4 1X (20 mM Tris-acetato, 50 mM acetato de potássio, 10 mM acetato de magnésio, 1 mM DTT, pH 7.9), 100 μ g/ml BSA, 2 U/ μ L *PmeI* (New England Biolabs), incubada a 37°C por 4 h.

Após linearização, as construções foram precipitadas com acetato de sódio e etanol, para concentrar a amostra. À solução contendo o plasmídeo linearizado foi adicionado 1/10 do volume de reação de acetato de sódio 3 M pH 5,2, 2,5 volumes de etanol 100% gelado e a solução foi incubada por 10 a 15 min a -80°C e, em seguida, centrifugado a 16.200 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 500 μ L de etanol 80% gelado e centrifugado nas mesmas condições descritas acima. Após evaporação do etanol, o material foi ressuscitado em 10 μ L de água miliQ.

Aproximadamente 1 μ g de cada construção linearizada foi utilizado para transformar células de KM71H eletrocompetentes segundo protocolo descrito por Cregg (2007). Inicialmente, uma colônia de KM71H foi inoculada em 5 mL de meio YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose) e crescida a 30°C, 250 rpm

por 9 h. Cinquenta μL desta cultura foi utilizada para inocular 50 mL de YPD que foi mantido a 30°C com agitação de 250 rpm até uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1,2. Para uma medida mais precisa da $\text{DO}_{600\text{nm}}$, a cultura foi diluída 10 vezes em água antes da leitura em espectrofotômetro. A cultura foi centrifugada a $1.500\text{ g } 4^{\circ}\text{C}$ por 5 min e o sobrenadante descartado. Em seguida, as células foram ressuspensas gentilmente em 10 mL de YPD líquido contendo 170 mM HEPES e, em seguida, adicionou-se 250 μL de ditioneitol (DTT) 1M e prosseguiu-se com uma incubação a 30°C por 15 min sem agitação. O uso de DTT permite o aumento na eficiência de transformação, pois este composto tiol reduz as ligações dissulfeto, induzindo o aumento da porosidade da parede celular facilitando a entrada do DNA exógeno (GANEVA *et al.*,1995). Em seguida, ao meio contendo as células, adicionou-se água destilada gelada (estéril) totalizando um volume final de 50 mL e o material foi centrifugado nas mesmas condições descritas acima. As células coletadas foram lavadas uma vez com 25 mL de água destilada gelada (estéril) e uma vez com 2 mL de sorbitol 1 M e ressuspensas em 100 μL de sorbitol 1 M.

Para transformação, o DNA linearizado, em um volume de até 5 μL , foi misturado com 40 μL de células competentes e, em seguida, transferido para cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad) que foram incubadas em gelo por 5 min. A transformação das células competentes foi realizada por eletroporação no aparelho GenePulser II (Bio-Rad) nas seguintes condições: 1500 V, 25 μF , 200 Ω . Imediatamente após o choque, foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 M à cubeta e as células foram transferidas para um tubo de 15 mL e mantidas a 30°C por 2 h sem agitação. Para seleção dos transformantes 10, 25, 50, 100 e 200 μL de células foram espalhadas em placas de YPDS ágar (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2%

dextrose, 1 M sorbitol, 2% ágar) contendo 100 µg/mL de zeocina e incubadas a 30°C por 3 - 4 dias.

Para confirmação da inserção do plasmídeo contendo a ORF da *CaneLEG* no genoma da *P. pastoris* os clones obtidos após transformação foram analisados por PCR de colônia conforme descrito por Akada *et al.* (2000). Quinze colônias transformantes de cada construção foram repicadas com palito de dente estéril e colocadas em tubos de 1,5 mL contendo 20 µL de SDS 0,2%, recém-preparado. A solução contendo as células foi fervida por 3 min e centrifugada a 12.000 g por 30 s. Um µL do sobrenadante foi utilizado como molde na PCR num volume final de 25 µL contendo 1% triton X-100, tampão de reação 1X (75 mM Tris-HCl pH 8,8 , 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas). A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf) utilizando o programa: 94°C 3 min, 35 ciclos a 94°C 1 min, 52°C 90 s, 72°C 4 min, extensão final 72°C 7 min. Após a amplificação o material foi analisado em gel de agarose 1% e visualizado sob luz UV.

3.7. Expressão heteróloga em *P. pastoris* e purificação da proteína recombinante

Os clones positivos selecionados por PCR no item 3.6 foram testados para avaliar as condições de expressão da proteína recombinante. Uma colônia foi cultivada em 50 mL de meio BMGY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 100 mM tampão fosfato de potássio pH 7,0 ou 6,0, 1,34% YNB, 4 x 10⁻⁵% biotina, 1% glicerol), em Erlenmeyer de 500 mL, por 24 h a 30°C com agitação de 250 rpm. As

células foram centrifugadas a 1.500 g por 5 min e ressuspendidas em 10 mL de meio BMMY (BMGY com 0,5% metanol em substituição ao glicerol), em Erlenmeyer de 125 mL, e mantidas a 28 ou 26°C com agitação de 250 rpm. A cada 24 h foi adicionado metanol 100% à cultura para uma concentração final de 0,75%, para estimular a indução da proteína recombinante como descrito por Aoki *et al.* (2003). Após 144 h de indução, as alíquotas do sobrenadante coletadas em intervalos de 24 h foram analisadas em SDS-PAGE 12%, corado com azul de *comassie* R-250 ou nitrato de prata (OAKLEY *et al.*, 1980), e por *Western blotting* utilizando os anticorpos produzidos no item 3.5. As amostras a serem analisadas por *Western blotting* foram concentradas em centrifuga utilizando colunas Centricon YM-3000 MWCO (Millipore). O transformante com maior expressão foi utilizado para experimentos posteriores.

Para produção da proteína recombinante em maior quantidade, uma colônia selecionada acima, contendo a construção pPICZ α A-*CaneLEG_{his}*, foi crescida em 10 mL de BMGY, em frasco de 125 mL, por 24 h a 30°C com agitação de 250 rpm. Esta cultura foi utilizada para inocular 500 mL de BMGY (pH 7,0), em Erlenmeyer aletado de 2 L, que foi mantido nas mesmas condições. Para indução da proteína recombinante, as células foram coletadas por centrifugação a 1.500 g e ressuspendidas em 100 mL de BMMY, em Erlenmeyer aletado de 1 L. A indução da proteína recombinante foi realizada a 26°C com agitação a 250 rpm. A cada 24 h foi adicionado metanol 100% para uma concentração final 0,75%. Após 96 h de indução, o material foi centrifugado a 1.500 g e o sobrenadante filtrado em membrana de PVDF 0,45 μ m (Millipore).

A proteína CaneLEG recombinante (rCaneLEG_{his}), contendo uma seqüência de seis histidinas na região N-terminal e uma na região C-terminal, foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de níquel Ni-NTA superflow (Qiagen) a 4°C. À coluna pré-equilibrada, com 5 volumes de tampão de lise (pH 8,0), foi adicionado o sobrenadante da cultura induzida, previamente filtrado. Após ligação da proteína à resina, foi realizada uma lavagem da coluna com 3 volumes de tampão de lise e seguiu-se para eluição da proteína em tampão de lise contendo concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50, 75, 100, 250 mM), sendo 2 volumes das soluções com 10 a 100 mM e 3 volumes da solução com 250 mM de imidazol. As amostras eluídas foram analisadas em SDS-PAGE 12% corado com azul de *comassie*. A proteína purificada foi dialisada em membrana de diálise 14.000 MW (Pierce) contra 2 L de tampão citrato-fosfato (138,5 mM Na₂HPO₄, 61,5 mM ácido cítrico pH 6,4) a 4°C, realizou-se uma troca de tampão após 2 h de incubação e a diálise foi mantida *overnight*. A proteína dialisada foi esterilizada em membrana de PVDF 0,22 µm (Millipore)

3.8. Caracterização cinética da rCaneLEG_{his}

3.8.1. Determinação do pH ótimo

Para caracterização do pH ótimo para atividade catalítica da rCaneLEG_{his}, foram utilizados os tampões: citrato-fosfato (faixa de pH 3,0 a 7,0), Hepes 50 mM pH 7,5 e borato de sódio 50 mM (faixa de pH 8,0 a 9,0). Os ensaios foram realizados em cubeta de quartzo de 1 mL. A enzima recombinante (6,5 nM) foi pré-incubada por 5 min a 37°C em 450 µL de solução de reação contendo tampão, DTT 2,5 mM. O DTT é utilizado como agente redutor do resíduo de cisteína presente no sítio ativo

das cisteíno-peptidases. Em seguida, foi adicionado à reação 13 μM do substrato Z-Ala-Ala-Asn-MCA (Bachem). A velocidade de reação foi medida considerando a quantidade de MCA (7-amido-4-metilcoumarina) livre, proveniente da hidrólise do substrato pela enzima. A molécula de MCA livre quando excitada em um comprimento de onda (λ) de 360 nm emite fluorescência que pode ser detectada em λ 480 nm em espectrofluorímetro F-2500 (Hitachi). Desta forma, o aumento na fluorescência é proporcional à velocidade de reação (Figura 3.1). A inclinação das retas geradas no programa FL Solutions 2.0 a partir dos dados UAF vs tempo correspondem à velocidade da reação. Cada medida foi realizada em triplicata.

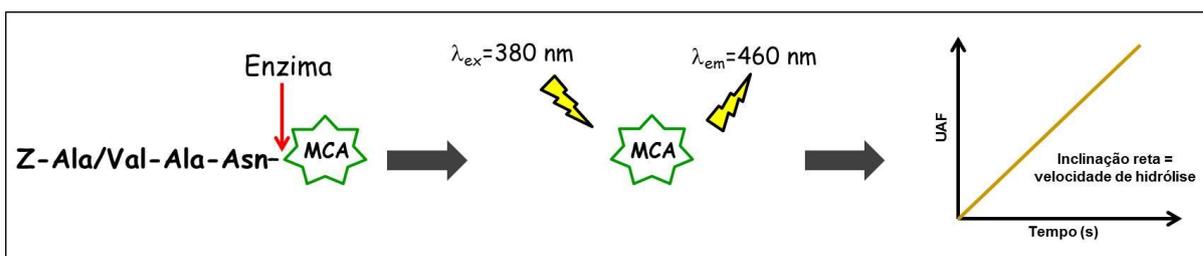


Figura 3.1. Determinação da atividade enzimática pela liberação do composto fluorescente MCA presente nos substratos utilizados neste estudo. Após liberação da molécula fluorescente pela clivagem do substrato pela enzima, o MCA livre é excitado em λ 380 nm e emite fluorescência em λ 460 nm. Com base nos dados de fluorescência o espectrofluorímetro gera um gráfico UAF vs tempo, e a inclinação da reta corresponde à velocidade da reação.

3.8.2. Determinação da temperatura ótima e estabilidade térmica

Para determinação da temperatura ótima, a atividade catalítica da rCaneLEG_{his} foi avaliada nas temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 37, 40, 45, 50, 55 e 60°C. A enzima foi pré-incubada por 10 min em cada temperatura em 450 μL solução de reação contendo tampão citrato-fosfato pH 6,5, 2,5 mM DTT, em seguida 13 μM do substrato Z-Ala-Ala-Asn-MCA foi adicionado e a leitura foi realizada, nas respectivas temperaturas citadas acima, em espectrofluorímetro F-2500 (Hitachi).

A rCaneLEG_{his} foi avaliada quanto a sua estabilidade térmica após incubação em diferentes temperaturas. Esta enzima foi incubada por 1 h nas temperaturas especificadas e, posteriormente, a atividade residual foi avaliada utilizando o substrato Z-Ala-Ala-Asn-MCA a 37°C como descrito acima. A atividade residual da enzima foi calculada a partir da inclinação das retas geradas com o programa FL Solutions 2.0 e expressa como porcentagem de atividade em relação ao controle. Como controles foram utilizados os dados de atividade da enzima mantida em gelo durante os ensaios. Cada medida foi realizada em triplicata.

3.8.3. Cálculo da constante de Michaelis-Menten (K_m) e da eficiência catalítica (k_{cat}/K_m)

A constante Michaelis-Menten (K_m) permite analisar a afinidade da enzima pelo substrato utilizado. O valor de K_m foi determinado com concentrações do substrato Z-Ala-Ala-Asn-MCA variando de 0,1 a 32 μ M, em 450 μ L de solução de reação contendo tampão citrato-fosfato pH 6,5 e DTT, como descrito no item 3.8.1. O valor de K_m foi determinado a partir de um gráfico da velocidade de reação vs [substrato], utilizando o programa Grafit (LEATHERBARROW, 2001).

A eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) da rCaneLEG_{his} na presença dos substratos Z-Ala-Ala-Asn-MCA e Z-Val-Ala-Asn-MCA foi calculada em condições de pseudo primeira ordem, onde a [substrato] $\ll K_m$. Os valores de k_{cat}/K_m foram calculados por análise de regressão não-linear utilizando o programa GraFit (LEATHERBARROW, 2001).

3.9. Ensaios de inibição da atividade catalítica da CaneLEG

Nos estudos de inibição da atividade catalítica da rCaneLEG_{his} foram utilizados os inibidores iodoacetamida (Sigma), o inibidor de caspase-1 Ac-YVAD-CHO (Bachem), CaneCPI-3, fitocistatina de cana-de-açúcar caracterizada por Gianotti *et al.* (2006) que apresenta motivo inibitório de legumaina descrito por Martinez *et al.* (2007), região N-terminal da CaneCPI-3 (CaneCPI-3Nterm) e região C-terminal da CaneCPI-3 (CaneCPI-3Cterm). Além disso, foi avaliada a atividade inibitória das proteínas mutantes CaneCPI-3 Δ N¹⁴¹ e CaneCPI-3Cterm Δ N¹⁴¹, obtidas como descrito no item 3.10, contra a rCaneLEG_{his}. Nos ensaios de inibição enzimática 6,5 nM de rCaneLEG_{his} foi pré-incubada com concentrações variadas dos inibidores por 5 min a 37°C em 450 μ L de solução de reação contendo tampão citrato-fosfato pH 6,5, DTT 2,5 mM. Após incubação, o substrato Z-Ala-Ala-Asn-MCA foi adicionado e a leitura da atividade catalítica residual realizada em espectrofluorímetro F-2500 (Hitachi). A atividade catalítica da enzima na ausência de inibidores, representada como 100% de atividade, foi utilizada como controle.

A constante de inibição aparente (K_{iap}) foi calculada baseada na fórmula $v_0/v_i = 1 + [I]_0/K_{iap}$, onde V_0 velocidade de reação na ausência de inibidor, V_i velocidade na presença de inibidor e $[I]$ corresponde à concentração de inibidor utilizada. Após obtenção dos valores de atividade catalítica da enzima na ausência e presença de inibidores, foi desenhado um gráfico $(v_0/v_i) - 1$ vs $[I]_0$ cuja inclinação da reta corresponde a $1/K_{iap}$. O K_i foi determinado a partir da fórmula $K_i = K_{iap}/(1 + [S]_0/K_m)$, utilizando o valor de K_m obtido no item 3.8.3 (BEYNON e BOND, 1990).

OBS: Para obtenção da proteína recombinante CaneCPI-3 foi utilizado o plasmídeo pET28a-CaneCPI-3 construído durante o doutorado de Andréia Gianotti e procedeu-se com a expressão e purificação da proteína recombinante como descrito em Gianotti *et al.* (2006). A expressão da proteína recombinante foi realizada em células de *E.coli* Rosetta (DE3) por 3 h a 37°C após a adição de IPTG, para uma concentração final de 0,2 mM. Em seguida as células foram coletadas e lisadas e a proteína recombinante purificada em resina de níquel (ver item 3.7). Os plasmídeos pET28a-CaneCPI-3Nterm e pET28a-CaneCPI-3Cterm foram construídos durante estágio de iniciação científica dos alunos de graduação Wendy Martin Rios e Daniel Espinosa, respectivamente. A expressão e purificação dos fragmentos da proteína CaneCPI-3, CaneCPI-3Nterm e CaneCPI-3Cterm, foram realizadas como descrito acima. As proteínas recombinantes CaneCPI-3 e variantes foram dialisadas em tampão PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) e esterilizadas por filtração em membrana de PVDF 0,22 µm (Millipore).

3.10. Mutagênese sítio dirigida

Para determinar o sítio ativo da CaneLEG, foi realizada a substituição do resíduo de cisteína 212 por um resíduo de serina, a enzima mutante foi denominada CaneLEG Δ C²¹² (Figura 3.2a). Além disso, o provável aminoácido responsável pela atividade inibitória de cistatina contra legumainas, o resíduo de asparagina 141 (N¹⁴¹), presente na região C-terminal estendida da CaneCPI-3, foi substituído por um resíduo de lisina (CaneCPI-3 Δ N¹⁴¹) (Figura 3.2b).

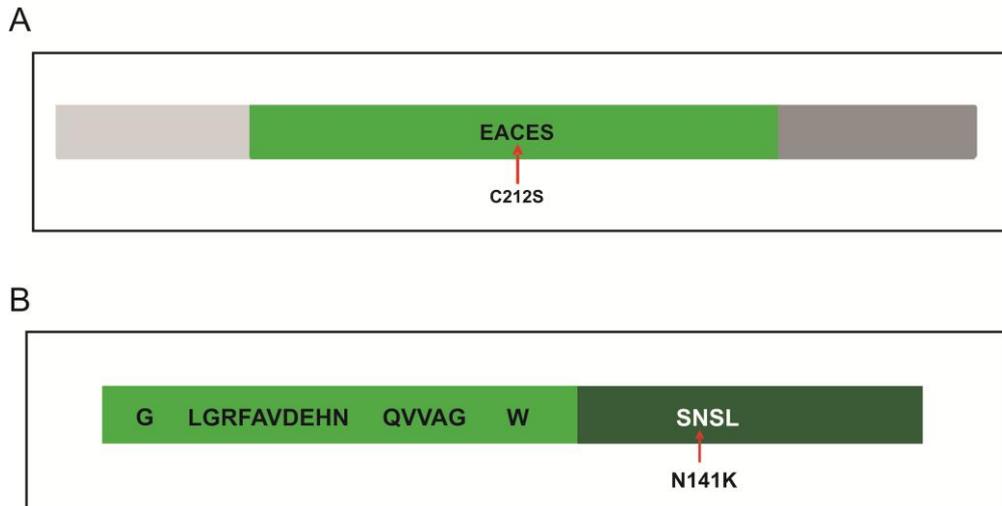


Figura 3.2. Esquema representativo das mutações realizadas nas proteínas CaneLEG e CaneCPI-3. (a) Esquema da estrutura da CaneLEG. Verde: proteína madura. Cinza claro e escuro: pró-peptídeos N e C-terminais, respectivamente. A seta vermelha indica o resíduo de cisteína mutado. (b) Representação da estrutura da CaneCPI-3. Verde claro: região N-terminal com motivos responsáveis pela inibição de enzimas do tipo papaína em destaque. Verde escuro: região C-terminal estendida, com provável motivo inibitório de leguminaína destacado em branco. A seta vermelha indica o resíduo de asparagina mutado.

As mutações foram inseridas utilizando o kit *GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen), que se baseia nas propriedades das enzimas DNA metilase e da endonuclease *McrBC*. O método consiste de uma reação de metilação e uma reação de mutagênese (PCR), na qual o plasmídeo metilado serve de molde para a amplificação utilizando oligos que se sobrepõem, sendo que um deles contém a mutação desejada. O produto da amplificação é então transformado na cepa bacteriana *E. coli* DH5 α TM-T1^R, que re-circulariza o DNA linear mutado e, através da atividade da endonuclease *McrBC*, digere o DNA metilado que serviu como molde na amplificação que gerou o DNA mutado (Figura 3.3).

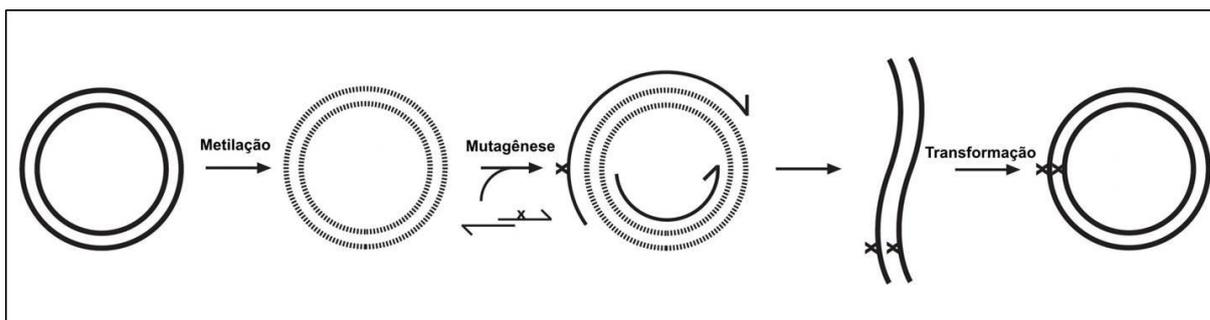


Figura 3.3. Procedimento realizado para obtenção dos clones mutantes utilizando o sistema GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis (Invitrogen). Figura adaptada do manual do kit.

Inicialmente, o plasmídeo contendo a ORF a ser mutada foi metilado numa reação contendo 100 ng do plasmídeo, S-adenosil metionina (SAM) 1X, tampão de metilação 1X, 4 U de DNA metilase, incubada a 37°C por 1 h. Para obtenção do plasmídeo mutante pPICZαA-*CaneLEG*ΔC²¹² foi utilizada a construção pPICZαA-*CaneLEG*_{his}. Os plasmídeos pET28a-*CaneCPI*-3, pET28a-*CaneCPI*-3Cterm foram utilizados para obtenção dos plasmídeos mutantes pET28a-*CaneCPI*-3ΔN¹⁴¹ e pET28a-*CaneCPI*-3CtermΔN¹⁴¹, respectivamente.

O plasmídeo metilado (12,5 ng) foi utilizado como molde numa reação de PCR com tampão de reação 1X, 300 μM de cada dNTP, 1 mM de MgSO₄, 0,3 μM de cada oligonucleotídeo, com programa de reação 94°C por 2 min seguidos de 25 ciclos de 94°C 30 s, 55°C 30s, 68°C 5 min e 30 s e extensão final a 68°C 10 min. O oligonucleotídeo direto continha a mutação a ser inserida, e o oligonucleotídeo reverso era complementar ao primeiro, gerando um produto dupla fita linear contendo a mutação desejada. Os oligos utilizados para mutagênese sítio dirigida estão descritos na tabela 3.4. Após a reação de mutagênese, o produto amplificado foi transformado na linhagem de *E. coli* DH5α™-T1^R. Após confirmação das colônias positivas por PCR, o DNA plasmidial mutado foi extraído e sequenciado para confirmar a inserção da mutação.

Os plasmídeos contendo a mutação foram utilizados para expressão heteróloga em *P. pastoris* (CaneLEG Δ C²¹²) e em *E. coli* Rosetta (DE3) (CaneCPI-3 Δ N¹⁴¹ e CaneCPI-3Cterm Δ N¹⁴¹) como descrito nos itens 3.7 e 3.9, respectivamente.

Tabela 3.4 Oligonucleotídeos utilizados para mutagênese sítio dirigida

Nome	Sequência
MutCLEG-F	<u>GGTCTTTTACCTTGAAGCAT</u> cCGAATCTGGGAG
MutCLEG-R	TGCTTCAAGGTAAAAGACCAGGCTTTTGT
MutNCPI3-F	<u>TCAATCCAAGAGAGGTCTAA</u> aTCCCTGTTTCCC
MutNCPI3-R	AGACCTCTCTTGGATTGATTTACAGCATG

Sublinhado região de sobreposição entre os pares de oligonucleotídeos.

A atividade catalítica da enzima CaneLEG mutada, CaneLEG Δ C²¹², foi avaliada em tampão citrato-fosfato pH 6,5 contendo 2,5 mM de DTT. Após incubação de 5 min, 13 μ M do substrato Z-Ala-Ala-Asn-MCA foram adicionados e a leitura da atividade catalítica foi realizada à 37°C em espectrofluorímetro F-2500 (Hitachi).

3.11 Localização de proteínas fusionadas a GFP em células vegetais e análise da interação legumaina-cistatina por BiFC

3.11.1 Clonagem e sequenciamento dos plasmídeos utilizados

Para avaliar a localização da CaneLEG e CaneCPI-3 em células vegetais essas proteínas foram expressas em células de cebola fusionadas à GFP. Além disso, foram realizados ensaios de complementação por fluorescência bimolecular (BiFC – *Bimolecular Fluorescence Complementation*) para avaliar a possível interação das proteínas CaneLEG e CaneCPI-3 nas células vegetais. As ORFs que codificam as proteínas CaneLEG e a CaneCPI-3, incluindo o peptídeo sinal, foram

amplificadas a partir dos clones SCBFRT1071E03 e SCSFHR1043A02, respectivamente. Foram utilizados oligonucleotídeos contendo sítio de restrição *Bam*HI (CLEGloc-F, CLEGloc-R), para *CaneLEG*, e *Bcl*I (CCPI3loc-F, CCPI3loc-R) para *CaneCPI-3* (Tabela 3.5). Para a reação de amplificação das ORFs utilizou-se o kit *GC-RICH PCR System* (Roche). A PCR foi realizada num volume final de 50 µL contendo 20 ng de DNA, 0,5 M *GC-RICH solution*, tampão *GC-RICH 1X* contendo $MgCl_2$ na concentração final de 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP (Promega), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e 2 U da Taq DNA polimerase *GC-RICH*. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial de 95°C 3 min seguida por 35 ciclos de 95°C 60 s, 52°C 90 s, 72°C 60 s e uma extensão final a 72°C por 7 min. Após a reação os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%. Os produtos de PCR foram recuperados do gel de agarose, utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega), e subclonados no vetor pGEM-T Easy (Promega). Após seleção, os clones recombinantes foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição e os fragmentos de interesse foram purificados e utilizados para clonagem nos plasmídeos CD3-327, CD3-N327 e CD3-C327 digeridos com *Bam*HI (DAVIS e VIESTRA, 1998).

Tabela 3.5. Oligonucleotídeos utilizados para clonagem da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* nos vetores CD3-327 e variantes

Nome oligonucleotídeo	Sequência 5'- 3'*
CLEG_loc-F	CGGGATCCATGGTGGCCGCTCGCCTCCGC
CLEG_loc-R	CGGGATCCCGGCGCTAAAACCCTTGTCGATAG
CLEGwcp-R	CGGGATCCCAACCAGAGGTTACCAGCTG
spCLEG-F	ATGGTGGCCGCTCGCCTCCGCCTCGCGCTGCTACTACTCTCCGT GTGCCTCTGCTCCGCGTGGGCGCGCCACGCCTCGAGCCGACC
CCPI3_loc-F	CGTGATCAATGCGCGTTGCCGCGACTCG
CCPI3_loc-R	CGTGATCACTGTAACACAACTACATTACTAC

O plasmídeo CD-327 (Figura 3.4) possui o gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP) sob o controle do promotor viral CamV35S e sequência terminadora do gene da nopalina sintase (NosT). A ORF da proteína a ser localizada foi inserida no sítio de restrição *Bam*HI, antes da sequência da GFP. Dessa forma, quando inserida em células vegetais, a proteína a ser localizada é expressa fusionada à GFP na sua região carboxi terminal. Os plasmídeos CD-N327 e CD-C327 são variantes do CD-327, diferenciando-se do primeiro por possuírem somente a região amino-terminal e carboxi-terminal da GFP, respectivamente. Estes vetores foram utilizados nos experimentos de interação por BiFC.

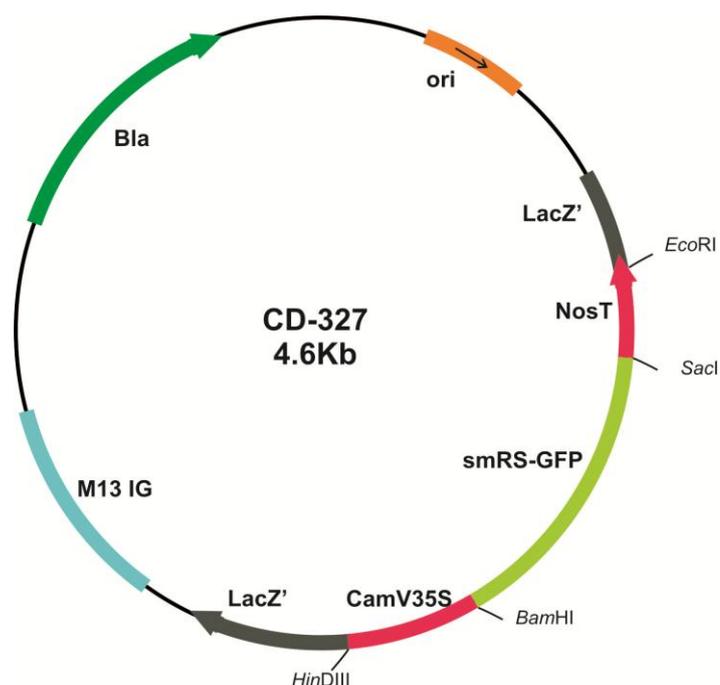


Figura 3.4. Estrutura básica do plasmídeo CD-327 e variantes utilizados para os ensaios de localização celular e BiFC.

A partir da informação de que as legumainas se auto-ativam *in vitro* e que isso acarreta na liberação do propéptido C-terminal, foi realizada a clonagem da ORF da *CaneLEG* sem a provável região do pró-peptídeo (*CaneLEGwcp*). Para isso,

a região correspondente à *CaneLEG* sem o pró-peptídeo C-terminal foi amplificada utilizando os oligos (CLEGloc-F e CLEGwcp-R, ver Tabela 3.5) para clonagem nos vetores CD3-327, CD3-C327 e CD3-N327, como descrito acima.

Além disso, foi realizada a clonagem da sequência mutante *CaneLEG Δ C²¹²* no vetor CD3-327. Foi necessária a adição da sequência que codifica o peptídeo sinal da proteína à sequência do mutante *CaneLEG Δ C²¹²*. Este mutante foi produzido sem a região correspondente ao peptídeo sinal para expressão em *P. pastoris* (ver item 3.10). A adição do peptídeo sinal na construção *CaneLEG Δ C²¹²* foi realizada por PCR utilizando os oligonucleotídeos spCaneLEG-F e CLEG_loc-R (Tabela 3.5). O plasmídeo pPICZ α - *CaneLEG Δ C²¹²* foi utilizado como molde na reação de amplificação, como descrito acima.

Para as análises de interação entre a *CaneLEG* e a *CaneCPI-3*, as ORFs de interesse foram fusionadas, cada uma, aos fragmentos N-terminal ou C-terminal da GFP, como descrito por Diaz *et al.* (2005). Caso ocorra interação peptidase-inibidor o que se observa é a emissão de fluorescência verde devido à aproximação das regiões N-terminal e C-terminal da GFP.

Para comparação com os resultados obtidos para as proteínas de cana-de-açúcar, foi realizada a clonagem nos vetores CD3-327 e CD3-N327 da ORF da legumaina de cevada *HvLEG-2* (número acesso GenBank CAQ00097) e no vetor CD3-C327 da ORF da cistatina de cevada *HvCPI-4* (número acesso GenBank CAG38130). A clonagem da ORF *HvLEG-2* e da forma variante *Hv-LEG2wcp* (sem o propetídeo C-terminal) foi realizada como descrito acima utilizando os oligonucleotídeos (*HvLEG-2-F*, *HvLEG-2-R* e *HvLEG-2wcp-R*) listados na tabela 3.6. Para clonagem da ORF da *HvCPI-4* no vetor CD3-C327, o fragmento

correspondente à ORF foi obtido a partir de digestão do plasmídeo CD-327-*HvCPI-4*, previamente construído por Martinez *et al.* (2009), com a enzima *Bam*HI. A reação de digestão e clonagem da ORF da *HvCPI-4* no plasmídeo CD-C327 foi realizada como descrito acima.

Tabela 3.6. Oligonucleotídeos utilizados para clonagem da HvLEG-2 nos vetores CD3-327 e variantes

Nome oligonucleotídeo	Sequência 5'- 3'*
HvLEG-2-F	CGGGATCCATGGACTCGAGGGTGCCGATG
HvLEG-2-R	CGGGATCCC GAACCAGAGGGTTCCACTTC
HvLEG-2wcp-R	CGGGATCCC GACCAATGGCTGGC

O esquema das construções utilizadas para localização ou análise de BiFC está representado na figura 3.5. Todos os plasmídeos construídos neste item foram confirmados por digestão com enzimas de restrição e sequenciamento.



Figura 3.5. Esquema da construção dos plasmídeos CD-327 e variantes contendo os genes das legumainas e das cistatinas. (a) Construções para localização e análise por BiFC das legumainas CaneLEG e HvLEG-2. Em amarelo com bordas sítios da enzima de restrição; PS peptídeo sinal; Cinza claro e escuro: pró-peptídeos N e C-terminal das legumainas, respectivamente; Verde: proteína madura; Verde fluorescente: GFP inteira ou fragmento N/C-terminal; CamV35S: promotor viral; NosT: sequência terminadora da nopalina sintase. (b) Construções para localização e análise por BiFC da CaneCPI-3 e análise por BiFC da HvCPI-4. Estrutura como descrito em (a).

3.11.2 Preparo das partículas de ouro recobertas com DNA para bombardeamento das células vegetais

Para preparo das partículas carreadoras, 30 mg de partículas de ouro 1 μm (BIO-RAD) foram lavadas com 1 mL de etanol 100% e centrifugadas à 12.000 g por 5 s. Em seguida, as partículas foram lavadas duas vezes com 500 μL de água miliQ estéril e ressuspensas em 500 μL de água miliQ, para resultar numa concentração final de 60 mg/mL. Após o preparo, as partículas de ouro foram sonicadas para manter o ouro em solução e evitar a formação de agregados.

Para recobrir as partículas de ouro com o DNA de interesse foram utilizados 12 μL de solução de ouro 60 mg/mL, 25 μL CaCl_2 2,5 M estéril, 10 μL de espermidina 100 mM e 2,5 μL de DNA a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Antes de pipetar as partículas de ouro estas foram sonicadas e rapidamente coletou-se o volume necessário que foi colocado no fundo do tubo Eppendorf de 1,5 mL. Os demais componentes foram adicionados em diferentes locais da parede do tubo, mantido na posição horizontal, sem permitir que se misturassem e, em seguida, o tubo foi rapidamente colocado em posição vertical e imediatamente agitado em vortex por 1 - 2 min. As partículas recobertas com DNA foram centrifugadas por 5 s, o sobrenadante foi descartado e as partículas lavadas com 50 μL de etanol 100% e ressuspensas em 50 μL de etanol 100%.

3.11.3 Transformação de células da epiderme de cebola e análise da expressão transiente

As partículas de ouro recobertas com as construções obtidas no item 3.11.2 foram utilizadas para transformação de células da epiderme de cebola utilizando o

bombardeador de partículas PSP-1000/He System (BIO-RAD) (Figura 3.6), como descrito por Diaz *et al.* (2005). As cebolas utilizadas nos experimentos foram compradas no mercado local (Madri, Espanha). Foi utilizada a terceira camada da cebola para evitar contaminação do material. Esta camada foi cortada em pedaços e com uma pinça foi retirada a epiderme da face interna (voltada para o centro da cebola) e colocada em meio MS^{1/2} (0,22% meio Murashige & Skoog (Duchefa Biochemie), 1% sacarose, 0,7% ágar, pH 5,69 - 5,85), com a face externa da epiderme voltada para o meio de cultivo. Foram utilizados 7 µL de partículas de ouro recobertas com DNA, que foi colocado no centro do macrocarreador e após evaporação do etanol da amostra, iniciaram-se os disparos contra o tecido biológico (Figura 3.6). A transformação foi realizada nas seguintes condições vácuo a 25 mm Hg e pressão 1100 psi.

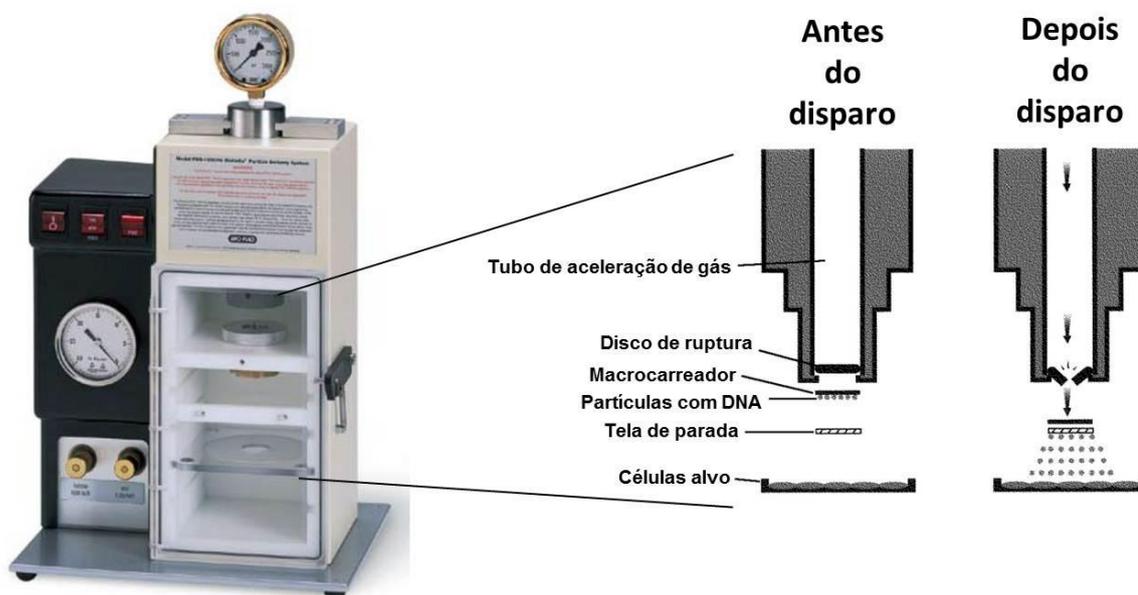


Figura 3.6. Esquema transformação de células vegetais utilizando o sistema PSP-1000/He (BIO-RAD). Este sistema utiliza gás hélio em alta pressão, que é liberado por um disco de ruptura, e vácuo para impulsionar um macro-carreador coberto com micropartículas de ouro para as células-alvo em alta velocidade. As micropartículas de ouro estão cobertas com DNA para transformação. O macrocarreador é barrado pela tela de parada e as micropartículas cobertas com o DNA continuam o trajeto até penetrarem e transformarem as células-alvo.

Após a transformação as amostras foram mantidas no escuro a 22°C por até 48 h. As células foram visualizadas 24 h e 48 h após o disparo, em microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot utilizando o conjunto de filtros BP 450/90, FT 510, LP 520. As imagens foram capturadas com a câmera DFC300 FX CCD utilizando o software Leica Application Suite 2.8.1 build 1554. Além disso, as amostras foram analisadas em microscópio confocal de varredura a laser Zeiss 710. As imagens de cortes ópticos das células de cebola foram obtidas no eixo Z por toda a célula e analisadas utilizando-se o software *Zen 2009 Light Edition* (Carl Zeiss). Como controle positivo foram utilizadas células transformadas com plasmídeo psmRS-GFP CD3-327. O plasmídeo psmRS-HDEL_RFP, contendo o sinal HDEL, sinal de retenção no retículo endoplasmático, fusionado à proteína fluorescente vermelha foi co-bombardeado com as construções utilizadas nos experimentos de localização das proteínas.

OBS: Os ensaios de localização celular e BiFC foram realizados na Universidade Politécnica de Madri, sob orientação da professora Dra. Isabel Diaz, como parte do meu estágio de Doutorado sanduíche financiado pelo CNPq. As análises em microscópio confocal foram realizadas com auxílio do professor Dr. Pablo Melendi.

3.12. Análise da expressão dos genes *CaneLEG* e *CaneCPI-3* em diferentes tecidos da cana-de-açúcar e em plântulas tratadas com fitohormônios

3.12.1 Condições de crescimento, tecidos e fases do desenvolvimento da cana-de-açúcar

A variedade comercial de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) RB867515 foi utilizada em todos os experimentos. As plantas utilizadas para análise da expressão

gênica durante o desenvolvimento da cana-de-açúcar foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Silvana Perissatto Meneghin, UFSCar *campus* Araras.

As plantas utilizadas para análise da expressão gênica em diferentes tecidos durante o desenvolvimento, foram cultivadas em vasos de 32 L contendo Latossolo Vermelho distroférico no *campus* da UFSCar em Araras SP. As plantas foram mantidas em condições de luz natural e temperatura ambiente durante os meses de julho de 2010 a abril de 2011. Os tecidos foram coletados em quatro períodos do desenvolvimento da planta, determinados de acordo com Diola e Santos (2010):

- Fase I ou fase de germinação e estabelecimento (25 DAP): neste estágio foram coletadas folha e bainha.
- Fase II ou fase de perfilhamento (90 DAP): neste estágio foram coletados folha, cartucho foliar (*leaf roll*), bainha da raiz (*root band*), broto (gema lateral em brotamento), entrenó, gema lateral e meristema apical (e tecidos circundantes).
- Fase III ou fase de crescimento dos colmos (180 DAP): neste estágio foram coletados folha, cartucho foliar (*leaf roll*), bainha da raiz (*root band*), entrenó, gema lateral e meristema apical (e tecidos circundantes).
- Fase IV ou início da fase de maturação dos colmos (270 DAP): neste estágio foram coletados folha, cartucho foliar (*leaf roll*), bainha da raiz (*root band*), entrenó, gema lateral e meristema apical (e tecidos circundantes).

Após a coleta todos os tecidos foram imediatamente congelados em N₂ líquido e armazenados a -80°C.

3.12.2 Tratamento de plântulas de cana-de-açúcar com fitohormônios

As plântulas de cana-de-açúcar utilizadas para tratamento com fitohormônios foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Lee Tseng Sheng Gerald, UFSCar *campus* Araras. As plântulas foram obtidas como descrito por Lee (1987). Para obtenção dos explantes de cana-de-açúcar um tolete da variedade RB867515 contendo gema lateral foi lavado e esterilizado em solução de hipoclorito comercial a 20% (cloro ativo 2 a 5%) por 40 min e, em seguida, colocado para germinar em incubadora à temperatura entre 37 - 40°C. Após germinação, 2 - 3 mm de tecido correspondente ao meristema apical foram extraídos com auxílio de um microscópio estereoscópico. Para desenvolvimento do meristema este foi mantido em solução MP11 (Tabela 3.7) por 30 - 45 dias em incubadora com fotoperíodo de 16 h, intensidade de luz a 37.5 $\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ e temperatura de crescimento entre 25 - 28°C. Após este período as plântulas foram transferidas para frascos estéreis de 6 x 10cm, contendo solução MP11. Esta solução contém reguladores de crescimento, o que permite um rápido perfilhamento das plântulas.

Aproximadamente 15 dias após o perfilhamento, as plântulas foram transferidas para a solução de enraizamento MR (Tabela 3.7). Vinte dias após incubação em meio MR, as plântulas enraizadas foram colocadas em tubos de ensaio contendo solução MR fresca e utilizadas para tratamento com fitohormônios. À solução MR foi adicionado fitohormônio diluído em etanol para uma concentração final de 100 μM . A concentração de fitohormônio a ser utilizada foi determinada baseado nos trabalhos realizados por Rocha *et al.* (2007) e Schlögl *et al.* (2008). As plântulas foram tratadas com ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS) e ácido giberélico (GA3) (Sigma). Três plântulas de cada condição

foram coletadas após 3 h e 24 h de tratamento. As plântulas controle foram tratadas com o mesmo volume de diluente, etanol, e coletadas nos períodos descritos acima. Após coleta as plântulas foram congeladas em N₂ líquido e mantidas a -80°C.

Tabela 3.7. Composição dos meios de cultivo para obtenção das plântulas de cana-de-açúcar.

Componentes	MPII (mg/L)	MR (mg/L)
<i>Macronutrientes</i>		
KNO ₃	1900	950
NH ₄ NO ₃	1650	825
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	220
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	185
KH ₂ PO ₄	170	85
<i>Micronutrientes</i>		
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	37,3	18,6
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8	13,9
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6
KI	0,83	0,83
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025
<i>Vitaminas, Hormônios e outros componentes orgânicos</i>		
Tiamina	1	-
Inositol	100	-
Cinetina	0,1	-
BAP	0,2	-
Sacarose	20000	20000
pH	5,8	4,0

3.12.3 Extração de RNA total de cana-de-açúcar

O RNA total das plantas coletadas no item 3.12.1 e 3.12.2 foi purificado utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen). Este reagente é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Durante a homogeneização/lise da amostra, o

TRIzol mantém a integridade do RNA enquanto lisa as células e dissolve os componentes celulares. A adição de clorofórmio após a centrifugação separa a solução em uma fase aquosa e outra orgânica. O RNA permanece na fase aquosa e pode então ser precipitado usando álcool isopropílico.

Os tecidos de cana-de-açúcar congelados foram homogeneizados a pó fino em N₂ líquido utilizando-se gral e pistilo previamente resfriados. Em seguida, o tecido macerado foi transferido para um tubo de 1,5 mL e pesado. Para cada 200 - 300 mg de tecido macerado adicionou-se 1 mL de TRIzol e a amostra foi homogeneizada em vortex e incubada por 5 min à temperatura ambiente, para completa dissociação do complexo ácido nucleico-proteína. Após incubação, a amostra foi centrifugada a 12.000 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante transferido para um tubo novo. Ao sobrenadante adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio, a mistura foi homogeneizada por inversão dos tubos e incubada por 3 min à temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 12.000 g, 4°C durante 15 min, a fase superior aquosa foi transferida para um tubo estéril e o RNA foi precipitado pela adição de 0,5 mL de álcool isopropílico. Após incubação por 10 min à temperatura ambiente, a solução foi centrifugada a 12.000 g, 4°C durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado foi lavado pela adição de 1 mL de etanol 75% e centrifugado por 5 min a 7500 g e 4°C. Por último, o sobrenadante foi removido e o RNA diluído em 50 µL de água DEPC. A solução de RNA foi incubada a 55°C durante 10 min para completa dissolução do ácido nucleico.

Para eliminar possível contaminação do RNA com DNA, 3 µg de cada amostra de RNA foram tratados com a enzima DNase I *amplification grade* (Invitrogen), em um volume de reação de 30 µL. Em cada tubo foram adicionados 3

μL de DNase I (1U/ μL) e 3 μL do tampão de reação 10x. Os tubos foram incubados 15 min a temperatura ambiente e a enzima foi posteriormente inativada pela adição de 3 μL de EDTA 25 mM e incubação a 65°C por 10 min. A integridade do RNA foi analisada em gel de agarose 1% e a quantificação do mesmo foi feita através da leitura em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) em comprimento de onda de 260 nm. A pureza do RNA foi confirmada através da razão das leituras a 260 e 280 nm.

3.12.4. Síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada pela técnica de RT-PCR com o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), que utiliza oligonucleotídeos randômicos para iniciar a síntese do cDNA. Na reação de síntese de cDNA foram utilizados 500 ng de RNA total, tampão da enzima transcriptase reversa 1X, dNTPs 2,5 mM, oligonucleotídeo randômico 1X, transcriptase reversa MultiScribe™ 2,5 U/ μL , inibidor de RNase 1 U/ μL em um volume final de 20 μL . A reação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf) com o seguinte programa 25°C 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min.

3.12.5 Análise quantitativa de transcritos por PCR (qPCR)

Para a qPCR foi utilizado o kit *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen) que contém todos os reagentes necessários para a reação, exceto os oligonucleotídeos. Este kit contém o fluoróforo *SYBR Green I*, que emite fluorescência ao se ligar ao DNA dupla fita, a enzima uracil-N-glicosidase (UDG) e dUTP em substituição ao dTTP. A enzima UDG remove resíduos de uracila

presentes em moléculas de DNA fita simples ou dupla, evitando que DNA contendo uracila, resultante de amplificações prévias, sirva como molde na reação. Após o passo de descontaminação, a UDG é inativada por altas temperaturas durante os passos da qPCR, permitindo assim a amplificação de sequências genuínas. A qPCR foi realizada em volume de 10 μ L contendo 2 μ L de cDNA, *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG 1X* e 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo. A reação de amplificação foi realizada no aparelho Eco Real-Time System (Illumina) nas seguintes condições: incubação da UDG durante 2 min a 50°C, ativação da polimerase por 2 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C e 40 s a 72°C. A especificidade das amplificações foi confirmada por meio da análise da curva de dissociação (*melting*) que consistiu de um ciclo de 15 s a 95°C, 15 s a 55°C e 15 s a 95°C, como recomendado pelo fabricante do equipamento.

A análise da curva de dissociação obtida no aparelho Eco Real-Time System (Illumina) permitiu determinar se o produto de PCR desejado estava livre de produtos de amplificação inespecíficos como dímeros de primers. Os produtos de PCR podem ser analisados pela curva de dissociação, pois cada molécula de DNA dupla fita tem uma temperatura de dissociação característica (T_m), na qual 50% das moléculas de DNA estão como dupla fita e 50% está dissociada, isto é, fita simples. Durante o processo, a mistura de reação é lentamente aquecida até 95°C e a fluorescência monitorada durante todo o processo. À medida que os produtos amplificados começam a desnaturar, o *SYBR Green* é liberado do DNA dupla fita, o que resulta na diminuição da fluorescência. Uma forte diminuição na fluorescência do SYBR é observada quando a temperatura alcança a T_m do produto de PCR presente na reação. A curva de dissociação de cada produto depende do conteúdo

de GC, tamanho e sequência, permitindo a distinção de produtos de amplificação específicos dos não específicos.

3.12.6 Critérios para desenho dos oligonucleotídeos e padronização da qPCR

Os oligonucleotídeos utilizados para as qPCR (tabela 3.8) foram desenhados com o programa Primer3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000), disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>. Para desenho dos oligonucleotídeos foi considerado: a ausência de complementaridade interna, % de GC, tamanho entre 18 - 20 bases, a temperatura de desnaturação T_m (55 - 61°C) e o tamanho do amplicon (75 - 150 pb). Os oligonucleotídeos ScVPE (-F e -R) foram utilizados para análise da expressão gênica da *CaneLEG* enquanto os oligos ScCPI3 (-F e -R) e Poliub (-F e -R) foram utilizados para análise da expressão dos genes *CaneCPI-3* e poliubiquitina, respectivamente. O gene da poliubiquitina foi utilizado como controle endógeno (PAPINI-TERZI *et al.*, 2005).

Tabela 3.8. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR

Nome oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'
ScCPI3-F	GGTTGTGGGAGGACTTTGC
ScCPI3-R	CGGCTGATGCTGGTTTAGC
ScVPE-F	TGGAGTTGCCTCAAGTCCATG
ScVPE-R	GATGCCAGCGTTGCAGATG
Poliub-F	CCCTCTGGTGTACCTCCATTTG
Poliub-R	CCGGTCCTTTAAACCAACTCAGT

O *SYBR Green* é um corante que se liga ao sulco menor da dupla fita de DNA sintetizado durante a reação de amplificação. Quando o *SYBR Green* se liga a molécula de DNA dupla fita a intensidade da emissão de fluorescência aumenta. O

aparelho de qPCR realiza a leitura da fluorescência ao término de cada ciclo de amplificação e a partir dos dados de fluorescência uma curva de amplificação é gerada. Para as análises de expressão gênica é utilizada a fase exponencial da reação, na qual a especificidade e precisão da reação são mais altas. A qPCR depende da habilidade do aparelho detectar o ciclo de amplificação no qual a quantidade de produto de PCR é suficiente para gerar um sinal acima de um limite arbitrário (*threshold*), que torna possível diferenciar a fluorescência resultante da amplificação daquela proveniente do ruído de fluorescência basal. O ciclo da reação no qual o sinal pode ser diferenciado da fluorescência basal, isto é quando ultrapassa o *threshold*, é denominado Ct (ou *cycle threshold*). Os valores de Ct obtidos após cada amplificação são utilizados para quantificar os níveis de mRNA. O valor de Ct é maior quanto menor for a quantidade de cDNA molde presente no início da reação, pois mais tempo é necessário até que a quantidade de fluorescência, resultante da quantidade de produto de PCR, seja suficiente para ultrapassar o *threshold*. Para uma reação de qPCR com eficiência de 100% a quantidade de produto dobra a cada ciclo.

A eficiência das reações de amplificação utilizando os oligonucleotídeos descritos na tabela 3.8, foi avaliada pelo método de diluição de cDNA (Figura 3.7). Este método é baseado na construção de uma curva padrão (Ct x quantidade cDNA), utilizando como molde nas reações de amplificação diluições seriadas de uma amostra de cDNA. A inclinação da reta (IR) obtida foi utilizada para calcular a eficiência da reação de acordo com a fórmula $E = 10^{[-1/IR]} - 1$. Uma IR de -3,3 corresponde a 100% de eficiência, significando que o número de moléculas molde dobra a cada ciclo da qPCR. No entanto, valores de IR entre $-3,3 \pm 0,3$ são

aceitáveis. Idealmente, a curva padrão deve ser linear com um valor de $R^2 > 0,99$ (PFAFFL, 2006). Neste trabalho, as qPCR foram otimizadas para uma eficiência entre 90 e 100%, $R^2 > 0,95$ e IR entre -3,0 e -3,6.

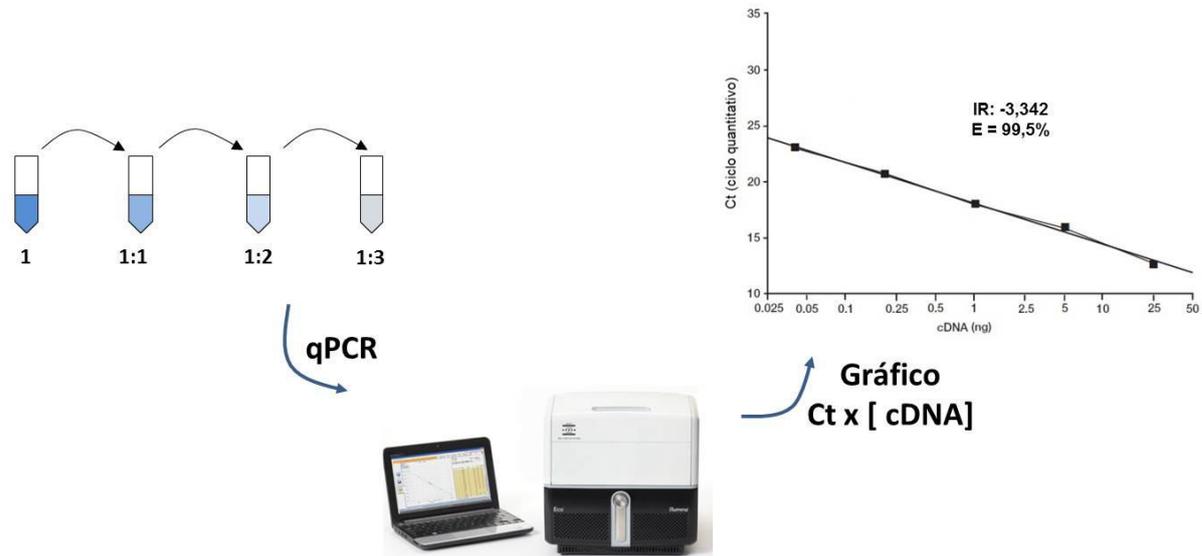


Figura 3.7. Análise da eficiência da reação de qPCR pelo método de diluição. As amostras de cDNA foram diluídas e utilizadas como molde nas reações de qPCR com cada conjunto de oligos a ser analisado. A curva padrão (Ct x quantidade de cDNA) foi gerada pelo software Eco versão 3.0 a partir da qual foram calculados a IR (inclinação da reta), eficiência de reação e R^2 .

3.12.7. Análise dos dados de qPCR

Os níveis de expressão relativa dos genes *CaneLEG* e *CaneCPI-3* foram calculados de acordo com o método do delta Ct (ΔCt) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN e LIVAK, 2008). Para determinação do nível de expressão relativa, a expressão de um gene de interesse é comparada a um gene de referência (controle endógeno). Após a obtenção dos valores de Ct, a média dos valores de Ct do gene alvo (*CaneLEG* ou *CaneCPI-3*) foi normalizado com a média dos valores de Ct do gene de referência (poliubiquitina), o que corresponde ao $\Delta Ct_{\text{médio}}$ ($Ct_{\text{médio alvo}} - Ct_{\text{médio gene referência}}$). O gene da poliubiquitina foi escolhido como controle endógeno por apresentar expressão homogênea nos tecidos analisados (PAPINI-TERZI *et al.*, 2005). Os valores de expressão relativa dos genes *CaneLEG* e *CaneCPI-3* nos

tecidos da planta durante o desenvolvimento foram expressos como potência de dois ($2^{-\Delta Ct}$) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN e LIVAK, 2008).

Para análise da expressão gênica nas plantas tratadas com fitohormônios foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). O $\Delta\Delta Ct$, além de realizar a normalização dos valores de Ct do gene alvo em relação ao controle endógeno, permite a normalização expressão gênica de determinada condição com a condição que se quer comparar, como descrito abaixo:

1° calcula-se o ΔCt das plantas tratadas e ΔCt das plantas não-tratadas com fitohormônios, como descrito acima;

2° os valores de expressão das plantas tratadas são normalizados em relação ao grupo controle, que resulta no $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tratado}} - \Delta Ct_{\text{não-tratado}}$$

3° Em seguida, os valores de $-\Delta\Delta Ct$ foram utilizados como potência de dois ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), que indica quantas vezes os genes em estudo foram mais ou menos expressos nas plantas tratadas quando comparados com a expressão nas plantas não-tratadas (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

A análise da expressão gênica após tratamento com fitohormônios foi realizada no programa *Relative Expression Software Tool* (REST) versão 2.0.13 da Qiagen (PFAFFL *et al.*, 2002). Este *software* calcula a expressão relativa de genes pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ levando em consideração a eficiência de reação calculada no item 3.12.6. Além disso, o programa permite analisar se existe diferença significativa entre as plantas tratadas e as plantas controle. Na tabela de resultados o programa disponibiliza os valores do teste de hipótese ($P(H1)$), que representa a probabilidade da hipótese de que a diferença entre a amostra tratada e o grupo controle seja

devido ao acaso. Considerou-se significativa a alteração da expressão gênica resultante de tratamento com fitohormônios quando os valores obtidos de P(H1) foram menores que 0,05, em intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS

4.1 Análise *in silico* da sequência da CaneLEG

A seleção do clone contendo a ORF que codifica legumaina de cana-de-açúcar foi baseada em informações descritas por Correa *et al.* (2001). Os autores analisaram vários *clusters* de legumainas e após análise da frequência desses grupos no banco de dados do SUCEST verificaram que o *cluster* SCJLLR1054F03.g foi o mais frequente nos tecidos estudados. Deste modo, o clone SCBFRT1071E03 (GCA131429) pertencente a este *cluster*, identificado a partir de uma biblioteca de raiz (RT1) da variedade de cana-de-açúcar SP80-3280 (VETTORE *et al.*, 2003), foi escolhido por possuir a região 5' da ORF completa.

A sequência de cDNA contida no clone selecionado (Figura 4.1) contém uma ORF de 1467 pb, que codifica uma legumaina de cana-de-açúcar (CaneLEG) com 488 resíduos de aminoácidos. A análise da sequência de aminoácidos da CaneLEG no programa *Signal P* (BENDTSEN *et al.*, 2004) indicou que os 22 aminoácidos iniciais devem corresponder ao peptídeo sinal, provavelmente envolvido no direcionamento da proteína para vacúolos segundo análise no programa de predição de direcionamento celular PSORT (HORTON *et al.*, 2007).

-121 acgctgcaggtacggcccgaatttacgggtcgaccacgcg
-81 tcgcaaaacctctactggctccttcccaaccgactcccaattccactctcgcgtctcgccttctttctcctatacga

M V A A R L R L A L L L L S V C L C S A W A R P R L E
1 ATGGTGGCCGCTCGCCTCCGCCTCGCGCTGCTACTACTCTCCGTGTGCTCTGCTCCGCGTGGGCGGCCACGCCTCGA

P T I R L P S E R A A A A A G D E T D D A V G T R W
81 GCCGACCATCCGCTGCCGTCCGAGCGAGCGGGCGGGCGGGCGGCGACGAAACGGACGACGCCGTCCGGGACACGGTGGG

A V L V A G S S G Y Y N Y R H Q A D I C H A Y Q I M K
161 CCGTGCTCGTCGCCGGCTCCAGCGGCTACTACAACCTACCGCCACCAGGCAGACATCTGCCATGCGTACCAGATTATGAAG

K G G L K D E N I I V F M Y D D I A H S A E N P R P G
241 AAGGGAGGACTCAAGGACGAGAACATAATTGCTTTCATGTACGATGACATCGCGCATAGCGCAGAGAATCCGAGGCCCGG

V V I N H P Q G G D V Y A G V P K D Y T G R Q V S V
321 TGTCGTCAACACCATCCCGAGGTGGCGATGTCTATGCTGGGGTCCAAAGGATTACACTGGGCGACAGGTGAGTGTCA

N N F F A V L L G N K T A L T G G S G K V V D S G P N
401 ACAATTTCTTCGCTGTTCTGCTTGGCAACAAACTGCTCTGACAGGTGGGAGCGCAAGGTTGTGGACAGTGGCCCCAAT

D H I F V F Y S D H G G P G V L G M P T Y P Y L Y G D
481 GATCATATCTTTGTTTTCTACAGTGACCATGGAGGTCTGGTGTCTTGGAAATGCCTACGTATCCATATCTCTACGGTGA

D L V D V L K K K H A A G T Y K S L V F Y L E A C E
561 TGACCTCGTAGATGTCTGAAGAAGAAGCATGCTGCTGGGACCTACAAAAGCCTGGTCTTTTTACCTTGAAGCATGCCAAT

S G S I F E G L L P D D I N V Y A T T A S N A E E S S
641 CTGGGAGCATCTTTGAGGGCCTCTGCCAGATGACATCAATGTGTATGCGACCACCGCGTCAAATGCAGAGGAGAGCAGC

W G T Y C P G E F P S P P P E Y D T C L G D L Y S V S
721 TGGGGGACGTACTGCCCTGGCGAGTTCCCAAGCCCTCCACCGGAGTATGACACTGCTTGGGAGACCTGTATAGTGTTC

W M E D S D F H N L R T E S L K Q Q Y K L V K D R T
801 TTGGATGGAAGACAGTGATTTCCACAATCTGCGAACTGAATCTCTCAAGCAGCAGTACAAGTTGGTCAAGGATAGGACAG

A A Q D T F S Y G S H V M Q Y G S L E L N V Q K L F S
881 CGGCTCAGGATACATTCAGCTATGTTCCCATGTGATGCAATATGGTTCATTGGAGTTGAATGTTGAGAAATGTTTTCC

Y I G T N P A N D G N T F V E D N S L P S F F K S C N
961 TACATTGGCACAACCCCTGCTAACGATGGCAACACATTTGTAGAAGATAACTCATGCCATCATTTTTCAAAGCTGTAA

Q R D A D L V Y F W Q K Y R K L A D G S S K K N E A
1041 TCAGCGTGATGCTGATCTTGTCTACTTCTGGCAGAAGTACCGGAAATGGCTGATGGCTCATCTAAGAAAATGAAGCTC

R K E L L E V M S H R S H V D N S V E L I G S L L F G
1121 GGAAGGAATGCTTGAAGTGATGTCCACCGGTCTCATGTTGACAACAGTGTGAACTCATTGGAAGCCTTCTCTTTGGC

S E D G P R V L K A V R A A G E P L V D D W S C L K S
1201 TCTGAGGACGGTCCAAGGGTCTGAAAGCCGTCCGTGCAGCTGGTGAACCTCTGGTTGATGATTGGAGTTGCCTCAAGTC

M V R T F E A Q C G S L A Q Y G M K H M R T F A N I
1281 CATGGTTCGTAATTTGAGGCGCAATGTGGGTGCTGGCGCAGTATGGGATGAAGCACATGAGAACCTTCGCAAACATCT

C N A G I L P E A V S K V A A Q A C T S I P S N P W S
1361 GCAACGCTGGCATCCTTCTGAAGCAGTGTCAAAGGTTGCCGCTCAGGCTTGACCAGCATTCTTCCAAACCCCTGGAGC

S I D K G F S A #
1441 TCTATCGACAAGGGTTTTAGCGCCTAAaagccataggtgagggcagacatattacagccgctccaccacaccgaactccatt
1521 acagattacgtagctatgcccatttccgggtgtacatacatgagtcggaagttatttggcgattgtattgggtcattgggt
1601 gtatatattccctatatagttttagtggcagatgtgtagtttgaattccataaatgaagaacgcattgctgcttaaaaaa
1681 taaaaaaaaaa

Figura 4.1. Sequência de nucleotídeos e proteína predita da CaneLEG. A ORF está representada em letras maiúsculas e as regiões não traduzidas em letras minúsculas. A proteína predita está representada em negrito. A cabeça de seta verde indica o local de clivagem do peptídeo sinal. O asterisco vermelho indica o provável sítio de glicosilação.

A figura 4.2 mostra a presença de um provável sítio de glicosilação, no resíduo de asparagina 143, na sequência de aminoácidos da CaneLEG (Figura 4.1).

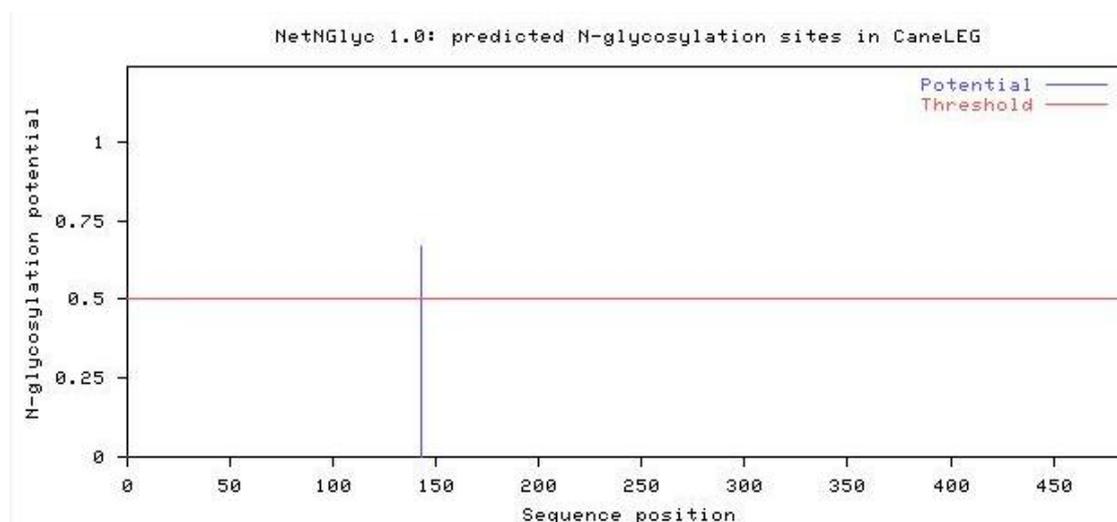


Figura 4.2 Possível sítio de glicosilação da CaneLEG. O gráfico gerado com o programa NetNGlyc 1.0 mostra a presença de um sítio de glicosilação, asparagina 143 da sequência de aminoácidos da CaneLEG.

A análise da sequência de aminoácidos da CaneLEG no programa BlastX indicou que esta proteína possui identidade de sequência variando de 53 a 95% com outras legumainas de plantas disponíveis no banco de dados do NCBI (Tabela 4.1). A CaneLEG apresenta 99% de similaridade com uma VPE estudada por Jackson *et al.* (2007). Iste resultado sugere que a CaneLEG estudada aqui deve ser a mesma legumaina descrita por esses autores.

Tabela 4.1. Identidade entre a sequência de aminoácidos da CaneLEG e legumaínas de outras plantas

Legumaína	Organismo	Identidade	Referência
ScVPE	<i>Saccharum officinarum</i> (ABF00019)	99%	Jackson <i>et al.</i> , 2007
-	<i>Sorghum bicolor</i> (EES00922)	95%	-
See2b	<i>Zea mays</i> (AJ131719)	92%	Donnison <i>et al.</i> , 2007
See2a	<i>Zea mays</i> (NP_001105119)	91%	Donnison <i>et al.</i> , 2007
HvVPE3	<i>Hordeum vulgare</i> (CBX26641)	85%	Radchuk <i>et al.</i> , 2010
PrVPE	<i>Papaver rhoeas</i> (CBM41515)	73%	Bosch <i>et al.</i> , 2010
LeCP	<i>Solanum lycopersicum</i> (CAH56498)	72%	Matarasso <i>et al.</i> , 2005
OsVPE1	<i>Oryza sativa</i> (BAC76418)	60%	Wang <i>et al.</i> , 2009
γ VPE	<i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_195020)	71%	Kinoshita <i>et al.</i> , 1995b
β VPE	<i>A. thaliana</i> (NP_176458)	61%	Kinoshita <i>et al.</i> , 1995
α VPE	<i>A. thaliana</i> (NP_180165)	68%	Kinoshita <i>et al.</i> , 1995
δ VPE	<i>A. thaliana</i> (AF521661)	53%	Gruis <i>et al.</i> , 2002

Para uma melhor análise das características da sequência de aminoácidos da CaneLEG, foi realizado um alinhamento dessa proteína com outras legumaínas de planta. Verificou-se uma alta similaridade entre a CaneLEG e legumaínas de outras plantas, com a presença de vários blocos de aminoácidos idênticos (Figura 4.3).

Em plantas, as legumaínas são sintetizadas como precursores constituídos por um peptídeo sinal e dois pró-peptídeos, sendo um na região N-terminal e outro na região C-terminal. Uma vez que os sítios de processamento dos pró-peptídeos geralmente são flanqueados por resíduos de asparagina ou ácido aspártico, a legumaína madura é obtida pela remoção auto-catalítica dessas pró-regiões (HIRAIWA *et al.*, 1999; KUROYANAGI *et al.*, 2002). A sequência da CaneLEG possui estes dois pró-peptídeos flanqueando a sequência da proteína madura e, como descrito para *R. communis* (HIRAIWA *et al.*, 1999), os possíveis sítios de

clivagem dos pró-peptídeos são flanqueados por dois resíduos de ácido aspártico (Figura 4.3, setas).

Em plantas, além da presença de peptídeo sinal, sinais de direcionamento vacuolar também podem ser encontrados nos pró-peptídeos N-terminal ou C-terminal (MATSUOKA e NAKAMURA, 1991; BEDNAREK e RAIKHEL, 1991). O motivo IRLPS (Figura 4.3) presente no pró-peptídeo N-terminal da CaneLEG é um provável sinal para direcionamento dessa enzima para o vacúolo lítico, como descrito por Jackson e colaboradores (2007).

O alinhamento da proteína CaneLEG mostra ainda a presença dos motivos característicos de proteínas do Clan CD, que é constituído pelas famílias do grupo das legumaínas (C13), caspase (C14), clostripaína (C11) e gingipaína R (C25). A disposição dos resíduos catalíticos His-Gly-espçador-Ala-Cys (Figura 4.3, His e Cys destacados em vermelho) é bem conservado nessas famílias e, ainda, são encontrados dois blocos de 4 resíduos hidrofóbicos (Figura 4.3, destacado em verde) que antecedem os resíduos catalíticos (CHEN *et al.*, 1998a).

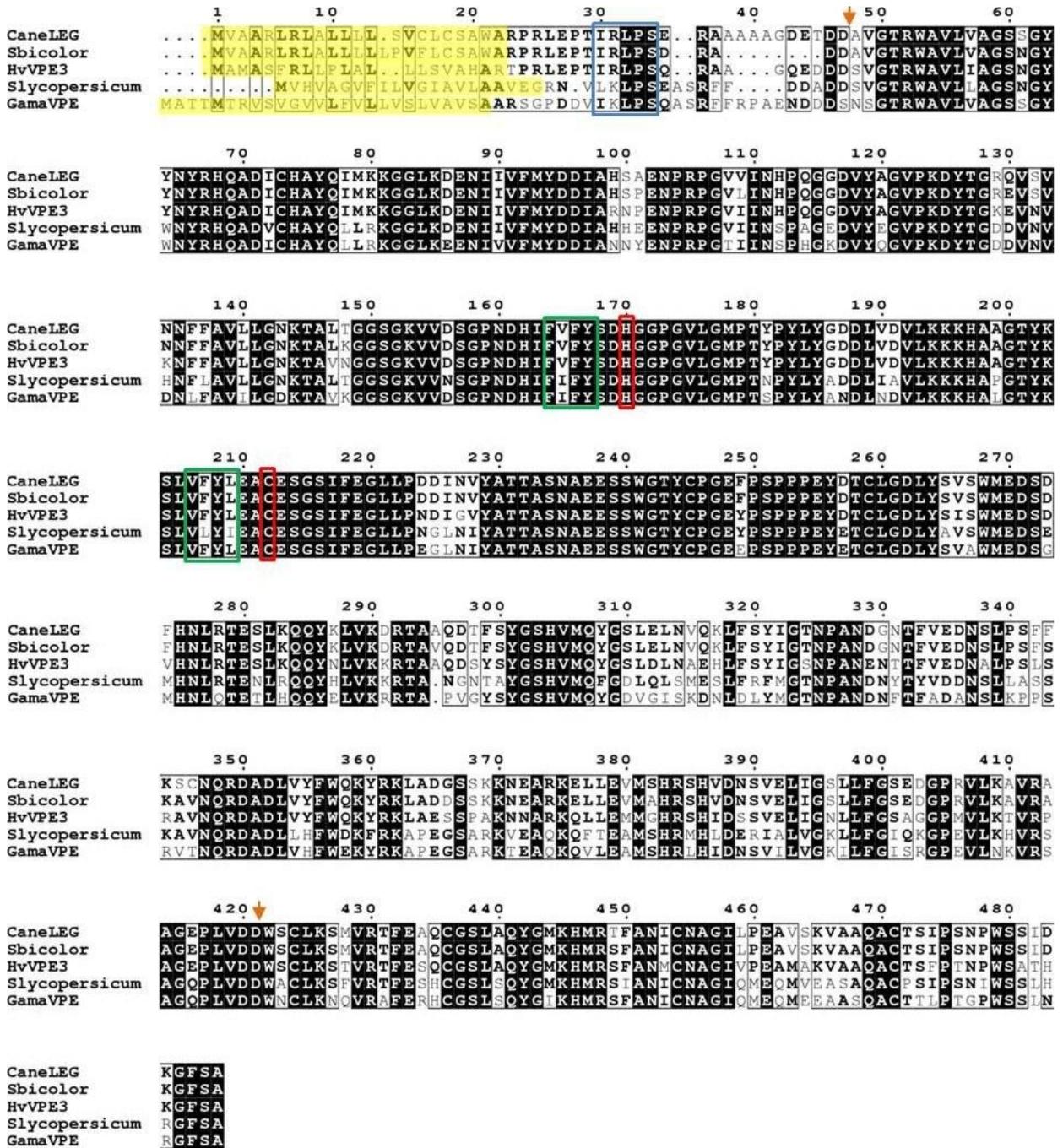


Figura 4.3. Alinhamento das legumainas CaneLEG, *Sorghum bicolor*, *Hordeum vulgare* HvVPE3, LeCP *Solanum lycopersicum* e γ VPE de *Arabidopsis thaliana*. Em amarelo o peptídeo sinal das proteínas. O motivo de direcionamento vacuolar em caixa azul. As setas alaranjadas indicam os sítios de clivagem dos pró-peptídeos. Os resíduos catalíticos do sítio ativo estão destacados em vermelho. Os blocos de aminoácidos hidrofóbicos destacados em verde. As caixas pretas correspondem a 100% de identidade de aminoácidos. As caixas vazias correspondem aos resíduos similares, mostrados em preto.

4.2. Expressão heteróloga da CaneLEG em *E. coli* e produção de anticorpos policlonais

A ORF da *CaneLEG*, excluindo o peptídeo sinal (após o nucleotídeo 66, ver figura 4.1), foi amplificada por PCR utilizando oligonucleotídeos contendo sítios para enzimas de restrição. A ORF obtida por PCR foi analisada em gel de agarose e observou-se a presença do fragmento correspondente à legumaina, com ou sem códon de parada da transcrição, no tamanho esperado (Figura 4.4).

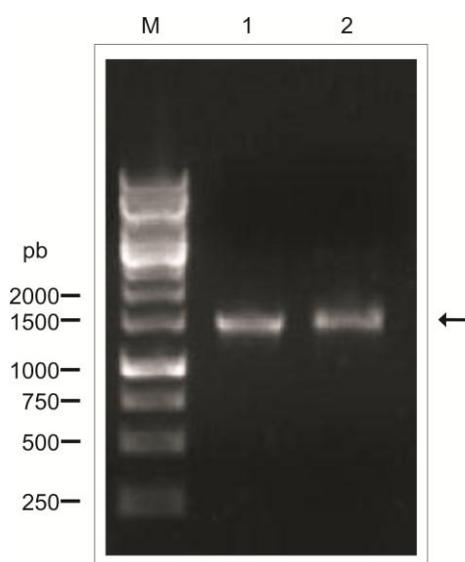


Figura 4.4. Amplificação da ORF da legumaina da cana-de-açúcar (*CaneLEG*). A ORF da *CaneLEG* foi amplificada por PCR a partir do clone SCBFRT1071E03, utilizando primers específicos. Na linha 1 e 2 produto amplificado: sem códon de parada e com códon de parada da tradução, respectivamente. Linha M, marcador de massa molecular 1kb DNA ladder (Fermentas).

Os produtos amplificados, com ou sem códon de parada da transcrição, foram digeridos e clonados nos vetores de expressão pET29a, pET28a e pET32a. A ORF da *CaneLEG* sem códon de parada foi utilizado para clonagem no vetor pET29a. Os vetores de expressão pET29a e pET28a possuem características parecidas, no entanto, o vetor pET29a permite a fusão da cauda de histidinas na região C-terminal da proteína recombinante. No vetor pET28a a cauda de histidinas é fusionada à região N-terminal da proteína recombinante. Uma vez que na análise da sequência

de aminoácidos da CaneLEG foi observada a presença de vários resíduos de cisteína, o vetor pET32a também foi utilizado para expressão da proteína recombinante. Este vetor possui o peptídeo da tiorredoxina, que fusionado à região N-terminal da proteína, facilita a formação de ligação dissulfeto no citoplasma da célula bacteriana.

Os vetores recombinantes foram posteriormente utilizados para a expressão heteróloga da CaneLEG na cepa de *E. coli* Rosetta (DE3). A comparação dos perfis protéicos dos clones bacterianos, antes e após a adição do agente indutor, por meio da análise em SDS-PAGE 15% revelou a presença de bandas com massa moleculares de 58,5 kDa, 71 kDa e 57 kDa nos clones induzidos utilizando os vetores pET29a, pET32a e pET28a, respectivamente, correspondentes à CaneLEG recombinante (Figura 4.5).

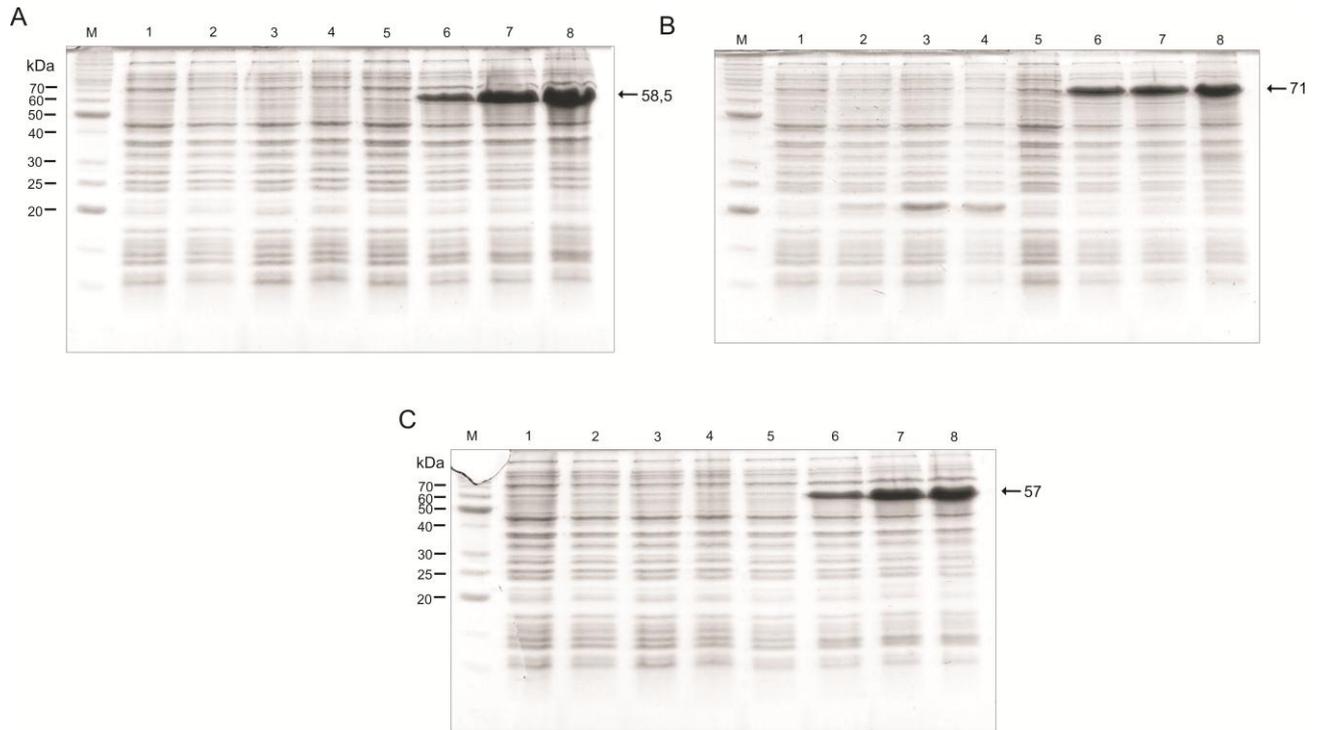


Figura 4.5. Análise em SDS-PAGE 15% da expressão heteróloga da CaneLEG em *E. coli*. Linhas 1 a 4: amostras não induzida, induzida por 1 h, 2 h e 3 h, respectivamente, coletadas de cultura de bactérias hospedeiras dos vetores de expressão sem a ORF da CaneLEG. Linhas 5 a 8: amostras não induzida, induzida por 1 h, 2 h e 3 h, respectivamente, coletadas de cultura de bactérias hospedeiras dos vetores recombinantes. As setas indicam o tamanho aproximado das proteínas recombinantes em kDa. M: marcador de massa molecular (Invitrogen). (a) Expressão utilizando o vetor pET29a. (b) Expressão utilizando o vetor pET32a. (c) Expressão utilizando o vetor pET28a.

Após 3 h de indução, as células contendo os plasmídeos recombinantes foram lisadas e as frações solúveis e insolúveis resultantes foram analisadas em SDS-PAGE. Observou-se que a proteína CaneLEG, independente do vetor utilizado, encontrava-se principalmente na fração insolúvel (Figura 4.6).

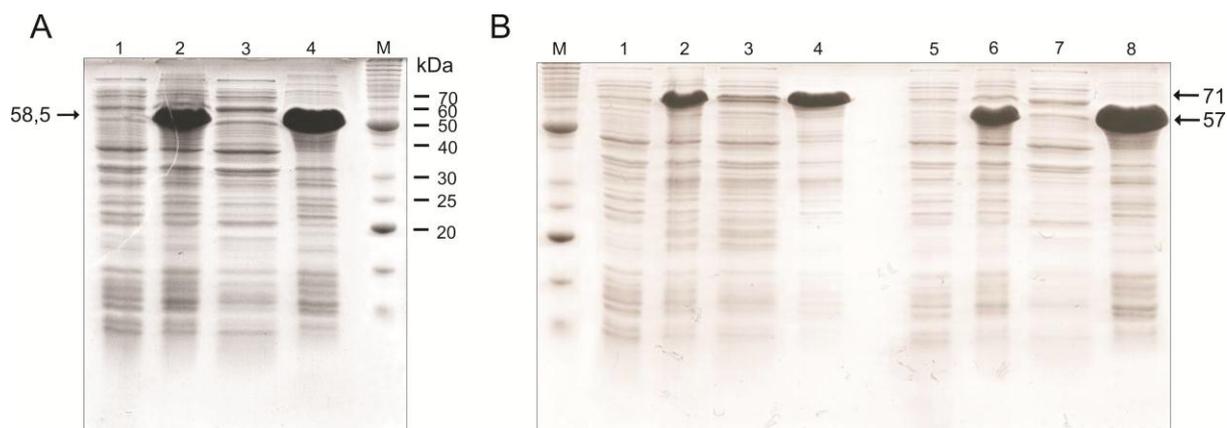


Figura 4.6. Análise em SDS-PAGE 15% da solubilidade da CaneLEG recombinante. M, marcador de massa molecular (Invitrogen). As setas indicam a massa molecular aproximada das proteínas recombinantes (a) Expressão utilizando o vetor pET29a. Linha 1: amostra não induzida; linha 2: amostra induzida; linha 3: fração solúvel; linha 4: fração insolúvel. (b) Linhas 1 a 4: amostras como em (a), expressão utilizando o vetor pET32a. Linhas 5 a 8: amostras como em (a), expressão utilizando o vetor pET28a.

Tem sido demonstrado que a redução da temperatura de indução, bem como da concentração de agente indutor (IPTG), permite um aumento na quantidade de proteína recombinante solúvel. Este aumento na solubilidade está relacionado à diminuição da taxa de síntese da proteína, pois em altas concentrações de proteína a taxa de agregação domina a taxa de enovelamento, levando à formação de proteína insolúvel (KIEFHABER *et al.*, 1991). Na tentativa de obter a CaneLEG recombinante na fração solúvel do lisado bacteriano, a temperatura de indução foi alterada para 20°C. No entanto, após indução a 20°C a CaneLEG foi encontrada principalmente na fração insolúvel, enquanto a proteína recombinante expressa utilizando o vetor pET28a não foi induzida nessas condições (Figura 4.7).

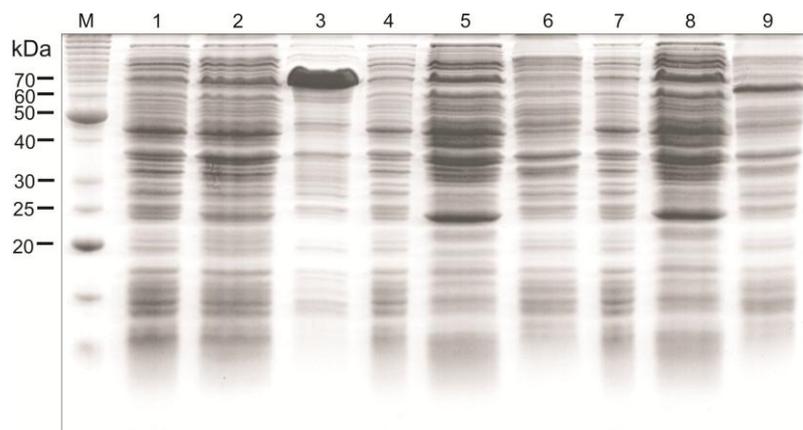


Figura 4.7. Indução CaneLEG em *E. coli* à 20°C. M: marcador de massa molecular (Invitrogen). (a) Linhas 1, 2 e 3: não induzido, fração solúvel e fração insolúvel, respectivamente, da expressão da CaneLEG utilizando o vetor pET32a. Linhas 4, 5 e 6: como em (a), da expressão da CaneLEG utilizando o vetor pET28a. Linhas 7, 8 e 9: como em (a), da expressão da CaneLEG utilizando o vetor pET29a.

Como não foi possível purificar a CaneLEG expressa em células de *E. coli*, a proteína recombinante obtida utilizando o vetor pET29a foi recuperada da fração insolúvel pelo método de eletroeluição (Figura 4.8). A proteína eletroeluída foi utilizada para gerar anticorpos policlonais em camundongos que foram utilizados em ensaios posteriores.

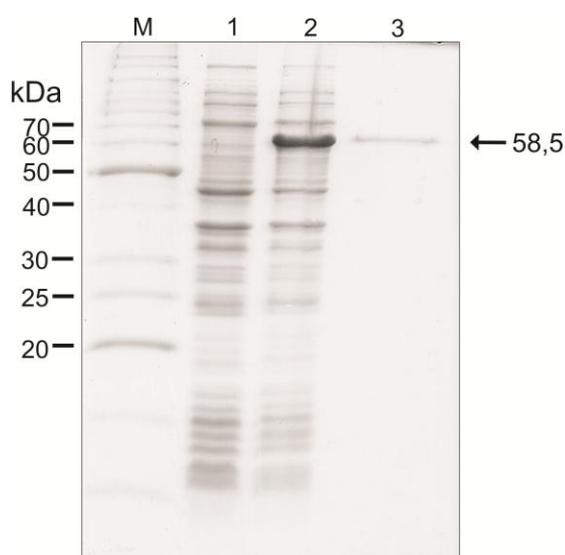


Figura 4.8. Recuperação da CaneLEG presente na fração insolúvel de SDS-PAGE, expressa utilizando o vetor pET29a. M: marcador de massa molecular (Invitrogen). Linha 1: amostra não induzida. Linha 2: amostra após 3 horas de indução a 37°C. Linha 3: CaneLEG eletroeluída de SDS-PAGE. A seta indica o tamanho aproximado da proteína recombinante.

4.3 Expressão heteróloga em *P. pastoris* e purificação da CaneLEG recombinante

Para obtenção da proteína CaneLEG ativa, a ORF da *CaneLEG*, sem peptídeo sinal e sem o códon de parada da transcrição, obtida no item 4.2 foi clonada no vetor pPICZ α A para expressão em *P. pastoris*. A proteína foi clonada na sua forma não-processada, contendo os pró-peptídeos N-terminal e C-terminal, fusionada à sequência sinal de secreção fator alfa e a uma cauda de histidinas na região C-terminal. A fusão da proteína com o fator alfa permitiu sua secreção no meio de cultivo. Como a levedura *P. pastoris* secreta uma baixa quantidade de proteínas endógenas o direcionamento da proteína recombinante para o meio de cultivo serviu como um passo inicial para sua purificação (CEREGHINO e CREGG, 2000).

O plasmídeo pPICZ α A contendo a ORF da *CaneLEG* foi sequenciado e após confirmação da sequência completa o plasmídeo foi linearizado por digestão com enzima de restrição (Figura 4.9) e utilizado para transformar células de *P. pastoris* KM71H competentes.

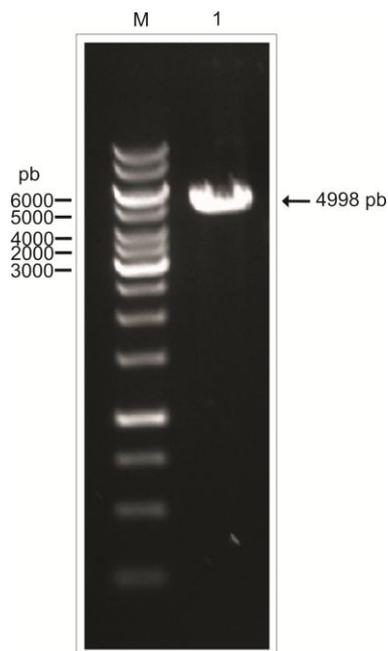


Figura 4.9. Plasmídeo recombinante pPICZαA-*CaneLEG* linearizado. Linha 1: Precipitação do vetor recombinante digerido com a enzima restrição *PmeI*. O vetor recombinante foi utilizado para transformar células *P. pastoris* KM71H competentes. M: marcador de massa molecular (Invitrogen)

Para confirmar a inserção do gene de interesse no genoma da levedura, foi realizada PCR de colônia dos clones crescidos em placa contendo meio seletivo. Dos oito clones analisados sete apresentaram produto de amplificação de aproximadamente 1500 pb, tamanho correspondente ao gene de interesse (Figura 4.10).

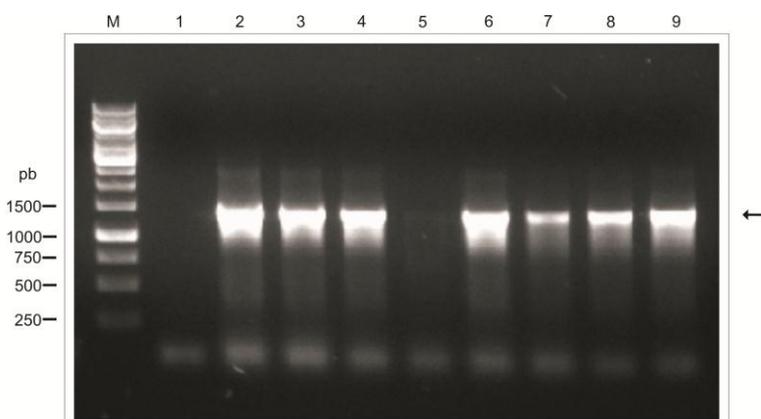


Figura 4.10. PCR das colônias de KM71H transformadas com o plasmídeo recombinante pPICZαA-*CaneLEG*. M: marcador de massa molecular (Invitrogen). Linha 1: controle negativo da PCR. Linhas 2 a 9: clones transformados com o plasmídeo recombinante.

Embora o resultado da PCR de colônia tenha indicado que a maioria dos clones continha o gene de interesse, foi necessário analisar a expressão da proteína recombinante nos clones positivos para confirmar se a inserção do gene aconteceu na região correta do genoma. Três clones positivos foram escolhidos e utilizados para o ensaio de expressão da proteína recombinante por um período de 144 h, os perfis de expressão de um dos clones selecionados e do controle negativo são demonstrados na Figura 4.11.

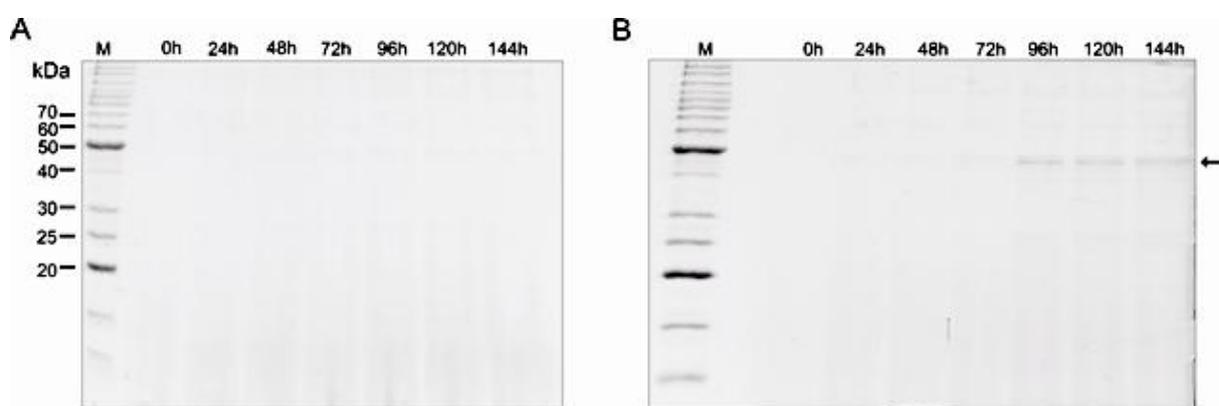


Figura 4.11. Expressão da CaneLEG recombinante em *P. pastoris*. (a) Amostras do meio de indução de um clone de *P. pastoris* KM71H transformado com o plasmídeo pPICZ α A (controle) após indução com metanol. (b) Amostras do meio de indução de um clone de *P. pastoris* KM71H transformado com a construção pPICZ α A-CaneLEG após indução com metanol. O tempo de indução é indicado na figura. M: marcador de massa molecular (Invitrogen). A seta indica a proteína recombinante.

O acúmulo de uma banda de massa molecular correspondente à CaneLEG recombinante no meio de cultivo foi visível após 96 h de indução somente na levedura transformada com a construção pPICZ α A-CaneLEG (Figura 4.11b). O tamanho esperado da proteína recombinante contendo os peptídeos de fusão era de 53,5 kDa. No entanto, observou-se que a CaneLEG expressa pela levedura apresentava aproximadamente 45 kDa. Como a análise da sequência de aminoácidos da CaneLEG indicou a presença de dois pró-peptídeos característicos de legumainas, a obtenção da proteína recombinante com aproximadamente 45 kDa

indica a perda do pró-peptídeo C-terminal. As massas moleculares esperadas da CaneLEG não processada, intermediária, processada e da proteína recombinante estão descritas na tabela 4.2.

Tabela 4.2. Massa molecular das formas precursoras, madura e recombinante da CaneLEG

	Massa molecular	PS	Proteína madura	PP-N	PP-C	c-myc	His-tag
Pré-pró- CaneLEG	53,5 kDa	x	x	x	x		
Pró-CaneLEG	51 kDa		x	x	x		
CaneLEG intermediária	43,8 kDa		x	x			
CaneLEG madura	41 kDa		x				
CaneLEG recombinante	53,5 kDa		x	x	x	x	x

PS: peptídeo sinal; PP-N: pró-peptídeo N-terminal; PP-C: pró-peptídeo C-terminal; c-myc: peptídeo de fusão; His-tag: cauda de histidinas.

Para confirmar que a banda de 45 kDa obtida após indução correspondia à CaneLEG recombinante, procedeu-se com o ensaio de imunodeteção utilizando os anticorpos policlonais anti-CaneLEG gerados em camundongos a partir da proteína recombinante produzida em bactéria. Foram analisadas alíquotas do meio de cultivo de três clones contendo a construção pPICZ α CaneLEG e do controle negativo, levedura transformada apenas com o vetor pPICZ α A, 144 h após indução com metanol (Figura 4.12).

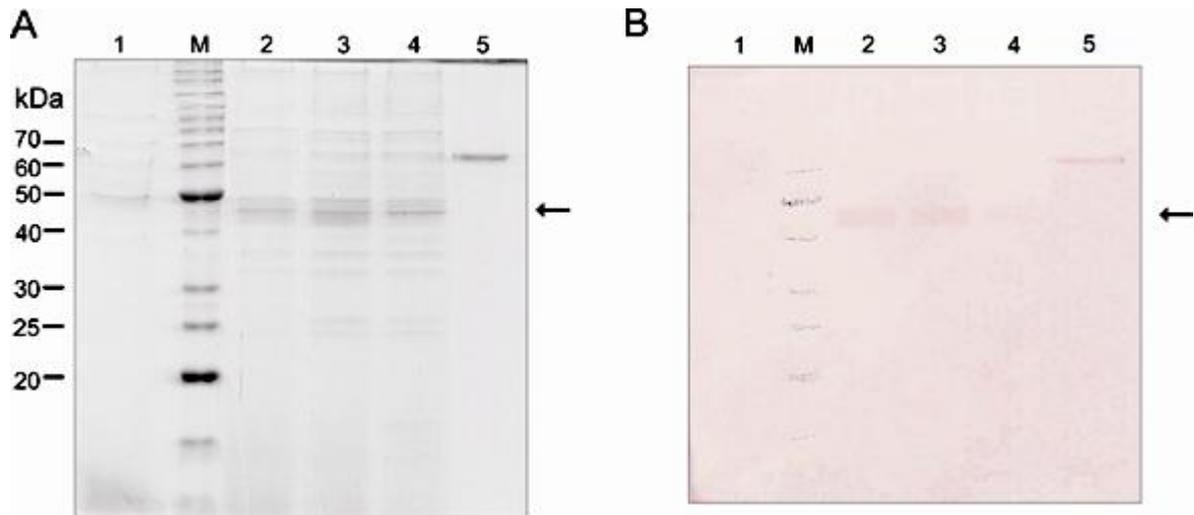


Figura 4.12. Detecção da CaneLEG recombinante produzida em *P. pastoris*. (a) SDS-PAGE 12% corado com azul de comassie. M: marcador de massa molecular (Invitrogen). Linha 1: indução clone *P. pastoris* transformado com o plasmídeo pPICZαA (controle negativo) após 144 h de indução com metanol. Linhas 2 - 4: Clones *P. pastoris* transformados com a construção pPICZαACaneLEG 144 h após indução com metanol. Linha 5 CaneLEG recombinante, produzida em *E. coli* utilizando o vetor pET29a, eletroeluída (controle positivo). (b) Réplica do gel mostrado no item (a), utilizado para detecção da CaneLEG recombinante utilizando anticorpos policlonais anti-CaneLEG.

O resultado do *Western blotting* indicou que todos os clones expressaram a CaneLEG recombinante com massa molecular de aproximadamente 45 kDa. O clone apresentando maior nível de expressão foi utilizado para produção da CaneLEG recombinante em maior quantidade. Após 144 h de indução do clone de *P. pastoris* contendo a ORF da *CaneLEG*, o meio de cultivo foi coletado e utilizado para purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade em coluna contendo resina de níquel. A CaneLEG recombinante foi recuperada nas frações correspondentes ao eluato e à primeira lavagem da resina com tampão, indicando a perda do pró-peptídeo C-terminal e, conseqüentemente, da cauda de histidinas necessária para interação da proteína recombinante com a resina de níquel (dado não mostrado).

Para facilitar a purificação da CaneLEG recombinante, foi adicionada uma cauda de histidinas na região N-terminal da proteína. Além disso, considerando que

legumainas de plantas possuem atividade ótima em pH ácido e que sua atividade é reduzida ou quase ausente em condições neutras ou básicas (ROTARI *et al.*, 2001; KUROYNAGI *et al.*, 2002), o pH de indução da CaneLEG em *P. pastoris* foi alterado para 7,0 com intuito de evitar seu processamento. A temperatura de indução foi mantida a 26°C, visto que esta temperatura mostrou-se mais adequada por permitir uma maior expressão da proteína recombinante. Li e colaboradores (2001) verificaram um aumento do acúmulo de uma proteína anti-congelamento expressa em *P. pastoris* a 23°C. Esses autores sugerem que o aumento na produção da proteína recombinante provavelmente esteja relacionado à melhoria das condições de envelhecimento e viabilidade das células da levedura, evitando a morte celular e consequente liberação de peptidases no meio de cultivo.

Noventa e seis horas após indução por metanol, o meio de cultivo foi coletado e a proteína recombinante foi purificada em resina de níquel (Figura 4.13). Embora a adição da cauda de histidinas na região N-terminal da proteína e a alteração do pH de indução tenham possibilitado a obtenção da proteína purificada em resina de níquel (Figura 4.13, linha 6), o processamento da CaneLEG ainda foi observado durante a indução (Figura 4.13, linhas 2 a 5). Após a purificação da CaneLEG em resina de níquel, foram recuperadas bandas de aproximadamente 60, 50 e 45 kDa (Figura 4.13, linha 6).

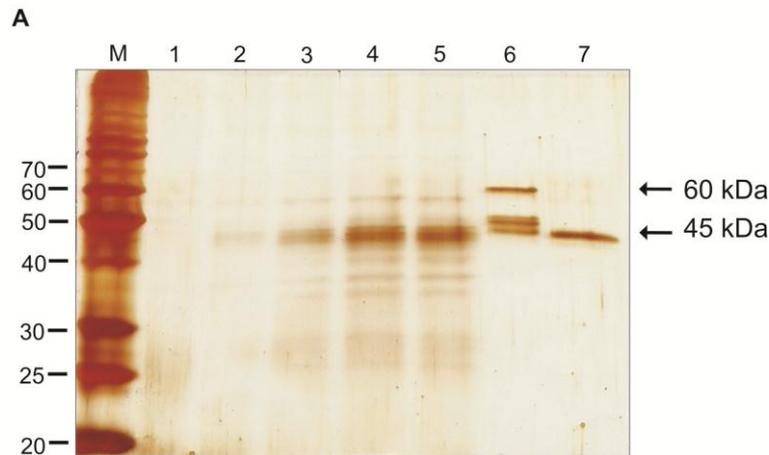


Figura 4.13. Expressão heteróloga e purificação da CaneLEG. Análise em SDS-PAGE 12%, corado com nitrato de prata, das amostras: linha 1: antes da adição de metanol; linhas 2 a 5: 24, 48, 72 e 96 h após a adição de metanol, respectivamente; linha 6: proteína purificada em resina de níquel antes da diálise em pH ácido; linha 7: proteína purificada em resina de níquel após diálise em pH ácido.

A banda de 60 kDa, apresentando massa molecular maior que o tamanho esperado de 51 kDa para a CaneLEG contendo os dois pró-peptídeos, já estava presente no início da indução (48 h) e tornou-se mais intensa após a purificação em resina de níquel (Figura 4.13, linha 6). Após diálise em pH ácido, a banda de 60 kDa desapareceu completamente sendo observada apenas uma banda com massa molecular aproximada de 45 kDa (Figura 4.13, linha 7). Este resultado indica que a proteína purificada com 60 kDa corresponde à CaneLEG não processada.

Os anticorpos policlonais anti-CaneLEG reagiram com todas as bandas recuperadas após a purificação e diálise (Figura 4.14, linha 6 e 7), corroborando com os dados acima. A análise de *Western blotting* confirma a autenticidade da proteína recombinante, uma vez que os anticorpos foram gerados utilizando a CaneLEG produzida em bactéria.

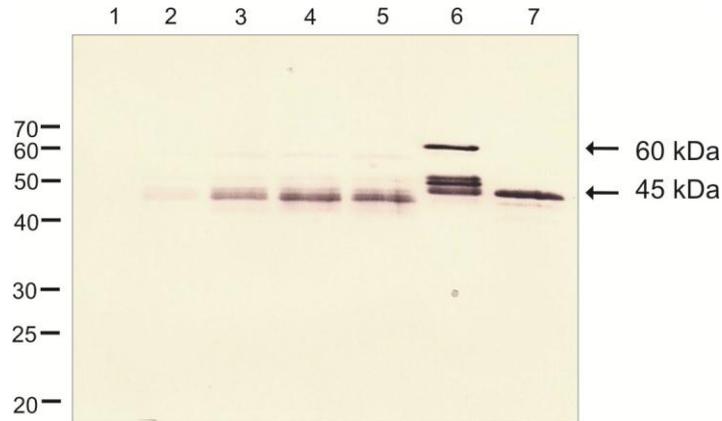


Figura 4.14. Detecção da CaneLEG recombinante produzida em *P. pastoris*. Réplica do gel mostrado na figura 4.13, utilizado para detecção da CaneLEG recombinante, contendo duas caudas de histidina, utilizando anticorpos policlonais anti-CaneLEG.

A análise das bandas com massa molecular de 60 e 50 kDa por espectrometria de massa forneceu a informação da sequência de aminoácidos de dois peptídeos “WAVLVAGSSGYNYR” e “DADLVYFWQK”. Estes peptídeos estão presentes na sequência da CaneLEG (ver Figura 4.1). Deste modo, os dados obtidos por espectrometria de massa confirmam que as bandas obtidas após a purificação correspondem à legumaina de cana-de-açúcar.

O uso de *P. pastoris* como sistema de expressão permite o processamento, enovelamento e modificação pós-traducional das proteínas recombinantes. Uma glicoamilase de *Aspergillus awamori* expressa em *P. pastoris* apresentou um aumento de 30 kDa na massa molecular esperada, dos quais 10 kDa foram resultantes de N-glicosilação e os outros 20 kDa resultantes de O-glicosilação (HEIMO *et al.*, 1997). Desse modo, é possível que o aumento observado na massa molecular da CaneLEG seja resultante da glicosilação pela levedura, uma vez que a análise da sequência de aminoácidos da CaneLEG (item 4.1) indicou a presença de um possível sítio de glicosilação no resíduo de asparagina 143.

O rendimento da CaneLEG recombinante produzida em levedura foi de 4 mg/L de cultura. Este rendimento foi baixo se comparado com outras proteínas expressas em *P. pastoris*, no entanto, foi suficiente para realização dos ensaios posteriores. Vale ressaltar que, apesar do baixo rendimento, foi possível visualizar a proteína recombinante em SDS-PAGE após a indução e purificação.

4.4 Expressão heteróloga e processamento da CaneLEG mutante

Com o intuito de avaliar se os dois pró-peptídeos haviam sido removidos após o processamento da CaneLEG recombinante, amostras coletadas da cultura não-induzida, induzida e da proteína purificada foram analisadas por *Western blotting*, utilizando anticorpos monoclonais anti-His-tag. Os anticorpos monoclonais reagiram com as amostras coletadas durante a indução e após a purificação (Figura 4.15), indicando que mesmo após o processamento visível, resultante da mudança de pH, a proteína ainda continha cauda de histidinas (Figura 4.15, linhas 6 e 7). Este resultado sugere que, nas condições analisadas, apenas o pró-peptídeo C-terminal da CaneLEG foi liberado durante o processamento.

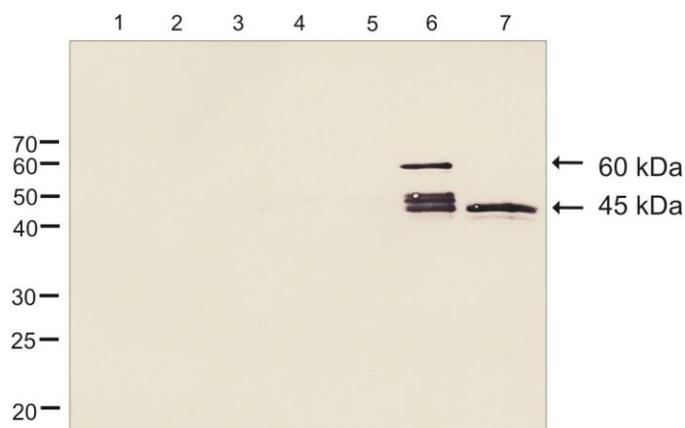


Figura 4.15. Detecção da CaneLEG recombinante produzida em *P. pastoris*. Réplica do gel mostrado na figura 4.13, utilizado para detecção da CaneLEG recombinante, contendo duas caudas de histidina, utilizando anticorpos monoclonais anti-His-tag.

Embora tenha sido descrito que a *P. pastoris* secreta uma baixa quantidade de proteínas endógenas, proteínas recombinantes expressas neste sistema podem ser degradadas por peptidases da levedura, secretadas no meio de cultivo ou provenientes da lise de células mortas (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005). Para confirmar que o processamento da CaneLEG ocorreu de modo auto-catalítico sem a atuação de peptidases da *P. pastoris*, a forma mutante da CaneLEG, cujo provável resíduo de cisteína do sítio ativo foi substituído por um resíduo de serina (C212S), foi obtida de forma recombinante (Figura 4.16). A forma mutante da CaneLEG foi denominada CaneLEG Δ C²¹².

A mutação na ORF da *CaneLEG* foi realizada utilizando uma metodologia que permite a mutação do gene já clonado em vetor de expressão. O plasmídeo recombinante com a mutação de interesse foi utilizado para transformar células de *P. pastoris* KM71H. Sete clones recombinantes foram avaliados em ensaio de expressão e, em seguida, um clone positivo foi utilizado para obtenção da CaneLEG Δ C²¹² purificada (Figura 4.16). A proteína recombinante CaneLEG Δ C²¹² foi expressa em *P. pastoris* e purificada por cromatografia de afinidade nas mesmas

condições utilizadas para expressão e purificação da CaneLEG. Após 144 h de indução, foi observada apenas uma banda com massa molecular de aproximadamente 60 kDa nos clones contendo o plasmídeo recombinante (Figura 4.16, linhas 2 a 8), enquanto nenhuma banda pode ser observada na amostra da cultura da levedura controle (Figura 4.16, linha 1). A presença de apenas uma banda de 60 kDa nas amostras induzidas dos clones contendo o a ORF *CaneLEG Δ C²¹²* confirma que a banda de 60 kDa obtida após a purificação da CaneLEG corresponde à forma não processada desta enzima. A *CaneLEG Δ C²¹²* pura apresentou rendimento de aproximadamente 13 mg por litro de meio de indução BMMY, correspondendo ao triplo do rendimento obtido para a CaneLEG pura. No ensaio de *western blotting*, os anticorpos policlonais anti-CaneLEG reagiram com a banda de 60 kDa, indicando que a proteína purificada corresponde à *CaneLEG Δ C²¹²* (Figura 4.16c).

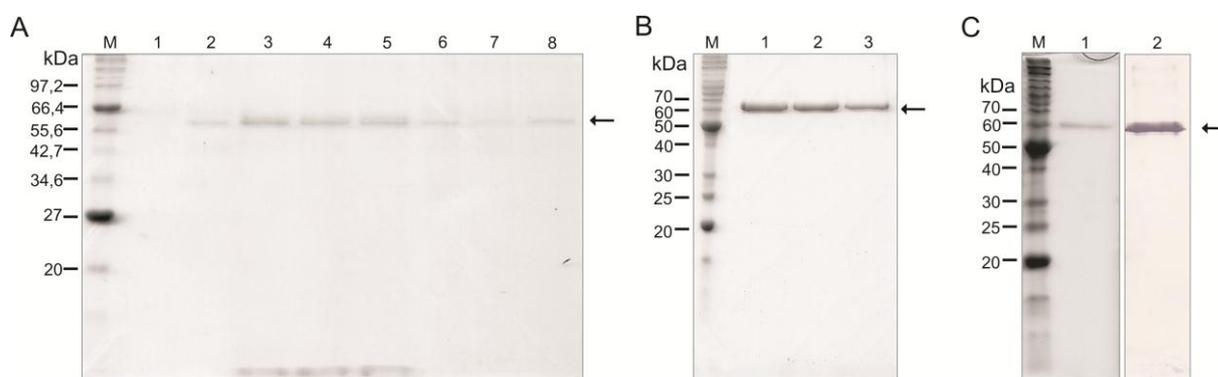


Figura 4.16. Expressão da proteína mutante *CLEG Δ C²¹²* em *P. pastoris* após 144h de indução com metanol (a) M: marcador de massa molecular (NEB). Linha 1: amostra do meio de indução de *P. pastoris* KM71H transformada com o plasmídeo pPICZ α A (controle). Linhas 2 a 8: amostras do meio de indução de clones de *P. pastoris* KM71H transformados contendo a ORF *CLEG Δ C²¹²*. (b) Linhas 1 a 3: *CLEG Δ C²¹²* purificada eluída nas frações contendo 75, 100 e 100 mM de imidazol, respectivamente. (c) Linha 1: SDS-PAGE da *CLEG Δ C²¹²* purificada. Linha 2: detecção da *CLEG Δ C²¹²* purificada por *Western blotting*, utilizando anticorpos policlonais anti-CaneLEG. M: marcador de massa molecular (Invitrogen), em (b) e em (c).

A CaneLEG Δ C²¹² purificada foi incubada em condições ácidas, no entanto, mesmo após um longo período de incubação, não foi observada a presença de bandas correspondentes à proteína processada (Figura 4.17 linhas 4 e 7). De outro modo, quando a CaneLEG Δ C²¹² foi incubada em solução de reação contendo a CaneLEG recombinante, em condição ácida, foi observado o aparecimento de uma banda com massa molecular aproximada de 45 kDa (Figura 4.17 linhas 3 e 5).

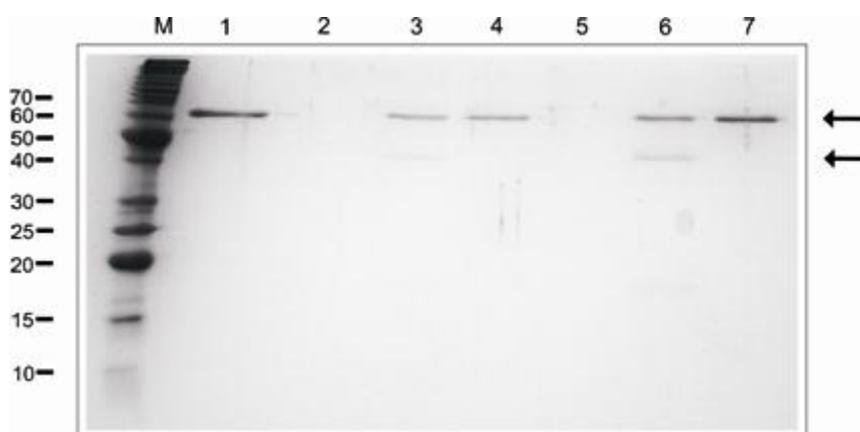


Figura 4.17. Processamento da CaneLEG Δ C²¹² pela CaneLEG. SDS-PAGE 12% corado com azul de comassie. M, marcador de massa molecular (Invitrogen). Linha 1 CaneLEG Δ C²¹² purificada; Linha 2 CaneLEG ativa (visível somente quando corada com nitrato de prata, ver figura 4.13). Linhas 3 a 5 proteínas incubadas por 90 min. Linha 3 CaneLEG Δ C²¹² incubada com a CaneLEG. Linha 4 CaneLEG Δ C²¹² sem a CaneLEG (controle). Linha 5 CaneLEG, mesma quantidade utilizada nos ensaios não visível em gel corado com azul de comassie. Linhas 6 e 7 proteínas incubadas por 3 horas. Linha 6 CaneLEG Δ C²¹² incubada com a CaneLEG. Linha 7 CaneLEG Δ C²¹² sem a CaneLEG (controle).

A enzima mutante CaneLEG Δ C²¹² não foi capaz de hidrolisar o substrato Z-Ala-Ala-Asn-MCA, utilizado para avaliar a atividade catalítica de legumainas. Os resultados obtidos mostram que o processamento observado durante a expressão da CaneLEG resulta da ativação auto catalítica da enzima e que o resíduo de cisteína 212 é essencial para sua atividade.

4.5 Caracterização cinética da CaneLEG recombinante produzida em *P. pastoris*

4.5.1 Determinação do pH e temperatura ótimos e ensaios de termoestabilidade

Após a diálise, a CaneLEG recombinante foi recuperada apenas na forma processada, portanto foi avaliada apenas a atividade catalítica da enzima processada. Para determinação do pH ótimo de atividade catalítica da CaneLEG, a enzima foi incubada em solução de reação contendo tampões com pH variando entre 3,0 e 9,0. A atividade catalítica da CaneLEG foi medida em espectrofluorímetro utilizando-se o substrato fluorogênico Z-Ala-Ala-Asn-MCA. A CaneLEG recombinante apresentou atividade ótima na faixa de pH entre 6,0 e 6,5 e atividade muito baixa ou quase nula em pHs acima ou abaixo de 8,0 e 4,0, respectivamente (Figura 4.18).

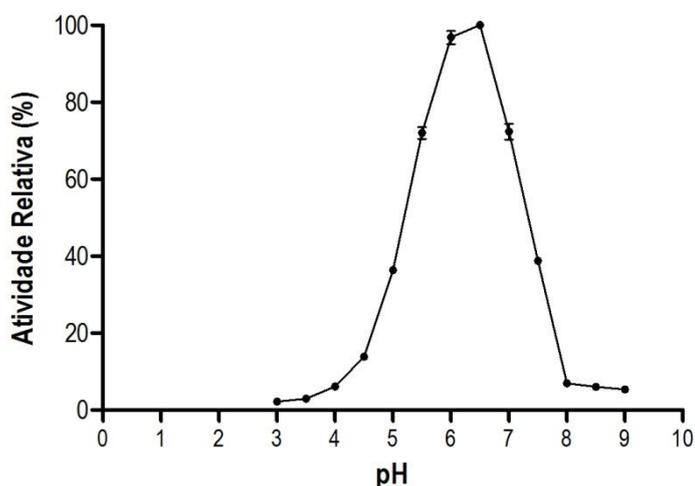


Figura 4.18. Determinação do pH ótimo de atividade da CaneLEG. Os dados representam a média de valores de três ensaios. As barras indicam o erro padrão.

Inicialmente, optou-se por realizar a expressão da CaneLEG em *P. pastoris* em meio de indução com pH 6,0. Nesta condição, a proteína apresentou um

processamento prematuro fazendo necessária a alteração do pH do meio de indução para uma condição neutra, pH 7,0. No entanto, em pH 7,0 a CaneLEG ainda apresentou 80% de sua atividade catalítica, justificando a presença das bandas correspondentes à CaneLEG processada durante sua expressão nesta condição.

Após determinação do pH ótimo, foi avaliado o efeito da temperatura na hidrólise do substrato Z-Ala-Ala-Asn-MCA pela CaneLEG. A legumaina de cana-de-açúcar apresentou atividade catalítica ótima a 37°C (Figura 4.19). No entanto, a enzima apresentou baixa estabilidade térmica, sendo sua atividade catalítica menos afetada quando a enzima foi incubada até 10°C por 1 h. (Figura 4.19). Durante os experimentos, observou-se que a enzima tornava-se inativa após sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento, confirmando que a enzima apresenta baixa estabilidade a variações de temperatura.

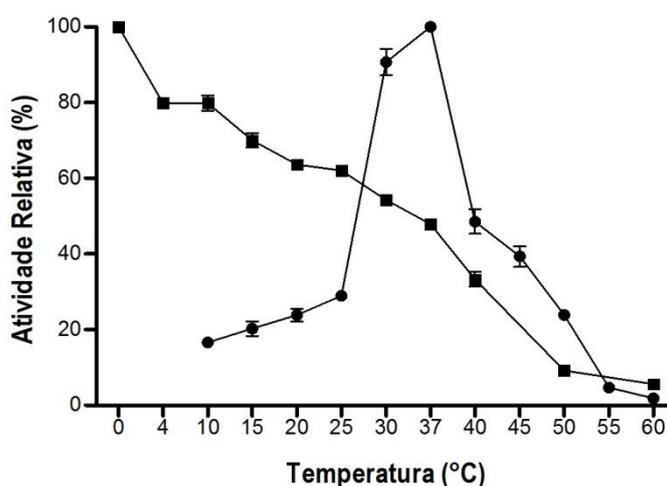


Figura 4.19. Determinação da temperatura ótima e estabilidade térmica da CaneLEG recombinante. (●) Temperatura ótima da CaneLEG. (■) Estabilidade térmica da CaneLEG. Para determinação da estabilidade térmica a enzima foi incubada nas diferentes temperaturas e sua atividade residual foi medida a 37°C e expressa como porcentagem da atividade da enzima não incubada. Todos os dados representam a média dos valores de três experimentos. As barras indicam o erro padrão.

4.5.2. Determinação da constante de Michaelis-Menten e especificidades de substrato da CaneLEG

A constante de Michaelis-Menten foi determinada para a CaneLEG utilizando diferentes concentrações do substrato Z-Ala-Ala-Asn-MCA. O valor de K_m obtido foi de 11,5 μM . Para avaliar a preferência de substrato da CaneLEG, a eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) desta enzima foi calculada com os substratos Z-Ala-Ala-Asn-MCA e Z-Val-Ala-MCA. A eficiência catalítica é uma constante de velocidade de segunda ordem aparente da reação enzimática. Os valores de k_{cat}/K_m geralmente são utilizados para comparar a eficiência de diferentes enzimas, bem como para comparar a utilização de diferentes substratos por uma determinada enzima (COPELAND, 2005). As eficiências catalíticas da CaneLEG para a hidrólise dos substratos Z-Ala-Ala-Asn-MCA e Z-Val-Ala-Asn-MCA foram $33.3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $65 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente. Este resultado indica que embora o substrato Z-Ala-Ala-Asn-MCA seja comumente utilizado para a caracterização de legumainas, a CaneLEG tem preferência pelo substrato contendo resíduo de valina na posição P3.

4.6 Ensaios de inibição da atividade da CaneLEG *in vitro* por iodoacetamida e pelo inibidor de caspase-1

Uma das características que diferenciam as legumainas das cisteíno-peptidases do Clan C1 é que as legumainas são insensíveis ao E-64, um inibidor sintético típico de cisteíno-peptidases do tipo papaína. No entanto, as legumainas são inativadas por iodoacetamida, um inibidor irreversível, que alquila os grupos tiol dos resíduos de cisteína. O inibidor iodoacetamida foi testado contra a CaneLEG e foi observada a inibição da atividade da enzima na ordem de mM enquanto o inibidor

E-64 não afetou sua atividade (Tabela 4.3, Figura 4.20a), como já observado para outras legumainas (KEMBHAVI *et al.*, 1993; ALIM *et al.*, 2007). Tem sido relatado que as legumainas de plantas possuem atividade do tipo caspase (ROJO *et al.*, 2004; HATSUGAI *et al.*, 2004; BOSCH *et al.*, 2010). Com base nisso, a atividade do inibidor de caspase 1, Ac-YVAD-CHO, foi testada contra a CaneLEG recombinante (Tabela 4.3, Figura 4.20b). Foi observado que o Ac-YVAD-CHO foi mais efetivo para inibir a atividade da CaneLEG do que a iodoacetamida (Tabela 4.3, Figura 4.20).

Tabela 4.3. Valores das constantes de inibição (K_i) de inibidores de cisteíno-peptidase e caspase-1 contra a CaneLEG

Inibidor	K_i (nM) \pm DP ^a
Iodoacetamida	$1.5 \times 10^3 \pm 0,018$
Ac-YVAD-CHO	$4.14 \times 10^3 \pm 0,19$
E-64	n.i. ^b

^a Desvio padrão ^b Não inibiu

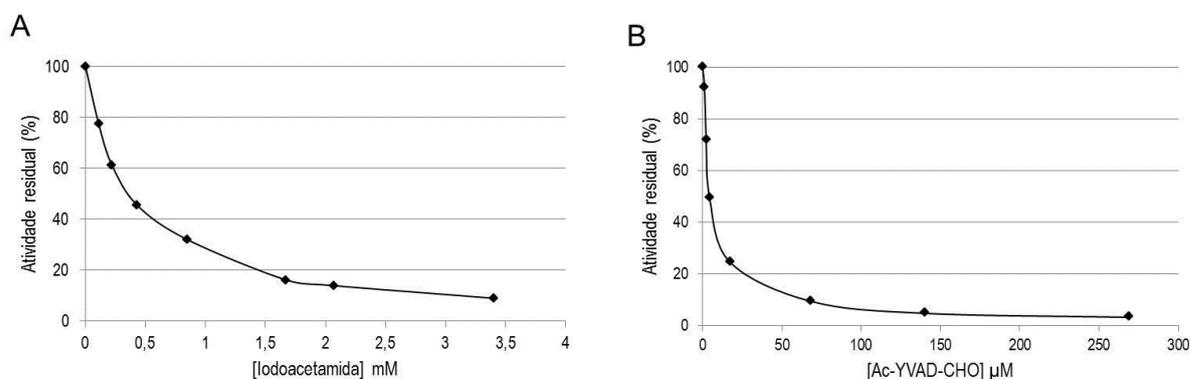


Figura 4.20. Inibição da CaneLEG por iodoacetamida e inibidor de caspase-1. (a) Inibição da CaneLEG pelo inibidor iodoacetamida. (b) Inibição da CaneLEG pelo inibidor de caspase-1 Ac-YVAD-CHO. A atividade residual da enzima foi calculada a partir da inclinação das retas geradas com o programa FL solutions 2.0 e expressa como porcentagem de atividade em relação ao controle (ausência de inibidor).

4.7 Inibição da CaneLEG pela cistatina de cana-de-açúcar (CaneCPI-3)

No presente trabalho, foi avaliada a atividade inibitória da CaneCPI-3, uma fitocistatina de cana-de-açúcar descrita por Gianotti *et al.* (2006), contra a CaneLEG.

A CaneCPI-3 apresenta uma região C-terminal estendida similar à cistatina de cevada descrita por Martinez *et al.* (2007). Os ensaios de inibição mostraram que a CaneCPI-3 é um bom inibidor da CaneLEG, visto que apresentou uma constante de inibição na ordem de nanomolar ($K_i = 0,28$ nM) (Tabela 4.4, Figura 4.21).

Na cistatina de cevada o motivo inibitório de legumaína foi encontrado na região C-terminal da proteína, baseado nestes dados foram realizados ensaios de inibição da CaneLEG com a região C-terminal estendida (CaneCPI-3Cterm) e com a região N-terminal (CaneCPI-3Nterm) da CaneCPI-3 (Figura 4.21). A CaneCPI-3Cterm foi capaz de inibir a atividade catalítica da CaneLEG, na ordem de nanomolar, enquanto a CaneCPI-3Nterm apresentou baixa capacidade inibitória, quando comparada à CaneCPI-3 e CaneCPI-3Cterm (Figura 4.21, Tabela 4.4). Estes resultados indicam que a região C-terminal da CaneCPI-3 é responsável pela inibição de legumaína, no entanto, a estrutura total do inibidor é necessária para uma inibição mais efetiva (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Valores das constantes de inibição (K_i) da CaneCPI-3 contra a CaneLEG

Inibidor	K_i (nM) \pm DP*
CaneCPI-3	0,28 \pm 0,012
CaneCPI3Cterm	0,56 \pm 0,12
CaneCPI3Nterm	3.2 x10 ² \pm 0,011

* Desvio padrão

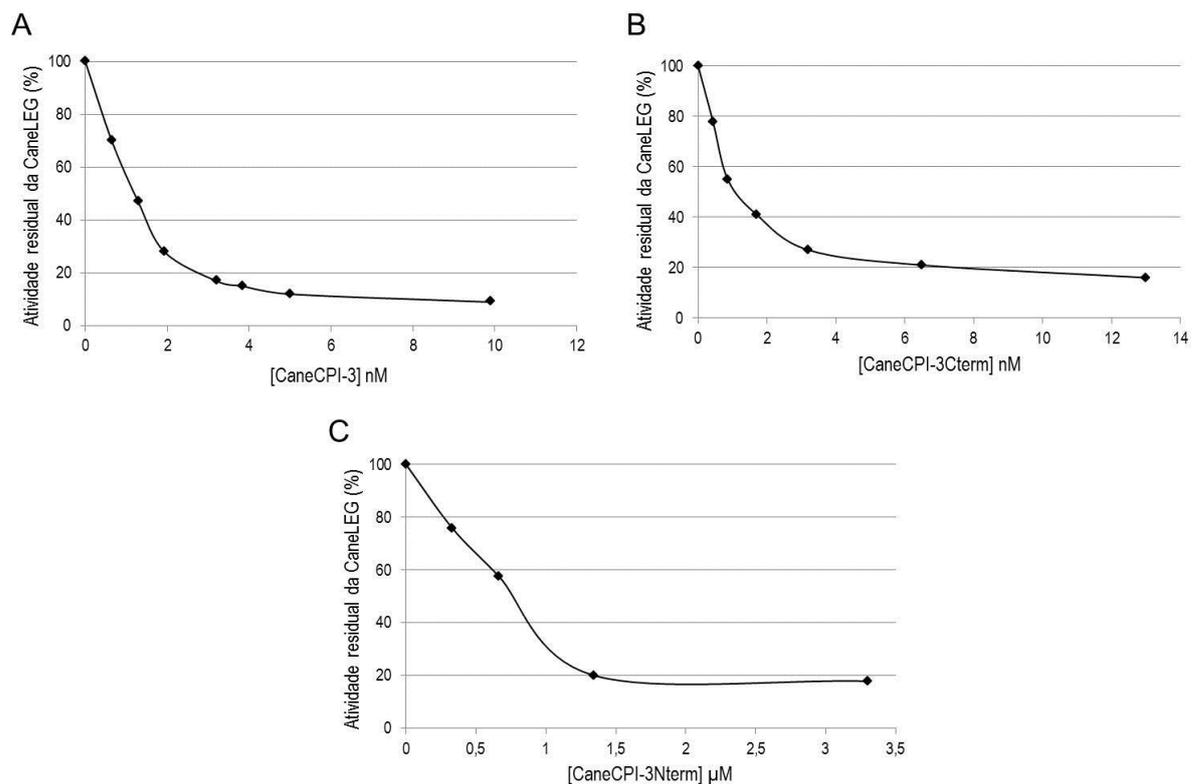


Figura 4.21. Inibição da CaneLEG pela CaneCPI-3. (a) Inibição da CaneLEG pela CaneCPI-3 inteira. (b) Inibição da CaneLEG pela região C-terminal estendida da CaneCPI-3 (CaneCPI-3Cterm). (c) Inibição da CaneLEG pela região N-terminal da CaneCPI-3 (CaneCPI-3Nterm). A atividade residual da enzima foi calculada a partir da inclinação das retas geradas com o programa FL solutions 2.0 e expressa como porcentagem de atividade em relação ao controle (ausência de inibidor).

4.8 Atividade inibitória das formas mutantes da CaneCPI-3 contra a CaneLEG

Martinez *et al.* (2007) verificaram que o resíduo de asparagina, presente no motivo SNSL, é essencial para a atividade inibitória da cistatina C-terminal estendida de cevada. Considerando isto, foi realizada a substituição do resíduo de asparagina 141, presente na região C-terminal estendida da CaneCPI-3, por um resíduo de lisina. As proteínas mutantes CaneCPI-3 Δ N¹⁴¹, mutante da CaneCPI-3 com o resíduo de asparagina 141 do motivo SNSL substituído por um resíduo de lisina, e CaneCPI-3Cterm Δ N¹⁴¹, região C-terminal estendida da CaneCPI-3 contendo a mesma mutação, foram expressas em *E. coli* Rosetta (DE3) (Figura 4.22a/c). Vale

ressaltar que a mutação inserida não interferiu na solubilidade e purificação da CaneCPI-3 e de sua região C-terminal estendida (Figura 4.22b/d).

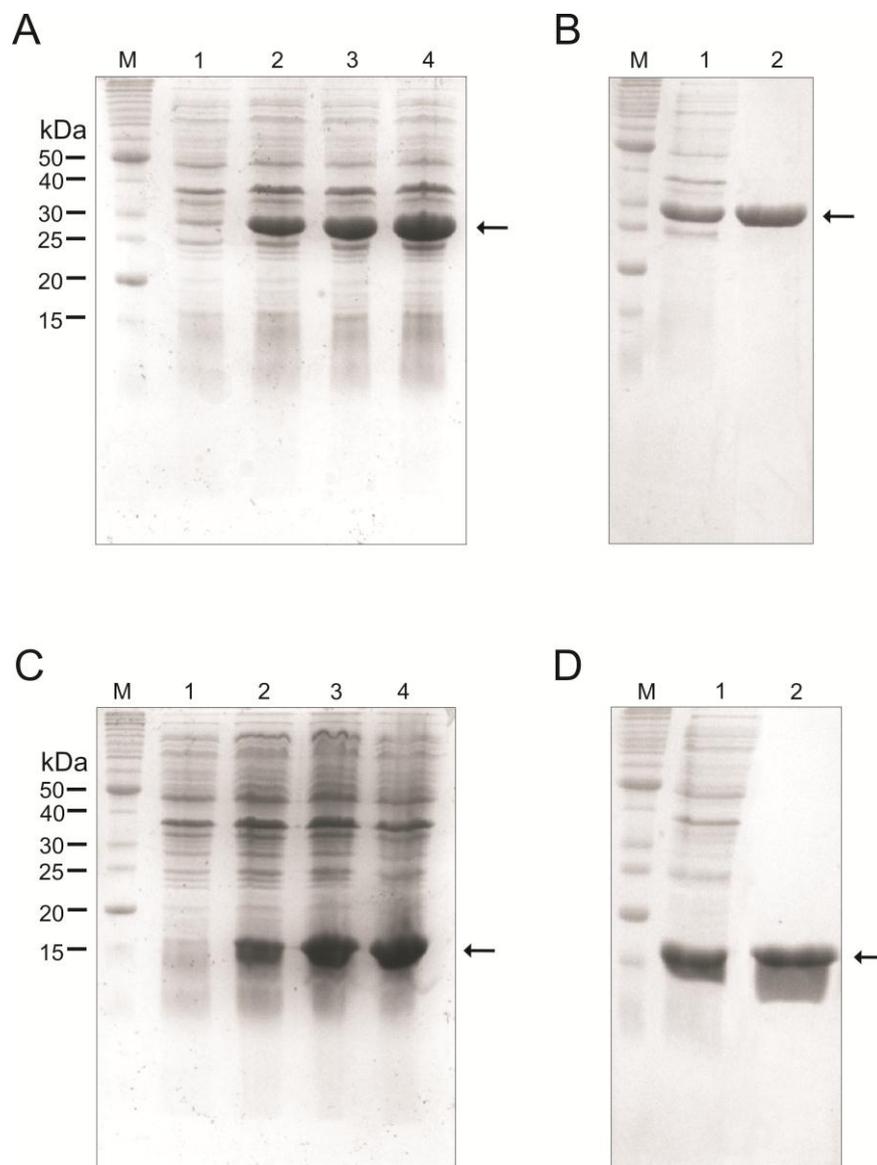


Figura 4.22. Análise em SDS-PAGE 15% da expressão heteróloga das formas mutantes da CaneCPI-3 em *E. coli*. (a) Expressão da CaneCPI-3ΔN¹⁴¹. Linhas 1 a 4: amostras não induzida, induzida por 1 h, 2 h e 3 h, respectivamente. (b) Linha 1: fração solúvel. Linha 2: CaneCPI-3ΔN¹⁴¹ proteína purificada. (c) Expressão da CaneCPI-3CtermΔN¹⁴¹, amostras como em (a). (d) CaneCPI-3CtermΔN¹⁴¹, amostras como em (b). As setas indicam as proteínas recombinantes. M: marcador de massa molecular (Invitrogen).

A atividade inibitória das formas mutantes da CaneCPI-3 contra a CaneLEG foi avaliada utilizando o substrato Z-Ala-Ala-Asn-MCA. Os mutantes CaneCPI-3ΔN¹⁴¹

e CaneCPI-3Cterm Δ N¹⁴¹ perderam a atividade inibitória contra a CaneLEG como pode ser observado na Figura 4.23. Estes resultados sugerem que o resíduo de asparagina 141, presente na região C-terminal da CaneCPI-3, deve estar diretamente envolvido na interação do inibidor com a CaneLEG.

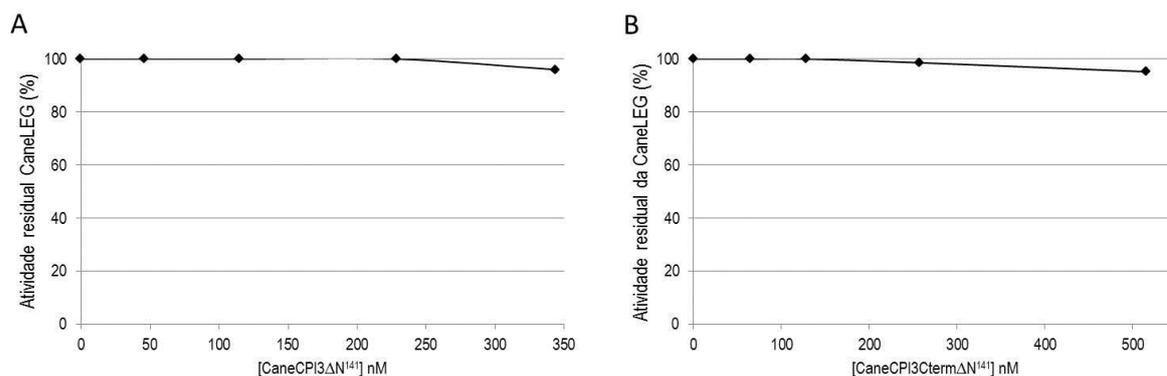


Figura 4.23. Inibição da CaneLEG pelas formas mutantes da CaneCPI-3. (a) Inibição da CaneLEG pela CaneCPI-3 Δ N¹⁴¹. (b) Inibição da CaneLEG pela CCPI3Cterm Δ N¹⁴¹. A atividade residual da enzima foi calculada a partir da inclinação das retas geradas com o programa FL solutions 2.0 e expressa como porcentagem de atividade em relação ao controle (ausência de inibidor)

4.9. Localização de legumainas fusionadas à GFP, em células vegetais

Para determinar se a CaneLEG e CaneCPI-3 estavam localizadas no mesmo compartimento celular, foram realizados ensaios de localização celular dessas proteínas fusionadas à GFP em células vegetais. As ORFs da *CaneLEG* e *CaneCPI-3*, contendo as sequências correspondentes ao peptídeo sinal, foram clonadas no vetor CD3-327, fusionadas à GFP na sua extremidade C-terminal. Em seguida, camadas de células da epiderme de cebola foram transformadas, de modo transiente, com os plasmídeos descritos acima. Em alguns ensaios as células vegetais foram co-bombardadas com o plasmídeo pRTL2DNS/ss-RFP-HDEL (SHOCKEY *et al.*, 2006), que continha o sinal HDEL C-terminal, para localização específica no retículo endoplasmático.

Nos ensaios de localização da CaneLEG fusionada a GFP não foram observadas células fluorescentes. As células transformadas com o plasmídeo controle, expressando apenas a GFP, estão mostradas na Figura 4.24.

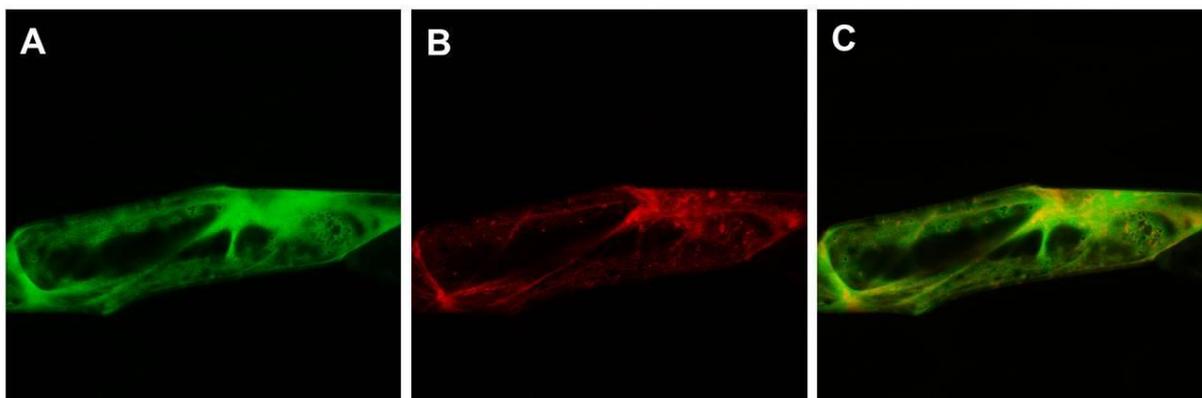


Figura 4.24. Localização da GFP (controle) em células da epiderme de cebola. (a), (b) e (c) célula co-transformada com os plasmídeos CD-327 (controle) e pRTL2DNS/ss-RFP-HDEL, que contém o sinal de retenção de retículo endoplasmático HDEL (emite fluorescência vermelha especificamente no RE). Fluorescência observada em microscópio confocal após 24 h de incubação. (a) Localização GFP. (c) Localização do marcador de RE. (c) Sobreposição das duas imagens.

Para avaliar a relação da liberação do pró-peptídeo com o não aparecimento de fluorescência nas células transformadas com a construção da CaneLEG, a sequência correspondente ao pró-peptídeo C-terminal foi excluída e as células cebola foram transformadas com a nova construção denominada *CaneLEGwcp* (*without c-terminal pro-peptide*). Após a retirada do pró-peptídeo C-terminal foi possível observar a localização da enzima *CaneLEGwcp* no interior da célula (Figura 4.25a/b). Além disso, a *CaneLEGwcp* co-localizou-se com o marcador vermelho que possui sinal HDEL, sinal para retenção no retículo endoplasmático (Figura 4.25b/c/d).

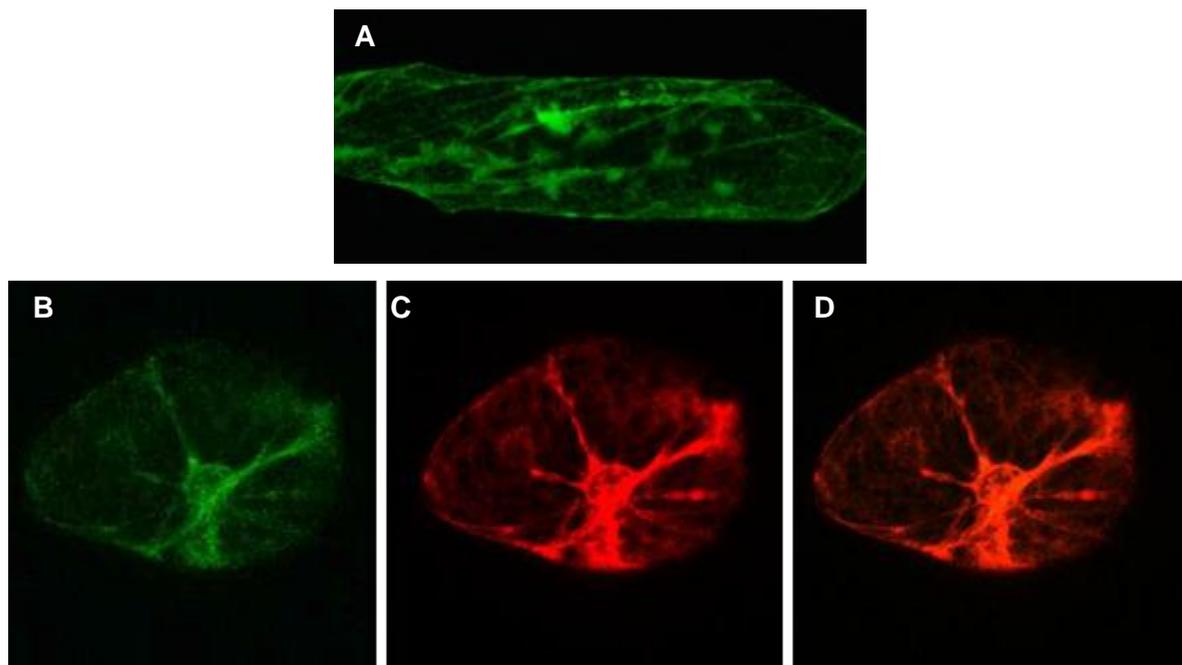


Figura 4.25. Localização CaneLEGwcp em células da epiderme de cebola. (a) Célula transformada com a construção CaneLEGwcp-GFP. (b), (c) e (d) célula co-transformada com as construções CaneLEGwcp-GFP e pRTL2DNS/ss-RFP-HDEL, que contém o sinal de retenção de retículo endoplasmático HDEL (emite fluorescência vermelha especificamente no RE). Fluorescência observada em microscópio confocal após 24 h de incubação. (b) Localização CaneLEGwcp-GFP. (c) Localização do marcador de RE. (d) Sobreposição das duas imagens.

Concordando com os resultados acima, as células transformadas com a ORF mutante *CaneLEG Δ C²¹²*, mutante da CaneLEG que é cataliticamente inativo e possui o pró-peptídeo C-terminal, apresentaram o mesmo perfil de localização que as células transformadas com a ORF *CaneLEGwcp* (Figura 4.26).

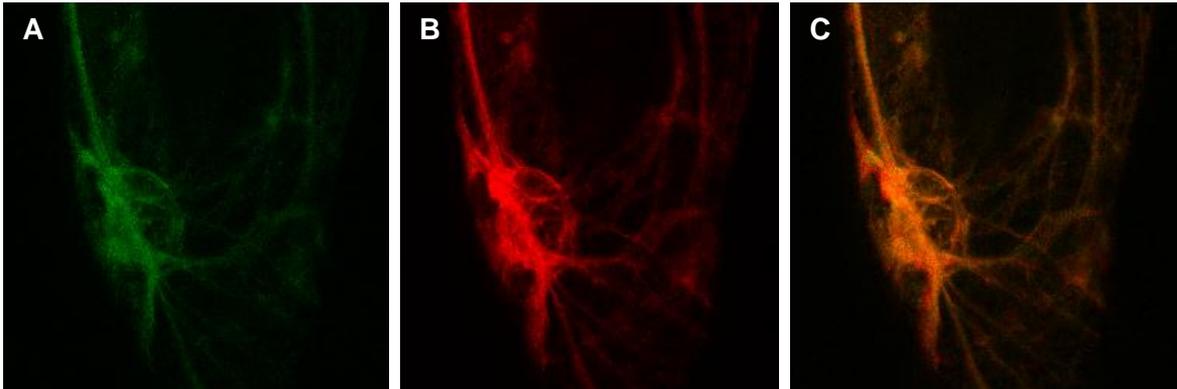


Figura 4.26. Localização CaneLEG Δ C²¹² em células da epiderme de cebola co-transformadas com as construções CaneLEG Δ C²¹²-GFP e pRTL2DNS/ss-RFP-HDEL, que contém o sinal de retenção de retículo endoplasmático HDEL (emite fluorescência vermelha especificamente no RE). Fluorescência observada em microscópio confocal após 24 h de incubação. (a) Localização CaneLEG Δ C²¹². (b) Localização do marcador de RE. (c) Sobreposição das duas imagens.

Embora a localização da cistatina com a região C-terminal estendida de cevada (HvCPI-4) tenha sido descrita por Martinez *et al.* (2009), nos ensaios de localização da CaneCPI-3 não foram observadas células fluorescentes.

Inicialmente foi proposto somente a realização dos ensaios de localização da CaneLEG e da CaneCPI-3. No entanto, após análise no banco de dados de ESTs disponíveis para cevada, foi escolhida uma legumaina, denominada HvLEG-2, que apresentou 75% de similaridade com a CaneLEG. Foi realizada a análise de localização da HvLEG-2 e complementação por BiFC da HvLEG-2 com uma cistatina de cevada com a região C-terminal estendida (HvCPI-4), previamente descrita por Martinez *et al.* (2007), para posterior comparação com os dados obtidos para cana-de-açúcar.

A legumaina de cevada, HvLEG-2, apresentou um padrão de localização no retículo endoplasmático semelhante ao observado para a CaneLEGwcp e CaneLEG Δ C²¹² (Figura 4.27). No entanto, a presença do pró-peptídeo C-terminal da HvLEG-2 bem como sua ausência, HvLEG-2wcp, não influenciou no aparecimento

de fluorescência ou no padrão de localização da proteína nas células transformadas (Figura 4.28).

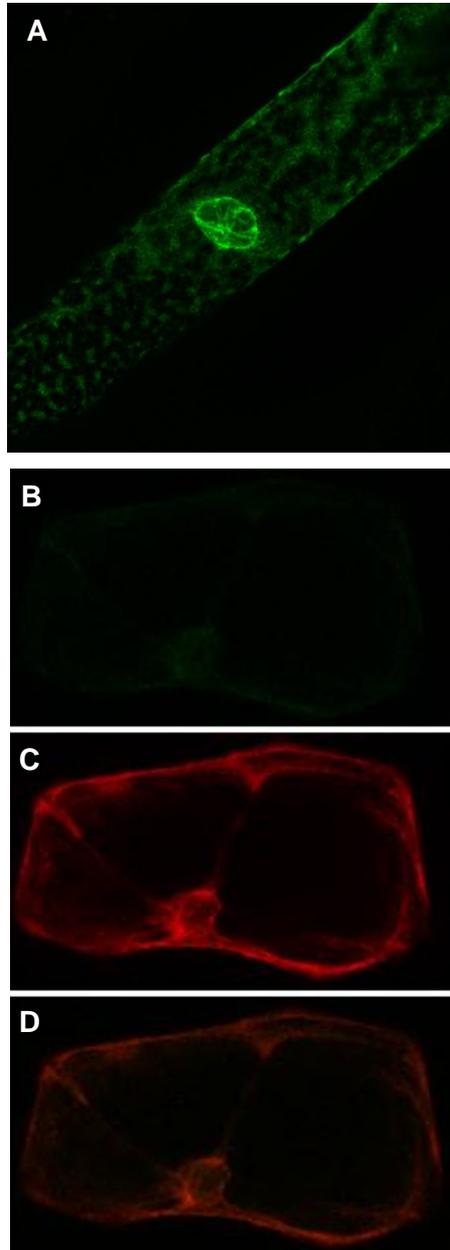


Figura 4.27. Localização HvLEG-2 em células da epiderme de cebola. (a) Célula transformada com a construção HvLEG-2-GFP. (b), (c) e (d) Célula co-transformada com as construções HvLEG-2-GFP e pRTL2DNS/ss-RFP-HDEL, que contém o sinal de retenção de retículo endoplasmático HDEL (emite fluorescência vermelha especificamente no RE). Fluorescência observada em microscópio confocal após 24 h de incubação. (b) Localização HvLEG-2-GFP. (c) Localização do marcador de RE. (d) Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

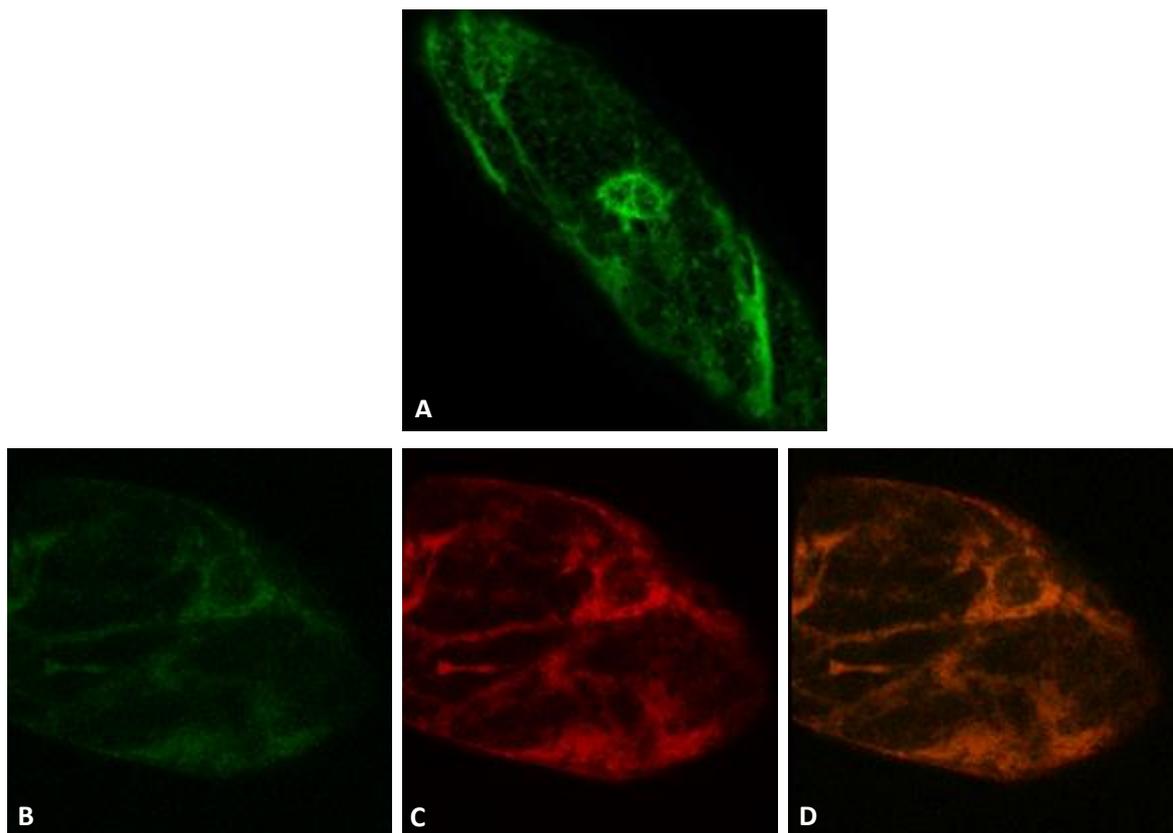


Figura 4.28. Localização HvLEG-2wcp em células da epiderme de cebola. (a) Célula transformada com a construção HvLEG-2wcp-GFP. (b), (c) e (d) Célula co-transformada com as construções HvLEG-2wcp-GFP e pRTL2DNS/ss-RFP-HDEL, que contém o sinal de retenção de retículo endoplasmático HDEL (emite fluorescência vermelha especificamente no RE). Fluorescência observada em microscópio confocal após 24 h de incubação. (b) Localização HvLEG-2wcp-GFP. (c) Localização do marcador de RE. (d) Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

4.10. Interação de uma legumaina com uma cistatina C-terminal estendida em células vegetais

Para avaliar se a interação observada entre a CaneLEG e a CaneCPI-3 *in vitro* também ocorre *in vivo*, foram realizados ensaios de complementação por fluorescência bimolecular (BiFC). Para os ensaios de interação entre a CaneLEG e a CaneCPI-3 essas proteínas foram fusionadas ao fragmento N-terminal (NGFP) e C-terminal da GFP (CGFP), respectivamente. Os ensaios de inibição *in vitro* indicaram uma forte inibição da atividade da CaneLEG pela CaneCPI-3 ($K_i = 0,28$ nM). Contudo, nos ensaios de BiFC não foi possível confirmar se a interação peptidase-

inibidor realmente ocorre nas células vegetais, uma vez que não foi observada a emissão de fluorescência pelas células co-bombardeadas com as construções CaneLEG-NGFP e CaneCPI-3-CGFP. A ausência de fluorescência observada nesse experimento poderia ser consequência da localização em diferentes compartimentos das proteínas analisadas ou, ainda, devido a não expressão do inibidor CaneCPI-3 nas células vegetais, visto que não foi possível observar a localização da CaneCPI-3 fusionada à GFP.

A interação entre uma legumaína e uma fitocistatina de cevada foi confirmada pela presença de fluorescência, após 48 h de incubação, em células co-bombardeadas com as construções HvLEG-2wcp-NGFP e HvCPI-4-CGFP (Figura 4.29). Embora os ensaios de inibição de cisteíno-peptidases (CP) por cistatinas *in vitro* sejam valiosos na busca pelos possíveis alvos das cistatinas na planta, ainda são poucos os relatos da ocorrência de interação cisteíno-peptidase-cistatina *in vivo*. O resultado obtido é o primeiro relato da interação entre uma legumaína e uma fitocistatina em célula vegetal.

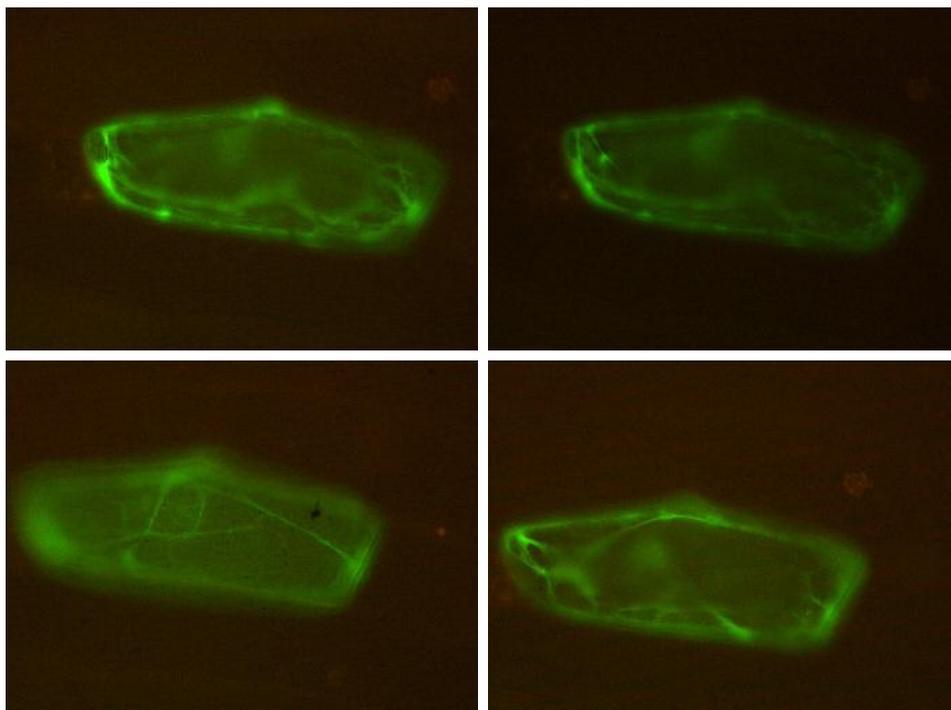


Figura 4.29. Análise da interação HvLEG-2wcp-HvCPI-4 por BiFC em células da epiderme de cebola. Fluorescência observada em microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot, após 48 h de incubação. As imagens correspondem a uma única célula.

4.11. Análise da expressão gênica da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* durante o desenvolvimento da cana de açúcar

A expressão dos genes *CaneLEG* e *CaneCPI-3* durante o desenvolvimento da cana-de-açúcar foi analisada utilizando a técnica de PCR quantitativo (qPCR). Os cDNAs utilizados como molde nas reações de qPCR foram sintetizados a partir dos RNAs extraídos de tecidos coletados em quatro estágios do desenvolvimento da cana de açúcar. Os valores de expressão foram expressos como conteúdo de mRNA dos genes da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* normalizados com os níveis de mRNA do gene da poliubiquitina de cana-de-açúcar, utilizado como controle endógeno.

Na fase I (25 dias após o plantio (DAP)), também denominada fase de germinação e estabelecimento, os níveis de expressão da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* foram analisados em folha e cartucho foliar da cana-de-açúcar. Neste estágio, a

expressão da *CaneLEG* foi mais pronunciada em folhas do que em cartucho foliar (Figura 4.30). De modo similar, os níveis de mRNA da *CaneCPI-3* também foram mais altos em folhas, no entanto, sua expressão foi ligeiramente menor que a expressão observada para *CaneLEG* em ambos tecidos (Figura 4.30).

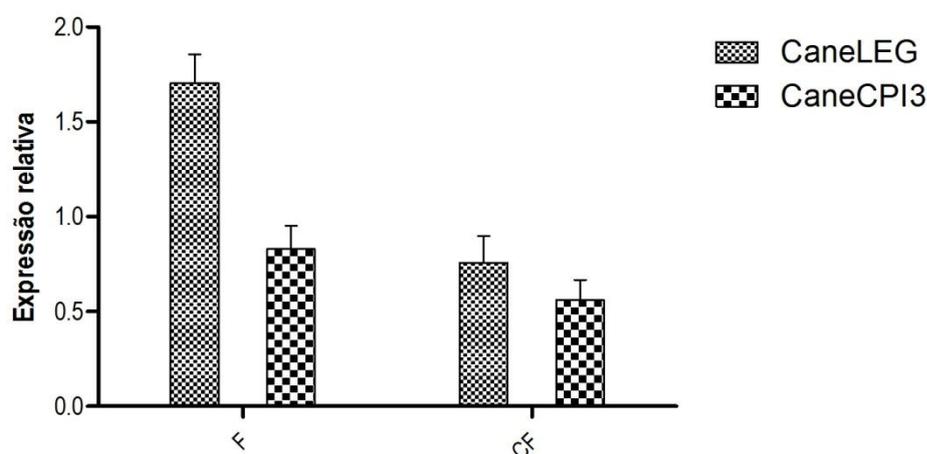


Figura 4.30. Avaliação da expressão por qPCR dos genes da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* durante a fase de germinação e estabelecimento da cana-de-açúcar (25 DAP). A expressão dos genes foi avaliada em folhas (F) e cartucho foliar (CF). Os valores de expressão são relativos ao gene da poliubiquitina (controle endógeno). As barras de erro foram calculadas de acordo com Livak e Schmittgen (2001).

Em torno de 40 dias após o plantio inicia-se a fase de perfilhamento da cana-de-açúcar, podendo durar até 120 dias. Para análise da expressão da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* durante o perfilhamento, ou fase II, os tecidos foram coletados 90 DAP. Os tecidos coletados foram cartucho foliar, folha, entrenó, gema lateral, meristema apical (e tecidos circundantes), bainha da raiz (*root band*) e broto (gema lateral em brotamento). Nesta fase do desenvolvimento, a *CaneLEG* apresentou-se mais expressa em broto e folha, enquanto um baixo nível de expressão foi observado no meristema apical e bainha da raiz (Figura 4.31). A *CaneLEG* apresentou níveis de expressão similares no cartucho foliar, entrenó e gema lateral (Figura 4.31). Já os

níveis de expressão do gene da *CaneCPI-3* foram mais pronunciados na bainha da raiz, meristema apical e broto, sendo ligeiramente menos expresso no entrenó, gema lateral e folha (Figura 4.31). No cartucho foliar foram detectados baixos níveis de mRNA da *CaneCPI-3* (Figura 4.31).

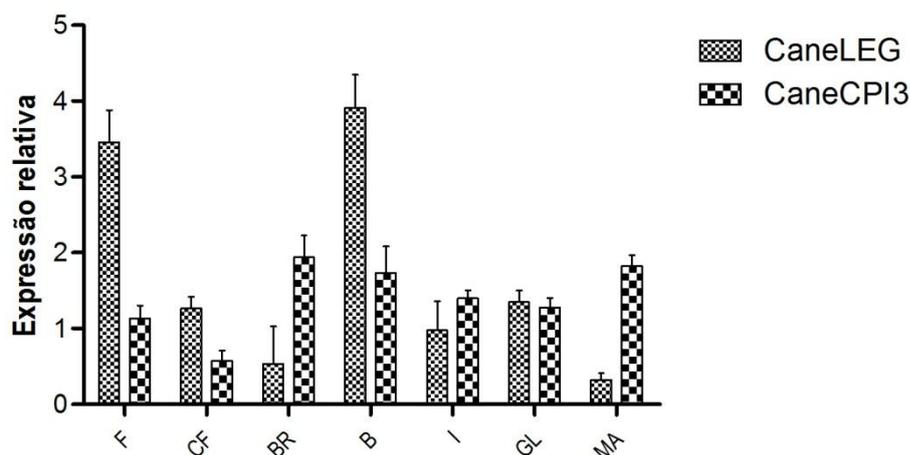


Figura 4.31. Avaliação da expressão por qPCR dos genes da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* durante o perfilhamento da cana-de-açúcar (90 DAP). A expressão dos genes foi avaliada em folhas (F), cartucho foliar (CF), bainha da raiz (BR), broto (B), entrenó (I), gema lateral (GL) e meristema apical (MA). Os valores de expressão são relativos ao gene da poliubiquitina (controle endógeno). As barras de erro foram calculadas de acordo com Livak e Schmittgen (2001).

Entre 120 e 270 DAP ocorre a fase de crescimento dos colmos, período no qual acontece o alongamento dos colmos. Nesta fase, fase III, a *CaneLEG* apresentou maior abundância de transcritos em folhas e entrenó. Quando comparada com a fase II do desenvolvimento, foi observada uma redução nos níveis de transcritos da *CaneLEG* em folhas e cartucho foliar. De modo inverso, observou-se um aumento significativo de transcritos no entrenó e na bainha da raiz, enquanto os níveis de expressão no meristema apical e gema lateral foram mantidos (Figura 4.32). Para *CaneCPI-3* foi observado um aumento no nível de expressão no cartucho foliar e uma diminuição da expressão na bainha da raiz, entrenó e gema lateral, com uma forte redução da expressão nos dois últimos tecidos (Figura 4.32).

Em folha e meristema apical, os níveis de expressão da *CaneCPI-3* foram similares ao observado na fase II.

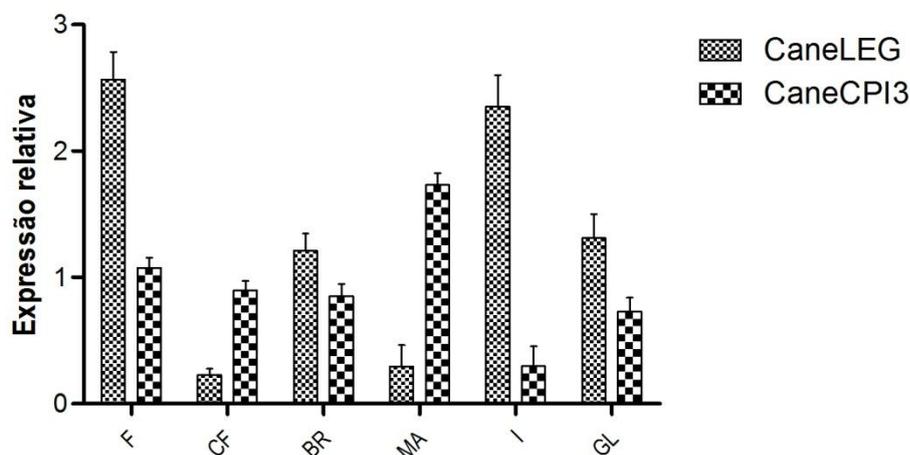


Figura 4.32. Avaliação da expressão por qPCR dos genes da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* durante a fase de crescimento dos colmos da cana-de-açúcar (180 DAP). A expressão dos genes foi avaliada em folhas (F), cartucho foliar (CF), bainha da raiz (BR), entrenó (I), gema lateral (GL) e meristema apical (MA). Os valores de expressão são relativos ao gene da poliubiquitina (controle endógeno). As barras de erro foram calculadas de acordo com Livak e Schmittgen (2001).

O último estágio de desenvolvimento analisado foi o início da fase de maturação dos colmos, também denominado neste trabalho como fase IV. No início da fase de maturação, a expressão da *CaneLEG* em folhas foi menor que a expressão observada na fase III (Figura 4.33). Além disso, observou-se uma ligeira diminuição no nível de transcritos da *CaneLEG* em bainha da raiz e gema lateral. Em cartucho foliar e meristema apical os níveis de expressão foram similares aos observados na fase III, enquanto houve uma forte superexpressão da *CaneLEG* no entrenó (Figura 4.33). Já a *CaneCPI-3*, na fase IV, apresentou um aumento nos níveis de transcritos em entrenó, gema lateral, bainha da raiz e cartucho foliar, sendo que o aumento mais forte ocorreu em entrenó e gema lateral. Uma ligeira diminuição da expressão da *CaneCPI-3* foi observada em folha e meristema apical, quando comparada com a expressão deste gene na fase III (Figura 4.33).

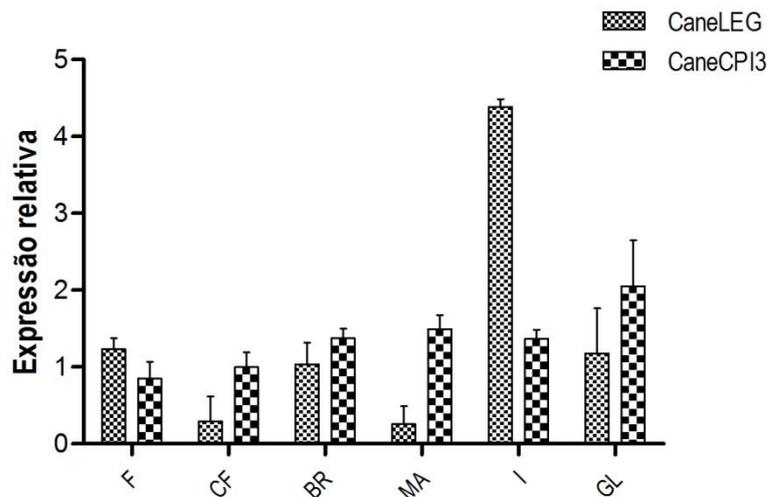


Figura 4.33. Avaliação da expressão por qPCR dos genes da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* durante o início da fase de maturação dos colmos da cana-de-açúcar (270 DAP). A expressão dos genes foi avaliada em folhas (F), cartucho foliar (CF), bainha da raiz (BR), entrenó (I), gema lateral (GL) e meristema apical (MA). Os valores de expressão são relativos ao gene da poliubiquitina (controle endógeno). As barras de erro foram calculadas de acordo com Livak e Schmittgen (2001).

4.12. Análise da expressão gênica da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* em plântulas tratadas com fitohormônios

Os fitohormônios são substâncias orgânicas naturalmente encontradas nas plantas, envolvidas em vários processos fisiológicos como crescimento, desenvolvimento, resposta a estresse biótico e abiótico. Dentre os modos de atuação dos fitohormônios está regulação da expressão de genes, direta ou indiretamente, envolvidos nos processos fisiológicos (DAVIES, 2004). Os padrões de expressão dos genes *CaneLEG* e *CaneCPI-3* foram avaliados por qPCR em plântulas de cana-de-açúcar tratadas com fitohormônios. Os cDNAs molde foram sintetizados a partir de amostras de RNA isoladas de folhas de plântulas tratadas com 100 μ M dos fitohormônios ácido giberélico (GA3), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico (AJ).

Nas plântulas tratadas com GA3, não foi observada alteração na expressão dos genes *CaneLEG* e *CaneCPI-3* três ou 24 h após o tratamento (HAT) (Figura 4.34a). Após o tratamento das plântulas com ABA, observou-se uma diminuição significativa da expressão da *CaneLEG* 3 HAT, seguida de um forte aumento no nível de transcritos 24 HAT (Figura 4.34b). Logo no início do tratamento com ABA houve uma super-expressão dos transcritos da *CaneCPI-3* que prosseguiu até 24 HAT (Figura 4.34b). No entanto, o nível de transcritos da *CaneLEG* na amostra coletada a 24 HAT foi maior que o observado para o gene da cistatina. No tratamento com AS, a *CaneLEG* apresentou uma diminuição da expressão 3 HAT, porém 24 HAT o nível de expressão foi similar à amostra controle (Figura 4.34c). A expressão do gene da *CaneCPI-3* não foi influenciada de modo significativo pelo tratamento com AS (Figura 4.34c). O tratamento com AJ levou à redução na expressão dos genes *CaneLEG* e *CaneCPI-3* 3 HAT, com uma maior redução no nível de mRNA da *CaneLEG* (Figura 4.34d). Contudo, 24 HAT com AJ os níveis de expressão da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* foram similares à expressão nas plântulas controle (Figura 4.34d).

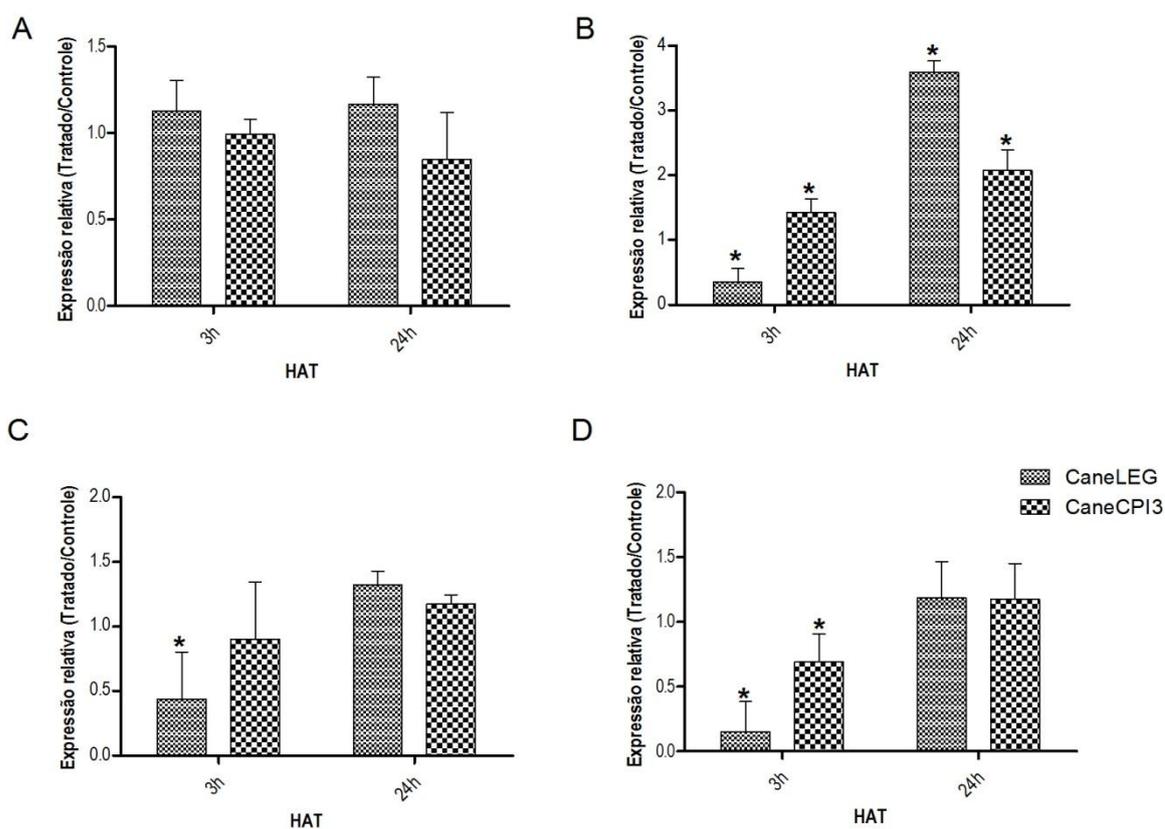


Figura 4.34. Expressão dos genes *CaneLEG* e *CaneCPI-3* em plântulas de cana-de-açúcar tratadas com fitohormônios. (a) 100 μ M GA3. (b) 100 μ M ABA. (c) 100 μ M AS. (d) 100 μ M AJ. Os dados de cada ponto representam a média de seis repetições, sendo triplicata biológica e duplicata da reação de qPCR. As plantas controle foram tratadas com o etanol. As barras de erro foram calculadas como descrito por Livak e Schmittgen (2001). Os asteriscos indicam os valores significativos ($p < 0,05$), de acordo com análise no programa REST.

5. DISCUSSÃO

Devido à importância da cana-de-açúcar como biomassa energética, vários trabalhos têm sido realizados almejando a obtenção de ferramentas para a melhor produção e aproveitamento desta matéria-prima. Dentre os estudos realizados, destacam-se aqueles relacionados à análise de ESTs (CARSON *et al.*, 2002; VETTORE *et al.*, 2003; CASU *et al.*, 2004). Os estudos de ESTs da cana-de-açúcar têm possibilitado o conhecimento mais detalhado da expressão gênica e levado à descoberta de novos genes, provavelmente envolvidos em processos fisiológicos importantes. No entanto, ainda faz-se necessária a caracterização desses genes, para um melhor entendimento de suas prováveis funções na fisiologia da planta.

Neste trabalho, foi realizada a caracterização de uma legumaina de cana-de-açúcar (CaneLEG) que incluiu a produção e caracterização da proteína recombinante e a análise da expressão gênica durante o desenvolvimento da planta e após tratamento com fitohormônios. Além disso, foi avaliada a inibição da CaneLEG recombinante por uma cistatina de cana-de-açúcar, CaneCPI-3 previamente descrita por Gianotti *et al.* (2006), bem como a análise da expressão gênica deste inibidor nas condições estudadas para a CaneLEG.

5.1. Caracterização da CaneLEG recombinante

Após análise no banco de dados do SUCEST e com base em informações descritas por Correa *et al.* (2001) uma legumaina de cana-de-açúcar foi escolhida para estudo. A análise da sequência que codifica a CaneLEG indicou que este gene codifica os resíduos de aminoácidos característicos de legumainas de plantas, apresentando maior similaridade com legumainas vegetativas. Concordando com os

dados da literatura, a CaneLEG é sintetizada como um polipeptídeo precursor, contendo um peptídeo sinal e os pró-peptídeos N e C-terminais. Alguns autores propõem que os pró-peptídeos das VPEs provavelmente permitem que a proteína seja transportada até o seu local de destino em uma forma inativa, que se auto-ativa em condições ácidas (HIRAIWA *et al.*, 1997; HIRAIWA *et al.*, 1999; KUROYNAGI *et al.*, 2002).

Além da presença dos dois pró-peptídeos, a sequência de aminoácidos da CaneLEG possui o motivo IRLPS localizado no pró-peptídeo N-terminal (Figura 4.3). Na busca por um sinal de direcionamento vacuolar em proteínas da cana-de-açúcar, Jackson e colaboradores (2007) descreveram que o motivo IRLPS, encontrado no pró-peptídeo de algumas VPEs, é uma sequência de direcionamento vacuolar. Esses autores avaliaram a função do motivo IRLPS de uma legumaina de cana-de-açúcar fusionando-o à GFP e verificaram o redirecionamento da proteína de fusão para o vacúolo em cana-de-açúcar. A CaneLEG apresenta similaridade com a VPE estudada por esses autores. Isto sugere que a CaneLEG estudada aqui deve ser a mesma legumaina descrita por esses autores e a localização da CaneLEG no vacúolo da cana-de-açúcar. De modo contrário, uma VPE de cevada, nucelaína, que não possui o sinal vacuolar descrito por Jackson *et al.* (2007) localiza-se na parede celular de células do nucelo (LINNESTAD *et al.*, 1998).

Embora alguns autores tenham caracterizado VPEs recombinantes produzidas em sistema bacteriano (WANG *et al.*, 2009; BOSCH *et al.*, 2010), neste trabalho não foi possível a obtenção da CaneLEG ativa neste sistema de expressão. A CaneLEG possui 11 resíduos de cisteína o que pode ter dificultado sua produção na forma solúvel em bactérias, provavelmente pela não-formação de ligações

dissulfeto. Portanto, a CaneLEG recombinante expressa em sistema bacteriano foi recuperada de gel de poliacrilamida e utilizada para produção de anticorpos policlonais em camundongos, que foram utilizados em ensaios posteriores.

A CaneLEG recombinante ativa foi expressa em *P. pastoris* e utilizada nos ensaios de caracterização. Uma VPE de *R. communis* foi expressa intracelularmente em *S. cerevisiae* e legumínas do parasita humano *Schistosoma mansoni* e do carrapato *Ixodes ricinus* foram expressas de forma secretada em *P. pastoris* (HIRAIWA *et al.*, 1997; CAFFREY *et al.*, 2000; SOJKA *et al.*, 2007). No entanto, nesses trabalhos as proteínas recombinantes foram detectadas apenas *por Western blotting* e não foram purificadas, sendo utilizado para os ensaios de caracterização o lisado celular ou o sobrenadante do meio de indução liofilizado.

A CaneLEG foi expressa com sucesso em *P. pastoris* em fusão com duas caudas de histidinas, uma na região N-terminal e outra na C-terminal, e em pH neutro para facilitar sua purificação e reduzir sua ativação prematura. A CaneLEG foi obtida com um baixo rendimento de ~4 mg/L, quando comparada com proteínas expressas em sistema bacteriano ou outras proteínas já expressas em *P. pastoris* em nosso laboratório. No entanto, a CaneLEG purificada apresentou atividade enzimática suficiente para realização dos ensaios de caracterização cinética.

Após a purificação da CaneLEG, foi observada a presença de bandas com massas moleculares entre 45 e 60 kDa, indicando o processamento da proteína nas condições de expressão utilizada. Uma vez que a CaneLEG possui um provável sítio de glicosilação no resíduo asparagina 143, a presença da banda com 60 kDa sugere que esta banda corresponde à forma não processada da proteína recombinante glicosilada pela levedura. Embora tenha sido descrita a presença de sítios de

glicosilação em legumainas de *Arabidopsis thaliana* e *Ricinus communis*, a análise de proteínas purificadas diretamente de extratos da planta indicam que as legumainas não são glicosiladas (HIRAIWA *et al.*, 1997; HIRAIWA *et al.*, 1999). No entanto, foi observada a glicosilação de VPEs expressas em *S. cerevisiae* e em células de inseto. A glicosilação não interferiu na atividade das enzimas (HIRAIWA *et al.*, 1997; KUROYANAGI *et al.*, 2002).

Os resultados mostraram que, como outras VPEs (KUROYANAGI *et al.*, 2002; BOSCH *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2009), a CaneLEG se auto-processa em condições ácidas. A mutação no resíduo de cisteína (C212), provável resíduo do sítio ativo de acordo com o alinhamento com outras VPEs, foi suficiente para inibir a ativação desta enzima. Após mutação do resíduo C212 da CaneLEG, a proteína mutante inativa foi purificada com um rendimento de ~13 mg/L, sugerindo que o baixo rendimento obtido da CaneLEG também pode estar relacionado à sua auto-proteólise durante o processo de indução (Figura 4.13). Um esquema da ativação observado para a CaneLEG e sua forma mutante é mostrado na Figura 5.1.

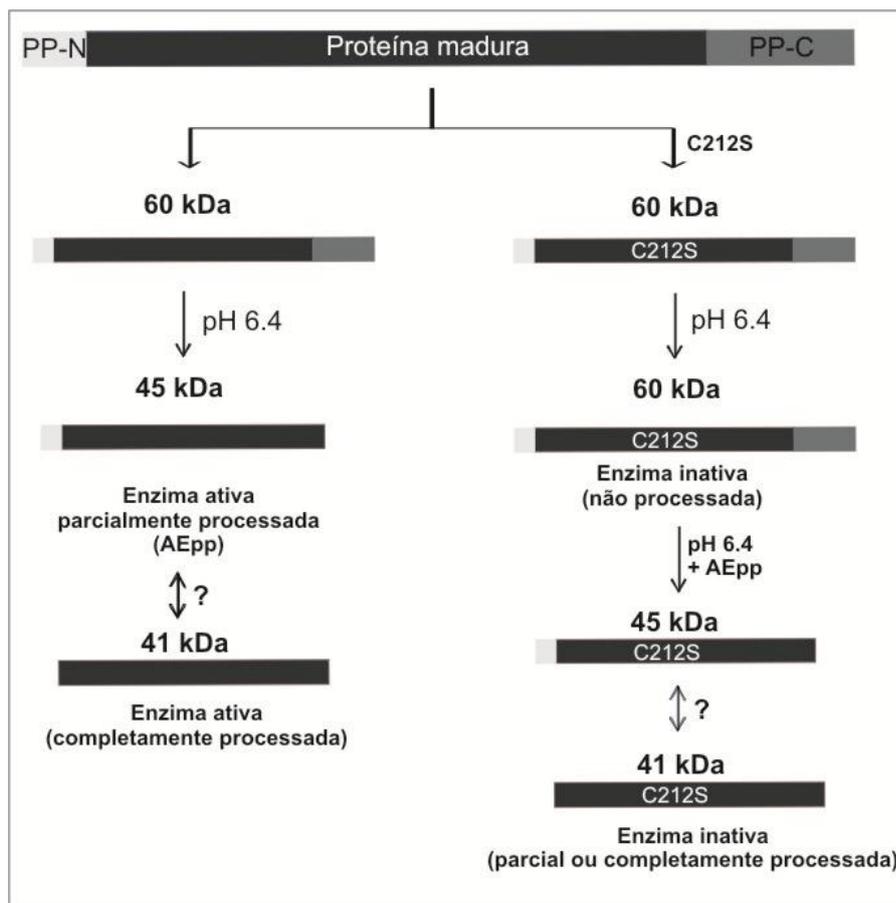


Figura 5.1. Representação esquemática da estrutura da CaneLEG, ativação *in vitro* e processamento da forma mutante CaneLEG Δ C²¹² pela CaneLEG. Neste esquema foi considerado o processamento das bandas de 60 kDa recuperadas após purificação da CaneLEG e CaneLEG Δ C²¹².

A análise de *Western blotting* utilizando anticorpos monoclonais anti-His-tag mostrou que mesmo após longos períodos de incubação em pH ácido a CaneLEG ainda apresentava uma cauda de histidinas, sugerindo a remoção apenas do pró-peptídeo C-terminal. Este resultado sugere que para a ativação completa da CaneLEG deva ser necessário a incubação da enzima em pH mais ácido, como observado para a legumaina humana. A legumaina humana remove o pró-peptídeo C-terminal em pH 5,5 e o pró-peptídeo N-terminal em pH 4,5 (LI *et al.*, 2003).

Em geral, as legumainas apresentam atividade ótima em pHs variando de 5 a 6,4 e, em alguns casos, essas enzimas são inativadas em pHs acima de 7 (KEMBHAVI *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 1998b). A atividade mais

alta da CaneLEG foi observada na faixa de pH entre 5,5 e 7, com 100% de atividade em pH 6,5. A clivagem do pró-peptídeo C-terminal foi observada quando a CaneLEG foi induzida em condições ácidas a neutras, pH 6 a 7. Estes resultados concordam com um estudo *in vitro* que sugere a atuação do pró-peptídeo C-terminal como um motivo auto-inibitório e sua liberação, em condições ácidas, é suficiente para ativar a γ VPE de *A. thaliana* produzida em células de inseto (KUROYNAGI *et al.*, 2002).

O valor de K_m obtido, utilizando o substrato Z-Ala-Ala-Asn-MCA, mostrou que a CaneLEG apresenta maior afinidade para este substrato, quando comparada com legumainas de porco (*Sus scropha*), feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), que apresentaram valores de K_m de 50, 56 e 33 μ M para o mesmo substrato, respectivamente (ABE *et al.*, 1993; ROTARI *et al.*, 2001). Os ensaios para determinação da eficiência catalítica indicaram a preferência da CaneLEG pelo substrato Z-Val-Ala-Asn-MCA ao invés do substrato padrão utilizado para caracterização de legumainas, Z-Ala-Ala-Asn-MCA. Estes resultados corroboram com a preferência da VPE de feijão por resíduo de valina na posição P3 do substrato (ROTARI *et al.*, 2001).

5.2. Inibição da CaneLEG recombinante pela cistatina de cana-de-açúcar

O uso de inibidores, com mecanismo de ação ou proteínas-alvo conhecidos, serve como uma valiosa ferramenta para a complementação da caracterização de enzimas quanto à sua provável função e mecanismo de ação. Os compostos iodoacetamida, um inibidor geral de cisteíno-peptidases, e o inibidor de caspase-1 Ac-YVAD-CHO apresentaram atividade inibitória contra a CaneLEG. A inibição da CaneLEG pelo Ac-YVAD-CHO sugere que esta enzima pode estar envolvida na

atividade tipo caspase em cana-de-açúcar. Entretanto, uma análise mais detalhada é necessária para validar a atividade tipo caspase desta enzima. Embora não tenha sido descrita a presença de caspases em plantas, o uso de substratos e inibidores desta classe de enzimas tem indicado a presença de atividade relacionada à caspases em células vegetais (BOZHKOV *et al.*, 2002; ELBAZ *et al.*, 2002; BOSCH e FRANKLIN-TONG, 2007). Acredita-se que as VPEs são responsáveis pela atividade do tipo caspase relacionada à MCP desencadeada durante o processo de defesa contra patógenos em *Arabidopsis* e *Nicotiana* (ROJO *et al.*, 2004; HATSUGAI *et al.*, 2004; KUROYANAGI *et al.*, 2005).

A cistatina CaneCPI-3 foi o inibidor mais potente contra a CaneLEG. As cistatinas são inibidores naturais de cisteíno-peptidases, descritas inicialmente como inibidores de cisteíno-peptidases do tipo papaína (TURK e BODE, 1991). Em plantas, Martinez *et al.* (2007) estudaram uma cistatina de cevada, com massa molecular de 23 kDa. Os autores observaram a presença de uma região C-terminal, contendo o motivo SNSL, com capacidade inibitória contra legumaína humana e de legumaínas presentes em extrato protéico de cevada. A região C-terminal da cistatina de 23 kDa de cevada é similar à cistatina E/M humana, uma cistatina que inibe legumaína em um sítio reativo distinto do sítio de inibição de enzimas do tipo papaína (CHENG *et al.*, 2006). A CaneCPI-3 é muito similar à cistatina C-terminal estendida de cevada e sua atividade inibitória contra enzimas do tipo papaína já foi descrita anteriormente (GIANOTTI *et al.*, 2006).

Neste trabalho, foi observado que a CaneCPI-3 também é um inibidor de VPE. O resíduo de asparagina do motivo SNSL da CaneCPI-3 é o principal responsável por sua capacidade inibitória, devido à perda de sua atividade quando o

resíduo de asparagina foi substituído nos mutantes da CaneCPI-3. Existem relatos da regulação de peptidases endógenas por inibidores de peptidases e o distúrbio deste controle pode afetar vários aspectos do desenvolvimento da planta (RIVARD *et al.*, 2007; SIN *et al.*, 2006; SOLOMON *et al.*, 1999). Assim, nossos resultados apontam a CaneCPI-3 como um potencial inibidor endógeno da CaneLEG, atuando provavelmente na regulação da atividade desta enzima na planta em adição à sua atividade como inibidor de enzimas do tipo papaína descrita previamente (GIANOTTI *et al.*, 2006).

5.3. Localização das VPEs de cana e cevada e interação VPE-cistatina em células vegetais

Neste trabalho, as ORFs da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* foram fusionadas à GFP e as construções resultantes foram utilizadas para transformação de células da epiderme de cebola. Durante as análises, não foi observada fluorescência nas células transformadas com as ORFs fusionadas à GFP. Na tentativa de explicar o não aparecimento de fluorescência nas células transformadas com a CaneLEG-GFP, a região correspondente ao pró-peptídeo C-terminal da CaneLEG foi excluída e a GFP foi fusionada diretamente à região C-terminal da proteína madura. Neste trabalho, foi observado que a CaneLEG recombinante produzida em *P. pastoris* é ativa e se auto-processa nos períodos iniciais de expressão, liberando o pró-peptídeo C-terminal. Este auto-processamento poderia estar ocorrendo em células vegetais o que levaria à liberação da GFP, fusionada à região C-terminal da legumaína, justificando o não aparecimento de células fluorescentes.

A GFP foi fusionada à ORF da *CaneLEG* contendo uma mutação no sítio ativo da enzima. Após a retirada do pró-peptídeo C-terminal ou mutação da *CaneLEG* foi observado o aparecimento de células fluorescentes. Desta forma, pode-se sugerir que o não aparecimento de fluorescência nas células transformadas com a sequência completa da *CaneLEG* pode estar relacionada à liberação do pró-peptídeo e, conseqüentemente, da GFP. Além disso, é possível que a região liberada tenha sido degradada pela enzima *CaneLEG* ativa.

As proteínas que contêm um peptídeo sinal são transportadas do RE para o complexo de Golgi até serem destinadas, por exemplo, à superfície celular ou vacúolos (VITALE e DENECKE, 1999). Embora, com base nos dados descritos para outras VPEs e nas análises realizadas por Jackson *et al.* (2007), fosse esperada a localização da *CaneLEG* em vacúolos, tanto a proteína sem o pró-peptídeo quanto a proteína inativa foram localizadas no retículo endoplasmático (RE). A não localização da *CaneLEGwcp-GFP* nos vacúolos de células de cebola pode estar relacionada à instabilidade da GFP neste compartimento. Foi observado que o não aparecimento de fluorescência vacuolar, em plantas transgênicas de *Arabidopsis* expressando a GFP fusionada a um sinal de direcionamento para vacúolos, está relacionado à alta sensibilidade da GFP à atividade proteolítica deste compartimento e à sua baixa estabilidade à luminosidade nessas condições. Os autores observaram fluorescência da GFP fusionada ao sinal vacuolar no RE e em estruturas granulares, sendo observada fluorescência no vacúolo quando foram alteradas condições pH, atividade de cisteíno-peptidases e luminosidade (TAMURA *et al.*, 2003).

Corroborando com os resultados obtidos para a CaneLEG, foi observada a localização de uma legumaína de cevada (HvLEG-2) no RE. Ao contrário da CaneLEG, não foi necessária a retirada do pró-peptídeo C-terminal ou mutação do sítio ativo para o aparecimento de fluorescência nas células transformadas com a construção HvLEG-2-GFP. Isso sugere que a CaneLEG e a HvLEG-2 devem atuar de modo distinto na liberação do pró-peptídeo C-terminal.

A análise por BiFC permite a visualização direta da interação de proteínas *in vivo* por meio da fusão de fragmentos da GFP, ou de outra proteína fluorescente, na extremidade amino ou carboxi terminal das proteínas a serem estudadas (HU *et al.*, 2002). Esta técnica foi utilizada com sucesso na análise e localização sub-celular da interação de fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento de semente e também em interações peptidases-cistatinas de cevada expressas em células de cebola (DIAZ *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2009). No entanto, a interação da CaneLEGwcp com a CaneCPI-3 não foi observada quando as células de cebola foram co-transformadas com ambas ORFs fusionadas aos fragmentos da GFP. O resultado negativo observado pode estar relacionado ao fato dessas proteínas simplesmente não interagirem *in vivo* ou à sua localização em compartimentos distintos. No entanto, como não foi possível avaliar a localização da CaneCPI-3 fusionada à GFP nas células de cebola, não se pode concluir que exista ou não uma interação entre a CaneLEG e a CaneCPI-3. Dessa forma, seria necessária uma análise mais minuciosa para verificar se a CaneCPI-3 seria secretada ou ainda utilizar outro vetor para expressão em células vegetais.

A interação de uma legumaína de planta com uma cistatina C-terminal estendida foi confirmada pela interação *in vivo* entre a HvLEG-2 e a HvCPI-4. A

cistatina de cevada HVCPI-4 foi estudada por Martinez *et al.* (2007) e mostrou-se capaz de inibir a atividade de legumina presente em extratos protéicos de cevada. Estes resultados indicam que a cistatina C-terminal estendida da planta pode atuar na regulação da atividade de legumina endógena.

5.4. Padrão de expressão gênica da *CaneLEG* e do inibidor *CaneCPI-3* durante o desenvolvimento da cana-de-açúcar

A expressão dos genes *CaneLEG* e *CaneCPI-3* foi avaliada durante o desenvolvimento da cana-de-açúcar utilizando a técnica de qPCR. Ambos os genes apresentaram níveis de expressão detectáveis em todos os tecidos analisados e alterações significativas foram observadas durante o desenvolvimento da planta. A expressão da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* foi avaliada em quatro estágios do desenvolvimento. O primeiro estágio analisado foi a fase de germinação-estabelecimento, que ocorre de 20 a 40 DAP. Neste estágio, os genes foram mais expressos em folhas do que em cartucho foliar, com o gene da *CaneLEG* apresentando uma maior expressão em folhas quando comparado com a expressão do gene da *CaneCPI-3*. Durante a fase de perfilhamento, que começa por volta de 40 DAP, a planta é provida com colmos adicionais, originados das gemas laterais presentes no colmo primário. Observou-se uma maior expressão da *CaneLEG* em folha e broto (gema lateral em brotamento). Os transcritos da *CaneCPI-3* foram mais abundantes do que a *CaneLEG* em bainha da raiz, entrenó e meristema apical. O padrão de expressão observado sugere funções tecido-específicas para a *CaneLEG* e *CaneCPI-3*.

Interessantemente, o alto nível de transcritos da *CaneLEG* no broto sugere que esta VPE deve desempenhar uma função importante no desenvolvimento do novo colmo. Tem sido descrito que as VPEs atuam na mobilização de proteínas durante a germinação e crescimento das plantas jovens, seja participando da digestão direta das proteínas de reserva ou no processamento de outras peptidases (SENYUK *et al.*, 1998; OKAMOTO e MINAMIKAWA *et al.*, 1999; SCHLERETH *et al.*, 2000). Este resultado é consistente com o fato do brotamento da gema lateral da cana-de-açúcar ser um estágio ativo no qual ocorre a mobilização de nutrientes, presentes no tolete, para o colmo em desenvolvimento (VAN DILLEWIJN, 1952). Além disso, este processo deve compartilhar semelhanças com a germinação de sementes, pois durante a germinação das sementes as proteínas de reserva, previamente depositadas nos vacúolos de armazenamento, são mobilizadas e utilizadas para o crescimento da planta (BEWLEY e BLACK, 1994). O alto nível de transcritos do gene da *CaneCPI-3* no meristema apical está de acordo com os resultados obtidos por Gianotti *et al.* (2006). Estes autores observaram maiores quantidades da *CaneCPI-3* em meristema apical quando comparado com a expressão da proteína em folhas e raiz de uma planta adulta.

Nos últimos estágios do desenvolvimento, a *CaneLEG* apresentou-se mais expressa em bainha da raiz e entrenó, no estágio de crescimento dos colmos, e em entrenó na fase de maturação dos colmos. O aumento mais forte no nível de transcritos da *CaneLEG*, nesses dois estágios, foi observado em entrenó. Observou-se uma tendência geral para a manutenção ou redução da expressão da *CaneLEG* em quase todos os tecidos do estágio de perfilhamento para a fase de crescimento e início da maturação, enquanto a expressão deste gene gradualmente aumentou no

entrenó. A super-expressão da *CaneLEG* no entrenó durante o desenvolvimento da planta indica seu potencial envolvimento na maturação deste tecido. Isto é consistente com análises prévias que relatam que a EST de uma VPE foi super-expressa em entrenó maduro de plantas com 12 meses, em três variedades de cana-de-açúcar (CASU *et al.*, 2004). Além disso, Rae *et al.* (2009) observaram um rápido aumento na expressão de uma VPE de cana-de-açúcar do entrenó mais imaturo para o mais maduro. Neste trabalho, foi observado que a expressão do gene da *CaneLEG* no entrenó apresentou um aumento gradual durante o desenvolvimento da planta

Os resultados obtidos sugerem que a *CaneLEG* deve atuar no processamento ou degradação de proteínas relacionadas à maturação do entrenó durante o crescimento da cana-de-açúcar. Em *Arabidopsis* foi relatado o envolvimento da γ VPE na degradação de uma invertase vacuolar em tecidos senescentes. Nas plantas mutantes γvpe , foram identificadas várias proteínas incluindo β -glicosidase, α -manosidases e uma α -galactosidase. Essas proteínas foram detectadas apenas nas folhas maduras das plantas mutantes, sugerindo seu processamento ou degradação pela γ VPE (ROJO *et al.*, 2003). Em cana-de-açúcar, uma invertase ácida solúvel é direcionada para o vacúolo e a sequência N-terminal da proteína madura é imediatamente precedida por um resíduo de asparagina, provavelmente processado pela VPE (RAE *et al.*, 2011). Além disso, um estudo com tomateiros suprimidos para o gene da VPE mostrou que a diminuição da atividade da enzima VPE interferiu no acúmulo de açúcar nos tomates maduros (ARIIZUMI *et al.*, 2011).

De outro modo, o gene da *CaneCPI-3* apresentou um padrão de expressão distinto do observado para *CaneLEG*, nos últimos estágios de desenvolvimento da

cana-de-açúcar. O gene da *CaneCPI-3* apresentou uma ligeira diminuição da expressão em bainha da raiz, entrenó e gema lateral durante a fase de crescimento dos colmos. No entanto, no início da maturação dos colmos observou-se um aumento na expressão do gene da *CaneCPI-3* em quase todos os tecidos analisados. Um estudo de uma cistatina C-terminal estendida de *A. thaliana* indicou que esta cistatina desempenha uma função crítica não apenas na germinação da semente, mas também no crescimento da planta jovem. Os autores sugerem que este inibidor deve regular a atividade de cisteíno-peptidases endógenas das famílias papaína e legumaína (HWANG *et al.*, 2009).

5.5. Padrão de expressão gênica da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* em resposta ao tratamento com fitohormônios

Estudos anteriores relatam que além da função da VPE em sementes sua expressão também muda em resposta a ferimento, senescência, defesa contra patógenos e em resposta ao tratamento com fitohormônios como AS, etileno e ABA (HATSUGAI *et al.*, 2004; YAMADA *et al.*, 2004; DONNISON *et al.*, 2007, KINOSHITA *et al.*, 1999). Além disso, tem sido descrito o possível envolvimento de cistatinas na resposta a estresses biótico e abiótico e a presença de elementos cis-atuantes responsivos à fitohormônios na região promotora do gene de uma cistatina de *Arabidopsis* (PERNAS *et al.*, 1998; PERNAS *et al.*, 2000; HWANG *et al.*, 2009; HWANG *et al.*, 2010). Para avaliar o possível envolvimento dos genes da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* no desenvolvimento e resposta a estresse mediada por fitohormônios, foi investigada a expressão destes genes em plântulas tratadas com fitohormônios, 3 e 24 horas após tratamento (HAT).

A análise de plântulas tratadas com GA3 revelou que a expressão dos genes *CaneLEG* e *CaneCPI-3* não foi afetada por este hormônio, sugerindo que a expressão desses genes não é regulada por GA3. Anteriormente, foi descrito que os níveis de proteína da VPE de arroz REP-2 β diminuíram rapidamente após tratamento com GA3, enquanto a REP-2 α não foi afetada por este hormônio (KATO *et al.*, 2003). Esses resultados mostram que diferentes VPEs são reguladas de modo distinto por GA3. De outro modo, os níveis de cistatinas de *Arabidopsis* e cevada diminuíram após tratamento com giberelina (HONG *et al.*, 2007; MARTINEZ *et al.*, 2003). Contudo, a ausência de alteração na expressão do gene da *CaneCPI-3* por GA3 deve ser resultado da análise de diferentes partes da planta. Neste trabalho analisamos a expressão em folhas, enquanto para *Arabidopsis* e cevada a expressão foi avaliada em sementes. Além disso, as plantas possuem várias cistatinas e cada uma deve ter uma função em diferentes processos na planta e ser regulada por sinais distintos.

Nas plântulas tratadas com AS, os transcritos da *CaneLEG* diminuíram 3 HAT e recuperaram os níveis controle a 24 HAT, enquanto a expressão do gene da *CaneCPI-3* não foi afetado pelo tratamento com este hormônio. O AS está associado à resposta hipersensível contra patógenos através da ativação de genes relacionados à patogênese (PR) (KLESSIG e MALAMY, 1994). Yamada e colaboradores (2004) observaram que a expressão da γ VPE induzida por ferimento depende da ação do AS. Além disso, um estudo anterior demonstrou a super-expressão de VPEs vegetativas em folhas tratadas com AS, sugerindo sua atuação na defesa contra patógenos (KINOSHITA *et al.*, 1999). Porém, se a *CaneLEG* ou

CaneCPI-3 estão envolvidas na resposta de defesa da cana-de-açúcar expressão destes genes não parece ser induzida pela via do AS.

O AJ é um fitohormônio envolvido na resposta contra ferimentos, infecção por patógenos e ataque de herbívoros (VIJAYAN *et al.*, 1998; WASTERACK, 2007). O efeito do tratamento de plântulas de cana-de-açúcar com AJ na expressão dos genes *CaneLEG* e *CaneCPI-3* foi avaliada neste trabalho. Os níveis de transcritos dos genes *CaneLEG* e *CaneCPI-3* foram inicialmente reduzidos e, mais tarde, voltaram ao nível normal durante o tratamento com AJ, sugerindo que a expressão desses genes não deve ser requerida na resposta contra ferimento ou deve ser regulada por outra via. De modo similar, a aplicação exógena de AJ em *Arabidopsis* não teve efeito na expressão da α VPE e γ VPE (KINOSHITA *et al.*, 1999; YAMADA *et al.*, 2004). O tratamento de plantas de soja com metiljasmonato ocasionou a indução das cistatinas N2 e R1 em folhas, enquanto a cistatina L1 não foi induzida por este hormônio (ZHAO *et al.*, 1996). Em plântulas de castanha-portuguesa (*Castanea sativa*) tratadas com AJ foi observado um aumento no nível de expressão de cistatina em folhas e raiz e nenhum efeito na expressão da cistatina em caule (PERNAS *et al.*, 2000). Nestes dois estudos nenhuma das cistatinas apresentava região C-terminal estendida. Em espigas de trigo tratadas com AJ foi observado o aumento nos transcritos de três cistatinas, incluindo uma cistatina contendo o motivo SNSL, envolvido na inibição de legumainas (DUTT *et al.*, 2011). Contudo, os resultados obtidos indicam que a expressão da *CaneCPI-3* pode não ser induzida em resposta a AJ ou a resposta a este hormônio deve ser tecido-específica.

Um resultado interessante foi a resposta dos genes da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* ao ABA. Em plântulas tratadas com ABA, foi observada uma redução inicial no

nível de transcritos da *CaneLEG 3 HAT*, seguida de um forte aumento na expressão 24 HAT. O gene da *CaneCPI-3* apresentou um aumento gradual na expressão durante o tratamento com ABA. O ABA é um hormônio relacionado, principalmente, à resposta contra estresse abiótico. Algumas fitocistatinas são super-expressas quando as plantas são expostas a estresse biótico, abiótico e ABA. Tem sido sugerido que estes inibidores desempenham funções no estresse da planta através da inibição de cisteíno-peptidases exógenas ou na regulação de enzimas endógenas (URWIN *et al.*, 2003; DIOP *et al.*, 2004). Além disso, a atuação de fitocistatinas na resposta a estresse regulada por hormônio é reforçada pela presença de elementos responsivos a ABA na região promotora de vários genes de fitocistatinas, incluindo uma cistatina C-terminal estendida (ZHANG *et al.*, 2008; HWANG *et al.*, 2009).

Os relatos do papel das VPEs em resposta ao estresse em plantas apontam o envolvimento desta classe de enzimas na defesa contra patógenos e ferimento, atuação provavelmente relacionada à sua atividade tipo caspase (ROJO *et al.*, 2004; HATSUGAI *et al.*, 2004). Além disso, foi relatada a interação entre as vias de resposta e metabolismo de açúcar e fitohormônios (GIBSON, 2004). Os resultados do aumento gradual da expressão da *CaneLEG* durante o desenvolvimento do entrenó e a resposta ao tratamento com ABA também sugerem a atuação da *CaneLEG* na resposta a açúcar. Em cana-de-açúcar, após a observação de que alguns genes associados com o conteúdo de sacarose também estão relacionados à resposta a estresse abiótico e ABA, foi sugerido que algumas vias associadas com o desenvolvimento do entrenó devem interagir com vias de sinalização de estresse (CASU *et al.*, 2004; PAPINI-TERZI *et al.*, 2009). Além disso, a provável atuação da *CaneLEG* no conteúdo de açúcar é reforçado pelos relatos de que a supressão de

genes de VPEs, que levam a diminuição da atividade enzimática de VPE, interferem no acúmulo de açúcar em tomate (ARIIZUMI *et al.*, 2011). Somado a isto, há o relato de que a VPE de *Arabidopsis* está envolvida na degradação de invertase (ROJO *et al.*, 2003) e recentemente foi descrito que uma invertase de cana-de-açúcar possui um resíduo de asparagina no sítio de processamento da proteína madura (RAE *et al.*, 2011). A resposta dos genes *CaneLEG* e *CaneCPI-3* ao ABA sugere que estes genes devem estar envolvidos na resposta a estresse regulada por este hormônio, com a *CaneCPI-3* provavelmente atuando na inibição de cisteíno-peptidases endógenas.

Este trabalho relata pela primeira vez a caracterização de uma legumaina de cana-de-açúcar e sua inibição por uma cistatina endógena. Além disso, os resultados da análise de expressão gênica indicam uma provável atuação da *CaneLEG* no conteúdo de açúcar do entrenó e em resposta a estresse mediada por ABA. Finalmente, os resultados obtidos aqui servirão como base para estudos visando o esclarecimento da função da legumaina na cana-de-açúcar e sua regulação por fitocistatina endógena.

6. CONCLUSÕES

- O sistema de expressão *P. pastoris* mostrou-se mais adequado que *E. coli* para obtenção da CaneLEG recombinante purificada e na forma ativa.
- A remoção do pró-peptídeo C-terminal da CaneLEG ocorreu de modo auto-catalítico em condições com pH ácido, sendo o resíduo de cisteína 212 da CaneLEG essencial para o processamento observado.
- A atividade enzimática da CaneLEG foi inibida pela CaneCPI-3 *in vitro* e a análise da atividade inibitória das regiões N-terminal e C-terminal da cistatina indicaram a região C-terminal estendida como a principal responsável pela inibição da legumaina.
- A substituição do resíduo de asparagina do motivo SNSL presente na região C-terminal estendida da CaneCPI-3 levou à perda de atividade inibitória contra a CaneLEG, sugerindo que este resíduo de aminoácido deve estar envolvido diretamente na inibição da legumaina.
- Os ensaios de localização da CaneLEG em células vegetais demonstraram a presença da enzima no retículo endoplasmático e a ausência do pró-peptídeo ou inativação da proteína, pela substituição do resíduo de cisteína do sítio ativo, foi necessário para o aparecimento de fluorescência nas células vegetais.
- A legumaina de cevada apresentou perfil de localização semelhante ao observado para a CaneLEG. No entanto, a retirada do pró-peptídeo C-terminal não foi necessária para visualização de fluorescência nas células vegetais.

- A interação entre a legumina e cistatina de cevada foi avaliada por meio de BiFC e o resultado obtido indica que a cistatina C-terminal estendida deve atuar na regulação da atividade de legumina na planta.
- Os genes *CaneLEG* e *CaneCPI-3* apresentaram variação de expressão ao longo do desenvolvimento da cana-de-açúcar.
- O aumento gradual de transcritos da *CaneLEG* no entrenó durante o desenvolvimento da planta sugere que esta legumina deve estar envolvida na maturação deste tecido.
- A super-expressão dos genes da *CaneLEG* e *CaneCPI-3* em plântulas tratadas com ABA sugere o envolvimento desses genes na resposta a estresse e reforça o possível envolvimento da *CaneLEG* na maturação do entrenó.
- Os resultados obtidos poderão auxiliar no entendimento das funções realizadas pela *CaneLEG* e *CaneCPI-3* na cana-de-açúcar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H.; SUZUKI, K.; ARAI, S. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. **J Biol Chem**, v. 262, p. 16793-16797, 1987.
- ABE, Y.; SHIRANE, K.; YOKOSAWA, H.; MATSUSHITA, H.; MITTA, M.; KATO, I.; ISHII, S. Asparaginyl endopeptidase of jack bean seeds. Purification, characterization, and high utility in protein sequence analysis. **J Biol Chem**, v. 268, p. 3525-3529, 1993.
- AKADA, R.; MURAKANE, T.; NISHIZAWA, Y. DNA extraction method for screening yeast clones by PCR. **Biotechniques**, v. 28, n. 4, p. 670-673, 2000.
- ALIM, M.A.; TSUJI, N.; MIYOSHI, T.; ISLAM, M.K.; HUANG, X.; MOTOBU, M.; FUJISAKI, K. Characterization of asparaginyl endopeptidase, legumain induced by blood feeding in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 3, p. 911-922, 2007.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ALVAREZ-FERNANDEZ, M.; BARRETT, A.J.; GERHARTZ, B.; DANDO, P.; NI, J.; ABRAHAMSON, M. Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due a novel second reactive site. **J Biol Chem**, v. 274, n. 27, p. 19195-19203, 1999.
- AN, C.; MOU, Z. Salicylic acid and its function in plant immunity. **J Integr Plant Biol**, v. 53, n. 6, p. 412-428, 2011.
- ANNADANA, S.; SCHIPPER, B.; BEEKWILDER, J.; OUTCHKOUROV, N.; UDAYAKUMAR, M.; JONGSMA, M.A. Cloning, functional expression in *Pichia pastoris*, and purification of potato cystatin and multicystatin. **J Biosci Bioeng**, v. 95, n. 2, p. 118-123, 2003.
- AOKI, H.; NAZMUL AHSAN, M.; WATABE, S. Heterologous expression in *Pichia pastoris* and single-step purification of a cysteine proteinase from northern shrimp. **Protein Expr Purif**, v. 31, n. 2, p. 213-221, 2003.
- ARIIZUMI, T.; HIGUCHI, K.; ARAKAKI, S.; SANO, T.; ASAMIZU, E.; EZURA, H. Genetic suppression analysis in novel vacuolar processing enzymes reveals their roles in controlling sugar accumulation in tomato fruits. **J Exp Bot**, v. 62, n. 8, p. 2773-2786, 2011.

- AVANCI, N.C.; LUCHE, D.D.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. **Genet Mol Res**, v. 9, n. 1, p. 484-505, 2010.
- BARI, R.; JONES, J.D. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Mol Biol**, v. 69, n.4, p. 473-488, 2009.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; DAVIES, M. E.; MACHLEIDT, W.; SALVESEN, G.; TURK, V. Cysteine proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. In: Proteinase Inhibitors. Amsterdam: Barrett, A. J.; Salvesen, G. eds., Elsevier Science Publisher, 1986. p. 515-569.
- BARRETT, A.J. Classification of peptidases. **Methods Enzymol**, v. 244, p. 1-15, 1994.
- BARRETT, A.J. Proteases. **Curr Protoc Protein Sci**, sup. 21, p. 21.1.1-21.1.12, 2000.
- BEDNAREK, S.Y.; RAIKHEL, N.V. The barley lectin carboxyl-terminal propeptide is a vacuolar protein sorting determinant in plants. **Plant Cell**, v. 3, n. 11, p. 1195-1206, 1991.
- BENCHABANE, M.; SCHLÜTER, U.; VORSTER, J.; GOULET, M.C.; MICHAUD, D. Plant cystatins. **Biochimie**, v. 92, n. 11, p. 1657-1666, 2010.
- BENDTSEN, J.D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **J Mol Biol**, v. 340, p. 783-795, 2004.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Seeds: Physiology of Development and Germination, Second edition. Plenum Press, New York, 1994.
- BEYNON, R.J.; BOND, J.S. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford University Press, 1990.
- BOSCH, M.; FRANKLIN-TONG, V.E. Temporal and spatial activation of caspase-like enzymes induced by self-incompatibility in Papaver pollen. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 46, p. 18327-18332, 2007.
- BOSCH, M.; POULTER, N.S.; PERRY, R.M.; WILKINS, K.A.; FRANKLIN-TONG, V.E. Characterization of a legumain/vacuolar processing enzyme and YVADase activity in *Papaver* pollen. **Plant Mol Biol**, v. 74, n. 4-5, p. 381-393, 2010.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CAFFREY, C.R.; MATHIEU, M.A.; GAFFNEY, A.M.; SALTER, J.P.; SAJID, M.; LUCAS, K.D.; FRANKLIN, C.; BOGYO, M.; MCKEROW, J.H. Identification of a cDNA encoding an active asparaginyl endopeptidase of *Schistosoma mansoni* and its expression in *Pichia pastoris*. **FEBS Lett**, v. 466, p. 244-248, 2000.

- CARRILLO, L.; MARTINEZ, M.; ALVAREZ-ALFAGEME, F.; CASTAÑERA, P.; SMAGGHE, G.; DIAZ, I.; ORTEGO, F. A barley cysteine-proteinase inhibitor reduces the performance of two aphid species in artificial diets and transgenic Arabidopsis plants. **Transgenic Res**, v. 20, n. 2, 305-319, 2011.
- CARSON, D.L.; HUCKETT, B.I.; BOTHA, F.C. Sugarcane ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal tissue. **Plant Sci**, v. 162, p. 289-300, 2002.
- CASU, R.E.; DIMMOCK, C.M.; CHAPMAN, S.C.; GROF, C.P.; MCINTYRE, C.L.; BONNETT, G.D.; MANNERS, J.M. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. **Plant Mol Biol**, v. 54, n. 4, p. 503-517, 2004.
- CASU, R.E.; JARMEY, J.M.; BONNETT, G.D.; MANNERS, J.M. Identification of transcripts associated with cell wall metabolism and development in the stem of sugarcane by Affymetrix GeneChip Sugarcane Genome Array expression profiling. **Funct Integr Genomics**, v. 7, p. 153–167, 2007.
- CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.
- CHEN, H.J.; HOU, W.C.; LIU, J.S.; YANG, C.Y.; HUANG, D.J.; LIN, Y.H. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding asparaginyl endopeptidase from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) senescent leaves. **J Exp Bot**, v. 55, n. 398, p. 825-835, 2004.
- CHEN, J.M.; DANDO, P.M.; RAWLINGS, N.D.; BROWN, M.A.; YOUNG, N.E.; STEVENS, R.A.; HEWITT, E.; WATTS, C.; BARRETT, A.J. Cloning, Isolation, and Characterization of Mammalian Legumain, an Asparaginyl Endopeptidase. **J Biol Chem**, v. 272, n. 12, p. 8090–8098, 1997.
- CHEN, J.M.; DANDO, P.M.; STEVENS, R.A.; FORTUNATO, M.; BARRETT, A.J. Cloning and expression of mouse legumain, a lysosomal endopeptidase. **Biochem J**, v. 335, n. Pt 1, p. 111-117, 1998b.
- CHEN, J.M.; RAWLINGS, N.D.; STEVENS, R.A.E.; BARRETT, A.J. Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases. **FEBS Lett**, v. 441, p. 361-365, 1998a.
- CHENG, T.; HITOMI, K.; VAN VLIJMEN-WILLEMS, I.M.; DE JONGH, G.J.; YAMAMOTO, K.; NISHI, K.; WATTS, C.; REINHECKEL, T.; SCHALKWIJK, J.; ZEEUWEN, P.L. Cystatin M/E is a high affinity inhibitor of cathepsin V and cathepsin L by a reactive site that is distinct from the legumain-binding site. A novel clue for the role of cystatin M/E in epidermal cornification. **J Biol Chem**, v. 281, n. 23, p. 15893-15899, 2006.

- CHU, M.H.; LIU, K.L.; WU, H.Y.; YEH, K.W.; CHENG, Y.S. Crystal structure of tarocystatin-papain complex: implications for the inhibition property of group-2 phytocystatins. **Planta**, v. 234, n. 2, p. 243-54, 2011.
- CLELAND, R.E. Introduction: Nature, occurrence and functioning of plant hormones. In: Hooykaas PJJ, Hall MA, Libbenga KR (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Elsevier, Amsterdam, 1999.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2009 - Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, 2009.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2011 - Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, 2011.
- COPELAND, R. A. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.
- CORREA, G.C.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Identification, classification and expression pattern analysis of sugarcane cysteine proteinases. **Genet Mol Biol**, v. 24, n. 1-4, p. 275-283, 2001.
- CORRE-MENGUY, F.; CEJUDO, F.J.; MAZUBERT, C.; VIDAL, J.; LELANDAIS-BRIÈRE, C.; TORRES, G.; RODE, A.; HARTMANN, C. Characterization of the expression of a wheat cystatin gene during caryopsis development. **Plant Mol Biol**, v. 50, n. 4-5, p. 687-698, 2002.
- CREGG, J.M. *Methods in Molecular Biology: Pichia Protocols*, Second Edition, Volume 389. Humana Press, Totowa, NJ, 2007.
- DANILES, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J. (Ed). *Sugarcane improvement through breeding*. Amsterdam: Elsevier. p. 7-84, 1987.
- DANON, A.; ROTARI, V.I.; GORDON, A.; MAILHAC, N.; GALLOIS, P. Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in Arabidopsis, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and Defender against apoptotic death. **J Biol Chem** v. 279, n. 1, p. 779-787, 2004.
- DAVIES, P. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Ed 3. Kluwer Academic Publishers, London, 2004.
- DAVIS, S.J.; VIESTRA, R.D. Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. **Plant Mol Biol**, v. 36, p. 521–528, 1998.

- DE JONG, A.J.; HOEBERICHTS, F.A.; YAKIMOVA, E.T.; MAXIMOVA, E.; WOLTERING, E.J. Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. **Planta**, v. 211, n. 5, p. 656-662, 2000.
- DIAZ, I.; MARTINEZ, M.; ISABEL-LAMONEDA, I.; RUBIO-SOMOZA, I.; CARBONERO, P. The DOF protein, SAD, interacts with GAMYB in plant nuclei and activates transcription of endosperm-specific genes during barley seed development. **Plant J**, v. 42, p. 652-662, 2005.
- DICKINSON, C.D.; HUSSEIN, E.H.; NIELSEN, N.C. Role of posttranslational cleavage in glycinin assembly. **Plant Cell**, v. 1, n. 4, p. 459-469, 1989.
- DIEESE (Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Socioeconômicos). Desempenho do setor sucroalcooleiro brasileiro e os trabalhadores, 2007. Disponível em: http://www.dieese.org.br/esp/estpesq30_setorSucroalcooleiro.pdf. Acesso em: 06 mar. 2012.
- DIOLA, V.; SANTOS, F. Fisiologia. In: Santos F, Borém A, Caldas C (eds) Cana-de-açúcar: Bioenergia, açúcar e álcool. Tecnologia e perspectivas, UFV, Viçosa MG, p 25-49, 2010.
- DIOP, N.N.; KIDRIC, M.; REPELLIN, A.; GAREIL, M.; D'ARCY-LAMETA, A.; PHAM THI, A.T.; ZUILY-FODIL, Y. A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. **FEBS Lett**, v. 577, n. 3, p. 545-550, 2004.
- DOARES, S.H.; NARVAEZ-VASQUEZ, J.; CONCONI, A.; RYAN, C.A. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. **Plant Physiol**, v. 108, n. 4, p. 1741-1746, 1995.
- DONNISON, I.S.; GAY, A.P.; THOMAS, H.; EDWARDS, K.J.; EDWARDS, D.; JAMES, C.L.; THOMAS, A.M.; OUGHAM, H.J. Modification of nitrogen remobilization, grain fill and leaf senescence in maize (*Zea mays*) by transposon insertional mutagenesis in a protease gene. **New Phytol**, v. 173, p. 481-494, 2007.
- DURNER, J.; SHAH, J.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Trends Plant Sci**, v. 2, n. 7, p. 266-274, 1997.
- DUTT, S.; PANDEY, D.; KUMAR, A. Jasmonate signal induced expression of cystatin genes for providing resistance against Karnal bunt in wheat. **Plant Signal Behav**, v. 6, p. 821-830, 2011.
- FUJINAGA, M.; CHERNEY, M.M.; OYAMA, H.; ODA, K.; JAMES, M.N.G. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, n. 10, p. 3364-3369, 2004.
- GANEVA, V.; GALUTZOV, B.; TEISSIÉ, J. Electric field mediated loading of macromolecules in intact yeast cells is critically controlled at the wall level. **Biochim Biophys Acta**, v. 1240, n. 2, p. 229-236, 1995.

- GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed) The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, 2005.
- GIANOTTI, A.; RIOS, W.M.; SOARES-COSTA, A.; NOGAROTO, V.; CARMONA, A.K.; OLIVA, M.L.; ANDRADE, S.S.; HENRIQUE-SILVA, F. Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein Expr Purif**, v. 47, p. 483-489, 2006.
- GIANOTTI, A.; SOMMER, C.A.; CARMONA, A.K.; HENRIQUE-SILVA, F. Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L. **Biol Chem**, v. 389, n. 4, p. 447-453, 2008.
- GIBSON, S.I. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. **J Exp Bot**, v. 55, n. 395, p. 253-264, 2004.
- GRUIS, D.; SCHULZE, J.; JUNG, R. Storage protein accumulation in the absence of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases. **Plant Cell**, v. 16, n. 1, p. 270-290, 2004.
- GRUIS, D.F.; SELINGER, D.A.; CURRAN, J.M.; JUNG, R. Redundant proteolytic mechanisms process seed storage proteins in the absence of seed-type members of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases. **Plant Cell**, v. 14, n. 11, p. 2863-2882, 2002.
- GUNAWARDENA, A.H. Programmed cell death and tissue remodelling in plants. **J Exp Bot**, v. 59, n. 3, p. 445-451, 2008.
- GUPTA, R.; JUNG, E.; BRUNAK, S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. In preparation, 2004.
- GUPTA, V.; RAGHUVANSHI, S.; GUPTA, A.; SAINI, N.; GAUR, A.; KHAN, M.S.; GUPTA, R.S.; SINGH, J.; DUTTAMAJUMDER, S.K.; SRIVASTAVA, S.; SUMAN, A.; KHURANA, J.P.; KAPUR, R.; TYAGI, A.K. The water-deficit stress- and red-rot-related genes in sugarcane. **Funct Integr Genomics**, v. 10, n. 2, p. 207-214, 2010.
- HABIB, H.; FAZILI, K.M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotech Mol Biol Rev**, v. 2, n. 3, p. 68-85, 2007.
- HAQ, S.K.; ATIF, S.M.; KHAN, R.H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Arch Biochem Biophys**, v. 431, p. 145-159, 2004.
- HARA-NISHIMURA, I.; HATSUGAI, N. The role of vacuole in plant cell death. **Cell Death Differ**, v. 18, p. 1298-1304, 2011.

- HARA-NISHIMURA, I.; INOUE, K.; NISHIMURA, M. A unique vacuolar processing enzyme responsible for conversion of several proprotein precursors into mature forms. **FEBS Lett**, v. 294, p. 89–94, 1991.
- HARA-NISHIMURA, I.; KINOSHITA, T.; HIRAIWA, N.; NISHIMURA, M. Vacuolar processing enzymes in the protein storage vacuoles and lytic vacuoles. **J Plant Physiol**, v. 152, p. 668-674, 1998.
- HATSUGAI, N.; KUROYANAGI, M.; YAMADA, K.; MESHII, T.; TSUDA, S.; KONDO, M.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. A Plant Vacuolar Protease, VPE, Mediates Virus-Induced Hypersensitive Cell Death. **Science**, v. 305, p. 855-858, 2004.
- HEIMO, H.; PALMU, K.; SUOMINEN, I. Expression in *Pichia pastoris* and purification of *Aspergillus awamori* glucoamylase catalytic domain. **Protein Expr Purif**, v. 10, n. 1, p. 70-79, 1997.
- HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. Protein Storage Bodies and Vacuoles. **Plant Cell**, v. 11, p. 601–613, 1999.
- HIGGINS, T.J.V. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. **Ann Rev Plant Physiol**, v. 35, p. 191-221, 1984.
- HIRAIWA, N.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. Expression and activation of the vacuolar processing enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. **Plant J**, v. 12, n. 4, p. 819-829, 1997.
- HIRAIWA, N.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. Vacuolar processing enzyme is self-catalytically activated by sequential removal of the C-terminal and N-terminal propeptides. **FEBS Lett**, v. 447, p. 213-216, 1999.
- HONG, J.K.; HWANG, J.E.; LIM, C.J.; YANG, K.A.; JIN, Z.L.; KIM, C.Y.; KOO, J.C.; CHUNG, W.S.; LEE, K.O.; LEE, S.Y.; CHO, M.J.; LIM, C.O. Over-expression of Chinese cabbage phytocystatin 1 retards seed germination in *Arabidopsis*. **Plant Sci**, v. 172, p. 556-563, 2007.
- HOOYKAAS, P.J.J.; HALL, M.A.; LIBBENGA, K.R. (eds) Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones. Elsevier, Amsterdam, 1999.
- HORTON, P.; PARK, K.J.; OBAYASHI, T.; FUJITA, N.; HARADA, H.; ADAMS-COLLIER, C.J.; NAKAI, K. WoLF PSORT: Protein Localization Predictor. **Nucleic Acids Res**, v. 35(Web Server issue), p. W585-7, 2007.
- HU, C.D.; CHINENOV, Y.; KERPPOLA, T.K. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. **Mol Cell**, v. 9, n. 4, p. 789-798, 2002.
- HWANG, J.E.; HONG, J.K.; JE, J.H.; LEE, K.O.; KIM, D.Y.; LEE, S.Y.; LIM, C.O. Regulation of seed germination and seedling growth by an *Arabidopsis* phytocystatin isoform, AtCYS6. **Plant Cell Rep**, v. 28, n. 11, p. 1623-1632, 2009.
- HWANG, J.E.; HONG, J.K.; LIM, C.J.; CHEN, H.; JE, J.; YANG, K.A.; KIM, D.Y.; CHOI, Y.J.; LEE, S.Y.; LIM, C.O. Distinct expression patterns of two *Arabidopsis* phytocystatin genes, AtCYS1 and AtCYS2, during development and abiotic stresses. **Plant Cell Rep**, v. 29, p. 905-915, 2010.

- IUBMB. Enzyme nomenclature recommendations. International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Academic Press, Orlando, FL, 1992.
- JACKSON, M.A.; RAE, A.L.; CASU, R.E.; GROF, C.P.L.; BONNETT, G.D.; MACLEAN, D.J. A bioinformatic approach to the identification of a conserved domain in a sugarcane legumain that directs GFP to the lytic vacuole. **Funct Plant Biol**, v. 34, n. 7, p. 633-644, 2007.
- JENÖ, P.; HORST, M. Electroelution of proteins from polyacrylamide gels. In: Walker JM (ed) The protein protocols handbook. Humana Press, Totowa New Jersey, pp 207-214, 1996.
- JUNG, R.; SCOTT, M.P.; NAM, Y.W.; BEAMAN, T.W.; BASSÜNER, R.; SAALBACH, I.; MÜNTZ, K.; NIELSEN, N.C. The role of proteolysis in the processing and assembly of 11S seed globulins. **Plant Cell**, v. 10, p. 343-357, 1998.
- KATO, H.; SUTOH, K.; MINAMIKAWA, T. Identification, cDNA cloning and possible roles of seed-specific rice asparaginyl endopeptidase, REP-2. **Planta**, v. 217, n. 4, p. 676-685, 2003.
- KEMBHAVI, A.A.; BUTTLE, D.J.; KNIGHT, C.G.; BARRETT, A.J. The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays. **Arch Biochem Biophys**, v. 303, n. 2, p. 208-213, 1993.
- KIEFHABER, T.; RUDOLPH, R.; KOHLER, H.H.; BUCHNER, J. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. **Biotechnology (NY)**, v. 9, n. 9, p. 825-829, 1991.
- KINOSHITA, T.; YAMADA, K.; HIRAIWA, N.; KONDO, M.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. **Plant J**, v. 19, n. 1, p. 43-53, 1999.
- KIYOSAKI, T.; MATSUMOTO, I.; ASAKURA, T.; FUNAKI, J.; KURODA, M.; MISAKA, T.; ARAI, S.; ABE, K. Gliadain, a gibberellin-inducible cysteine proteinase occurring in germinating seeds of wheat, *Triticum aestivum* L., specifically digests gliadin and is regulated by intrinsic cystatins. **FEBS J**, v. 274, n. 8, p. 1908-1917, 2007.
- KLESSIG, D.F.; MALAMY, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant Mol Biol**, v. 26, n. 5, p. 1439-1458, 1994.
- KONDO, H.; ABE, K.; EMORI, Y.; ARAI, S. Gene organization of oryzacystatin-II, a new cystatin superfamily member of plant origin, is closely related to that of oryzacystatin-I but different from those of animal cystatins. **FEBS Lett**, v. 278, n. 1, p. 87-90, 1991.
- KUMAMARU, T.; UEMURA, Y.; INOUE, Y.; TAKEMOTO, Y.; SIDDIQUI, S.U.; OGAWA, M.; HARA-NISHIMURA, I.; SATOH, H. Vacuolar processing enzyme plays an essential role in the crystalline structure of glutelin in rice seed. **Plant Cell Physiol**, v. 51, n. 1, p. 38-46, 2010.

- KUMAR, S. Caspase function in programmed cell death. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 1, p.32-43, 2007.
- KUROYANAGI, M.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. Activation of Arabidopsis vacuolar processing enzyme by self-catalytic removal of an auto-inhibitory domain of the C-terminal propeptide. **Plant Cell Physiol**, v. 43, n. 2, p. 143-151, 2002.
- KUROYANAGI, M.; YAMADA, K.; HATSUGAI, N.; KONDO, M.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. **J Biol Chem**, v. 280, n. 38, p. 32914-32920, 2005.
- LEATHERBARROW, R.J. GraFit Version 5. Erithacus Software Ltd., Horley, UK, 2001.
- LEE, T.S.G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 10, p. 47-55, 1987.
- LI, D.N.; MATTHEWS, S.P.; ANTONIOU, A.N.; MAZZEO, D.; WATTS, C. Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase *in vitro* and *in vivo*. **J Biol Chem**, v. 278, p. 38980-38990, 2003.
- LI, Z.; XIONG, F.; LIN, Q.; D'ANJOU, M.; DAUGULIS, A.J.; YANG, D.S.; HEW, C.L. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 21, p. 448-445, 2001.
- LINNESTAD, C.; DOAN, D.N.; BROWN, R.C.; LEMMON, B.E.; MEYER, D.J.; JUNG, R.; OLSEN, O.A. Nucellain, a barley homolog of the dicot vacuolar-processing protease, is localized in nucellar cell walls. **Plant Physiol**, v. 118, p. 1169-1180, 1998.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-2\Delta\Delta CT}$. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M.L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249-270, 2005.
- MAHAJAN, R.T.; BADGUJAR, S.B. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. **J Pharm Res**, v. 3, n. 9, p. 2048-2068, 2010.
- MANNERS, J.M.; CASU, R.E. Transcriptome Analysis and Functional Genomics of Sugarcane. **Tropical Plant Biol**, v. 4, p. 9-21, 2011.
- MARGIS, R.; REIS, E.M.; VILLERET, V. Structural and Phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. **Arch Biochem Biophys**, v. 359, n. 1, p. 24-30, 1998.
- MARTINEZ, M.; CAMBRA, I.; CARRILLO, L.; DIAZ-MENDOZA, M.; DIAZ, I. Characterization of the entire cystatin gene family in barley and their target cathepsin L-like cysteine-proteases, partners in the hordein mobilization during seed germination. **Plant Physiol**, v. 151, p. 1531-1545, 2009.

- MARTINEZ, M.; DIAZ-MENDOZA, M.; CARRILLO, L.; DIAZ, I. Carboxy terminal extended phycocystatins are bifunctional inhibitors of papain and legumain cysteine proteinases. **FEBS Lett**, v. 581, n. 16, p. 2914-2918, 2007.
- MARTÍNEZ, M.; RUBIO-SOMOZA, I.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. A cathepsin B-like cysteine protease gene from *Hordeum vulgare* (gene CatB) induced by GA in aleurone cells isol under circadian control in leaves. **J Exp Bot**, v. 54, n. 384, p. 951-959, 2003.
- MATSUOKA, K.; NAKAMURA, K. Propeptide of a precursor to a plant vacuolar protein required for vacuolar targeting. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, n. 3, p. 834-838, 1991.
- MOSOLOV, V.V.; VALUEVA, T.A. Participation of proteolytic enzymes in the interaction of plants and phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry (Moscow)**, v. 71, n. 8, p. 838-845, 2006.
- MÜNTZ, K.; SHUTOV, A.D. Legumains and their functions in plants. **Trends Plant Sci**, v. 7, n. 8, p. 340-344, 2002.
- NAKAUNE, S.; YAMADA, K.; KONDO, M.; KATO, T.; TABATA, S.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. A vacuolar processing enzyme, deltaVPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. **Plant Cell**, v. 17, n. 3, p. 876-887, 2005.
- OAKLEY, B.R.; KIRSCH, D.R.; MORRIS, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Anal Biochem**, v. 105, p. 361-363, 1980.
- OKAMOTO, T.; MINAMIKAWA, T. Molecular cloning and characterization of *Vigna mungo* processing enzyme 1 (VmPE-1), an asparaginyl endopeptidase possibly involved in post-translational processing of a vacuolar cysteine endopeptidase. **Plant Mol Biol**, v. 39, n. 1, p. 63-73, 1999.
- OLIVA, M.L.; CARMONA, A.K.; ANDRADE, S.S.; COTRIN, S.S.; SOARES-COSTA, A.; HENRIQUE-SILVA, F. Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine peptidase inhibitor from sugarcane. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 320, n. 4, p. 1082-1086, 2004.
- OLIVEIRA, J.P.; MAGLIARELLI, H.F.; PEREIRA, F.V.; GIANOTTI, A.; SOARES-COSTA, A.; HENRIQUE-SILVA, F.; WAKAMATSU, A.; SOARES, I.C.; NONOGAKI, S.; TRAVASSOS, L.R.; CARMONA, A.K.; PASCHOALIN, T. Sugarcane cystatin CaneCPI-4 inhibits melanoma growth by angiogenesis disruption. **J Cancer Sci Ther**, v. 3, p. 161-167, 2011.
- PAPINI-TERZI, F.S.; ROCHA, F.R.; VÊNIO, R.Z.; FELIX, J.M.; BRANCO, D.S.; WACLAWOVSKY, A.J.; DEL BEM, LE.; LEMBKE, C.G.; COSTA, M.D.; NISHIYAMA M.Y. JR.; VICENTINI, R.; VINCENTZ, M.G.; ULIAN, E.C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Sugarcane genes associated with sucrose content. **BMC Genomics**, v. 10, p. 120, 2009.
- PAPINI-TERZI, F.S.; ROCHA, F.R.; VÊNIO, R.Z.; OLIVEIRA, K.C.; FELIX, J.M.; VICENTINI, R.; ROCHA, C.S.; SIMÕES, A.C.; ULIAN, E.C.; DI MAURO, S.M.; DA

- SILVA, A.M.; PEREIRA, C.A.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. **DNA Res**, v. 12, n. 1, p. 27-38, 2005.
- PENNELL, R.I.; LAMB, C. Programmed cell death in plants. **Plant Cell**, v. 9, p. 1157-1168, 1997.
- PERNAS, M.; SÁNCHEZ-MONGE, R.; GÓMEZ, L.; SALCEDO, G. A chestnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinases from closely related pests. **Plant Mol Biol**, v. 38, n. 6, p. 1235-1242, 1998.
- PERNAS, M.; SÁNCHEZ-MONGE, R.; SALCEDO, G. Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. **FEBS Lett**, v. 467, n. 2-3, p. 206-210, 2000.
- PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.
- PFAFFL, M.W. Relative quantification In: Dorak MT (ed) Real-time PCR. Taylor & Francis, New York, p 63-82, 2006.
- PRABU, G.; KAWAR, P.G.; PAGARIYA, M.C.; PRASAD, D.T. Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. **Plant Mol Biol Rep**, v. 29, p. 291-304, 2011.
- RADCHUK, V.; WEIER, D.; RADCHUK, R.; WESCHKE, W.; WEBER, H. Development of maternal seed tissue in barley is mediated by regulated cell expansion and cell disintegration and coordinated with endosperm growth. **J Exp Bot**, v. 62, n. 3, p. 1217-1227, 2011.
- RAE, A.L.; CASU, R.E.; PERROUX, J.M.; JACKSON, M.A.; GROF, C.P. A soluble acid invertase is directed to the vacuole by a signal anchor mechanism. **J Plant Physiol**, v. 168, n. 9, p. 983-989, 2011.
- RAE, A.L.; JACKSON, M.A.; NGUYEN, C.H.; BONNETT, G.D. Functional specialization of vacuoles in sugarcane leaf and stem. **Tropical Plant Biol**, v. 2, p. 13-22, 2009.
- RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res**, v. 27, n. 1, p. 325-331, 1999.
- RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res** v. 40, p. D343-D350, 2012.
- RAWLINGS, N.D.; MORTON, F.R.; KOK, C.Y.; KONG, J.; BARRETT, A.J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res**, v. 36, p. 320-325, 2008.

- REAPE, T.J.; MCCABE, P.F. Apoptotic-like programmed cell death in plants. **New Phytol**, v. 180, n. 1, p. 13-26, 2008.
- REIS, E.M.; MARGIS, R. Sugarcane phytocystatins: Identification, classification, and expression pattern analysis. **Genet Mol Biol**, v. 24, n. 1-4, p. 291- 296, 2001.
- RIVARD, D.; GIRARD, C.; ANGUENOT, R.; VÉZINA, L.P.; TRÉPANIER, S.; MICHAUD, D. MsCYS1, a developmentally-regulated cystatin from alfalfa. **Plant Physiol Biochem**, v. 45, p. 508-514, 2007.
- RIVAS-SAN VICENTE, M.; PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J Exp Bot*, v. 62, n. 10 3321-3338, 2011.
- ROCHA, F.R.; PAPINI-TERZI, F.S.; NISHIYAMA M.Y. JR.; VÊNCIO, R.Z.; VICENTINI, R.; DUARTE, R.D.; DE ROSA V.E. JR.; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A.H.; RODRIGUES, F.A.; ULIAN, E.C.; ZINGARETTI, S.M.; GALBIATTI, J.A.; ALMEIDA, R.S.; FIGUEIRA, A.V.; HEMERLY, A.S.; SILVA-FILHO, M.C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, v. 8, p. 71, 2007.
- ROJO, E.; MARTÍN, R.; CARTER, C.; ZOUHAR, J.; PAN, S.; PLOTNIKOVA, J.; JIN, H.; PANEQUE, M.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J.; BAKER, B.; AUSUBEL, F.M.; RAIKHEL, N.V. VPE gamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defence against pathogens. **Curr Biol**, v. 14, p. 1897-1906, 2004.
- ROJO, E.; ZOUHAR, J.; CARTER, C.; KOVALEVA, V.; RAIKHEL, N.V. A unique mechanism for protein processing and degradation in *Arabidopsis thaliana*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 12, p. 7389-7394, 2003.
- ROTARI, V.I.; DANDO, P.M.; BARRETT, A.J. Legumain forms form plants and animals differ in their specificity. **Biol Chem**, v. 382, p. 953-959, 2001.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, p 365-386, 2000.
- RUBIO, V.; BUSTOS, R.; IRIGOYEN, M.L.; CARDONA-LÓPEZ, X.; ROJAS-TRIANA, M.; PAZ-ARES, J. Plant hormones and nutrient signaling. **Plant Mol Biol**, v. 69, n. 4, p. 361-373, 2009.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in peptidases. I Papain. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 27, p. 157-162, 1967.
- SCHLERETH, A.; BECKER, C.; HORSTMANN, C.; TIEDEMANN, J.; MÜNTZ, K. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes

- and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). **J Exp Bot**, v. 51, n. 349, p. 1423-1433, 2000.
- SCHLÖGL, P.S.; NOGUEIRA, F.T.; DRUMMOND, R.; FELIX, J.M.; DE ROSA, V.E. JR.; VICENTINI, R.; LEITE, A.; ULIAN, E.C.; MENOSSE, M. Identification of new ABA- and MEJA-activated sugarcane bZIP genes by data mining in the SUCEST database. **Plant Cell Rep**, v. 27, n. 2, p. 335-345, 2008.
- SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. **Nat Protoc**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.
- SCOTT, M.P.; JUNG, R.; MÜNTZ, K.; NIELSEN, N.C. A protease responsible for post-translational cleavage of a conserved Asn-Gly linkage in glycinin, the major seed storage protein of soybean. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, p. 658-662, 1992.
- SENYUK, V.; ROTARI, V.; BECKER, C.; ZAKHAROV, A.; HORSTMANN, C.; MÜNTZ, K.; VAINTRAUB, I. Does an asparaginyl-specific cysteine endopeptidase trigger phaseolin degradation in cotyledons of kidney bean seedlings? **Eur J Biochem**, v. 258, n. 2, p. 546-558, 1998.
- SHEWRY, P.R.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A.S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 945-956, 1995.
- SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. **Mol Cell**, v. 9, p. 459-470, 2002.
- SHIMADA, T.; YAMADA, K.; KATAOKA, M.; NAKAUNE, S.; KOUMOTO, Y.; KUROYANAGI, M.; TABATA, S.; KATO, T.; SHINOZAKI, K.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; KONDO, M.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. **J Biol Chem**, v. 278, p. 32292-32299, 2003.
- SHOCKEY, J.M.; GIDDA, S.K.; CHAPITAL, D.C.; KUAN, J.C.; DHANOA, P.K.; BLAND, J.M.; ROTHSTEIN, S.J. MULLEN, R.T. DYER, J.M. Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. **Plant Cell**, v. 18, n. 9, p. 2294-2313, 2006.
- SIN, S.F.; YEUNG, E.C.; CHYE, M.L. Downregulation of *Solanum americanum* genes encoding proteinase inhibitor II causes defective seed development. **Plant J**, v. 45, p. 58-70, 2006.
- SOARES-COSTA, A.; BELTRAMINI, L.M.; THIEMANN, O.H.; HENRIQUE-SILVA, F. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification and antifungal activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 296, p. 1194-1199, 2002.
- SOJKA, D.; HAJDUSEK, O.; DVORÁK, J.; SAJID, M.; FRANTA, Z.; SCHNEIDER, E.L.; CRAIK, C.S.; VANCOVÁ, M.; BURESOVÁ, V.; BOGYO, M.; SEXTON, K.B.; MCKERROW, J.H.; CAFFREY, C.R.; KOPÁČEK, P. IrAE: an asparaginyl endopeptidase (legumain) in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus*. **Int J Parasitol**, v. 37, p. 713-724, 2007.

- SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell**, v. 11, n. 3, p. 431-444, 1999.
- SOUZA, J.S.I.; PEIXOTO, A.M.; TOLEDO, F.F.; REICHARDT, K. Enciclopédia Agrícola Brasileira: vol2 C-D. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 605 p, 1998.
- STORER, A.C.; MÉNARD, R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. **Methods Enzymol**, v. 244, p. 486-500, 1994.
- SUGAWARA, H.; SHIBUYA, K.; YOSHIOKA, T.; HASHIBA, T.; SATOH, S. Is a cysteine proteinase inhibitor involved in the regulation of petal wilting in senescing carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers? **J Exp Bot**, v. 53, n. 368, p. 407-413, 2002.
- TAMURA, K.; SHIMADA, T.; ONO, E.; TANAKA, Y.; NAGATANI, A.; HIGASHI, S.I.; WATANABE, M.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. **Plant J**, v. 35, n. 4, p. 545-555, 2003.
- TIAN, L.; ZHANG, L.; ZHANG, J.; SONG, Y.; GUO, Y. Differential proteomic analysis of soluble extracellular proteins reveals the cysteine protease and cystatin involved in suspension-cultured cell proliferation in rice. **Biochim Biophys Acta**, v. 1794, n. 3, p. 459-467, 2009.
- TURK, V.; BODE, W. The cystatins: Protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Lett**, v. 285, n. 2, p. 213-219, 1991.
- URWIN, P.E.; GREEN, J.; ATKINSON, H.J. Expression of a plant cystatin confers partial resistance to Globodera, full resistance is achieved by pyramiding with natural resistance. **Mol Breeding**, v. 12, p. 263-269, 2003.
- VAN DILLEWIJN, C. Botany of Sugarcane. Chronica Botanica, Waltham Mass, 1952.
- VETTORE, A.L.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; SOUZA, G.M.; DA SILVA, A.M.; FERRO, M.I.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTI, E.A.; LEMOS, M.V.; COUTINHO, L.L.; NOBREGA, M.P.; CARRER, H.; FRANÇA, S.C.; BACCI JÚNIOR, M.; GOLDMAN, M.H.; GOMES, S.L.; NUNES, L.R.; CAMARGO, L.E.; SIQUEIRA, W.J.; VAN SLUYS, M.A.; THIEMANN, O.H.; KURAMAE, E.E.; SANTELLI, R.V.; MARINO, C.L.; TARGON, M.; FERRO, J.A.; SILVEIRA, H.C.; MARINI, D.C.; LEMOS, E.G.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; TAMBOR, J.H.; CARRARO, D.M.; ROBERTO, P.G.; MARTINS, V.G.; GOLDMAN, G.H.; DE OLIVEIRA, R.C.; TRUFFI, D.; COLOMBO, C.A.; ROSSI, M.; DE ARAUJO, P.G.; SCULACCIO, S.A.; ANGELLA, A.; LIMA, M.M.; DE ROSA JÚNIOR, V.E.; SIVIERO, F.; COSCRATO, V.E.; MACHADO, M.A.; GRIVET, L.; DI MAURO, S.M.; NOBREGA, F.G.; MENCK, C.F.; BRAGA, M.D.; TELLES, G.P.; CARA, F.A.; PEDROSA, G.; MEIDANIS,

- J.;ARRUDA, P. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, v. 13, n. 12, p. 2725-2735, 2003.
- VIJAYAN, P.; SHOCKEY, J.; LÉVESQUE, C.A.; COOK, R.J.; BROWSE, J. A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, n. 12, p. 7209-7214, 1998.
- VITALE, A.; DENECKE, J. The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. **Plant Cell**, v. 11, n. 4, p. 615-628, 1999.
- WANG, Y.; ZHU, S.; LIU, S.; JIANG, L.; CHEN, L.; REN, Y.; HAN, X.; LIU, F.; JI, S.; LIU, X.; WAN, J. The vacuolar processing enzyme OsVPE1 is required for efficient glutelin processing in rice. **Plant J**, v. 58, n. 4, p. 606-617, 2009.
- WASTERNAK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Ann Bot**, v. 100, n. 4, p. 681-697, 2007.
- WEEDA, S.M.; MOHAN KUMAR, G.N.; RICHARD KNOWLES, N. Developmentally linked changes in proteases and protease inhibitors suggest a role for potato multicystatin in regulating protein content of potato tubers. **Planta**, v. 230, n. 1, p. 73-84, 2009.
- WIEDERANDERS, B. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. **Acta Biochim Pol**, v. 50, n. 3, p. 691-713, 2003.
- YAMADA, K.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. The slow wound-response of gammaVPE is regulated by endogenous salicylic acid in *Arabidopsis*. **Planta**, v. 218, n. 4, p. 599-605, 2004.
- YAMADA, T.; ICHIMURA, K.; KANEKATSU, M.; VAN DOORN, W.G. Homologs of genes associated with programmed cell death in animal cells are differentially expressed during senescence of Ipomoea nil petals. **Plant Cell Physiol**, v. 50, n. 3, p. 610-625, 2009.
- YAMADA, T.; OHTA, H.; SHINOHARA, A.; IWAMATSU, A.; SHIMADA, H.; TSUCHIYA, T.; MASUDA, T.; TAKAMIYA, K. A cysteine protease from maize isolated in a complex with cystatin. **Plant Cell Physiol**, v. 41, n. 2, p. 185-191, 2000.
- YANG, A.H.; YEH, K.W. Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung no. 1). **Planta**, v. 221, n. 4, p. 493-501, 2005.
- ZAKHAROV, A.; CARCHILAN, M.; STEPURINA, T.; ROTARI, V.; WILSON, K.; VAINTRAUB, I. A comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* (L.)

Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins. **J Exp Bot**, v. 55, n. 406, p. 2241-2249, 2004.

ZHANG, X.; LIU, S.; TAKANO, T. Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. **Plant Mol Biol**, v. 68, n. 1-2, p. 131-143, 2008.

ZHAO, Y.; BOTELLA, M.A.; SUBRAMANIAN, L.; NIU, X.; NIELSEN, S.S.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. **Plant Physiol**, v. 111, n. 4, p. 1299-1306, 1996.