

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

“ESTABELECIMENTO DE UMA CANA-DE-AÇÚCAR TRANSGÊNICA  
SUPEREXPRESSANDO O GENE DA CANACISTATINA (CaneCPI-1), UMA  
PROTEÍNA INIBIDORA DE CISTEÍNO-PROTEASE”

**CAROLINA WERNER RIBEIRO**

SÃO CARLOS

-2007-

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

“ESTABELECIMENTO DE UMA CANA-DE-AÇÚCAR TRANSGÊNICA  
SUPEREXPRESSANDO O GENE DA CANACISTATINA (CaneCPI-1), UMA  
PROTEÍNA INIBIDORA DE CISTEÍNO-PROTEASE”

**CAROLINA WERNER RIBEIRO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Ciências Biológicas), área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS

-2007-

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

R484ec

Ribeiro, Carolina Werner.

Estabelecimento de uma cana-de-açúcar transgênica superexpressando o gene da canacistatina (CaneCPI-1), uma proteína inibidora de cisteíno-protease / Carolina Werner Ribeiro . -- São Carlos : UFSCar, 2007.  
98 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Genética molecular. 2. Alimentos transgênicos. 3. Cana-de-açúcar. 4. Canacistatina. 5. Cistatina. I. Título.

CDD: 574.87328 (20<sup>a</sup>)

Orientador

**Prof. Dr. Flávio Henrique Silva**

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>III</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. CANA-DE-AÇÚCAR.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. PRAGAS E DOENÇAS EM CANA-DE-AÇÚCAR.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. PROTEASES.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.1. Cisteíno-proteases.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4. PROTEÍNAS INIBIDORAS DE PROTEASES.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.1. Cistatínas.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4.2. Cistatínas da cana-de-açúcar.....</b>	<b>14</b>
<b>1.4.3. Inibidores de proteases no controle de insetos.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4.4. Plantas transgênicas como sistema de expressão.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA.....</b>	<b>19</b>
<b>1.5.1. Técnica de transformação por biobalística.....</b>	<b>21</b>
<b>1.5.2. Transformação genética da cana-de-açúcar.....</b>	<b>23</b>
<b>1.5.3. Escolha do transgene.....</b>	<b>24</b>

<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. MATERIAL.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. CONSTRUÇÃO DO VETOR PARA EXPRESSÃO NA PLANTA.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.1. Amplificação da fase aberta de leitura da CaneCPI-1.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.2. Subclonagem da CaneCPI-1 no vetor pAHC17.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3. OBTENÇÃO DE CALOS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4. PREPARAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE TUNGSTÊNIO PARA O BOMBARDEAMENTO.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5. SELEÇÃO DAS PLANTAS TRANSFORMADAS.....</b>	<b>34</b>
<b>3.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA CANECPI-1 EM PLANTAS TRANSGÊNICAS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.7. ANÁLISE DE WESTERN BLOTTING DA CaneCPI-1 EM PLANTAS TRANSGÊNICAS.....</b>	<b>37</b>
<b>3.7.1 Produção de anticorpos policlonais contra a proteína Poliubiquitina.....</b>	<b>38</b>
<b>3.8. PURIFICAÇÃO DA CANECPI-1 A PARTIR DA CANA-DE-AÇÚCAR TRANSFORMADA.....</b>	<b>43</b>
<b>3.8.1. Extração e purificação da <i>HIS</i>CaneCPI-1.....</b>	<b>44</b>
<b>3.8.2. Análise de Western blotting da <i>HIS</i>CaneCPI-1.....</b>	<b>45</b>
<b>3.8.3. Ensaio de atividade da proteína <i>HIS</i>CaneCPI-1.....</b>	<b>46</b>

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1. CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2. OBTENÇÃO DOS CALOS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....</b>	<b>52</b>
<b>4.3. BOMBARDEAMENTO DOS CALOS EMBRIOGÊNICOS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....</b>	<b>54</b>
<b>4.4. SELEÇÃO DAS PLANTAS TRANSFORMADAS.....</b>	<b>59</b>
<b>4.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA CaneCPI-1 NAS PLANTAS TRANSGÊNICAS.....</b>	<b>62</b>
<b>4.6. ANÁLISE DE WESTERN BLOTTING DA CaneCPI-1 NAS PLANTAS TRANSGÊNICAS.....</b>	<b>67</b>
<b>4.6.1. Produção de anticorpos policlonais contra a proteína Poliubiquitina.....</b>	<b>71</b>
<b>4.7. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CaneCPI-1 DA CANA-DE-AÇÚCAR TRANSFORMADA.....</b>	<b>80</b>
<b>4.7.1. Extração e purificação da <i>HIS</i>CaneCPI-1 purificada a partir da planta.....</b>	<b>80</b>
<b>4.7.2. Análise de Western blotting <i>HIS</i>CaneCPI-1 purificada a partir da planta.....</b>	<b>82</b>
<b>4.7.3. Ensaio de atividade com a proteína <i>HIS</i>CaneCPI-1 purificada a partir da planta.....</b>	<b>84</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>88</b>

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Flávio Henrique Silva, pela orientação, apoio e incentivo.

À Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes, pela co-orientação e ajuda na realização deste trabalho, pelo incentivo, apoio, pelas viagens divertidas, pelo carinho, longas conversas e amizade.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho, em especial:

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Às instituições CEPID/CBME/FAPESP.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro.

À Dra. Adriana K. Carmona e Simone S. Cotrin, pela colaboração no trabalho e gentileza.

Ao Dr. Eugênio C. Ulian, pela oportunidade de colaboração com o Centro de Tecnologia Canavieiro (CTC- Piracicaba/SP) e auxílio no planejamento do trabalho.

Às pesquisadoras do CTC Maria Cristina Falco e Sabrina M. Chabregas, pela colaboração e auxílio na execução deste trabalho, sempre dispostas a ajudar.

À todos os funcionários e técnicos do CTC, em especial a Sueli A. Piacentini e Luis C. de Almeida, pelos experimentos realizados com larvas.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, em especial à Regiane pelos auxílios prestados.



À todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular, pela ajuda, solidariedade e amizade e aos amigos de outros laboratórios.

Aos amigos de longe, pelo incentivo, palavras de apoio, força e amizade.

Às amigas do coração: Andreia, Márcia, Mylene e Viviane, pela enorme ajuda, apoio, conversas, risadas, carinho e pela amizade, em especial à Andréia pela ajuda desde o meu primeiro dia no laboratório.

Aos meus pais, por tudo que representam de bom em minha vida, por sempre estarem ao meu lado, pelo apoio, incentivo e dedicação. Muito obrigada!

À Deus, pela minha vida e por me dar forças para alcançar meus objetivos.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fotografia mostrando os estágios de desenvolvimento do inseto <i>S. levis</i> .....	5
<b>Figura 2:</b> Infestação da cana-de-açúcar por <i>Sphenophorus Levis</i> .....	6
<b>Figura 3:</b> Visão esquemática de uma cistatina e uma cisteíno-protease.....	13
<b>Figura 4:</b> Seqüência de nucleotídeos do gene da CaneCPI-1.....	15
<b>Figura 5:</b> Transformação por biobalística.....	22
<b>Figura 6:</b> Mapa do pAHC17.....	28
<b>Figura 7:</b> Esquema representativo dos vetores de expressão.....	29
<b>Figura 8:</b> Aparelho de biobalística.....	33
<b>Figura 9:</b> Amplificação do gene da CaneCPI-1 a partir do plasmídeo pET28canecys..	48
<b>Figura 10:</b> Clivagem do plasmídeo pAHC17 com a enzima de restrição <i>Bam</i> HI.....	49
<b>Figura 11:</b> Análise por restrição dos vetores pAHCaneCPI-1A e pAHCaneCPI-1C....	50
<b>Figura 12:</b> Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene CaneCPI-1 e das construções pAHCaneCPI-1A e pAHCaneCPI-1C.....	51
<b>Figura 13:</b> Palmito de cana-de-açúcar.....	52
<b>Figura 14:</b> Calos embriogênicos de cana-de-açúcar.....	53
<b>Figura 15:</b> Calos de cana-de-açúcar bombardeados.....	55
<b>Figura 16:</b> Calos de cana-de-açúcar regenerados em placa.....	56
<b>Figura 17:</b> Plantas de cana-de-açúcar regeneradas em tubete.....	57
<b>Figura 18:</b> Plantas enraizadas.....	58
<b>Figura 19:</b> Análise da presença da CaneCPI-1 nas plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1A.....	60
<b>Figura 20:</b> Análise da presença da CaneCPI-1 nas plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1C.....	61
<b>Figura 21:</b> Canas-de-açúcar transformadas com o gene CaneCPI-1.....	62

<b>Figura 22:</b> Análise por PCR Semi-quantitativo das plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1A .....	64
<b>Figura 23:</b> Análise por PCR Semi-quantitativo das plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1C.....	65
<b>Figura 24:</b> Imunodeteção da CaneCPI-1 em folhas de plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1A.....	68
<b>Figura 25:</b> Imunodeteção da CaneCPI-1 em folhas de plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1C.....	69
<b>Figura 26:</b> Imunodeteção da CaneCPI-1 em raízes de plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1C.....	70
<b>Figura 27:</b> Amplificação do gene da poliubiquitina à partir do plasmídeo pSPORTST2001.....	71
<b>Figura 28:</b> Clivagem do plasmídeo pTZST2001.....	72
<b>Figura 29:</b> Análise de expressão e solubilidade da proteína Poliubiquitina.....	73
<b>Figura 30:</b> Análise de expressão, solubilidade e purificação da proteína Poliubiquitina em condições desnaturantes.....	75
<b>Figura 31:</b> Imunodeteção teste da Poliubiquitina expressa em <i>E. coli</i> .....	77
<b>Figura 32:</b> Imunodeteção da Poliubiquitina em folhas de plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1A.....	79
<b>Figura 33:</b> Imunodeteção da Poliubiquitina em plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1C.....	79
<b>Figura 34:</b> Análise da purificação da <i>HIS</i> CaneCPI-1.....	81
<b>Figura 35:</b> Imunodeteção da <i>HIS</i> CaneCPI-1.....	83
<b>Figura 36:</b> Gráfico de inibição da <i>HIS</i> CaneCPI-1 sobre catepsina L .....	85

## RESUMO

A cana-de-açúcar é uma planta de grande importância econômica, principalmente no Brasil, que hoje é o maior produtor mundial desta cultura. Porém, as lavouras de cana-de-açúcar estão cada vez mais sendo atacadas e destruídas por pragas e patógenos, causando grandes perdas econômicas para os produtores. Assim, vários estudos estão focados no desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar mais resistentes. Nosso laboratório tem trabalhado com a proteína CaneCPI-1, uma proteína inibidora de cisteíno-protease. Baseado em estudos que indicam que insetos pertencentes à ordem *Coleoptera* possuem enzimas proteolíticas do tipo cisteíno-proteases em seu trato digestivo e, sabendo que algumas espécies de *Coleoptera* são pragas de cana-de-açúcar e que causam sérios danos aos canaviais, foi desenvolvida uma cana-de-açúcar transgênica superexpressando o gene da CaneCPI-1 sobre controle do promotor da ubiquitina do milho. A CaneCPI-1 foi também fusionada a uma his-tag para facilitar a posterior purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Para a transformação genética dos calos foi utilizado o método de biobalística e, após isto, foi feita uma seleção das plantas transformadas através de uma reação de PCR. As plantas que apresentaram resultado positivo foram selecionadas por PCR Semi-quantitativo e ensaios de Western blotting. Uma planta transformada expressando a proteína CaneCPI-1 com his-tag foi selecionada para a purificação da proteína recombinante em coluna de afinidade ao níquel, possibilitando a purificação da *HIS*CaneCPI-1 em um único passo. O rendimento foi de 6mg de proteína pura por kilograma de folhas de cana-de-açúcar. A *HIS*CaneCPI-1 purificada demonstrou atividade inibitória contra a enzima catepsina L, uma cisteíno-protease humana. Estes resultados mostram que a cana-de-açúcar pode ser usada como um sistema de expressão seguro e viável para a produção de proteínas recombinantes e é o primeiro passo para o estabelecimento de uma cana-de-açúcar resistente à pragas.

## ABSTRACT

Sugarcane is a plant of great economical importance, mainly in Brazil, which is currently the largest producer of this crop in the world. However, sugarcane farming has suffered attacks from pests and pathogens, leading to considerable economical losses. Therefore, a number of studies have focused on the development of more resistant sugarcane varieties. Our laboratory has been working on a sugarcane protein (CaneCPI-1), which is a cystein-protease inhibitor protein. Based on studies that indicate that insects belonging to the order Coleoptera possess cystein-proteases in their mid-gut and with the knowledge that some species of Coleoptera are sugarcane pests, a transgenic sugarcane plant overexpressing the CaneCPI-1 gene was developed under the control of maize ubiquitin promoter. CaneCPI-1 was fused to a His-tag to facilitate further purification through affinity chromatography. The calli transformation was performed through biobalistics. The transformed plants were then selected by polymerase chain reaction. Positive plants were further selected by Semi-quantitative PCR and Western blotting. A transformed plant expressing a His-tagged CaneCPI-1 was selected for purification of the recombinant protein in a nickel column, enabling purification of HIS-CaneCPI-1 from plant leaves in a single step. The yield was about 6mg of pure protein per kilogram of sugarcane leaves. The *HIS*CaneCPI-1 purified from the transformed sugarcane demonstrated inhibitory activity on the human cysteine protease cathepsin L. These studies demonstrate that the sugarcane can be a safe and viable expression system for recombinant protein production, and are the first step in the establishment of a sugarcane plant that is more resistant to pathogens.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar é uma planta alógama que pertence à família Gramineae (Poaceae). Faz parte do gênero *Saccharum*, originária do Sudeste Asiático, da grande região central da Nova Guiné e Indonésia (DANIELS e ROACH, 1987). A maioria das variedades comerciais é formada por meio do cruzamento das várias espécies existentes. Possui número poliplóide de cromossomos, variando entre 130 e 170.

É uma planta que se propaga vegetativamente nas culturas agrícolas através de toletes que sofrem indução para brotação das gemas. A cana-de-açúcar é ereta, perene, rizomatosa e forma touceiras. Pode crescer de 3 a 6 metros. O colmo é cilíndrico, extremamente glabro e de coloração variável. As folhas são simples, alternadas e estreito lanceoladas. Possui frutos secos, do tipo cariopse e com semente de endosperma abundante. É uma cultura que produz, em curto período, um alto rendimento de matéria verde, energia e fibras, sendo considerada uma das plantas com maior eficiência fotossintética. Seu plantio em larga escala é tradicional em vários países das regiões tropical e subtropical (COSTA-LIMA *et al.*, 2001).

No Brasil, devido às condições climáticas favoráveis, a cana-de-açúcar é cultivada desde o seu descobrimento, sendo que a cultura estabeleceu-se de forma definitiva nas regiões Centro-Sul e Nordeste do país. A cana-de-açúcar tem grande importância nas indústrias de açúcar e álcool e constitui a base de produção de matérias primas como o bagaço, o melaço e outros de utilização crescente (STUPIELLO, 1987).

O Brasil se tornou o maior produtor mundial de açúcar derivado da cana e o único país a produzir álcool em larga escala, em substituição ao petróleo, e com a

vantagem de ser um combustível renovável e menos poluente. Atualmente o cultivo de cana-de-açúcar fundamenta a economia de determinadas regiões do país.

Com uma área plantada de 6,18 milhões de hectares e uma safra estimada em 475,7 milhões de toneladas em 2006/07, o mercado sucroalcooleiro movimentou mais de 12,7 bilhões de reais por ano com a venda de produtos como açúcar, aguardente, álcool e alguns subprodutos como melaço e vinhaça. Atualmente existem no Brasil cerca de 50 mil produtores de cana-de-açúcar e 308 unidades de processamento industrial, com uma produtividade de 76,8kg/ha e produzindo 17,6 milhões de m<sup>3</sup> de etanol por ano (Disponível em: <[www.unica.com.br](http://www.unica.com.br)>. Em jan. de 2007).

A agroindústria canavieira é responsável por milhões de empregos, o que evidencia a importância social da cultura (SGRILLO, 1979), com a geração de divisas através da exportação de açúcar e álcool e pelo aproveitamento racional da biomassa vegetal, gerando energia elétrica e produtos para a indústria álcoolquímica e para a alimentação de animais entre outros (RAIZER, 1998).

Com tecnologias comerciais, e usando somente o bagaço, é possível gerar energia elétrica, sendo que a tecnologia existente permite gerar cem kilowatts de eletricidade por tonelada de bagaço. A utilização de parte da palha poderia elevar este potencial, aumentando ainda mais a importância econômica da cana-de-açúcar (SACIOTO, 2003).

Por ser um mercado de expressão econômica, preocupações com a qualidade e a produtividade são constantes no setor. Existem vários fatores que contribuem para a qualidade e a produtividade da cana-de-açúcar como o preparo do solo, a adubação, a escolha de variedades, o plantio e o ataque de pragas e doenças. Dentre estes fatores estima-se que as perdas na produção causadas por ataques de pragas na cana-de-açúcar chegam a um total de 470 milhões de dólares por ano. O ataque de patógenos e pragas

de plantas vêm contribuindo significativamente para as perdas na produção sofridas por produtores de cana-de-açúcar em todo o mundo. As perdas na produção agrícola mundial causadas por insetos chegam a 37% e sabe-se que mais de 200 doenças de plantas são causadas por fitopatógenos (HAQ *et al.*, 2004). Os principais métodos de controle aplicados ao combate de fitopatógenos ainda são os que se baseiam na utilização de fungicidas e pesticidas, causando altos custos econômicos e ambientais. Estes métodos de combate químico são geralmente eficientes, porém contaminam o meio ambiente deixando resíduos no solo, o custo é elevado para os produtores e permitem o surgimento de pragas resistentes a estes pesticidas (GLEDDIE *et al.*, 1989). Por tais motivos, é desejável o desenvolvimento de alternativas de baixo custo que diminuam o uso de produtos químicos e conseqüente contaminação do solo, e também evitando o surgimento de patógenos resistentes.

Um grande sucesso na produção de cana-de-açúcar deve-se à utilização de variedades advindas do melhoramento genético clássico desenvolvido por centros de pesquisas e estações experimentais, como o antigo IAA – Instituto do Açúcar e do Alcool e atualmente o CTC – Centro de Tecnologia Canavieira (SACIOTO, 2003). O mapeamento genético dos cultivares de cana mais utilizados está sendo realizado (GRIVET e ARRUDA, 2001), porém, a seleção de variedades mais produtivas, resistentes a pragas e doenças, e adaptadas a ambientes diversos por intercruzamentos, é um processo demorado que pode levar anos.

Hoje, o seqüenciamento do genoma de várias plantas tem facilitado e acelerado a identificação de genes responsáveis por qualidades desejáveis, possibilitando o estudo e a manipulação subsequente de genes de interesse através de técnicas de genética molecular. Assim, é possível o desenvolvimento de plantas com maior resistência ao ataque de pragas inserindo nestas plantas genes que codificam proteínas com função de



defesa, isto é, proteínas que possam interferir em alguma função metabólica vital para o organismo invasor. Após estes estudos será possível disponibilizar comercialmente culturas de importância econômica resistentes a pragas e patógenos, proporcionando a diminuição de problemas fitossanitários que comprometem a alta produção das culturas ou a sanidade do meio ambiente pela utilização de agrotóxicos.

## **1.2. PRAGAS E DOENÇAS EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Como já mencionado, as perdas na produção de culturas de plantas devido ao ataque de pragas e doenças têm sido estimadas em 37% em todo mundo (HAQ *et al.*, 2004), causando sérios problemas para a agricultura.

Em culturas de cana-de-açúcar foram descritas mais de 216 patogenias, das quais 38 já foram encontradas nos canaviais brasileiros, sendo 10 de grande importância para os produtores.

Até alguns anos atrás, as variedades de canas-de-açúcar existentes apresentavam uma alta resistência ao ataque de pragas, porém, as variedades atuais não mostram o mesmo grau de resistência em relação às variedades passadas. Em alguns casos é provável que os genes de resistência ainda estejam presentes nestas variedades, mas estes genes não estão sendo corretamente expressos (FALCO *et al.*, 2001) ou então as plantas e suas pragas têm co-evoluído ao longo dos anos, causando uma adaptação dos insetos aos mecanismos de defesa das plantas (JONGSMA e BOLTER, 1997).

A cana-de-açúcar é susceptível ao ataque de vários insetos. Dentre eles, um que tem se tornando uma praga destruidora de lavouras de cana-de-açúcar nos últimos anos é o *Sphenophorus levis* (Ordem *Coleoptera*). Este inseto é conhecido como “Gorgulhão rajado” ou “bicudo da cana” (figura1) e sua infestação nas lavouras vêm causando grandes prejuízos.

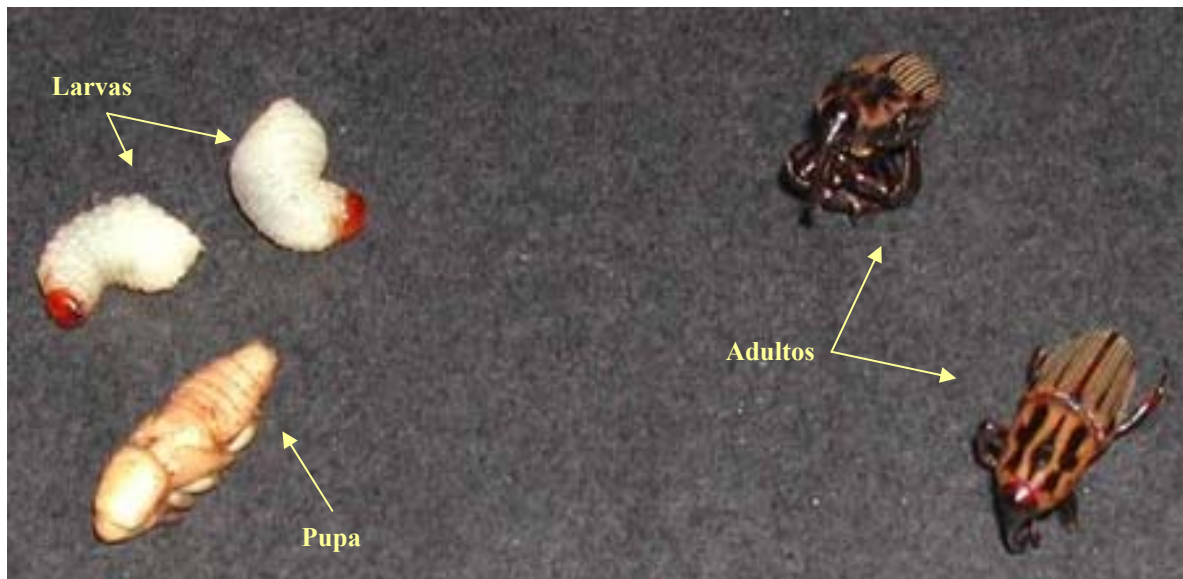


Figura 1. Fotografia mostrando os três estágios de desenvolvimento do inseto *Sphenophorus levis*. As setas indicam duas larvas, uma pupa e dois adultos.

O gênero *Sphenophorus* é comumente encontrado na América do Sul com 14 espécies descritas no Brasil. É um coleóptero da família curculionidae que foi identificado em 1978 e se tornou uma importante praga da cana-de-açúcar (VANIN, 1990).

O *Sphenophorus levis* possui um tamanho aproximado de 15 mm, tem hábitos noturnos, apresenta pouca agilidade e simula-se morto quando atacado. A postura dos

ovos é realizada no solo, mais especificamente nos rizomas. As larvas recém-nascidas são brancas e com cabeça e corpo volumoso. Elas penetram no rizoma em busca de alimento e abrigo construindo galerias irregulares (figura 2) onde permanecem até o estágio adulto, bloqueando a parte basal da planta e rizomas, causando como consequência o amarelamento do canavial, morte das plantas e falhas nas soqueiras (CERDA *et al*, 1999). Alguns inseticidas vêm sendo utilizados no controle desta praga, mas sem sucesso. O comportamento do *Sphenophorus* em estágio larval não permite a utilização de inseticidas sintéticos porque eles permanecem no interior da cana.

Assim, é necessária a busca de novas estratégias para controle desta praga, podendo ser aplicadas como uma abordagem útil no manejo integrado do *Sphenophorus*. Uma das alternativas para controle deste e de outros insetos seria a utilização de plantas transgênicas expressando proteínas de defesa, capazes de inibir o crescimento e desenvolvimento destas pragas nas lavouras.



Figura 2. Infestação da cana por *Sphenophorus levis*. Foto mostrando larvas de *Sphenophorus levis* atacando o rizoma de uma cana-de-açúcar (Disponível em: <[www.biologico.sp.gov.br](http://www.biologico.sp.gov.br)>. Acesso em dez. 2006).

### 1.3. PROTEASES

As enzimas constituem um grupo especializado e diverso de proteínas que têm muitas funções em diversos processos fisiológicos. Enzimas proteolíticas têm como ação a regulação de processos complexos envolvidos na fisiologia normal da célula e o controle da síntese e degradação de proteínas (LEUNG-TOUNG *et al.*, 2002). As proteases estão envolvidas em processos digestivos, ativação de proenzimas, processos inflamatórios e outros (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

As proteases são divididas em cinco categorias de acordo com o resíduo de aminoácido essencial ao seu sítio ativo e ao seu mecanismo de ação, similaridades de seqüências de aminoácidos e estruturas tridimensionais das proteínas, similaridades de inibidores e a extensão do pH ótimo de atividade (BARRET *et al.*, 2004; RAO *et al.*, 1998). São elas: serino-proteases, cisteíno-proteases, aspartil-proteases, metalo-proteases e as treonino-proteases. Exemplos destas proteases têm sido identificados em plantas, insetos, microorganismos, e são todas semelhantes àquelas encontradas nos mamíferos.

As serino-proteases compreendem duas famílias distintas. Em geral, a estrutura tridimensional das duas famílias é diferente, porém a geometria do sítio catalítico e o mecanismo de catálise são os mesmos. Possuem no sítio catalítico um grupo serino (BEYNON e BOND, 1989). As cisteíno-proteases incluem as proteases de plantas tais como papaína, várias catepsinas lisossomais de mamíferos, calpaínas e proteases de parasitas. A catálise das cisteíno-proteases ocorre através da formação de um intermediário covalente e envolve uma cisteína e um resíduo de histidina (TURK e BODE, 1991).

A grande parte das aspartil-proteases pertence à família pepsina, incluindo enzimas digestivas, catepsinas lisossomais e enzimas de processamento. Estas enzimas são compostas por moléculas bilobadas com o sítio ativo localizado entre dois lobos homólogos, em que cada lobo contribui com um resíduo de aspartato, o qual é necessário para a atividade da enzima (BEYNON e BOND, 1989). As metalo-proteases são enzimas encontradas em bactérias, fungos e em organismos superiores. Elas apresentam grandes diferenças em suas seqüências e estruturas, porém a maioria destas enzimas contém um átomo de zinco o qual é cataliticamente ativo. Em alguns casos o zinco pode ser substituído por outro metal, como o cobalto ou níquel sem perda de atividade. Estudos de cristalografia indicam que o zinco é ligado por duas histidinas e um ácido glutâmico (BLUNDELL, 1994).

### **1.3.1. Cisteíno –proteases**

Em vertebrados, as cisteíno-proteases estão envolvidas no sistema de degradação de proteínas lisossomais, mas também possuem uma função extracelular como em algumas desordens metabólicas. Em invertebrados, tais como nematóides e ácaros, cisteíno-proteases estão entre as enzimas digestivas e em artrópodos, tais como lagostas, elas exercem um papel digestivo, mas também estão relacionadas ao sistema nervoso (RAWLINGS e BARRET, 1994). Em insetos, elas são utilizadas em processos digestivos (RAWLINGS e BARRET, 1994), porém são encontradas em muitos outros tecidos, indicando que podem ter outras funções. As cisteíno-proteases também são muito utilizadas por vírus, fungos e bactérias para infecção de plantas.

Experimentos realizados com larvas de insetos mostraram que eles, e também outros animais, usam uma mistura de enzimas digestivas para hidrolisar proteínas ingeridas (APLLEBAUM, 1985).

Geralmente as cisteíno-proteases requerem um processamento de remoção do fragmento amino-terminal para que seja ativada. A região amino-terminal, também chamada de pró-região, exerce importantes funções não somente como inibidor de atividade enzimática, mas também no correto enovelamento da proteína recém sintetizada para protegê-la contra desnaturação em mudanças repentinas em condições de pH (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Em plantas estas enzimas são encontradas particularmente nos vacúolos e são responsáveis pela mobilização de proteínas estocadas no endosperma durante a germinação das sementes (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Também são encontradas no meio extracelular tais como aquelas de papaia e figo (RAWLINGS e BARRET, 1994).

#### **1.4. PROTEÍNAS INIBIDORAS DE PROTEASES**

Ao longo da evolução, as plantas parecem ter desenvolvido mecanismos de defesa contra proteases de fungos e insetos. Dentre estes mecanismos estão aqueles que se utilizam de proteínas de defesa. Desta forma, estas proteínas têm potencial para utilização no desenvolvimento de plantas transgênicas mais resistentes a patógenos. São descritas em torno de treze classes de proteínas de defesa. Entre elas estão as proteínas PR (“pathogenesis related”), as Ciclofilinas, as RIPs (“RNA N-glycosidases”), as LTPs (“Lipids Transfer Proteins”), as “Killer proteins” e finalmente os inibidores de cisteíno-

proteases de plantas (fitocistatinas). Esta última classe, fitocistatinas, é capaz de inibir proteases que ocorrem em muitas espécies de insetos herbívoros e fungos patogênicos, interferindo no crescimento e desenvolvimento, pois têm a capacidade de ligar-se, e, portanto, inibir a ação das proteases digestivas destas pragas e patógenos (SELITRENNIKOFF, 2001). Os inibidores de proteases (IPs) são produzidos em órgãos de estoque e sua síntese é induzida por ferimentos que constituem o complexo mecanismo de defesa de plantas. Altos níveis de inibidores de proteases são induzidos em folhas de batata por ferimentos e quando estes inibidores são ingeridos pela larva do besouro do Colorado da batata (*Leptinotarsa decemlineata*), bloqueiam as atividades proteolíticas específicas no intestino do inseto, alterando o seu crescimento (GRUDEN *et al.*, 1998).

Os IPs são considerados agentes antimetabólicos, pois causam deficiências protéicas nos patógenos. O comportamento antibiótico de inibidores de proteases é atribuído pela sua interferência na digestão de proteínas, as quais reduzem a viabilidade de aminoácidos impedindo, assim, a síntese de proteínas necessárias para o crescimento, desenvolvimento e reprodução de patógenos (BRODWAYS e DUFFEY, 1986). A atividade dos inibidores deve-se a sua capacidade de formar complexos estáveis com as proteases alvo, bloqueando, alterando ou prevenindo o acesso ao sítio ativo da enzima (HAQ *et al.*, 2004)

Os IPs são classificados em quatro grupos de acordo com suas especificidades e aminoácidos ativos nos sítios catalíticos das proteases. São eles: inibidores de serino, cisteíno, aspártico e metalo-proteases.

### 1.4.1. Cistatinas

As cistatinas são proteínas que especificamente inibem a atividade de cisteíno-proteases (TURK e BODE, 1991). As cistatinas são inibidores reversíveis e seu mecanismo de ação é baseado na inibição competitiva através do bloqueio da atividade proteolítica (ABRAHAMSON, 1993). Têm como principal função garantir a proteção de células e tecidos contra a atividade proteolítica de peptidases lisossomais que podem ser liberadas ocasionalmente na morte normal de células ou na morte celular causada por doenças ou invasão de organismos, como insetos (BARRETT e KIRSCHKE, 1981).

A primeira cistatina a ser isolada foi um inibidor de enzimas “papaína like”, caracterizado a partir da clara do ovo de galinha. O nome cistatina foi proposto por Barret em 1986 e mais tarde foi usado para descrever proteínas homólogas da mesma família. Cistatinas têm sido consideradas evolutivamente relacionadas, formando a “superfamília cistatina”. Membros desta superfamília podem ser divididos em três famílias de proteínas intimamente relacionadas, que compreendem as cistatinas animais (BARRET *et al.*, 1987) e uma família de cistatinas de plantas. A classificação das famílias é baseada nas similaridades da sequência primária, massas moleculares, número de ligações dissulfeto e localização subcelular. A Família 1, ou família Estefina, compreende as cistatinas que não contém ligações dissulfeto, com massa molecular de aproximadamente 11 kDa e são geralmente citosólicas (OLIVEIRA *et al.*, 2003). A Família 2, ou família Cistatina, são as cistatinas que formam duas ligações dissulfeto intracelulares próximas ao carboxi-terminal, com massa molecular entre 13 e 24 kDa e podem ocorrer em altas ou baixas concentrações em muitos fluidos biológicos (TURK e BODE, 1991). A Família 3, ou família Cininogênio, estão no plasma sanguíneo e possuem alta massa molecular, com cerca de 60 a 120 kDa. Formam ligações dissulfeto,



são glicosiladas e têm uma grande participação no processo de coagulação do sangue (TURK e BODE, 1991). Finalmente, a Família 4, ou fitocistatinas pois são encontradas em plantas. A massa molecular está entre 5 e 87 kDa e possuem características das famílias 1 e 2 (REIS e MARGIS, 2001).

As fitocistatinas são a segunda classe de inibidores de proteases mais estudada e têm sido caracterizadas a partir de várias espécies de plantas, tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas, incluindo feijão de corda (FERNANDES, *et al.*, 1993), batata (WALDROM *et al.*, 1993), repolho (LIM *et al.*, 1996), erva daninha (ROGERS *et al.*, 1993), cenoura (OJIMA *et al.*, 1997), papaia (SONG *et al.*, 1995), maçã (RYAN *et al.*, 2003), abacate (KIMURA *et al.*, 1995) e castanha (CONNORS *et al.*, 2002). Cistatinas também têm sido isoladas de sementes de várias plantas incluindo girassol (KOUZUMA *et al.*, 1996), arroz (ABE *et al.*, 1987), trigo (KURODA *et al.*, 2001), milho (ABE *et al.*, 1995) e soja (HINES *et al.*, 1991; MISAKA *et al.*, 1996). Essas proteínas exercem importantes funções biológicas, como a regulação das atividades das proteases endógenas durante a maturação de sementes, a defesa contra ataque de insetos e nematóides, que geralmente têm cisteíno-proteases em seus intestinos. A inibição é causada por uma região hidrofóbica, em forma de cunha da molécula de cistatina, que é inserida no sítio ativo da protease bloqueando o acesso do substrato neste sítio (BODE *et al.*, 1988). Esta forma triangular é composta por três elementos estruturais, que são três regiões que possuem resíduos ou domínios conservados na maioria das cistatinas, compreendendo uma Glicina na região N-terminal, um motivo Gln-Val-Val-Ala-Gly no primeiro “loop” e uma sequência Leu-Pro ou Pro-Trp no segundo “loop” de ligação das famílias 1 e 2 das cistatinas. A atividade das cistatinas tem sido explicada pela presença destes três pontos de contato com a protease alvo.

Estudos com a cistatina C humana indicam que o primeiro ponto de interação envolve um segmento contendo um resíduo de glicina no N-terminal, que se encaixa entre os sub-sítios S1 e S2 da enzima. Os outros pontos de interação ocorrem no “hairpin loop” contendo o domínio QxVxV (uma sequência altamente conservada presente na superfamília das cistatinas) o qual estabiliza o complexo fornecendo uma área de contato estendida com o sítio de ligação da protease. O segundo “loop” corresponde a um segmento contendo um resíduo de triptofano que também pode interagir com o sítio de ligação da protease (ABRAHAMSON *et al.*, 1987).

Os três pontos de interação da cistatina com a cisteíno-protease são ilustrados na figura 3.

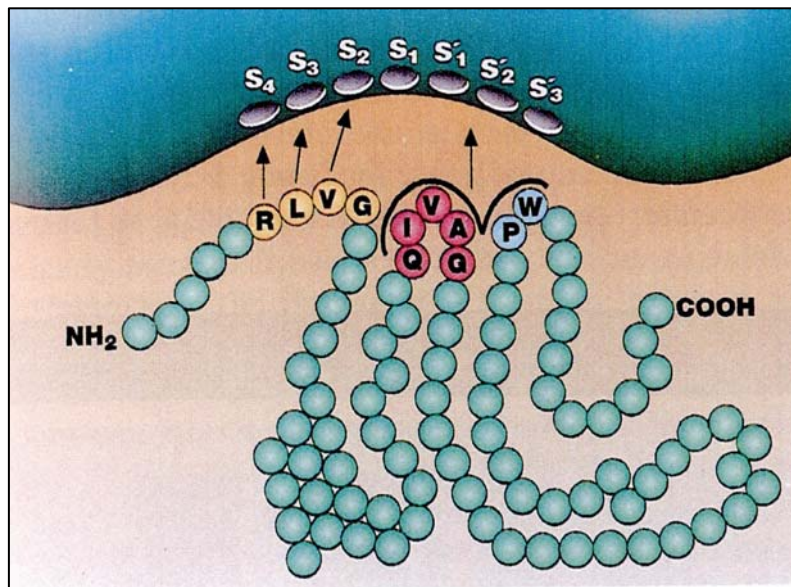


Figura 3. Visão esquemática da interação de uma cistatina e uma cisteíno-protease. O sítio ativo da enzima é mostrado na parte superior da figura. A cadeia polipeptídica da cistatina C é ilustrada abaixo, com os resíduos de aminoácidos indicados por letras. Três segmentos da cistatina estão envolvidos na ligação da enzima. Os resíduos da região N-terminal (amarelo) interagem com o substrato. Dois “loops” são formados, um em vermelho na região central e um segmento localizado próximo à região C-terminal (azul) juntos formam a área de contato com a protease. A conformação da molécula da cistatina não permite que ela seja clivada por uma protease na interação (ABRAHAMSON, 1993).

#### 1.4.2. Cistatinas da cana-de-açúcar

As cistatinas de cana-de-açúcar foram descritas primeiramente por REIS e MARGIS (2001), que identificaram no banco de dados de cana-de-açúcar do SUCEST (Sugarcane Expressed Tags Project) vinte e cinco prováveis fitocistatinas, possíveis membros da superfamília cistatina.

O clone SCCCRZ2001G09, originário do SUCEST, foi utilizado no projeto de doutorado da Dra. Andrea Soares Costa desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da UFSCar. Este clone codifica uma proteína inibidora de cisteína protease da cana-de-açúcar que foi denominada Canacistatina (SOARES-COSTA *et al.*, 2002). Esta proteína é composta por 126 aminoácidos e possui massa molecular aproximada de 13 kDa.

A canacistatina, também denominada CaneCPI-1, possui similaridade de seqüência com a Orizacistatina I, uma cistatina de arroz. A proteína recombinante foi expressa em *E. coli* e apresenta-se na forma solúvel. A proteína purificada foi caracterizada como sendo uma cistatina e foi utilizada em ensaios de inibição de atividade de cisteína-proteases, inclusive com algumas catepsinas humanas (SOARES-COSTA *et al.*, 2002; OLIVA *et al.*, 2004).

Outras duas cistatinas foram isoladas da cana-de-açúcar sendo denominadas de CaneCPI-2 e CaneCPI-3. Estas cistatinas foram expressas em *E. coli* e purificadas. Em ensaios de inibição, a CaneCPI-2 e CaneCPI-3 mostraram atividade inibitória sobre a papaína (GIANOTTI *et al.*, 2006).

A figura 4 mostra a seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da CaneCPI-1.

M A E A H N **G** R R V G M V G D  
**ATG**GCCGAGGCACACAACGGGCGGCGCGTGGGGATGGTGGGCGAC  
 V R D A P A G H E N D L E A I E **L A**  
 GTCCGGGACGCGCCGGCCGGCCACGAGAACGACCTCGAGGCCATCGAGCTCGCG  
**R F A V** A E H N S K T N A M L E F E  
 CGCTTCGCCGTCGCCGAGCACAACAGCAAGACCAACGCGATGCTGGAGTTCGAG  
 R L V K V R H **Q V V A G** T M H H F T  
 AGGCTGGTGAAGGTGAGGCACCAGGTGGTGGCCGGGACCATGCACCACTTCACC  
 V Q V K E A G G G K K L Y E A K V W  
 GTCCAGGTGAAGGAGGCCGGCGGCGGCAAGAAGCTGTACGAGGCCAAGGTGTGG  
 E K V **W** E N F K Q L Q S F Q P V G D  
 GAGAAGGTGTGGGAGAACTTCAAGCAGCTGCAGAGCTTCCAGCCGGTCGGGGAC  
 A  
 GCC

Figura 4. Seqüência de nucleotídeos do gene da CaneCPI-1. A região codificante da proteína é mostrada a partir do códon de iniciação (ATG), em rosa; as regiões conservadas presentes na superfamília Cistatina são mostradas em azul; o motivo conservado característico da família Fitocistatina é mostrado em laranja.

### 1.4.3. Inibidores de proteases no controle de insetos

As perdas na produção de culturas de plantas causadas por pragas são um grave problema que afeta os produtores, a agricultura e a economia de um país. Assim, é necessária a busca por novos métodos de combate a estas pragas. O método mais utilizado para eliminar os patógenos e as pragas de plantas é o uso de agrotóxicos e pesticidas, porém este método é caro e prejudicial ao meio ambiente.

Plantas superexpressando genes de resistência a pragas vêm se tornando uma alternativa interessante para a agricultura, viabilizando a obtenção de plantas menos dependentes de pesticidas químicos (BOUCHARD *et al.*, 2003). Recentes estudos estão focados na busca de novos genes de interesse que codificam proteínas de defesa, isto é, proteínas que ofereçam proteção contra os insetos. Neste sentido, as proteínas inibidoras de proteases têm se mostrado eficientes no combate aos insetos.

Os inibidores de proteases têm como uma de suas funções a defesa das plantas contra o ataque de pragas ou patógenos. Muitas pesquisas recentemente vêm explorando este mecanismo de defesa para a proteção da cultura, através da transformação genética de plantas com genes que codificam proteínas inibidoras de proteases, aumentando a resistência destas plantas aos insetos (WALKER *et al.*, 1999). Os inibidores de proteases atuam extracelularmente no intestino dos insetos através do bloqueio da proteólise do alimento, interferindo na nutrição e outras funções metabólicas relacionadas (BOUCHARD *et al.*, 2003).

O provável envolvimento dos inibidores de proteases na proteção das plantas foi observado inicialmente por LIPKE *et al.*, em 1954, quando larvas do besouro da flor *Tribolium confusum* não se desenvolveram na presença de inibidores de tripsina de soja. Após estes estudos surgiram vários outros exemplos de inibidores de proteases que se mostraram ativos contra certas espécies de insetos tanto em experimentos realizados com proteases *in vitro* (PANNETIER *et al.*, 1997; KOIWA *et al.*, 1998) quanto *in vivo* em ensaios feitos com dietas artificiais (URWIN *et al.*, 1997; VAIN *et al.*, 1998).

O uso de proteínas inibidoras de proteases no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a pragas e doenças tem sido adotado recentemente (HILDER *et al.*, 1987).

Para uma administração eficiente do controle de pragas através do uso de inibidores de proteases em plantas transgênicas, é importante conhecer o tipo de enzima presente no intestino do inseto. Das quatro classes de proteases existentes, as serino e cisteíno-proteases são as que mais se destacam, sendo encontradas com maior frequência no intestino dos insetos fitófagos. As serino-proteases são encontradas com maior frequência nos insetos da ordem *Lepidoptera*, já as cisteíno-proteases são encontradas com maior incidência nos insetos da ordem *Coleoptera*. O inseto *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae) possui no intestino de suas larvas enzimas proteolíticas do tipo cisteíno-proteases (CAMPOS *et al*, 1989). Proteases similares foram isoladas do intestino de larvas do besouro da flor *Tribolium castanaeum* (MURDOCK *et al*, 1987).

Como já verificado em diversos trabalhos, testes bioquímicos e moleculares indicam que as cisteíno-proteases “catepsina L-like” são as enzimas mais comumente encontradas no intestino de insetos pertencentes às ordens *Hemiptera*, *Diptera* e *Coleoptera* (TERRA e FERREIRA, 1994).

As cisteíno-proteases isoladas de intestino de insetos podem ter sua atividade inibida por inibidores sintéticos como também por inibidores naturais. Em um estudo com proteases de intestino de vários membros da ordem *Coleoptera* 10 de 11 besouros tiveram inibição de proteases por um reagente à base de sulfidrila (PCMBS) indicando que as proteases são da classe das cisteíno-proteases (MURDOCK *et al.*, 1987). A atividade ótima observada nas cisteíno-proteases ocorre em pH 5-7, mesma faixa de pH do intestino de insetos que utilizam cisteíno-proteases na sua digestão (MURDOCK *et al.*, 1987).

#### 1.4.4. Plantas transgênicas como sistema de expressão

Recentemente, o potencial uso das cistatinas de plantas em inibir cisteíno-proteases de insetos tem evoluído e a importância dos estudos das proteases digestivas de patógenos tem sido acentuada (TURK *et al.*, 1991). Várias plantas transgênicas expressando cistatinas de plantas já foram testadas contra espécies de insetos. Foi desenvolvida uma batata transgênica expressando um inibidor de cisteíno-protease de arroz, a orizacistatina (OC-I) (BOUCHARD *et al.*, 2003). Uma orizacistatina mutante, OC-IA86, também foi utilizada na transformação genética de banana (ATKINSON *et al.*, 2004) e *Arabidopsis thaliana* (WALKER *et al.*, 1999).

A transformação genética de plantas com genes que codificam inibidores de proteases pode se tornar uma alternativa interessante não somente para o controle de pragas e patógenos, mas também como um método de produção de inibidores de proteases. Algumas proteínas vêm sendo produzidas em plantas transgênicas com sucesso. Tabaco e alfafa foram transformados geneticamente com o gene que codifica uma proteína inibidora de protease de tomate (NARVAEZ-VASQUEZ, *et al.*, 1992), assim como o arroz foi transformado expressando o inibidor Kunitz de soja (LEE *et al.*, 1999) e pera também tem sido produzida expressando um inibidor de protease de *Nicotiana glauca* (CHARITY, *et al.*, 1999). Assim, as plantas transgênicas além de se tornarem resistentes a pragas e patógenos podem funcionar como uma “biofábrica” para a produção de proteínas heterólogas (SARDANA *et al.*, 1998). Além das vantagens econômicas, existem benefícios qualitativos que favorecem o uso de plantas transgênicas como fábricas para a produção de proteínas recombinantes.

Embora os sistemas de expressão em bactérias e fungos sejam mais robustos, eles não são ideais para a síntese de muitas proteínas de mamíferos devido às diferenças

nas suas vias metabólicas, uso de códons e formação de corpos de inclusão. Apesar de existirem diferenças no processamento pós-traducional e no uso de códons entre plantas e mamíferos, estas diferenças são menos significativas quando comparamos mamíferos e microorganismos. E, se as diferenças no processamento representarem alguma dificuldade, é possível modificar as plantas para alterar as vias de maturação das proteínas. Em adição, os produtos das plantas transgênicas são menos suscetíveis à contaminação por patógenos, toxinas microbianas ou seqüências oncogênicas (GIDDINGS, 2001).

## 1.5. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

Utilizando as técnicas de cultura de tecidos vegetais e da engenharia genética, ampliaram-se consideravelmente as possibilidades da introdução de genes de interesse agrônômico, inclusive para o controle de fitopatógenos (DOMINGUEZ *et al.*, 2000). A introdução de genes exógenos em plantas pode ser feita através da *Agrobacterium tumefaciens* ou por métodos diretos como a eletroporação e a biobalística.

A bactéria de solo *Agrobacterium tumefaciens* é do tipo gram negativa, causadora da doença “galha da coroa”, em que ocorre um processo de transferência natural de genes entre a agrobactéria e a célula vegetal, quando fragmentos de DNA bacteriano (T-DNA) são transferidos para dentro da célula vegetal, integrando-se ao genoma nuclear (REAM e GELVIN, 1996). Em sua forma natural, a bactéria transfere um fragmento de DNA, parte do plasmídeo bacteriano, e este se integra ao genoma das células de plantas infectadas. No fragmento de T-DNA (Transferred DNA) que é



transferido para a célula vegetal estão os genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de opinas e de fitohormônios, produtos que são responsáveis pela formação do tumor e sobrevivência da bactéria. Os vetores utilizados para a transformação são chamados de “desarmados”, isto é, não possuem os oncogenes em seu plasmídeo, mas retêm os genes de virulência (região vir), localizados no plasmídeo Ti (REAM e GELVIN, 1996). Estas construções de plasmídeos possuem promotores de plantas e genes bacterianos que conferem resistência a antibióticos, fazendo com que estes marcadores sejam eficientes para a seleção de células ou plantas transformadas. Assim, a *Agrobacterium tumefaciens* é utilizada como vetor de transformação, onde o fragmento de T-DNA é deletado e substituído por um gene de interesse (SACIOTO, 2003), perdendo a capacidade de causar tumores, porém sendo capaz de transferir o DNA exógeno. Explantes inoculados com as linhagens desarmadas têm capacidade regenerativa e grande porcentagem de produção de plantas transgênicas (BRASILEIRO, 1998).

O processo de eletroporação consiste na indução temporária de poros nas membranas celulares de protoplastos, produzidos por um campo elétrico permitindo, assim, a passagem de íons e moléculas, como a de DNA contendo os transgenes. Este método não é muito utilizado em monocotiledôneas (BIRCH, 1997).

A biobalística é o procedimento que utiliza o bombardeamento de explantes com microprojéteis objetivando a inserção de DNA exógeno no genoma das plantas. A técnica da biobalística (balística biológica), também conhecida por biolística, aceleração de partículas ou bombardeamento de partículas, foi descrita inicialmente por SANFORD *et al.*, (1987).

### **1.5.1. Técnica de transformação por Biobalística**

O método de biobalística consiste na aceleração de micropartículas que atravessam a parede celular e a membrana plasmática, de forma não letal, carreando substâncias adsorvidas, como DNA, para o interior da célula (FERREIRA *et al.*, 2004). São utilizados microprojéteis de ouro ou tungstênio, com diâmetro em torno de 1µm, nos quais são precipitadas as moléculas de DNA. Os projéteis carregam moléculas de DNA precipitadas na superfície, que são liberadas, sendo que algumas atingem o núcleo da célula vegetal e, em baixa frequência, conseguem integrar-se de forma aleatória no genoma (Klein et al, 1987). O tipo de aparelho usado para acelerar as micropartículas envolvidas pelo DNA pode ter propulsão a ar, pólvora, gás hélio ou eletricidade (FERREIRA *et al.*, 2004).

A figura 5 mostra em um esquema representativo os passos envolvidos na técnica de transformação genética por biobalística.

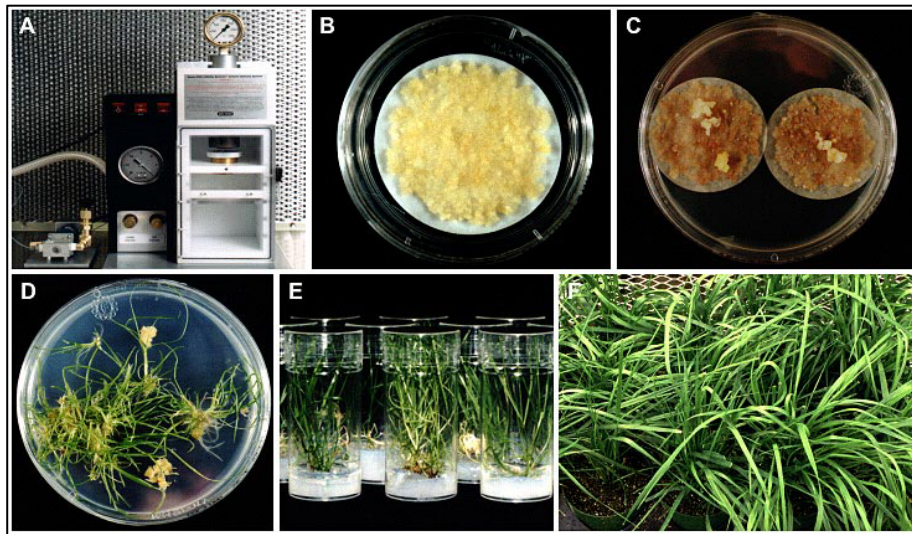


Figura 5. Transformação por biobalística. Esquema representativo do método de transformação genética por biobalística. A: foto do aparelho de biobalística, que é utilizado para o bombardeio dos calos embriogênicos. B: Placa de Petri com os calos embriogênicos posicionados no centro da placa. C: calos embriogênicos após o bombardeamento, em meio de seleção. D e E: regeneração dos calos e formação de plântulas, inicialmente em placa de Petri e depois em tubetes de vidro. F: Plantas regeneradas, cultivadas em vasos com terra. (Disponível em: [www.porquebiotecnologia.com.ar](http://www.porquebiotecnologia.com.ar). Acesso: jan 2006).

Neste método de transformação genética, são utilizadas moléculas de DNA do gene de interesse e marcadores selecionáveis, os quais são clonados em plasmídeos que possuem uma origem de replicação de *E.coli* e um gene marcador de resistência a um antibiótico, para a seleção das bactérias que levam o inserto.

Um fator importante desta técnica é a escolha do tecido alvo. Vários tipos de tecidos podem servir como alvo, como folhas, calos, raízes, células em suspensão e outros explantes têm sido empregados em inúmeros trabalhos. Gambley *et al.*, 1993 verificaram que a escolha do alvo é um dos fatores fundamentais neste processo.

### 1.5.2. Transformação genética da cana-de-açúcar

A transformação genética de cana-de-açúcar foi descrita por Chen *et al.* (1987), que obtiveram massas celulares transgênicas a partir de protoplastos tratados com polietilenoglicol (PEG) sem, contudo, alcançar a regeneração de plântulas. Plantas transgênicas foram obtidas através da utilização de métodos diretos e indiretos de transformação, incluindo a eletroporação de tecidos meristemáticos e fragmentos de calo, o bombardeamento de calos embriogênicos e outras técnicas baseadas na utilização da *Agrobacterium tumefaciens* (COSTA-LIMA *et al.*, 2001).

Para a cana-de-açúcar, a técnica de transformação genética por biobalística mostrou-se eficiente e com resultados satisfatórios. Neste método, verificou-se que os calos embriogênicos foram os melhores alvos para a transformação genética de cana-de-açúcar. Além do alvo, a escolha do promotor também é importante para garantir o sucesso da técnica. No caso das monocotiledôneas o promotor mais utilizado é o da ubiquitina do milho (*Ubi-1*).

As técnicas de transformação de cana-de-açúcar estão sendo amplamente estudadas e atualmente existem plantas transgênicas para as mais variadas características. As perspectivas de transformação genética de cana-de-açúcar foram incrementadas pelo projeto genoma da cana, financiado pela FAPESP e COPERSUCAR. Este projeto identificou milhares de seqüências expressas.

### 1.5.3. Escolha do transgene

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos em relação à transformação de plantas, empregando transgenes na tolerância a herbicidas (FALCO *et al.*, 2000). Temos como exemplos o gene da capa protéica do mosaico da cana-de-açúcar (SMITH *et al.*, 1992), o gene *bt* para resistência a pragas (MOORE, 1996) e o gene da lactoferrina, uma proteína que possui atividade antibacteriana, que foi inserido em tabaco, causando diminuição dos sintomas causados *R. solanaceum*. Em tabaco, outra proteína *Ttr*, (tabatoxina) foi expressa em plantas transformadas, levando a completa resistência da planta a *P. syringae*.

Neste trabalho, o gene escolhido para a transformação genética da cana-de-açúcar foi o gene da proteína Canacistatina ou CaneCPI-1 (SOARES-COSTA *et al.*, 2002). Esta proteína pertence ao grupo das cistatinas de cana-de-açúcar, que provavelmente estão envolvidas com mecanismos de defesa da planta ao ataque de insetos.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma cana-de-açúcar transgênica superexpressando o gene que codifica a proteína Canacistatina (CaneCPI-1), com a finalidade de obtenção de uma planta resistente ao ataque de insetos e a posterior purificação desta proteína recombinante das folhas da cana-de-açúcar transgênica. A escolha da CaneCPI-1 foi baseada em ensaios enzimáticos anteriores que mostraram que ela pode inibir proteases intestinais do inseto *S. levis*. Estes ensaios são parte do trabalho de pós-doutoramento de Andréa Soares-Costa.

### 2.1. Objetivos específicos

- Inserção do gene que codifica a CaneCPI-1 no vetor pAHC17 para expressão da proteína sob controle do promotor *Ubi-1*.
- Transformação genética da cana-de-açúcar com o gene CaneCPI-1 através do bombardeamento dos calos embriogênicos.
- Regeneração dos calos de cana-de-açúcar após bombardeamento e cultivo das células transformadas *in vitro*.
- Verificação da integração estável do gene exógeno ao genoma da planta.
- Análise da expressão gênica nas plantas transformadas pelo método de PCR Semi-Quantitativo.
- Detecção da CaneCPI-1 em canas transgênicas por análise de Western blotting.
- Purificação da proteína Canacistatina (*HIS*CaneCPI-1) a partir das folhas das plantas transformadas.
- Ensaio de atividade com a proteína *HIS*CaneCPI-1 contra a catepsina L.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar (São Carlos), com a colaboração do laboratório de Biologia Molecular do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC-Piracicaba) e laboratório de Biofísica do Departamento de Biofísica do Instituto de Farmacologia (INFAR) da UNIFESP (São Paulo).

#### **3.1. MATERIAL**

O gene utilizado neste trabalho foi o gene da canacistatina, CaneCPI-1, que foi obtido inicialmente a partir do clone SCCRZ2001G09 (Accession Number: AY119689) originado do Sugarcane Genome Project – SUCEST (FAPESP). A proteína CaneCPI-1 foi expressa em *E. coli*, purificada e caracterizada, sendo que o gene CaneCPI-1 foi subclonado no vetor de expressão pET28a, sendo esta construção denominada pET28canecys. Este plasmídeo foi utilizado como molde para as ampliações.

O método de transformação genética utilizado foi a Biobalística e este procedimento foi realizado no Centro de Tecnologia Canavieira – CTC (Piracicaba – SP). O vetor de expressão utilizado para a transformação genética da cana-de-açúcar foi o plasmídeo pAHC17 (CHRISTENSEN e QUAIL, 1996). Outro vetor utilizado na transformação genética dos calos de cana-de-açúcar foi o vetor pHA9 que contém o gene marcador de seleção para geneticina e o gene que codifica para a enzima neomicina fosfotransferase II (NPT II). Essas enzimas não são normalmente encontradas em plantas e atuam fosforilando antibióticos aminoglicosilados, como os

antibióticos canamicina, geneticina e neomicina (BRASILEIRO, 1998; SACILOTO, 2003). A variedade de cana-de-açúcar escolhida para o bombardeamento do transgene foi a SP80-185, a qual se mostra ser estável em diversos ambientes.

Para a expressão da proteína Poliubiquitina em bactérias foi utilizada a cepa bacteriana Rosetta (DE3). Para a purificação da proteína foi utilizada resina de níquel Ni-NTA (QIAGEN).

Nos ensaios de atividade com proteases foi utilizada a enzima Catepsina L (Calbiochem), o substrato Z-Phe-Arg-MCA (7-amino-metil-coumarina) (Calbiochem) e o ativador enzimático dithioeritritol – DTE (SIGMA).

### **3.2. CONSTRUÇÃO DOS VETORES PARA EXPRESSÃO NA PLANTA**

O plasmídeo pAHC17 utilizado nesta construção foi cedido pelo Dr. Eugênio Cesar Ulian do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). O plasmídeo pAHC17 possui o promotor da ubiquitina do milho (*ubi1*) que expressa muito bem em monocotiledôneas. A frente do promotor há sítios de restrição para facilitar a clonagem do gene de interesse (CHRISTENSEN e QUAIL, 1996).

O esquema representativo do mapa do pAHC17 é mostrado na figura 6.



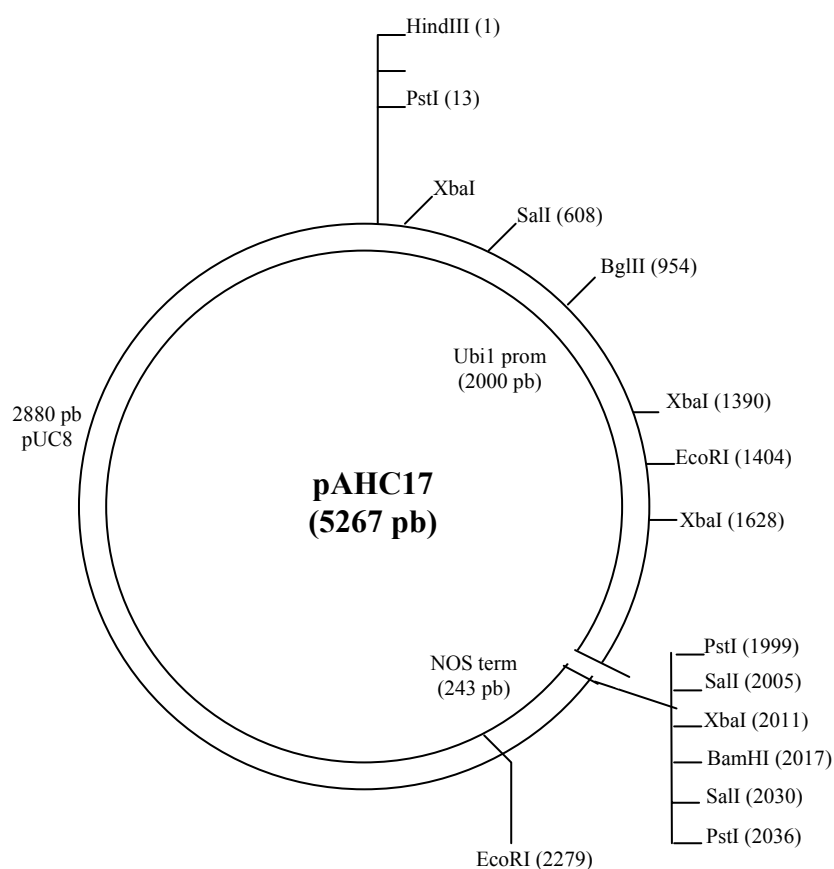


Figura 6: Mapa do pAHC17. Este plasmídeo possui um polylinker para clonagem, sendo preferencialmente usado o sítio de restrição para a enzima *Bam*HI.

Foram construídos dois vetores de expressão. O primeiro vetor, denominado de pAHCaneCPI-1A (figura 7), não possui cauda de histidinas mantendo a forma original do gene da canacistatina. A outra construção, denominada pAHCaneCPI-1C (figura 7), possui uma cauda contendo seis histidinas no C-terminal. Esta estratégia foi utilizada para facilitar a posterior purificação da proteína a partir da planta.

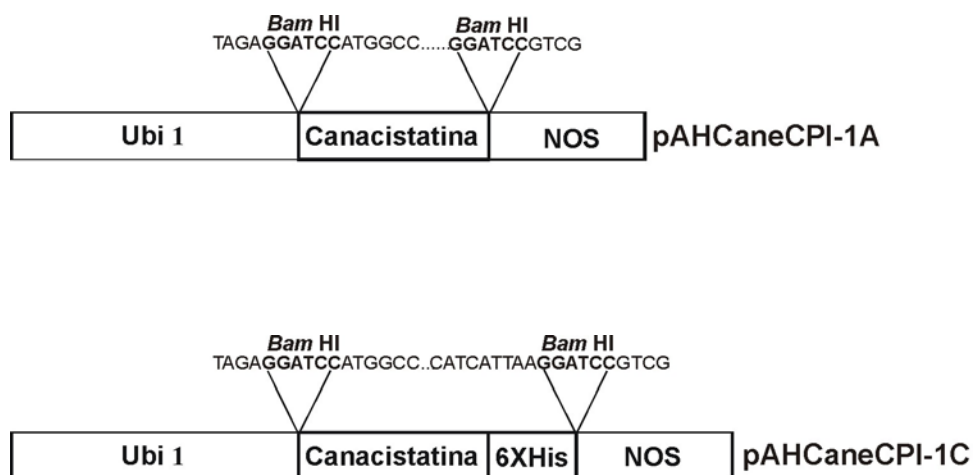


Figura 7: Esquema representativo dos vetores de expressão pAHCaneCPI-1A e pAHCaneCPI-1C. *Ubi-1*, promotor da ubiquitina do milho; ORF da Canacistatina; 6X Histidina tag; NOS (nopaline synthase terminator).

### 3.2.1. Amplificação da fase aberta de leitura da CaneCPI-1

A fase aberta de leitura que codifica a proteína inibidora de cisteíno protease, contida no vetor pET28canecys, foi obtida através de amplificação por PCR.

Para a construção pAHCaneCPI-1A foram utilizados os oligonucleotídeos CaneF\_bam: 5' cac ttg gat ccg tca gcg atg gcc gag g 3' e CaneR\_Bam: 5' cag cag gat cct tag gcg tcc ccg acc ggc tg 3' e para a construção pAHCaneCPI-1C foram utilizados os oligonucleotídeos CaneF\_bam: 5' cac ttg gat ccg tca gcg atg gcc gag g 3' e CaneR\_His: 5' tag gat cct tta **atg atg atg atg atg atg** agg cgt ccc cga ccg gct g 3'. Nota-se que o oligonucleotídeo CaneR\_His possui uma sequência de seis histidinas (em negrito).

Os oligonucleotídeos acima descritos contêm sítios para a enzima de restrição *Bam*HI (em sublinhado) para a clonagem no vetor pAHC17 clivado com a mesma enzima. Para a amplificação do gene da CaneCPI-1 por PCR foram utilizados 10ng de DNA como molde, 200 $\mu$ M de cada dNTP (Invitrogen), tampão de PCR 1 X (20mM Tris-HCl pH 8.4), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 20pmol de cada oligonucleotídeo e 1U de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) em uma reação com volume final de 100 $\mu$ l. O programa usado foi [1x] 94°C 1 min, [35x] 94°C 30 sec, 48°C 30 sec, 72°C 1 min, e [1x]72°C 5 min. Os resultados das amplificações foram observados em gel de agarose 1%. Os produtos de amplificação foram clivados com a enzima *Bam*HI e purificados utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Bioscience).

### **3.2.2. Subclonagem da CaneCPI-1 no vetor pAHC17**

O vetor pAHC17 foi previamente digerido com a enzima de restrição *Bam*HI e 1 $\mu$ g de DNA do vetor foi defosforilado com 2U de enzima SAP – Shrimp Alkaline Phosphatase (Amersham Biosciences) e tampão da enzima 1X, em um volume final de 50 $\mu$ l. Foi necessária a defosforilação do vetor clivado para evitar a ligação do plasmídeo sem o inserto.

Os produtos de amplificação CaneCPI-1A e CaneCPI-1C, previamente digeridos com a enzima de restrição *Bam*HI, foram ligados no vetor pAHC17. A ligação foi feita utilizando 80ng do vetor pAHC17, 480ng de cada fragmento amplificado, tampão da enzima 1X e 1U da enzima T4 DNA Ligase, durante 12 horas a 4°C. A mistura de ligação contendo o inserto e o vetor pAHC17 foi utilizada para transformar células de *E.coli* DH5- $\alpha$ , cloreto de cálcio competentes (SAMBROOK *et al.*, 1989). As bactérias transformadas foram plaqueadas em LB Ágar (USB) contendo ampicilina (100 $\mu$ g/ml).

As colônias transformantes foram analisadas por PCR, com os primers utilizados na amplificação dos insertos, e as colônias com amplificação positiva foram selecionadas para extração do DNA plasmidial. Para isso, foram cultivadas em meio líquido LB Broth (USB) contendo o antibiótico ampicilina, durante 16 horas a 37°C, e a partir destas colônias foram feitas extrações do DNA plasmidial.

Para confirmar a inserção dos fragmentos no vetor pAHC17 foi feita uma análise de restrição, utilizando 3U da enzima *Bam*HI (Fermentas), 200ng de DNA e tampão *Bam*HI<sup>+</sup> 1X (Fermentas), durante 3 horas a 37°C.

Após a confirmação dos recombinantes por análise de restrição, os clones selecionados foram seqüenciados para verificação da integridade e correta direção dos insertos. Para o sequenciamento foi utilizado o kit Dyanamic ET Terminator (Amersham Biosciencies) em sequenciador ABI Prism 377 DNA sequencer (SANGER, 1977), utilizando os primers M13 Foward: 5' gta aaa cga cgg cca g 3' ou M13 Reverse: 5' cag gaa aca gct atg ac 3'.

### **3.3. OBTENÇÃO DE CALOS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Todos os procedimentos de obtenção dos calos de cana-de-açúcar, bombardeamento, seleção e regeneração dos calos e cultivo das plantas transformadas foram realizados no Centro de Tecnologia Canavieira (Piracicaba - SP). Estes procedimentos foram realizados pelos técnicos e pesquisadores do CTC.

A variedade da cana de açúcar utilizada na transformação foi a SP80-185. Esta variedade foi escolhida pela sua característica de estabilidade em diferentes ambientes com fácil adaptação.

Foram utilizados calos embriogênicos de cana-de açúcar como tecido alvo para o bombardeamento, que regeneram plantas com grande facilidade, além de serem de fácil manuseio no processo de seleção em meio de cultura e permitem uma alta produção de material para o uso em bombardeamento em pouco tempo. Foram feitos cortes da região meristemática e estas cultivadas em meio indutor de calogênese. Dos calos que se desenvolveram, foram selecionados os calos com potencial embriogênico para o bombardeamento das micropartículas com DNA transformante.

#### **3.4. PREPARAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE TUNGSTÊNIO PARA O BOMBARDEAMENTO**

Foram utilizadas no bombardeamento partículas de tungstênio envolvidas com o DNA transformante de acordo com o método descrito por Sanford *et al.* (1987). O DNA plasmidial contendo o gene de interesse foi preparado para o bombardeamento, através de Midiprep (QIAGEN). Os plasmídeos foram precipitados em partículas de tungstênio, através da mistura de 2.5M de cloreto de cálcio, 10µg de DNA, 0.1M de espermidina e também com 10µl do plasmídeo pHA9, que contém os genes de resistência para geneticina, em um volume final de 140µl. O DNA vetor foi preparado usando uma variação do método de co-bombardeamento de Klein *et al.* (1988a,b). Essa mistura ficou sob agitação lenta por 10 minutos para aderência, depois foi centrifugada e o

pellet foi lavado duas vezes com etanol 95% e ressuspenso em 25 µl de etanol 95%. Quatro microlitros desta mistura foram utilizados no bombardeamento de cada placa de Petri contendo os calos embriogênicos posicionados no centro da mesma para o bombardeamento. No total, foram bombardeadas seis placas de Petri. O aparelho utilizado foi desenvolvido pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e emprega gás Hélio comprimido de 8 a 9kgf/cm<sup>2</sup> e os disparos são realizados em uma câmara de vácuo de 27mmHg para minimizar a resistência do ar.

A figura 8 mostra uma foto do aparelho de biobalística utilizado neste trabalho.



Figura 8: Aparelho de biobalística. Foto do aparelho de biobalística utilizado para o bombardeamento de DNA exógeno em plantas, construído pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), o qual utiliza gás hélio comprimido e vácuo parcial.

Após o bombardeamento os calos de cana-de-açúcar passaram por vários processos de seleção e regeneração baseados no trabalho de Bower e Birch (1992). Os calos foram transferidos para meio de cultura sem seleção e mantidos em sala de

crescimento. Após 10 dias os calos foram transferidos para um novo meio de cultura CI-3 contendo o antibiótico geneticina para seleção. Estes calos foram mantidos em sala de crescimento em um fotoperíodo de 12 horas a temperatura de  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  para a regeneração dos transformantes.

### **3.5. SELEÇÃO DAS PLANTAS TRANSFORMADAS**

Os calos que cresceram em meio de seleção, provavelmente transformados, foram transferidos para um meio contendo geneticina para seleção, crescimento e regeneração das plantas. Após aproximadamente quatro meses foram obtidas plantas com raiz, sendo possível a coleta de pequenos pedaços de folhas para extração de DNA. Foram utilizadas plantas controles não-transformadas, obtidas do mesmo tipo de calo, e que se regeneraram passando pelos mesmos passos da cultura de tecido, porém não sofreram bombardeamento.

As plantas regeneradas em meio de cultura seletivo, com cerca de 4cm de altura, foram analisadas por PCR para determinar se houve integração do transgene no genoma da cana-de-açúcar.

O DNA da planta foi isolado através de maceração de folhas de cana-de-açúcar em nitrogênio líquido e posterior homogeneização do tecido em Reagente Plant DNAzol (Invitrogen), obtendo-se no final o DNA genômico das plantas. A reação de amplificação foi realizada utilizando 20ng do DNA isolado das folhas de plantas não-transformadas e transformadas como molde,  $200\mu\text{M}$  de cada dNTP (Invitrogen), tampão de PCR 1 X ( $20\text{mM}$  Tris-HCl pH 8.4),  $1.5\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $8\text{pmol}$  de cada oligonucleotídeo

e 0.25U de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) em uma reação de 25µl. Os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados nas reações para as duas construções: Ubi\_forward: 5' ggc ata tgc agc atc tat tca 3' e CaneR\_bam: 5' cag cag gat cct tag gcg tcc ccg acc ggc tg 3', os quais hibridizam no promotor da ubiquitina e na região flanqueadora 3' do gene da CaneCPI-1, respectivamente. O programa utilizado no termociclador foi [1x] 94°C 1 min, [40x] 94°C 30 seg, 48°C 30 seg, 72°C 1 min, e [1x] 72°C 5 min. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1%.

### **3.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA CaneCPI-1 EM PLANTAS TRANSGÊNICAS**

A análise de expressão foi realizada através de PCR Semi-quantitativo para confirmar a presença de um transcrito de tamanho esperado. Para esta análise, 100mg de folhas de canas-de-açúcar não-transformadas e transformadas foram maceradas em nitrogênio líquido com ajuda de um pistilo e homogeneizadas em 1ml de reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante para a obtenção do RNA total. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro com absorvância de 260nm. Para síntese de cDNA foi utilizada a técnica de RT-PCR através do Kit Improm II Reverse Transcription System (Promega). Cerca de 2µg de RNA total e 1µg de Oligo dT (Promega) foram utilizados por reação.

Foi realizada uma reação de PCR para amplificar os fragmentos de cDNAs das plantas selecionadas. Assim, como molde para a reação, foram utilizados 4 µl do cDNA sintetizado a partir do RNA da planta não-transformada e das transformadas, 200µM de



cada dNTP (Invitrogen), tampão de PCR 1 X (20mM Tris-HCl pH 8.4), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 5pmol de cada oligonucleotídeo e 0.25U de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) em uma reação de 25µl. Os oligonucleotídeos utilizados na reação de amplificação foram: CaneF\_bam:5' cac ttg gat ccg tca gcg atg gcc gag g 3' e CaneR\_bam:5' cag cag gat cct tag gcg tcc ccg acc ggc tg 3'.

Para estimar a expressão do gene da CaneCPI-1 na cana-de-açúcar transformada, em comparação com uma não-transformada, foi utilizada a técnica de PCR semi-quantitativo. Seis diluições do cDNA foram utilizadas nas reações de amplificação (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64). Estas reações de PCR foram realizadas com os oligonucleotídeos específicos para o gene da CaneCPI-1, em um volume final de 25µl. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1% e visualizados sob luz UV.

O gene da poliubiquitina foi escolhido como controle endógeno para este experimento por ser um gene com expressão homogênea e adequado para a normalização de experimentos (PAPINI-TERZI, *et al.*, 2005). O clone SCCCST2001G02.g da cana-de-açúcar (originário do SUCEST- Sugarcane EST Project) apresenta uma fase aberta de leitura de aproximadamente 250pb e codifica uma proteína com 83 resíduos de aminoácidos (8kDa). O controle endógeno também foi utilizado em uma amplificação por PCR, em uma reação seguindo as mesmas condições descritas para o gene da CaneCPI-1, nas mesmas diluições e com os oligonucleotídeos: ST2001F: 5' ccc ata tgc aga tat ttg tg 3' e ST2001R: 5' ccg gat cct tac tgc cca cc 3'. O programa usado para o gene da poliubiquitina foi [1x] 94°C 5 min, [35x] 94°C 45 seg, 50°C 45 seg, 72°C 1 min, e [1x]72°C 10 min.

### 3.7. ANÁLISE DE WESTERN BLOTTING DA CaneCPI-1 EM PLANTAS TRANSGÊNICAS

Para a análise da expressão da proteína CaneCPI-1 na planta não-transformada e nas plantas transformadas, foram realizados ensaios de Western blotting utilizando dois diferentes tecidos das plantas: folhas e raízes.

Aproximadamente, 200mg de tecido de planta não-transformada e de plantas transformadas selecionadas foram macerados em nitrogênio líquido com a ajuda de pistilo e homogêneos em 2ml de reagente Trizol (Invitrogen). As proteínas foram isoladas de acordo com as instruções do fabricante e a concentração da proteína foi medida utilizando o Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad).

Para confirmação da integridade das proteínas extraídas das folhas e raízes das plantas transformadas e não-transformadas, foi realizado um SDS-PAGE 15% contendo 10µg da proteína recombinante expressa em *E. coli* e purificada e quantidades iguais de proteínas extraídas do extrato bruto das folhas das canas-de-açúcar (cerca de 30µg de proteínas do extrato bruto de cada planta).

Para análise de Western blotting, novamente 10µg da proteína recombinante expressa em *E. coli* e purificada e 30µg de proteínas extraídas do extrato bruto das folhas das plantas foram separadas em SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas de PVDF Invitrolon<sup>TM</sup> (Invitrogen), em tampão de transferência contendo 20mM Tris, 50mM Glicina e 165ml de metanol, em volume final de 975ml. As membranas foram bloqueadas em tampão TBS 1X (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl), com 5% de leite desnatado. Após 12 horas a 4°C, as membranas foram lavadas 4X em TBS 1X e incubadas com anticorpo específico anti-CaneCPI-1 com diluição de 1:3000 e lavadas novamente com TBS. Em seguida a membrana foi incubada com anti-mouse IgG AP-

labeled (Sigma) com diluição de 1:10000. As bandas de proteínas que reagiram com os anticorpos foram reveladas utilizando o Kit AP Conjugate Substrate (Bio-Rad).

Neste experimento também utilizamos a proteína Poliubiquitina como controle endógeno. Para isto, foi necessária a produção de anticorpos policlonais anti-poliubiquitina para as análises de Western blotting. Os mesmos procedimentos acima descritos foram realizados para imunodeteção da Poliubiquitina nos extratos brutos das plantas transformadas e não-transformadas, porém substituindo a proteína recombinante CaneCPI-1 pela proteína Poliubiquitina produzida em *E. coli*.

### **3.7.1. Produção de anticorpos policlonais contra a proteína Poliubiquitina**

O gene ST2001, que codifica a proteína Poliubiquitina, estava inicialmente inserido no vetor pSPORT1, assim sendo denominado de pSPORTST2001. Este vetor pSPORTST2001 foi utilizado como molde em uma reação de PCR para a amplificação do gene ST2001.

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação foram: ST2001F: 5' ccc ata tgc aga tat ttg tg 3' e ST2001R: 5' ccg gat cct tac tgc cca cc 3'. Estes oligonucleotídeos possuem sítios de clivagem para as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, respectivamente (sublinhados). Para a reação de amplificação foram utilizados 20ng de DNA como molde, 200µM de cada dNTP (Invitrogen), tampão de PCR 1 X (20mM Tris-HCl pH 8.4), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 20pmol de cada oligonucleotídeo e 1U de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) em uma reação de 100µl. O programa usado para o gene da poliubiquitina foi [1x] 94°C 5 min, [35x] 94°C 45 seg, 50°C 45 seg, 72°C 1 min, e [1x]72°C 10 min. O produto da amplificação foi observado em gel de agarose 1%.

Após a amplificação, este fragmento foi purificado e foi inserido no vetor de propagação pTZ57R/T (Fermentas). Foi feita a transformação do produto da ligação em células competentes (cepa DH-5 $\alpha$  CaCl<sub>2</sub>). A seleção das colônias recombinantes foi feita através das colônias que exibiam coloração branca. Algumas colônias foram selecionadas para extração do DNA plasmidial e foram seqüenciadas utilizando o kit Dyenamic ET Terminator (Amersham Biosciencies) em sequenciador ABI Prism 377 DNA sequencer (SANGER, 1977), utilizando os primers M13 Foward ou M13 Reverse.

O novo plasmídeo, denominado de pTZST, foi clivado com as enzimas *Nde*I e *Bam*HI. O inserto foi recuperado do gel de agarose, purificado utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e subclonado no vetor de expressão pET28a, previamente clivados com as enzimas de restrição *Nde*I e *Bam*HI.

O inserto foi ligado no vetor pET28a, que contém em sua seqüência uma cauda de histidinas (6XHIS). A ligação foi feita utilizando 50ng do vetor pET28a, 120ng do inserto, tampão da enzima 1X e 1U da enzima T4 DNA Ligase, durante 12 horas a 4°C. A mistura de ligação contendo inserto e pET28a foi utilizada para transformar células de *E.coli* DH-5 $\alpha$ , cloreto de cálcio competentes (SAMBROOK *et al.*, 1989).

As bactérias transformadas foram plaqueadas em LB Ágar (USB) contendo canamicina (25 $\mu$ g/ml). As colônias transformantes foram analisadas por PCR, com os primers da poliubiquitina, e as colônias com amplificação positiva foram selecionadas para extração do DNA plasmidial. Para isso, foram cultivadas em meio líquido LB Broth (USB) contendo o antibiótico canamicina, durante 16 horas a 37°C, e delas foram feitas as extrações do DNA plasmidial.

Após a confirmação do recombinante, o plasmídeo agora denominado pETST2001, foi utilizado para a realização de ensaios de expressão da Poliubiquitina em *E. coli*. O plasmídeo pETST2001 foi utilizado na transformação de células de *E.coli*

cepa Rosetta (DE3) cloreto de cálcio competentes, resultando em várias colônias. Uma dessas colônias foi cultivada em 500ml de meio líquido LB Broth (USB) com antibiótico canamicina (25µg/ml) a 37°C sob agitação até atingir uma densidade óptica (D.O.) de 0.6 no comprimento de onda de 600nm. Após a D.O. ter sido atingida, foi coletada uma alíquota de 1ml da amostra para servir de controle antes da indução e adicionou-se IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) em uma concentração final de 0.4mM, para indução. A indução foi de 4 horas e a expressão foi analisada em SDS-PAGE 15%, segundo LAEMMLI (1990).

Após a indução, as células foram coletadas e analisadas em relação à solubilidade. Assim, as células foram sonicadas 7 vezes de 60 segundos com intervalos de 30 segundos. As células bacterianas foram mantidas em gelo durante os intervalos de sonicação. As células foram novamente centrifugadas e foram coletadas alíquotas do pellet formado e do sobrenadante, e estas foram analisadas em SDS-PAGE 15% para a verificação da solubilidade da proteína (LAEMMLI, 1990).

Foi verificado que a proteína poliubiquitina apresentou-se na forma insolúvel, estando concentrada no pellet e não no sobrenadante (parte solúvel após a sonicação). Assim, foi necessária a utilização da uréia para solubilizar a proteína. Após a indução, as células foram centrifugadas, ressuspensas em tampão de lise (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8), sonicadas 7 vezes de 60 segundos com intervalos de 30 segundos (mantidas em gelo) e novamente centrifugadas. O precipitado foi ressuspendido em tampão de lise acrescido de 6M de Uréia e permaneceu 2 horas no gelo sob agitação. Após este período, a mistura foi centrifugada e foram coletadas alíquotas do pellet e do sobrenadante para análise de solubilidade.

A purificação da poliubiquitina foi realizada em cromatografia de afinidade utilizando coluna contendo resina de níquel Ni-NTA (QIAGEN). Esta coluna contém

um ligante (níquel) fixado por ligações covalentes a resina e este ligante tem a capacidade de interagir com a proteína recombinante. Ao passar a mistura protéica pelo complexo resina-ligante, ocorre uma interação entre a proteína alvo e o ligante. Como o gene da poliubiquitina foi clonado no vetor pET28a fusionado a uma seqüência de 6 histidinas na sua região N-terminal, foi possível a purificação desta proteína em coluna de afinidade utilizando o ligante níquel devido à alta afinidade entre a histidina e o níquel.

Para a eluição da proteína recombinante ligada ao níquel utilizou-se o composto imidazol, pois o anel imidazólico liga-se aos íons níquel imobilizados pelos grupos NTA da resina.

O sobrenadante proveniente da lise bacteriana solubilizada em uréia foi utilizado para a purificação da proteína em coluna de afinidade ao níquel. A coluna foi montada em uma seringa com 5ml de resina de níquel empacotada e mantida à temperatura ambiente. Inicialmente, a coluna foi lavada com água mili-Q (Millipore) com a passagem de 3 vezes o volume da resina e depois equilibrada com 3 volumes de tampão (10mM Tris-HCl, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 100mM NaCl, pH 8, 6M Uréia). Em seguida o sobrenadante foi fracionado e novamente foram passados 3 volumes de tampão com uréia. Após esta etapa, iniciou-se a eluição da proteína com a passagem de tampões com uréia, contendo um gradiente com concentrações crescentes de imidazol. O primeiro tampão utilizado continha 10mM de imidazol, o segundo 25mM de imidazol, o terceiro 50mM de imidazol, o quarto 75mM de imidazol, o quinto 100mM de imidazol e o sexto tampão continha 250mM de imidazol. Foram coletadas duas frações de cada gradiente. Esta etapa de purificação foi analisada em SDS-PAGE 15%.

Após a eluição, a proteína foi submetida a diálise utilizando membranas SnakeSkin Pleated Dialysis Tubing 3,500MWCO (PIERCE n.catal. 68035). Nesta

membrana foi colocada a proteína purificada e esta foi submergida em tampão contendo (10mM Tris-HCl, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 100mM NaCl, pH 8) e 3M Uréia. A diálise foi realizada durante um período de 12 horas a 4°C sob agitação, para a retirada do imidazol e da uréia. Foram realizadas mais 3 diálises, a segunda em tampão contendo 1M de uréia e a terceira e quarta em tampão sem uréia, nas mesmas condições anteriores. A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Anticorpos policlonais anti-poliubiquitina foram produzidos em camundongos contra a proteína purificada, produzida em *E. coli*, utilizando o protocolo segundo Sambrook *et al.* (1989). Na primeira imunização foram usados 50µg da proteína recombinante Poliubiquitina purificada misturados com adjuvante completo de Freud (Sigma). Uma segunda imunização foi feita após 45 dias utilizando novamente 50µg da proteína recombinante purificada Poliubiquitina misturada com adjuvante incompleto de Freud (Sigma). Após 15 dias, os animais imunizados foram sacrificados e o soro foi coletado por centrifugação a 15000g por 5 minutos e mantido a 4°C.

Após a obtenção do anticorpos policlonais, foi realizada uma análise de Western blotting para testar se os anticorpos estavam funcionando. Para esta análise de Western blotting, foram utilizadas amostras do vetor pET28a sem inserto transformado em células de *E.coli*, cepa Rosetta (DE3) induzido com IPTG e amostras da proteína poliubiquitina expressa em *E.coli* (cultura de bactéria induzida) e da proteína poliubiquitina purificada.

Assim, 10µl de cada amostra foram separados em SDS-PAGE 15% e transferidos para membrana de PVDF Invitrolon<sup>TM</sup> (Invitrogen), em tampão de transferência contendo 20mM Tris, 50mM Glicina e 165ml de metanol, em um volume final de 975ml. A membrana foi bloqueada em tampão TBS 1X (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl), com 5% de leite desnatado. Após 12 horas a 4°C, a membrana foi

lavada 4X em TBS 1X e incubada com anticorpo específico anti-poliubiquitina com diluição de 1:5000 e lavada novamente com TBS. Em seguida a membrana foi incubada com anti-mouse IgG AP-labeled (Sigma) com diluição de 1:10000. As bandas de proteínas que reagiram com os anticorpos foram reveladas utilizando o Kit AP Conjugate Substrate (Bio-Rad).

Estes anticorpos anti-poliubiquitina foram utilizados para as análises de Western blotting das proteínas extraídas dos extratos brutos das folhas das canas-de-açúcar, seguindo os mesmos procedimentos realizados para a imunodeteção da proteína CaneCPI-1 nas folhas das plantas transformadas e não-transformadas.

### **3.8. PURIFICAÇÃO DA CaneCPI-1 A PARTIR DA CANA-DE-AÇÚCAR TRANSFORMADA**

A construção pAHCaneCPI-1C contendo uma cauda de histidinas na região C-terminal do gene da CaneCPI-1 foi feita para possibilitar a posterior purificação da proteína recombinante superexpressa a partir das folhas da cana-de-açúcar transformada. Foi selecionada uma cana-de-açúcar transformada com um maior nível de expressão da proteína CaneCPI-1 (esta denominada *HIS*CaneCPI-1) para ser utilizada na purificação.

Plantas com aproximadamente nove meses já cultivadas em vasos com terra foram utilizadas para a extração da proteína recombinante.



### 3.8.1. Extração e Purificação da *HIS*CaneCPI-1

Para a extração da proteína *HIS*CaneCPI-1 a partir das folhas da cana-de-açúcar transgênica, foram coletados 10g de folhas da planta transformada selecionada e da planta não transformada e estas foram maceradas em nitrogênio líquido com a ajuda de pistilo e homogeneizados em 30ml de solução contendo 0.15M NaCl e mantidos durante 12 horas a 4°C. A mistura foi centrifugada durante 20 minutos, 10.000g a 4°C. O sobrenadante derivado da planta transformada foi precipitado com acetona 50% v/v e centrifugado durante 10 minutos, 10.000g a 4°C. O precipitado, contendo todas as proteínas solúveis da planta transformada, foi ressuspenso em 10ml de tampão contendo 10mM Tris-HCl, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 50mM NaCl, pH 8 (ROE, 2001).

A proteína recombinante foi purificada como descrito em SOARES-COSTA *et al.*, 2002. A *HIS*CaneCPI-1 foi purificada da fração solúvel do extrato bruto de folhas por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna contendo resina de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen). Como a proteína foi expressa em fusão com uma “cauda” de histidinas (6XHIS) contida no oligonucleotídeo e considerando que resíduos de histidina têm afinidade pelo níquel, foi possível a purificação em etapa única neste procedimento. Para a posterior eluição da *HIS*CaneCPI-1 utilizou-se o imidazol, por este ter maior afinidade aos íons de níquel quando comparado à histidina.

A coluna foi montada em uma seringa com 5ml de resina de níquel empacotada e mantida à temperatura ambiente. Inicialmente, a coluna foi lavada com água mili-Q (Millipore) com a passagem de 3 vezes o volume da resina e depois equilibrada com 3 volumes de tampão 10mM Tris-HCl, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 50mM NaCl, pH 8. Em seguida foi passado o extrato bruto das folhas da planta transformada e novamente foram passados 3 volumes de tampão. Após esta etapa, iniciou-se a eluição da proteína

com a passagem de tampões contendo concentrações crescentes de imidazol. O primeiro tampão continha 10mM de imidazol, o segundo 25mM de imidazol, o terceiro 50mM de imidazol, o quarto 75mM de imidazol, o quinto 100mM de imidazol e o sexto tampão continha 250mM de imidazol. As etapas de purificação foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

Após a eluição, a proteína foi submetida a diálise utilizando membrana SnakeSkin Pleated Dialysis Tubing 3,500MWCO (PIERCE n.catal. 68035). Nesta membrana foi colocada a proteína purificada e esta foi submersa em tampão contendo 10mM Tris-HCl e 50mM NaCl, pH 8, durante 12 horas a 4°C sob agitação, para a retirada do imidazol. A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).

### **3.8.2. Análise de Western blotting da *HIS*CaneCPI-1**

Para confirmar a purificação da proteína *HIS*CaneCPI-1 foi feita uma análise de Western blotting. Para esta análise, quantidades iguais de amostras de proteínas (60µg) provenientes do extrato bruto das folhas da planta não-transformada e da planta transformada e 0.4µg de proteína *HIS*CaneCPI-1 purificada das folhas foram separadas em SDS-PAGE 15% e transferidas para membrana de PVDF Invitrolon™ (Invitrogen), em tampão de transferência contendo 20mM Tris, 50mM Glicina e 165ml de metanol, em um volume final de 975ml. A membrana foi bloqueada em tampão TBS 1X (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl), com 5% de leite desnatado. Após 12 horas a 4°C, a membrana foi lavada 4X em TBS 1X e incubada com anticorpo específico anti-CaneCPI-1 com diluição de 1:3000 e lavada novamente com TBS. Em seguida a membrana foi incubada com anti-mouse IgG AP-labeled (Sigma) com diluição de

1:10000. As bandas de proteínas que reagiram com os anticorpos foram reveladas utilizando o Kit AP Conjugate Substrate (Bio-Rad).

### **3.8.3. Ensaio de atividade da proteína *HIS*CaneCPI-1**

Para verificar a atividade inibitória da *HIS*CaneCPI-1 após a purificação da proteína das folhas da cana-de-açúcar transgênica, realizou-se um teste de inibição contra uma cisteíno-protease. O ensaio de atividade foi realizado em colaboração com a Prof. Dra. Adriana K. Carmona da UNIFESP (São Paulo).

Para este ensaio de atividade foi utilizada a cisteíno-protease humana catepsina L (Calbiochem) e o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA (Calbiochem). A medida foi realizada em cubeta de quartzo mantida em compartimento aquecido a 37°C e foi ensaiada pela adição do substrato a enzima, utilizando o espectrofluorímetro HITACHI-2000 com comprimentos de onda de excitação e emissão de 380 e 460nm, respectivamente.

Foram adicionados na cubeta de quartzo, 100mM de tampão acetato de sódio pH 5.5, 1mM de dithioeritritol (DTE) e 0.3nM de catepsina L e incubados 5 min a 37°C. Após este período, foi adicionado 0.01mM do substrato Z-Phe-Arg-MCA e após 5 min de incubação foi adicionado 5nM do inibidor *HIS*CaneCPI-1. Assim, foi determinada a atividade hidrolítica residual da enzima após a adição do inibidor.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Como o objetivo principal deste trabalho é a obtenção de uma cana-de-açúcar transgênica resistente a insetos utilizando como transgene um inibidor de cisteino-protease, é de fundamental importância saber qual tipo de enzimas alvo estão presentes no trato digestivo do inseto *Sphenophorus levis*. Assim, foram realizados experimentos relacionados à purificação parcial das enzimas do *Sphenophorus levis*. Estes experimentos fazem parte do projeto de pós-doutorado da Dra. Andrea Soares Costa.

Foi realizado com a proteína CaneCPI-1 um ensaio de atividade inibitória contra as proteases do trato digestivo de *Sphenophorus levis* e esta demonstrou boa capacidade inibitória sobre as proteases deste inseto. A CaneCPI-1 inibiu por completo a atividade das proteases com uma constante de inibição de 3.9 nM. Este dado pode ser mais um indicativo de que a proteína CaneCPI-1 pode ser utilizada na produção de uma cana-de-açúcar transgênica resistente a insetos, especificamente ao *Sphenophorus levis*.

##### **4.1. CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO**

A fase aberta de leitura do gene que codifica a proteína CaneCPI-1 foi amplificada através de uma reação de PCR. O molde utilizado foi o vetor pET28canecys, que continha o gene da CaneCPI-1.

Foram construídos dois vetores de expressão, em que em um deles o gene da CaneCPI-1 estava na sua forma original (pAHCaneCPI-1A) e no outro vetor o gene da

CaneCPI-1 foi fusionado a uma seqüência de seis histidinas (pAHCaneCPI-1C), para posterior purificação da proteína recombinante.

Os produtos das ampliações da proteína CaneCPI-1, utilizando os oligonucleotídeos específicos para cada construção, resultaram em dois fragmentos de aproximadamente 320pb (figura 9). Os resultados das ampliações são mostrados a seguir:

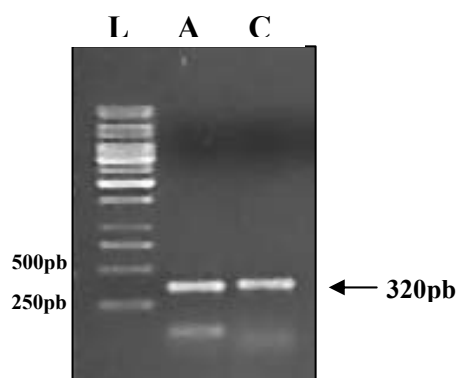


Figura 9. Amplificação do gene da CaneCPI-1 a partir do plasmídeo pET28canecys. Legendas: L: Ladder 1Kb; A: fragmento amplificado para a construção pAHCaneCPI-1A; C: fragmento amplificado para a construção pAHCaneCPI-1C, com aproximadamente 320pb.

Nas reações de amplificação, em cada oligonucleotídeo foi inserido um sítio de restrição para a enzima *Bam*HI, para facilitar a subclonagem destes fragmentos no vetor de expressão pAHC17. Após as ampliações, os fragmentos foram clivados com a enzima *Bam*HI e purificados.

O vetor pAHC17 possui um único sítio de clivagem para a enzima *Bam*HI. Este plasmídeo foi clivado com a enzima *Bam*HI, linearizando (figura 10).

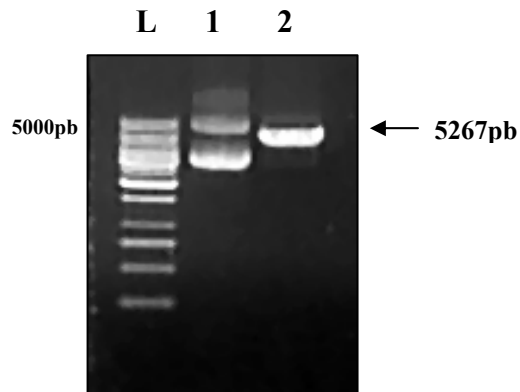


Figura 10. Clivagem do plasmídeo pAHC17 com a enzima de restrição *Bam*HI. L: Ladder 1Kb; 1: pAHC17 não clivado; 2: pAHC17 clivado e linearizado.

Após clivagem dos fragmentos estes foram purificados e subclonados no plasmídeo pAHC17 clivado com a mesma enzima formando os vetores denominados pAHCaneCPI-1A e pAHCaneCPI-1B. Esses vetores quando digeridos com a enzima de restrição *Bam*HI, que flanqueia as construções, liberaram, cada um, um fragmento de 320pb, confirmando o sucesso da subclonagem (figura 11). Nota-se que o fragmento clivado da construção pAHCaneCPI-1C apresenta-se com um tamanho maior, de alguns pares de bases, pela presença da cauda de histidinas neste amplificado.

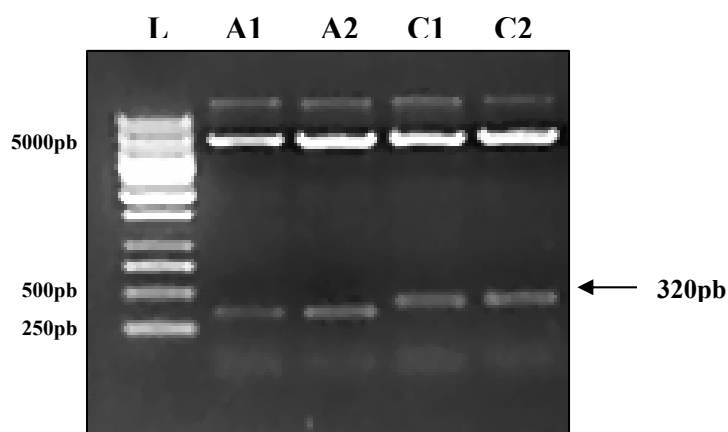


Figura 11. Análise por restrição dos plasmídeos pAHCaneCPI-1A e pAHCaneCPI-1C. L: Ladder 1Kb; A1 e A2: pAHCaneCPI-1A clivado com a enzima *Bam*HI gerando um fragmento de aproximadamente 320pb; C1 e C2: pAHCaneCPI-1C clivado com a enzima *Bam*HI gerando um fragmento de aproximadamente 320pb.

Os vetores com resultados positivos na análise de restrição foram submetidos ao sequenciamento para verificar a integridade dos genes e se estes estavam em sua correta direção.

A figura 12 mostra um alinhamento obtido a partir das seqüências do gene CaneCPI-1 e das construções pAHCaneCPI-1A e pAHCaneCPI-1C, confirmando integridade do gene da CaneCPI-1 no vetor pAHC17.

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CaneCPI-1      ATGGCCGAGGCACACACACGGGCGGCGTGGGGATGGTG
pAHCaneCPI-1A      TTTTGCNGGTTGACT-TTAGAGGATCCGTCATGGCCGAGGCACACACGGGCGGCGTGGGGATGGTG
pAHCaneCPI-1C      ATGGTGTACTTCTGCAAGGTCGACTCTTAGAGGATCCG-CCATGGCCGAGGCACACACGGGCGGCGTGGGGATGGTG
Consensus      .....tt.tgc.ggt.gact.ttagaggatccg.c.ATGGCCGAGGCACACACGGGCGGCGTGGGGATGGTG

81     90     100    110    120    130    140    150    160
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CaneCPI-1      GGCAGCTCCGGGACGCGCCGGCCGGCCACGAGAACGACCTCGAGGCCATCGAGCTCGCGCGCTTCGCCGTCGCCGAGCA
pAHCaneCPI-1A      GGCAGCTCCGGGACGCGCCGGCCGGCCACGAGAACGACCTCGAGGCCATCGAGCTCGCGCGCTTCGCCGTCGCCGAGCA
pAHCaneCPI-1C      GGCAGCTCCGGGACGCGCCGGCCGGCCACGAGAACGACCTCGAGGCCATCGAGCTCGCGCGCTTCGCCGTCGCCGAGCA
Consensus      GGCAGCTCCGGGACGCGCCGGCCGGCCACGAGAACGACCTCGAGGCCATCGAGCTCGCGCGCTTCGCCGTCGCCGAGCA

161    170    180    190    200    210    220    230    240
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CaneCPI-1      CAAACAGCAGACCAACGCGATGCTGGAGTTCGAGAGGCTGGTGAAGGTGAGGCACAGGTGGTGGCCGGGACCATGCACC
pAHCaneCPI-1A      CAAACAGCAGACCAACGCGATGCTGGAGTTCGAGAGGCTGGTGAAGGTGAGGCACAGGTGGTGGCCGGGACCATGCACC
pAHCaneCPI-1C      CAAACAGCAGACCAACGCGATGCTGGAGTTCGAGAGGCTGGTGAAGGTGAGGCACAGGTGGTGGCCGGGACCATGCACC
Consensus      CAAACAGCAGACCAACGCGATGCTGGAGTTCGAGAGGCTGGTGAAGGTGAGGCACAGGTGGTGGCCGGGACCATGCACC

241    250    260    270    280    290    300    310    320
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CaneCPI-1      ACTTACCCGTCAGGTTGAAGGAGGCCGGCCGGCCAGAGAGCTGTACGAGGCCAAGGTGTGGGAGAGGTTGGGAGAAC
pAHCaneCPI-1A      ACTTACCCGTCAGGTTGAAGGAGGCCGGCCGGCCAGAGAGCTGTACGAGGCCAAGGTGTGGGAGAGGTTGGGAGAAC
pAHCaneCPI-1C      ACTTACCCGTCAGGTTGAAGGAGGCCGGCCGGCCAGAGAGCTGTACGAGGCCAAGGTGTGGGAGAGGTTGGGAGAAC
Consensus      ACTTACCCGTCAGGTTGAAGGAGGCCGGCCGGCCAGAGAGCTGTACGAGGCCAAGGTGTGGGAGAGGTTGGGAGAAC

321    330    340    350    360    370    380    390    400
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CaneCPI-1      TTCAAGCAGCTGCAGAGCTTCCAGCCGGTCGGGGACGCC
pAHCaneCPI-1A      TTCAAGCAGCTGCAGAGCTTCCAGCCGGTCGGGGACGCC-----TAAAGGATCCGTCGACCTGCAGAT
pAHCaneCPI-1C      TTCAAGCAGCTGCAGAGCTTCCAGCCGGTCGGGGACGCCCATCATCATCATCATTAAGGATCCGTCGACCTGCAGAT
Consensus      TTCAAGCAGCTGCAGAGCTTCCAGCCGGTCGGGGACGCC.....taaggatccgtcgacctgcagat

401    410    420    430    440    450    460    470    480
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CaneCPI-1      CGTTCAACATTGGCAATAAAGTTTCTTAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCAATATAATTTCTGT
pAHCaneCPI-1A      CGTTCAACATTGGCAATAAAGTTTCTTAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCA-TATAATTTCTGT
pAHCaneCPI-1C      cgttcaaacatt.ggcaataaagtttcttaagattgaatcctgttgccggctctgcatgattatca.tataatttctgt
Consensus      cgttcaaacatt.ggcaataaagtttcttaagattgaatcctgttgccggctctgcatgattatca.tataatttctgt

481    490    500    510    520    530    540    550    560
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CaneCPI-1      TGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACTGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCG
pAHCaneCPI-1A      TGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACTGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCG
pAHCaneCPI-1C      TGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACTGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCG
Consensus      tgaattacgttaagcatgt.aataatt.aactgt.aatgcatgacgtt.at.tatgagatgggtttt.tatgatta.....

561    570    580    590    600    610    620    630    640
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CaneCPI-1      CAATTATACATTTAATACGCGATAGAAACAAATATAGCGCGCAACTAGGATAAATTATCGCGCGGTTGCATCTAT
pAHCaneCPI-1A      CAATTATACATTTAATACGCGATAGAAACAAATATAGCGCGCAACTAGGATAAATTATCGCGCGGTTGCATCTAT
pAHCaneCPI-1C      .....
Consensus      .....

641    650    660    670    680    690    700    708
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CaneCPI-1      GTTACTAGATCCGATGATAGCTGTCAACATGAGARTTCGTGNTCATGGTCATAGCTGGTTTCTGNG
pAHCaneCPI-1A      GTTACTAGATCCGATGATAGCTGTCAACATGAGARTTCGTGNTCATGGTCATAGCTGGTTTCTGNG
pAHCaneCPI-1C      .....
Consensus      .....

```

Figura 12. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da ORF CaneCPI-1 e das construções pAHCaneCPI-1A e pAHCaneCPI-1C, confirmando integridade do gene da canacitastina no vetor pAHC17. Em vermelho a ORF, e em azul a seqüência do plasmídeo pAHC17.



## 4.2. OBTENÇÃO DOS CALOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Neste trabalho foram utilizados calos embriogênicos de cana-de-açúcar da variedade SP80-185.

Inicialmente, plântulas de cana-de-açúcar com aproximadamente 30cm foram utilizadas para a obtenção dos calos embriogênicos. Estes toletes foram seccionados em e os palmitos inoculados (figura 13) em meio de cultura CI-3, acrescido de antibiótico para evitar contaminações. Estes palmitos foram mantidos em sala de crescimento, por trinta dias, quando a primeira repicagem foi realizada. Os mesmo foram repicados a cada três semanas.



Figura 13. Palmito de cana-de-açúcar recém inoculado em meio de cultura contendo antibiótico.

A figura 14 mostra explantes com duas semanas em meio de cultura com antibiótico e a formação inicial dos calos.

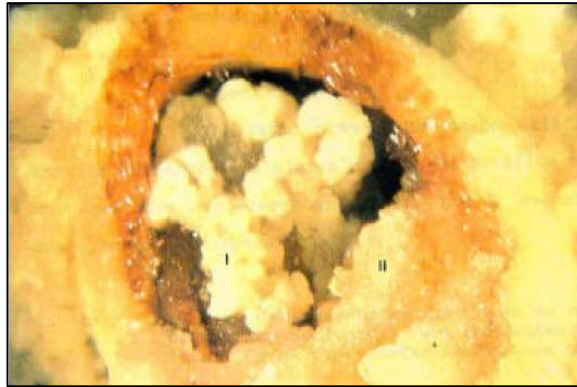


Figura 14. Calos da cana-de-açúcar apresentando formação inicial de calos embriogênicos após trinta dias.

Após quatro repicagens, foram selecionados os calos embriogênicos, com cerca de 19 semanas. Estes calos foram utilizados no bombardeamento de micropartículas de tungstênio contendo o DNA de interesse, ou seja, gene da CaneCPI-1.

### **4.3. BOMBARDEAMENTO DOS CALOS EMBRIOGÊNICOS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Para o bombardeamento dos calos embriogênicos de cana-de-açúcar foram necessários 10µg de DNA plasmidial.

Os plasmídeos foram precipitados em partículas de tungstênio, acrescidos de espermidina, cloreto de cálcio e do plasmídeo pHA9, que contém o gene de resistência ao antibiótico geneticina. Foi utilizada a técnica de co-bombardeamento, modificada, de Klein *et al.* (1988a,b).

Após o bombardeamento, os calos foram transferidos para uma placa de Petri contendo meio CI-3 sem seleção para regeneração dos calos. Após 10 dias para a regeneração, os calos foram transferidos para um novo meio de cultura CI-3 contendo o antibiótico geneticina para seleção. Estes calos foram mantidos em sala de crescimento em um fotoperíodo de 12 horas a temperatura de 24°C ±2°C para a regeneração dos calos transformantes.

A geneticina é um eficiente agente seletivo para ser usado na transformação genética de cana-de-açúcar. Em relação aos outros antibióticos, a geneticina é o antibiótico ideal para monocotiledôneas, pois não interfere na regeneração, sendo eficaz como agente seletivo nos estágios iniciais (NEHRA, et al., 1994).

A figura 15 mostra os calos de cana-de-açúcar após o bombardeamento.



Figura 15. Calos de cana-de-açúcar bombardeados em meio de cultura contendo antibiótico e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 12h a 24°C.

Estes calos sofreram trocas regulares de meio de cultura a cada duas semanas e, após seis semanas, os calos foram transferidos para meio de cultura de regeneração. Os calos foram mantidos neste meio de cultura por trinta dias em sala de crescimento em um foto período de 12 horas a temperatura de 24°C  $\pm$ 2°C.

A figura 16 mostra os calos em fase de regeneração em placa de Petri.



Figura 16. Calos de cana-de-açúcar regenerados em meio de seleção com hormônio indutor de crescimento

Os calos embriogênicos de cana-de-açúcar mostraram ser muito eficientes como tecidos alvos para a transformação genética da cana-de-açúcar, facilitando a seleção dos calos transformados através do antibiótico geneticina e apresentando uma boa frequência de regeneração, estando de acordo com Birch *et al.*, 1995.

Regeneraram calos provenientes das doze placas de Petri bombardeadas inicialmente, sendo seis placas bombardeadas para cada vetor de expressão. Para se ter um controle dos eventos de transformação, os calos regenerados foram nomeados de acordo com a placa de origem para identificação dos eventos de bombardeamento e mantidos separadamente. Neste trabalho foi utilizada uma nomenclatura simplificada para descrever as plantas regeneradas, porém, o controle interno dos eventos foi mantido. Assim, é possível saber exatamente qual o evento em que a planta transformada pertence.

Os calos embriogênicos resistentes ao antibiótico geneticina originaram plantas possivelmente transformadas. Estas plantas foram selecionadas através do antibiótico contido no meio de cultura e colocadas em tubetes com o mesmo meio de cultura e com o mesmo antibiótico. Observa-se que as plantas regeneradas dos calos bombardeados possivelmente são as plantas transformadas com o gene da CaneCPI-1 e o plasmídeo pHA9 que contém o gene de resistência à geneticina.

As plantas regeneradas em tubetes de vidros podem ser observadas na figura 17.



Figura 17. Plantas regeneradas de cana-de-açúcar da variedade SP80-185 em tubetes de vidro.

Estas plantas permaneceram no meio de cultura com agente seletivo e após três meses, foram obtidas as primeiras plantas com raiz. Estas plantas enraizadas possibilitaram a coleta de pequenos pedaços de folhas para a extração de DNA e análise

da integração do gene da CaneCPI-1 no genoma da planta. Na figura 18 pode-se observar as plantas regeneradas em tubetes contendo meio de cultura seletivo.

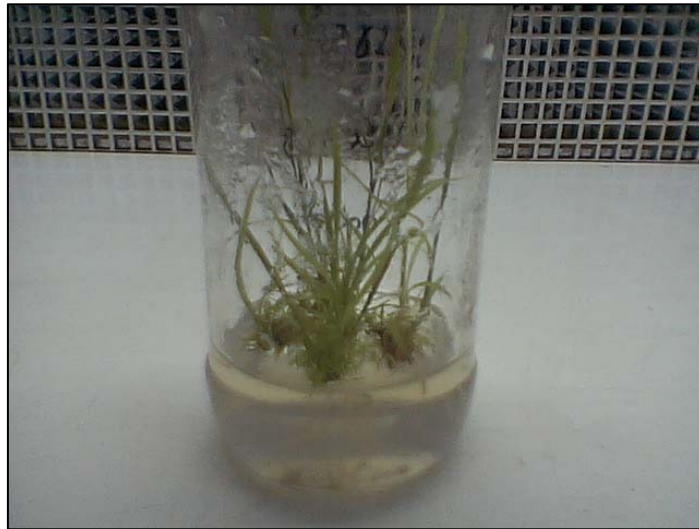


Figura 18. Plantas que sofreram seleção com antibiótico, enraizada em meio de cultura contendo indutor de crescimento.

Plantas não transformadas, que não sofreram bombardeamento, foram utilizadas como controle. Essas plantas passaram pelos mesmos processos de regeneração que as plantas transformadas e possuem a mesma idade.

#### 4.4. SELEÇÃO DAS PLANTAS TRANSFORMADAS

As plantas que regeneraram e cresceram no meio de seleção contendo o antibiótico geneticina foram consideradas transformadas. Porém, esta análise visual não é suficiente para confirmar que estas plantas foram transformadas com o gene da CaneCPI-1. Após o bombardeamento, o DNA de interesse introduzido via micropartículas poderá estar integrado ao genoma das plantas ou não. Após inúmeras divisões celulares, a permanência do agente marcador de seleção caracterizará um elemento de transformação positiva. Caso contrário, o tecido que foi submetido ao processo de bombardeamento ao passar pelo processo de seleção química, por exemplo, resistência a antibióticos, não será viável, vindo a perecer no processo de multiplicação. Entretanto, a simples passagem pelo processo de seleção não é indicador de transgenicidade, termo que se refere à célula que teve o DNA exógeno integrado ao genoma.

Para confirmação da integração do gene da CaneCPI-1 no genoma das plantas transformadas é necessário utilizar técnicas de biologia molecular, como a reação de amplificação por PCR e/ou Southern Blotting.

Foram construídos dois vetores de expressão contendo o gene da CaneCPI-1, em que um deles continha a proteína na sua forma original (pAHCaneCPI-1A) e o outro com o gene da CaneCPI-1 fusionado a uma seqüência de seis histidinas (pAHCaneCPI-1C). Para análise da presença destes vetores nas plantas, foram extraídos os DNAs genômicos das plantas transformadas e não-transformadas para posterior análise por PCR. Entre as plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1A, um total de vinte e cinco plantas regeneraram em meio de seleção com antibiótico e foram selecionadas



para análise de PCR. Destas 25, vinte e três amplificaram um fragmento de tamanho esperado de 520pb (figura 19).

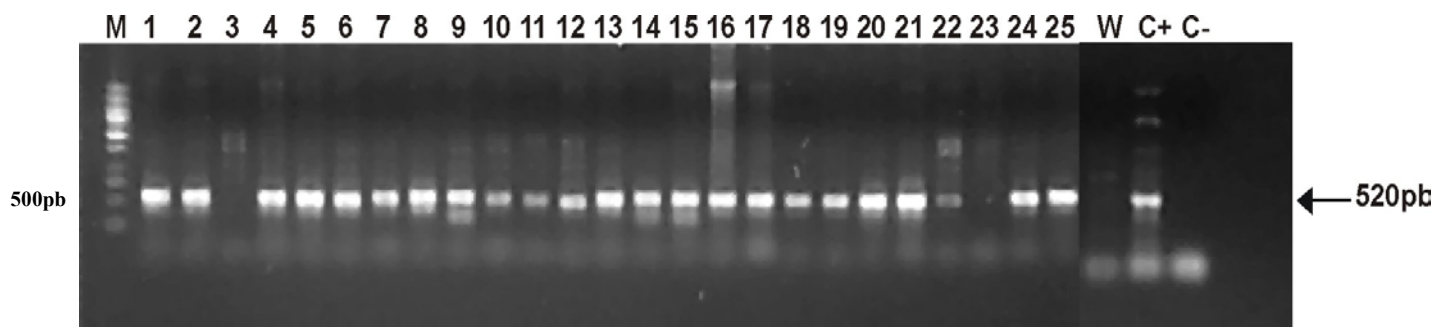


Figura 19. Análise da presença da CaneCPI-1 dirigida pelo promotor *Ubi-1* nos possíveis transformantes. Gel de agarose 1% mostrando produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar transformada com a construção pAHCaneCPI-1A. M: Ladder 1kb; coluna 1 a 25: plantas selecionadas; W: planta não-transformada; C+: controle positivo (pAHCaneCPI-1A); C-: controle negativo.

O fragmento amplificado a partir do DNA das plantas teve um tamanho aproximado de 520pb, sendo 200pb correspondentes ao promotor da ubiquitina do milho (*Ubi1*) e 320pb correspondentes ao gene da CaneCPI-1. Plantas não transformadas foram utilizadas como controle e nas reações não apresentaram banda de amplificação.

As plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1C também foram regeneradas e selecionadas para análise de PCR. Entre as plantas transformadas com este vetor, um total de dezesseis plantas regeneraram em meio de seleção com antibiótico. Destas dezesseis, quinze amplificaram um fragmento de tamanho esperado de 520pb (figura 20). Plantas não transformadas foram utilizadas como controle e não apresentaram banda de amplificação.

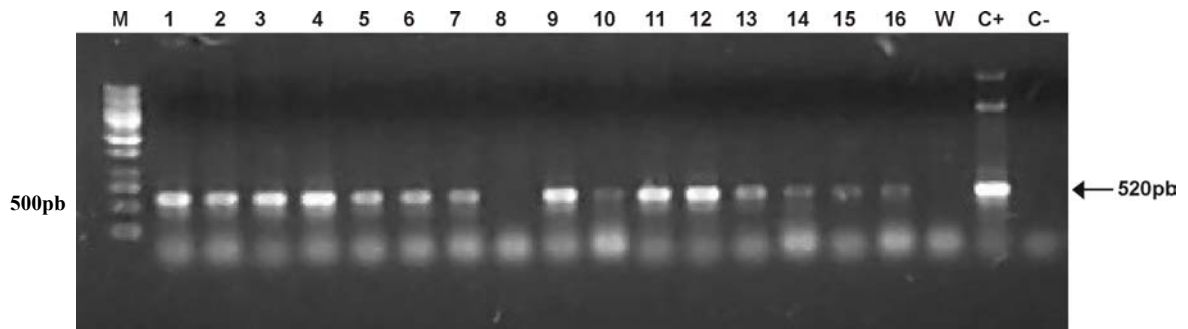


Figure 20. Análise da presença da CaneCPI-1 dirigida pelo promotor *Ubi-1* nos possíveis transformantes. Gel de agarose 1% mostrando produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar transformadas, construção pAHCaneCPI-1C. M: Ladder 1kb; coluna 1 a 16: plantas selecionadas; W: planta não-transformada; C+: controle positivo (pAHCaneCPI-1C); C-: controle negativo.

Após seleção das plantas transformadas e confirmação da integração do vetor contendo o gene da CaneCPI-1 sob controle do promotor da ubiquitina do milho no genoma das plantas, as canas-de-açúcar que apresentaram um produto de amplificação de 520pb foram selecionadas e transferidas para vasos em casa de vegetação, durante um período de três meses para o desenvolvimento e crescimento das plantas. Após este período, as plantas que melhor se desenvolveram foram selecionadas para análise de expressão gênica. Para a análise de expressão é necessário que as canas já estejam mais desenvolvidas para possibilitar a coleta de folhas dessas plantas.

A figura 21 mostra as canas-de-açúcar transgênicas que foram analisadas por PCR e selecionadas para crescerem em casa de vegetação.

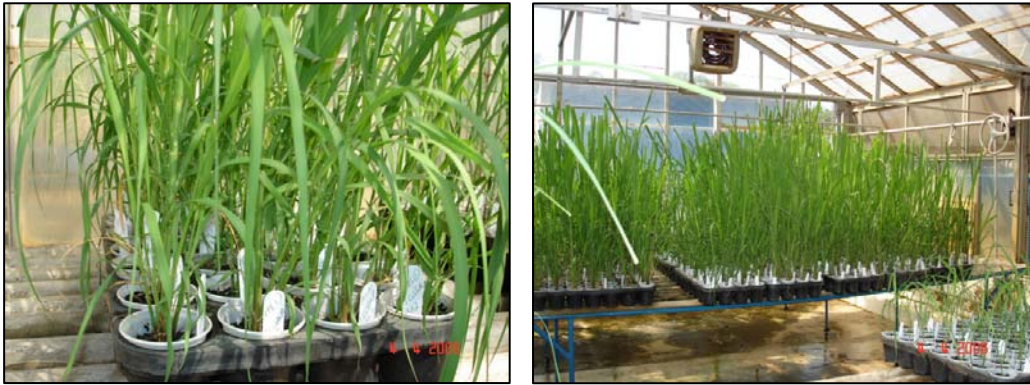


Figura 21. Canas-de-açúcar transformadas com o gene da CaneCPI-1. Plantas que foram regeneradas, selecionadas, analisadas por PCR e transferidas para casa de vegetação, com aproximadamente 6 meses de idade.

#### **4.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA CANECPI-1 NAS PLANTAS TRANSGÊNICAS**

As plantas selecionadas e crescidas em casa de vegetação foram submetidas à análise da expressão gênica da CaneCPI-1 e do controle endógeno poliubiquitina.

A análise foi realizada através da obtenção de transcritos para a CaneCPI-1 e poliubiquitina por RT-PCR e quando amplificados apresentaram um produto de amplificação de tamanho esperado para estes genes. Através da técnica de PCR Semi-quantitativo, foi possível a análise da expressão da CaneCPI-1 nas canas-de-açúcar transgênicas. A análise foi realizada nas plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1A, nas plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1C e nas

plantas não- transformadas, possibilitando detectar uma expressão diferencial entre estas plantas.

Para esta análise de PCR Semi-quantitativo foram realizadas amplificações utilizando o cDNA como molde e os oligonucleotídeos específicos para o gene da CaneCPI-1 nas duas construções. Para o controle endógeno foi utilizado o mesmo cDNA sintetizado para amplificação da CaneCPI-1 como molde para a amplificação da poliubiquitina. Para a amplificação da poliubiquitina foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para este gene. O resultado da amplificação da poliubiquitina mostrou que a expressão deste gene foi similar entre as plantas transformadas (T) e não-transformadas (NT), apresentando níveis de transcritos similares nos tecidos de folhas. O gene da Poliubiquitina mostrou ser um bom controle endógeno para análises de PCR Semi-quantitativo, estando de acordo com os resultados obtidos por PAPINI-TERZI, *et al.* (2005).

Nas plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1A observou-se que o gene da CaneCPI-1 apresentou uma maior expressão nestas plantas quando comparadas com a planta não transformada, mostrando que o gene da CaneCPI-1 deve estar sendo mais expresso nas plantas transformadas.

A figura 22 mostra o resultado do PCR Semi-quantitativo realizado com as plantas transformadas com a construção pAHCaneCPI-1A. As plantas que apresentaram maior nível de expressão foram as plantas 2, 5, 8, 15 e 21.

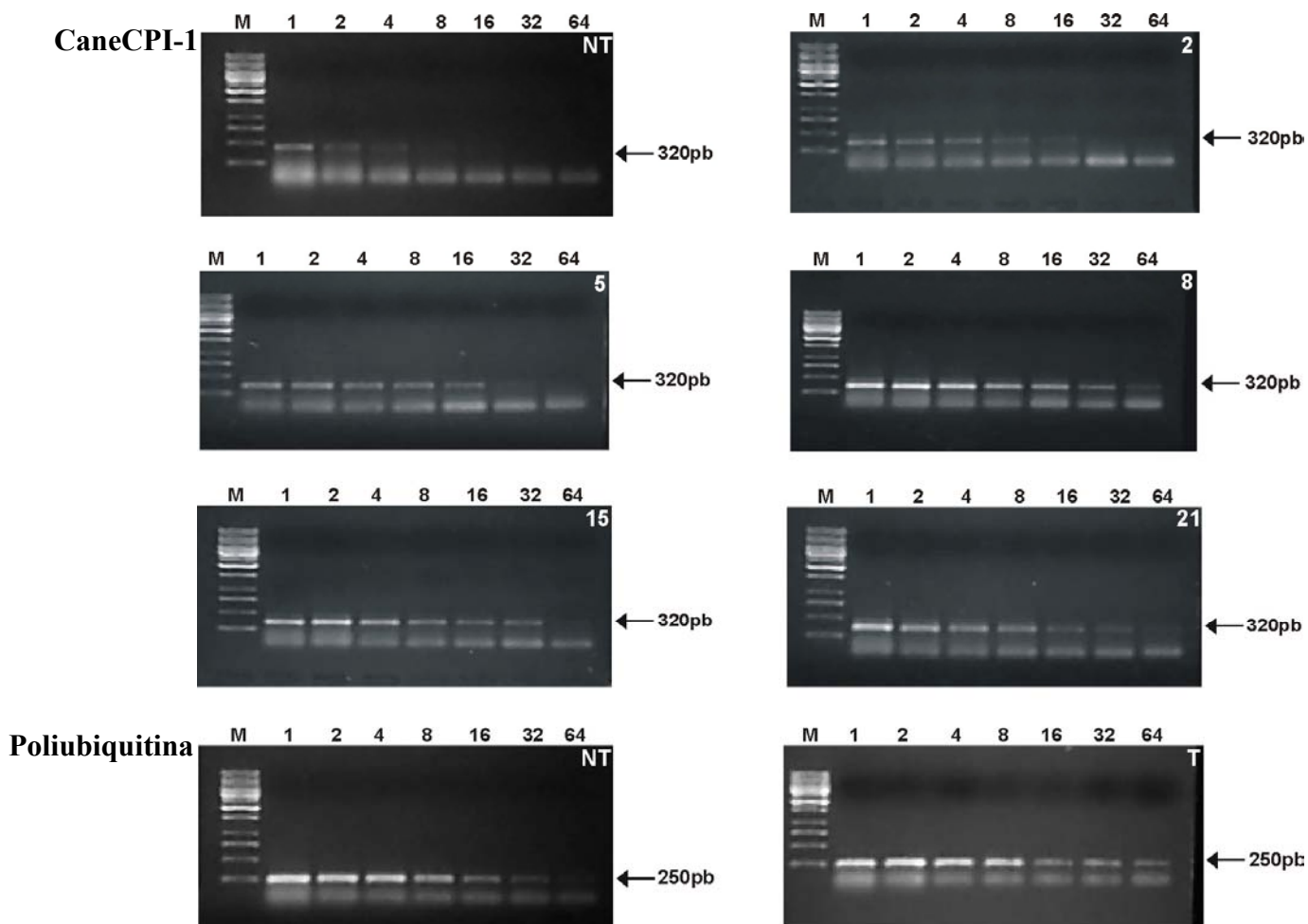


Figura 22. Análise por PCR Semi-quantitativo das plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1A. Fotografias de géis de agarose 1% mostrando produtos de amplificação por PCR a partir de amostras de RNA de folhas de canas-de-açúcar de plantas não transformadas e plantas transformadas com a construção pAHCaneCPI-1A. CaneCPI-1: amplificação utilizando oligonucleotídeos específicos para CaneCPI-1 gerando um fragmento de 320pb: NT (planta não transformada), T (plantas transformadas - 2, 5, 8, 15 e 21). Poliubiquitina: amplificação utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene da poliubiquitina gerando um fragmento de 250pb: NT (planta não transformada), T (planta transformada). M: Ladder 1kb; diluições de RT-PCR (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64).

Nas plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1C, que possui uma cauda de histidinas no C-terminal, observou-se que o gene da CaneCPI-1 também apresentou uma maior expressão nestas plantas em relação à planta não transformada, novamente mostrando que o gene da CaneCPI-1 deve estar superexpresso nas plantas transformadas com este vetor.

A figura 23 mostra o resultado do PCR Semi-quantitativo realizado com as plantas transformadas com a construção pAHCaneCPI-1C. As plantas que apresentaram maior nível de expressão foram as plantas 1, 4, 9 e 12.

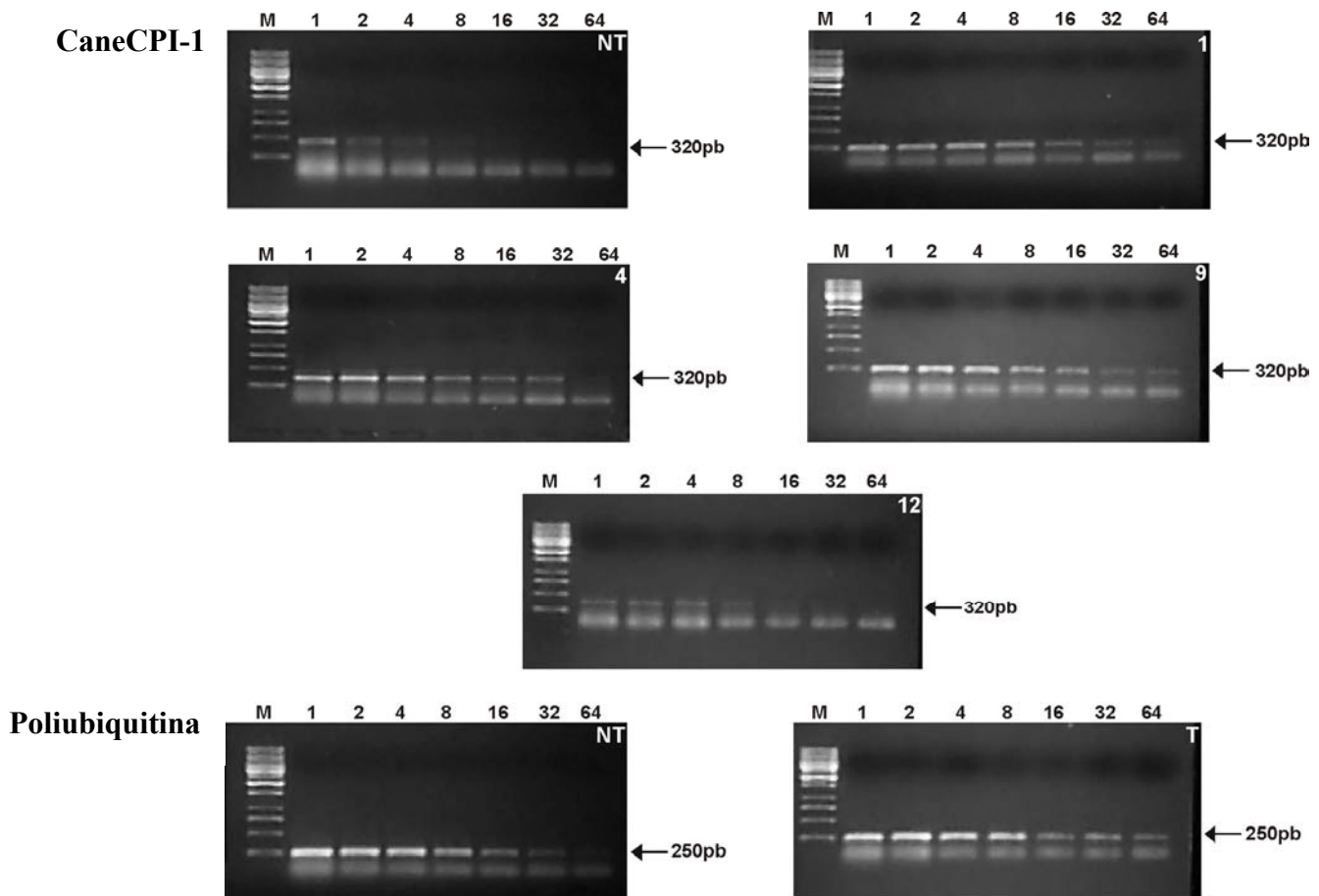


Figura 23. Análise por PCR Semi-quantitativo das plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1C. Fotografia de géis de agarose 1% mostrando produtos da amplificação por PCR a partir de amostras de RNA de folhas de canas-de-açúcar de plantas não-transformadas e plantas transformadas com a construção pAHCaneCPI-1C. CaneCPI-1: amplificação utilizando oligonucleotídeos específicos para CaneCPI-1 gerando um fragmento de 320pb: NT (planta não transformada), T(plantas transformadas - 1, 4, 9, 12); Poliubiquitina: amplificação utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene da ubiquitina gerando um fragmento de 250pb: NT (planta não-transformada), T(planta transformada). M: Ladder 1kb; diluições de RT-PCR (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64).

De acordo com as reações de amplificação realizadas com as diluições dos cDNAs (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64) foi possível detectar maior expressão da CaneCPI-1 nas plantas transformadas com as construções pAHCaneCPI-1A e pAHCaneCPI-1C quando comparadas as plantas não transformadas (controle negativo) que apresentaram menor expressão nas mesmas diluições. Assim, observa-se que a CaneCPI-1 possui um maior grau de expressão nas plantas transgênicas em relação à planta selvagem que possui uma baixa expressão da CaneCPI-1 endógena. Além disso, nota-se que a poliubiquitina teve expressão similar entre as plantas transformadas e não-transformadas, comprovando que o bombardeamento do gene da CaneCPI-1 não afetou os genes endógenos da planta. Este fato também pode ser observado visualmente, pois as plantas transformadas não apresentam nenhuma modificação morfológica, pelo menos até o presente momento, quando possuem 15 meses.

As plantas transformadas e analisadas pelo PCR Semi-quantitativo apresentando maior expressão foram selecionadas para a realização dos experimentos de imunodeteção da proteína CaneCPI-1 em seus tecidos.

Entre as plantas transformadas com a construção pAHCaneCPI-1A, os clones selecionados para realização de experimentos com imunodeteção foram 2, 5, 8, 15 e 21. Entre as plantas transformadas com a construção pAHCaneCPI-1C, os clones selecionados para os experimentos de imunodeteção foram 1, 4, 9 e 12. A maioria destas plantas são provenientes de eventos de bombardeamentos diferentes.

#### **4.6. ANÁLISE DE WESTERN BLOTTING DA CaneCPI-1 NAS PLANTAS TRANSGÊNICAS**

As plantas transformadas que foram selecionadas pelo método de PCR Semi-quantitativo foram utilizadas para análise de imunodeteccção da proteína CaneCPI-1 nos tecidos destas plantas e das plantas não-transformadas. Foram realizados testes de imunodeteccção utilizando folhas e raízes das canas-de-açúcar.

Folhas e raízes das plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1A (plantas 2, 5, 8, 15 e 21) e das transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1C (plantas 1, 4, 9 e 12) e também folhas e raízes de plantas não-transformadas foram coletadas e utilizadas para a extração de proteínas.

Utilizando o anticorpo policlonal gerado contra a proteína CaneCPI-1, foi possível a deteccção da proteína recombinante e da proteína endógena e recombinante nos tecidos das folhas e raízes das plantas transformadas e não-transformadas. O anticorpo mostrou-se eficiente reconhecendo as bandas de proteínas de tamanho esperado de 13kDa. O anticorpo anti-CaneCPI-1 também foi específico, não reconhecendo outras bandas na membrana. A CaneCPI-1 foi uniformemente detectada nos tecidos de folhas e raízes de cana-de-açúcar.

Um SDS-PAGE 15% contendo amostras de proteínas extraídas dos tecidos das canas-de-açúcar foi realizado em paralelo ao Western blotting para mostrar que quantidades similares de proteínas foram utilizadas para a imunodeteccção da CaneCPI-1 nos tecidos das plantas transformadas e não transformadas.

A figura 24 mostra o ensaio de Western blotting realizado com as folhas das plantas que foram transformadas com a construção pAHCaneCPI-1A e a figura 25 mostra o ensaio de Western blotting realizado com as folhas das plantas que foram



transformadas com a construção pAHCaneCPI-1C. Os mesmos ensaios foram realizados com o anticorpo anti-poliubiquitina para detectar a expressão da proteína Poliubiquitina nos tecidos de folhas das plantas não transformadas e transformadas.

Figura 24 mostrando a análise de Western blotting realizada com as folhas das plantas transformadas com a construção pAHCaneCPI-1A.

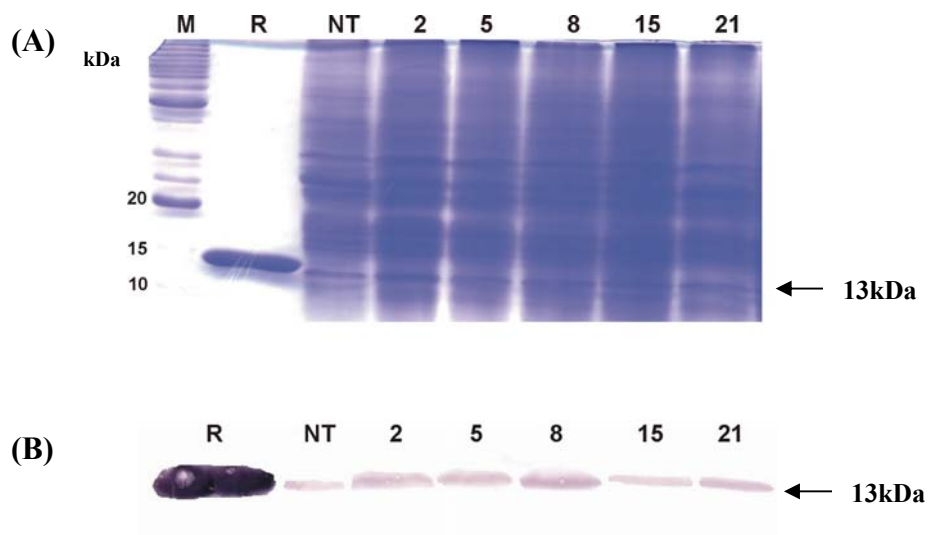


Figura 24. Imunodeteção da CaneCPI-1 em folhas de canas-de-açúcar. Western blotting do extrato bruto de folhas de canas-de-açúcar não transformadas e transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1A. (A) Aproximadamente, 60µg de proteína foram extraídas de folhas e separadas em SDS-PAGE 15%, mostrando que foram utilizadas quantidades similares de proteínas na imunodeteção, (B) Proteínas transferidas para membrana de PVDF incubadas com anticorpos policlonais anti-CaneCPI-1. M: marcador de peso molecular; R: Proteína CaneCPI-1 recombinante, expressa em *E.coli* e purificada; NT: extrato bruto de plantas não transformadas; 2: extrato bruto da planta transformada 2; 5: extrato bruto da planta transformada 5; 8: extrato bruto da planta transformada 8; 15: extrato bruto da planta transformada 15 e 21: extrato bruto da planta transformada 21.

A figura 25 mostra a análise de Western blotting realizada com as folhas das plantas transformadas com a construção pAHCaneCPI-1C.

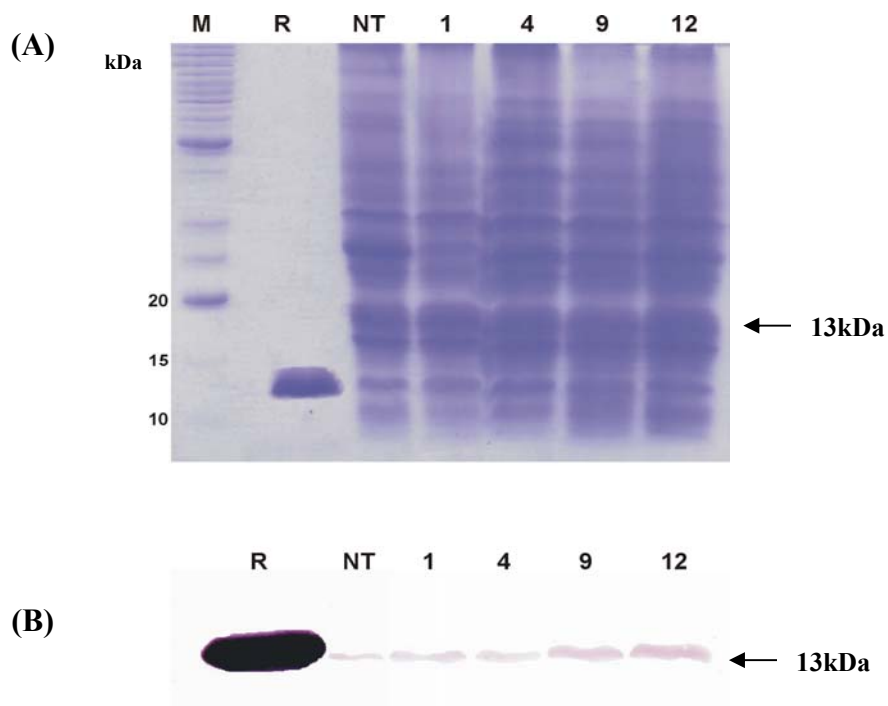


Figura 25. Imunodeteção da CaneCPI-1 em folhas de canas-de-açúcar. Western blotting do extrato bruto de folhas de canas-de-açúcar não transformadas e transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1C. (A) Aproximadamente, 60µg de proteína foram extraídas de folhas e separadas em SDS-PAGE 15%, mostrando que foram utilizadas quantidades similares de proteínas na imunodeteção, (B) Proteínas transferidas para membrana de PVDF incubadas com anticorpos policlonais anti-CaneCPI-1. M: marcador de peso molecular; R: Proteína CaneCPI-1 recombinante, expressa em *E.coli* e purificada; NT: extrato bruto de plantas não-transformadas; 1: extrato bruto da planta transformada 1; 4: extrato bruto da planta transformada 4; 9: extrato bruto da planta transformada 9 e 12: extrato bruto da planta transformada 12.

A figura 26 mostra a análise de Western blotting realizada com as raízes das plantas transformadas com a construção pAHCaneCPI-1C.

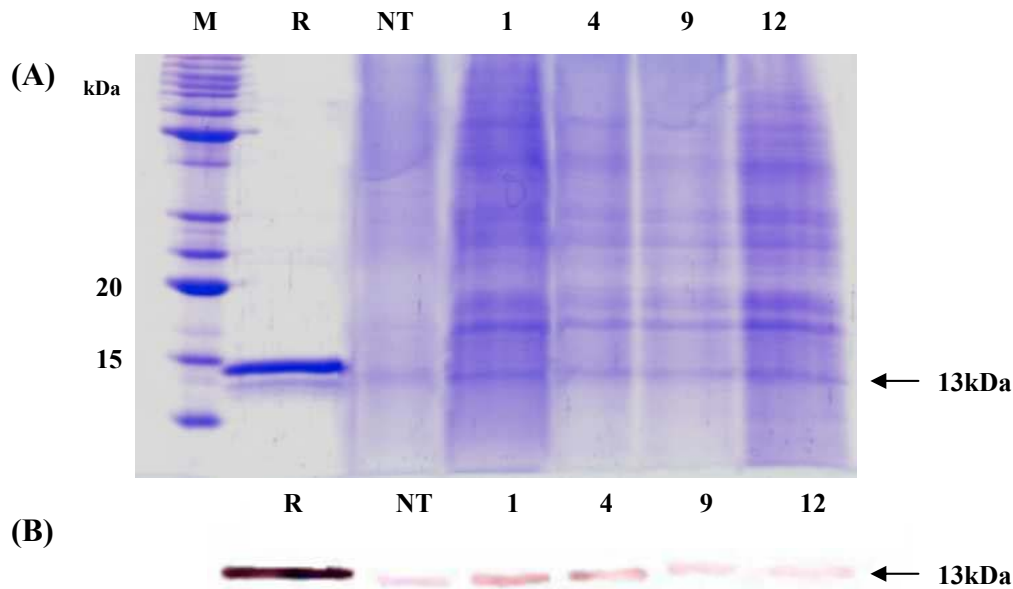


Figura 26. Imunodeteccção da CaneCPI-1 em raízes de canas-de-açúcar. Western blotting do extrato bruto de raízes de canas-de-açúcar não transformadas e transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1C. (A) Aproximadamente, 60µg de proteína foram extraídas de raízes e separadas em SDS-PAGE 15%, mostrando que foram utilizadas quantidades similares de proteínas na imunodeteccção, (B) Proteínas transferidas para membrana de PVDF incubadas com anticorpos policlonais anti-CaneCPI-1. M: marcador de peso molecular; R: Proteína CaneCPI-1 recombinante, expressa em *E.coli* e purificada; NT: extrato bruto de plantas não-transformadas; 1: extrato bruto da planta transformada 1; 4: extrato bruto da planta transformada 4; 9: extrato bruto da planta transformada 9 e 12: extrato bruto da planta transformada 12.

Embora a intensidade das bandas detectadas tenha sido menor quando comparada com a banda da proteína recombinante, os anticorpos provaram ser específicos e permitiram a verificação da expressão da CaneCPI-1 na planta transformada. Vale ressaltar que tentamos utilizar anticorpos contra a cauda de Histidinas em experimentos de Western blotting. No entanto, estes experimentos não

foram bem sucedidos. As análises com estes anticorpos poderiam mostrar a expressão apenas da proteína recombinante, excluindo o sinal da CaneCPI-1 endógena.

#### 4.6.1. Produção de anticorpos policlonais contra a proteína poliubiquitina

O produto de amplificação do gene da poliubiquitina a partir do clone pSPORTST2001 resultou em um fragmento de aproximadamente 250pb. O resultado da amplificação é mostrado na figura 27.

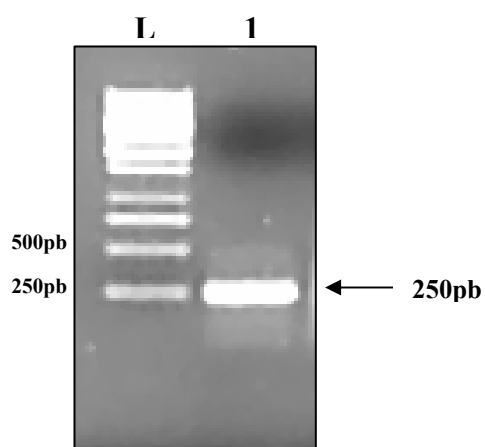


Figura 27. Amplificação do gene da poliubiquitina a partir do plasmídeo pPORTST2001. L: Ladder 1Kb; 1: fragmento amplificado com aproximadamente 250pb.

O produto da amplificação foi purificado e subclonado no plasmídeo de propagação pTZ57R/T (Fermentas). O plasmídeo recombinante foi denominado de pTZST2001. Nos oligonucleotídeos específicos para o gene da poliubiquitina foram inseridos sítios de clivagem para as enzimas *NdeI* e *BamHI*, facilitando a subclonagem.

Após a seleção das colônias recombinantes e extração do DNA plasmidial, o vetor pTZST2001 foi seqüenciado.

Posteriormente, o plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, que flanqueiam a construção, liberando um fragmento de aproximadamente 250pb, confirmando a subclonagem. A figura 28 mostra a clivagem do plasmídeo pTZST2001 com as enzimas *NdeI* e *BamHI*.

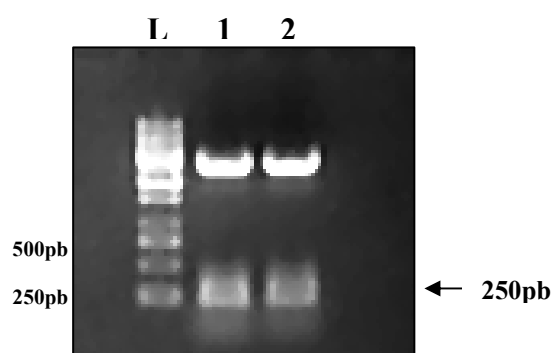


Figura 28. Clivagem do plasmídeo pTZST2001 com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. L: Ladder 1Kb; 1 e 2: plasmídeos pTZST2001 clivados, liberando um fragmento de aproximadamente 250pb.

O fragmento originado da clivagem do plasmídeo pTZST2001 foi subclonado no vetor de expressão pET28a, denominado de pETST2001. Ensaio de expressão da proteína Poliubiquitina em *E.coli* foram realizados utilizando esta construção.

Os resultados da expressão da proteína Poliubiquitina em *E.coli* foram bem sucedidos, pois foi observada uma banda de expressão com massa molecular de aproximadamente 8KDa, como esperado. A análise de expressão da Poliubiquitina pode ser observada em SDS-PAGE 15% (figura 29).

Foram realizados ensaios para analisar a solubilidade da proteína Poliubiquitina. Se a proteína estivesse solúvel, ela poderia ser purificada na sua forma nativa, porém, se a proteína estivesse insolúvel seria necessário realizar uma purificação em condições desnaturantes.

O teste de solubilidade mostrou que a proteína Poliubiquitina apresentou-se insolúvel. O teste de solubilidade foi analisado em SDS-PAGE 15%, mostrado na figura 29.

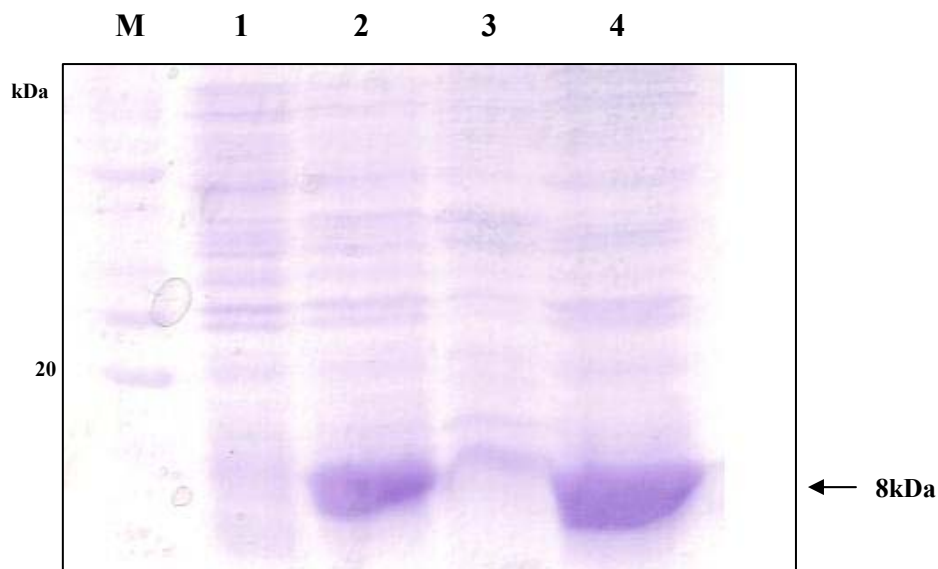


Figura 29. Análise da expressão e solubilidade da proteína Poliubiquitina. SDS-PAGE 15%. M: marcador de peso molecular; 1: pETST2001 não-induzido; 2: pETST2001 induzido; 3: fração solúvel do lisado bacteriano; 4: fração insolúvel do lisado bacteriano.

Após a verificação que a proteína Poliubiquitina encontrava-se insolúvel, decidiu-se optar pela purificação desta proteína em condições desnaturantes, onde, apesar da proteína não apresentar atividade biológica evidente, a purificação é simples e realizada em um único passo. Como agente desnaturante, foi utilizada a uréia para a purificação da proteína Poliubiquitina. A uréia é um agente desnaturante, capaz de solubilizar proteínas a partir de corpos de inclusão.

Proteínas expressas em *E. coli* normalmente formam corpos de inclusão, que são agregados protéicos insolúveis. Embora esta seja uma das barreiras para estudos estruturais (YASUKAWA *et al.*, 1995) a purificação de proteínas recombinantes a partir de corpos de inclusão é relativamente fácil.

Assim, os ensaios de purificação da proteína Poliubiquitina foram realizados em condições desnaturantes.

A purificação da proteína foi feita através de sucessivos fracionamentos considerando algumas propriedades da proteína, como solubilidade, carga iônica, massa molecular, ponto isoeletrico, propriedades de adsorção e especificidade de ligação a outras moléculas. As técnicas de purificação de proteínas utilizam colunas verticais, nas quais as amostras são colocadas nas colunas, formando duas fases, uma fixa e uma móvel. A fase fixa é composta por uma resina ligada a um elemento imóvel e a fase móvel é o solvente, cujo fluxo arrasta a maioria das moléculas (NELSON e COX, 2000).

O método de purificação escolhido para a proteína Poliubiquitina foi a cromatografia de afinidade em coluna de níquel, em condições desnaturantes. Este sistema foi eficiente para a purificação desta proteína, pois o resultado em SDS-PAGE 15% mostrou que a proteína ligou-se à resina e foi possível sua eluição na fração

coletada em 250mM de imidazol (figura 30). Observa-se na figura uma banda de aproximadamente 8kDa correspondente à proteína Poliubiquitina purificada.

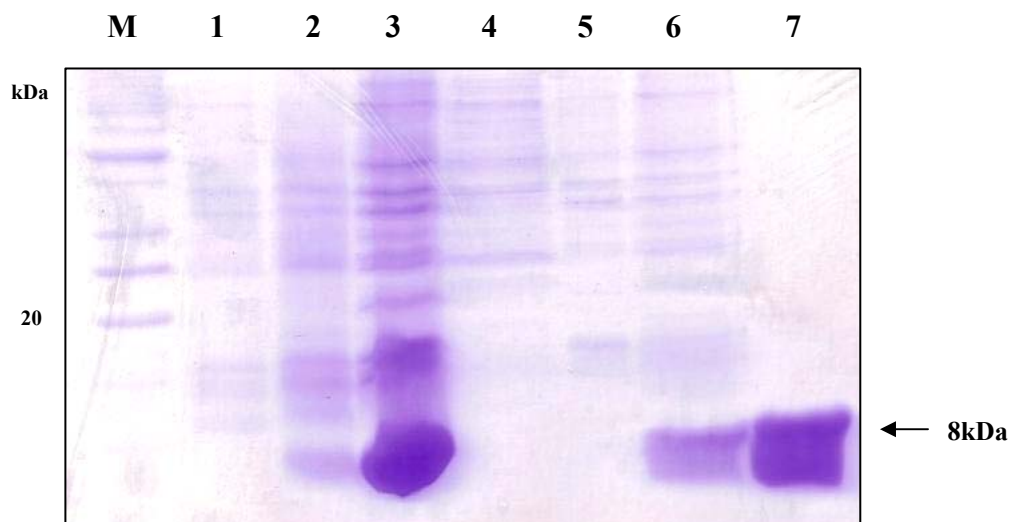


Figura 30. Análise da expressão, solubilidade e purificação da proteína Poliubiquitina em condições desnaturantes. SDS-PAGE 15%. M: marcador de peso molecular; 1: pETST2001 não-induzido; 2: pETST2001 induzido; 3: fração insolúvel do lisado bacteriano; 4: fração solúvel do lisado bacteriano; 5: fração insolúvel do lisado bacteriano após tratamento com uréia; 6: fração solúvel do lisado bacteriano após tratamento com uréia; 7: proteína Poliubiquitina purificada.

Após a purificação, foram realizadas quatro diálises com a proteína Poliubiquitina para a retirada do imidazol e da uréia, possibilitando a renaturação da proteína.

O rendimento da purificação da Poliubiquitina foi em torno de 2mg de proteína por litro de cultura. Os resultados da purificação da Poliubiquitina obtidos foram satisfatórios, pois foi possível purificar a proteína em quantidade suficiente para a produção de anticorpos policlonais contra esta proteína.



Após a produção do anticorpo anti-poliubiquitina, foi realizado um teste para verificar se o anticorpo estava ativo e se era específico à proteína Poliubiquitina. Para este teste foram utilizados o vetor pET28a sem inserto, o plasmídeo pETST2001 e a proteína recombinante purificada. Os vetores pET28a e pETST2001 foram transformados em células de *E. coli* Rosetta (DE3) e foram induzidos com 0.4mM de IPTG durante 4 horas com 200rpm de rotação a 37°C. O vetor pET28a sem inserto foi utilizado para comprovar que o anticorpo não reconhece nenhuma proteína endógena da bactéria.

Quantidades iguais das culturas induzidas e não induzidas dos plasmídeos pET28a e pETST2001 e 0.3µg da proteína Poliubiquitina pura foram separadas em SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas de PVDF Invitrolon™ (Invitrogen). A membrana foi incubada com anticorpo específico anti-poliubiquitina e o anticorpo mostrou ser capaz de detectar a proteína Poliubiquitina de peso molecular aproximado de 8kDa.

O anticorpo demonstrou ser específico, porém como a proteína Poliubiquitina é uma proteína formada por várias moléculas de ubiquitina, o anticorpo reconheceu outras bandas correspondentes a poliubiquitinas no extrato da bactéria. A figura 31 mostra o resultado da análise de Western blotting realizado com o anticorpo policlonal anti-poliubiquitina.

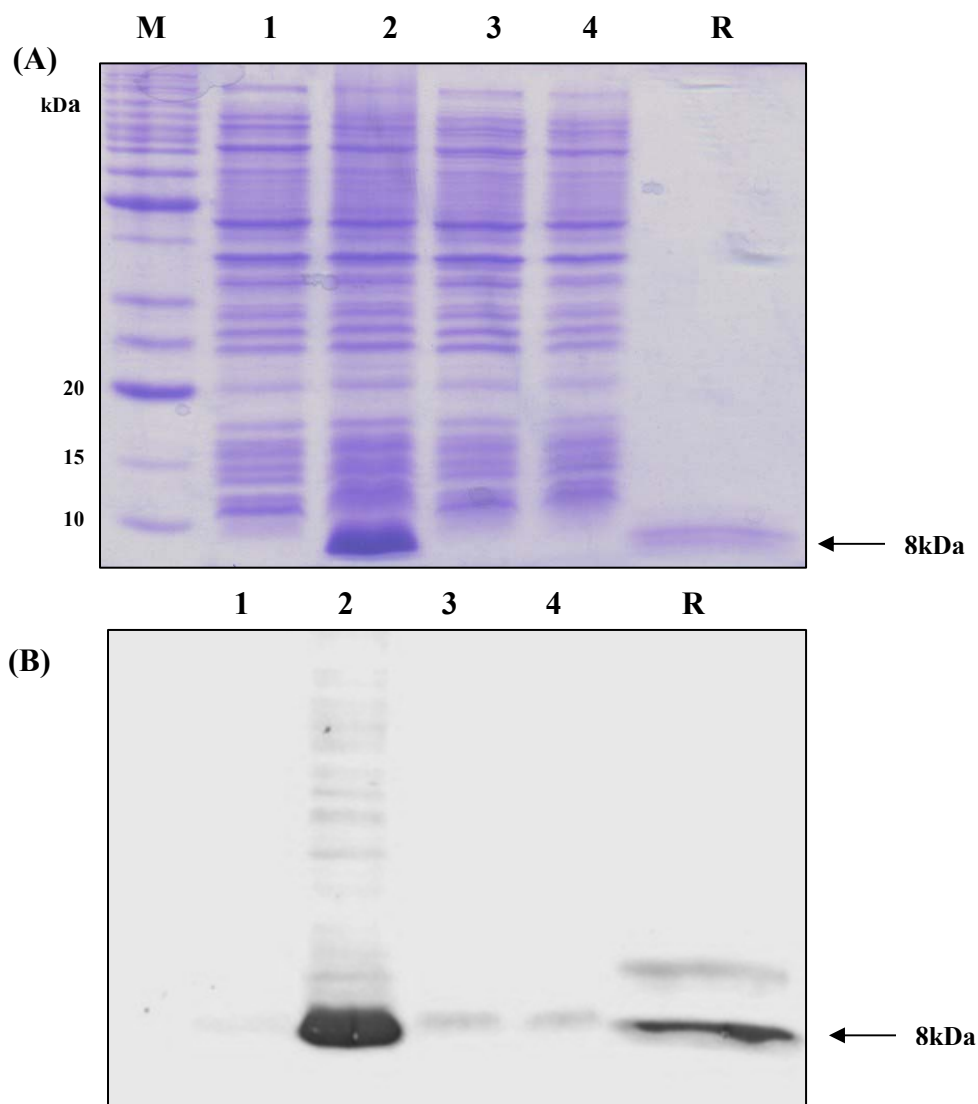


Figura 31. Imunodeteccção teste da Poliubiquitina expressa em *E. coli*. A figura mostra a imunodeteccção da Poliubiquitina utilizando o anticorpo policlonal anti-poliubiquitina. (A) Quantidades iguais das frações induzidas e não induzidas dos plasmídeos e 0.3 $\mu$ g da proteína ST2001 purificada foram separadas em SDS-PAGE 15%. (B) Proteínas transferidas para membrana de PVDF incubadas com anticorpo policlonal anti-poliubiquitina. M: marcador de peso molecular; 1: pETST2001 não induzido; 2: pETST2001 induzido; 3: pET28a não induzido; 4: pET28a induzido; R: proteína ST2001 recombinante purificada.

Após verificar que o anticorpo era específico para a proteína Poliubiquitina, foram realizadas análises de Western blotting para detectar a expressão da Poliubiquitina nos extratos brutos das folhas das canas-de-açúcar transgênicas.

O anticorpo anti-poliubiquitina mostrou ser específico contra esta proteína, reconhecendo as bandas de peso molecular esperado de aproximadamente 8kDa. Porém, como a Poliubiquitina é uma proteína formada de várias moléculas de ubiquitina, ela é capaz de formar polímeros de diferentes tamanhos e moléculas de ubiquitina, com pesos moleculares diferentes. Assim, o anticorpo além de reconhecer a Poliubiquitina de tamanho esperado, também reconheceu bandas na membrana referentes a estes diferentes polímeros de Poliubiquitina. Pode-se concluir que neste experimento de Western blotting, não foi possível utilizar a proteína Poliubiquitina como controle endógeno, pois a proteína não foi detectada em uma banda única e definida. Desta forma, utilizamos apenas a análise por PCR Semi-quantitativo para comparação entre a expressão gênica da CaneCPI-1 e Poliubiquitina nas diferentes plantas transformadas e não-transformadas.

A figura 32 mostra o ensaio de Western blotting realizado com plantas que foram transformadas com a construção pAHCaneCPI-1A, utilizando o anticorpo anti-poliubiquitina.

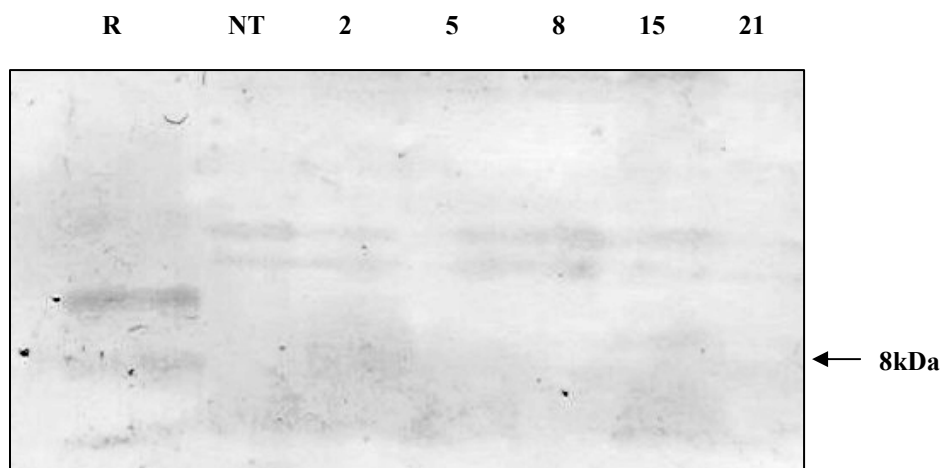


Figura 32. Imunodeteção da Poliubiquitina em folhas de canas-de-açúcar. Western blotting do extrato bruto de folhas de canas-de-açúcar não transformadas e transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1A. Proteínas transferidas para membrana de PVDF incubadas com anticorpos policlonais anti-poliubiquitina. R: Proteína Poliubiquitina recombinante, expressa em *E.coli* e purificada; NT: extrato bruto de planta não transformada; 2: extrato bruto da planta transformada 2; 5: extrato bruto da planta transformada 5; 8: extrato bruto da planta transformada 8; 15: extrato bruto da planta transformada 15 e 21: extrato bruto da planta transformada 21.

A figura 33 mostra o ensaio de Western blotting realizado com plantas que foram transformadas com a construção pAHCaneCPI-1C, utilizando o anticorpo anti-poliubiquitina

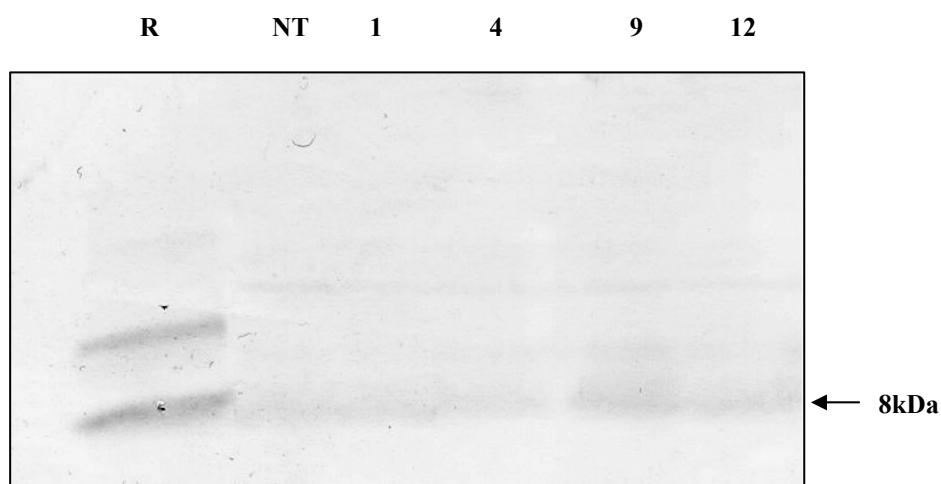


Figura 33. Imunodeteção da Poliubiquitina em folhas de canas-de-açúcar. Western blotting do extrato bruto de folhas de canas-de-açúcar não transformadas e transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1C. Proteínas transferidas para membrana de PVDF incubadas com anticorpos policlonais anti-poliubiquitina. R: Proteína Poliubiquitina recombinante, expressa em *E.coli* e purificada; NT: extrato bruto de planta não-transformada; 1: extrato bruto da planta transformada 1; 4: extrato bruto da planta transformada 4; 9: extrato bruto da planta transformada 9 e 12: extrato bruto da planta transformada 12.

## **4.7. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CaneCPI-1 A PARTIR DA CANA-DE-AÇÚCAR TRANSFORMADA**

Após a análise por Western blotting das plantas transgênicas foi selecionada uma planta transformada com o vetor pAHCaneCPI-1C para extração e purificação da proteína CaneCPI-1 fusionada a uma His-Tag (*HIS*CaneCPI-1). A planta utilizada para a extração da proteína recombinante foi a planta 9, que apresentou maior expressão da CaneCPI-1. Esta expressão é resultado da expressão endógena adicionada da expressão do gene controlado pelo promotor da ubiquitina.

### **4.7.1. Extração e Purificação da *HIS*CaneCPI-1 purificada a partir da planta**

Folhas de canas-de-açúcar não-transformada e transformada foram coletadas, maceradas e ressuspensas em tampão, como descrito em métodos. O extrato bruto da planta transformada foi precipitado com acetona e o precipitado contendo todas as proteínas solúveis da planta transformada foi ressuspendido em tampão e purificado. O método de purificação utilizado foi uma cromatografia de afinidade em coluna de níquel, já que a construção pAHCaneCPI-1C contém o gene da CaneCPI-1 fusionado a uma cauda de histidinas (6XHIS) que possui alta afinidade pelo níquel.

Ao passar pela coluna, a proteína recombinante ligada a histidina foi fixada aos íons de níquel e as outras proteínas presentes no extrato bruto foram eluídas. Este método de purificação foi eficiente, permitindo a eluição da proteína *HIS*CaneCPI-1 na fração de 250mM de imidazol. O resultado do SDS-PAGE 15% revelou a presença de uma banda de tamanho esperado para a proteína *HIS*CaneCPI-1 de 13 kDa (figura 34).

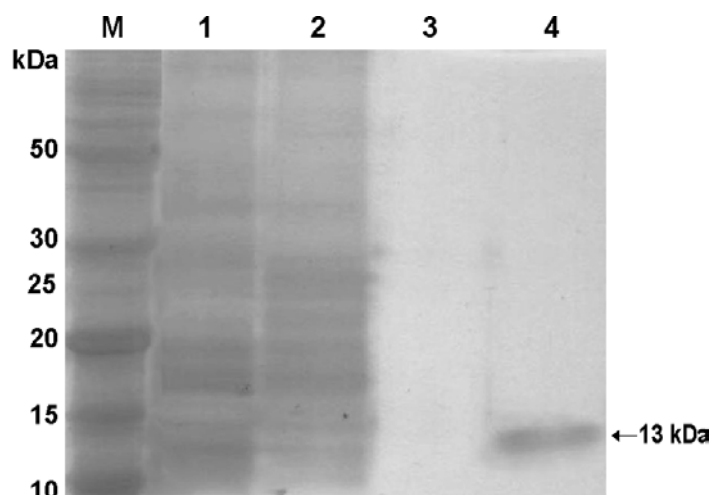


Figura 34: Análise da purificação da *HIS*CaneCPI-1 produzida em cana-de-açúcar transgênica. SDS-PAGE 15% corado com prata. M: marcador de peso molecular; 1: extrato bruto de folhas de cana-de-açúcar transformada; 2: extrato bruto de folhas de cana-de-açúcar não-transformada; 3: fração eluída de 100mM de imidazol; 4: fração eluída de 250mM de imidazol, apresentando uma banda de tamanho esperado para a *HIS*CaneCPI-1 de 13kDa.

É possível observar no gel, na coluna 1, a presença de uma região mais escura na altura prevista para a proteína CaneCPI-1, quando comparamos com a coluna 2, embora não se possa afirmar com certeza que se trata da proteína em questão.

A produção da proteína *HIS*CaneCPI-1 na planta transgênica apresentou um rendimento de aproximadamente 6mg de proteína purificada por kilograma de folhas de cana-de-açúcar. Isto representa um bom rendimento, com cerca de 1% do total de proteína solúvel presente nos tecidos das folhas. Acreditamos que podemos obter ainda maiores quantidades otimizando o protocolo de extração de proteínas da folha e, posteriormente, utilizando o caldo da cana transgênica. Outras plantas também utilizadas como sistema de expressão produziram proteínas recombinantes com níveis altos de acumulação de proteínas, como por exemplo, a avidina (HOOD *et al.*, 1997) e a

$\beta$ -glucuronidase (WITCHER *et al.*, 1998) que foram produzidas em concentrações de 3 e 0.7% do total de proteínas solúveis, respectivamente, em sementes de milho. A proteína lectina tem sido produzida em cana-de-açúcar transgênica com níveis de aproximadamente 1% do total de proteínas solúveis (SÉTAMOU *et al.*, 2002).

A utilização de plantas como sistema de expressão de proteínas heterólogas é uma alternativa viável e eficiente. Além de produzir proteínas a níveis consideravelmente altos, as plantas possuem outras vantagens. A primeira vantagem é o baixo custo de produção, pois este custo já está embutido no custo do plantio da cultura a ser utilizada como sistema de expressão. O custo adicional seria o custo de extração e purificação, porém esta metodologia é viável de ser implantada nas indústrias e já existem vários estudos buscando reduzir os custos de processamento das proteínas recombinantes (TWYMAN *et al.*, 2003). A segunda vantagem é que plantas possuem muitas semelhanças com os mamíferos na produção de proteínas, como o uso de códons e modificações pós-traducionais, que não são possíveis em sistemas de expressão que utilizam organismos inferiores, como bactérias e fungos (GIDDINGS, 2001).

#### **4.7.2. Análise de Western blotting da *HIS*CaneCPI-1 purificada a partir da planta**

Para análise de Western blotting foi utilizado o anticorpo policlonal anti-CaneCPI-1, produzido anteriormente em camundongo contra a proteína recombinante produzida em *E. coli*. A imunodeteção da proteína CaneCPI-1 purificada a partir da planta transgênica foi realizada para detectar a expressão e confirmar a purificação da proteína.

As análises mostraram que o anticorpo anti-CaneCPI-1 foi capaz de detectar a proteína CaneCPI-1 purificada a partir da planta com tamanho esperado de 13kDa

(figura 35). Embora a intensidade da banda detectada tenha sido baixa, o anticorpo provou ser específico, reconhecendo somente a proteína *HIS*CaneCPI-1 e também permitiu a verificação da expressão da proteína em plantas transformadas e não-transformadas, embora nestas últimas a visualização na figura 35 esteja comprometida pela perda de qualidade após aquisição da imagem por scanner.

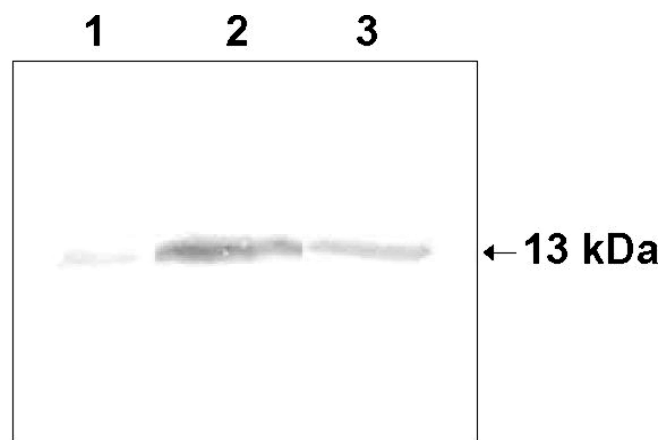


Figure 35: Imunodeteção da *HIS*CaneCPI-1 em canas-de-açúcar. Western blotting do extrato bruto de canas-de-açúcar não-transformadas e transformadas, e *HIS*CaneCPI-1 purificada da cana-de-açúcar transformada. Aproximadamente, 60 $\mu$ g de proteína extraída das folhas das plantas e 0.4 $\mu$ g de proteína *HIS*CaneCPI-1 pura foram separadas em SDS-PAGE 15%, transferidas para uma membrana de PVDF e incubada com anticorpos policlonais gerados contra a proteína CaneCPI-1 recombinante purificada. 1: extrato bruto de folhas de cana-de-açúcar não-transformada; 2: extrato bruto de folhas de cana-de-açúcar transformada; 3: proteína *HIS*CaneCPI-1 purificada de folhas de cana-de-açúcar transformada.



#### 4.7.3. Ensaio de atividade da *HIS*CaneCPI-1 purificada a partir da planta

Como já verificado em trabalhos anteriores, a proteína CaneCPI-1 é capaz de inibir a atividade da enzima catepsina L com uma constante de inibição ( $K_i$ ) de 0.6nM (OLIVA *et al.*, 2004). Este ensaio de atividade é importante para confirmar se a proteína purificada a partir das folhas da cana-de-açúcar transgênica mantém sua conformação correta e capacidade inibitória após os processos de purificação. Além disso, confirma o tipo da proteína purificada como sendo uma cistatina.

Foi verificado que a proteína recombinante *HIS*CaneCPI-1 foi capaz de inibir a atividade da enzima catepsina L na mesma ordem de grandeza que aquela produzida em *E. coli* (Figura 36). Baseando-se na atividade inibitória da *HIS*CaneCPI-1, pode-se concluir que esta proteína produzida em cana-de-açúcar transgênica está em sua conformação correta e forma ativa. Estes resultados contribuem para eleger a cana-de-açúcar como um sistema alternativo para a expressão de proteínas heterólogas visto que a proteína recombinante não sofreu nenhuma modificação aparente em sua estrutura que bloqueie sua atividade.

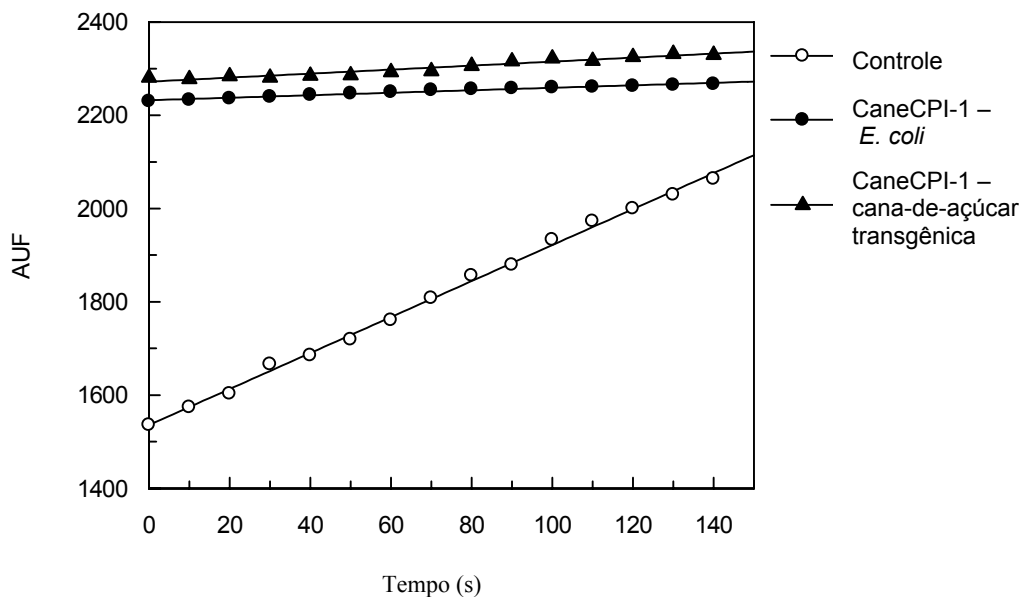


Figura 36: Gráfico de inibição da *HIS*CaneCPI-1 sobre a enzima Catepsina L. Catepsina L (0.3nM) foi ativada por incubação em 100mM de tampão acetato de sódio pH 5.5 e 1mM de DTE e sua atividade foi determinada espectrofluoréticamente, após a adição do substrato Z-Phe-Arg-MCA. A atividade inibitória da CaneCPI-1 expressa em *E. coli* e da *HIS*CaneCPI-1 purificada das folhas de uma cana-de-açúcar transgênica foi determinada medindo-se a atividade hidrolítica residual da enzima após pré-incubação com o inibidor.

Vale ressaltar que estudos com enzimas digestivas de alguns coleópteros demonstraram a presença de cisteíno-proteases catepsina L-like no intestino destes insetos (MURDOCK *et al.*, 1987; CAMPOS *et al.*, 1989). Sabendo-se que alguns insetos da ordem *Coleoptera* são pragas de cana-de-açúcar, é importante que a proteína produzida na cana-de-açúcar transgênica não perca sua capacidade inibitória sobre a catepsina L, pois uma cana-de-açúcar superexpressando a proteína *HIS*CaneCPI-1 poderá ser mais resistente ao ataque destas pragas.

O Laboratório de Biologia Molecular do DGE/UFSCar, onde este trabalho foi desenvolvido, iniciou recentemente trabalhos com o coleóptero *Sphenophorus levis*, o

qual é uma importante praga dos canaviais no estado de São Paulo. As larvas desse inseto destroem o rizoma da planta, pois estes abrigam-se no interior do rizoma e danificam os tecidos. Em consequência pode ocorrer a morte da planta e falhas nas brotações das soqueiras, causando prejuízos da ordem de 30 toneladas de cana por hectare, além de reduzir a longevidade do canavial. Ensaio iniciais utilizando proteases purificadas do intestino do inseto mostraram que elas são inibidas eficientemente pela CaneCPI-1. Desta forma, acreditamos que os resultados obtidos nesta dissertação possam contribuir para esta nova linha de pesquisa do laboratório no sentido de obter plantas mais resistentes a esta praga.

## 5. CONCLUSÕES

- Foram obtidas 38 plantas transgênicas superexpressando a proteína CaneCPI-1, entre as plantas transformadas com o vetor pAHCaneCPI-1A e com o vetor pAHCaneCPI-1C.
- A análise de expressão da proteína CaneCPI-1 nas plantas transformadas com as construções pAHCaneCPI-1A e pAHCaneCPI-1C revelou que a proteína CaneCPI-1 apresentou maior expressão nas plantas transformadas em relação às plantas que não foram transformadas, tanto nas análises de expressão gênica e nas análises de Western blotting.
- Foi possível a detecção da proteína CaneCPI-1 nos tecidos de folhas e raízes das canas-de-açúcar transformadas
- Foi possível a purificação eficiente da proteína *HIS*CaneCPI-1 a partir de folhas de uma planta transformada com a construção pAHCaneCPI-1C (selecionada por expressar a proteína CaneCPI-1 em maior quantidade).
- A proteína purificada da planta transformada foi capaz de inibir catepsina L humana, mostrando que CaneCPI-1 manteve sua forma ativa.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). **J. Biol Chem**, v. 262, p. 16793-16797, 1987.
2. ABE, M. *et al.* Two distinct species of corn cystatin in corn kernels. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 59, p. 756-758, 1995.
3. ABRAHAMSON, M. *et al.* Identification of the probable inhibitory reactive sites of the cysteine inhibitors human cystatin C and chicken cystatin. **J Biol Chem**, v. 262, p. 9688-9694, 1987.
4. ABRAHAMSON, M. Cystatins-Proteins Inhibitors of papain-like cysteine proteinases. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 45, p. 299-303, 1993.
5. APLEBAUM, S.W. Biochemistry of digestion. In: KERKUT, G.; GILBERT, L.I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 279-311.
6. ATKINSON, H.J. *et al.* Prototype demonstration of transgenic resistance to the nematode *Radopholus similis* conferred on banana by a cystatin. **Trans Res**, v. 13, p. 135-142, 2004.
7. BARRET, A.J.; KIRSCHKE, H. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L. **Methods Enzymol**, v. 80, p. 535-561, 1981.
8. BARRET, A.; FRITZ, H.; GRUB, A. Nomenclature and classification of the homologous with the cysteine proteinases inhibitor chicken cystatin. **Biochem J**, v. 236, p. 3-12, 1987.
9. BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D.; WOESSNER, J.F. **Handbook of proteolytic enzymes**. London: Academic Press, 2004.

10. BEYNON, R.J.; BOND, J.S. **Proteolitic enzymes: a practical approach**. Oxford England, 1989. p.87-89.
11. BIRCH, R.G. *et al.* **Expression of foreign genes in sugarcane**. In. CONGRESSO OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 1995, Cali: Tecnicaná. v.2, p.369-373.
12. BIRCH, R.G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 48, p. 297-326, 1997.
13. BLUNDELL, T.L. Metalloproteinase superfamilies and drug desing. **Nature Struct Biol**, v. 1, p. 73-75, 1994.
14. BODE, W. *et al.* The 2.0 A X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. **EMBO J**, v. 7, p. 2593-2599, 1988.
15. BOUCHARD, E.; CLOUTIER, C.; MICHAUD, D. Oryzacystatin I expressed in transgenic potato induces digestive compensation in an insect natural predator via its herbivorous prey feeding on the plant. **Mol Ecology**, v. 12, p. 2439-2446, 2003.
16. BOWER, R.; BIRCH, R. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **Plant J**, v. 2, p. 409-416, 1992.
17. 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.
18. BRASILEIRO, A.C.M. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 309 p.

19. BRODWAY, R.M.; DUFFEY, S.S. Plant proteinase inhibitor: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **J Insect Physiol**, v. 32, p. 827-833, 1986.
20. CAMPOS, F.A. *et al.* Resolution and partial characterization of proteinases and alpha-amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. **Comp Biochem Physiol**, v. 92B, p. 51-57, 1989.
21. CERDA, H. *et al.* Olfactory attraction of the sugarcane weevil (coleoptera:curculionidae) to host plant odors and its aggregation pheromone. **Fla Entomology**, v. 82, p. 103 -112, 1999.
22. CHARITY, J.A. *et al.* Transgenic tobacco and peas expressing a proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* have increased insect resistance. **Mol Breeding**, v. 5, p. 357-365, 1999.
23. CHEN, W.H. *et al.* Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimeric gene. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 297-301, 1987.
24. CHRISTENSEN, A.H.; QUAIL, P.H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. **Trans Res**, v. 5, p. 213-218, 1996.
25. CONNORS, B.J. *et al.* Molecular characterization of a gene encoding a cystatin expressed in the stems of American chestnut (*Castanea dentata*). **Planta**, v. 215, p. 510-514, 2002.
26. COSTA LIMA, M.A. *et al.* Morfogênese in vitro e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Rev Brasileira Botânica**, v. 24 n. 1, 2001.

27. DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 7–84.
28. DOMINGUES, A. *et al.* Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Plants Cell Reports**, v.19, p.427-433, 2000.
29. FALCO, M.C.; TULMANN-NETO, A.; ULIAN, E.C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **Plant Cell Rep**, v. 19, p. 1188-1194, 2000.
30. FALCO, M.C. *et al.* Mechanisms of sugarcane response to herbivory. **Gen Mol Biol**, v. 24, p. 113-122, 2001.
31. FERNANDES, K.V.S. *et al.* The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. **Plant Mol Biol**, v. 23, p. 215-9, 1993.
32. FERREIRA, M.G.R. *et al.* Genes introduction in foliar segments of cupuassu (*Theobroma grandiflorum* schumm.) using biolistic. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 4, p. 279-280, 2004.
33. GAMBLEY, R.L.; FORD, R.; SMITH, G.R. Microprojetele transformation of sugarcane meristems and regeneration transformation of shoots expressing  $\beta$ -glucoronidase. **Plant Cell Rep**, v. 12, p. 343-346, 1993.
34. GIANOTTI, A. *et al.* Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein Expr Purif**, v. 47, p. 483-489, 2006.
35. GIDDINGS, G. Transgenic plants as protein factories. **Curr Opin Biotechnol**, v. 12, p. 450-454, 2001.



36. GLEDDIE, S.; LELLER, W.A. Protoplast fusion technology. **J Tissue Cult Methods**, v. 12, p. 157-162, 1989.
37. GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Curr Opin Plant Biol**, v. 5, p. 122-127, 2001.
38. GRUDEN, K. et al. The cysteine protease activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) guts, which is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 28, p. 549-60, 1998.
39. 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.
40. HILDER, V.A. *et al.* A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v. 330, p. 160-163, 1987.
41. HINES, M.E.; OSUALA, C.I.; NIELSEN, S.S. Isolation and partial characterization of a soyabean cystatin cysteine proteinase inhibitor of coeopteran digestive proteolytic activity. **J Agric Food Chem**, v. 39, p. 1515-1520, 1991.
42. HOOD, E.E. *et al.* Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. **Mol Breeding**, v. 3, p. 291-306, 1997.
43. JOGSMAN, M.A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **J Insect Physiol**, v. 43, p. 885-895, 1997.
44. KIMURA, M. *et al.* Primary structure of a cysteine proteinase inhibitor from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill). **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 59, p. 2328-9, 1995.

45. KLEIN, T.M. *et al.* Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity of microprojectiles. **Biotechnology**, v. 6, p. 559-563, 1987.
46. KLEIN, T.M. *et al.* Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 85, p. 8502-8505, 1988.
47. KLEIN, T.M. *et al.* Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 85, p. 4305-4309, 1988.
48. KOIWA, H. *et al.* A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin L-like digestive cysteine proteinases (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*). **FEBS Lett**, v. 471, p. 67-70, 1998.
49. KOUZUMA, Y. *et al.* Purification, characterization, and sequencing of two cysteine proteinase inhibitors, Sca and Scb, from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. **J Biochem**, v. 119, p. 1106-1113, 1996.
50. KURODA, M. *et al.* Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 65, p. 22-28, 2001.
51. LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
52. LEE, S.I. *et al.* Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal.) in transgenic rice. **Mol Breeding**, v. 5, p. 1-9, 1999.
53. LEUNG-TOUNG, R. *et al.* Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a review. **Curr Med Chem**, p. 979-1002, 2002.

54. LIM, C.H. *et al.* Characterization of a cDNA encoding cysteine proteinase inhibitor from Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) flower buds. **Plant Mol Biol**, v. 30, p. 373-379, 1996.
55. LIPKE, H.; FRAENKEL, G.S; LIENER, J.E. Effects of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*. **J Sci Food Agric**, v. 2, p. 410-415, 1954.
56. MISAKA, T. *et al.* Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin. **Eur J Biochem**, v. 240, p. 609-14, 1996.
57. MOORE, P.H. Progress in sugarcane molecular biology. In: CONGRESSES OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS. **Proceedings**. Cali: ISSCT, 1996. p.353-362.
58. MURDOCK, L.L. *et al.* Cysteine digestive proteinase in Coleoptera. **Comp Biochem Physiol**, v. 87, p. 783-787, 1987.
59. NARVAEZ-VASQUEZ, J.; OROZCO-CARDENAS, M.L.; RYAN, C.A. Differential expression of a chimeric CaMV-tomatoproteinase inhibitor I gene in leaves of transformed nightshade, tobacco and alfalfa plants. **Mol Biol**, v. 20, p. 1149-1157, 1992.
60. NEHRA, N.S. *et al.* Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues from microparticle bombardment with two distinct genes constructs. **Plant J**, v. 5, p. 285-297, 1994.
61. NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. 3. ed. New York: Worth Publishers, 2000. p. 848-849.
62. OJIMA, A. *et al.* An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteinases in cell cultures and seeds of carrot. **Plant Mol Biol**, v. 34, p. 99-109, 1997.

63. OLIVA, M.L.V. *et al.* Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine peptidase inhibitor from sugarcane. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 320, p. 1082-1086, 2004.
64. OLIVEIRA, A.S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M.P. Cysteine proteases and Cystatins. A Review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 91-104, 2003.
65. PANNETIER, C. *et al.* Introduction of new traits into cotton through genetic engineering: insect resistance as example. v. 96, p.163-166, 1997.
66. PAPINI-TERZI, F.L. *et al.* Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. **DNA Res**, v. 12, p. 27-38, 2005.
67. RAIZER, A.J. **Interações genótipos x ambientes e estabilidade fenótipo em cana-de-açúcar no estado de São Paulo**. 103p. DISSERTAÇÃO (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.
68. RAO, M.B. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, p. 597-635, 1998.
69. RAWLINGS, N.D.; BARRET, A.J. Families of cysteine peptidases. **Methods Enzymol**, v. 244, p. 461-486, 1994.
70. REAM, W.; GELVIN, S.B. **Crow gall: advances in understanding interkingdom gene transfer**. Saint Paul: APS Press, 1996. 148 p.
71. REIS, E.M.; MARGIS, R. Sugarcane phytocystatins: identification, classification and expression pattern analysis. **Gen Mol Biol**, v. 24, p. 291-296, 2001.
72. ROE, S. **Protein purification techniques**. New York: Oxford University Press, 2001.

73. ROGERS, B.L. *et al.* Sequence of the proteinase-inhibitor cystatin homologue from the pollen of *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed). **Gene**, v. 133, p. 219-221, 1993.
74. RYAN, S.N.; LIANG, W.A.; MCMANUS, M.T. A cysteine protease inhibitor purified from apple fruit. **Phytochemistry**, v. 49, p. 957-963, 2003.
75. SACILOTO, R.F.Z. **Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala***. 74p. DISSERTAÇÃO (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
76. SAMBROOK, J.; FRTSCH, E.F; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual** 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
77. SANFORD, J.C. *et al.* Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Journal Particle Science Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.
78. SANGER, F.; NICKLENS, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Science, USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
79. SARDANA, R.K. *et al.* Sintesis of recombinant human cytokine GMCSF in the sedes of transgenic tobacco plants. In: CUNNINGHAM, C.; PORTER, A.J.R. (Ed.). **Recombinants proteins from plants. Production and isolation of clinically useful compounds**. Totowa, N.J., **Humana Press**. p.77-87, 1998.
80. SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal proteins. **Aplied and Enviromental Microbiology**, v. 67, p. 2883-2894, 2001.

81. SÉTAMOU, M. *et al.* Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalkborers (Lepidoptera:Pyralidae): effects on life history parameters. **J Econ Entomol**, v. 95, p. 469-477, 2002.
82. SGRILLO, R.B. **Desenvolvimento de modelo matemático para a população da broca da cana-de-açúcar, *Diatrea saccharalis* (Fabr., 1794) e simulação da técnica do indivíduo estéril.** 189p. TESE (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1979.
83. SMITH, F.D.; HARPENDING, P.R.; SANFORD, J.C. Biolistic transformation of prokaryotes: factors that affect biolistic transformation of very small cells. **J Gen Microbiol**, v. 138, p. 239-248, 1992.
84. SOARES-COSTA, A. *et al.* A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 296, p. 1194-1199, 2002.
85. SONG, I. *et al.* Inhibition of cysteine proteinases by *Carica papaya* cystatin produced in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 162, p. 221-224, 1995.
86. STUPIELLO, J.P. A cana-de-açúcar como matéria-prima. In: PARANHOS, S.B. (Ed.). **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização.** Campinas: Fundação Cargil, 1987. v. 2, p. 187-259.
87. TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp Biochem Physiol**, v. 109, p. 1-62, 1994.
88. TURK, V.; BODE, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS**, v. 285, p. 213-219, 1991.
89. TWYMAN, R.M. *et al.* Molecular farming in plants: host systems and expression technology. **Trends Biotechnol**, v. 21, p. 570-578, 2003.

90. URWIN, P.E. *et al.* Resistance to both cyst and rootnot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. **Plant J**, v. 12, p. 455-461, 1997.
91. VAIN, P. *et al.* Expression of an engineering cysteine proteinase inhibitor (oryzacystatin-I delta D876) for nematode resistance in transgenic rice plants. **Theor Appl Genet**, v. 96, p. 266-271, 1998.
92. VANIN, S.A. A new species of *Sphenophorus* Schoenherr from Brazil (Coleoptera, Curculionidae, Rhynchophorinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 34, p. 697-701, 1990.
93. WALDRON, C. *et al.* Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor. **Plant Mol Biol**, v. 23, p. 801-12, 1993.
94. WALKER, AJ. *et al.* Transgenic *Arabidopsis* leaf tissue expressing a modified oryzacystatin shows resistance to the field slug *Deroceras reticulatum* (Müller). **Trans Res**, v. 8, p. 95-103, 1999.
95. WITCHER, D.R. *et al.* Commercial production of  $\beta$ -glucuronidase (gus): a model system for the production of proteins in plants. **Mol Breeding**, v. 4, p. 301-312, 1998.
96. YASUKAWA, T. *et al.* Increase of solubility of foreign proteins in *E. coli* by co-production of bacterial thioredoxin. **J Biol Chem**, v. 270, p. 25328-25331, 1995.