

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

PRISCILA YUMI TANAKA SHIBAO

Cistatinas de cana-de-açúcar: produção recombinante em vacúolos de cana-de-açúcar transgênica (e outros sistemas de expressão em plantas) e estudos de interação com uma pseudo protease do coleóptero *Sphenophorus levis*

SÃO CARLOS -SP
2021

PRISCILA YUMI TANAKA SHIBAO

Cistatinas de cana-de-açúcar: Produção recombinante em vacúolos de cana-de-açúcar transgênica (e outros sistemas de expressão em plantas) e estudos de interação com uma pseudo protease do coleóptero *Sphenophorus levis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de doutora em Ciências, área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva

São Carlos-SP
2021

Shibao, Priscila Yumi Tanaka

Cistatinas de cana-de-açúcar: Produção recombinante em vacúolos de cana-de-açúcar transgênica (e outros sistemas de expressão em plantas) e estudos de interação com uma pseudo protease do coleóptero *Sphenophorus levis* / Priscila Yumi Tanaka Shibao -- 2021.

96f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Flávio Henrique da Silva

Banca Examinadora: Monalisa Sampaio Carneiro, Renata Santos Rodrigues, Eliane Candiani Arantes, Luiz Ricardo Goulart Filho

Bibliografia

1. *Sphenophorus levis*. 2. Cana-de-açúcar. 3. Canacistatina. I. Shibao, Priscila Yumi Tanaka. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Priscila Yumi Tanaka Shibao, realizada em 29/03/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva (UFSCar)

Profa. Dra. Monalisa Sampaio Carneiro (UFSCar)

Profa. Dra. Renata dos Santos Rodrigues (UFU)

Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes (FCFRP/USP)

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (UFU)

Dedico este trabalho aos meus pais, Miyki e Yassumitsu, meus maiores exemplos, e à minha
irmã Gabriela.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Silva por todos esses anos de orientação, amizade, confiança e lealdade. Muito obrigada por me permitir fazer parte do grupo e por sempre me incentivar a buscar além. Agradeço por ser um exemplo vivo de que ciência se faz com muito prazer e alegria e por todo apoio recebido nas horas em que mais precisei. Não há palavras para expressar minha gratidão!

Ao Dr. Andreas Schiemeyer por toda a orientação e acolhimento. Agradeço o tempo investido em mim, discussões esclarecedoras e ensino tão cuidadoso. Não poderia ter desejado uma experiência melhor.

À Profa. Dra. Andrea Soares Costa-Fuentes, por ter aberto as portas de seu laboratório, pela confiança e sempre prontidão em ajudar. À Dra. Daniela Neo e à Samara, que tornam o LBV acolhedor e muito divertido!

Ao Prof. Dr. Antônio Figueira por todo auxílio e disposição. À Dra. Danielle Scotton e Paulo Cassieri por toda ajuda e proatividade.

Ao Dr. Chakravarthi Mohan pelos ensinamentos e amizade.

Às “empoderadas” do LBM: Heloisa Tavoni Peccin e Dra. Danyelle Toyama, pela amizade, risadas, cafés, almoços e momentos juntas. A companhia e vocês faz a vida ser mais leve e divertida.

Aos colegas e amigos do LBM, que estão presentes ou que já partiram para novas aventuras: Camilo, Augusto, Adelita, Célio, Paty, Isabella, Anderson, Karen, Yan, Iara pela convivência e risadas. Ao Eduardo, por estar sempre pronto a ajudar.

À Dra. Camila Takeno Cologna pela incrível amizade, pelos conselhos valiosos e por estar sempre pronta a ouvir.

À minha família maravilhosa: Miyki, Yassumitsu e Gabriela. Aos meus pais, que são força e fortaleza, inspiração, exemplo e amor. À minha irmã, um potinho de luz que sempre ilumina os caminhos escuros.

À minha família na Alemanha: Julian, Jessica, Phillip e Cristina por todos os momentos, acolhimento, brincadeiras, viagens, sessões de violão, rum, cerveja e prosecco. Minha vida na Alemanha não seria tão calorosa e colorida sem vocês.

À FAPESP pelos auxílios financeiros que permitiram o desenvolvimento deste trabalho: processo referente à bolsa de doutorado n°: 2017/16118-1 e à Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior n°: 2018/20051-2.

Ao PPGGEV.

E a todos que estiveram envolvidos direta e indiretamente neste trabalho.

SÚMULA CURRICULAR

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Doutorado em ciências, área de concentração: bioquímica e biologia molecular (em andamento). Programa de pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos. Tese: “Interação entre *Sphenophorus levis* e cana-de-açúcar: caracterização de uma pseudo cisteína protease e produção de linhagem de cana-de-açúcar resistente ao ataque do inseto” Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva. Período sanduíche para desenvolvimento do projeto: “Produção de uma cistatina de cana-de-açúcar em *Nicotiana benthamiana*”. Orientador: Dr. Andreas Schiermeyer. Instituição: *Plant Biotechnology Department, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology* IME, Aquisgrano, Alemanha. Projetos FAPESP nº: 2017/16118-1 e 2018/20051-2.
- Mestrado em ciências, área de concentração: toxicologia (2016). Dissertação: “Transcriptoma da glândula mucosa de *Rhinella schneideri*”. Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga. Programa de Pós Graduação em Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP-RP. Projeto FAPESP n: 2014/15644-3.
- Farmacêutica-Bioquímica (2013) pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP-RP. Projeto de iniciação científica: “Isolamento e caracterização bioquímica de um inibidor de proteases presente no veneno de *Rhinella schneideri*”, projeto FAPESP n: 2010/05722-6.

PUBLICAÇÕES

8. Araujo, TT; Camiloti, GD; Valle, AD; da Silva, NDG; Souza, BM; Carvalho, TS; Câmara, JVF; **SHIBAO PYT**; Henrique-Silva, F; da Silva, TC; Magalhães, AC; Buzalaf, MAR. A sugarcane cystatin (CaneCPI-5) alters microcosm biofilm formation and reduces dental caries. Bioufouling, 2021

7. Mohan, C¹; **SHIBAO, PYT¹**; Paula, FFP; Toyama, D; Vieira, MS; Figueira, A; Soares-Costa, A; Henrique-Silva, F. hRNAi mediated knock-down of V-ATPase subunit E in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp) influences growth and survival of *Sphenophorus levis*. Plant Cell Reports, 2021

¹**Autores colaboraram igualmente para a produção deste trabalho.**

6. **SHIBAO, PYT**; Santos-Junior, CD; Santiago, AC; Mohan, C; Toyama, D; Vieira, MAS; Narayanan, S; Figueira, A; Carmona, AC; Schiermeyer, A; Soares-Costa, A; Henrique-Silva, F. Sugarcane cystatins: from discovery to biotechnological application. International Journal of Biological Macromolecules, 2021

5. Carvalho, TS; Araújo, TT ; Ventura, TMO; Dionizio, A; Câmara, JYF; Moraes, SM; Pelá, VT; Martini, T; Leme, JC; Derbotolli, ALB; Grizzo, LT Crusca, E; **SHIBAO, PYT**; Marchetto, R; Henrique-Silva, F; Pessan, JP; Buzalaf, MAR. Acquired pellicle protein-based engineering protects against erosive demineralization. Journal of dentistry, 2020.

4. **SHIBAO, PYT**; Cologna, CT; Morandi-Filho, R; Wiezel, GA; Fujimura, PT; Ueira-Vieira, C; Arantes, EC. Deep sequencing analysis of toad *Rhinella schneideri* skin glands and partial biochemical characterization of its cutaneous secretion. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 2018.

3. Wiezel, GA¹; **SHIBAO, PYT**¹; Cologna, CT; Morandi-Filho, R; Ueira-Vieira, C; de Pauw, E; Quinton, L; Arantes, EC. The in-depth venom of the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: an integrative approach combining its venom gland transcriptome and venom proteome. IJournal of Proteome Research, 2018.

¹**Autores colaboraram igualmente para a produção deste trabalho.**

2. Boldrini-França, J; Cologna, CT; Pucca, MB; Bordon, KCF ; Amorim, FG; Anjolette, FAP; Cordeiro, FA; Wiezel, GA; Cerni, FA; Pinheiro-Junior, EL; **SHIBAO, PYT**; Ferreira, IG; Oliveira, IS; Cardoso, IA; Arantes, EC. Minor snake venom proteins: structure, function and potential applications. Biochimica et Biophysica Acta. G, General Subjects (Print), 2017.

1. **SHIBAO, PYT**; Anjolette, FAP; Lopes, NP; Arantes, EC. First serine protease inhibitor isolated from *Rhinella schneideri* poison. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 2015.

CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO

1. Mohan C, **SHIBAO, PYT**, Henrique-Silva, F (2019). Applications of Genome Engineering/Editing Tools in Plants. In: Sathishkumar R., Kumar S., Hema J., Baskar V. (eds) Advances in Plant Transgenics: Methods and Applications. Springer, Singapore.

ARTIGO A SER SUBMETIDO:

1. **SHIBAO, PYT**; Ferro, M; Paula, FFP; Henrique-Silva, F. A pseudo-cysteine protease revealed in *Sphenophorus levis* midgut transcriptome. A ser submetido no : “International Journal of Biological Macromolecules (IF: 5,2)

RESUMO

O coleóptero *Sphenophorus levis* é uma das principais pragas da cultura canavieira e possui cisteíno proteases como principais enzimas digestivas. Neste projeto foi estudada uma variante da principal enzima digestiva do inseto *S.levis* (Sl-CathL), chamada Sl-CathL-CS, que apresenta uma serina na posição 138 em substituição à cisteína do sítio catalítico. Esta proteína foi expressa e caracterizada. Além disso, foi desenvolvida uma enzima mutante, denominada Sl-CathL-mutSC, na qual a serina 138 foi substituída por uma cisteína. Enquanto a Sl-CathL-CS não apresentou atividade proteolítica, a Sl-CathL-mutSC degradou proteínas do leite e o substrato Z-Phe-Arg-AMC ($V_{max} = 1017.6 \pm 135,55$ e $K_m = 10,766 \mu\text{M}$). A mutante foi inibida por E-64 ($K_i = 38.52 \pm 1,2 \mu\text{M}$), mas não por PMSF e docagem molecular estática mostrou a diferença entre o sítio ativo das duas proteínas. Ensaio de interação entre as duas proteínas e a cistatina CaneCPI-1 revelou que a Sl-CathL-CS tem maior interação com esta canacistatina, indicando que a proteína pode auxiliar no processo digestivo do inseto ao interagir com as cistatinas da planta e permitir que as proteases verdadeiras atuem. Considerando a importância da interação cistatina/cisteíno proteases, nosso laboratório tem se dedicado também ao estudo das cistatinas da cana-de-açúcar, caracterizando seis delas (CaneCPI-1 a CaneCPI-6). Dentre elas, a CaneCPI-5 mostrou alta capacidade inibitória contra Sl-CathL, além de inibir outras cisteíno catépsinas. CaneCPI-5 também foi capaz de proteger o esmalte dentário frente à erosão ácida e formação de cáries, criando necessidade de escalonar de sua produção para atender uma possível demanda industrial. Neste trabalho, CaneCPI-5 foi produzida em sistema baseado em plantas por lisados celulares (sistemas livres de células) de células de *Nicotiana tabacum* cv Bright Yellow-2 (BY-2) expressão transiente em folhas de *Nicotiana benthamiana* e expressão estável em células BY-2. Foram obtidos 25 μg de proteína purificada por grama de folha infiltrada com poder de inibição semelhante ($K_i = 10 \text{ nM}$) à da CaneCPI-5 produzida em bactéria. A CaneCPI-5 foi produzida em vacúolos de cana-de-açúcar transgênica e purificada a partir da garapa, com rendimento de 200 μg /mL, que possibilitaria, em campo, a produção de até 15,3 kg de proteína por hectare de cana-de-açúcar. Os eventos transgênicos de cana-de-açúcar tiveram a sua resistência frente ao ataque de larvas de *S. levis* testada, mas os clones deixaram de expressar a proteína no caldo após os repiques em casa de vegetação, resultado de provável silenciamento. Isso pode ter sido responsável por eles não apresentarem aumento de resistência.

Palavras-chave: *Sphenophorus levis*. cana-de-açúcar transgênica. Canacistatina. Molecular farming. Pseudo cisteíno protease.

ABSTRACT

Sphenophorus levis (Curculionidae: Coleoptera) is one of the major pests of sugarcane crop in Brazil and presents cysteine proteases as main digestive enzymes. In this project, we report the characterization of SI-CathL-CS, a variant of the main digestive cathepsin (SI-CathL) of the insect *S. levis* that presents a serine residue instead of a cysteine in the catalytic site at position 138. In addition, a mutant enzyme, in which serine 138 was replaced by a cysteine residue was produced and named SI-CathL-mutSC. SI-CathL-CS did not show proteolytic capacity, but SI-CathL-mutSC was able to hydrolyze milk proteins and the substrate Z-Phe-Arg-AMC ($V_{\max} = 1017.6 \pm 135.55$ and $K_m = 10.766$ mM). This mutant was inhibited by E-64 ($K_i = 38.52 \pm 1.2$ μ M), but not by PMSF, which is an inhibitor of serine proteases, and the static docking showed the difference of the active site of the two proteins. Interaction assay between them and the cystatin CaneCPI-1 revealed that SI-CathL-CS has greater interaction with this cystatin, indicating that the protein can assist in the insect digestive process by interacting with the plant cystatins thus allowing the true proteases to work. Considering the importance of the cystatin/cysteine proteases interaction, Laboratory of Molecular Biology has dedicated itself to the study of sugarcane cystatins, being responsible for the identification and characterization of six of them (CaneCPI-1 to CaneCPI-6). Among them, CaneCPI-5 presented high inhibitory capability against SI-CathL, which is the main digestive enzyme of the insect, besides inhibiting other cysteine cathepsins. Interestingly, this cystatin can protect tooth enamel against acid erosion and cavities. For this reason, there is a need to upscale its production to fulfill potential industrial demand. In this work, CaneCPI-5 was produced in a plant-based system by cell lysates (cell-free systems) of *Nicotiana tabacum* cv Bright Yellow cells (BY-2 cells), transient expression in leaves of *Nicotiana benthamiana* and stable expression in BY-2 cells. It was possible to obtain 25 μ g of purified protein per gram of infiltrated leaf and the protein showed similar inhibition ($K_i = 10$ nM) to that of CaneCPI-5 produced in bacteria. CaneCPI-5 was also produced in transgenic sugarcane vacuoles and was purified from its juice, yielding 200 μ g per mL, which, in the field, would allow the production of up to 15.3 kg of protein per hectare of sugarcane. The transgenic sugarcane events had their resistance against the attack of *S. levis* larvae assessed, however the transgenic clones failed to express the protein in the juice after propagation in the greenhouse, which may have occurred by gene silencing. This may have been responsible for them not showing increased resistance.

Key-words: *Sphenophorus levis*. transgenic sugarcane. Canacystatin. Molecular farming. Pseudo cysteine protease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da CaneCPI-5 e interação com a catepsina B humana	3
Figura 1.1. Proteínas relacionadas à SI-CathL identificadas no transcriptoma das larvas de <i>S. levis</i> .	16
Figura 1.2. Variantes da SI-CathL que apresentam alterações na cisteína no sítio catalítico	17
Figure 1.3. <i>Screening</i> e purificação da SI-CathL-mutSC.	18
Figura 1.4. Atividade enzimática das proteínas SI-CathL-CS e SI-CathL-mutSC.	19
Figura 1.5. <i>Pull down</i> entre SI-CathL-CS, SI-CathL-mutSC e CaneCPI-1	21
Figura 1.6. Comparação do sítio catalítico das proteínas SI-CathL-mutSC e SI-CathL-CS.	22
Figura 1.7. Docagem molecular estática entre SI-CathL, SI-CathL-CS, SI-CathL-mutSC e inibidores.	23
Figura 2.1. Representação gráfica dos cassetes de expressão	31
Figura 2.2. Representação esquemática do cassete de expressão do vetor pSBI-MF22	33
Figura 2.3. Etapas da transformação de cana-de-açúcar por agroinfiltração	36
Figura 2.4. Expressão da CaneCPI-5 em lisado de células BY-2	40
Figura 2.5. SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> da expressão dos diferentes plasmídeos codificantes da CaneCPI-5	41
Figura 2.6. Purificação da CaneCPI-5. A proteína solúvel foi purificada com aumento da concentração de imidazol	42
Figura 2.7. <i>Nicotiana benthamiana</i> após 5 dias de infiltração.	43
Figura 2.8. Análise da expressão de CaneCPI-5 em calos transformados.	44
Figura 2.9. Etapas do processo de obtenção de transformantes de cana-de-açúcar	45
Figura 2.10. Análise da garapa dos eventos transformantes de cana-de-açúcar transgênica por SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> .	46
Figura 3.1. Efeito da CaneCPI-5 em larvas de <i>S. levis</i> em dieta artificial	54
Figura 3.2. Perfil de proteínas intestinal das larvas desafiadas em dieta contendo CaneCPI-5	55
Figura 3.3. Expressão relativa dos genes SI-CathL, SI-Ser, SI-CathB e SI-CathL-CS nas diferentes condições	57

Figura 3.4. Desafio dos eventos transformantes de cana-de-açúcar com larvas de *S. levis*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers usados na mutação sítio dirigida	10
Tabela 2.1. Nome dos plasmídeos, direcionamento celular e sequências.	32
Tabela 2.2. Atividade residual da papaína após adição de 1 μ L de garapa dialisada	47
Tabela 3.1. Lista de primers usados em qPCR	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- BMGY: meio glicerol complexo tamponado (Buffered Glycerol-complex Medium)
- BMMY: meio metanol complexo tamponado (Buffered Methanol-complex Medium)
- BY-2: células de *Nicotiana tabacum* cv. *Bright Yellow-2*
- Cath: catepsina
- C-terminal: carboxi-terminal
- CaneCPI: canacistatina da cana-de-açúcar
- cDNA: DNA complementar
- dNTP: desoxirribonucleotídeos trifosfatados (deoxynucleotide triphosphates)
- DO₆₀₀: densidade óptica em 600 nm
- F: Farad
- HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfônico
- IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
- Ki: constante de inibição
- MS: meio Murashige and Skoog
- N-terminal: amino-terminal
- ORF: fase aberta de leitura (*open reading frame*)
- PBS: tampão fosfato salino (*phosphate-buffered saline*)
- PCR: reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
- SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
- YEPD: extrato de levedura, peptona e dextrose (yeast extract peptone dextrose)
- YEPDS: extrato de levedura, peptona, dextrose e sorbitol (yeast extract peptone dextrose sorbitol)
- YNB: base nitrogenada para leveduras (Yeast Nitrogen Base)
- Z-Leu-Arg-MCA: benziloxycarbonil-Leu-Arg-7-amino-4-metilcoumarina
- Z-Phe-Arg-MCA: benziloxycarbonil-Phe-Arg-7-amino-4-metilcoumarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Proteases digestivas de <i>Sphenophorus levis</i>	1
1.2. Fitocistatinas de cana de açúcar	2
2. OBJETIVOS GERAIS	5
CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DE UMA PSEUDO CISTEÍNO PROTEASE DO INTESTINO MÉDIO DE <i>Sphenophorus levis</i>	6
1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Cisteíno catepsinas	7
1.2. Proteases digestivas de <i>S. levis</i>	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS	10
2.1. Identificação das sequências similares à SI-CathL	10
2.2. Expressão da proteína SL-CathL-CS e SI-CathL-mutSC	10
2.3. Caracterização funcional das proteínas SI-CathL-CS e SI-CathL-mutSC	12
2.3.1. Atividade sobre substrato complexo	12
2.3.2. Atividade enzimática sobre substrato específico	12
2.4. Ensaio de <i>Pull-down</i> entre as proteínas SI-CathL-CS e SI-CathL-mutSC e cistatinas	13
2.4.1 Análise por <i>Western Blotting</i>	14
2.5. Docagem molecular estática	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1. Identificação de possíveis pseudo proteases do intestino médio de <i>S. levis</i>	15
3.2. Expressão e atividade enzimática das proteínas SI-CathL-CS e SI-CathL- mutSC	18
3.3. Ensaio de <i>Pull-down</i> entre as proteínas SI-CathL-CS e SI-CathL-mutSC e cistatinas	20
3.4. Docagem molecular estática	22

CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DA CANACISTATINA CANECPI-5 EM PLANTAS	26
1. INTRODUÇÃO	27
1.1. <i>Molecular farming</i>	27
1.2. Cana-de-açúcar como modelo de expressão heteróloga	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1. Construção dos cassetes de expressão	30
2.1.1. Construção dos plasmídeos para expressão em <i>Nicotiana spp</i>	30
2.1.2. Construção do cassete de expressão para cana-de-açúcar	32
2.2. Mobilização do plasmídeo em <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para expressão em <i>Nicotiana spp</i> .	33
2.3. <i>In vivo</i> translation (<i>ivt</i>) em lisado de células BY-2	34
2.4. Expressão transiente em folhas de <i>N. benthamiana</i>	34
2.5. Expressão estável em células BY-2	35
2.6. Mobilização do plasmídeo em <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para transformação de cana-de-açúcar	35
2.7. Infiltração de discos de cana-de-açúcar por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
2.8. Análise molecular dos eventos transgênicos	37
2.9. Aclimatização das plantas transgênicas	38
2.10. Análise da produção de proteína	38
2.10.1. Expressão em <i>N. benthamiana spp</i> .	38
2.10.2. Expressão em cana-de-açúcar	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1. Expressão da CaneCPI-5 em <i>Nicotiana spp</i> .	40
3.1.1. <i>in vivo</i> translation (<i>ivt</i>) em lisado de células BY-2	40
3.1.2. Expressão transiente em <i>N. benthamiana</i>	41

3.1.3. Produção da CaneCPI-5 em células BY-2.	44
3.2. Determinação do K_i da CaneCPI-5 produzida em <i>N. benthamiana</i>	45
3.3. Obtenção dos eventos transgênicos de cana-de-açúcar	45
3.4. Obtenção da CaneCPI-5 a partir da garapa das linhagens transgênicas	46
CAPÍTULO 3: GERAÇÃO DE UMA LINHAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR	48
MAIS RESISTENTE AO ATAQUE DO INSETO <i>Sphenophorus levis</i>	
1. INTRODUÇÃO	49
1.1. Utilização de inibidores protéicos como controle de insetos praga	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1. Desafio de alimentação das larvas de <i>S. levis</i> em dieta artificial	51
2.2. Extração de conteúdo intestinal das larvas: material genético (RNA) e proteico	51
2.3. Análise de expressão gênica	52
2.4. Desafio das larvas de <i>S. levis</i> nos clones de cana-de-açúcar transgênicos	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.1. Desafio das larvas de <i>S. levis</i> em dieta artificial	54
3.2. Extração de RNA e material protéico	54
3.3. Análise da expressão gênica	56
3.4. Desafio das larvas de <i>S. levis</i> nos eventos transformantes	59
CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. *Sphenophorus levis*, o bicudo da cana-de-açúcar

Sphenophorus levis (Coleoptera: Curculionidae), popularmente conhecido como gorgulho ou bicudo, é uma das maiores pragas da cana-de-açúcar (DINARDO-MIRANDA, 2005; CANAVIEIRA, 2013). O primeiro relato de sua ocorrência foi em 1977 na cidade de Piracicaba, estado de São Paulo (DEGASPARI, 1987). Atualmente, ele é encontrado principalmente no estado de São Paulo, mas sua presença já foi reportada em Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Paraná (DINARDO-MIRANDA, 2005; CANAVIEIRA, 2013; CURSI *et al.*, 2021).

A infestação dos canaviais acontece após o acasalamento, quando as fêmeas perfuram a parede celular do rizoma da cana, abaixo do nível do solo, e botam seus ovos (DINARDO-MIRANDA, 2005; TAVARES, 2009; CANAVIEIRA, 2013). As larvas são as responsáveis pelos danos à plantação, pois se alimentam do colmo abrindo galerias que levam ao amarelamento das folhas, secagem e morte de perfilhos e até falhas na rebrota (DEGASPARI, 1987; DINARDO-MIRANDA, 2005; TAVARES, 2009). As larvas transformam-se em pupas, que também são encontradas no interior dos colmos; as pupas são desenvolvidas a forma adulta, que vivem na base do solo (DEGASPARI, 1987; DINARDO-MIRANDA, 2005). Os adultos medem entre 12 e 15 mm, possuem coloração preta ou marrom, e a fêmea possui mandíbulas na base do rosto, que permite a perfuração do rizoma da cana-de-açúcar (DINARDO-MIRANDA, 2005).

Visando entender a dinâmica entre o *S. levis* e a cana-de-açúcar, estudos prévios focaram na identificação e caracterização das principais proteases digestivas a partir do conteúdo intestinal (SOARES-COSTA *et al.*, 2011) e por construção de biblioteca de cDNA e imunolocalização da principal protease digestiva (FONSECA *et al.*, 2012). Ambos os estudos mostraram que a cisteína catépsina L do inseto, pertencente à família C1, é a principal responsável pela digestão proteica no intestino médio e a imunolocalização comprovou sua presença no intestino médio da larva. O uso de cisteína proteases como enzimas digestivas é comum em coleópteros (KOIWA *et al.*, 2000; MARTYNOV *et al.*, 2015), e a sua inibição é uma estratégia promissora no controle da praga (TERRA e FERREIRA, 1994; BOWN *et al.*, 2004; CRISTOFOLETTI *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2016).

Durante a análise das bibliotecas de cDNA, possíveis cisteína proteases foram identificadas. Uma dessas sequências apresentava um resíduo de serina ao invés da cisteína no

sítio catalítico e a sua presença levantou interesse sobre a sua função. Serino e cisteíno proteases dividem história evolutiva e muitas das famílias apresentam enovelamento semelhante, sendo classificadas no mesmo clã (BARRETT e RAWLINGS, 1995; 2001). Apesar das semelhanças, serino e cisteíno proteases apresentam especificidades e funções distintas nos insetos e a presença desta sequência levanta questões sobre sua função biológica na digestão do inseto.

1.2. Fitocistatinas de cana de açúcar

Cistatinas são inibidores tipo *tight-binding* de cisteíno proteases, e as cistatinas produzidas em plantas são denominadas fitocistatinas (KONDO *et al.*, 1991). As cistatinas apresentam os seguintes motivos conservados que são importantes para sua atividade inibitória: (i) presença de um ou dois resíduos de glicina na região N-terminal, (ii) domínio Q-X-V-X-G, (iii) resíduo de triptofano conservado na região C-terminal (BENCHABANE *et al.*, 2010). As fitocistatinas, além de apresentarem tais motivos, possuem ainda uma sequência consenso L-A-R-F-A-V, responsável pela formação de uma α -hélice na região N-terminal (MARGIS *et al.*, 1998).

Fitocistatinas apresentam diversos papéis fisiológicos e na defesa de plantas contra estresses bióticos e abióticos (MARTINEZ *et al.*, 2016). Também são importantes para a germinação de sementes já que regulam processos de maturação de proteínas e ativação de proteases, fazem parte do sistema de defesa endógena das plantas contra os ataques de insetos e outras pragas herbívoras (LABUDDA *et al.*, 2016; MARTINEZ *et al.*, 2016; SZEWINSKA *et al.*, 2016)

Nosso laboratório já produziu e caracterizou as cistatinas de cana de açúcar, denominadas canacistatinas, CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3, CaneCPI-4, CaneCPI-5 e CaneCPI-6 (SOARES-COSTA *et al.*, 2002; GIANOTTI *et al.*, 2005; GIANOTTI *et al.*, 2008; SANTIAGO *et al.*, 2017, SHIBAO *et al.*, 2021). As canacistatinas foram inicialmente divididas em três grupos filogenéticos (REIS e MARGIS, 2001), mas uma análise recente mostrou a existência de um quarto grupo (SHIBAO *et al.*, 2021). As proteínas pertencentes ao grupo 1 apresenta os motivos L-A-R-F-A-V e Q-X-V-X-G; o grupo 2 têm ambos os motivos do grupo 1 mais extensão C-terminal que contém motivo S-N-S-L, responsável pela inibição de leguminais, cisteíno proteases do tipo C13; grupo 3 que não apresenta o motivo L-A-R-F-A-V; e o grupo 4 que apresenta os domínios L-A-R-F-A-V e Q-X-V-X-G, extensão C-terminal menor que a do grupo 2 e com ausência do domínio S-N-S-L (REIS e MARGIS, 2001; SHIBAO *et al.*, 2021).

De maneira geral, as cistatinas apresentam a estrutura tridimensional de cunha (Fig. 1A), bloqueando o sítio catalítico da cisteína protease. A glicina, juntamente com o motivo Q-X-V-X-G, é responsável por interagir com a asparagina da tríade catalítica das cisteína catépsinas da família C1, enquanto o resíduo de triptofano interage com a cisteína e a histidina catalíticas (Fig. 1B)

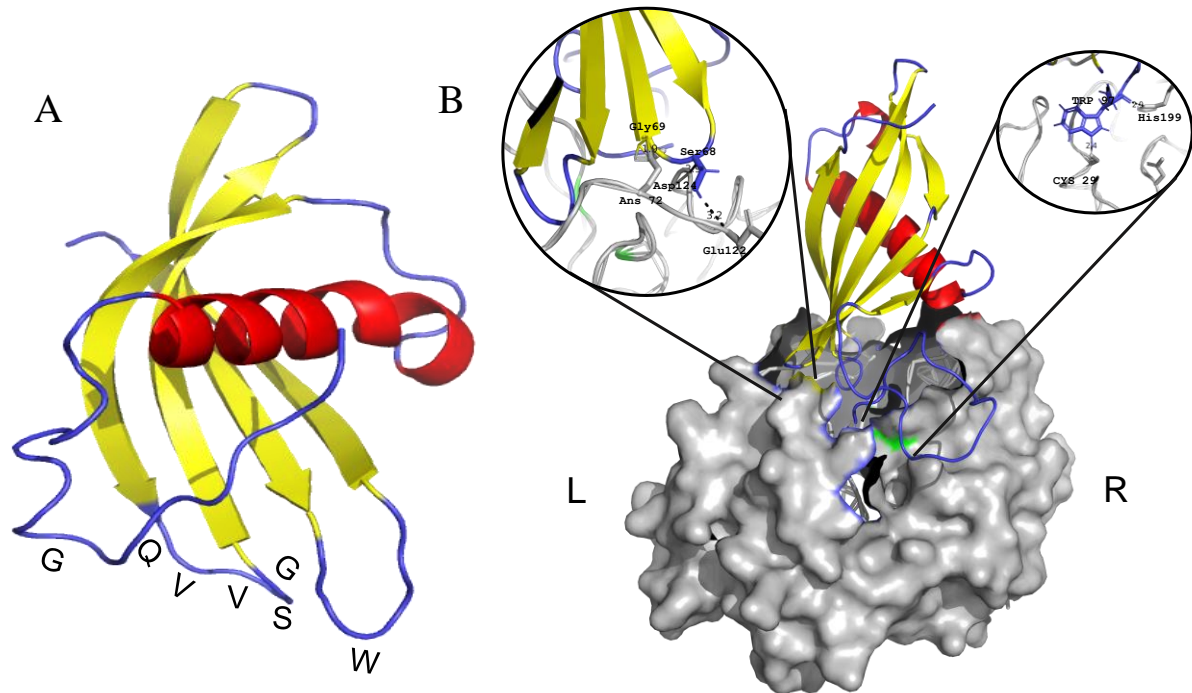


Figura 1. Estrutura da CaneCPI-5 e interação com a catépsina B humana. A) estrutura tridimensional da CaneCPI-5 com os resíduos e motivos importantes para sua atividade e destaque. A α -hélice é mostrada em vermelho, as folhas β em amarelo e os *loops* em azul. B) Interação entre CaneCPI-5 e CathB. A protease está representada em cinza, sendo que os domínios direito e esquerda estão indicados (R- *right*, lado direito em inglês e L-*left*, lado esquerdo), e a canacistatina está representada no mesmo esquema de cores da figura A. Nos insertos estão indicadas a interação entre os domínio QxVxG (inserto da esquerda) e resíduos de triptofano (resíduo da direita) da CaneCPI-5 com os aminoácidos da tríade catalítica da CathB. (SHIBAO *et al.*, 2021)

Dentre as canacistatinas, Cane-CPI-4 e CaneCPI-5 apresentaram as maiores capacidades inibitórias contra a catépsina B humana, apresentando potencial para utilização em tratamento de enfermidades causadas pela expressão descontrolada desta enzima (GIANOTTI *et al.*, 2008; MIGUEL, 2014). A CaneCPI-5 é o mais potente inibidor da SI-CathL intestinal de *S.levis*, ($K_i = 0,059$ nM) e pode aderir-se fortemente ao esmalte dentário, o protegendo da erosão ácida e da formação de cáries, e não é tóxica para células humanas para células humanas (MIGUEL, 2014; SANTIAGO *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2020; ARAUJO *et al.*, 2021; SHIBAO *et al.*, 2021). Inclusive, o uso desta proteína para proteção do esmalte dentário foi

submetido ao patenteamento pelo nosso grupo (UFSCar, 2017), e estudos para determinação da melhor apresentação estão sendo realizados. Porém, para este uso, ainda é necessária a criação de estratégias que aumentem a sua produção a fim de suprir a demanda de uso industrial.

2. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem três objetivos que serão abordados em três capítulos. O primeiro objetivo geral é compreender a função da proteína SI-CathL-CS, uma variante da cisteíno protease SI-CathL, no sistema digestivo do *S. levis*. O segundo objetivo é a produção da CaneCPI-5 em sistemas baseados em planta de modo a permitir seu escalonamento. Finalmente, o último objetivo é a geração de um evento de cana-de-açúcar transgênico que superexpresse a CaneCPI-5 e seja mais resistente ao ataque das larvas de *S. levis*. A mesma linhagem de cana-de-açúcar usada para obtenção da CaneCPI-5 foi usada nos desafios com o inseto.

Para tanto, foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- Caracterização da proteína SI-CathL-CS e compreensão da sua função ao comparar a sua atividade com o mutante SI-CathL-mutSC
- Produção da CaneCPI-5 em diversos sistemas baseado em planta: expressão em sistema livre de célula (lisados celulares) a partir de células de *Nicotiana tabacum* cv. *Bright Yellow-2*, expressão transiente e folhas de *Nicotiana benthamiana*, expressão estável em células de *Nicotiana tabacum* cv. *Bright Yellow-2* e em cana-de-açúcar transgênica
- Avaliação da cana-de-açúcar transgênica superexpressando a CaneCPI-5 quanto à resistência ao ataque das larvas de *S. levis*

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DE UMA PSEUDO CISTEÍNO PROTEASE DO INTESTINO
MÉDIO DE *Sphenophorus levis*

1. Introdução

1.1. Cisteíno catepsinas

Cisteíno proteases são enzimas que apresentam uma díade ou tríade catalítica formada por um resíduo de cisteína, cujo grupo tiol atua como nucleófilo na reação de catálise, uma histidina, que atua como base; e uma asparagina, quando a protease apresenta tríade catalítica, que auxilia na orientação da histidina durante a catálise (BARRETT e RAWLINGS, 2001). A primeira cisteíno protease descoberta foi a papaína, que teve sua estrutura primária descrita em 1968 (HUSAIN e LOWE, 1969). As diferentes classes de cisteíno proteases apresentam ação de endo e exopeptidases (RAWLINGS e BARRETT, 1993; BARRETT e RAWLINGS, 2001).

As cisteíno catepsinas pertencem à família C1 das cisteíno proteases (EC.3.4.22) e a sua principal representante é a papaína e, por este motivo, essas enzimas também são chamadas de *papain-like* (RAWLINGS e BARRETT, 1993). As cisteíno catepsinas, em sua maioria, possuem atividade ótima em pH ácido, são produzidas na forma de zimogênio e ativadas quando o pró-peptídeo é clivado na região N-terminal, sendo que este pró-peptídeo atua como inibidor da própria enzima, regulando sua atividade (TURK *et al.*, 2011). A família C1 está presente em organismos procariotos, eucariotos, vírus, plantas e animais. A maior parte destas catepsinas apresenta ação de endopeptidase, incluindo a catepsina L (TURK *et al.*, 2011). A catepsina L humana é composta pelos domínios direito (R), composto por estruturas de barril β e zonas com estruturas aleatórias (*coil*), enquanto no domínio esquerdo (L), pode-se perceber a formação de três α -hélices (TURK *et al.*, 1997; HARDEGGER *et al.*, 2011). O subsítio catalítico é formado pelas cisteína 25 (Cys²⁵) e histidina 163 (His¹⁶³), sendo que os números dos resíduos são considerados na forma madura, ou seja, após a clivagem do pró-peptídeo. Esta estrutura é semelhante à da papaína (KIM *et al.*, 1992) e a modelagem *ab initio* da S1-CathL mostra que esta última proteína tem enovelamento parecido.

De acordo com a nomenclatura proposta por Schechter e Berger (1967), as posições em que o substrato se acomoda no sítio catalítico da enzima são chamadas de S1, S2, S3, e assim sucessivamente, em relação ao ponto de clivagem até a região N-terminal e S1', S2', S3' do ponto de clivagem em direção ao C-terminal. Os resíduos do substrato são nomeados de acordo com a posição que ocupam, ou seja, do ponto de clivagem em direção à extremidade N-terminal, os resíduos são chamados P1, P2, etc.; e do ponto de clivagem em direção à região C-terminal, são chamados de P1', P2', etc. Seguindo esta nomenclatura, o aminoácido arginina é o preferido como P1, e os aminoácidos do sítio P2 podem variar de acordo com o tipo de cisteíno

catepsina; por exemplo, catepsinas L degradam preferencialmente fenilalanina e catepsinas B, argininas (TURK *et al.*, 1998).

1.2. Proteases digestivas de *S. levis*

O inseto *S. levis* é uma das maiores pragas no cultivo da cana-de-açúcar no Brasil. Como a larva se encontra no interior do colmo, o combate à praga com iscas ou agentes químicos ainda é deficiente. Uma opção é a produção de plantas transgênicas que produzam proteínas que desequilibrem o processo de digestão do inseto, afetando seu desenvolvimento. Para melhor entender o processo digestivo do *S. levis*, foram construídas bibliotecas de cDNA de diferentes estágios de desenvolvimento e de tecidos do inseto. Em relação aos transcritos obtidos a partir do intestino médio de larvas com 30 dias, cerca de 67,35% dos ESTs anotados estavam relacionados à digestão de proteínas, sendo que sequências similares a Catepsina L corresponderam a 54,29% do total de enzimas digestivas (FONSECA *et al.*, 2012). A cisteína catepsina L majoritária foi produzida de forma recombinante e denominada SI-CathL, e teve sua localização no intestino médio confirmada. Ademais, a análise do lisado do intestino do inseto identificou e comprovou que a SI-CathL é a protease com maior atividade (SOARES-COSTA *et al.*, 2011; FONSECA *et al.*, 2012).

Além das cisteína catepsinas L, outras enzimas com diferentes funções foram identificadas e caracterizadas a partir das bibliotecas de cDNA: invertases, responsáveis pela digestão de sacarose em frutose e manose (PEDEZZI *et al.*, 2014), e pectinases (EVANGELISTA *et al.*, 2015; HABRYLO *et al.*, 2018). A partir da purificação do extrato do intestino bruto, a atividade de serino proteases tipo tripsina, e enzimas como maltase e amilase foram observadas, reforçando a complexidade do sistema digestório (SOARES-COSTA *et al.*, 2011).

Seguindo o desenvolvimento de técnicas que sequenciamento de nova geração (do inglês *Next Generation Sequencing* – NGS), nosso grupo construiu um transcriptoma a partir do intestino médio de larvas com 30 dias. Estes dados já estavam disponíveis, mas não tinham sido analisados. Ao focar na busca de sequências de cisteína catepsinas L, novamente foi observada a presença de possíveis proteases que apresentavam a alteração de cisteína para serina no sítio catalítico, sendo uma delas foi nomeada SI-CathL-CS e escolhida para produção e caracterização.

Cisteína catepsinas, como descritas anteriormente, pertencem à família C1 das cisteína proteases, e são as principais enzimas digestivas de insetos coleópteros (BOWN *et al.*, 2004;

CRISTOFOLETTI *et al.*, 2005; BAUM *et al.*, 2007; VINOKUROV *et al.*, 2009). Já insetos lepidópteros apresentam serino proteases como enzimas digestivas. (CHRISTELLER *et al.*, 1992).

Serino proteases são enzimas que apresentam uma tríade catalítica formada por serina, histidina e ácido aspártico, responsável pela formação do sítio de ligação do oxiânion, um composto de transição formado no mecanismo de catálise (CARTER e WELLS, 1988). São responsáveis por diversos papéis na manutenção de organismos de várias classes, atuando na regulação da coagulação sanguínea humana (POSMA *et al.*, 2016) até sendo responsáveis pela digestão proteica de insetos, principalmente de lepidópteros (LOUATI *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2016).

Algumas famílias de catepsinas são evolutivamente relacionadas com famílias de serino proteases. Apesar da dificuldade de se relacionar as classes de proteases devido à diferença existente nos sítios catalíticos, a comparação das estruturas tridimensionais das proteínas indica relação entre as famílias de enzimas, que podem ser agrupadas em um mesmo clã (RAWLINGS e BARRETT, 1993; BARRETT e RAWLINGS, 1995; 2001). Um exemplo é o clã CB, que compreende cisteíno peptidases de piconarvírus com quimotripsina, uma serino protease (BARRETT e RAWLINGS, 2001)

A proteína SI-CathL-CS foi previamente clonada em vetor pPIC α A, transformada e expressa em *Pichia pastoris* cepa KM71H. Apesar da presença de serina no lugar da cisteína no sítio catalítico putativo da SI-CathL-CS, testes com substratos fluorogênicos específicos de serino protease mostraram ausência da atividade catalítica da proteína (Lima, 2016). Uma hipótese sobre a função desta proteína é que ela seja expressa para interagir com as cistatinas da cana-de-açúcar, sequestrando-as e deixando as cisteíno proteases agirem.

Diante do exposto, o presente capítulo é focado na expressão, caracterização de uma dessas variantes, bem como a geração de uma proteína revertente (resíduo de serina no sítio ativo é alterado para resíduo de cisteína) e comparação entre as atividades das duas proteínas.

2. Materiais e métodos

2.1. Identificação das sequências similares à SI-CathL

As buscas nos transcriptoma foram realizados com auxílio da Dra. Milene Ferro (UNESP Rio Claro). Sequências semelhantes à SI-CathL foram recuperadas usando como banco de dados o transcriptoma feito com RNA de larvas de 30 dias do *S. levis* (Bioproject: PRJNA694547, BioSample: SAMN17526444 e SRR13518685) e o algoritmo local BlastP com valor de *e-value* de *cut off* de 1e-03 na plataforma OmicsBox. Os resultados foram analisados manualmente e os alinhamentos foram feitos usando o *software* Multalin (CORPET, 1988) com os parâmetros padrão e formatados com o Esript 3.0 (ROBERT e GOUET, 2014).

2.2. Expressão da proteína SL-CathL-CS e SI-CathL-mutSC

A mutação sítio dirigida do resíduo Ser¹³⁸ para Cys¹³⁸, numerados a partir da metionina iniciadora, que gerou a proteína SI-CathL-mutSC, foi feita a partir de *primers* contendo duas substituições pontuais de nucleotídeos (Tabela 1), escolhidos de acordo com a tabela de uso de códon de *P. pastoris*. O plasmídeo foi construído usando o QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent), seguindo as orientações do fabricante, e o plasmídeo pPICZαA-SI-CathL-CS como molde. O plasmídeo contendo a mutação sítio-dirigida foi nomeado pPICZαA-SI-CathL-mutSC. Após a confirmação da mutação no plasmídeo por sequenciamento de DNA, aproximadamente 1,5 µg de DNA plasmidial pPICZαA-SI-CathL-mutSC foram linearizados com a enzima de restrição *MssI* (*PmeI*). A reação foi feita com 10 U de *MssI* (Thermo Fischer), 1x tampão Tango em reação com volume de 30 µL completada com água deionizada, a 37 °C, *overnight* e dialisada por 20 min em membrana de nitrocelulose (VSWP 02500, Millipore) contra água deionizada por 20 min.

Tabela 1. Primers usados na mutação sítio dirigida. O códon alterado está em negrito

Primer	Sequência (5´- 3´)
mutSI-CathL-CSforw	ACCAAGGAGAATGGGATACAT TGT TGGGCTTTCTCCACTATTGC
mutSI-CathL-CS_rev	GCAATAGTGGAGAAAGCCCA ACA TGTATCCCATTCTCCTTGGT

Um inóculo de 5 mL de *P. pastoris* linhagem X-33 foi crescido em meio YEPD (1% de extrato de levedura - Himedia, 2% de peptona - Himedia, 2% de dextrose- Merck) por 8 h a 28 °C, 250 rpm em *Shaker* de bancada (Bruker Daltonics). Então, 150 µL do pré-inóculo foram adicionados a 50 mL de meio YEPD e incubados por 16 h, 28 °C, 250 rpm. A densidade óptica (DO) em 600 nm de uma alíquota diluída 10 x foi medida, de modo a confirmar que o valor de $DO_{600} = 1,0$ e 1,5. O inóculo foi dividido em dois tubos adequados para centrifuga Sorvall (25 mL em cada tubo) e centrifugados a 1.500 g, 5 min, 4 °C e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 5 mL de meio YEPD, e então foram adicionados 1 mL de HEPES 1 M (pH = 7,0 - JT-Baker) e 125 µL de DTT (1 M - USB). As células foram manualmente ressuspensas na presença de gelo. A suspensão foi incubada a 28 °C, 15 min, sem agitação, e água gelada foi adicionada de modo a completar volume final de 25 mL. A suspensão foi gentilmente agitada por inversão, centrifugada nas condições supracitadas e o sobrenadante foi novamente descartado. As células foram ressuspensas em 12,5 mL de água gelada, novamente centrifugadas e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Então, 1 mL solução de sorbitol 1M (JT Baker) gelado foi adicionado, novamente centrifugado como descrito acima, e as células foram ressuspensas em 1 mL da solução de sorbitol. Alíquotas de 40 µL foram feitas e uma delas foi usada para a transformação.

Dez microlitros do plasmídeo linearizado e dialisado foram adicionados à alíquota de *P. pastoris*, incubados por 5 min em gelo, e eletroporados a 1,5 kV, 25 µF e 200 Ω em eletroporador Gene-Pulser II (Bio-Rad), usando cubeta de 0,2 cm. Foi adicionado 1 mL da solução de sorbitol 1M e as células transformadas foram transferidas para tubo tipo Falcon de 15 mL e incubadas a 28 °C por 2 h, sem agitação. As células foram plaqueadas em meio YPDS (1% de extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose, 2% ágar, 1 M de sorbitol) contendo 100 mg/L, 250 mg/L e 500 mg/L de zeocina (Thermo Fischer) e incubadas a 28 °C por 4 dias.

Colônias foram analisadas quanto à expressão da proteína. Para tanto, foi utilizada placa de 24 poços (Whatmann) contendo 3 mL de meio BMGY (2% peptona, 1% extrato de levedura, 100 mM tampão fosfato de potássio pH 6,0, 1,34% de YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ de biotina e 1% glicerol) em cada poço. O conteúdo celular do controle negativo (X-33 não transformada) e de 23 colônias foi coletado individualmente com auxílio de palito de dente autoclavado e adicionado aos poços. A placa foi incubada a 28 °C, 48 h, 250 rpm. Então, ela foi centrifugada a 1.500 g, 10 min e o sobrenadante foi descartado. À cada poço foram adicionados 2 mL de meio indutor BMMY (meio BMGY com adição de 0,75 % (v/v) de metanol) e a alíquota de 0 h foi coletada. A placa foi incubada nas condições supracitadas e a cada 24h nova adição de metanol (para

concentração final de 0,75%) era realizada, bem como a coleta da alíquota para análise de expressão até o tempo final de 144h.

Uma colônia que expressava a proteína SL-CathL-mutSC foi usada para expressão em 100 mL de meio indutor BMGY. A proteína SI-CathL-CS foi expressa como descrita anteriormente (LIMA, 2016).

A purificação da SI-CathL-mutSC e da SI-CathL-CS foi realizada como descrito anteriormente (LIMA, 2016) e as diálises foram feitas contra tampão fosfato de sódio (10 mM, pH = 8,0) e membrana 14 kDa MWCO (Thermo Fischer) em 3 trocas de 1 h.

2.3.Caracterização funcional das proteínas SI-CathL-CS e SI-CathL-mutSC

2.3.1. Atividade sobre substrato complexo

Ambas as proteínas foram testadas frente a substrato complexo (leite em pó) e a cisteíno catepsina SI-CathL (FONSECA *et al.*, 2012) foi usada como controle positivo. Cerca de 1,5 µg de cada proteína foram incubados com 100 µL de solução de leite em pó 0,5 % (m/v) em tampão acetato de sódio 10 mM, pH = 5,0 a 37 °C em volume final de 1 mL. Alíquotas da reação foram retiradas a cada hora e analisadas em SDS-PAGE 15% (LAEMMLI, 1970).

2.3.2. Atividade enzimática sobre substrato específico e com inibidores

SI-CathL-CS e SI-CathL-mutSC foram avaliadas em teste de atividade sobre substratos específicos para cisteíno peptidases em espectrofluorímetro F-2500 Hitachi. Foram usados 2,5 µL de cada proteína purificada para o ensaio, de modo que as concentrações finais das proteínas na cubeta foram de 5 nM e 3 nM para SI-CathL-CS e SI-CathL-mutSC, respectivamente. Concentrações crescentes dos substratos Z-Phe-Arg-AMC, Z-Arg-Arg-AMC e Z-Leu-Arg-AMC foram usados para determinação das constantes cinéticas V_{max} e K_m . Concentrações crescentes de inibidor específico de cisteíno protease (E-64), e serino protease (PMSF) também foram utilizados para comprovar a reversão do resíduo de serina para cisteína no sítio catalítico da SI-CathL-mutSC, conforme descrito (BEYNON, 1991).

As proteínas foram incubadas com 3 mM de DTT (1,5 µL de solução estoque 1 M) por 5 minutos em volume final de 500 µL completados com tampão acetato de sódio (10 mM, pH = 5,0). Então, foram adicionadas concentrações crescentes (40 mM – 200 mM) dos diferentes substratos e o aumento da fluorescência foi monitorado por 100 segundos. Os substratos foram

diluídos para solução na concentração de 10 mM e 1 μ L de substrato era adicionado à cubeta. Após 100 s, entre 1 - 2 μ L de substrato era adicionado e nova leitura era feita. Foram realizadas ao menos 5 leituras com concentrações crescentes de cada substrato.

Para os ensaios com inibidores específicos, após a incubação da SI-CathL-mutSC com DTT por 5 minutos, 40 mM de substrato Z-Leu-Arg-AMC foi adicionado à cubeta e monitorado por 60 segundos. O ensaio da ausência de inibidor é feito para determinação da velocidade inicial (V_0). Então, concentrações crescentes de inibidor foram adicionadas à cubeta e a atividade foi novamente monitorada por 60 segundos. PMSF e E-64 foram preparados na concentração de 10 μ M e, após a determinação da V_0 , 1 μ L de inibidor era adicionado à cubeta e o valor de fluorescência era novamente monitorado por 60 s. Então, mais inibidor era adicionado e a nova velocidade medida. Esta etapa foi repetida até se obter ao menos 5 valores de velocidade na presença de concentrações crescentes de inibidor. A atividade residual (V_i), ou seja, porcentagem de atividade remanescente após a adição de inibidor, foi usada para determinação do $K_{i(app)}$ de acordo com Morrison (MORRISON, 1969). A determinação do valor de K_i foi feita com o auxílio do software GraFit versão 5 (LEATHERBARROW, 2001).

Todas as reações foram realizadas em cubeta de quartzo de 1 mL, 37 °C, triplicata e monitoradas a $\lambda_{ex} = 380$ e $\lambda_{em} = 460$ nm.

2.4. Ensaio de *Pull-down* entre as proteínas SI-CathL-CS e SI-CathL-mutSC e cistatinas

SI-CathL-CS (2,5 μ g) e SI-CathL-mutSC (2,5 μ g) foram incubados com 250 μ g de CaneCPI-1 (SOARES-COSTA *et al.*, 2002), previamente tratada com trombina para remoção da cauda de histidina, e 50 μ L de resina Ni-NTA Agarose (Thermo Fischer) em tampão de acetato de sódio 10 mM, pH = 5,5 para volume final de 1 mL, em banho de gelo e agitação suave. Após 2 horas, a mistura foi centrifugada a 13.000 g, 1 min, 4 °C e o sobrenadante foi coletado. Foram realizadas três lavagens com tampão de lise (100 mM NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris; pH = 8,0) e duas eluições com tampão de lise contendo 250 mM de imidazol. Todas as etapas foram seguidas de centrifugação e coletadas para análise em SDS-PAGE 15%.

2.4.1. Análise por *Western Blotting*

As amostras do ensaio de interação foram separadas em SDS-PAGE 15% (LAEMMLI, 1970) e transferidas para membrana de PVDF via *electroblotting* em tampão de transferência (Tris-HCl 200 mM, glicina 50 mM, metanol 20% (v/v)). A membrana foi incubada *overnight* em solução de bloqueio contendo leite em pó 5% (m/v) em tampão TBS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH = 8.0), e lavada com tampão TBS. A membrana foi incubada por 2 horas com o anticorpo comercial *Anti-His Antibody* (número de catálogo: GE27-4710-01, GE Healthcare) diluído 10.000 vezes ou com o anticorpo policlonal Anti-CPI-1 (SOARES-COSTA *et al.*, 2002) na proporção 1:5.000, lavada com tampão TBS e incubada por 90 minutos com anticorpo secundário *goat anti-mouse IgG* (número de catálogo: 074-1806, KPL) na proporção 1:5.000, lavada novamente com solução TBS e revelada com o substrato Clarity Max ECL *Western Blotting Substrates* (BioRad, CA, USA).

2.5. Docagem molecular estática

As estruturas das proteínas SI-CathL, SI-CathL-CS e SI-CathL-mutSC foram simuladas usando o servidor ModWeb (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/modweb/>) usando as configurações padrão e a energia foi minimizada usando o programa UCSF Chimera 1.15 (PETTERSEN *et al.*, 2004). A estrutura dos inibidores E-64 e PMSF foram extraídas pelo UCSF Chimera a partir dos seus códigos no Pubchem: 123985 e 4784, respectivamente. A docagem molecular estática foi feito no mesmo programa usando o software AutoDock vina (TROTT e OLSON, 2010), com grau de exaustividade 8 e diferença de energia entre determinação de modelos de 2 kcal/mol.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação de possíveis pseudo proteases do intestino médio de *S. levis*

A sequência codificadora da SL-CathL-CS foi primeiramente encontrada em biblioteca de cDNA do intestino médio das larvas de *S. levis* com 30 dias (PAULA, 2012). Além dela, outras 2 variantes, que também apresentam o resíduo de serina no lugar da cisteína, foram relatadas. A sequência foi clonada em vetor pPICZ α , transformado e expresso em *P. pastoris* linhagem KM71H, e induzido por metanol em 24 h (Lima, 2016).

O transcriptoma, feito por sequenciamento de RNA (RNAseq) em sequenciador Illumina Hiseq foi feito posteriormente, mas não tinha sido analisado. Na busca inicial foram encontradas 1221 sequências relacionadas, que foram filtradas para que a cobertura mínima fosse 40%, de modo a excluir fragmentos. Então foram recuperadas 121 sequências que foram individualmente analisadas de modo que do que aquelas que apresentam os aminoácidos Cys¹³⁹ e His²⁷² pertencentes à tríade catalítica foram consideradas (Fig. 1.1). As sequências foram divididas em três grupos de acordo com a similaridade com a SL-CathL: o grupo 1 apresenta entre 99 e 75% de similaridade, o grupo 2 apresenta entre 74,9 e 50% de identidade, e o grupo 3 compartilha entre 49,9% e 30% de similaridade.

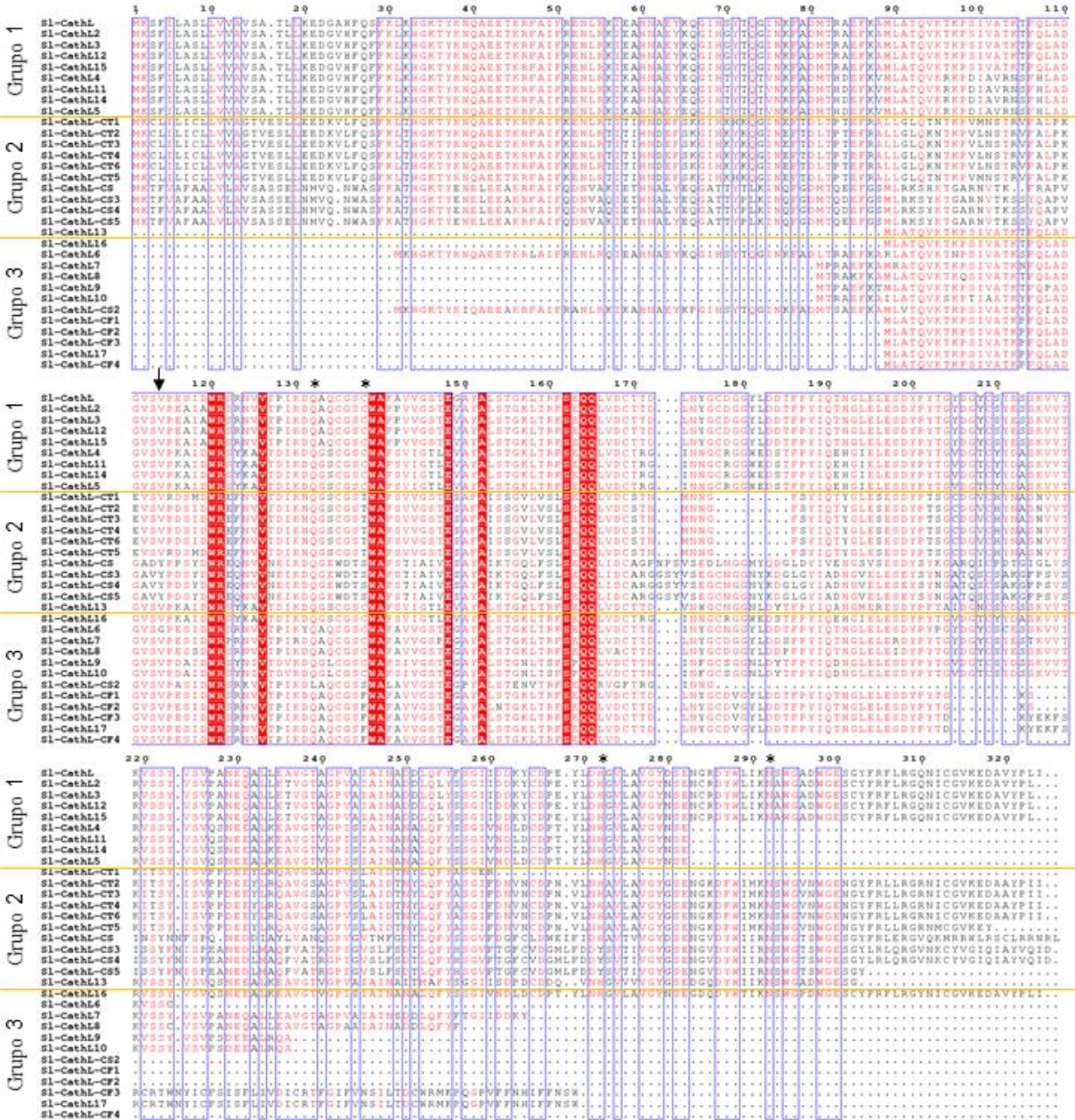


Figura 1.1. Proteínas relacionadas à SL-CathL identificadas no transcriptoma das larvas de *S. levis*. Os três grupos estão divididos com pela linha amarela e indicados à esquerda dos nomes das proteínas. As letras em vermelho representam os aminoácidos com alto grau de consenso, enquanto os aminoácidos representados em azul apresentam baixo consenso. A caixa vermelha mostra os aminoácidos idênticos entre todas as sequências alinhadas e a caixa azul indica bloco de aminoácidos similares. A seta indica o local de clivagem para maturação das proteínas e o asterisco mostra a tríade catalítica e o resíduo Gln¹³², que auxilia no processo de catálise.

Na análise do transcriptoma, a proteína SL-CathL-CS foi novamente encontrada, bem outras sequências que contém a alteração do resíduo de cisteína para outros aminoácidos. Estas sequências podem ser vistas em destaque na figura 1.2. Neste segundo alinhamento, mesmo as sequências que não apresentavam a tríade catalítica completa, mas que apresentavam resíduos

de aminoácidos diferentes da cisteína na posição 138 foram consideradas para disponibilizar visão mais abrangente das variantes encontradas.

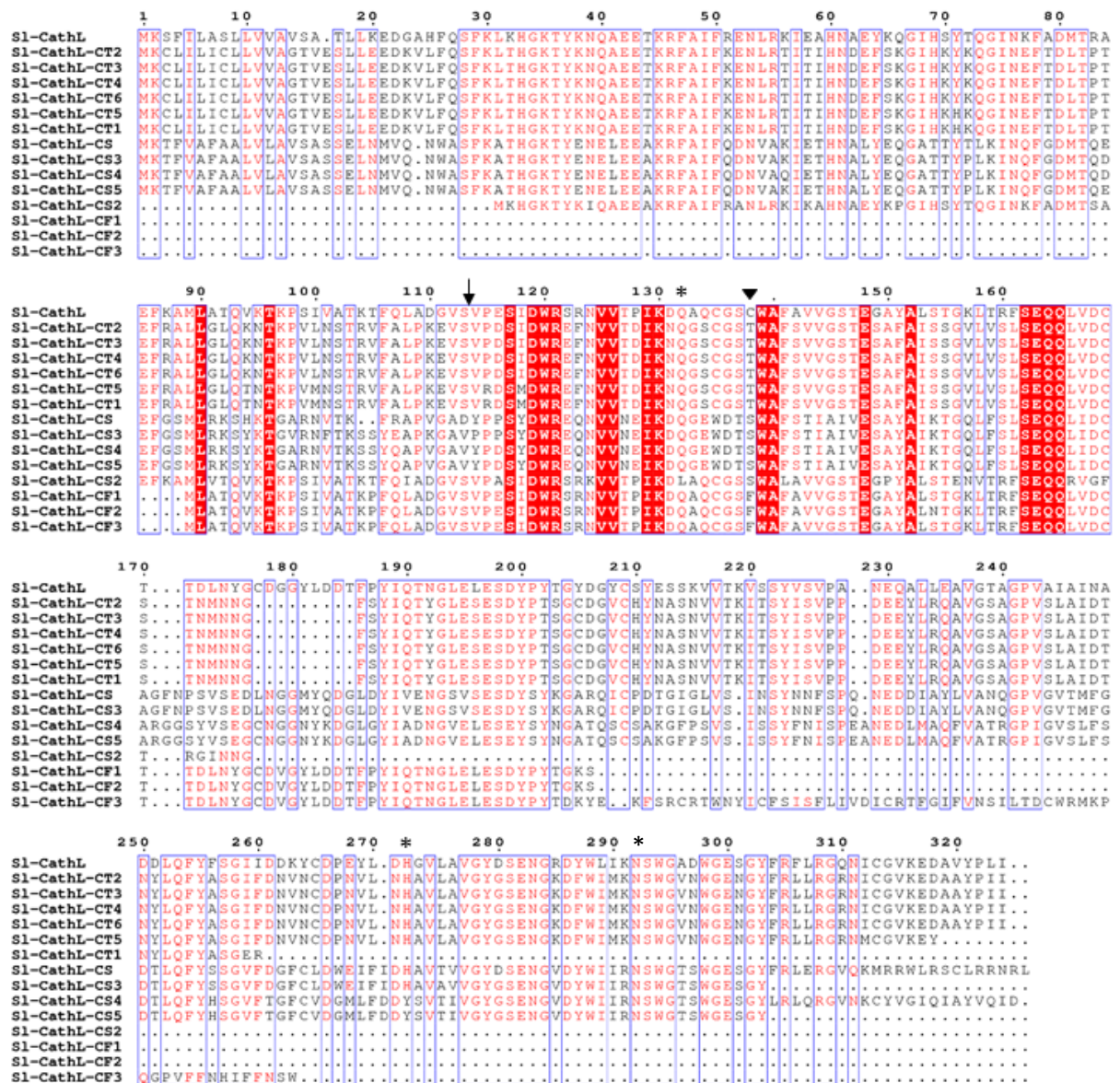


Figura 1.2. Variantes da SI-CathL que apresentam alterações na cisteína no sítio catalítico. Neste alinhamento foram incluídas sequências todas as sequências que apresentavam aminoácidos diferentes da cisteína na posição 138. As letras em vermelho representam os aminoácidos com alto consenso, enquanto os aminoácidos representados em azul apresentam baixo consenso. A caixa vermelha mostra os aminoácidos idênticos entre todas as sequências alinhadas e a caixa azul indica bloco de aminoácidos similares. A seta indica o local de clivagem para maturação das proteínas e o asterisco mostra a tríade catalítica e o resíduo Gln¹³², que auxilia no processo de catálise.

As variantes podem não possuir atividade catalítica e, algumas delas, não apresentam a tríade catalítica completa. As sequências que contém fenilalanina não possuem atividade de protease devido às características da cadeia lateral do aminoácido e à ausência da histidina que

forma a tríade catalítica. Já sequências que contêm treonina podem apresentar atividade catalítica. Serino, cisteíno e treonino proteases são conhecidas e descritas, sendo que a última classe está presente, em sua maioria, em proteassomos. (RAWLINGS *et al.*, 2018).

Como exposto anteriormente, a sequência SI-CathL-CS foi identificada anteriormente em bibliotecas de cDNA e foi escolhida para maiores estudos. Ainda, serino e cisteíno proteases dividem história evolutiva e são proteases importantes na digestão de inseto.

3.2. Expressão e atividade enzimática das proteínas SI-CathL-CS e SI-CathL-mutSC

A proteína mutante SI-CathL-mutSC foi expressa em *P. pastoris* a partir de 48 h de indução com metanol, com estabilização da expressão após 72 h (Fig. 1.3A). Assim, 72h de indução foi o tempo escolhido para produção da proteína em maior escala, resultando em aproximadamente 1,5 mg/L de proteína purificada. A purificação foi feita em coluna imobilizada com níquel (IMAC) e a proteína foi dialisada em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH = 8,0) e está mostrado na figura 1.1B. A proteína SI-CathL-CS foi induzida, purificada e dialisada conforme descrito anteriormente (LIMA, 2016).

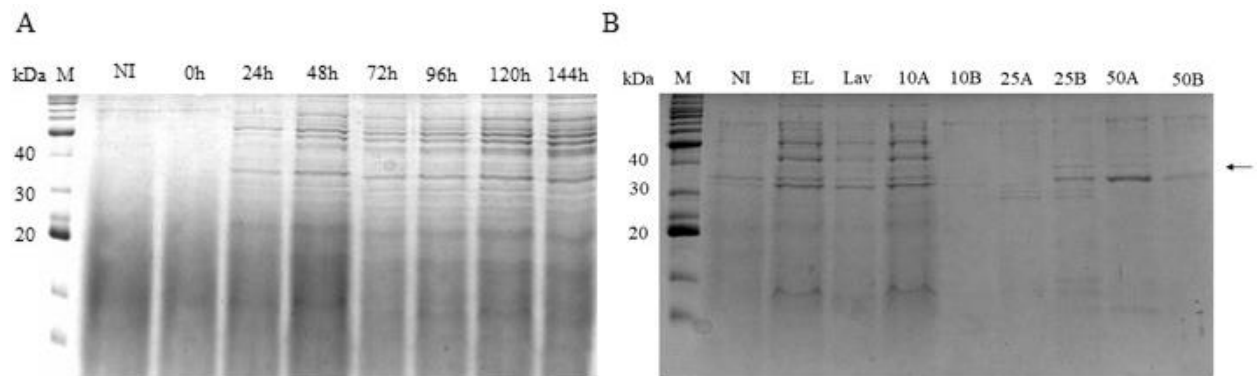


Figura 1.3. Screening e purificação da SI-CathL-mutSC. A) Alíquotas coletadas a cada 24h do screening de colônia que expressa a SI-CathL-mutSC. B) Purificação da SI-CathL-mutSC em coluna imobilizada com níquel. M: *Benchmark molecular weight marker* (Invitrogen). NI: fração não induzida. El: eluato. Lav: lavagem. Em A estão indicados o tempo de *screening* do qual cada fração foi obtida e em B a concentração de imidazol em mM usada para eluição de cada fração.

Nas figuras 1.3A e B é possível perceber a aparição de diversas bandas bem definidas com diversos tamanhos, incomuns à expressão de proteínas secretadas por *P. pastoris*. Este padrão é, provavelmente, causado pela ação da protease, que cliva proteínas da própria *Pichia*,

já que o maior de tempo de expressão ocasiona diminuição do pH do meio, e as cisteíno catepsinas são ativadas e têm atividade em meio ácido. Este mesmo padrão foi identificado na expressão de outras proteínas produzidas no Laboratório de Biologia Molecular, incluindo a legumaína de cana-de-açúcar CaneLEG2. Neste caso, a adição ao meio de um inibidor contendo a região C-terminal estendida da CaneCPI-3, responsável por inibição de legumaínas, evitou o processamento precoce da CaneLEG2, e a degradação de proteínas da levedura (BUZOLIN, 2014). Este perfil é o primeiro indício de que a SI-CathL-mutSC possui atividade catalítica.

SL-CathL-CS e SI-CathL-mutSC foram caracterizadas em relação à atividade enzimática e a cisteíno protease SI-CathL foi usada como controle. Na figura 1.3 é possível notar que o controle SI-CathL (Fig 1.4A) apresentou maior degradação, enquanto a proteína SI-CathL-CS (Fig. 1.4B) não foi capaz de hidrolisar o leite em pó, e SI-CathL-mutSC (Fig. 1.4C) degradou o leite em pó.

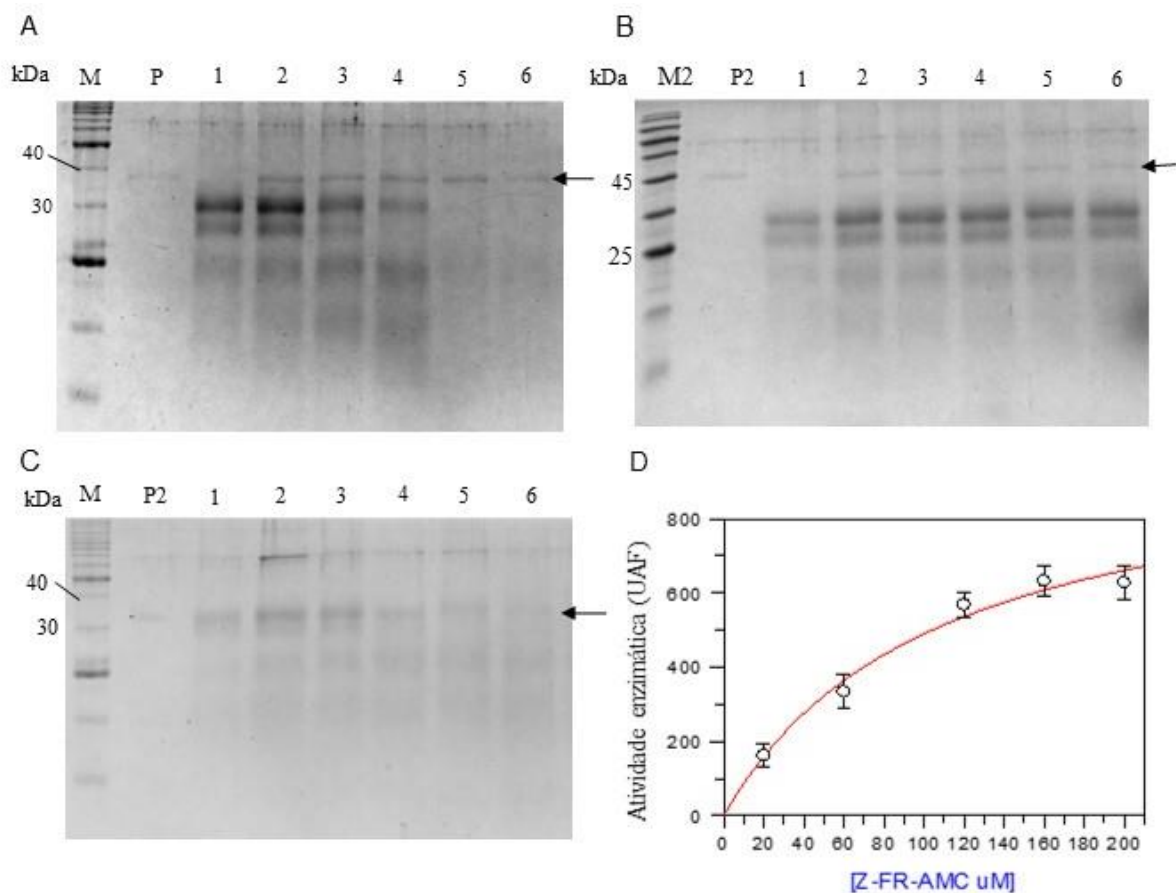


Figura 1.4. Atividade enzimática das proteínas SI-CathL-CS e SI-CathL-mutSC. Ensaio de degradação de substrato complexo com a) SI-CathL, B) SI-CathL-CS e C) SI-CathL-mutSC. As setas à esquerda indicam cada proteína, respectivamente; M: BenchMark Protein Marker (Invitrogen); M2: Prestained Protein Marker (Jena); 1-7: alíquotas de 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas. D) Curva da cinética da enzima SI-CathL-mutSC e sobre Z-FR-AMC, sendo que a atividade enzimática é mostrada em fluorescência.

Em seguida, foram realizados testes com os substratos específicos para cisteíno proteases: Z-Leu-Arg-AMC, Z-Arg-Arg-AMC e Z-Phe-Arg-AMC. SI-CathL-CS não mostrou atividade catalítica, enquanto SI-CathL-mutSC foi capaz de degradar exclusivamente o substrato Z-Phe-Arg-AMC (Fig. 1.4D), com $V_{\text{máx}} = 1017,61 \pm 134,55$ e $K_m = 107,66 \pm 31,82$. A preferência por fenilalanina na posição P2 sugere que há alargamento no sítio catalítico já que a cadeia lateral deste aminoácido é maior quando comparado com arginina e leucina. Os ensaios com inibidores seletivos com E-64 e PMSF confirmaram que a reversão da serina para cisteína na SI-CathL-mutSC. E-64 é um inibidor irreversível de cisteíno protease; já o PMSF é inibidor de serino proteases. E-64 foi capaz de inibir a proteína com $K_i = 2,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$, enquanto nenhuma inibição foi observada com adição de até 200 μM de PMSF.

A proteína SI-CathL-CS não mostrou atividade proteolítica sobre nenhum dos substratos testados, sendo eles o leite em pó desnatado (substrato complexo) e substratos específicos de cisteíno protease. Anteriormente, ela também foi testada sobre substratos fluorogênicos específicos de serino protease Abz-KLFSSK.Q-EDDnp (Sigma-Aldrich), Abz-FSKQ-EDDnp Abz-KNRSSKQ-EDDnp (AminoTech P&D Ltda., Diadema) e Abz-GIVRAK-EDDnp (AminoTech P&D Ltda., Diadema), sem mostrar atividade de serino protease (Lima, 2016).

Portanto, a presença da cisteína no sítio catalítico da proteína SI-CathL-mutSC conferiu atividade de protease à proteína, atividade que não foi reportada para a proteína SI-CathL-CS.

3.3. Ensaio de *Pull-down* entre as proteínas SI-CathL-CS e SI-CathL-mutSC e cistatinas

O ensaio de *pull-down* revelou que a pseudo cisteíno protease SI-CathL-CS interage com a CaneCPI-1 (Fig. 1.5A), uma cistatina da cana-de-açúcar, enquanto a mutação de apenas um resíduo na SI-CathL-mutSC diminuiu a interação (Fig. 1.5B). CaneCPI-1 foi previamente tratada com trombina para remoção da cauda de histidina e, para comprovar a remoção, foram feitos *Western blottings* usando anti-CaneCPI-1 como anticorpo primário (apresentado logo abaixo do SDS-PAGE), e com anticorpo Anti-His primário, mostrado na membrana inferior. Na membrana representada pela figura do meio, todas as bandas referentes à CaneCPI-1 são marcadas, enquanto no ensaio usando anticorpo Anti-His, apenas o controle não tratado com trombina é detectado, juntamente com as bandas referentes a SI-CathL-CS e SI-CathL-mutSC.

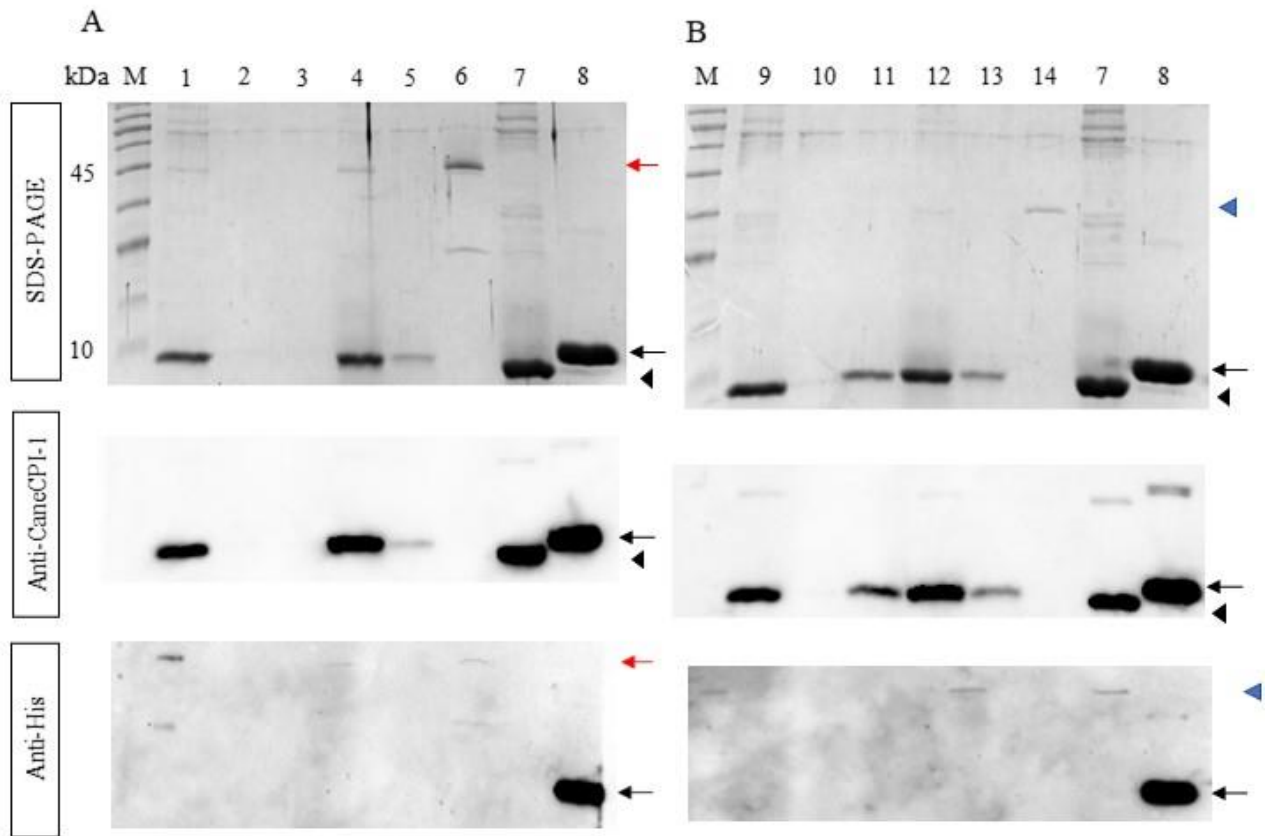


Figura 1.5. Pull down entre SI-CathL-CS, SI-CathL-mutSC e CaneCPI-1. A) *Pull-down* entre SI-CathL-CS e CaneCPI-1. A primeira figura representa o SDS-PAGE 15% entre as diferentes condições, enquanto a segunda e terceira imagem, de cima para baixo, são os ensaios de *Western blotting* usando anticorpo Anti-CaneCPI-1 e Anti-His (Invitrogen), respectivamente e como indicado à esquerda da figura. B) *Pull-down* entre SI-CathL-mutSC e CaneCPI-1 e membranas de *Western blotting* usando anticorpo Anti-CPI1 e Anti-His como anticorpos primários. M: Blue Classic Prestained Marker (Jena Biosciences). 1 e 9-eluat; 2-3 e 10-11: lavagens com tampão de lise; 4-5 e 12-13: eluições com tampão de lise contendo 250 mM de imidazol; 6: SI-CathL-CS; 14: SI-CathL-mutSC; 7: CaneCPI-1 tratada com trombina e 8: CaneCPI-1 com cauda de histidina. As setas pretas à direita indicam a CaneCPI-1; as cabeças de seta indicam CaneCPI-1 sem a cauda de histidina; seta vermelha indica a SI-CathL e a seta azul, SI-CathL-mutSC.

Na figura 1.5 é mostrado o ensaio de *pull-down* centre a proteína SI-CathL-CS e a CaneCPI-1 (Fig. 1.5A) e entre a SI-CathL-mutSC e a CaneCPI-1 (1.5B). No ensaio, foi feita a coleta do sobrenadante, 2 etapas de lavagem e 2 etapas de eluição com tampão de lise contendo 250 mM de imidazol. Como pode ser visto na figura 1.4 e nos poços 3 e 11, correspondentes à segunda etapa de lavagem, no poço 3 a CaneCPI-1 não é detectada, diferente do poço 11. A presença da CaneCPI-1 no poço 11 é confirmada pela sua banda correspondente indicada no *Western blotting* usando anti-CaneCPI-1 como anticorpo primário e indica que a canacistatina é detectada já na lavagem, ou seja, sua interação com a SI-CathL-mutSC não é forte como a sua interação com a SI-CathL-CS. A interação entre CaneCPI-1 e SI-CathL-CS resiste à etapa de

lavagem e a canacistatina apenas é eluída como complexo na presença de imidazol. Além disso, o *Western blotting* feito com anticorpo anti-His como primário confirma a remoção da cauda de histidina da CaneCPI-1 tratada previamente com trombina.

3.4. Docagem molecular estática

Os modelos estruturais das proteínas SI-CathL-CS e SI-CathL-mutSC mostraram que a fenda do sítio ativo da proteína SI-CathL-mutSC tem proximidade maior entre os aminoácidos envolvidos na tríade catalítica quando comparado ao sítio da SI-CathL-CS (Fig. 1.6)

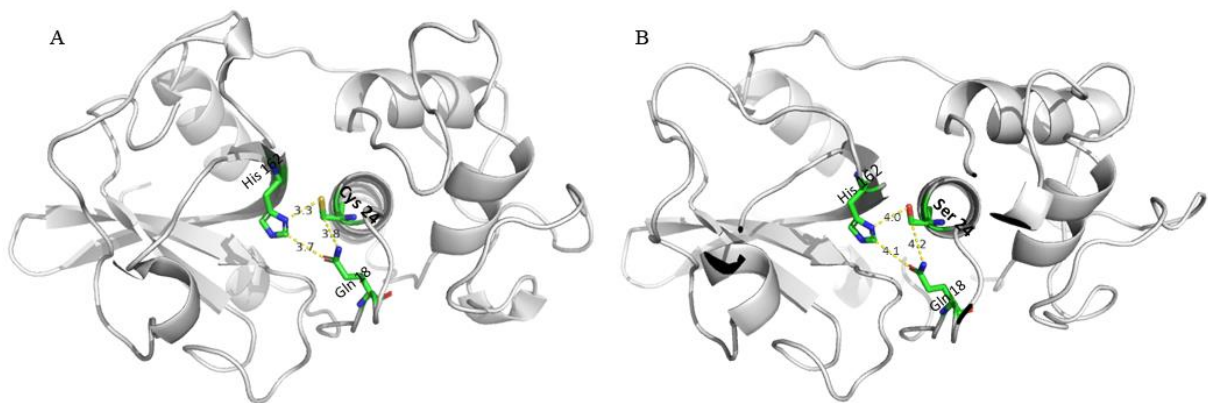


Figura 1.6. Comparação do sítio catalítico das proteínas SI-CathL-mutSC e SI-CathL-CS. A região em que localiza o sítio catalítico das proteínas SI-CathL-mutSC (A) e SI-CathL-CS (B) estão em evidência. Os aminoácidos Cys²⁴ e Ser²⁴ em A e B, respectivamente, a His¹⁶², presentes na tríade catalítica estão em evidência, bem como a Glu¹⁸, que auxilia na orientação do oxianion durante a catálise.

Como pode ser visto na figura, a alteração do resíduo de serina da SI-CathL-CS para cisteína na SI-CathL-mutSC levou a alteração da distância entre as cadeias laterais dos aminoácidos importantes para o mecanismo de catálise. Estes aminoácidos, na proteína SI-CathL-mutSC, estão mais próximos, o que pode ser favorável para a hidrólise de substratos. Analisando o possível sítio ativo da SI-CathL-CS, o maior distanciamento entre as cadeias laterais dos aminoácidos importantes para acomodação do substrato pode indicar a falta de atividade, como foi reportado experimentalmente.

A docagem molecular estática foi usada para avaliar a interação entre as proteínas SI-CathL (Fig. 1.7A) SI-CathL-mutSC (Fig. 1.7B) e SI-CathL-CS (Fig. 1.7C) e o inibidor E-64. Uma vez que a proteína SI-CathL-CS apresenta o resíduo de serina no sítio catalítico, também foi criado um modelo de interação entre a proteína e PMSF (Fig. 1.7D). A protease SI-CathL foi modelada com o E-64 e usada para comparação. Neste ensaio, foram considerados

principalmente os resíduos Cys²⁴ ou Ser²⁴, Asp¹⁶¹ e Gly⁶⁶, presentes na cavidade oxianion que acomoda o E-64 na cathepsina L humana (FUJISHIMA *et al.*, 1997).

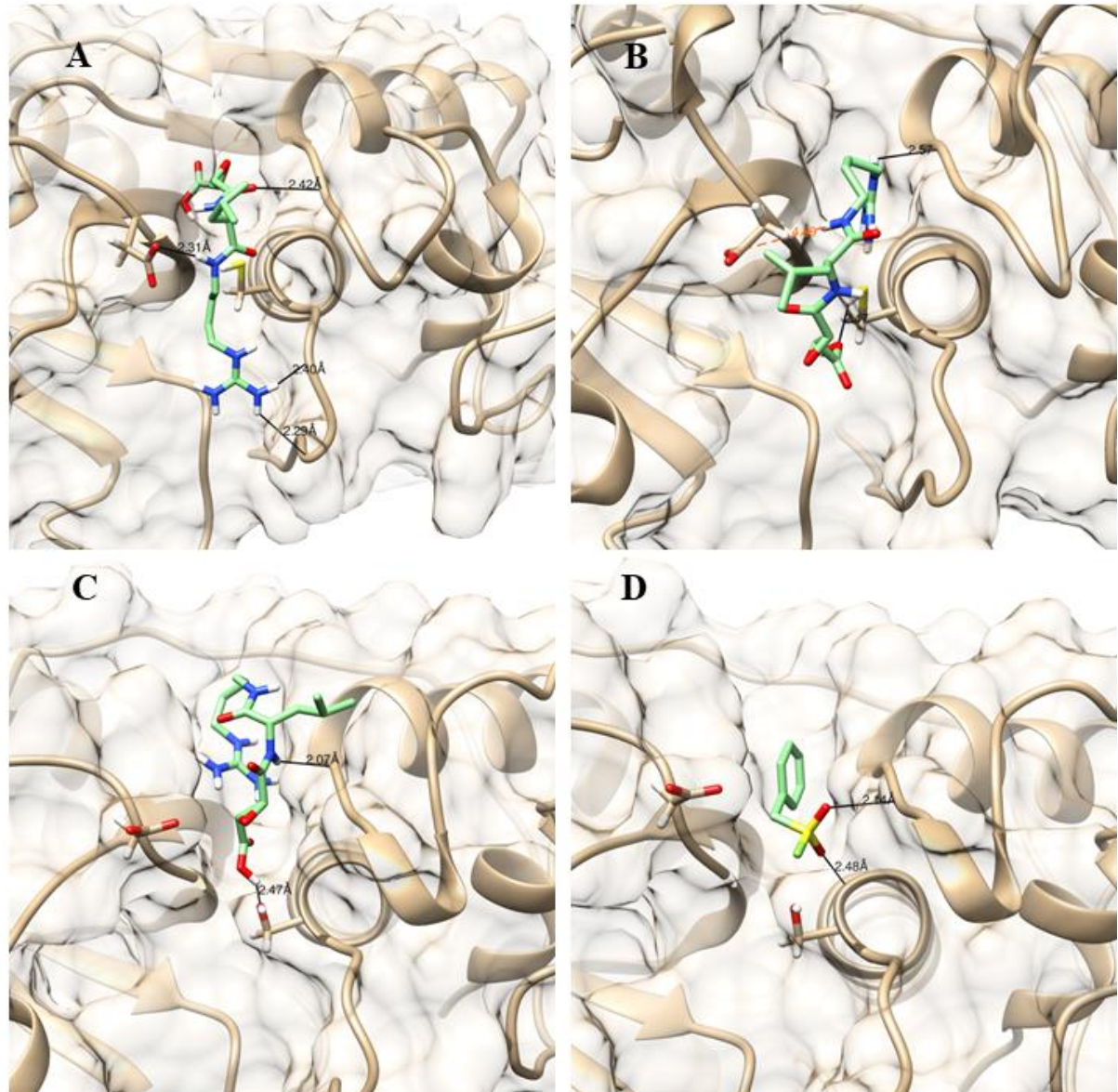


Figura 1.7. Docagem molecular estática entre SI-CathL, SI-CathL-CS, SI-CathL-mutSC e inibidores. A) interação entre SI-CathL e E-64. Este modelo revela que o E-64 encaixa-se no sítio ativo da SI-CathL como descrito para a Cathepsina L humana, formando 4 pontos de interação. B) Interação entre SI-CathL-mutSC e E-64. O E-64 acomoda-se no sítio ativo da proteína, e eles dividem dois pontos de interação. C) docagem molecular entre SI-CathL-CS e E-64. Na simulação, o E-64 não adquire conformação esperada na interação com cisteíno proteases. D) simulação entre SI-CathL-CS e PMSF. O inibidor não se estabiliza em posição esperada como em serino proteases. As proteínas e suas superfícies estão representadas em cinza, enquanto os inibidores são coloridos de acordo com o átomo: C em verde, N em azul, O em azul e S em amarelo. As linhas pretas representam as interações entre átomos com a distância mostrada em Å. A linha laranja pontilhada indica a interação que deveria acontecer entre os dois átomos.

No ensaio de interação molecular, a Sl-CathL foi usada como modelo. A protease acomoda o inibidor E-64 (Fig.1.7A) como esperado e descrito para catepsina L humana com 4 pontes (FUJISHIMA *et al.*, 1997). A proteína mutante Sl-CathL-mutSC também acomoda o E-64 na cavidade oxianion (Fig. 1.7B), mas forma menos interações, e a interação que poderia ser formada como o modelo simulado para a Sl-CathL está indicada com a linha laranja pontilhada. Este resultado está em acordo com os obtidos experimentalmente, nos quais a adição de E-64 na reação da protease com o substrato foi capaz de inibir a proteólise. O Ki observado entre a Sl-CathL-mutSC e o E-64 foi maior do que o reportado para a Sl-CathL, muito provavelmente pois o inibidor faz menos interação com a SL-CathL-mutSC quando comparado à Sl-CathL. A modelagem entre Sl-CathL-CS mostrou que a proteína não interage eficientemente com o E-64 (Fig. 1.7C) e com o PMSF (1.7D).

Os resíduos de aminoácido serina e cisteína possuem cadeias laterais polares, não carregados e eletronegativos, sendo que mutações entre eles são consideradas conservadas. No entanto, a reversão do resíduo de serina para cisteína levou a alteração na capacidade de ligação entre a proteína e a canacistatina CaneCPI-1. Exemplos de alteração ou até mesmo perda da atividade de protease quando há a reversão entre resíduos de cisteíno/ serino são conhecidos: a mutação de cisteíno para serino em tirosinase de ratos resulta em fenótipo albino (YOKOYAMA *et al.*, 1990), e a mesma alteração em proteína ligante de sulfato de *Salmonella typhimurium* levou a diminuição de mais de 3.000 vezes entre a proteína e o sulfato (HE e QUIOCHO, 1991). A mutação reversa, ou seja, de um resíduo de serina para cisteína, em proteínas repressoras do operon triptofano causa diminuição da afinidade do repressor ao triptofano e/ou ao DNA, dependendo da posição (CHOU e MATTHEWS, 1989); e a mesma mutação em β -lactamases de *Bacillus licheniformis* desestabiliza a estrutura da enzima, causando alteração o seu dobramento e consequente perda de função (SANTOS *et al.*, 2007).

A relação entre plantas e insetos herbívoros é fruto de processo co-evolutivo muito bem coordenado. Por um lado, os insetos produzem um arsenal de proteases e enzimas que permitem e facilitam a sua alimentação, por outro lado, as plantas produzem diversos inibidores de enzimas. (LOPES *et al.*, 2004; WAR *et al.*, 2012; ZHU-SALZMAN e ZENG, 2015). A presença destes inibidores atua como pressão seletiva nos insetos, alterando o padrão de expressão de enzimas em seus sistemas digestórios. Existem 4 principais maneiras compensatórias que insetos adotam para contornar a presença de inibidores: (i) aumento da expressão da protease alvo do inibidor, de modo a compensar a inibição; (ii) expressão de proteases insensíveis aos inibidores; (iii) produção de proteases que degradam tais inibidores; (iv) expressão de isoformas das proteases-chave; porém é comum que haja combinação de mais

de uma estratégia (ZHU-SALZMAN e ZENG, 2015). Além dos mecanismos moleculares, insetos que são alimentados com plantas que expressam inibidores proteicos podem apresentar comportamento hipertrófico com aumento da taxa e velocidade de alimentação, de modo a compensar a necessidade nutricional (CLOUTIER *et al.*, 2000).

No caso da SI-CathL-CS, os resultados indicam que a proteína é fruto de um quinto mecanismo molecular de proteção, na qual o inseto produz uma proteína semelhante à protease chave capaz de interagir com o inibidor. A SI-CathL-CS pode atuar de maneira aditiva ou sinérgica com as proteases chaves, ao interagir com as fitocistatinas da cana-de-açúcar, sequestrando-as, de modo a impedir sua atuação contra proteases chave.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DA CANACISTATINA CANECPI-5 EM PLANTAS

1. Introdução

Canacistatinas apresentam potencial inibitório frente à diversas cisteíno catepsinas, característica que as torna bastante versáteis em diversos usos (SHIBAO *et al.*, 2021). Dentre elas, a CaneCPI-5 é bastante interessante para produção comercial e, para suprir a demanda industrial, é necessária a produção da CaneCPI-5 em modelos que facilitem o seu escalonamento e obtenção em menor tempo.

1.1. *Molecular Farming*

Plantas são usadas como biorreatores desde a década de 80. Elas podem ser usadas tanto para a produção e obtenção de metabólitos secundários (micromoléculas), como para produção proteínas de interesse, e este processo é chamado *Molecular farming* (FISCHER *et al.*, 2015).

Devido ao custo-benefício, segurança, controle do meio em que crescem e grande quantidade de proteína expressa, elas são alternativas atrativas à expressão heteróloga em bactérias, leveduras e células de mamíferos (HAKKINEN *et al.*, 2013; SACK *et al.*, 2015). O primeiro passo é a escolha do hospedeiro mais adequado para a produção da molécula de interesse; quando se trata de peptídeos e proteínas, é importante a combinação entre promotor, desenho do transgene e direcionamento intracelular da produção da proteína; seguido da análise de padrão de glicosilação desejado e verificação da variabilidade das linhagens dos transgênicos gerados (FISCHER *et al.*, 2015)

Diversas proteínas com potencial biotecnológico já foram expressas em diferentes plantas, como anticorpos em tabaco (HAKKINEN *et al.*, 2013), avidina, β -glucuronidase (GUS) e tripsina em milho (HORN *et al.*, 2004), e até anticorpos monoclonais (FLOSS *et al.*, 2007; SACK *et al.*, 2007). Um dos marcos no *Molecular farming* foi a aprovação do uso de uma glucocerebrosidase para tratamento para doença de Gaucher, produzida em células de raiz de cenoura, em 2012 para adultos e 2014 para tratamento pediátrico (FOX, 2012; PASTORES *et al.*, 2014). Mais recentemente, a biofarmacêutica Medicago estuda o desenvolvimento de uma vacina do tipo *Virus-Like Protein* (VLP) contra o COVID-19 em tabaco (<https://www.gsk.com/en-gb/media/press-releases/medicago-and-gsk-announce-start-of-phase-23-clinical-trials-of-adjuvanted-covid-19-vaccine-candidate/>, acessado em 20/01/21), e mesma companhia já obteve a autorização emergencial para vacina contra influenza H3N2 e ter minou com sucesso a fase 3 de ensaios clínicos para uma vacina contra gripe sazonal (TREGONING, 2020; WARD *et al.*, 2020).

Dentre as diversas plantas que podem ser usadas para MF, as espécies de tabaco *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana tabacum* são de particular interesse. Estas espécies são usadas para expressão transiente, estável (através da geração de plantas transgênicas ou por transformação de células) e em sistemas livres de células (lisados celulares), por possuírem metodologia de transformação, manutenção e armazenamento bem estabelecidas (AN, 1985; HELLWIG *et al.*, 2004; HORN *et al.*, 2004; LIENARD *et al.*, 2007; BUNTRU *et al.*, 2014). Além disso ambas as espécies possuem genoma já sequenciado e conhecido, o que possibilita a criação de novas linhagens por meio de edição gênica (BOMBARELY *et al.*, 2012; EDWARDS *et al.*, 2017).

O escalonamento da produção de proteínas recombinantes é fácil e rápido, principalmente na expressão transiente e estável em células. Na expressão transiente, é possível fazer a infiltração de mais folha usando vácuo para preparação em escala maior. A produção estável em células é feita em biorreator, e o número de células/ biorreatores podem ser facilmente adequadas (SCHIERMEYER, 2019). Ademais, é possível utilizar estratégias como aumento de expressão mediada por íntron (IME- do inglês *intron mediated enhancement*) e direcionamento para diferentes organelas celulares, de modo a evitar a degradação indesejada da proteína alvo por proteases endógenas ou secretadas (LAXA, 2016; MANDAL *et al.*, 2016).

1.2. Cana-de-açúcar como modelo de expressão heteróloga

A cana-de-açúcar é um dos destaques do setor agrícola brasileiro, sendo que o eixo centro-sul o responsável por mais de 90% da produção. Entre os anos 2019-2020, mais de 8 milhões de hectares foram usados no plantio de cana-de-açúcar (CURSI *et al.*, 2021). Além disso, ela apresenta alta taxa de crescimento em regiões tropicais, além de metabolismo C4 que lhe confere alta produção de biomassa, podendo produzir grandes quantidades de proteínas recombinantes. Atualmente, são cultivados híbridos interespecíficos de *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum*, principalmente (BRUMBLEY *et al.*, 2008).

Em um primeiro momento, o uso da cana-de-açúcar como biofábrica foi voltada para a produção de açúcares, como o sorbitol (CHONG *et al.*, 2007) e a isomaltulose (WU e BIRCH, 2007). O desenho experimental foi feito considerando que a planta já produz eficientemente outros açúcares (sacarose e frutose) em grande quantidade, o que indica que já possui maquinaria refinada para a produção dessa classe de compostos. Seguindo a onda verde, num segundo momento, a cana-de-açúcar foi modificada para viabilizar a produção de bioplásticos (PETRASOVITS *et al.*, 2007; PURNELL *et al.*, 2007). Mais recentemente, esta planta foi usada

como biofábrica para produção de proteínas recombinantes com interesse comercial (PALANISWAMY *et al.*, 2015; DAMAJ *et al.*, 2020).

Em plantas, o vacúolo lítico pode ocupar mais que 80% do volume celular, sendo um alvo proeminente para produção de proteínas heteróloga que sejam estáveis em seu ambiente ácido (MARTY, 1999; FRIGERIO *et al.*, 2008). As proteínas *Green fluorescent protein* (GFP), aprotinina, um inibidor enzimático, e a β -glucuronidase (GUS) já foram produzidas em vacúolos líticos e isoladas a partir do suco da cana, com rendimento estimado entre 4,8 e 7,2 kg/acre, considerando o cultivo de 40.000.000 canas por acre, produzindo aproximadamente 1 mg de proteína liofilizada por mL de garapa (PALANISWAMY *et al.*, 2015).

Diante do panorama exposto, usar plantas como sistema de expressão heteróloga é uma alternativa interessante para suprir a demanda industrial de possíveis produtos contendo a CaneCPI-5. Este capítulo apresenta a produção da CaneCPI-5 em sistemas baseado em tabaco e cana-de-açúcar.

2. Material e métodos

2.1. Construção dos cassetes de expressão

2.1.1. Construção dos plasmídeos para expressão em *Nicotiana spp.*

Foram construídos plasmídeos para expressão transiente em *N. benthamiana* com direcionamento a diferentes organelas, sistema livre de células (lisado celular) e expressão estável em células de *N. tabacum* cv. *Bright Yellow-2 (BY-2)*. Esta parte foi feita no Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology (IME), sob orientação do Dr. Andreas Schiermeyer.

Para construção do plasmídeo usado no sistema livre de células, também chamado *in vivo translation (ivt)*, a região codificante da CaneCPI-5 clonada em vetor pET28 (Invitrogen), e o vetor pLenex (Lenibio, Alemanha) foram digeridos com as enzimas de restrição *NcoI*-HF e *BamHI*-HF (New England Biolabs, EUA). Inseto e plasmídeo foram purificados de gel de agarose 1% com NucleoSpin Gel e com o PCR Clean-Up kit (Macherey-Nagel) e ligados numa reação de proporção molar 1:3 (inseto: plasmídeo). A reação foi feita com 1U de T4 DNA ligase (New England Biolabs), cerca de 100 ng de plasmídeo e 20 ng de inseto, em reação com volume final de 20 μ L, *overnight*, a 15 °C. A ligação (10 μ L) foi transformada em *E. coli* 10- β por choque térmico, plaqueadas em meio LB contendo canamicina (50 mg/L) e as colônias obtidas foram usadas para extração plasmidial. Após a confirmação por sequenciamento, um plasmídeo foi escolhido para o *ivt*.

Os plasmídeos usados para expressão transiente e estável são os mesmos. Nesta etapa, diferentes sinais de direcionamento celular foram adicionados à sequência da canacistatina: KDEL para retículo endoplasmático (MUNRO e PELHAM, 1987); RVGFAEAA, determinante vacuolar C-terminal (ctVSD) identificado a partir de uma aspártico protease de *Cynara cardunculus* (RAMALHO-SANTOS *et al.*, 1998), além da manutenção do próprio peptídeo sinal da CaneCPI-5, com direcionamento ao apoplasto. Também foram construídos plasmídeos com o íntron de catalase usado tradicionalmente para aumento de expressão de proteínas em vetores binários (HAJDUKIEWICZ *et al.*, 1994) e com domínio de granulina, que direciona ao vacúolo (YAMADA *et al.*, 2001). Genes sintéticos contendo as sequências da CaneCPI-5 com peptídeo sinal e íntron da catalase e domínio de granulina foram otimizados para expressão em *Nicotiana spp* com ferramenta disponível em (<https://eu.idtdna.com/CodonOpt>, acessado em: 09.08.2019). Os outros construtos foram obtidos a partir da amplificação com primers contendo

as sequências desejadas. Os genes sintéticos e primers continham sequência de 30 nucleotídeos que permitiu a clonagem por *Gibson Assembly* (GIBSON *et al.*, 2009) em vetor pTRa (NOLKE *et al.*, 2003), usando Hi-Fi DNA Assembly Cloning Kit (New England Biotechnologies, USA). Os primers e genes sintéticos e o local de direcionamento celular podem ser vistos na tabela 2.1 e a representação gráfica na figura 2.1.

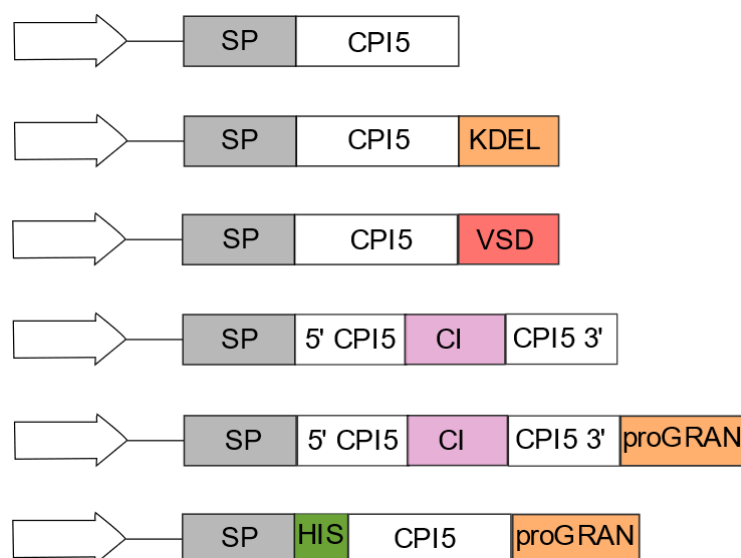


Figura 2.1. Representação gráfica dos cassetes de expressão. A seta representa o promotor 35S. SP: peptídeo sinal (*signal peptide*). CPI5: CaneCPI-5. ctVSD: sinal de direcionamento vacuolar (*vacuolar sorting determinant*). KDEL: sequência direcionadora ao retículo endoplasmático. CI: intron da catalase. proGRAN: sequência da granulina. his: His-tag. Quando não indicado, a cauda de histidina estava na região C-terminal, antes do sinal de direcionamento celular. A representação não está em escala.

Os genes sintéticos e vetor pTRA foram digeridos com as enzimas *NcoI*-HF e *BamHI*-HF, purificados de gel e clonados usando o NEBuilder Hi-Fi DNA Assembly Cloning Kit (New England Biotechnologies, USA) com 1x Nebuilder Mix (10 μ L), 8 μ L de pTRAkt, 2 μ L dos genes sintéticos (10 μ M), em reação de 20 μ L. A reação aconteceu a 50 °C por 15 min em Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, California, USA). Então, 4 μ L da reação foram usados para transformação em células de *E. coli* 10- β por choque térmico.

Tabela 2.1. Plasmídeos, direcionamento celular e sequências.

Plasmídeo	Direcionamento	Gene sintético/primer
pTRAkt_cpi5_ctVSD	Vacúolo	Gene sintético
pTRAkt_cpi5_KDEL	Retículo endoplasmático	pTRAkt_fw: 5'GGATCCGATCCTCTAGAGTCCGCAAAAATC 3' pTRAkt_cpi5_His_KDEL_rev: 5'PhosTCAGAGCTCATCTTTATGGTGATGGTGGTGATG TGCACGAGG 3'
pTRAkt_cpi5_apo	Apoplasto	pTRAkt_fw pTRAkt_cpi5_His_rev 5'PhosTCAATGGTGATGGTGGTGATGTGCACGAGG 3'
pTRAkt_cpi5_intron	Apoplasto	Gene sintético
pTRAkt_cpi5_His_pro_g ran	Vacúolo	Gene sintético
pTRAkt_SP_His_cpi5_g ran	Vacúolo	Gene sintético

Os insertos foram obtidos por PCR usando os parâmetros: 95 ° C por 2 minutos seguidos por 25 ciclos de 95 ° C por 20 segundos, 60 ° C por 30 segundos, 70 ° C por 4 minutos, extensão final a 70 ° C por 7 minutos. Nas reações foram usados 1,5 mM de MgSO₄, 0,2 mM de dNTP, 10 µM de cada primer (Tabela 2.1); 0,5 ng de molde pTRAkt_cpi5_ctVSD, 1x tampão para KOD Hot Start DNA Polymerase, 1 U de KOD Hot Start DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, USA) em volume final de 50 µL. Os insertos e o vetor pTRA foram digeridos, ligados e transformados como os genes sintéticos. Todos os plasmídeos tiveram sua sequência confirmada por sequenciamento. Os mapas completos dos plasmídeos estão disponíveis no anexo 1.

2.1.2. Construção do cassete de expressão para cana-de-açúcar

A sequência codificante da CaneCPI-5 foi amplificada por PCR usando os *primers forward* CPI-5_cana_fw (5-AAAAACTAGTATGGGCAGCAGCCATCATCA-3') e *reverse* CPI-5_cana_rv (5'-AAAAAACACGTGTCAGTGGGCGCGGGGCG-3') com sítios de restrição para as enzimas *Spe*I e *Pml*I (indicados pelo sublinhado), respectivamente. O programa e reação de PCR usados foram os mesmos usados por Miguel (2014) e o amplicon obtido foi analisado em gel de agarose 1%.

A reação de ligação foi realizada usando a razão molar 3:1 (inserto:vetor) e vetor pSBI-MF22 (Fig. 2.2.), doado pelo Dr. Subramonyan e o mapa completo está disponível no Anexo II. A ligação foi com 100 ng do vetor, aproximadamente 10 ng do inserto em tampão de ligação 1X, 5 U de T4 DNA Ligase e água para completar volume de 20 µL. A reação foi incubada por

16 h a 4 °C. Cerca de 100 ng do produto de ligação foram utilizados para transformar células de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes. As células transformadas foram plaqueadas em meio sólido contendo canamicina (50 μ g/mL), e as colônias recombinantes foram identificadas por PCR de colônia.



Figura 2.2. Representação esquemática do cassete de expressão do vetor pSBI-MF22. O vetor foi alterado a partir do vetor comercial pCAMBIA 1305.2. Port ubi882: sequência promotora. SP: peptídeo sinal. VT78: sinal de direcionamento para vacúolo lítico. CI: intron da catalase. Modificado de Palaniswamy, 2015.

Para a PCR de colônia, as colônias picadas com palitos de dentes foram amplificadas em reação contendo tampão 1X, 0,4 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmol de *primers* Cane5_cana_fw e NOSr (5'-CCCGATCTAGTAACATAGATGA-3'), 1 U *Taq* DNA Polymerase (Thermo) e água para 20 μ L. O programa para PCR foi composto por ciclo de desnaturação a 94 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s e 72 °C por 90 s, seguidos de extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Após confirmação por PCR, o plasmídeo denominado pSBI_CaneCPI-5 foi obtido com QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) e teve sua sequência confirmada por sequenciamento.

2.2. Mobilização do plasmídeo em *Agrobacterium tumefaciens* para expressão em *Nicotiana spp.*

Os plasmídeos usados para expressão transiente, estável e *inv* foram mobilizados em *A. tumefaciens* GV3101 por eletroporação (DOWER *et al.*, 1988). Cerca de 0,25 ng de plasmídeo foram adicionados a 50 μ L de *A. tumefaciens* e incubados em gelo por 30 min. A mistura foi transferida para cubeta (0,1 cm) e submetida a choque elétrico a 2.500 V por 5 ms em Multiporator (Eppendorf, Alemanha). Então, 950 μ L de meio SOC (Thermo Fischer) e a suspensão foi incubada por 2 h, 160 rpm, 26 °C. Finalmente, 5 e 100 μ L foram plaqueados em meio YEB (1,5 % ágar - Himedia, 0,5 % extrato de carne - Himedia, 0,5 % peptona - Himedia, 0,5 % sacarose – JT Baker, 0,1 % extrato de levedura – Himedia, 2 mM Mg₂SO₄ – JT Baker) com carbenicilina (50 mg/L), rifampicina (50 mg/L) e canamicina (25 mg/L) e incubados a 26 °C por 3 dias.

Colônias que continham o plasmídeo foram identificadas por PCR de colônia. Na reação, foram usados 1 x PCR Master Mix (i-MAX II) (Intron Technologies), 0,4 mM de

primers *forward* 35S_seq2 (5'-ATCCTTCGCAAGACCCTTCC-3') e *reverse* PS3_back (5'-AGAGAGAGATAGATTTGTAGAGA-3'), 5 µL de material celular previamente fervido por 10 min, e água deionizada para completar volume final de 25 µL.

2.3. *in vivo* translation (*ivt*) em lisado de células BY-2

Lisado de células *N. tabacum* cv *Bright Yellow*- (BY-2) foram cedidas pelo Dr. Mathias Buntru (IME, Fraunhofer Gesselchaft), que as preparou como descrito anteriormente (BUNTRU *et al.*, 2014). Para a expressão, 1 mg do plasmídeo pLeNex_cpi5 foi adicionado a 49 µL de lisado de células. *ivt* foi feito em microplaca Cell Star de 96 poços, preta e opaca (Greiner Bio-one) por 48 h, 25 °C, 75% de umidade, 500 rpm em Shaker LT-X Lab-Therm (Kuhner, Suíça). Os plasmídeos contendo proteína plasmídeos contendo sequência codificante para *Yellow Fluorescent Protein* (eYFP) e a proteína alérgena de soja Gly m 5 (HOLZHAUSER *et al.*, 2009), usados como controle de expressão visual e para o *Western blotting*, respectivamente.

2.4. Expressão transiente em folhas de *N. benthamiana*

Uma colônia de *A. tumefaciens* GV3101 contendo o plasmídeo foi incubada em 20 mL de meio YEB contendo canamicina (25 mg/L) e rifampicina (50 mg/L) a 26 °C, 160 rpm por 3 dias. O meio foi centrifugado a 4.000 g por 10 min. O *pellet* foi ressuscitado em 10 mL de meio de infiltração (0,5 % de Fertyl®2-Mega, composição disponível no Anexo I) e a solução foi diluída em água até alcançar OD₆₀₀ entre 0,9 e 1.

A expressão transiente foi feita em plantas com aproximadamente 8 semanas. A aplicação do meio contendo *A. tumefaciens* foi feita na face abaxial de folhas jovens, com auxílio de seringa. Após a infiltração, as plantas ficaram em quarto a 22 °C, fotoperíodo 16h/8h, por 5 dias.

2.5. Expressão estável em células BY-2

O inóculo foi preparado como no item acima em volume de 20 mL e 25 µL de acetoseringona (100 mg/L) foram adicionados. Três mililitros de suspensão de células BY-2 foram transferidos para placa de petri com 150 µL da suspensão de agrobactéria e a placa foi gentilmente misturada. A placa foi mantida no escuro, por 10 dias, a 26 °C. O co-cultivo foi

transferido para placas contendo meio sólido Murashige and Skoog (2% ágar, MS) com canamicina (100 mg/L) e incubado por 6 semanas, 26 °C, escuro. Os calos obtidos foram transferidos para nova placa de petri contendo meio sólido MS com canamicina e crescidos nas mesmas condições.

2.6. Mobilização do plasmídeo em *Agrobacterium tumefaciens* para transformação de cana-de-açúcar

A mobilização de agrobactéria foi realizada usando o método de congelamento e descongelamento. *A. tumefaciens* da linhagem EHA105 foram mobilizadas com cerca de 90 ng de plasmídeo Psbi-CaneCpi-5. *A. tumefaciens* EHA 105 foi inoculada em 5 mL de meio YEP (1% peptona - Himedia, 1% extrato de levedura - Himedia, cloreto de sódio 5 g/L – Merck) contendo 10 mg/L de rifampicina e deixada crescer por 16 h, 28 °C, 150 rpm. Após alcançar $DO_{600} = 0,8 - 1$, 1 mL do pré-inóculo foi colocado para crescer em 50 mL de meio YEP contendo 10 mg/L de rifampicina pelo mesmo tempo. Então, o meio foi centrifugado a 15.000 g, 5 min, 4° C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de solução gelada de cloreto de cálcio 20 mM. O plasmídeo foi adicionado em alíquota de 200 µL de *A. tumefaciens*, e congelada por 15 s em nitrogênio líquido e mantida em banho maria a 37 °C por 5 min. Após este tempo, foram adicionados 800 µL de meio YEP e o tubo foi mantido a 28° C, 150 rpm por 3 h. O conteúdo foi centrifugado a 10.000 g, 4 °C, 5 min. O *pellet* foi ressuscitado em 200 µL do próprio meio e plaqueado em meio YEP sólido (YEP com 7,5 g/L de ágar), 50 mg/l de canamicina e 10 mg/L de rifampicina e incubado a 28°C por 48 h. As colônias contendo o plasmídeo foram identificadas por PCR de colônia, que foi realizado conforme descrito na seção anterior.

2.7. Infiltração de discos de cana-de-açúcar por *Agrobacterium tumefaciens*

A agroinfiltração foi realizada conforme metodologia descrita (ARVINTH *et al.*, 2010) e esquematizada na figura 4.

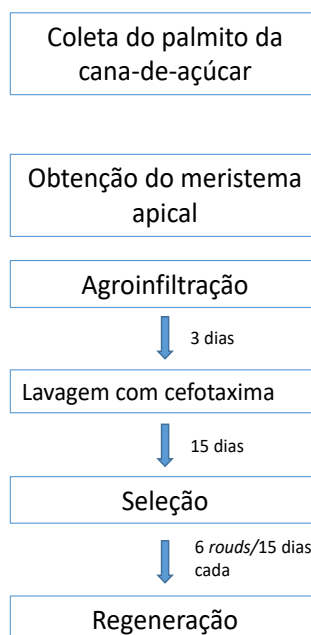


Figura 2.3. Etapas da transformação de cana-de-açúcar por agroinfiltração. Ao lado de cada etapa estão indicados o tempo entre cada etapa.

Uma colônia de *A. tumefaciens* foi inoculada em 10 mL de meio YEP contendo rifampicina (10 mg/L) e canamicina (50 mg/L) e incubada a 28 °C, 250 rpm, *overnight*. Um mililitro do pré-inóculo foi adicionado a 50 mL de meio YEP contendo rifampicina (10 mg/L) e canamicina (50 mg/L) e crescido a 28 °C, 150 rpm por 16 h. O inóculo foi centrifugado a 15.000 g, 10 min e a massa celular foi ressuspensa em 20 mL de meio para infecção (sacarose 15 g/L – Synth, dextrose 15 g/L – Synth, 2,23 g/L meio MS, ácido cítrico 0,150 g/L - Synth) gelado, transferido para um Erlenmeyer de 250 mL e mantido na presença de luz natural, por 1 h, 28 °C, 250 rpm. Após este período, cerca de 300 discos, previamente mantidos em meio meio indutor de calogênese, que é o meio MSI (sacarose 30 g/L – Synth, ágar para planta 7 g/L, meio Murashige & Skoog (MS) 4,43 g/L, ácido cítrico 0,15 g/L – Synth, 2,4-D 3 mg/L – Sigma, pH = 5,78) com adição 200 uM de acetoseringona, foram transferidos para o meio de infecção e incubados a 28 °C, sem agitação, 1 h na ausência de luz. O frasco com os explantes foi submetido duas vezes a sessão de vácuo composto por 3 minutos a 25 mmHg, em um equipamento de biolística (BioRad) com intervalo de 2 minutos entre cada sessão. Os explantes foram retirados do frasco e secados em papel filtro 3 MM autoclavado. Entre 12 e 15 explantes foram colocados em placas contendo 15 mL de meio de infecção (Sacarose 15 g/L – Sigma, ágar para planta 7 g/L – Sigma, meio MS 2,23 g/L - Phytotechlab, ácido cítrico 0,150 – Synth, dextrose 15 g/L - Synth, pH = 5,3) e incubados por 48 h, 28 °C, na ausência de luz. Os explantes foram colocados em Erlenmeyers de 250 mL (cerca de 75 explantes por frasco), lavados 3 vezes

com com 50 mL de água estéril, descartada a cada lavagem e lavados com 100 mL de solução aquosa de cefotaxima 500 mg/L por 5 minutos, secados sobre papel 3MM autoclavado e dispostos em meio de seleção (Sacarose 30 g/L – Sigma, ágar para planta 7 g/L – Sigma, meio MS 4,43 g/L - Phytotechlab, ácido cítrico 0,150 – Synth, 2,4 D – 3 mg/L- Sigma, higromicina 500 mg/L e cefotaxima 30 mg/L, pH = 5,78). Após duas semanas, os calos foram transferidos para novas placas com meio sólido MSI contendo cefotaxima (500 mg/L) e Higromicina (30 mg/L). Esta transferência foi repetida a cada 15 dias, descartando calos escurecidos e placas que apresentassem contaminação por agrobactéria ou fúngica. Após 6 etapas de seleção, os calos foram colocados em meio sólido de regeneração (Sacarose 30 g/L – Sigma, ágar para planta 7 g/L – Sigma, meio MS 4,43 g/L - Phytotechlab, ácido cítrico 0,150 – Synth, 6-benzilaminopurina (BAP) 1 mg/L – Sigma, ácido 1-naftalenacético (ANA) 0,5 mg/L – Sigma, cinetina 0,5 mg/L – Sigma, pH= 5,8) até os calos regenerarem e alcançarem altura de cerca de 10 cm. Os calos em regeneração eram trocados de meio a cada 4 semanas.

As plântulas obtidas foram colocadas em meio de enraizamento (sacarose 50 g/L – Sigma, meio MS 2,2 g/L, ANA 1 mg/L) por 3 dias. Após o crescimento das raízes, as plântulas foram aclimatizadas em casa de vegetação.

2.8. Análise molecular dos eventos transgênicos

DNA genômico das prováveis plantas transgênicas foram extraídas usando brometo de cetrimônio (CTAB). Aproximadamente 200 mg de folhas foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido, gral e pistilo. Ao macerado, foi adicionado 1 mL de solução CTAB (5 % CTAB – Riedel-de-Haën; 2 % polivinilpirrolidona- Sigma, 1,4 M NaCl; 0,2 M EDTA; 0,1 M Tris-HCl, pH = 8), e 100 µL de β-mercaptoetanol. O tubo foi homogeneizado por vortexação e incubado a 65 °C por 1 hora em termobloco Thermo stat plus (Eppendorf). O tubo foi centrifugado a 16.000 g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Então, foram adicionados 1 mL de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e o tubo foi invertido manualmente por 5 minutos, para homogeneização. O tubo foi novamente centrifugado e a fase aquosa foi transferida para novo tubo; à fase aquosa foi adicionado 1 mL de isopropanol gelado. Ele foi incubado por 1 h, 4 °C e novamente centrifugado nas condições descritas acima. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 µL de solução de etanol 70%. O material foi novamente centrifugado e o sobrenadante foi descartado; então o *pellet* foi deixado para secar em temperatura ambiente e ressuspenso em 20 µL de água. Após

este processo, o material obtido foi tratado com 1 µL de RNase (10 mg/mL) (Invitrogen) por 1 hora em termobloco a 37 °C.

O material obtido foi resolvido em gel de agarose 1% e armazenado a -80 °C até o momento do uso. Para confirmação da presença do gene de interesse nos transformantes foram usados os *primers* Cane5_cana_fw e NOSr, utilizando aproximadamente 10 ng de DNA genômico das plantas transgênicas. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1%.

2.9. Aclimatização das plantas transgênicas

Plantas com aproximadamente 10 cm de altura foram colocadas em meio de enraizamento (Sacarose – 50g/L- Syth, meio MS – 2,2 g/L, ANA 1 mg/L) por entre 7 e 10 dias. Após a formação de raízes, as plantas foram lavadas e dispostas em substrato para formação de mudas (turfa, corretivos, vermiculita, carvão vegetal e casca de pinus. Baseplant) umedecido, cobertas por um saco plástico, e mantidas em bandejas com água a 30 °C. Após 2 dias, foi feito um furo no saco plástico e, passado mais 2 dias, um outro furo. Após 7 dias corridos do plantio em substrato, os sacos foram retirados.

2.10. Análise da produção de proteína

2.10.1. Expressão em *N. benthamiana* spp.

A proteína produzida por *ivt* foi coletada e preparada para análise por SDS-PAGE e *Western blotting*.

Folhas infiltradas (cerca de 3 mg) foram colhidas, tiveram as nervuras retiradas com auxílio de bisturi, e foram maceradas em tampão PBS (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH₂PO₄) pH= 7,4 com adição de cloreto de sódio (NaCl 500 mM), metabisulfito de sódio (Na₂S₂O₅ 10 mM), imidazol (10 mM) e Polivinilpolipirrolidona (1% (m/v)), nitrogênio líquido, gral e pistilo. A suspensão foi centrifugada por 30 min, 4 °C e 35.000 g. A fração solúvel foi coletada, teve o pH ajustado para 7,4, quando necessário, e novamente centrifugada. O sobrenadante foi coletado, usado para análises por SDS e *Western blotting* e fracionado em coluna Ni-NTA agarose (Thermo Fischer, EUA).

Para avaliação da produção da CaneCPI-5 em expressão estável em células BY-2, parte dos calos foi macerado com auxílio de gral, pistilo e nitrogênio líquido em mesma solução

tampão usada para avaliação da produção por expressão transiente. Os passos subsequentes também foram os mesmos.

2.10.2. Expressão em cana-de-açúcar

Pedaços (cerca de 10 cm) de caule das canas transformadas e de cana controle foram usados para extração da garapa e análise da expressão da cistatina CaneCPI-5. Todo o material foi mantido em gelo durante o procedimento. Os caules foram moídos manualmente em extrator de garapa e o suco obtido foi coletado em tubos tipo Falcon de 50 mL. O caldo foi centrifugado a 10.000 g, 4 ° C, 15 min e o sobrenadante contendo a proteína solúvel foi dialisado contra tampão PBS, pH = 7,4, na proporção 1:1000 com três trocas, sendo a primeira após 1h, a segunda após 16h a terceira após 1 hora, a 4 ° C. A membrana usada foi a SnakeSkin 3,5 K MWCO (Thermo Scientific, MA, USA). O material dialisado foi armazenado a – 20 ° C até o momento do uso. Amostras antes e depois da diálise foram analisadas em SDS-PAGE 15% e *Western Blotting*.

Para os testes de atividade com as garapas dialisadas, foram usados papaína (5 mM), substrato específico Z-Phe-Arg-AMC (20 mM) e 1 µL da garapa de cana dialisado. Os ensaios foram realizados em fluorímetro Hitachi F-2500, em triplicata, como descritos no capítulo 1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Expressão da CaneCPI-5 em *Nicotiana spp.*

A CaneCPI-5 foi expressa nos três sistemas usando tabaco.

3.1.1. *in vivo* translation (*ivt*) em lisado de células BY-2

CaneCPI-5 foi expressa em lisado de células BY-2. A expressão da proteína pode ser detectada com 24h (Fig. 2.4).

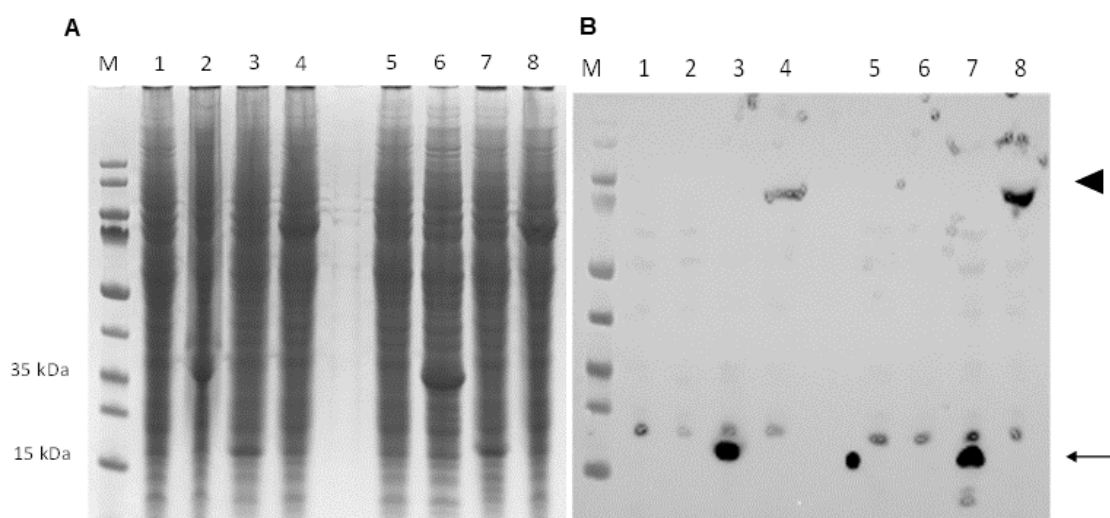


Figura 2.4. Expressão da CaneCPI-5 em lisado de células BY-2. A) SDS-PAGE usado como gel espelho e B) *Western blotting*. M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fischer, EUA). 1-4: amostras coletadas com 24 h, sendo 1: controle negativo, ou seja, células BY-2 na ausência de plasmídeo. 2: expressão de eYFP, usado como controle visual. 3: CaneCPI-5, 4: Gly M 4. 5-8: amostras coletadas com 48h de expressão, seguindo a mesma ordem de aplicação das amostras 1-4. A seta à esquerda indica CaneCPI-5 com aproximadamente 15 kDa e o triângulo indica Gly m 5 com cerca de 75 kDa.

A análise inicial sobre expressão foi feita em lisados de células BY-2. essa plataforma foi escolhida devido à sua rapidez, já que a proteína é obtida após 48h, baixo custo e facilidade. Porém, esse sistema ainda não permite que quantidades grandes de proteína sejam produzidas, já que a capacidade máxima é cerca de 5 mL de lisado celular por placa (50 μ L por poço em placa de 96 poços). Para contornar este fator, outras opções são expressão transiente e estável.

3.1.2. Expressão transiente em *N. benthamiana*

Os cassetes de expressão foram testados em expressão transiente em folhas de *N. benthamiana* e a produção da CaneCPI-5 pode ser vista na figura 2.5.

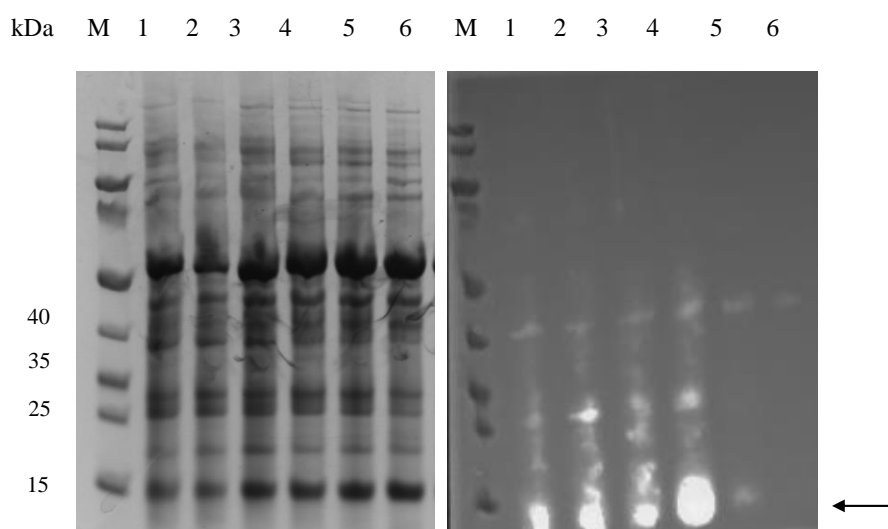


Figura 2.5. SDS-PAGE e *Western blotting* da expressão dos diferentes plasmídeos codificantes da CaneCPI-5. M: PageRule Prestained Protein Ladder (Thermo Fischer). 1-6: amostras da expressão dos plasmídeos pTRAkt_cpi5_KDEL, pTRAkt_cpi5_ctVSD, pTRAkt_cpi5_intron, pTRAkt_cpi5_apo, pTRAkt_cpi5_His_pro GRAN e pTRAkt_SP_his_cpi5 GRAN, respectivamente. A seta à direita indica a CaneCPI-5. Adaptada de Shibao (2021), com permissão de uso de Copyright no Anexo 3.

Como pode ser visto na figura 2.5, principalmente considerando os resultados apresentados na figura 2.5.B, o construto que tem apenas o peptídeo sinal, chamado pTRAkt_cpi5_apo, foi o que mostrou maior produção da canacistatina. Seguindo a quantidade de proteína produzida, não houve diferença aparente na expressão dos construtos que direcionam para o retículo endoplasmático e para o vacúolo lítico (usando os vetores pTRAkt_cpi5_KDEL, pTRAkt_cpi5_ctVSD e pTRAkt_cpi5_His_pro_gran, respectivamente). Por fim, os construtos que contêm o íntron da catalase (pTRAkt_cpi5_intron, pTRAkt_cpi5_His_pro GRAN e pTRAkt_SP_his_cpi5 GRAN). Considerando o resultado da expressão da CaneCPI-5 com diferentes construtos, o plasmídeo pTRAkt_cpi5_apo foi usado para nova agroinfiltração e a proteína obtida foi purificada por IMAC (Figura 2.6.)

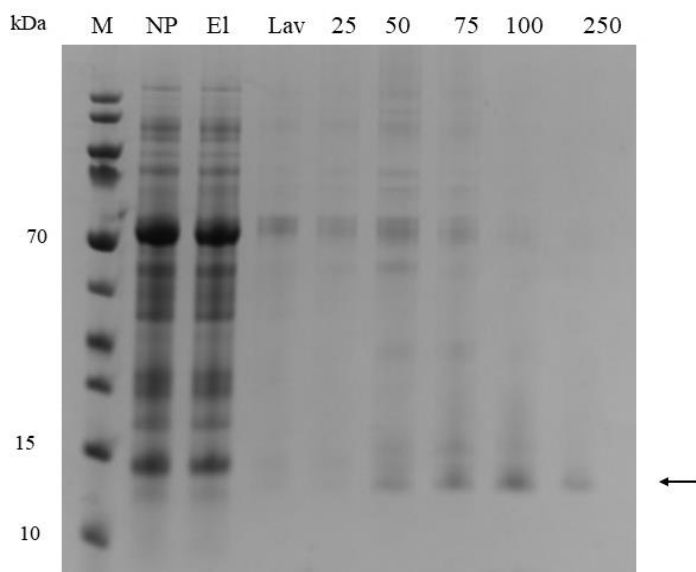


Figura 2.6. Purificação da CaneCPI-5. A proteína solúvel foi purificada com aumento da concentração de imidazol. M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fischer), NP: não purificada (fração coletada antes da purificação), El: eluato, Lav: lavagem. 25 -250: concentração, em mM, imidazol nas soluções usadas para eluição da proteína. A seta à direita indica a CaneCPI-5.

Diferentes sinais de direcionamento celular e expressão aumentada por IME foram testados. O direcionamento celular é uma alternativa quando a proteína desejada pode ser degradada por proteases do tabaco enquanto percorre o caminho intracelular, ou no momento da extração as proteínas, por proteases que extravasam as células rompidas no processo (PILLAY *et al.*, 2014; MANDAL *et al.*, 2016). O mecanismo pelo qual o IME pode causar aumento de expressão ainda é desconhecido, mas é provável que haja envolvimento do processo de maturação do mRNA e sua estabilização (SAMADDER *et al.*, 2008; ROSE *et al.*, 2011).

Entretanto, o direcionamento para diferentes organelas não causou aumento da expressão da proteína, quando comparado à proteína secretada no apoplasto (Figura 2.5). A estratégia de IME levou à diminuição na quantidade de proteína expressa, que pode ter ocorrido por remoção incorreta do íntron. A expressão transiente com o plasmídeo pTRAkt_cpi5_apo resultou em 25 µg de proteína purificada por grama de folha. Além disso, a cistatina produzida por expressão transiente apresentou K_i similar ao da proteína produzida em *E. coli*, indicando que a proteína foi efetivamente produzida e enovelada. Além disso, a canacistatina deve estar disponível em forma de monômero para ser ter atividade inibitória. Canacistatinas, como outras cistatinas, podem formar dímeros ou formas ainda mais complexas através de *domain swapping* (CAVINI *et al.*, 2013; VALADARES *et al.*, 2013).

Apesar da expressão da CaneCPI-5 por expressão transiente, algumas folhas infiltradas tiveram seu fenótipo alterado, apresentando manchas brancas, semelhantes à infecção por vírus, ou necrose (Figura 2.7). Cisteíno proteases foram identificadas em diferentes compartimentos celulares das folhas de tabaco (GOULET *et al.*, 2010; GOULET *et al.*, 2012; GROSSE-HOLZ *et al.*, 2018) e a relação entre cisteíno proteases e cistatinas é chave para regulação da senescência de folhas (DÍAZ-MENDOZA *et al.*, 2014). Assim, a expressão de uma cistatina com alto potencial inibitório frente a diversas cisteíno proteases pode ter causado desequilíbrio entre a relação protease-inibidor, levando aos fenótipos observados.

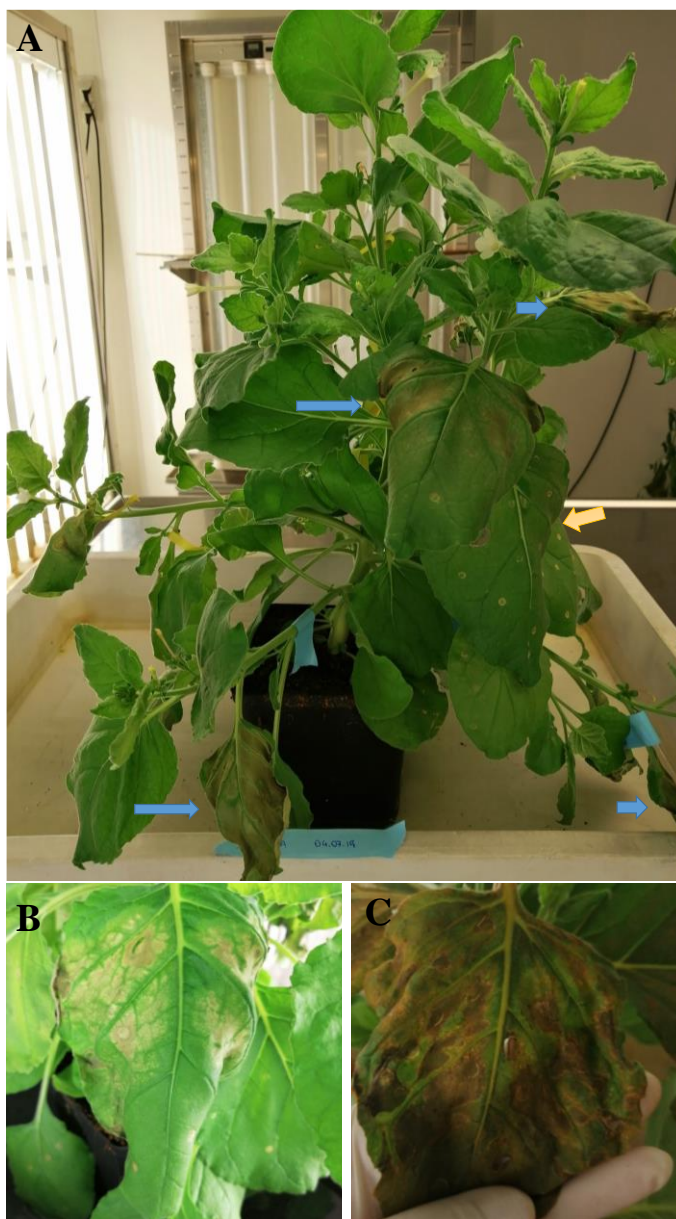


Figura 2.7. *Nicotiana benthamiana* após 5 dias de infiltração. (A) *N. benthamiana*. As setas azuis indicam as folhas com necrose. Seta amarela mostra folha infiltrada e sadia. (B) Manchas brancas semelhantes à infecção com vírus. (C) Folha com necrose.

3.1.3. Produção da CaneCPI-5 em células BY-2.

O plasmídeo pTRAkt_cpi5_apo também foi usado para a transformação e estabelecimento de células BY-2. Foram obtidos 22 calos após 6 semanas. Os calos foram cortados e parte foi usada para detecção da expressão da CaneCPI-5 por *Western blotting* (Fig. 2.8)

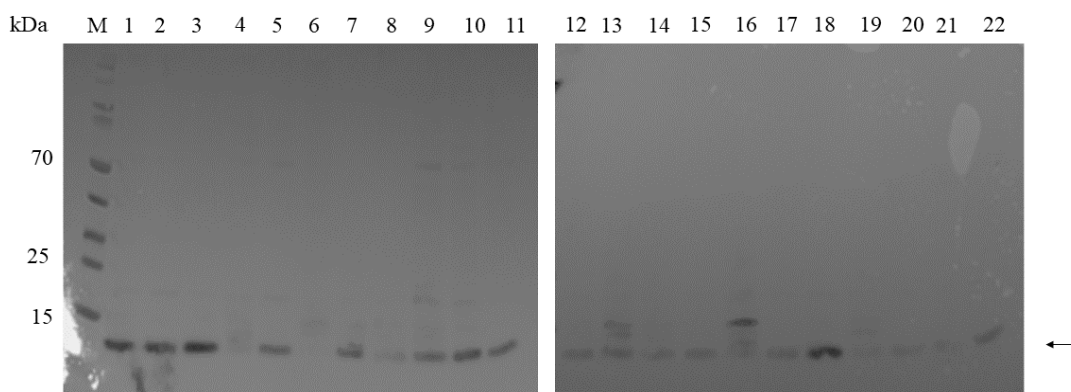


Figura 2.8. Análise da expressão de CaneCPI-5 em calos transformados. M: PageRuler Prestained Protein Ladder. 1-22: material coletado dos respectivos calos. A SETA à direita indica a CaneCPI-5.

A obtenção dos calos levou o triplo de tempo que o esperado, indicando que a proteína pode causar efeito tóxico também na formação de calos, além dos efeitos observados na expressão transiente. A sequência codificadora da CaneCPI-5 foi identificada em biblioteca de cDNA de meristema apical da cana-de-açúcar e a relação entre cisteíno proteases e cistatinas influenciam no processo de germinação de diversas plantas. Uma análise feita com cistatina de soja mostrou que as cistatinas com maior capacidade inibitória contra catepsinas L e B são menos expressas em condições normais, em que não há estresse e nem maturação ou senescência da planta (VAN WYK *et al.*, 2014; GROSSE-HOLZ e VAN DER HOORN, 2016). Portanto, a expressão da CaneCPI-5 pode ter levado ao retardo do crescimento de calos e até mesmo a inviabilidade de alguns eventos transgênicos por meio do desequilíbrio da atividade de proteases importantes para o tabaco.

3.2. Determinação do K_i da CaneCPI-5 produzida em *N. benthamiana*

CaneCPI-5 produzida por expressão transiente e purificada foi usada para teste cinético. K_i contra catepsina B humana foi $10.56 \pm 1,36$ nM. O valor de K_i obtido em *N. benthamiana* é semelhante ao obtido quando expresso em *E. coli* ($K_i = 6.87$ nM) (SANTIAGO *et al.*, 2017).

3.3. Obtenção dos eventos transgênicos de cana-de-açúcar

Discos de cana-de-açúcar contendo tecido meristemático foram usados como material de partida para transformação (Fig. 2.9). Após as etapas de seleção e regeneração foram obtidos 15 eventos de cana-de-açúcar transgênicos.

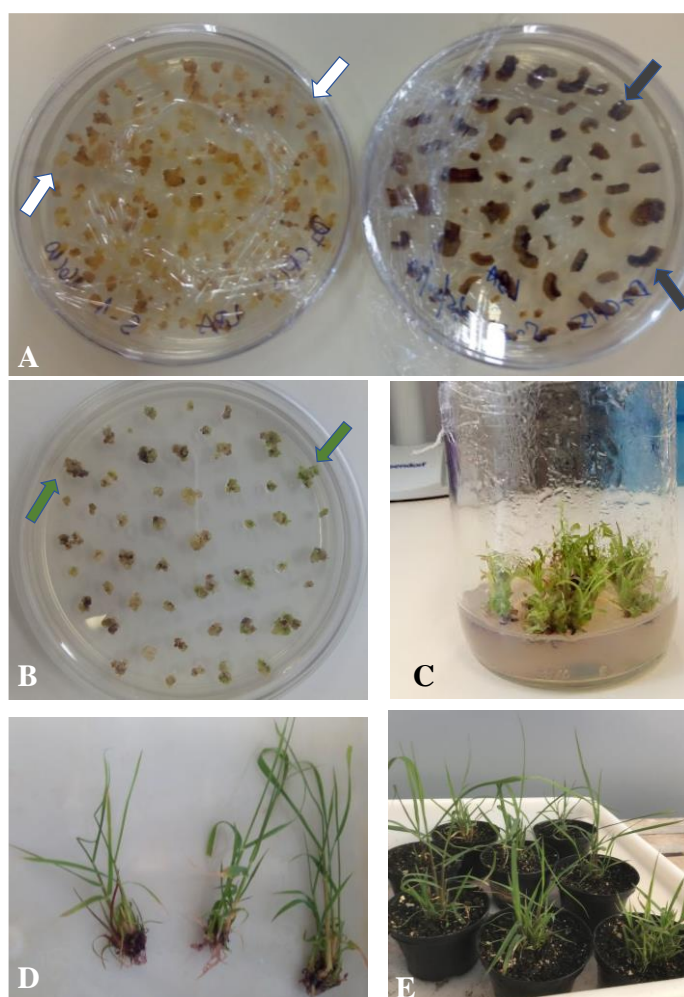


Figura 2.9. Etapas da obtenção de transformantes de cana-de-açúcar. A) Calos em processo de seleção. As setas em branco mostram alguns calos que são considerados aptos para próxima etapa de seleção, enquanto as setas pretas mostram os calos escurecidos e descartados. B) Calos selecionados para regeneração após as seis etapas de seleção. A seta verde ressalta alguns calos que já apresentam certa regeneração. C e D) Mudanças regeneradas. E) Mudanças que foram colocadas para aclimatização

3.4. Obtenção da CaneCPI-5 a partir da garapa das linhagens transgênicas

Foram obtidas 15 plantas transgênicas. Durante a etapa de aclimatização, 6 plantas morreram, restando 9 plantas viáveis.

Quando as plantas atingiram cerca de 1m, pedaços do colmo foram usados para extração da garapa. As amostras de garapa dialisadas foram analisadas em eletroforese em condições desnaturantes e em *Western blotting* (Figura 2.10) com anticorpo primário para detecção de cauda de histidina.

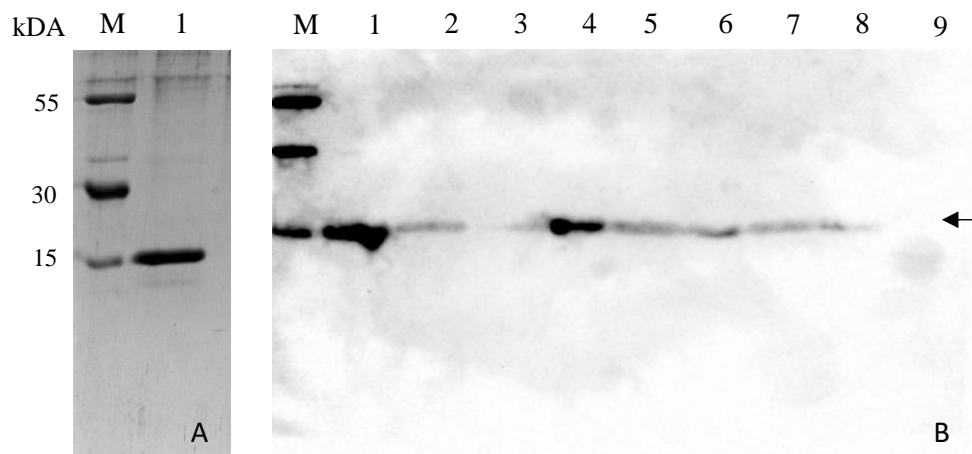


Figura 2.10. Análise da garapa dos eventos transformantes de cana-de-açúcar transgênica por SDS-PAGE e *Western blotting*. O sobrenadante dialisado proveniente da garapa de cada um dos clones foi analisado em SDS-PAGE 15%. A) Amostra da garapa do evento 1. B) *Western blotting* das amostras dos 9 eventos transgênicos. M: marcador feito com proteínas expressas no Laboratório de Biologia Molecular contendo cauda de histidina. 1-9: amostras provenientes dos eventos transgênicos 1-9. A seta à esquerda mostra banda de aproximadamente 15 kDa, tamanho esperado da CaneCPI-5. Os valores à esquerda indicam o peso molecular das proteínas usadas, da maior para menor: β -glucosidade, *Green fluorescent protein* (GFP) e CaneCPI-5 (produzida em bactéria).

A produção da CaneCPI-5 em vacúolos lícicos é possível pois a proteína é ácido-resistente. Foram obtidos cerca de 200 μ g de CaneCPI-5 por mL de garapa dialisada. Considerando que a produção de cana-de-açúcar no Brasil pode chegar a 85 t por hectare e que até 90 % de garapa pode ser recuperada (76.500 L), podem ser produzidos até 15,3 kg de CaneCPI-5 por hectare de cana-de-açúcar plantada (SHIBAO *et al.*, 2021), quantidade suficiente para demanda do uso industrial

Após verificar a presença da CaneCPI-5 na garapa dos eventos transgênicos, a capacidade inibitória das garapas frente à papaína foi testada (tabela 2.2).

Tabela 2.2. Atividade residual da papaína após adição de 1 μ L de garapa dialisada

Evento	Atividade residual (%)
1	52,3 ± 4,2
2	97,3 ± 3,1
3	70,0 ± 3,1
4	94 ± 1,3
5	69,4 ± 2,0
6	80,7 ± 1,1
7	91,7 ± 0,4
8	89,0 ± 2,0
9	82,3 ± 2,2
Controle (garapa de planta não transformada)	97,5 ± 2,3

Os eventos número 1, 5 e 9 foram mantidos e repicados para os experimentos apresentados no capítulo 3. Estes eventos foram escolhidos porque as respectivas garapas apresentaram diferentes concentrações da CaneCPI-5 no ensaio de *Western blotting* e diferentes capacidades de inibir a papaína. É esperado que os eventos apresentem variados níveis de resistência frente ao ataque das larvas do inseto variando de acordo com a maior e menor expressão da CaneCP-5.

CAPÍTULO 3:

GERAÇÃO DE UMA LINHAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR RESISTENTE AO ATAQUE DO INSETO *Sphenophorus levis*

1. Introdução

1.1. Utilização de inibidores proteicos como controle de insetos praga

O desenvolvimento de plantas transgênicas que expressam ou superexpressam proteína tóxica para os insetos pragas, ou que silenciem genes essenciais para seu desenvolvimento e/ou sobrevivência são alternativas cada vez mais exploradas. O exemplo mais conhecido são as linhagens comerciais de algodão e milho Bt, que já estão disponíveis no mercado desde a década de 90 e que expressam a toxina Cry1A da bactéria *Bacillus thuringiensis*. Essas plantações podem ser encontradas em vários países e são modelos para entendimento da dinâmica de resistência entre insetos pragas, plantação transgênica e importância da área de escape (TABASHNIK *et al.*, 2013; JIN *et al.*, 2015).

O uso da proteína Cry1A para geração de cana-de-açúcar mais resistente ao ataque da praga *Diatrea saccharalis*, popularmente conhecida como broca da cana. Diferentes grupos mostraram que a toxina é eficiente em testes em laboratório e em campo, sendo que a resistência pode variar de acordo com a parte da planta em que a proteína é expressa. Para que a planta mostre resistência, a Cry1A deve ser expressa em toda a planta, principalmente no colmo; a expressão da proteína apenas em folhas não confere resistência contra a broca (ARENCIBIA *et al.*, 1997; BRAGA *et al.*, 2003; GAO *et al.*, 2016).

Outra abordagem promissora é a obtenção de linhagens que produzam RNA de interferência (RNAi) para silenciar proteínas chave. Devido ao conhecimento prévio sobre as proteínas intestinais da larva de *S. levis*, recentemente nosso grupo desenvolveu linhagens que expressa RNAi para silenciar a subunidade E da ATPase vacuolar do inseto. As linhagens apresentaram expressão do dsRNA e causaram diminuição da expressão da ATPase vacuolar E das larvas testadas, retardando o crescimento de algumas e sendo fatal para outras (MOHAN *et al.*, 2021).

A terceira abordagem é o uso de inibidores de cisteína peptidases é para o controle de coleópteros, já que esta classe de enzima é majoritária no sistema digestivo destes insetos (RICHARDS *et al.*, 2008; MORRIS *et al.*, 2009; WIELKOPOLAN *et al.*, 2015). Além disso, lepidópteros, em sua maioria, fazem o uso de serino protease como principal classe de enzimas digestivas (CHRISTELLER *et al.*, 1992; VINOKUROV *et al.*, 2006). Portanto, a produção de plantas que expressam ou superexpressam cistatinas têm menor chance de causarem inibição cruzada e afetarem lepidópteros.

A CaneCPI-1 foi a primeira canacistatina identificada, produzida de maneira heteróloga e caracterizada (SOARES-COSTA *et al.*, 2002) e, por apresentar alto potencial inibitório contra a cisteína catépsina L de *S. levis* (FONSECA *et al.*, 2012), foi usada para gerar uma linhagem de cana-de-açúcar mais resistente ao ataque do inseto (SCHNEIDER *et al.*, 2016). Apesar de a CaneCPI-1 ser uma proteína naturalmente produzida pela própria cana-de-açúcar, a sua expressão normal é menor do que a necessária para aumento de resistência da planta frente ao ataque da larva do inseto. Por isso, foram criadas duas linhagens transgênicas que superexpressam a cistatina e que foram testadas quanto ao aumento de resistência frente ao ataque das larvas do *S. levis*. Ambas as linhagens tiveram os danos, medidos em cm, reduzidos e as larvas apresentaram retardo no crescimento quando comparadas ao grupo controle. Além disso, foi possível detectar e purificar a CaneCPI-1 a partir da cana-de-açúcar transgênica (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Mais recentemente, a canacistatina CaneCPI-5 foi também produzida e caracterizada pelo nosso grupo, e apresentou potencial inibitório contra a SI-CathL ainda maior do que a CaneCPI-1 (MIGUEL, 2014; SHIBAO *et al.*, 2021). Em adição, uma sequência que direciona a produção e armazenamento de proteínas recombinantes em vacúolos de cana-de-açúcar foi descrita (PALANISWAMY *et al.*, 2015). Combinando estas duas informações, a produção de nova linhagem de cana-de-açúcar que superexpresse a CaneCPI-5 em seus vacúolos líticos pode ter resistência ainda maior frente à praga, já que a proteína ficaria acumulada nas organelas e no caule. Portanto, o presente capítulo almeja avaliar o uso da CaneCPI-5 como molécula usada para afetar o crescimento das larvas de *S. levis* e caracterizar os eventos transformantes quanto a sua resistência contra a praga.

2. Material e métodos

2.1. Desafio de alimentação das larvas de *S. levis* em dieta artificial

Para avaliar as possíveis diferenças fenotípicas que as larvas de *S. levis* podem apresentar quando alimentadas com a cistatina CaneCPI-5, larvas de aproximadamente 15 dias foram colocadas em dieta contendo 40 ng/ μ L e 200 ng/ μ L da proteína. O meio para dieta artificial foi preparado conforme descrito por Degaspari (DEGASPARI, 1987), alterando o ácido nalidíxico por ampicilina na mesma concentração. Quando o meio estava quase a temperatura ambiente a Cane CPI-5 foi adicionada, de modo que a concentração final fosse adequada para os ensaios e foram preparados tubos contendo meio sem adição da cistatina, que foram os controles do experimento. A CaneCPI-5 foi produzida em *Escherichia coli*, cepa *Rosetta* (DE3), e purificada conforme descrito anteriormente (SANTIAGO et al, 2017). O ensaio foi feito com 10 larvas em cada condição (grupo controle, mantidas em meio contendo 40 ng/ μ L e em meio contendo 200 ng/ μ L de CaneCPI-5) durante 4 semanas, incubadas em câmara Humidity MLR-352 (Panasonic, Japan) a 28 °C, 60 % de umidade com fotoperíodo de 12 horas.

Após 4 semanas, as larvas foram pesadas e usadas para extração de conteúdo intestinal.

2.2. Extração de conteúdo intestinal das larvas: material genético (RNA) e proteico

As larvas submetidas ao desafio da alimentação tiveram seu conteúdo intestinal removido e tratado com TRIzol (Invitrogen, CA, USA) para extração de RNA e proteínas. Para isso, foi seguido o protocolo usado por Fonseca (2012) com modificações. Após as larvas serem colocadas em gelo, elas foram rapidamente esterilizadas em etanol 70 % e lavadas em tampão PBS, pH = 7,4. O intestino foi removido manualmente e o material seguiu para extração de RNA e proteínas. A fase orgânica foi usada para extração de proteínas conforme instruções do fabricante, optando-se pela diálise de proteínas. Brevemente, foram adicionados 150 μ L de etanol à fase orgânica contendo TRIzol e clorofórmio. A suspensão foi homogeneizada por inversão e incubada por 3 minutos à temperatura ambiente, centrifugada a 2.000 g, 5 min, 4 °C e o sobrenadante foi dialisado em membrana Snake Skin 3,5 K MWCO (Thermo Fischer) contra solução de SDS 0,1% na proporção de 1: 1000 por período total de 22 horas. As trocas foram realizadas após 2 horas, 16 horas e 4 horas. O material dialisado foi centrifugado a 10.000 g por

10 minutos a 4 °C e o sobrenadante contendo a fração proteica solúvel foi armazenado a – 80 °C até o momento de uso.

2.3. Análise de expressão gênica

Transcrição reversa seguida por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foi feito para a avaliação da expressão das principais proteases do intestino de larvas de *S. levis* em dieta artificial, e para a SI-CathL-CS. Os primers foram desenhados com auxílio da ferramenta Primer3Plus (UNTERGASSER *et al.*, 2007), disponível em: <http://www.bioinformatics.nl/primer3plus>, com os parâmetros: conteúdo de GC entre 45 e 55% com GC ótimo de 50%; T_m entre 58 e 62 °C e T_m ótimo de 60 °C; e fragmentos entre 80 e 150 bp. A lista de primers utilizados está disponível na tabela 3.1. Os primers para análise da expressão da SI-CathL-CS foram desenhados de modo que a região amplificada contenha o códon que codifica a serina, evitando a detecção de outras cisteíno proteases ou suas variantes.

Tabela 3.1. Lista de primers usados em qPCR. Os primers indicados por * foram os mesmos usados por Fonseca (2012).

Gene alvo	Amplicon (bp)	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
GAPDH*	104	CAACTGGCGTTTTTACCACA	AACATACATTGGGGCGTCA
Catepsina L*	143	CCTTCTTAAAGAGGATGGTGTC	TATATTCAGCATTGTGAGCTTCAATT
Catepsina B*	103	CGCTATTGTTCTGGTGTTGG	CGATTGTTTGGCGTTGATTT
Serino protease*	99	AGGTCTCGGTTCTTCCAA	ATCGTCCTGGTGGTGATGA
CathL-CS	108	ATACGACTGGAGGGAGCAGA	ATGGCGTAGGCACTTTCAAC
Proteína ribossomal S23	97	GCTAAACAGCCCAACTCTGC	AGCAACCATCTCTGGGTACG
α-tubulina	101	GGTCGACAATGAAGCCATCT	AGGAGACGATTTGACCGATG

As reações foram feitas no equipamento Eco Real-Time System (Illumina) e Eco™ Software v3.0.16.0 seguindo as condições: 50 °C por 2 min, 95°C por 2 min, seguida de 40 ciclos compostos por 95 °C por 30 s, 54 °C por 1 min e 72 °C por 40 s. A curva de dissociação foi obtida por um ciclo de 95 °C por 15 s, 55 °C por 15 s e 95 °C por 15 s. A reação foi composta

por 5 μ L de Platinum SYBR Green qPCR UDG Supermix (Invitrogen, USA), 1 μ L de cDNA e 0.4 μ M de cada *primer* em volume final de 10 μ L.

A padronização dos primers foi feita usando diluições seriadas de cDNA. A partir do cDNA 1x foram feitas 5 diluições na razão de 1:10. As condições de adequação dos pares de primer foram eficiência entre 95 e 105%, sendo que as eficiências entre dois pares de primers usados como controle e alvo não poderiam variar mais que 2%, e $R^2 > 95\%$. Os genes de Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), proteína ribossomal S 23 (RPS23) e α -tubulina (α -tub) foram usados como referência.

2.4. Desafio das larvas de *S. levis* nos clones de cana-de-açúcar transgênicos

O ensaio foi realizado conforme descrito por Schneider (SCHNEIDER *et al.*, 2017). Em cada teste foram usados 10 clones propagados de cada evento transgênico. Quando os clones alcançaram aproximadamente 1,5 m, foram feitos buracos com uma broca na parte inferior do colmo para disposição das larvas de 15 dias de idade. Os buracos foram tampados com vial e fita adesiva. Após 30 dias, as canas foram cortadas, abertas e as larvas tiveram seu peso comparado em relação ao inicial.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Desafio das larvas de *S. levis* em dieta artificial

As larvas alimentadas em dieta artificial contendo CaneCPI-5 tiveram seu crescimento afetado, principalmente o grupo que cresceu no meio contendo 200 ng/ μ L da cistatina (Fig. 3.1). Em tal grupo, houve a morte de três larvas, que apresentaram crescimento. Este fato é importante porque indica que as mortes não ocorreram por manuseio, mas pela ação da canacistatina no desenvolvimento das larvas.

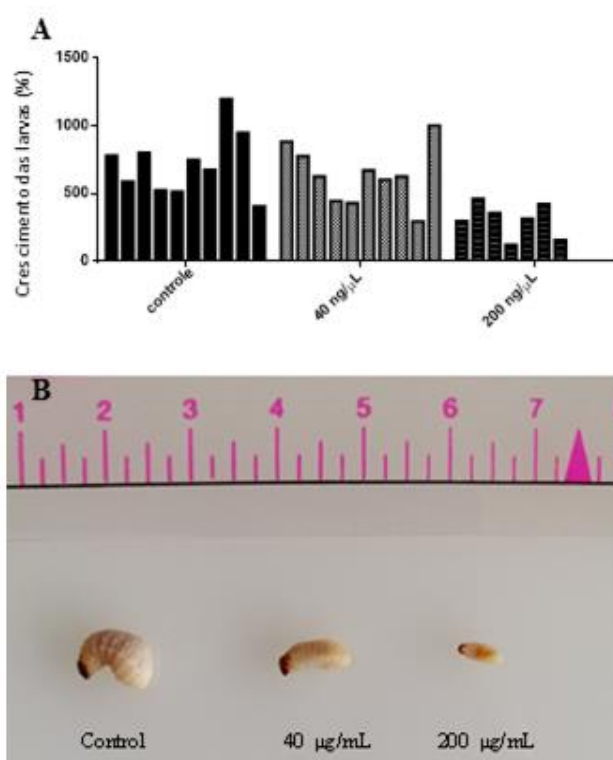


Figura 3.1 Efeito da CaneCPI-5 em larvas de *S. levis* em dieta artificial. A) Gráfico que mostra o crescimento individual das larvas do ensaio. O crescimento é mostrado em %, considerando como 100% o peso antes do experimento. B) Larvas representativas de cada grupo. Adaptado de Shibao (2021), com permissão de uso de Copyright no anexo 2.

3.2. Extração de RNA e material proteico

O intestino das larvas foi cuidadosamente retirado e dele foram extraídos RNA e fração proteica. A fração protéica foi analisada por SDS-PAGE 15 % (figura 3.2).

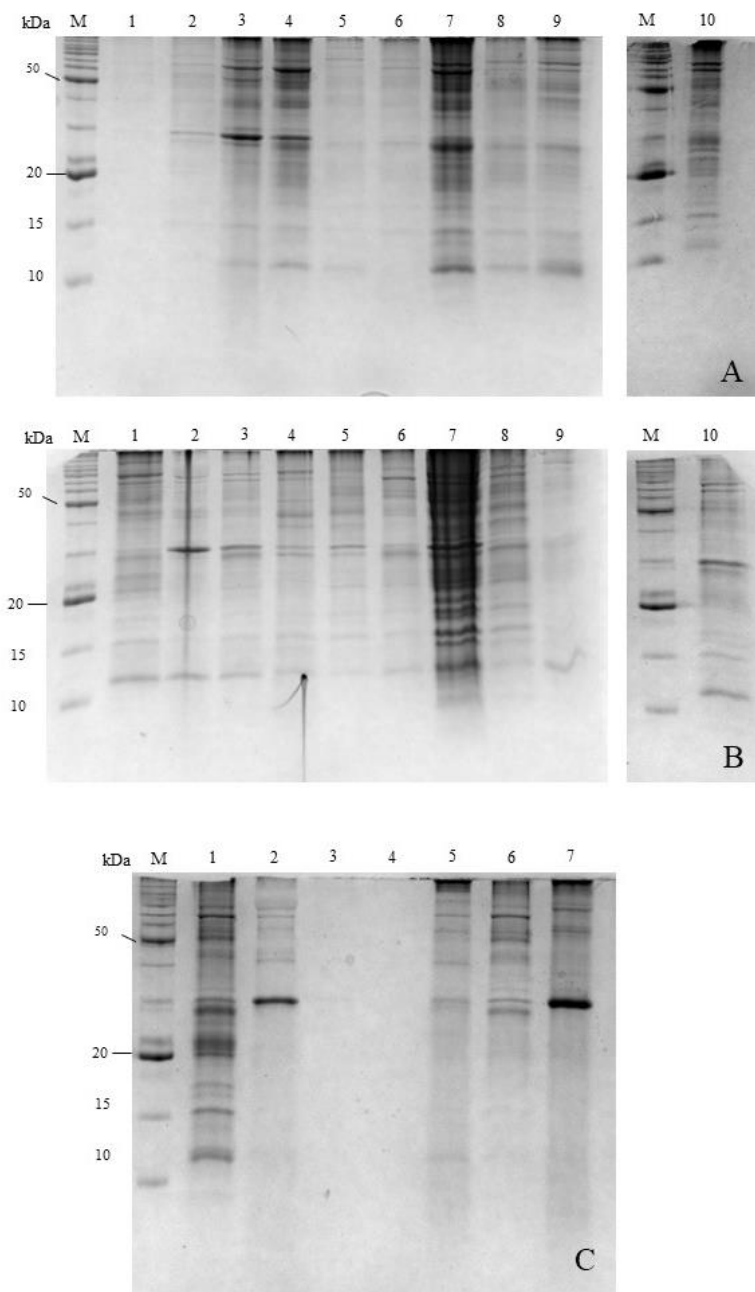


Figura 3.2. Perfil de proteínas intestinais das larvas desafiadas em dieta contendo CaneCPI-5. As amostras foram analisadas em SDS-PAGE 15%. Os números acima dos géis indicam o número da larva; M representa o marcador de peso molecular BenchMark (Invitrogen) e os números ao lado esquerdo são valores em kDa de algumas bandas do marcador. A) são amostras retiradas do grupo controle; b) amostras do grupo em dieta com adição de CaneCPI-5 na concentração final de 40 ng/μL e C) amostras do grupo do grupo em dieta com adição de CaneCPI-5 na concentração final de 200 ng/μL.

A expressão de proteínas intestinais foi, aparentemente, afetada na presença da CaneCPI-5. O perfil apresentado pelas larvas do grupo controle (Fig. 3.2A) é mais homogêneo do que o perfil daquelas mantidas em dieta na presença da canacistatina, e semelhante ao já descrito (SOARES-COSTA *et al.*, 2011). O perfil proteico das larvas mantidas em meio com 40 ng/ μL de CaneCPI-5 aparenta ser uniforme e semelhante ao controle (Fig. 3.2B).

Considerando o perfil apresentado em 3.2.C, ou seja, das larvas mantidas na presença de 200 ng/ μ L, é possível perceber que há presença majoritária de uma proteína com cerca de 30 kDa nas larvas 2 e 7 em detrimento de outras proteínas.

Inibidores de protease podem atuar como pressão seletiva na expressão de proteases digestivas de insetos. A adição de inibidores de serino protease à dieta artificial de diversos insetos lepidópteros levou tanto ao aumento de proteases sensíveis ao inibidor e de isoformas ou outras proteases insensíveis aos inibidores, de modo a compensar a atividade proteolítica (LOPES *et al.*, 2004). O uso de uma cistatina de tomate (SICY8), cistatina D, orizacistatinas I e II na dieta do besouro *Leptinotarsa decemlineata* causou aumento de cisteíno proteases digestivas e de proteases de outras classes e alteração na velocidade de alimentação de insetos adultos (CLOUTIER *et al.*, 2000; BRUNELLE *et al.*, 2004; VORSTER *et al.*, 2015). A mesma alteração de expressão foi observada quando o *L. decemlineata* foi desafiado em linhagens de batata transgênica expressando orizacistatinas (CINGEL *et al.*, 2015).

3.3. Análise da expressão gênica

A expressão das proteínas CathB, CathL, CathL-CS, serino protease das larvas mantidas em meio contendo as duas concentrações de CaneCPI-5 e o controle foi avaliada comparando-as com os genes de referência GAPDH, RPS23 e α -tub (Fig. 3.3).

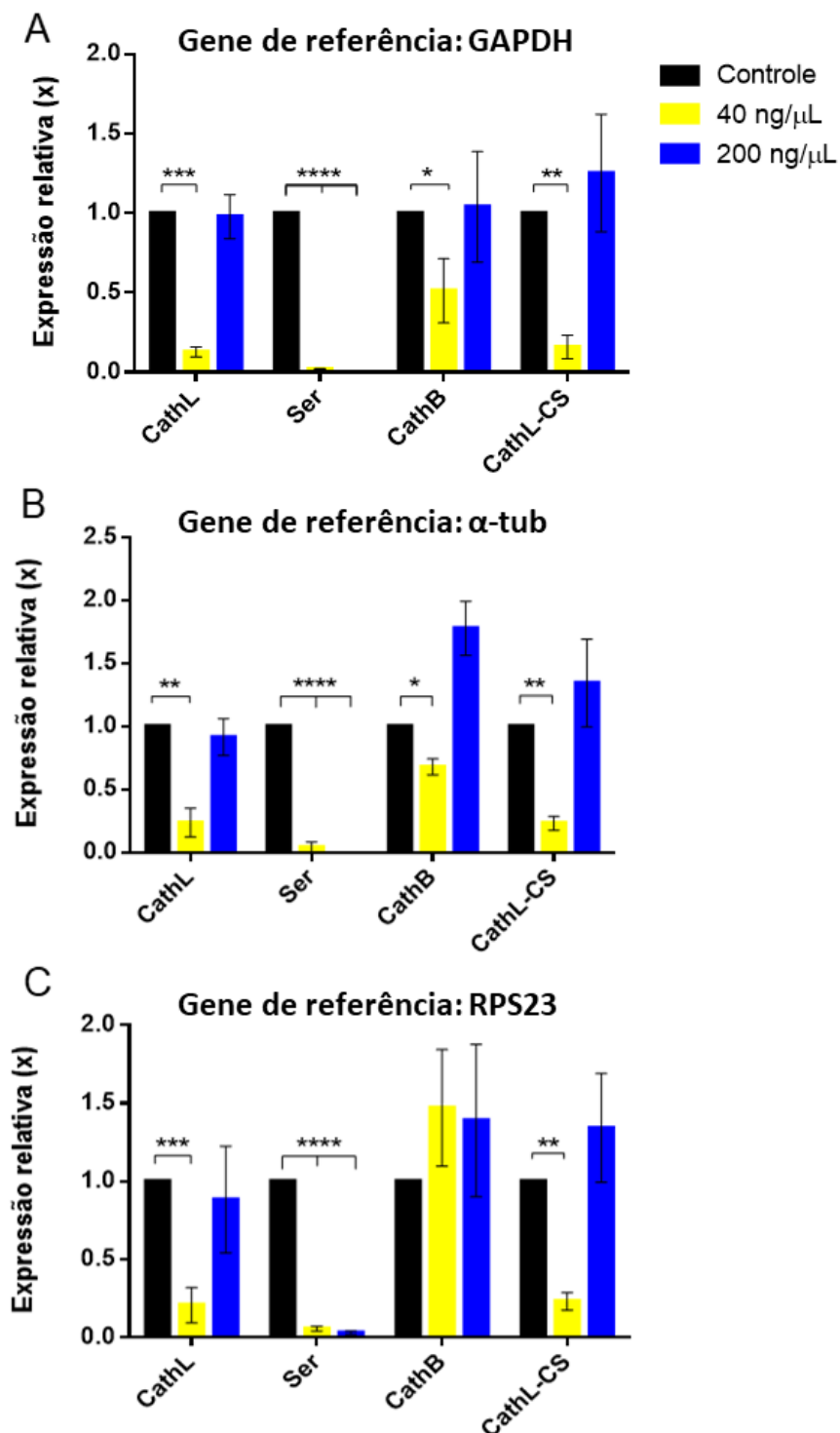


Figura 3.3. Expressão relativa dos genes SI-CathL, SI-Ser, SI-CathB e SI-CathL-CS nas diferentes condições. Os valores de expressão relativa foram calculados usando como gene de referência (A) GAPDH, (B) RPS23 e (C) α -tub. Os valores de expressão estão indicados em preto para o controle (ausência de CaneCPI-5), amarelo para a adição de 40 ng/ μ L de CaneCPI-5 e azul para adição de 200 ng/ μ L. Ser: serino protease. O desvio padrão está indicado e as análises estatísticas foram feitas considerando os valores de Δ Ct, usando One-Way ANOVA. (**** indica $p < 0,00001$; *** indica $p < 0,0001$; ** indica $p < 0,001$ e * indica $p < 0,01$).

Como pode ser observado pela análise RT-qPCR, os genes de referência GAPDH e α -tubulina apresentaram resultados estáveis para todos os genes estudados, enquanto o gene relacionado com a proteína ribossomal S23 (RPS23) apresentou variação para comparação com o gene da SI-CathB.

A adição da CaneCPI-5 retardou o crescimento das larvas, principalmente aquelas crescidas na presença de 200 ng/ μ L. No entanto, a expressão das cisteíno proteases CathL, CathB, serino protease e da proteína SI-CathL-CS não teve alterações significativas. Nas larvas que foram alimentadas em dieta artificial com adição de 40 ng/ μ L da canacistatina, todas as proteínas investigadas apresentaram diminuição de expressão, com exceção da CathB. Apesar de apresentar diminuição da expressão quando comparado ao controle, a diminuição da SI-CathL-CS foi menor do que a das cisteíno e serino proteases, o que pode indicar o seu papel auxiliar às proteases digestivas, como descrito no capítulo 1.

Apesar da alteração no fenótipo e no perfil de proteínas visto em SDS-PAGE, as larvas alimentadas em dieta contendo maior concentração de canacistatina não foram detectadas. Uma das hipóteses que pode explicar este resultado é que as proteínas escolhidas para o RT-qPCR foram baseadas nas proteases mais expressas em condições controle (dieta artificial sem adição de CaneCPI-5) encontradas anteriormente (PAULA, 2012) e a presença do inibidor pode ter aumentado a expressão de outras proteases, que são menos ou até mesmo não expressas na ausência de estresse. Além disso, a análise de RT-qPCR foi feita sobre poucos genes, sendo que a complexidade do sistema digestório é, muito provavelmente, bem maior. Um exemplo da complexidade de mecanismos compensatórios é que larvas de *L. decemliana* colocadas para se alimentar em folhas de batatas transgênicas que produziam orizacistatina I (correspondente em até 1% de proteínas solúveis da folha) apresentaram desenvolvimento igual às usadas como controle e, ainda, exibiram taxa de alimentação mais rápida (CLOUTIER *et al.*, 1999). Larvas do mesmo inseto, ao serem desafiadas em batatas transgênicas que expressavam inibidor de catepsina D, tiveram o seu desenvolvimento levemente retardado, com compensação da inibição da catepsina D após 12 h (BRUNELLE *et al.*, 2004).

A análise de expressão dos genes das larvas acondicionadas com presença de 40 ng/ μ L mostrou que as proteínas estudadas tiveram diminuição da expressão. Essa diminuição pode ter sido complementada pela expressão de outras isoformas das proteases estudadas ou pela expressão de outras proteases que são expressas sob estresse. Nesta concentração, o retardo do crescimento foi menor do que observado no grupo alimentado com 200 ng/ μ L de canacistatina, e a presença do inibidor pode ter engatilhado uma resposta gênica mais tardia, sendo observado pela diminuição da expressão das proteases. Já no grupo alimentado com mais cistatina, a maior

concentração do inibidor pode ter causado resposta mais rápida, de modo que ao fim do experimento (30 dias), a expressão das proteases estudadas já tenha sido normalizada.

3.4. Desafio das larvas de *S. levis* nos eventos transgênicos

Os ensaios biológicos com larvas de *S. levis* não mostraram alterações significativas no ataque de plantas transgênicas e controle (Fig. 3.4).

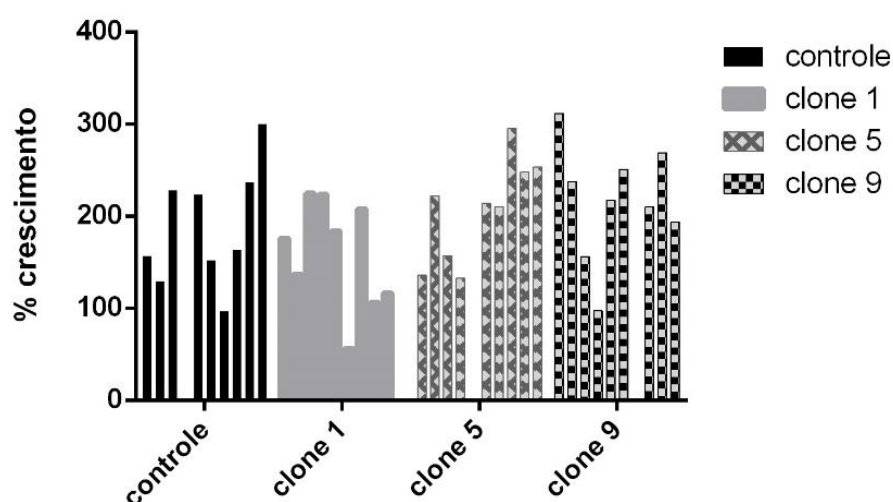


Figura 3.4. Desafio dos eventos transformantes de cana-de-açúcar com larvas de *S. levis*.

O crescimento foi calculado considerando o peso inicial da larva antes do ensaio

Como descrito no capítulo 2, os eventos transgênicos número 3, 5 e 9 foram propagados de modo a se obter 10 clones de cada, usados no desafio com as larvas. Estes eventos foram escolhidos devido a sua maior, média e menor expressão da CaneCPI-5 em sua garapa e capacidade de inibir a papaína, cuja atividade residual após adição da garapa dialisada foi de cerca de 52 %, 69% e 82%, respectivamente. Considerando tais valores, era esperado que cada evento apresentasse diferente capacidade de resistência frente ao ataque da larva de inseto e que esta capacidade fosse relacionada com a quantidade de CaneCPI-5 expressa.

Após o crescimento dos clones e o ensaio com as larvas, parte do colmo foi usado para extração de garapa e avaliação da presença da CaneCPI-5 na garapa. Ensaio de *Western blotting* revelaram a ausência da canacistatina nos clones, o que justifica a ausência da resistência frente ao desafio com as larvas. Estes resultados indicam que o gene codificante da CaneCPI-5 pode ter sido silenciado ou ter sido eliminado por variação somaclonal, resultantes

da aneuploidia e poliploidia da cana-de-açúcar (ARENCEBIA *et al.*, 1999; CARMONA *et al.*, 2005). A poliploidia, complexidade e tamanho do genoma, e aneuploidia da cana-de-açúcar são desafios na geração de linhagens transgênicas da planta (MOHAN, 2016). Além disso, o direcionamento da proteína para o vacúolo lítico pode ter levado ao acúmulo da proteína, e por se tratar de um inibidor potente, a própria planta identificou-a como um fator de estresse, ou um fator não desejado, silenciando sua expressão.

CONCLUSÕES

Este trabalho tem as seguintes conclusões:

A proteína SL-CathL-CS não possui atividade catalítica, sendo uma pseudo cisteíno protease. A presença de um resíduo de serina na posição 138 confere maior capacidade de ligação com a CaneCPI-1 quando comparada com sua proteína revertente SI-CathL-mutSC. Essas características indicam que a função da SI-CathL-CS é interagir com cistatinas da cana-de-açúcar, de modo que as proteases verdadeiras fiquem livres e possam atuar como enzimas digestivas.

No segundo capítulo foi possível estabelecer a produção da CaneCPI-5 em diferentes sistemas baseados em plantas: lisados celulares de células BY-2, expressão transiente em folhas de *N. benthamiana* e expressão estável em células de *N. tabacum* cv. *Bright Yellow*. A expressão da canacistatina causou alteração de fenótipo (na expressão transiente) e atraso no desenvolvimento de calos na expressão estável, indicando que a proteína pode inibir cisteíno proteases das plantas, levando a retardo ou alterações indesejadas. No entanto, foi possível obter 20 µg de proteína purificada por g de folha na expressão transiente, mostrando que o sistema é viável. Além disso, a proteína foi expressa em cana-de-açúcar e purificada com sucesso da garapa, na concentração de 200 µg/mL de garapa, que pode ser escalonado para 15,3 kg de CaneCPI-5 por hectare de cana-de-açúcar plantada.

Finalmente, a CaneCPI-5 retardou o desenvolvimento de larvas de *S. levis* em dieta artificial e alterou o perfil de expressão de proteínas do intestino médio. As linhagens de cana-de-açúcar geradas não apresentaram aumento de resistência contra o ataque das larvas, mas as linhagens apresentaram silenciamento do transgene, não produzindo a canacistatina.

REFERÊNCIAS

- AN, G. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. **Plant Physiol**, v. 79, n. 2, p. 568-70, 1985.
- ARAUJO, T. T. et al. A sugarcane cystatin (CaneCPI-5) alters microcosm biofilm formation and reduces dental caries. **Biofouling**, p. 1-8, 2021.
- ARENCIBIA, A. et al. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding**, v. 3, n. 4, p. 247-255, 1997.
- ARENCIBIA, A. D. et al. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum hybrid*) plants produced by cell electroporation. **Transgenic Research**, v. 8, n. 5, p. 349-360, 1999.
- ARVINTH, S. et al. Genetic transformation and pyramiding of aprotinin-expressing sugarcane with cry1Ab for shoot borer (*Chilo infuscatellus*) resistance. **Plant Cell Rep**, v. 29, n. 4, p. 383-95, 2010.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. **Arch Biochem Biophys**, v. 318, n. 2, p. 247-50, 1995.
- _____. Evolutionary lines of cysteine peptidases. **Biol Chem**, v. 382, n. 5, p. 727-33, 2001.
- BAUM, J. A. et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1322-1326, 2007.
- BENCHABANE, M. et al. Plant cystatins. **Biochimie**, v. 92, n. 11, p. 1657-66, 2010.
- BOMBARELY, A. et al. A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 25, n. 12, p. 1523-30, 2012.
- BOWN, D. P. et al. Characterisation of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larval western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 34, n. 4, p. 305-20, 2004.
- BRAGA, D. P. V. et al. Expression of the Cry1Ab Protein in Genetically Modified Sugarcane for the Control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, v. 5, n. 2-3, p. 209-221, 2003.

BRUMBLEY, S. M. et al. Sugarcane. In: (Ed.). **Compendium of Transgenic Crop Plants**, 2008. p.1-58.

BRUNELLE, F.; CLOUTIER, C.; MICHAUD, D. Colorado potato beetles compensate for tomato cathepsin D inhibitor expressed in transgenic potato. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 55, n. 3, p. 103-13, 2004.

BUNTRU, M. et al. Tobacco BY-2 cell-free lysate: an alternative and highly-productive plant-based in vitro translation system. **BMC Biotechnol**, v. 14, p. 37, 2014.

BUZOLIN, A. L. **Produção recombinante e caracterização de uma legumaina de cana-de-açúcar**. 2014. 52 (Mestrado). Departamento de Genética e Evolução, UNiversidade Federal de São Carlos, São Carlos.

CANAVIEIRA, C. D. T. **Pragas e doenças da cana-de-açúcar** 2013.

CARMONA, E. R. et al. Analysis of genomic variability in transgenic sugarcane plants produced by *Agrobacterium tumefaciens* infection. **Plant Breeding**, v. 124, n. 1, p. 33-38, 2005.

CARTER, P.; WELLS, J. A. Dissecting the catalytic triad of a serine protease. **Nature**, v. 332, n. 6164, p. 564-8, 1988.

CARVALHO, T. S. et al. Acquired pellicle protein-based engineering protects against erosive demineralization. **Journal of Dentistry**, v. 102, p. 103478, 2020.

CAVINI, I. A. et al. Chemical shift assignments of the canecystatin-1 from *Saccharum officinarum*. **Biomol NMR Assign**, v. 7, n. 2, p. 163-5, 2013.

CHONG, B. F. et al. Growth and metabolism in sugarcane are altered by the creation of a new hexose-phosphate sink. **Plant Biotechnol J**, v. 5, n. 2, p. 240-53, 2007.

CHOU, W. Y.; MATTHEWS, K. S. Serine to cysteine mutations in trp repressor protein alter tryptophan and operator binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 31, p. 18314-9, 1989.

CHRISTELLER, J. T. et al. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: Dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, n. 7, p. 735-746, 1992.

CINGEL, A. et al. Growth and development of Colorado potato beetle larvae, *Leptinotarsa decemlineata*, on potato plants expressing the oryzacystatin II proteinase inhibitor. **Transgenic Res**, v. 24, n. 4, p. 729-40, 2015.

CLOUTIER, C. et al. Growth compensation and faster development of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding on potato foliage expressing oryzacystatin I. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 40, n. 2, p. 69-79, 1999.

CLOUTIER, C. et al. Adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* compensate for nutritional stress on oryzacystatin I-transgenic potato plants by hypertrophic behavior and over-production of insensitive proteases. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 44, n. 2, p. 69-81, 2000.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 22, p. 10881-90, 1988.

CRISTOFOLETTI, P. T.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: sequence, properties, immunocytochemical localization and function. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 35, n. 8, p. 883-901, 2005.

CURSI, D. E. et al. History and Current Status of Sugarcane Breeding, Germplasm Development and Molecular Genetics in Brazil. **Sugar Tech**, 2021.

DAMAJ, M. B. et al. Unprecedented enhancement of recombinant protein production in sugarcane culms using a combinatorial promoter stacking system. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 13713, 2020.

DEGASPARI, N. B., P. S. M.; ALMEIDA, L. C.; CASTILHO, H. J. Biologia de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col.: curculionidae), em dieta artificial e no campo. **Pesquisa agropecuaria brasileira**, v. 22, n. 6, p. 553-558, 1987.

DÍAZ-MENDOZA, M. et al. C1A cysteine protease–cystatin interactions in leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 14, p. 3825-3833, 2014.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar. **Encarte do Informações Agronômicas**, n. 110, p. 25-32, 2005.

DOWER, W. J.; MILLER, J. F.; RAGSDALE, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 13, p. 6127-45, 1988.

EDWARDS, K. D. et al. A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 448, 2017.

EVANGELISTA, D. E. et al. Pectinases from *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae): putative accessory digestive enzymes. **J Insect Sci**, v. 15, p. 168, 2015.

FISCHER, R. et al. High-value products from plants: the challenges of process optimization. **Curr Opin Biotechnol**, v. 32, p. 156-162, 2015.

FLOSS, D. M.; FALKENBURG, D.; CONRAD, U. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. **Transgenic Res**, v. 16, n. 3, p. 315-32, 2007.

FONSECA, F. P. et al. Recombinant expression, localization and in vitro inhibition of midgut cysteine peptidase (Sl-CathL) from sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 42, n. 1, p. 58-69, 2012.

FOX, J. L. First plant-made biologic approved. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 472-472, 2012.

FUJISHIMA, A. et al. The crystal structure of human cathepsin L complexed with E-64. **FEBS Lett**, v. 407, n. 1, p. 47-50, 1997.

FRIGERIO, L.; HINZ, G.; ROBINSON, D. G. Multiple vacuoles in plant cells: rule or exception? **Traffic**, v. 9, n. 10, p. 1564-70, 2008.

GAO, S. et al. Transgenic Sugarcane with a cry1Ac Gene Exhibited Better Phenotypic Traits and Enhanced Resistance against Sugarcane Borer. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153929, 2016.

GIANOTTI, A. et al. Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein Expr Purif**, v. 47, n. 2, p. 483-9, 2005.

GIANOTTI, A. et al. Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L and human breast cancer cell invasion. **Biol Chem**, v. 389, n. 4, p. 447-53, 2008.

GIBSON, D. G. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nat Methods**, v. 6, n. 5, p. 343-5, 2009.

GOULET, C. et al. 2-DE proteome maps for the leaf apoplast of *Nicotiana benthamiana*. **Proteomics**, v. 10, n. 13, p. 2536-44, 2010.

GOULET, C. et al. A protease activity-depleted environment for heterologous proteins migrating towards the leaf cell apoplast. **Plant Biotechnol J**, v. 10, n. 1, p. 83-94, 2012.

GROSSE-HOLZ, F. et al. The transcriptome, extracellular proteome and active secretome of agroinfiltrated *Nicotiana benthamiana* uncover a large, diverse protease repertoire. **Plant Biotechnol J**, v. 16, n. 5, p. 1068-1084, 2018.

GROSSE-HOLZ, F. M.; VAN DER HOORN, R. A. Juggling jobs: roles and mechanisms of multifunctional protease inhibitors in plants. **New Phytol**, v. 210, n. 3, p. 794-807, 2016.

HABRYLO, O. et al. The pectinases from *Sphenophorus levis*: Potential for biotechnological applications. **Int J Biol Macromol**, v. 112, p. 499-508, 2018.

HAJDUKIEWICZ, P.; SVAB, Z.; MALIGA, P. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. **Plant Molecular Biology**, v. 25, n. 6, p. 989-994, 1994.

HAKKINEN, S. T. et al. Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody. **Biotechnol Bioeng**, v. 111, n. 2, p. 336-46, 2013.

HARDEGGER, L. A. et al. Halogen bonding at the active sites of human cathepsin L and MEK1 kinase: efficient interactions in different environments. **ChemMedChem**, v. 6, n. 11, p. 2048-54, 2011.

HASNAIN, S. et al. Characterization of cathepsin B specificity by site-directed mutagenesis. Importance of Glu245 in the S2-P2 specificity for arginine and its role in transition state stabilization. **J Biol Chem**, v. 268, n. 1, p. 235-40, 1993.

HE, J.; QUIOCHO, F. A nonconservative serine to cysteine mutation in the sulfate-binding protein, a transport receptor. **Science**, v. 251, n. 5000, p. 1479-1481, 1991.

HELLWIG, S. et al. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. **Nat Biotechnol**, v. 22, n. 11, p. 1415-22, 2004.

HOLZHAUSER, T. et al. Soybean (*Glycine max*) allergy in Europe: Gly m 5 (beta-conglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy. **J Allergy Clin Immunol**, v. 123, n. 2, p. 452-8, 2009.

HORN, M. E.; WOODARD, S. L.; HOWARD, J. A. Plant molecular farming: systems and products. **Plant Cell Rep**, v. 22, n. 10, p. 711-20, 2004.

HUSAIN, S. S.; LOWE, G. Completion of the amino acid sequence of papain. **Biochem J**, v. 114, n. 2, p. 279-88, 1969.

JIN, L. et al. Large-scale test of the natural refuge strategy for delaying insect resistance to transgenic Bt crops. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 169-174, 2015.

KIM, M. J. et al. Crystal structure of papain-E64-c complex. Binding diversity of E64-c to papain S2 and S3 subsites. **Biochem J**, v. 287 (Pt 3), n. Pt 3, p. 797-803, 1992.

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 virgifera*). **FEBS Letters**, v. 471, n. 1, p. 67-70, 2000.

KONDO, H. et al. Gene organization of oryzacystatin-II, a new cystatin superfamily member of plant origin, is closely related to that of oryzacystatin-I but different from those of animal cystatins. **FEBS Lett**, v. 278, n. 1, p. 87-90, 1991.

LABUDDA, M. et al. Protease activity and phytocystatin expression in *Arabidopsis thaliana* upon *Heterodera schachtii* infection. **Plant Physiol Biochem**, v. 109, p. 416-429, 2016.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LAXA, M. Intron-Mediated Enhancement: A Tool for Heterologous Gene Expression in Plants? **Front Plant Sci**, v. 7, p. 1977, 2016.

LEATHERBARROW, R. GraFit version 5. **Erithacus Software Ltd., Horley, UK**, 2001.

LIENARD, D. et al. Pharming and transgenic plants. **Biotechnol Annu Rev**, v. 13, p. 115-47, 2007.

LIMA, B. S. **Estudos de uma variante de Catepsina L do inseto *Sphenophorus levis***. 2016. (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

LIU, H. W. et al. A midgut-specific serine protease, BmSP36, is involved in dietary protein digestion in the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Sci**, 2016.

LOPES, A. R. et al. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 55, n. 3, p. 140-52, 2004.

LOUATI, H. et al. A new chymotrypsin-like serine protease involved in dietary protein digestion in a primitive animal, *Scorpio maurus*: purification and biochemical characterization. **Lipids Health Dis**, v. 10, p. 121, 2011.

MANDAL, M. K. et al. Tackling Unwanted Proteolysis in Plant Production Hosts Used for Molecular Farming. **Front Plant Sci**, v. 7, p. 267, 2016.

MARGIS, R.; REIS, E. M.; VILLERET, V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. **Arch Biochem Biophys**, v. 359, n. 1, p. 24-30, 1998.

MARTINEZ, M. et al. Phytocystatins: Defense Proteins against Phytophagous Insects and Acari. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 10, 2016.

MARTY, F. Plant vacuoles. **Plant Cell**, v. 11, n. 4, p. 587-600, 1999.

MARTYNOV, A. G. et al. Functional analysis of C1 family cysteine peptidases in the larval gut of *Tenebrio molitor* and *Tribolium castaneum*. **BMC Genomics**, v. 16, p. 75, 2015.

MIGUEL, M. C. **Produção recombinante e caracterização de duas cistatinas de cana-de-açúcar**. 2014. 68 (Mestrado). Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

MOHAN, C. Genome Editing in Sugarcane: Challenges Ahead. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1542, 2016.

MOHAN, C. et al. hRNAi-mediated knock-down of *Sphenophorus levis* V-ATPase E in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp interspecific hybrid) affects the insect growth and survival. **Plant Cell Reports**, 2021.

MORRIS, K. et al. *Tribolium castaneum* larval gut transcriptome and proteome: A resource for the study of the coleopteran gut. **J Proteome Res**, v. 8, n. 8, p. 3889-98, 2009.

MORRISON, J. F. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. **Biochim Biophys Acta**, v. 185, n. 2, p. 269-86, 1969.

MUNRO, S.; PELHAM, H. R. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. **Cell**, v. 48, n. 5, p. 899-907, 1987.

NOLKE, G.; FISCHER, R.; SCHILLBERG, S. Production of therapeutic antibodies in plants. **Expert Opin Biol Ther**, v. 3, n. 7, p. 1153-62, 2003.

PALANISWAMY, H. et al. Vacuolar targeting of r-proteins in sugarcane leads to higher levels of purifiable commercially equivalent recombinant proteins in cane juice. **Plant Biotechnol J**, v. 14, n. 2, p. 791-807, 2015.

PASTORES, G. M. et al. A Phase 3, multicenter, open-label, switchover trial to assess the safety and efficacy of taliglucerase alfa, a plant cell-expressed recombinant human glucocerebrosidase, in adult and pediatric patients with Gaucher disease previously treated with imiglucerase. **Blood Cells Mol Dis**, v. 53, n. 4, p. 253-60, 2014.

PAULA, F. F. P. D. **Biologia molecular aplicada à identificação de alvos para o controle do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis***. 2012. 206 (Doutorado). Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

PEDEZZI, R. et al. A novel beta-fructofuranosidase in Coleoptera: Characterization of a beta-fructofuranosidase from the sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 55, p. 31-8, 2014.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem**, v. 25, n. 13, p. 1605-12, 2004.

PETRASOVITS, L. A. et al. Production of polyhydroxybutyrate in sugarcane. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, n. 1, p. 162-172, 2007.

PILLAY, P. et al. Proteolysis of recombinant proteins in bioengineered plant cells. **Bioengineered**, v. 5, n. 1, p. 15-20, 2014.

POSMA, J. J.; POSTHUMA, J. J.; SPRONK, H. M. Coagulation and non-coagulation effects of thrombin. **J Thromb Haemost**, 2016.

PURNELL, M. P. et al. Spatio-temporal characterization of polyhydroxybutyrate accumulation in sugarcane. **Plant Biotechnol J**, v. 5, n. 1, p. 173-84, 2007.

RAMALHO-SANTOS, M. et al. Identification and proteolytic processing of procardosin A. **Eur J Biochem**, v. 255, n. 1, p. 133-8, 1998.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochem J**, v. 290

RAWLINGS, N. D. et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Res**, v. 46, n. D1, p. D624-d632, 2018.

(Pt 1), p. 205-18, 1993.

REIS, E. M.; MARGIS, R. Sugarcane phytocystatins: Identification, classification and expression pattern analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 291-296, 2001.

RIBEIRO, C. W. et al. Production of a His-tagged canecystatin in transgenic sugarcane and subsequent purification. **Biotechnol Prog**, v. 24, n. 5, p. 1060-6, 2008.

RICHARDS, S. et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, v. 452, n. 7190, p. 949-55, 2008.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Web Server issue, p. W320-4, 2014.

ROSE, A. B. et al. Evidence for a DNA-Based Mechanism of Intron-Mediated Enhancement. **Front Plant Sci**, v. 2, p. 98, 2011.

SACK, M. et al. The increasing value of plant-made proteins. **Curr Opin Biotechnol**, v. 32, p. 163-170, 2015.

SACK, M. et al. Functional analysis of the broadly neutralizing human anti-HIV-1 antibody 2F5 produced in transgenic BY-2 suspension cultures. **Faseb j**, v. 21, n. 8, p. 1655-64, 2007.

SAMADDER, P. et al. Transcriptional and post-transcriptional enhancement of gene expression by the 5' UTR intron of rice rubi3 gene in transgenic rice cells. **Mol Genet Genomics**, v. 279, n. 4, p. 429-39, 2008.

SANTIAGO, A. C. et al. A New Sugarcane Cystatin Strongly Binds to Dental Enamel and Reduces Erosion. **J Dent Res**, v. 96, n. 9, p. 1051-1057, 2017.

SANTOS, J. et al. Effects of Serine-to-Cysteine Mutations on β -Lactamase Folding. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 5, p. 1707-1718, 2007.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 27, 157–162. 1967.

SCHIERMEYER, A. Optimizing product quality in molecular farming. **Curr Opin Biotechnol**, v. 61, p. 15-20, 2019.

SCHNEIDER, V. K. et al. Transgenic sugarcane overexpressing CaneCPI-1 negatively affects the growth and development of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Plant Cell Rep**, v. 36, n. 1, p. 193-201, 2016.

SHIBAO, P. Y. T. et al. Sugarcane cystatins: From discovery to biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 676-686, 2021.

SOARES-COSTA, A. et al. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 296, n. 5, p. 1194-9, 2002.

SOARES-COSTA, A. et al. Digestive physiology and characterization of digestive cathepsin L-like proteinase from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **J Insect Physiol**, v. 57, n. 4, p. 462-8, 2011.

SZEWINSKA, J.; SIMINSKA, J.; BIELAWSKI, W. The roles of cysteine proteases and phytocystatins in development and germination of cereal seeds. **J Plant Physiol**, v. 207, p. 10-21, 2016.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nat Biotechnol**, v. 31, n. 6, p. 510-21, 2013.

TAVARES, F. M. B.-F., A.; LEITE, L. G.; ALMEIDA, L. C.; GOULART, T. M. Efeitos Sinérgicos de Combinações entre Nematóides Entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) e Inseticidas Químicos na Mortalidade de *Sphenophorus levis* (Vaurie) (Coleoptera: Curculionidae). **BioAssay** v. 4, n. 7, p. 1-10, 2009.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 1-62, 1994.

TREGONING, J. S. First human efficacy study of a plant-derived influenza vaccine. **Lancet**, v. 396, n. 10261, p. 1464-1465, 2020.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

TURK, B.; TURK, V.; TURK, D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. **Biol Chem**, v. 378, n. 3-4, p. 141-50, 1997.

TURK, D. et al. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. **Biol Chem**, v. 379, n. 2, p. 137-47, 1998.

TURK, V. et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. **Biochim Biophys Acta**, v. 1824, n. 1, p. 68-88, 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCar). Flávio Henrique-Silva. Cistatina recombinante da cana-de-açúcar para redução do desgaste dentário erosivo e proteção contra cárie dentária. BR 10 2017 008691 7

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. Web Server issue, p. W71-4, 2007.

VINOKUROV, K. S. et al. Digestive proteolysis organization in two closely related Tenebrionid beetles: red flour beetle (*Tribolium castaneum*) and confused flour beetle (*Tribolium confusum*). **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 70, n. 4, p. 254-79, 2009.

VALADARES, N. F. et al. X-ray crystallography and NMR studies of domain-swapped canecystatin-1. **FEBS J**, v. 280, n. 4, p. 1028-38, 2013.

VAN WYK, S. G. et al. Cysteine protease and cystatin expression and activity during soybean nodule development and senescence. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 294, 2014.

VINOKUROV, K. S. et al. Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 145, n. 2, p. 126-37, 2006.

VORSTER, J. et al. Positive selection of digestive Cys proteases in herbivorous Coleoptera. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 65, p. 10-9, 2015.

WAR, A. R. et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, 2012.

WARD, B. J. et al. Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18-64 years) and older adults (≥ 65 years): two multicentre, randomised phase 3 trials. **Lancet**, v. 396, n. 10261, p. 1491-1503, 2020.

WIELKOPOLAN, B. et al. Identification and partial characterization of proteases in larval preparations of the cereal leaf beetle (*Oulema melanopus*, Chrysomelidae, Coleoptera). **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 88, n. 3, p. 192-202, 2015.

WU, L.; BIRCH, R. G. Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. **Plant Biotechnol J**, v. 5, n. 1, p. 109-17, 2007.

YAMADA, K. et al. A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing *Arabidopsis* leaves. **Plant Physiol**, v. 127, n. 4, p. 1626-34, 2001.

YOKOYAMA, T. et al. Conserved cysteine to serine mutation in tyrosinase is responsible for the classical albino mutation in laboratory mice. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 24, p. 7293-7298, 1990.

ZHOU, X.; FAN, D.; ZHAO, K. CHARACTERIZATION OF TRYPSIN-LIKE AND CHYMOTRYPSIN-LIKE SERINE PROTEASES FROM MIDGUT OF *Mythimna separata* Walker. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 92, n. 3, p. 173-91, 2016.

ZHU-SALZMAN, K.; ZENG, R. Insect response to plant defensive protease inhibitors. **Annu Rev Entomol**, v. 60, p. 233-52, 2015.

APÊNDICE I

pTRAkt_CPI5_ct_VDS:

ATGGCTCCACCACGTCACCATCTCCCCCTTTTGCTGGTTCTTGCTACGTTGGCCGCC
 TTATCTTTAGCA TTGGCTCCGGTACCGGGGCCCGCTGTTTTGGGTGGGGGTGGCAGAGGTCC
 ATTACTCGGAGGTTGGGCACCGATTCCGGACGTAGGGGATAAACATATTCAGGAATTAGGGG
 GCTGGGCCCTGGGGCAAGCAAACATCAAAGTTGGCAGCTGATGGACTTAGGTTCCGTAGA
 GTCGTTTCGAGGGGAACAACAAGTTGTCTCAGGAATGAGGTACAGACTTTATGTTGATGCCGC
 CGATCCCGCCGGCAGAACGGTACCCTACGTGGCTGTAGTATATGAACAGGTTTGGACTAGAA
 CCAGGCAGCTCGCCTCATTCAACCCAGCCCCCTCGTGCA CATCACCACCATCATCATAGGGTC
 GGATTCGCCGAAGCCGCA TGA

Amarelo: peptídeo sinal

Azul: cauda de histidina

Rosa: *Vacuolar sorting determinant (VSD) signal*

pTRAkt_CPI5_KDEL:

ATGGCTCCACCACGTCACCATCTCCCCCTTTTGCTGGTTCTTGCTACGTTGGCCGCC
 TTATCTTTAGCA TTGGCTCCGGTACCGGGGCCCGCTGTTTTGGGTGGGGGTGGCAGAGGTCC
 ATTACTCGGAGGTTGGGCACCGATTCCGGACGTAGGGGATAAACATATTCAGGAATTAGGGG
 GCTGGGCCCTGGGGCAAGCAAACATCAAAGTTGGCAGCTGATGGACTTAGGTTCCGTAGA
 GTCGTTTCGAGGGGAACAACAAGTTGTCTCAGGAATGAGGTACAGACTTTATGTTGATGCCGC
 CGATCCCGCCGGCAGAACGGTACCCTACGTGGCTGTAGTATATGAACAGGTTTGGACTAGAA
 CCAGGCAGCTCGCCTCATTCAACCCAGCCCCCTCGTGCA CATCACCACCATCATCATAAAGAT
 GAGCTCTA TGA

Amarelo: peptídeo sinal

Azul: cauda de histidina

Verde escuro: sinal KDEL

pTRAkt_CPI5_apo:

ATGGCTCCACCACGTCACCATCTCCCCCTTTTGCTGGTTCTTGCTACGTTGGCCGCC
 TTATCTTTAGCA TTGGCTCCGGTACCGGGGCCCGCTGTTTTGGGTGGGGGTGGCAGAGGTCC
 ATTACTCGGAGGTTGGGCACCGATTCCGGACGTAGGGGATAAACATATTCAGGAATTAGGGG
 GCTGGGCCCTGGGGCAAGCAAACATCAAAGTTGGCAGCTGATGGACTTAGGTTCCGTAGA
 GTCGTTTCGAGGGGAACAACAAGTTGTCTCAGGAATGAGGTACAGACTTTATGTTGATGCCGC
 CGATCCCGCCGGCAGAACGGTACCCTACGTGGCTGTAGTATATGAACAGGTTTGGACTAGAA
 CCAGGCAGCTCGCCTCATTCAACCCAGCCCCCTCGTGCA CATCACCACCATCATCAT TGA

Amarelo: peptídeo sinal

Azul: cauda de histidina

Cpi5_intron

ATGGCTCCACCACGTCACCATCTCCCCCTTTTGCTGGTTCTTGCTACGTTGGCCGCC
 TTATCTTTAGCA TTGGCTCCGGTACCGGGGCCCGCTGTTTTGGGTGGGGGTGGCAGAG GTAA
 ATTTCTAGTTTTTCTCCTTCATTTTCTTGGTTAGGACCT TTTCTCTTTTTATTTTTTTGAG

CTTTGATCTTTCTTTAAACTGATCTATTTTTTAATTGATTGGTTATGGTGTAAATATTACAT
 AGCTTTAACTGATAATCTGATTACTTTATTTTCGTGTGTCTATGATGATGATGATAGTTACAG
 GTCCATTACTCGGAGGTGGGCACCGATTCCGGACGTAGGGGATAAACATATTCAGGAATTA
 GGGGGCTGGGCCCTGGGGCAAGCAAACATCAAAGTTGGCAGCTGATGGACTTAGGTTCCG
 TAGAGTCGTTTCGAGGGGAACAACAAGTTGTCTCAGGAATGAGGTACAGACTTTATGTTGATG
 CCGCCGATCCCGCCGGCAGAACGGTACCCTACGTGGCTGTAGTATATGAACAGGTTTGGACT
 AGAACCAGGCAGCTCGCCTCATTCAACCCAGCCCCTCGTGCACATCACCACCATCACCATTG
 A

Amarelo: peptídeo sinal

Vermelho: íntron da catalase

Cpi5_His_pro_GRAN

ATGGCTCCACCACGTCACCATCTCCCCCTTTGCTGGTTCTTGCTACGTTGGCCGCC
 TTATCTTTAGCA TTGGCTCCGGTACCGGGGCCCGCTGTTTTGGGTGGGGGTGGCAGAG GTAA
 ATTTCTAGTTTTCTCCTTCATTTTTCTTGGTTAGGACCCT TTTCTCTTTTTATTTTTTTGAG
 CTTTGATCTTTCTTTAAACTGATCTATTTTTTAATTGATTGGTTATGGTGTAAATATTACAT
 AGCTTTAACTGATAATCTGATTACTTTATTTTCGTGTGTCTATGATGATGATGATAGTTACAG
 GTCCATTACTCGGAGGTGGGCACCGATTCCGGACGTAGGGGATAAACATATTCAGGAATTA
 GGGGGCTGGGCCCTGGGGCAAGCAAACATCAAAGTTGGCAGCTGATGGACTTAGGTTCCG
 TAGAGTCGTTTCGAGGGGAACAACAAGTTGTCTCAGGAATGAGGTACAGACTTTATGTTGATG
 CCGCCGATCCCGCCGGCAGAACGGTACCCTACGTGGCTGTAGTATATGAACAGGTTTGGACT
 AGAACCAGGCAGCTCGCCTCATTCAACCCAGCCCCTCGTGCACAT CACCACCATCACCATTC
 TTATCCTCTTAAGTCTGGCGCAAATCCTCCTAATCCTGGTCCATCTCCTCCTACTCCTGTAA
 CACCATCAACTGTTTGGCGATGAGTACTATAGCTGCCACAGGGCACTACTTGCTGCTGCATT
 TATCAATATGGCGAATACTGTTTTGGCTGGGGATGCTGTCCCTTATGAGTCTGCTACCTGTTG
 TGATGATAACTACAGCTGCTGTCCCCATGATTATCCTGTATGTGATGTTGATGCTGGCACTT
 GCCTTATGAGCAAGGACAATCCATTAAGTAAAAGCATTGAAGAGAGGTCCAGCTAGAGTA
 AACTGGTCAGGGATGAAATCTAACAGGAAAGTGAGTTACGTTTGA

Amarelo: peptídeo sinal

Vermelho: íntron da catalase

Cinza: propeptídeo e domínio da granulina

SP_His_cpi5_pro_GRAN

ATGGCTCCACCACGTCACCATCTCCCCCTTTGCTGGTTCTTGCTACGTTGGCCGCC
 TTATCTTTAGCA CATCACCACCATCACCAT TTGGCTCCGGTACCGGGGCCCGCTGTTTTGGG
 TGGGGGTGGCAGAGGTCCATTACTCGGAGGTGGGCACCGATTCCGGACGTAGGGGATAAAC
 ATATTCAGGAATTAGGGGGCTGGGCCCTGGGGCAAGCAAACATCAAAGTTGGCAGCTGAT
 GGACTTAGGTTCCGTAGAGTCGTTTCGAGGGGAACAACAAGTTGTCTCAGGAATGAGGTACAG
 ACTTTATGTTGATGCCGCCGATCCCGCCGGCAGAACGGTACCCTACGTGGCTGTAGTATATG
 AACAGGTTTGGACTAGAACCAGGCAGCTCGCCTCATTCAACCCAGCCCCTCGTGCATCTTAT
 CCTCTTAAGTCTGGCGCAAATCCTCCTAATCCTGGTCCATCTCCTCCTACTCCTGTAACACC
 ATCAACTGTTTGGCGATGAGTACTATAGCTGCCACAGGGCACTACTTGCTGCTGCATTTATC
 AATATGGCGAATACTGTTTTGGCTGGGGATGCTGTCCCTTATGAGTCTGCTACCTGTTGTGAT

GATAACTACAGCTGCTGTCCCATGATTATCCTGTATGTGATGTTGATGCTGGCACTTGCCT
 TATGAGCAAGGACAATCCATTTAAAAGTAAAAGCATTGAAGAGAGGTCCAGCTAGAGTAAACT
 GGTCAGGGATGAAATCTAACAGGAAAGTGAGTTACGTT

Amarelo: peptídeo sinal

Azul: cauda de histidina

Cinza: propeptídeo e domínio da granulina

>Sl-CathL-CS

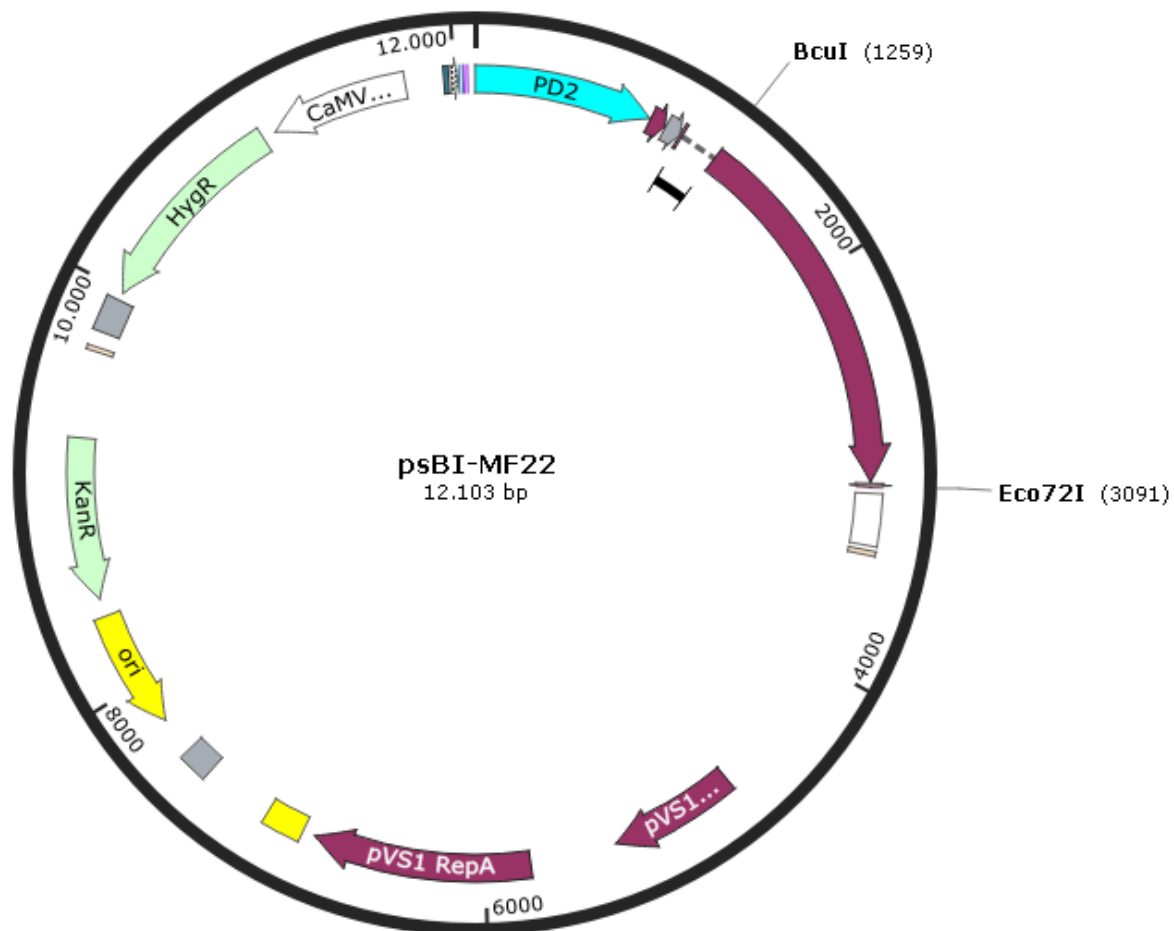
ATGAAGACCTTCGTTGCATTCGCCGCTCTCGTATTGGCAGTTTCTGCTAGTTCGGAGCTGAACATGGT
 CCAGAACTGGGCCAGTTTTAAGGCCACCCACGGCAAACATACGAAAATGAATTGGAAGAAGCCAAAC
 GCTTCGCTATTTTCCAAGATAACGTTGCCAAGATCGAGACTCACAACGCTTTATACGAACAAGGTGCC
 ACAACTTACACCTTGAAGATTAATCAATTCGGTGACATGACCCAGGAAGAATTTGGAAGCATGCTCAG
 AAAATCGCACAAAACGGTGCTAGAAATGTCACTAAATTCAGAGCTCCAGTAGGCGCCGATTACCCAC
 CTTTCATACGACTGGAGGGAGCAGAACGTTGTAAACGAGATTAAGACCAAGGAGAATGGGATACA [TC
 C] TGGGCTTTCTCCACTATTGCTATTGTTGAAAAGTGCCTACGCCATTAAAAACGGGCAATTGTTTTCT
 CTTTCTGAACAGCAACTGATTGACTGTGCTGGGTTTAACCCCTAGCGTCAGTGAAGATCTCAATGGAGG
 TATGTACCAAGATGGATTGGACTACATTGTAGAGAATGGTAGCGTATCGGAAAGCGATTACAGCTACA
 AAGGTGCCCGCCAGATATGCCAGATACAGGTATTGGACTTGTCTCAATCAACAGTTACAATAACTTC
 TCCCCCAGAACGAAGACGATATTGCTTATCTTGTAGCTAATCAAGGTCCCGTTGGTGTGACCATGTT
 CGGAGACACCCTGCAATTCTACAGCTCAGGTGTGTTGACGGTTTCTGCTTGGACTGGGAAATCTTCA
 TCGACCACGCTGTCACCGTTGTGCGATACGATTCTGAAAACGGCGTCGACTACTGGATCATTAGAAAC
 TCCTGGGGTACCAGCTGGGGTGAATCCGGTTATTTAGACTCGAACGTGGTGTTCAAAAAATGCGCCG
 TTGGTTACGAAGCTGCCTACGTCGAAATCGATTAA

O códon em [] indica a serina

>Sl-CathL-mutSC

ATGAAGACCTTCGTTGCATTCGCCGCTCTCGTATTGGCAGTTTCTGCTAGTTCGGAGCTGAACATGGT
 CCAGAACTGGGCCAGTTTTAAGGCCACCCACGGCAAACATACGAAAATGAATTGGAAGAAGCCAAAC
 GCTTCGCTATTTTCCAAGATAACGTTGCCAAGATCGAGACTCACAACGCTTTATACGAACAAGGTGCC
 ACAACTTACACCTTGAAGATTAATCAATTCGGTGACATGACCCAGGAAGAATTTGGAAGCATGCTCAG
 AAAATCGCACAAAACGGTGCTAGAAATGTCACTAAATTCAGAGCTCCAGTAGGCGCCGATTACCCAC
 CTTTCATACGACTGGAGGGAGCAGAACGTTGTAAACGAGATTAAGACCAAGGAGAATGGGATACA [TG
 T] TGGGCTTTCTCCACTATTGCTATTGTTGAAAAGTGCCTACGCCATTAAAAACGGGCAATTGTTTTCT
 CTTTCTGAACAGCAACTGATTGACTGTGCTGGGTTTAACCCCTAGCGTCAGTGAAGATCTCAATGGAGG
 TATGTACCAAGATGGATTGGACTACATTGTAGAGAATGGTAGCGTATCGGAAAGCGATTACAGCTACA
 AAGGTGCCCGCCAGATATGCCAGATACAGGTATTGGACTTGTCTCAATCAACAGTTACAATAACTTC
 TCCCCCAGAACGAAGACGATATTGCTTATCTTGTAGCTAATCAAGGTCCCGTTGGTGTGACCATGTT
 CGGAGACACCCTGCAATTCTACAGCTCAGGTGTGTTGACGGTTTCTGCTTGGACTGGGAAATCTTCA
 TCGACCACGCTGTCACCGTTGTGCGATACGATTCTGAAAACGGCGTCGACTACTGGATCATTAGAAAC
 TCCTGGGGTACCAGCTGGGGTGAATCCGGTTATTTAGACTCGAACGTGGTGTTCAAAAAATGCGCCG
 TTGGTTACGAAGCTGCCTACGTCGAAATCGATTAA

ANEXO I: Mapa do vetor psBI-MF22:



ANEXO I

Ferty®2-Mega composition:

16 %	Total Nitrogen:
11,0 %	nitrate nitrogen (NO ₃ -N)
5,0 %	ammonium nitrogen (NH ₄ -N)
6 %	water-soluble Phosphate (P ₂ O ₅)
26 %	water-soluble Potassium Oxide (K ₂ O)
3,4	water-soluble Magnesium Oxide (MgO)

ANEXO 11



RightsLink®



Home



Help



Email Support



Sign in



Create Account



Sugarcane cystatins: From discovery to biotechnological applications

Author:

Priscila Yumi Tanaka Shibao, Célio Dias Santos-Júnior, Adelita Carolina Santiago, Chakravarthi Mohan, Mariana Cardoso Miguel, Danyelle Toyama, Marcos Antonio Sanches Vieira, Subramonian Narayanan, Antonio Figueira, Adriana K. Carmona, Andreas Schiermeyer et al.

Publication: International Journal of Biological Macromolecules

Publisher: Elsevier

Date: 15 January 2021

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>



Review

Sugarcane cystatins: From discovery to biotechnological applications



Priscila Yumi Tanaka Shibao^{a,f}, Célio Dias Santos-Júnior^{a,g,h}, Adelita Carolina Santiago^a, Chakravarthi Mohan^a, Mariana Cardoso Miguel^a, Danyelle Toyama^a, Marcos Antonio Sanches Vieira^b, Subramonian Narayanan^c, Antonio Figueira^d, Adriana K. Carmona^e, Andreas Schiermeyer^f, Andrea Soares-Costa^a, Flavio Henrique-Silva^{a,*}

^a Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil

^b Center for Agrarian Sciences, Federal University of São Carlos, Araras, Brazil

^c Genetic Transformation Laboratory, Division of Crop Improvement, ICAR Sugarcane Breeding Institute, Coimbatore, India

^d Center for Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brazil

^e Department of Biophysics, Federal University of São Paulo, Instituto de Medicina, São Paulo, Brazil

^f Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology (IME), Aachen, Germany

^g Institute of Science and Technology for Brain-Inspired Intelligence, Peking University, Shanghai 200403, China

^h Key Laboratory of Computational Neuroscience and Brain-Inspired Intelligence, Ministry of Education, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 September 2020

Received in revised form 25 November 2020

Accepted 26 November 2020

Available online 04 December 2020

Keywords:

Saccharum

Cysteine protease

Phytocystatin

ABSTRACT

Phytocystatins are tight-binding cysteine protease inhibitors produced by plants. The first phytocystatin described was isolated from *Oryza sativa* and, since then, cystatins from several plant species were reported, including from sugarcane. Sugarcane cystatins were uncovered in Sugarcane EST project database, after sequencing of cDNA libraries from various sugarcane tissues at different developmental stages and six sugarcane cystatins were cloned, expressed and characterized (CaneCPI-1 to CaneCPI-6). Their recombinant proteins were produced in different expression systems and inhibited several cysteine proteases, including human cathepsin B and L, which can be involved in pathologies, such as cancer. In this review, we summarize a comprehensive history of all sugarcane cystatins, presenting an updated phylogenetic analysis, chromosomal localization, and genomic organization. We also present protein docking of CaneCPI-5 in the active site of human cathepsin B, insight to about cathepsin structure, recombinant expression in different systems, comparison of their inhibitory activities against human cysteine cathepsins B, K, L, S, V, kalipains from *Plasmodium falciparum* and a cathepsin L-like from the sugarcane weevil *Sphenophorus litus*, and in light on their potential and current applications in agriculture and health.

© 2020 Published by Elsevier B.V.

Contents

1. Introduction	677
2. Materials and methods	677
2.1. Chromosome, cellular location and intron inference	677
2.2. Phylogenetic analysis	677
2.3. Protein docking	677
2.4. Recombinant expression of CaneCPI-6 production in <i>E. coli</i>	677
2.5. CaneCPI-4 recombinant expression in <i>Pichia pastoris</i>	678
2.6. CaneCPI-5 production in plant-based systems	678
2.6.1. Sugarcane	678
2.6.2. Transient expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> leaves	678
2.7. Inhibitory activity of cane cystatins	678
2.8. <i>Sphenophorus litus</i> challenge in artificial diet	678
3. Sugarcane cystatins phylogeny and characteristics	678

* Corresponding author.

E-mail address: dfh@ufscar.br (F. Henrique-Silva).