

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

“EXPRESSÃO HETERÓLOGA, PURIFICAÇÃO E ESTUDOS DE ATIVIDADE DE UMA
PROTEÍNA INIBIDORA DE CISTEÍNO PROTEASE DA CANA-DE-AÇÚCAR E
POSTERIOR EVOLUÇÃO IN VITRO PELA TÉCNICA DE DNA SHUFFLING”

ANDREA SOARES DA COSTA FUENTES

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

SÃO CARLOS –

-2004 -

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

F954eh

Fuentes, Andrea Soares da Costa.

Expressão heteróloga, purificação e estudo de atividade de uma proteína inibidora de cisteíno protease da cana-de-açúcar e posterior evolução in vitro pela técnica de DNA Shuffling / Andrea Soares da Costa Fuentes. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

101 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Genética molecular. 2. Cistatina. 3. Cana-de-açúcar. 4. Canacistatina. 5. Proteína antifúngica. 6. Inibidores de cisteino protease. I. Título.

CDD: 574.87328 (20^a)

Orientador

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva

SUMÁRIO

SUMULA CURRICULAR.....	I
AGRADECIMENTOS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
ABSTRACT.....	XI
RESUMO.....	XII
1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1-CANA-DE-AÇÚCAR.....	1
1.2-PATÓGENOS.....	3
1.3-PROTEÍNAS DE DEFESA.....	7
1.4 CISTATINAS.....	12
1.4.1- ORIZACISTATINA.....	16
1.4.2- CISTATINAS DE CANA-DE-AÇUCAR.....	17
1.5- EVOLUÇÃO MOLECULAR DIRETA DE PROTEÍNAS.....	18
1.6- PROJETO GENOMA DA CANA-DE-AÇÚCAR (SUCEST).....	20
2.0-OBJETIVOS.....	21
3.0-MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1-MATERIAIS.....	22
3.2-MÉTODOS.....	23

3.2.1- ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO CLONE SCCCRZ2001GO9.....	23
3.2.2-ISOLAMENTO DA REGIÃO CODANTE DA CPI DA CANA-DE-AÇÚCAR.	24
3.2.3- ISOLAMENTO DA FASE ABERTA DE LEITURA A PARTIR DO VETOR PGEM-T.....	26
3.2.4-SUBCLONAGEM DO cDNA RZ2001 EM VETOR pET28a.....	27
3.2.5- EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RZ2001 EM <i>E.coli</i>	29
3.2.7-ENSAIO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO FUNGO <i>Trichoderma reesei</i>	32
3.2.8-ENSAIO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DOS FUNGOS PATOGENICOS.....	33
3.2.9-ANÁLISE POR DICROÍSMO CIRCULAR.....	34
3.2.10-CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR.....	36
3.2.11-DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR.....	37
3.2.12-ENSAIO DE CRISTALIZAÇÃO.....	37
3.2.13- TESTE DE INIBIÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASES COM A PROTEÍNA RZ2001.....	40
3.2.14- SELEÇÃO DOS GENES HOMÓLOGOS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	41
3.2..15- ISOLAMENTO DA REGIÃO CODANTE DE INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASES.....	44
3.2.16-TRATAMENTO COM DNase I.....	44
3.2.17- REAGRUPAMENTO DOS cDNAs FRAGMENTADOS.....	45
3.2.18- OBTENÇÃO DE UM “FULL LENGTH”.....	45
3.2.19- OBTENÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE “SHUFFLING”.....	46

3.2.20- ANÁLISE DA BIBLIOTECA DE SHUFFLING.....	47
3.2.21- ANÁLISE DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO CLONE A10PL3.....	48
3.2.22- TESTE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DE PROTEASES COM A PROTEÍNA A10PL3.....	50
4.0-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1-ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO CLONE SCCCRZ2001G09.....	51
4.2-SUBCLONAGEM DO cDNA QUE CODIFICA PARA CPI.....	53
4.3-EXPRESSÃO DA RZ2001 (CPI) NO VETOR pET28a.....	57
4.4-PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RZ2001.....	59
4.5-TESTES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO FO FUNGO FILAMENTOSO <i>Trichoderma reesei</i>.....	61
4.6-TESTES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	64
4.7- ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR E ESTRUTURA SECUNDÁRIA ESTIMADA.....	70
4.8-ANÁLISE POR EXCLUSÃO MOLECULAR.....	72
4.9-OBTENÇÃO DE CRISTAIS.....	74
4.10- AÇÃO INIBITÓRIA DA PROTEÍNA RZ2001.....	76
4.11-CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE SHUFFLING.....	78
4.11.1- AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODANTE DA CISTATINA DE CANA-DE- AÇÚCAR (RZ2001).....	79
4.11.2-AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODANTE DA CISTATINA DE ARROZ.....	80
4.11.3- TRATAMENTO COM DNASE I.....	81

4.11.4-RECOMBINAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DA CANACISTATINA E ORIZACISTATINA.....	82
4.11.5- AMPLIFICAÇÃO POR PCR DOS PRODUTOS RECOMBINADOS.....	83
4.11.6- ANÁLISE DAS BIBLIOTECAS DE “SHUFFLING”.....	84
4.11.7- ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA BIBLIOTECA DE SHUFFLING CANACISTATINA/ ORIZACISTATINA.....	84
4.11.8-ANÁLISE DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HÍBRIDA A10PL3.....	89
4.11.9-TESTES DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA PELA PROTEÍNA A10PL3 COM CATEPSINAS.....	90
5.0- CONCLUSÕES	93
6.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	94

SÚMULA CURRICULAR

- Titulação Acadêmica

- Graduação: Engenharia Agrônômica. Universidade Federal de São Carlos. Período de março de 1995 a dezembro de 1999.

- Pós-Graduação: Doutorado em Ciências, área de concentração em Genética e Evolução. Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos. Período de março de 2000 a outubro de 2004. Dissertação intitulada “Expressão Heteróloga, Purificação e Estudos de Atividade de uma Proteína Inibidora de Cisteíno Protease da Cana-de-açúcar e posterior Evolução in vitro pela Técnica de DNA shuffling”. Orientador: Professor Dr. Flavio Henrique Silva (em andamento).

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

- 1-Soares-Costa, A; Beltramini, Leila Maria; Thiemann, Otavio Henrique. Henrique-Silva, Flavio. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification and antifungal activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 296, p. 1194-1199, 2002.

- 2- Oliva, Maria Luiza Vilela, Carmona, Adriana K., Andrade, Sheila S., Cotrin Simoni S., Soares-Costa, A and Henrique-Silva, F. Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine peptidase inhibitor from sugarcane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.320. p.1082-1086, 2004.

- 3-The Ludwig-FAPESP Transcript Finishing Initiative, Camargo, Anamaria A; Mari Cleide Sogayar. Transcript Finishing Initiative for Closing Gaps in the Human Transcriptome. *Genome Research*, 2004

4-Silveira, Henrique Cesar; Sommer, Cesar Augusto; Soares-Costa, A; Henrique-Silva, F. A calcineurin inhibitory protein over expressed in Down's Syndrome interacts with the product of ubiquitously expressed transcript. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.37, p.785-789, 2004.

5-Novo, MariaTeresa M; Soares-Costa, A; Figueira, Ana Carolina M; Palacios, Carlos A.; Kull, Claudia R; molina, Gustavo C; Monteiro, Izabel; Baldan-Pineda, Paulo H; Henrique-Silva, F. A complete approach for recombinant protein expression training: from gene cloning to assessment of protein functionality. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2004. (In press)

6- Novo, Maria Teresa M, Souza, Antonia Queiroz Lima, Soares-Costa, A, Pereira, José Odair and Henrique-Silva, F. Inhibition of filamentous fungi and *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* growth by recombinant oryzacystatin I, a cysteine protease inhibitor from rice. *Applied and Enviromental Microbiology*, 2004. (Submitted)

7- Soares-Costa, A; Pereira, José Odair; Souza, Antonia Queiroz Lima de; SILVA, Henrique-Silva, F. Canecystatin, the first cystatin described in sugarcane can inhibit plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*. (Manuscrito em preparação)

8-Malago Junior, Wilson; Sommer, Cesar Augusto; Soares-Costa, A; Possik, Patricia Abrão; Silveira; Henrique Cesar Santejo; Henrique-Silva, F. Gene expression profile of human Down syndrome leukocytes. 2004. (Submitted to Croatian Medical Journal)

DEMAIS TIPOS DE PRODUÇÃO TÉCNICA

1-COSTA, Andrea Soares da; SILVA, Flavio Henrique. Expressão e purificação de proteínas recombinantes. 2003. (Curso de curta duração ministrado – 50 h).

2-COSTA, Andrea Soares da; SILVA, Flavio Henrique; NOVO, Maria Teresa M. Introdução a Engenharia Genetica. 2003. (Monitoria).

3-COSTA, Andrea Soares da. Tópicos em Genética e Evolução 2: Amplificação, clonagem e sequenciamento- uma abordagem experimental. 2001. (Curso de curta duração ministrado/Monitoria).

PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS

1-TRANSCRIPT FINISHING INITIATIVE PROJECT-Brazilian Human Cancer Genome Project- LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH.2002. (Colaboração em Projetos Científicos).

2- SUGARCANE EST GENOME PROJECT SUCEST-Fapesp. 2000. (Colaboração em Projetos Científicos).

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS EXAMINADORAS

TRABALHOS DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO

1-Participação em banca de Izabel Fernandez Monteiro. Produção de Anticorpos contra uma cisteína protease de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* para utilização em Diagnóstico de Câncer Cítrico. 2004. Trabalho de Conclusão de Curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de São Carlos.

2-Participação em banca de Viviane Nogaroto. Subclonagem, expressão e caracterização da xilelase, uma cisteína protease da bactéria *Xylella fastidiosa*. 2003. Trabalho de Conclusão de Curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de São Carlos.

3- Participação em banca de Marcia Yuri Kondo. Clonagem e expressão de uma nova cistatina de cana-de-açúcar. 2002. Trabalho de Conclusão de Curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos.

OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

Durante o período de 25/06/2003 a 25/08/2003 foi realizado um estágio no laboratório do Dr. Stephen Benkovic da Penn State University (Pennsylvania) Estados Unidos. Neste estágio foi realizado treinamento da técnica de DNA shuffling, que faz parte do projeto de doutorado intitulado: “Expressão heteróloga, purificação e estudos de atividade de uma proteína inibidora de cisteína protease da cana-de-açúcar e posterior evolução *in vitro* pela técnica de “DNA shuffling”, processo FAPESP: 02/06311-3.

RESUMOS EM ANAIS DE EVENTOS

1-NOVO, Maria Teresa Marques., COSTA, Andrea Soares da; SOUZA, Antonia Queiroz Lima de; PEREIRA, José Odair; and SILVA, Flavio Henrique. INHIBITION OF PLANT PATHOGENIC FUNGI BY RECOMBINANT ORYZACYSTATIN I, A CYSTEINE PROTEASE INHIBITOR FROM RICE. In: XXXIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2004, Caxambu. SBBq/Programa e Resumos da XXXIII Reunião Anual/2004.São Paulo: SBBq.

2- NOVO, Maria Teresa Marques.,COSTA, Andrea Soares da; SOUZA, Antonia Queiroz Lima de; PEREIRA, José Odair; BALDAN-PINEDA, Paulo.H.; FIGUEIRA, A.C.M.; KULL. Claudia.R.; MOLINA, G.C.; MONTEIRO, I.F.; PALACIOS, C.A.; SILVA, Flavio Henrique. A COMPLETE APPROACH FOR RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION TRAINING: FROM GENE CLONING TO ASSESSMENT OF PROTEIN FUNCTIONALITY. In: XXXIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2004, Caxambu. SBBq/Programa e Resumos da XXXIII Reunião Anual/2004.São Paulo: SBBq.

3 COSTA, Andrea Soares da; SOUZA, Antonia Queiroz Lima de; PEREIRA, José Odair; SILVA, Flavio Henrique. CANECYSTATIN, THE FIRST CYSTATIN DESCRIBED IN SUGARCANE CAN INHIBIT PLANT PATHOGENIC FUNGI. In: XXXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2003, Caxambu. SBBq/Programa e Resumos da XXXII Reunião Anual/2003.São Paulo: SBBq, 2003. p. 112-112.

4-OLIVA, Maria Luiza V; COSTA, Andrea Soares da; SILVA, Flavio Henrique FURTHER CHARACTERIZATION OF A CYSTEINE PROTEINASE FROM *B.forficata* LEAVES. In: XXXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2003, Caxambu. SBBq/Programa e Resumos da XXXII Reunião Anual/2003. São Paulo: SBBq, 2003. p. 145-145.

5 CAMARGO, Ana Maria ;COSTA, Andrea Soares da; Consórcio TFI. TRANSCRIPT FINISHING INITIATIVE(TFI): NEW GENES IDENTIFICATION AND ANNOTATION. In: XXXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, Caxambu. SBBq/Programa e Resumos da XXXII Reunião Anual/2003. São Paulo: SBBq, 2003. p. 15.

6 MALAGÓ JUNIOR, Wilson; COSTA, Andrea Soares da; POSSIK, Patrícia Abrão; SOMMER, Cesar Augusto; SILVEIRA, Henrique Cesar. TRANSCRIPTIONAL STUDIES IN LEUKOCITES OF A DOWN SYNDROME PATIENT USING THE SERIAL ANALYSIS OF GENE EXPRESSION (SAGE).In: XXXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2003, Caxambu. SBBq/Programa e Resumos da XXXII Reunião Anual/2003. São Paulo: SBBq, 2003. p. 15-15.

7 COSTA, Andrea Soares da; SILVA, Flavio Henrique. A cystatin from sugarcane can inhibit the growth of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. In: XXXI REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2002, Caxambu. Resumos da XXXI Reunião da SBBq. 2002.p. 94.

8 COSTA, Andrea Soares da; BELTRAMINI, Leila Maria; RODRIGUES, Elisandra Marcia; THIEMANN, Otávio Henrique; SILVA, Flavio Henrique. Expression in *E.coli*, purification and initial structural studies of a cystatin from sugarcane. In: XXXI REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2002, Caxambu. Resumos da XXXI Reunião da SBBq. 2002. p. 108-108.

9 MALAGÓ JUNIOR, Wilson; COSTA, Andrea Soares da; SOMMER, Cesar Augusto; PANEPUCCI, Rodrigo Alexandre; POSSIK, Patrícia Abrão; SILVEIRA, Henrique Cesar; CASSAGO, Alexandre; SILVA, Flavio Henrique. Human leukocyte transcriptome profile of a down syndrome patient. In: 48 CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA, 2002, Aguas de Lindóia. Resumos 2002.

10 PANEPUCCI, Rodrigo Alexandre; SOMMER, Cesar Augusto; COSTA, Andrea Soares da; MALAGÓ JUNIOR, Wilson; POSSIK, Patrícia Abrão; SILVEIRA, Henrique Cesar; CASSAGO, Alexandre. SAGE Transcriptome profiling of human leukocytes from 28 year old down syndrome individual. In: XXXI REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2002, Caxambu. XXXI reunião da SBBq. 2002. p. 27-27.

11 PFISTER, Sandra Cristina; COSTA, Andrea Soares da; SILVA, Flavio Henrique. Construction of a new plasmids expressing fluorescent proteins target to nucleus and mitochondria. In: XXX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2001, Caxambu. Resumos da XXX SBBq. 2001. p. 12-12.

12 COSTA, Andrea Soares da; ANTONINI, Sandra Regina Ceccato. Identificação e uso contínuo de leveduras no processo de fermentação etanólica através de taxonomia classica e RAPD. In: VII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFSCAR, 1999, São Carlos. Resumos do VII Congresso de Iniciação Científica da UFSCar. 1999.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor, Dr. Flavio Henrique Silva, pela orientação, confiança, incentivo e amizade.

Expresso meus sinceros agradecimentos às instituições e a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

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

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

Dra. Adriana K. Carmona (UNIFESP – São Paulo) e Dra. Maria Luiza Vilela Oliva pela colaboração no trabalho, gentileza e disposição oferecidos.

Dra. Ana Paula Ulian de Araújo (IFSC-USP-São Carlos) pela colaboração oferecida.

Dr. Glaucius Oliva e o grupo de cristalografia do IFSC-USP, que sempre abriram as portas do laboratório para utilização e colaboração.

Dr. Otávio Henrique Thiemman (IFSC-USP - São Carlos) pela gentileza e auxílios prestados e amizade.

Dra. Heloísa Selistre de Araújo (UFSCar), pela utilização de equipamentos e atenção.

Dra. Leila Maria Beltramini (IFSC-USP-São Carlos) pelos ensaios de Dicroísmo Circular

Ao Professor Dr. Stephen Benkovic, Penn State University pelo treinamento recebido em seu laboratório para utilização de técnicas de Evolução “In Vitro”.

Dr. José Odair Pereira pelo fornecimento dos fungos utilizados neste trabalho.

Às secretárias do Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução: Rosemeire, Regiane e Tatiane por todos os auxílios prestados.

A todos os amigos do laboratório, pela solidariedade e pela amizade e agradável convivência durante esses anos que estivemos juntos e também aos amigos de outros laboratórios, Bioquímica e Biofísica do Instituto de Física de São Carlos-USP, pelo forte vínculo de amizade.

As amigas inesquecíveis: Daniela, Sandra, Elisete e Elisandra, pelas infinitas ajudas, pelo carinho, pela amizade e por tantos momentos inesquecíveis.

Ao meu querido Pablo, pela paciência, dedicação, carinho e compreensão nos momentos mais difíceis

Aos meus pais, pelo incentivo, dedicação e pelo modo que me ensinaram a viver. A Deus, pela minha vida e por tudo o que acontece nela.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cana-de-açúcar.....	2
Figura 2A: Broca da Cana-de-açúcar.....	4
Figura 2B: Podridão Vermelha do colmo.....	4
Figura 3: Estrutura tridimensional da proteína Orizacistatina.....	13
Figura 4: Visão esquemática da interação de uma cistatina e uma cisteíno protease.....	15
Figura 5: Esquema do modelo de interação da CEW cistatina.....	17
Figura 6: Construção do plasmídeo pET28aRZ2001.....	27
Figura 7: Esquema representativo do arranjo de um cristal.....	38
Figura 8: Esquema do método de cristalização usando a técnica da gota.....	39
Figura 9: Alinhamento entre as sequências de nucleotídeos da RZ2001 e Orizacistatina	41
Figura 10: Esquema representativo da técnica de “DNA shuffling”.....	43
Figura 11: Sequência de nucleotídeos do clone RZ2001.....	51
Figura 12: Alinhamento múltiplo das sequencias de aminoácidos das cistatinas de plantas..	52
Figura 13: Amplificação do cDNA do gene que codifica para CPI a partir do plasmídeo pSPORT RZ2001.....	53
Figura 14: Caracterização do plasmídeo pGEM-T RZ2001 com <i>Nde</i> I e <i>Eco</i> RI.....	54
Figura 15: Amplificação do cDNA do RZ2001.....	55
Figura 16: Amplificação do pET28aRZ2001 por PCR de colônia.....	56
Figura 17: Análise de Expressão da proteína RZ2001 em <i>E.coli</i>	57
Figura 18: Teste de Solubilidade da RZ2001 expressa em <i>E.coli</i>	58
Figura 19: Gradiente de Imidazol.....	59
Figura 20: Purificação da proteína RZ2001.....	60

Figura 21: Ensaio de inibição do crescimento do fungo filamentosso <i>Trichoderma reesei</i> ..	62
Figura 22: Fotomicrografias do produto da incubação de <i>Trichoderma reesei</i> com a proteína purificada.....	63
Figura 23: Fotomicrografias dos produtos de incubação da proteína RZ2001 purificada com os fungos fitopatogênicos <i>Fusarium moniliforme</i> ; <i>Aspergillus niger</i> ; <i>Colletotrichum</i> sp p25;.....	69
Figura 24: Espectro de CD da proteína canacistatina.....	70
Figura 25: Perfil cromatográfico da separação da proteína RZ2001.....	72
Figura 26: Curva de calibração da coluna superdex-75.....	73
Figura 27: Ensaio de cristalização da proteína RZ2001.....	75
Figura 28: Produto de amplificação do cDNA do gene que codifica para CPI a partir do plasmídeo pET28a RZ2001.....	79
Figura 29: Produto de amplificação da região codante da Orizacistatina.....	80
Figura 30: Gel de agarose com fragmentos de 40-120pb após a digestão com DNase I.....	81
Figura 31: Recombinação dos fragmentos purificados na ausência de primers.....	82
Figura 32: Produto de amplificação dos fragmentos recombinados de RZ2001 e OC-I.....	83
Figura 33: Alinhamento de seqüências de aminoácidos das proteínas Orizacistatina (OC-I), Canacistatina I (Cana) e A10PL3.....	86
Figura 34: Análise de Expressão da proteína A10PL3 em <i>E.coli</i>	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações de proteína RZ2001 purificada utilizadas no ensaio de inibição do crescimento de <i>Trichoderma reesei</i>	32
Tabela 2: Ensaio de inibição de crescimento de fungos fitopatogênicos.....	67
Tabela 3: Composição de estrutura secundária da proteína Canacistatina.....	71
Tabela 4: Atividade das proteínas Canacistatina em relação às catepsinas humanas.....	77
Tabela 5: Atividade das proteínas Canacistatina I, Orizacistatina I e A10PL3 em relação às catepsinas humanas.....	

ABSTRACT

Plants seem to have developed, over a long period of time, defence mechanisms against fungi and insects. One of them is the use of protease inhibitor proteins. Cystatins are proteins that inhibit specifically cysteine proteases. They occur naturally in several vegetable species and it is believed that they work in the defence mechanism from plants against some pathogens. The Canecystatin gene which codifies a protein containing 106 amino acids residues, was identified in sugarcane and bears significant similarity with oryzacystatin, a cystatin from rice. The recombinant protein was expressed in *E.coli* in the soluble form, which promoted its direct purification by affinity chromatography in nickel column. The purified protein was analysed by Circular Dichroism (CD) and displayed estimated secondary structure similar to oryzacystatin I. Besides that, the protein was submitted to crystallization assay, and it was possible to form protein crystal, which will enable future studies by X-Ray Crystallography. Canecystatin, was used successfully in growth inhibition tests against the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. The protein minimum inhibitory dose were about 50 µg/ml. The recombinant canecystatin was also able to inhibit plant pathogenic fungi including *Colletotrichum* sp P25, *Colletotrichum* sp P28, *Colletotrichum* sp P10, *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus niger*. The most efficient inhibition was obtained against *Colletotrichum* sp P10 (32.25µg/ml). In order to obtain cystatin with improved activity direct evolution tests were carried out. A shuffling library was constructed using two diferent cystatins, i.e Canecystatin and Oryzacystatin I. One clone formed by this proteins was selected. This clone was expressed, purified and subjected to activity tests, and the results shown that the activity of mutant protein increased, in particular regarding its inhibit activity of Cathepsin B. Our findings open perspectives of using this protein as a natural fungicide and of developing more resistant varieties of sugarcane .

RESUMO

As plantas parecem ter desenvolvido ao longo da evolução mecanismos naturais de defesa contra fungos e insetos. Entre eles está o uso de inibidores de protease. Cistatinas são proteínas que inibem especificamente cisteíno proteases. Elas ocorrem naturalmente em várias espécies de vegetais e acredita-se que elas estejam envolvidas com mecanismos de defesa da planta contra o ataque de patógenos. O gene da Canacistatina que codifica uma proteína contendo 106 resíduos de aminoácidos, foi identificado em cana-de-açúcar e possui significativa similaridade de sequência com a Orizacistatina I, uma cistatina de arroz. A proteína recombinante foi expressa em *E.coli* na forma solúvel, o que possibilitou sua purificação direta por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A proteína purificada foi analisada por Dicroísmo Circular que apresentou uma estrutura secundária estimada similar a proteína Orizacistatina I. Além disso, a proteína foi submetida a ensaios de cristalização e foi possível a formação de cristais protéicos, os quais serão utilizados para futuros estudos de cristalografia de Raio-X. A Canacistatina foi utilizada com sucesso em testes de inibição de crescimento do fungo *Trichoderma reesei*. A dose mínima inibitória foi em torno de 50 µg/ml. A canacistatina recombinante também foi capaz de inibir o crescimento de fungos patogênicos incluindo *Colletotrichum* sp P25, *Colletotrichum* sp P28, *Colletotrichum* sp P10, *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus niger*. A inibição mais eficiente foi obtida contra *Colletotrichum* sp P10 (32.25µg/ml). Para obtenção de uma cistatina com atividade melhorada, ensaios de evolução direta foram realizados. Uma biblioteca de shuffling foi construída utilizando duas cistatinas diferentes, a Canacistatina e a Orizacistatina I. Um clone formado por estas duas proteínas foi selecionado. Este clone foi expresso, purificado e submetido a testes de atividade e os resultados demonstraram que a atividade do mutante aumentou e este inibe a atividade da catepsina B. Nossos resultados abrem perspectivas para o uso desta proteína como um fungicida natural e para o desenvolvimento de variedades mais resistentes de cana-de-açúcar.

1-INTRODUÇÃO

1.1-CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar (*Saccharum sp*) é uma planta originária da Ásia. No Brasil passou a ser cultivada em larga escala em meados do século XVI, tornando-se um produto importante e atraente para o mercado mundial. As regiões produtoras de cana-de-açúcar concentravam-se inicialmente no Nordeste, ao redor da Bahia e Pernambuco e expandiram-se mais tarde para a região sudeste, principalmente no Rio de Janeiro e São Paulo. Devido às condições climáticas favoráveis do Brasil grandes latifúndios monocultores foram formados, fundamentando a economia regional até os dias atuais. A cana-de-açúcar é uma cultura de elevada importância econômica em muitos países tropicais e subtropicais. Dados do ano de 1995 indicaram uma área de cultivo de 4,3 milhões de hectares, produções de 240 milhões de toneladas de açúcar e 12 milhões de litros de álcool (MACEDO, 1994). O Brasil é o maior produtor de açúcar derivado de cana e o único país no mundo a produzir em larga escala um combustível renovável, alternativo e pouco poluente, o álcool em substituição ao petróleo. O mercado sucroalcooleiro movimentava cerca de 12,7 bilhões de reais por ano com a venda de produtos como o açúcar, aguardente, álcool e alguns subprodutos como melaço e vinhaça. Por consistir um mercado de expressão econômica, preocupações com a qualidade e a produtividade são constantes no setor. A qualidade e a produtividade dependem fatores como preparo do solo, adubação, escolha de variedades, plantio e ataque de pragas e doenças. Dentre estes fatores estima-se que as perdas causadas por ataque de pragas e doenças na cana-de-açúcar chega-se a cerca de 470 milhões de dólares por ano (BENTO, 1999).

A cana-de-açúcar pertence a família das gramíneas, é classificada como monocotiledônea, ordem Ciperales. É uma planta que possui facilidade de adaptação.

Propaga-se vegetativamente por meios de toletes que contêm três a cinco gemas e, uma vez colocados no sulco de plantio, sofrem indução para brotação das gemas para formação do sistema radicular. É uma planta ereta, perene, rizomatosa que forma touceiras (Fig.1). Possui colmo cilíndrico, extremamente glabro, de coloração variável e internamente com feixes vasculares totalmente primários e amplamente diversos. Possui ainda entrenós retos ou em zigue-zague de comprimento, espessura e forma variadas podendo crescer de 3 a 6 metros. Podem estar ou não revestidas de uma camada cerosa. Os nós apresentam-se

protuberantes ou constrictos. As folhas são simples, alternadas e estreito-lanceoladas. Os frutos são secos do tipo cariópse e com semente de endosperma abundante (<http://encarta.msn.com>).



Figura 1. Cana-de-açúcar. Imagem ilustrativa de uma cultura de cana-de-açúcar mostrando as características da planta (IAA/PIANALSUCAR, 1977)

As variedades de cana existentes atualmente são resultados de cruzamentos interespecíficos envolvendo as espécies *Saccharum officinarum*, *S. barber*, *S. sinense* e espécies selvagens como *Saccharum spontaneum* e *S. robustum* (BRUGNARO, 1986).

Muitas vantagens têm sido adquiridas através do estudo de melhoramento genético da cana-de-açúcar. As informações a respeito de patologias da cana têm tornado possível identificar e amenizar sintomas de algumas doenças, o que, em parte, pode ser atribuído ao progresso da biologia molecular (RAO, *et al.*, 1999).

Apesar da produtividade e qualidade da cana-de-açúcar no Brasil ocuparem lugar de destaque, observa-se que muito ainda pode ser melhorado, principalmente no que concerne à obtenção de variedades mais resistentes aos patógenos.

1.2-PATÓGENOS

Os patógenos de plantas contribuem significativamente para perdas na produção sofridas por produtores de várias culturas em todo o mundo. A cana-de-açúcar, vem sofrendo danos causados por patógenos, ocasionando grandes perdas na produção.

A planta é susceptível a doenças fúngicas, como a podridão vermelha do colmo, que resulta em prejuízos na produção e na qualidade da cana-de-açúcar. A podridão vermelha do colmo é uma doença causada por uma praga, a Broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) (fig. 2A). A larva deste inseto faz perfurações no colmo da cana deixando galerias abertas por onde penetram fungos que causam a doença. Essa doença é causada por dois fungos, o *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*, que causam a inversão da sacarose produzindo metabólitos inibidores, diminuindo a pureza do caldo, resultando em menor rendimento na produção de açúcar e álcool (GALLO, 1988) (fig 2B).

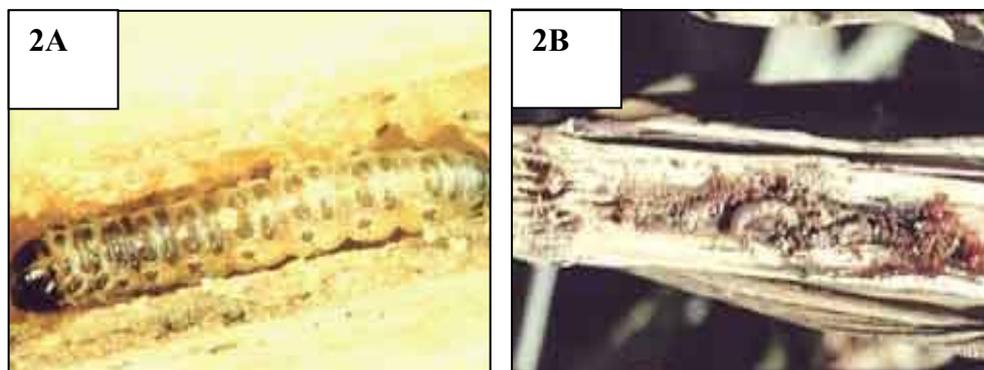


Figura 2A. Larva do inseto Diatrea Saccharallis (Broca da Cana-de-açúcar). 2B. Foto da cana-de-açúcar com galerias infectadas com *Fusarium moniliforme* apresentando o colmo avermelhado característico de uma planta com podridão vermelha do colmo (www.agrobyte.com.br)

O fungo fitopatogênico *Fusarium moniliforme* causa doenças não só em cana-de-açúcar, mas também em várias outras culturas. Cada forma de *Fusarium* é patogênica para um ou para um número limitado de hospedeiros, como no caso do *Fusarium oxysporium* que causa a podridão de raiz em tomate. As células do fungo são geralmente circundadas por uma

rígida parede celular, que não apenas confere a forma da célula, como também está envolvida em conjugação, aderência a substratos, incompatibilidade vegetativa e proteção da célula (AGRIOS, 1997 *apud in* SCHOELFFELKMEER, 1999). Estudos de algumas espécies de *Fusarium* têm mostrado que a parede celular do fungo é composta de N-acetil-glucosamina, glicose, galactose, manose, ácido glucurônico e proteínas (BARBOSA & KEMMELMEIER, 1993). Análises por microscopia eletrônica mostram que a parede celular madura dos fungos consiste em duas camadas: uma camada interna densa e outra camada externa translúcida. Esta estrutura de natureza densa da camada interna indica a presença de proteínas (HUNSLEY & BURNETT, 1970 *apud in* SCHOELFFELMEER, 1999). O tratamento com proteases remove parcialmente a camada densa e causa forte redução no sinal obtido por microscopia. Esta observação indica que a camada interna densa é enriquecida com proteínas. Estas proteínas da parede celular determinam propriedades adesivas às hifas (PENDLAND & BOUCIAS, 1993 *apud in* SCHOELFFELMEER, 1999). É possível então, que algumas moléculas da parede celular de fungos fitopatogênicos tenham alguma função na interação com a planta hospedeira.

Vários estudos revelaram a função de proteases extracelulares em fungos patogênicos de plantas. Um estudo de DOBINSON *et al.*, (1997), demonstrou que vários fungos secretam proteases digestivas em meio de cultura quando cultivados *in vitro*. Por exemplo o fungo patogênico *Verticillium dahliae* produziu uma protease extracelular em diferentes meios testados.

Um outro fungo, o basidiomiceto *Chondrosterum purpureum*, patogênico de frutíferas, também secreta proteases (MC HENRY *et al.*, 1996).

Em *Glomerella cingulata*, agente causal da Antracnose em diversas culturas, o processo de infecção normalmente envolve o ataque do esporo do fungo na superfície da planta, seguido pela diferenciação do esporo em apressório, forma que penetra na cutícula da planta. Após a invasão, o desenvolvimento do fungo dependerá da secreção de uma protease, que atuará degradando as proteínas da parede celular da planta para propósitos nutricionais do fungo e conseqüentemente sua sobrevivência (MC HENRY *et al.*, 1996).

Enquanto a função exata das proteases extracelulares em patógenos de plantas ainda é pouco conhecida, sua importância durante o processo de infecção dos tecidos das plantas parece clara em alguns casos.

Segundo BALL *et al.*,(1991) vários fungos patogênicos, os quais são deficientes em proteases, foram caracterizados como não patogênicos, sugerindo uma função para as proteases secretadas durante o processo de infecção, colonização e patogênese de plantas

susceptíveis. Um exemplo é o patógeno *Pyrenopeziza brassicae*, que infecta o espaço subcuticular das folhas, sendo porém, os sintomas da doença não visíveis, isto é, este fungo não secreta proteases e o processo de infecção não causa danos à planta. Estes mesmos autores demonstraram também que vários mutantes independentes, deficientes na produção de proteases extracelulares, perderam a habilidade de induzir lesões na planta, portanto, neste caso a protease secretada pelo fungo é um fator determinante para a patogenicidade.

Os principais métodos de controle aplicados ao combate de fitopatógenos ainda são os que se baseiam na utilização de fungicidas e pesticidas, um procedimento comum nos dias de hoje, principalmente quando os custos estão associados à doença. Porém, muitas vezes o uso excessivo de pesticidas, causam custos econômicos e ambientais. Além disso, uma das conseqüências do uso de fungicidas e pesticidas é o aparecimento de patógenos resistentes a estes produtos (GLEDDIE *et al.*, 1989). Por tais motivos a possibilidade de se desenvolver um sistema que diminua o uso de produtos químicos, que não deixe resíduos indesejáveis ao meio ambiente e que não permita o aumento de populações de patógenos resistentes é desejável. Hoje com a evolução da genética, é possível produzir plantas resistentes a patógenos através da manipulação de genes que codificam proteínas de resistência. Neste caso as plantas podem se tornar resistentes ao patógeno através da capacidade de codificar proteínas relacionadas à defesa, isto é, através de proteínas que interferem em alguma função metabólica vital para o organismo invasor e deste modo evita-se o uso indiscriminado de agrotóxicos e poluição do ambiente.

Neste contexto a análise das proteínas da cana-de-açúcar que têm função de defesa pode ser importante para estudos efetivos contra doenças causadas por fungos fitopatogênicos em cana-de-açúcar.

1.3- PROTEÍNAS DE DEFESA

Atualmente os métodos de controle de fitopatógenos concentram-se na utilização de agrotóxicos. Entretanto, existe uma demanda por parte da sociedade voltada para a utilização de uma agricultura que diminua o uso de produtos químicos e, entre as alternativas para estes problemas, está o cultivo de variedades mais resistentes.

As plantas parecem ter desenvolvido, ao longo da evolução, mecanismos de defesa contra proteases de fungos e insetos.

As proteínas anti-fúngicas desenvolvem um importante papel na defesa de plantas contra invasão de patógenos. Sabe-se que já existem centenas de proteínas antifúngicas. Há evidências de eficácia destas proteínas de defesa de plantas e animais contra ataque de patógenos. Desta forma, têm um vasto potencial tanto para o desenvolvimento de plantas transgênicas ou para o uso direto como fungicidas.

São descritas em torno de treze classes de proteínas antifúngicas. Entre elas estão as PR: proteínas chamadas “pathogenesis related”, que são classificadas em 5 grupos. As PR-1, as quais são acumuladas em tecidos de plantas após a infecção do patógeno, têm sido descritas em arroz, trigo, amido, tabaco e outras plantas. As PR-2 também chamadas de β -glucanases, têm como mecanismo de ação a hidrólise de proteínas estruturais (β -glucan) presentes na parede celular dos fungos. As PR-3 compreendem as quitinases e são divididas em 5 grupos. São as enzimas que quebram a parede celular dos fungos. As PR-4 (proteínas ligantes de quitina) são classificadas em 2 grupos. Sua atividade é resultante da ligação da proteína na parede celular do fungo nascente que contém β -quitina, porém, mecanismos exatos desta catálise ainda não são conhecidos. E finalmente as PR-5, proteínas conhecidas como “thaumatin like”, têm seu mecanismo de ação ainda não conhecido, mas há indícios de que elas possam alterar a permeabilidade celular da parede de fungos causando rápida lise das células (SELITRENNIKOFF, 2001).

A localização de muitas proteínas (PRPs) no apoplasto sugere que estas proteínas estão posicionadas em direção ao local de contato do patógeno durante o processo de infecção reforçando a hipótese de que estas proteínas atuem na defesa (VANLOON, 1997 *apud in* HAMMERSCHMIDT, 1999).

Outras classes de proteínas antifúngicas incluem as Ciclofilinas, que são receptores intracelulares para ciclosporina e inibem α e β glucosidases e as proteínas ricas em glicina e histidina. Os insetos sintetizam um grande número destas proteínas e elas atuam inibindo vários fungos patogênicos. As RIPs (“RNA N-glycosidases”) são uma outra classe de proteínas de defesa que foram classificadas em 3 grupos, que compreendem enzimas com atividade antifúngica intrínseca pela sua habilidade em inativar ribossomos. Uma outra classe interessante é a das LTPs (“Lipids Transfer Proteins”), são proteínas que possuem a habilidade de transferir fosfolipídios entre membranas. Elas têm várias funções “in vivo”, incluindo troca de lipídios entre organelas do citoplasma e defesa contra patógenos. Seu mecanismo de ação ainda não é conhecido, mas há suspeitas de que ela se insira na parede celular do fungo e forme uma cavidade permitindo um influxo extracelular de íons e leve o

fungo a morte celular. Temos ainda a classe das “Killer proteins”, que são secretadas por leveduras. Estas são letais para os fungos. Embora elas tenham mecanismos de ação variáveis, o primeiro passo desta proteína é sua ligação com um receptor específico na superfície da célula. E finalmente a última classe de proteínas de defesa estão os inibidores de protease. Estes têm sido isolados de vários organismos e dentro deste grupo existem alguns inibidores de cisteíno proteases de plantas que formam um outro grupo chamado de fitocistatinas (SELITRENNIKOFF, 2001). Estas proteínas inibidoras de protease, têm funções fitoquímicas naturais de defesa contra muitas espécies de insetos herbívoros e estão surgindo como uma nova classe de proteínas anti-fúngicas (LORITO, 1994).

Alguns mecanismos de defesa contra ataque de patógenos ocorrem através de respostas sistêmicas em tecidos que estão imediatamente próximos a organismos invasores. Estas respostas se dão através da síntese e acumulação das PRPs (proteínas relacionadas a patogêneses) e Inibidores de proteases (ABELS *et al.*, 1970).

Um ensaio utilizando *Phytophthora infestans* mostrou que estas proteínas causam quebra de esporos e inibem o crescimento do fungo (BOL & LINTHORST, 1990).

Uma proteína inibidora de serino protease encontrada em repolho pode apresentar atividade antifúngica contra duas espécies de fungos fitopatogênicos como o *Bortrytis cinerea* e *Fusarium solanie in vitro*. Entretanto, não são relatados ainda outros inibidores de serino proteases com ação anti-fúngica em plantas. Inibidores de serino proteases, em particular, têm sido relatados por atividades inseticidas (WOLFSON *et al*, 1995).

Inibidores de proteases em particular têm atraído atenção de pesquisadores visto que têm se mostrado capazes de inibir proteases que ocorrem em muitas espécies de insetos herbívoros bem como em fungos patogênicos (RYAN, 1990).

Eles são proteínas ou peptídeos capazes de inibir atividades catalíticas de enzimas, o que é conhecido desde o final do século passado em nematóides (MACEDO, *et al*, 2000). Os inibidores de proteases são conhecidos por regular atividades proteolíticas endógenas em órgãos de estocagem e atuam como parte do mecanismo de defesa da planta contra ferimentos e invasão de insetos ou fungos (PARK *et al.*, 2000). Inibidores de protease ocorrem naturalmente em várias espécies de plantas e acredita-se que têm uma função no mecanismo de defesa natural das plantas contra insetos (GREEN & RYAN, 1972 *apud in* WILHITE *et al* 2000). A habilidade dos inibidores de protease de interferir no crescimento e desenvolvimento de insetos tem sido atribuída à sua capacidade de ligar-se e portanto, inibir a ação das proteases digestivas destes patógenos (WILHITE *et al*, 2000).

Plantas de tabaco expressando um gene denominado D4E1, cuja proteína interage com esteróis presentes na parede celular de fungos, mostrou altos níveis de resistência ao fungo patogênico *Colletotrichum destructivum*, causador da doença antracnose (JEFFREY *et al.*, 2000)

As proteínas de defesa podem ser produzidas em tecidos que são vulneráveis ao ataque de insetos, como as sementes, ou por danos mecânicos, como ocorre quando um inseto se alimenta de folha ou colmo.

De acordo com sua especificidade as proteases podem ser divididas em quatro classes: serino-proteases, cisteíno-proteases, metallo-proteases e aspartil-proteases (TERRA & FERREIRA, 1994).

Os inibidores de serino e cisteíno proteases são amplamente distribuídos em tecidos de reserva da planta. Além da função de proteção das plantas contra o ataque de patógenos são também utilizados como proteínas de reserva em algumas sementes. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição competitiva via bloqueio de atividade proteolítica. A ingestão de inibidores de protease por patógenos interfere no processo de degradação de proteínas no intestino médio. Assim sendo, os inibidores de proteases são considerados agentes anti-metabólitos, pois levam a uma deficiência protéica nos patógenos ocasionada pela diminuição da disponibilidade de aminoácidos, prejudicando assim a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do patógeno (BROADWAY, 1995).

Foi relatado por HEAT *et al.*, 1997, a ação inibitória de uma proteína inibidora de protease de *Nicotiana glauca*, uma planta ornamental, contra enzimas proteolíticas de várias ordens de insetos.

O uso de seqüências de cDNAs que codificam inibidores de protease pode ser interessante no desenvolvimento de plantas que são resistentes aos patógenos, pois estes podem inibir uma variedade de enzimas proteolíticas. Os inibidores foram propostos como uma ferramenta para o controle de pestes e organismos patogênicos, como insetos, nematóides e até patógenos humanos, mesmo que ainda não se conheça com exatidão seus mecanismos de ação.

Pestes e patógenos são os maiores constrangimentos para o crescimento e desenvolvimento de plantas, resultando em um aumento do prejuízo na produção e na qualidade das culturas.

Considerando que o uso dos fungicidas químicos tem mostrado um efeito nocivo à saúde dos humanos, há a tendência de usar e buscar estratégias seguras para acentuar os mecanismos de defesa naturais das culturas. Inibidores de protease em particular têm atraído a

atenção de pesquisadores visto que têm se mostrado capazes de inibir proteases que ocorrem em muitas espécies de insetos bem como em fungos patogênicos (RYAN, 1990). Apresentam desta forma, um vasto potencial tanto para o desenvolvimento de plantas transgênicas ou para o uso direto destas proteínas como fungicidas. A expressão de uma proteína inibidora de serino protease de ervilha em tabaco aumentou a resistência a insetos herbívoros e foi o primeiro exemplo de envolvimento destas proteínas na ação de defesa de plantas (HILDER, 1987 *apud in* JOSHI, 1999). Este tipo de estudo foi realizado em várias espécies de plantas (MACMANUS, 1994 *apud in* JOSHI 1999).

A função de proteínas inibidoras de cisteíno protease (CPI) como um agente de defesa foi relatada previamente por WOLFSON *et al.*, 1995.

Inibidores de protease são produzidos em órgãos de armazenamento e sementes. A síntese é induzida por ferimento e estes contribuem para o complexo mecanismo de defesa das plantas. Altos níveis de inibidores de protease são induzidos em folhas de batata por ferimento. Estes inibidores quando ingeridos pela larva do besouro da batata Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*), induzem a expressão de atividades proteolíticas específicas no intestino do inseto e alteram o seu crescimento (GRUDEN *et al.*, 1998).

1.4-CISTATINAS

As cistatinas foram definidas como proteínas que inibem especificamente cisteíno proteases em geral (BARRET *et al.*, 1986).

Através dos avanços na enzimologia foi demonstrada a existência de uma variedade de cisteíno proteases resultando em sua classificação em várias famílias, nomeadas de papaína, calpaina, caspase e asparagina. Cistatinas são inibidores específicos das enzimas pertencentes a família das papaínas (TURK *et al.*, 1991).

As cistatinas de plantas possuem alvos exógenos originários de invasores, tais como vírus, bactérias, fungos e insetos. Recentemente, o potencial do uso das cistatinas de plantas em inibir cisteíno proteases de insetos tem evoluído e a importância dos estudos das proteases digestivas de patógenos tem sido acentuada (TURK *et al.*, 1991).

Em recente estudo, ELDEN *et al.*, (1995), utilizaram a proteína Orizacistatina I para controle de patógenos através de experimento *in vivo* para verificar a habilidade desta proteína em inibir o crescimento e desenvolvimento da broca da alfafa *Hypera postica*, com resultados positivos.

Desta forma, os estudos de proteínas inibidoras de cisteíno proteases da cana-de-açúcar podem ser importantes para o desenvolvimento de plantas mais resistentes. Além disso, a utilização direta de uma proteína com estas características, expressa de forma heteróloga, diretamente no controle de patógenos na cana-de-açúcar seria pioneiro e trariam contribuições que estimulariam investigações futuras.

As cistatinas constituem uma superfamília de inibidores de cisteíno proteases. As cistatinas de origem animal têm como sua provável função garantir proteção das células e tecidos contra atividades proteolíticas de peptídases lisossomais que são liberadas ocasionalmente na morte celular.

O nome cistatina foi proposto por BARRET em 1986 e mais tarde foi usado para descrever proteínas homólogas na mesma família. Várias cistatinas de origem animal têm sido isoladas incluindo as cistatinas humanas. Todas agrupadas em uma das três famílias dentro da superfamília de cistatinas. Assim as cistatinas podem ser agrupadas em inibidores da família 1, com aproximadamente 12KDa e ausência de ligações de sulfeto, inibidores da família 2 com 14KDa, possuem 2 ligações de sulfeto e finalmente os inibidores pertencentes a família 3, constituídos por proteínas de alta massa molecular, são glicoproteínas originalmente chamada de inibidores de thiol proteases, foram inicialmente isoladas do plasma sanguíneo chamados de quinogênios, com aproximadamente 120KDa e presença de três grandes domínios cistatínicos (ABRAHAMSON, 1993).

Uma quarta classe de Cistatinas com baixo peso molecular têm sido encontradas em muitos organismos inclusive entre plantas, estas são denominadas fitocistatinas, que foram classificadas em uma família intermediária entre as famílias 1 e 2. As fitocistatinas especificamente compreendem mais de 60 membros, cujo “cluster” está entre a principal árvore evolucionária da superfamília de cistatinas (MARGIS *et al*, 1998).

As primeiras cistatinas a serem isoladas foram os inibidores específicos das enzimas pertencentes a família das papaínas, as quais incluem várias de enzimas de plantas (TURK *et al.*, 1991). As cistatinas são inibidores competitivos e reversíveis de cisteíno proteases, que atuam formando um complexo com suas proteases alvo. A inibição é causada por uma extremidade hidrofóbica em forma de cunha da molécula de cistatina sendo inserida no sítio ativo da protease bloqueando o acesso do substrato no sítio ativo (BODE, 1988). Esta forma triangular é composta por três elementos estruturais, que são três regiões que possuem resíduos ou domínios conservados na maioria das cistatinas, compreendendo uma Glicina na região N-terminal, um motivo Gln-Val-Val-Ala-Gly no primeiro “loop” e uma sequência Leu-

Pro ou Pro-Trp no segundo “loop” de ligação das famílias 1 e 2 das cistatinas. A atividade das cistatinas tem sido explicada pela presença destes três pontos de contato com a protease alvo.

Os três pontos de interação da cistatina são ilustrados na figura 4.

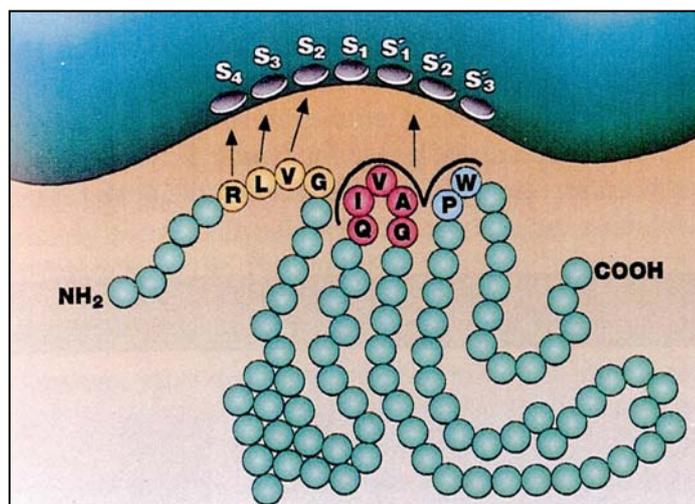


Figura 4. Visão esquemática da interação de uma cistatina e uma cisteína protease. O sítio ativo da enzima é mostrado na parte superior da figura. A cadeia polipeptídica da cistatina C é ilustrada abaixo, com os resíduos de aminoácidos indicados por letras. Três segmentos da cistatina estão envolvidos na ligação da enzima. Os resíduos da região N-terminal (amarelo) interagem com o substrato. Dois “loops” são formados, um em vermelho na região central e um segmento localizado próximo a região C-terminal (azul) juntos formam a área de contato com a protease. A conformação da molécula da cistatina não permite que ela seja clivada por uma protease na interação (ABRAHAMSON, 1993).

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

Um esquema hipotético do mecanismo de interação de inibidores com cisteíno proteases foi proposto por TURK e BODE, 1991. Este esquema foi baseado na interação da cistatina de clara de ovo “chicken egg-white cystatin”(CEW) com a papaína (figura 5).

Neste modelo ambos primeiro e segundo “loop” têm a forma apropriada para se ligar

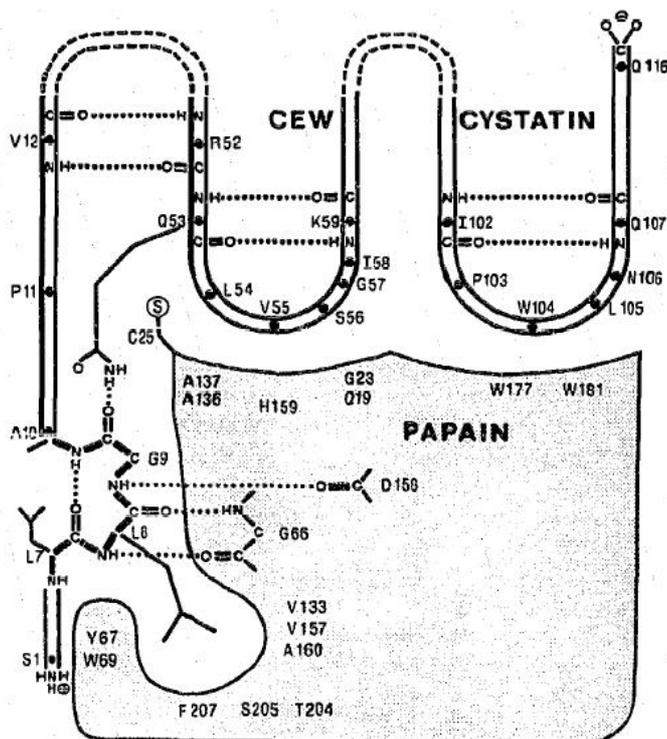


Figura 5. Esquema do modelo proposto para a interação da “chicken egg- white cystatin” e papaína.

no sítio ativo da papaína. O segmento N-terminal da cistatina (Glicina-9 e Alanina-10) é voltado para o subsítio S2 do substrato, mas em uma conformação não apropriada e distante de ser atacado pelo sítio ativo da enzima (Cisteína 25).

1.4.1-ORIZACISTATINA

Orizacistatina I é uma proteína inibidora de cisteíno protease proveniente de sementes de arroz, *Oryza sativa L.japonica*. Foi a primeira proteína de origem vegetal caracterizada como inibidor de cisteíno protease e considerada membro da superfamília das cistatinas. A proteína Orizacistatina tem potencial de ação em enzimas exógenas alvos, como a dos insetos e fungos (ABE *et al.*, 1987).

A Orizacistatina I tem sua estrutura tridimensional resolvida por espectroscopia de NMR (“nuclear magnetic resonance”) e consiste em uma hélice alfa e cinco folhas β -antiparalelas, enquanto que as regiões N e C-terminal são menos definidas (NAGATA *et al.*, 2000) figura 3.

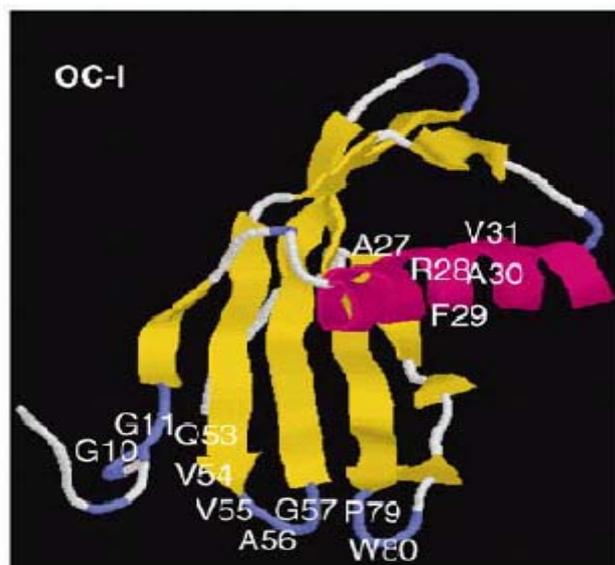


Figura 3. Estrutura tridimensional da proteína Orizacistatina-I, um inibidor de cisteína protease de arroz (*Oryza sativa*).

1.4.2- CISTATINAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

As cistatina de cana-de-açúcar foram descritas primeiramente por MARGIS *et al.*, 2001, onde foi possível a identificação de vinte e cinco prováveis fitocistatinas de cana-de-açúcar, possíveis membros da superfamília das cistatinas presentes no banco de dados de cana-de-açúcar do SUCEST (Sugarcane Expressed Tags Project).

Até o presente momento não há descrição na literatura de estudos estruturais e de atividade de cistatinas de cana-de-açúcar. Assim, estudos de expressão, purificação e testes de atividade desta proteína foram realizados neste projeto para fins de estudos estruturais e para aplicação desta como agentes antifúngicos.

Devido ao potencial antifúngico das cistatinas, também seriam interessantes estudos de evolução molecular direta que pudessem contribuir para obtenção de proteínas com

propriedades melhoradas, aumentando seu potencial de ação e intensificando ainda mais sua atividade antifúngica.

1.5- EVOLUÇÃO MOLECULAR DIRETA DE PROTEÍNAS

Através da descoberta de novas espécies e posterior estudo das mesmas, é possível a obtenção de proteínas com novas propriedades e funções, que possam ser utilizadas em estudos de atividade e até mesmo serem produzidas em laboratório. Entretanto, é possível ainda estudar proteínas com funções benéficas já existentes em espécies conhecidas, e que possam ter suas propriedades naturais melhoradas (STEMMER *et al.*, 1997).

Atualmente o interesse em proteínas com propriedades medicinais, industriais ou ambientais vêm se expandindo rapidamente, pois a utilização destas proteínas pode contribuir significativamente para a melhoria em diversas áreas aplicação, tal como saúde e alimentação.

O progresso nesta área tem se refletido no rápido desenvolvimento de métodos experimentais para criação de diversidade genética e para pesquisas nas populações encontrando funções nas proteínas que possam ser melhoradas. Estes avanços podem ajudar a criar novas moléculas funcionais e contribuir para a aplicação destas diretamente na indústria (ARNOLD *et al.*, 1999). A seleção de proteínas úteis para aplicações comerciais tem sido feita, pela procura de moléculas ou microrganismos que se adaptam em sistemas ou ambientes que possam se adequar a um organismo vivo (HARAYAMA *et al.*, 1999). Uma estratégia para otimizar propriedades de proteínas com funções importantes é através de Evolução Molecular Direta. Uma vantagem da evolução Molecular direta de proteínas é que apenas informações mínimas são requeridas para melhorar o fenótipo desejado (STEMMER *et al.*, 1997). A técnica de evolução molecular direta foi utilizada por MIYAZAKI *et al.*, (2000), para aumentar a termoestabilidade de subtilisina S41 e o resultado foi um aumento da estabilidade da enzima em torno de 100 vezes.

Uma biblioteca de variantes da enzima humana UM glutathione transferase GST-M1-1 e GST-M2-2 foi criada por evolução direta e a especificidade dos GSTs parentais para o substrato aminocromono e 2-ciano-1,3- dimetil-1 nitroguanidina aumentaram em 100 vezes em relação a enzima original (HANSSON *et al.*, 1999).

A obtenção de proteínas por evolução molecular direta pode ser realizada através da técnica de “DNA shuffling”, pela qual é possível a mistura de sequências de DNA

provenientes de diferentes ou da mesma espécie (CRAMERI *et al.*, 1998). “DNA shuffling” é um método para recombinação homóloga “*in vitro*” de um conjunto de genes mutantes relacionados, através de fragmentação ao acaso e reagrupamento pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (STEMMER, 1994). Este é um processo prático, que acelera dramaticamente o processo pelo qual um gene pode evoluir, através de efeitos de mutações benéficas em seus fenótipos. Esta tecnologia vem se estendendo em diversas aplicações como na fabricação de, uma grande quantidade de proteínas que têm sido geneticamente modificadas, vacinas, terapias gênicas e produção de moléculas farmacêuticas (PATTEN *et al.*, 1997). A engenharia de proteínas está passando pela mais profunda transformação, possibilitando a expansão e aplicação de proteínas modificadas ou melhoradas com propriedades físicas desejadas. A evolução molecular direta não requer informações sobre como a estrutura da proteína se relaciona com a função. Esta técnica se aplica em um processo ao acaso no qual a PCR é utilizada para criar uma biblioteca de genes mutados e através da seleção genética identifica-se o mutante que possui propriedades melhoradas. Nos últimos anos a evolução direta tem sido adotada pela indústria e tem provado a eficiência no melhoramento de enzimas, bem como o envolvimento de novas vias metabólicas (CHEN *et al.*, 2001). Atualmente estas alterações vêm sendo aplicadas em uma variedade de enzimas com o intuito de aumentar seu potencial de ação, desenvolvendo proteínas com propriedades funcionais melhoradas, através de técnicas de evolução direta feitas por “DNA shuffling”, o que pode ser chamado de engenharia de proteínas (HARAYAMA *et al.*, 2000).

Visto que a utilização de inibidores de cisteíno proteases para propósitos industriais, atuando como agentes antifúngicos ou como inibidores de proteases, é um campo que promete expansão rápida nos próximos anos, a engenharia de proteínas também pode aumentar o potencial de ação de fitocistatinas, através da criação de uma biblioteca de “shuffling” composta de inibidores de cisteíno proteases com diferentes atividades.

1.6- PROJETO GENOMA DA CANA-DE-AÇÚCAR (SUCEST)

O SUCEST (Sugarcane Expressed Sequence Tags) fez parte do consórcio paulista da rede ONSA (SIMPSON E PEREZ, 1998), constituído por 74 laboratórios de pesquisa do estado de São Paulo e financiado pela FAPESP com cerca de 200 pesquisadores com o objetivo de implementar o Programa Genoma. O principal objetivo do projeto Genoma da

cana-de-açúcar foi empreender um programa de EST (Expressed Sequence Tags) em larga escala através do sequenciamento ao acaso dos clones originados das bibliotecas de cDNA (DNA complementar), que foram preparadas a partir de mRNA de tecidos diferenciados (raiz, calo, folhas, sementes, flores e caule) originados de 30 diferentes cultivares de cana-de-açúcar derivados de cruzamentos das espécies *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum*. O SUCEST construiu um banco de dados com 238.000 ESTs originadas de 26 bibliotecas de cDNA. Estas bibliotecas foram construídas a partir da extração do mRNA dos vários tecidos. Os cDNAs foram clonados no vetor PSPORT, que é um vetor multifuncional próprio para construção de bibliotecas (VETTORE *et al.*, 2001). Estas sequências foram depositadas no banco de dados do SUCEST. O clone SCCCRZ2001G09, o qual foi utilizado neste projeto, que codifica uma proteína inibidora de cisteína protease (cistatina) da cana-de-açúcar foi obtido através do banco de dados do SUCEST

2- OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo estudar uma proteína inibidora de cisteína protease da cana-de-açúcar e para tal os seguintes objetivos específicos foram realizados:

- Isolamento e caracterização de um clone originário do SUCEST o qual codifica uma provável proteína inibidora de cisteína protease
- Clonagem da CPI no vetor de expressão pET28a
- Expressão da proteína em *E.coli*
- Purificação da proteína Canacistatina expressa em *E.coli*
- Ensaio de atividade da proteína Canacistatina como inibidora do crescimento do fungo filamentosso *Trichoderma reesei* e fungos fitopatogênicos
- Análise da estrutura secundária da Canacistatina por Dicroísmo Circular
- Ensaio de cristalização da proteína canacistatina
- Teste de inibição de proteases utilizando a cistatina expressa
- Seleção de genes homólogos de cana-de-açúcar que codifiquem para proteínas inibidoras de cisteína proteases para utilização em evolução *in vitro*
- Recombinação de DNA *in vitro* de uma cistatina de cana-de-açúcar e de arroz pela técnica de “DNA shuffling”
- Análise, expressão e purificação de um clone recombinado selecionado
- Ensaio de atividade do clone selecionado e comparação de atividade com as proteínas Canacistatina I e Orizacistatina I.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- MATERIAIS

Os materiais utilizados para a realização deste trabalho foram o vetor pGEM-T easy (PROMEGA) para clonagem e propagação; vetor pET28a (NOVAGEN), enzimas de restrição *Nde I* e *Eco R I* (Amersham Pharmacia Biotech).

O cDNA que codifica a provável proteína inibidora de cisteína protease da cana-de-açúcar foi obtido a partir do SUCEST junto ao grupo CC do Projeto Genoma Cana-de-açúcar no CBMEG, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Universidade de Campinas. Este clone foi resequenciado em nosso laboratório pelo método dideoxi (SANGER, 1977), utilizando sequenciador automático modelo ABI PRISM 377.

Para a expressão de proteínas em bactérias utilizamos o vetor pET 28a (NOVAGEN) Foram utilizadas cepas bacterianas necessárias para propagação e expressão de proteínas (DH-5 α e BL21(DE3) respectivamente. Para as etapas de purificação de proteínas foi utilizada resina de níquel Ni-NTA (QIAGEN). Nos experimentos de “DNA shuffling” foram utilizadas as enzimas DNase I (PROMEGA) e Pfu Turbo Hot Start DNA Polymerase. Para os ensaios de inibição de crescimentos de fungos as cepas utilizadas foram: QM 9414 ATCC (269210) de *Trichoderma reesei*; *Colletotrichum sp* isolados de pupunha (*Bactris gasipaes*) e caju (*Anacardium humile*); *Fusarium moniliforme* isolado de arroz (*Oryza sativa*) e *Arpergillus niger* isolado do “cafezinho” (*Palicourea longiflora*). Estas cepas foram cedidas pelo professor José Odair Pereira, da Universidade do Amazonas.

Para os ensaios de atividade com proteases, as enzimas utilizadas foram catepsina L (EC 3.4.22.15), catepsina B (EC 3.4.22.1), catepsina V (3.4.22.43) e catepsina K (3.4.22.38) o substrato utilizado foi o Z-Phe-Arg-MCA (SIGMA) e o ativador enzimático DL-dithiothreitol (DTT) (SIGMA).

3.2- MÉTODOS

Inicialmente foi feito o sequenciamento do clone SCCRZ2001G09 da cana-de-açúcar, e posterior análise da sequência e alinhamento através de banco de dados.

Após o isolamento da região codante da proteína inibidora de cisteína protease da cana-de-açúcar, análise de sua expressão e ensaios iniciais de sua atividade partiu-se para a etapa de purificação desta proteína seguindo com ensaios iniciais de estrutura, como o Dicroísmo Circular para estimar a estrutura secundária da proteína e ensaios de cristalização. Nas próximas etapas foram feitos ensaios de atividade antifúngica da proteína Canacistatina como inibidora do crescimento de fungos patogênicos, e ensaios de atividade da proteína

Canacistatina com diferentes proteases. O passo final foi a aplicação da técnica de “DNA shuffling”, com a recombinação das proteínas Canacistatina e Orizacistatina para a formação de uma proteína híbrida com atividade melhorada.

3.2.1- ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO CLONE SCCCRZ2001G09

O sequenciamento do clone SCCCRZ2001G09 da cana-de-açúcar foi feito pelo método dideoxi (SANGER, 1977), os “primers” utilizados foram T7 terminator e SP6. Foi possível a confirmação da sequência obtida com a sequência depositada no banco de dados do SUCEST, através de alinhamentos do clone SCCCRZ2001G09 com a sequência de nucleotídeos depositada no banco de dados do SUCEST.

Foram utilizados também os programas BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) (ALTSCHUL *et al.*, 1997) para comparação com cistatinas publicadas e MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) (CORPET, 1988) para análises mais específicas.

3.2.2- ISOLAMENTO DA REGIÃO CODANTE DA CPI DA CANA-DE-AÇÚCAR

O clone SCCCRZ2001G09 da cana-de-açúcar apresenta uma fase aberta de leitura de 378pb que codifica uma provável proteína inibidora de cisteino protease com 106 resíduos de aminoácidos (aproximadamente 12 KDa).

O cDNA inserido no vetor pSPORT 1, a partir daqui denominado pSPORTRZ2001, foi mapeado por restrição, utilizando clivagens com a enzima *Bam* HI (Amersham Pharmacia), *Bam* HI e *Pst* I (Amersham Pharmacia) e uma terceira clivagem com as enzimas *Hind* III e *Pst* I. O resultado da clivagem do vetor pSPORTRZ2001 foi observado em gel de agarose 1%. A região codante foi obtida através da amplificação em termociclador PTC-100 TM-MJ Research, utilizando os “ primers”:

RZ2001F: 5´ tgc aag gtc gtc ata tga tgg ccg agg cac 3´

SP6: 3´ att tag gtg aca cta tag 5´ (hibridiza na região 3´ do plasmídeo)

O sítio de *Nde* I, inserido no iniciador para posterior subclonagem no vetor de expressão está sublinhado. A mistura de reação para a amplificação continha 10 ng de plasmídeo pSPORT-RZ2001 molde, uma unidade da enzima Deep Vent Polimerase (NEW ENGLAND BIOLABS), o tampão da deep Vent 1X (NEW ENGLAND BIOLABS) com

3mM de Cloreto de Magnésio, 0,2 mM de dNTPs e 5pmoles de “primers“ 5’ e 3’. O programa utilizado foi 94°C 4 minutos, 30 ciclos de 94°C 1 minuto, 58°C 1 minuto, 72°C 1 minutos e 72°C a 5 minutos.

O resultado da amplificação foi observado em gel de agarose 1%. Após a amplificação os insertos foram purificados em colunas MicroSpin S-200 HR (Amersham Pharmacia Biotech). Depois de purificado, aproximadamente 50 ng do fragmento foi ligado no vetor de propagação pGEM-T easy (PROMEGA).

A transformação do produto da ligação foi feita em bactérias competentes DH5- α . As células competentes de *E.coli* foram preparadas por tratamento com cloreto de cálcio segundo o protocolo descrito por SAMBROOK *et al.*, 1989 e guardadas em alíquotas de 200 μ l a -80°C. “10 μ l” da mistura de ligação foram utilizados para transformar 200 μ l de células competentes de *E.coli* por choque térmico (SAMBROOK *et al.*, 1989). O rastreamento das colônias recombinantes foi feito através das colônias que exibiam coloração branca. Um total de 16 colônias brancas foram selecionadas para a extração do DNA plasmidial e posterior clivagem com a enzima de restrição *Nde* I (Invitrogen). O resultado das clivagens foi visualizado em gel de agarose 1% sob luz UV.

Após a confirmação do recombinante por análise de restrição o clone foi submetido ao sequenciamento utilizando os “primers” T7 promoter : 5’ taa tac gac tca cta tag gg3’ e SP6 3’ att tag gtg aca cta tag 5’.

3.2.3- ISOLAMENTO DA FASE ABERTA DE LEITURA RZ2001 A PARTIR DO VETOR pGEM-T (PROMEGA)

Baseado na seqüência do clone em pGEM-T, foi construído um novo “primer” que foi utilizado como iniciador 3’. Este “primer ” denominado RZ2001 R, cuja seqüência é mostrada a seguir, hibrida no final da ORF (Open Reading Frame) e inclui o sítio para *Eco* RI e uma trinca de terminação (sublinhado):

RZ2001R: 5`ccg aat tet ata gaa gag cta tga cgt c 3'

Foi realizada então uma nova reação de amplificação utilizando como DNA molde o plasmídeo recombinante pGEM-T/RZ2001.

A reação de amplificação continha 10ng de DNA molde, uma unidade de enzima Deep Vent polimerase (NEW ENGLAND BIOLABS), tampão da enzima 1X com 3mM de Cloreto de Magnésio, 0,2 mM de dNTPs e 5 pmoles de cada “primer” (RZ2001F e RZ2001 R). O

programa utilizado foi 94°C 4 minutos, 30 ciclos de 94°C 1 minuto, 58°C 1 minuto, 72°C 1 minuto e 72°C 5 minutos. O resultado da amplificação foi visualizado sob luz UV em gel de agarose 1%. Após a amplificação, o inserto foi purificado, para a retirada de "primers" remanescentes e sais, em colunas MicroSpin S200HR (Amersham Pharmacia).

3.2.4- SUBCLONAGEM DO cDNA RZ2001 EM VETOR pET28a (NOVAGEN)

Foram realizadas reações de clivagem com o inserto purificado e o vetor de expressão pET28a (NOVAGEN) com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Nde* I (Invitrogen) segundo a estratégia mostrada na figura 6.

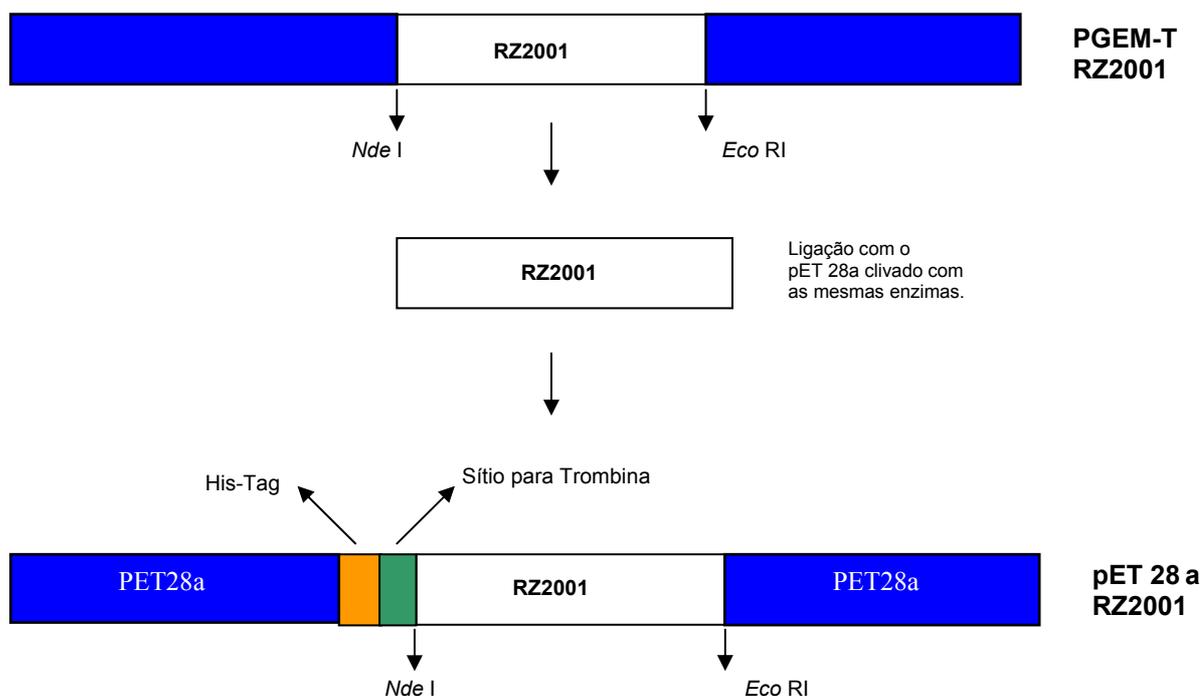


Figura 6. esquema da construção do plasmídeo para expressão da Canacistatina em E.coli. a ORF foi retirada do plasmídeo pGEM-T e transferida para o plasmídeo pET28a

As reações de clivagem foram feitas a 37° C por 3 horas e foram visualizadas sob luz UV em gel de agarose 1%.

O inserto e plasmídeo foram clivados e recuperados do gel de agarose 1% (Invitrogen) com o Kit “CONCERT Rapid Gel Extraction System” (GIBCO-BRL-Life Technologies).

Inserto e plasmídeo foram ligados durante 12 horas a 16°C, (100ng de cada). A ligação foi feita com uma unidade de T4 DNA Ligase e tampão da enzima contendo 1mM de ATP. A ligação foi então utilizada para transformar cepas de bactérias DH5- α , cloreto de cálcio competentes, preparadas segundo o protocolo descrito por SAMBROOK *et al.*,(1989).

As bactérias transformadas foram plaqueadas em LB contendo canamicina (25 μ g/ml) e as colônias transformantes foram analisadas por PCR. As colônias foram agrupadas em 5 grupos (G1, G2, G3, G4 e G5) e foram submetidas ao PCR de colônia. A reação foi feita com o uso de "primers" utilizados na amplificação do inserto RZ2001. Os grupos que apresentaram resultado de amplificação positivo foram selecionados para a extração do DNA plasmidial. As colônias dos grupos amplificados foram então cultivadas em meio LB-líquido (20g/ml, USB) com antibiótico canamicina (25 μ g/ml, USB) durante 16 horas, e delas foram feitas extrações de DNA plasmidial com o Kit “CONCERT Rapid Plasmid Miniprep System” (GIBCO-BRL-Life Technologies).

Os plasmídeos foram então caracterizados por clivagem com as enzimas de restrição *Nde* I e *Eco* RI (Invitrogen) durante 3 horas a 37°C.

Após a confirmação dos recombinantes por análise de restrição o clone selecionado foi submetido a sequenciamento para verificação da integridade do inserto. O sequenciamento de ambas fitas de DNA foi realizado pelo método dideoxi (SANGER, 1977) em sequenciador automático modelo ABI Prism 377 utilizando os "primers" T7 promoter: 5' taa tac gac tca cta tag gg 3' e T7 terminator: 3' tag tta ttg etc agc ggt gg 5' (10pmoles para um volume final de reação igual a 10 μ l).

A sequência obtida foi então comparada com a sequência no banco de dados do SUCEST e também traduzida e alinhada com a proteína Orizacistatina I utilizando o software Multialin.

3.2.5- EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RZ2001 EM *E.coli*

Após a confirmação do recombinante o plasmídeo pET28aRZ2001 foi utilizado para transformar *E.coli* BL21(DE3) cloreto de cálcio competentes e uma colônia obtida foi cultivada em meio seletivo com antibiótico canamicina (25µg/ml) a 37°C sob agitação até atingir uma densidade óptica (D.O) de 0,6 no comprimento de onda de 600nm. Nesta densidade óptica coletou-se 1ml da amostra como controle sem indução e adicionou-se IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) para uma concentração final de 0.4mM.

Foram coletadas amostras até 4 horas (intervalo de 1 hora) de indução e a expressão foi analisada em SDS-PAGE 15% segundo LAEMMLI,U.K, (1970).

Após a indução as células foram coletadas, centrifugadas e submetidas a teste de solubilidade. Para tanto as células foram sonicadas 5 vezes 60 segundos com intervalos de 30 segundos em gelo. Após a sonicação procedeu-se nova centrifugação e coletou-se o sobrenadante e precipitado, que foram analisados em SDS-PAGE 15% segundo LAEMMLI,U.K, (1970) para teste de solubilidade da proteína.

A próxima etapa foi a purificação da proteína RZ2001 expressa em *E.coli*. O método cromatográfico utilizado neste trabalho foi o de cromatografia de afinidade. Este método foi realizado em uma coluna composta por um ligante fixado covalentemente a uma matriz, capaz de interagir especificamente com a proteína de interesse. Na cromatografia de afinidade, ao passar a mistura protéica pelo complexo matriz-ligante ocorre uma interação entre a proteína alvo e o ligante imobilizado. As demais proteínas são retiradas por várias lavagens da coluna. Como o gene de interesse foi clonado no vetor pET28a fusionado em seu N-terminal com a sequência que codifica 6XHIS, que por sua vez tem a capacidade de ligação ao metal divalente Ni²⁺, foi possível a purificação em coluna de cromatografia de afinidade Ni-NTA superflow (QIAGEN).

Na cromatografia de afinidade as proteínas são separadas por suas especificidades de ligação. A cauda de histidinas permite a ligação ao Ni-NTA (Níquel-Ácido Nitrilacético), e esta cauda geralmente não interfere na estrutura ou função das proteínas expressas. A cromatografia de afinidade por metal imobilizado usa o ligante quelado ao ácido nitrilacético (NTA), que é carregado com íons Ni²⁺. Neste tipo de purificação utiliza-se o composto imidazol para realizar a eluição da proteína, já que o anel imidazólico (parte integrante da estrutura da histidina) liga-se aos íons níquel imobilizados pelo grupos NTA na matriz.

Assim o sobrenadante proveniente da lise bacteriana foi utilizado na purificação da proteína na sua forma nativa em coluna de resina de níquel (Ni-NTA QIAGEN). A coluna foi montada em seringa descartável de 10 ml, deixando 5 ml de resina de nível empacotada. Este sistema foi mantido em temperatura ambiente. Inicialmente foi feita uma lavagem da coluna com água mili-Q (Millipore), na proporção de 3 volumes (15 ml de água). Posteriormente, a coluna foi equilibrada com o tampão de sonicação (Tris-HCl 10mM, NaCl 100mM e NaH_2PO_4 , pH:8.0) com a passagem de 3 vezes o volume da resina (15 ml). Em seguida foi passado o sobrenadante com cerca de 50 ml e novamente passado 3 volumes (15ml) do tampão de sonicação (tampão 1). Assim, iniciou-se a diluição com um gradiente contendo diferentes concentrações de imidazol, isto é, os tampões utilizados na eluição continham as mesmas concentrações do tampão 1, porém com concentrações crescentes de imidazol, acrescentando 10 mM de imidazol no primeiro tampão, 25 mM de imidazol no segundo, 50mM de Imidazol no terceiro, 75mM no quarto, 100mM no quinto e finalmente o último tampão com 250mM de imidazol. A passagem dos tampões na coluna foi feita e duas frações de 10ml de cada gradiente foram coletadas. Finalmente, foi passado pela coluna 10 ml de tampão 1. As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE 15% (LAEMMLI, 1970).

Após a passagem do sobrenadante pela coluna com resina de níquel, a proteína expressa e purificada foi submetida a uma diálise utilizando membranas MWCO:3.500 (Spectrum Laboratories) previamente mantida a 100°C por 10 minutos em uma solução contendo 1mM de EDTA pH 8.0 para lavagem e abertura dos poros. Nela então foi colocada a proteína RZ2001 purificada para retirada do imidazol da solução. A membrana, já com a proteína, foi submergida em 2 litros de tampão contendo Tris-HCl 10mM, NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 10 mM, pH 8.0. Foram feitas quatro trocas de tampão a cada duas horas e o sistema foi mantido a 4°C. Em seguida foi feita a quantificação da proteína segundo BRADFORD, 1967.

3.2.7- ENSAIO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO FUNGO *Trichoderma reesei*

No experimento de inibição do crescimento do fungo filamentososo *Trichoderma reesei*, esporos do fungo que cresceram durante 5 dias foram coletados para a utilização no ensaio. Estes esporos foram ressuspensos em água estéril de forma a obter-se uma suspensão de 2.5×10^8 esporos/ml. Para o ensaio foram colocados diferentes volumes de proteína em tubos contendo 20 μ l da solução de esporos em 4ml de PDB (potato dextrose broth), para que fossem obtidas concentrações diferentes de proteína em escala crescente (Tabela 1). Foi possível uma análise da concentração aproximada de proteína que pudesse inibir o crescimento do fungo, ou seja, uma dose mínima inibitória. Como controle foi utilizado um tubo contendo esporos sem adição da proteína. A tabela 1 mostra concentrações finais de proteína purificada utilizadas para o ensaio de inibição do crescimento do fungo *Trichoderma reesei*.

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA RZ2001 (μ g/ml)
Controle	0
Tubo 1	12.5
Tubo 2	50.0
Tubo 3	100.0
Tubo 4	200.0

Tabela 1: Concentrações de proteína RZ2001 purificada utilizadas no ensaio de inibição do crescimento de *Trichoderma reesei*

Todos os tubos foram mantidos a 28°C por 72 horas sob agitação contínua. O crescimento micelial foi observado diretamente e também através da análise das amostras em microscópio OLYMPUS B x 50 no aumento de 20 vezes e fotografados em câmara digital Coolsnape Pro Color (Média Cybernetics). As amostras foram analisadas em filtro FITC e em filtro de luz branca.

3.2.8-ENSAIO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

No ensaio de inibição do crescimento dos fungos patogênicos foram utilizados esporos dos fungos *Fusarium moniliforme*; *Aspergillus niger*; *Colletotrichum sp* p25; *Colletotrichum sp* p28; *Colletotrichum sp* (C9) gentilmente cedidos pelo professor Dr. José Odair Pereira da Universidade do Amazonas, colaborador nestas análises.

Esporos de 15 dias cultivados em meio PDA (potato dextrose Agar) foram coletados e utilizados. Estes esporos foram ressuspensos em água estéril de forma a obter-se uma suspensão de 2.5×10^6 esporos/ml. Os ensaios de inibição de crescimento de fungos filamentosos foram realizados com diferentes quantidades de proteína RZ2001 purificada. Em cada poço de uma placa de Elisa foram colocados $2,5 \times 10^6$ esporos de diferentes espécies de fungos por ml de meio PDB (potato dextrose broth). Em cada poço contendo os esporos em meio PDB adicionou-se diferentes concentrações da proteína. A proteína RZ2001 foi adicionada nos poços contendo esporos e meio PDB em concentrações de 7.8, 15.6, 31.25, 62.5, 125, 250 e 500.0 $\mu\text{g/ml}$ de proteína em um volume total de 200 μl para que fossem obtidas concentrações diferentes de proteína em escala crescente. Deste modo foi possível uma análise da concentração aproximada de proteína que pudesse inibir o crescimento do fungo, ou seja, uma dose mínima inibitória. O controle deste experimento foi realizado em um poço da placa de ELISA contendo esporos mas sem adição da proteína. A placa de ELISA foi incubada a 28° C por 72 horas. O crescimento micelial foi observado diretamente e também através da análise das amostras em microscópio OLYMPUS B x 50 no aumento de 40 vezes e fotografado em câmara digital Coolsnape Pro Color (Média Cybernetics). As amostras foram analisadas em filtro de luz branca.

3.2.9- ANÁLISE POR DICROÍSMO CIRCULAR

O Dicroísmo circular (CD) é uma técnica apropriada para estimar a porcentagem dos componentes da estrutura secundária das proteínas (hélice- α , folhas- β , voltas- β e sequências desordenadas). O espectro de CD baseia-se na luz circularmente polarizada incidente em compostos assimétricos. Em proteínas, estes grupos assimétricos envolvem principalmente as ligações peptídicas, as cadeias laterais dos aminoácidos e grupos prostéticos (NAKANISHI, 1994).

Esta luz circularmente polarizada, consiste de dois feixes de onda plana, linearmente polarizados, ortogonais entre si e fora de fase por 90°. A onda linearmente polarizada pode ser decomposta em duas componentes individuais circularmente polarizadas uma à esquerda e outra à direita. Quando a luz passa através de um composto assimétrico esta é absorvida e cada um dos componentes interage de forma distinta em relação a absorvidade específica dos diferentes compostos. Dessa maneira pode-se definir o CD como a propriedade que consiste na interação distinta da luz circularmente polarizada à direita e para a luz circularmente polarizada à esquerda emitida com igual intensidade, e o sinal de CD como sendo a diferença entre a absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita (BUGS, 2001).

O CD é a contribuição linear de todas as frações de estrutura secundária que constituem uma dada proteína. Sendo assim, pela análise e desconvolução de um espectro de CD é possível estimar a composição de estruturas secundárias (VENYAMINOV *et al.*, 1994).

O espectro de CD é dividido em duas regiões próximas da região visível: na região do UV próximo e na região do UV distante. Na região de UV próximo que compreende o intervalo para o comprimento de onda entre 250 a 300 nm, verifica-se a contribuição dos aminoácidos aromáticos e também das pontes dissulfeto. Já na região UV distante que compreende o intervalo de 190 a 250 nm é dominada pela transição das cadeias peptídicas da proteína e esta região que nos permite estimar a composição da estrutura secundária e acompanhara as possíveis mudanças na estrutura que possam ocorrer durante o experimento. O espectro de CD pode ser considerado como sendo do tipo hélice- α quando apresenta um espectro contendo duas bandas negativas em 208 e 222 nm e uma banda positiva em 192nm. Já o espectro característico de folhas β apresenta uma banda negativa em 216nm e uma banda positiva em 195nm.

O espectro de CD foi realizado utilizando um espectropolarímetro Jasco J-720 sobre um comprimento de onda de 195 a 260nm. As medidas foram feitas a partir da proteína RZ2001 recombinante purificada em concentração em torno de 0.17 mg/ml, em cubetas de quartzo de 1mm de caminho óptico. Os espectros foram realizados em média 16 scans. Os espectros de CD foram medidos em tampão contendo Tris-HCl 10 mM, NaCl 100mM e NaH₂PO₄ 50mM, pH 8.0, e obtidos em miligrau de escala de elipicidade (θ). Eles foram transformados para elipicidade molar $[\theta]$ utilizando o resíduo de peso principal e prévia concentração na estrutura secundária.

A análise dos espectro de CD foi realizada através do programa *Self-Consistent* “SELCON-2”, desenvolvido por SREERAMA e WOODY (1993). Foi utilizado um banco de dados com 33 proteínas diferentes usadas para desconvolução da contribuição espectral de cada estrutura secundária. Na desconvolução, utiliza-se um método matemático chamado análise de “cluster” desenvolvido por VENYAMINOV, *et al* (1994), onde o espectro de CD é incluído em uma matriz com dados espectrais de CD. É selecionada inicialmente uma estrutura por outra e o processo é repetido até que a autoconsistência seja alcançada (SREERAMA et al., 2000). Este experimento pelo grupo de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, com a colaboração da professora Dra. Leila Maria Beltramini.

3.2.10- CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR EM SUPERDEX-75

A cromatografia de exclusão molecular é composta de uma fase estacionária, representada por um polímero de poros de tamanho variado. As moléculas de maior massa molecular não conseguem penetrar nos poros e são arrastadas pela fase móvel, enquanto que moléculas de menor massa molecular, penetram nos poros e são retidas por mais tempo, diminuindo sua trajetória na fase estacionária. Assim, proteínas com maior massa molecular migram mais rápido do que proteínas com menor massa molecular, pois aquelas não entram nos poros passando através da coluna pelo volume de exclusão. As proteínas menores, por sua vez, entram nos poros da resina e saem vagarosamente através da coluna. Assim, as diferentes proteínas serão eluídas em diferentes volumes de retenção, de acordo com a massa molecular. A resolução da cromatografia é determinada por três características: distribuição do tamanho de poros, volume do poro e tamanho da partícula. A proteína após eluída em coluna Ni-NTA foi aplicada na coluna de exclusão molecular SUPERDEX-75 (Amersham Pharmacia Biotech) com 16mm/60cm, equilibrada com tampão Tris-HCl 10mM pH 8.0 contendo NaCl 100mM e NaH₂PO₄ 50 mM. A eluição foi feita no mesmo tampão sob fluxo de 0.5 ml por minuto.

3.2.11- DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR

Para se determinar o valor da massa molecular da proteína recombinante, e confirmar seu valor teórico, foi necessário realizar uma cromatografia de exclusão molecular em coluna superdex-75 com a aplicação de uma mistura de proteínas com diferentes massas moleculares,

nas mesmas condições da cromatografia realizada com a proteína recombinante descrita na secção 3.2.9 foram filtradas na coluna duas proteínas de massa molecular conhecida, a ACB (Anidrase carbônica bovina) de massa molecular 29.000 Da, Citocromo C com 12.000Da e a Riboflavina de 375Da. Uma vez realizada a separação destas proteínas na coluna determinou-se ao volume de eluição de cada uma delas, com este volume de eluição e o valor de massa molecular pode se fazer um gráfico a partir da equação da reta $Y = A + B * X$ o que possibilitou determinar o valor da massa molecular aparente da proteína em estudo.

3.2.12 - ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO

A cristalografia de proteína permite o estudo da estrutura tridimensional de moléculas através da realização de experimentos posteriores de difração de raio-X. Porém, a determinação da estrutura tridimensional de uma proteína por difração de raio-X têm como etapa crítica a obtenção de cristais de proteína. A estratégia utilizada para induzir a cristalização de macromoléculas constitui em conduzir lentamente o sistema a um estado de supersaturação, com um ambiente favorável que maximiza as interações e diminui a repulsão entre as moléculas em solução. Dessa forma, as moléculas podem se arranjar de maneira ordenada e periódica dando origem a um cristal, que consiste de moléculas idênticas que se repetem em um arranjo ordenado e periódico (Figura 7).

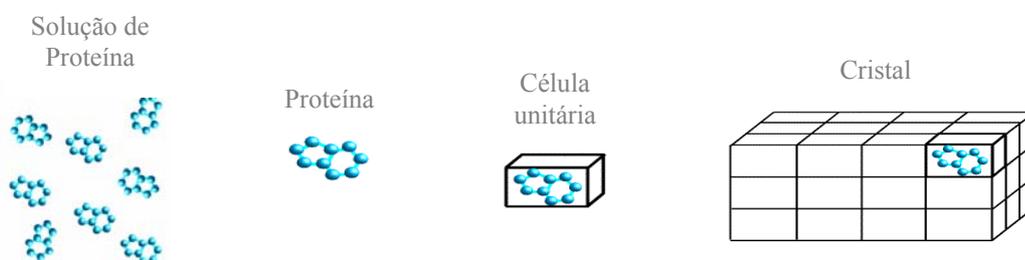


Figura 7. Esquema representativo do arranjo de um cristal protéico

Para a obtenção de cristais protéicos existem vários métodos, e entre eles está o método de Difusão de vapor, baseado no processo de equilíbrio entre duas soluções, através da passagem das espécies voláteis da solução menos concentrada para a mais concentrada (BLUNDELL, 1976). Neste método a técnica mais utilizada é a da Gota Suspensa, na qual a gota da solução de proteína mais o agente precipitante é exposta gradualmente á saturação pela perda de água da gota para o reservatório que contém a solução precipitante, desta maneira possibilitando o arranjo das moléculas de forma ordenada originando o cristal (BRANDEN *et al.*, 1991) (Figura 8).

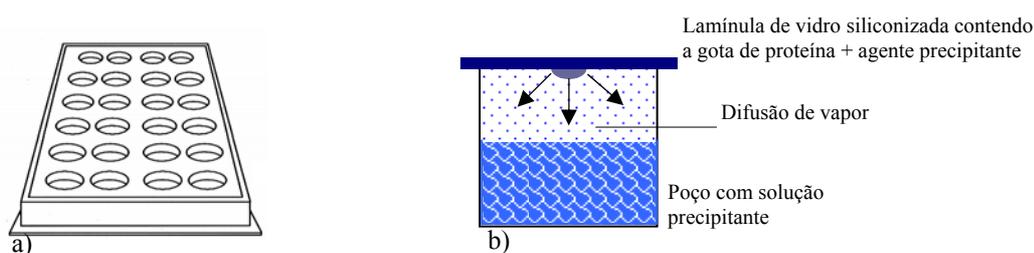


Figura 8: Esquema do método de cristalização usando a técnica da gota suspensa. a) Modelo da caixa de cristalização. Geralmente são plásticas, apresentam 24 poços marcados de diâmetro de 16 mm e cada poço comporta cerca de 2 ml de solução. b) Modelo de um poço de cristalização.

Os experimentos de cristalização com a proteína RZ2001 foram realizados após a obtenção da proteína pura fusionada à cauda de histidina. Foram adicionados 500 μ l de cada solução precipitante em cada poço e em uma lamínula siliconizada fez-se uma gota contendo 3 μ l da proteína purificada na concentração de 8mg/ml e 3 μ l da solução precipitante (solução do poço) contida no Kit Crystal Screen Reagent Formulation I e II (HAMPTON RESEARCH).

3.2.13- TESTE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DE PROTEASES COM A PROTEÍNA RZ2001 PURIFICADA

Os ensaios foram feitos em colaboração com a Dra. Adriana K. Carmona e Dra. Maria Luiza Oliva da UNIFESP e foram realizados utilizando as cisteíno proteases humanas (recombinantes) catepsinas V, K, B e L. O substrato utilizado foi o Z-Phe-Arg-MCA (SIGMA) preparado de acordo as especificações do fabricante. A dosagem foi realizada direto em cubeta de quartzo mantida em compartimento termostático a 37°C e foi ensaiada pela adição das enzimas aos seus substratos específicos, utilizando o espectrofluorímetro HITACHI-2000 com comprimentos de onda de excitação e emissão de respectivamente 380 e 460nm.

No ensaio de inibição de catepsina V foram adicionados na cubeta de quartzo 990 µl de tampão fosfato de potássio 100mM, EDTA 1mM pH 6,2, 10µl de DTE (dithiothreitol) como ativador da enzima na concentração 500mM e 1 µl da enzima catepsina V na concentração 1.3µM. Após 5 minutos de ativação da enzima foi adicionado 1µl do substrato Z-Phe-Arg-RMCA (7-amino-metil-coumarina) na concentração de 1,2 mM (1:10). Após uma incubação de 1 minuto foram adicionadas diferentes concentrações de inibidor (6nM, 12nM e 18Nm). No ensaio de inibição das catepsinas K, B e L seguiu-se o mesmo procedimento utilizado para catepsina V, modificando a concentração de enzima. As concentrações utilizadas para as enzimas foram: Catepsina K: 3µM, Catepsina B: 0.5 µM e Catepsina L: 0.14 µM. as enzimas foram tituladas com inibidores específicos.

Após o ensaios descritos acima foi realizada a determinação da constante de inibição K_i conforme descrito por BEYNON e BOND, 1989.

3.2.14- SELEÇÃO DOS GENES HOMÓLOGOS DE CANA-DE-ACÚCAR

A seleção os genes homólogos que codificam inibidores de cisteíno protease foi feita inicialmente com os clones da cana-de-açúcar, SCSFST3081D05 e SCSFHR1043A02, que foram escolhidos baseados similaridade de sequências de DNA que foram verificadas através de alinhamentos em banco de dados (BLAST). Como tivemos dificuldades para amplificar as ORFs a partir destes clones, escolhemos a Orizacistatina I para ser utilizada para a construção

da biblioteca de “DNA shuffling”. Assim como observado na figura 9, o alinhamento entre as ORFs das proteínas RZ2001 e Orizacistatina I mostra que há similaridade entre as sequências das duas proteínas, fator este importante para a utilização desta técnica.

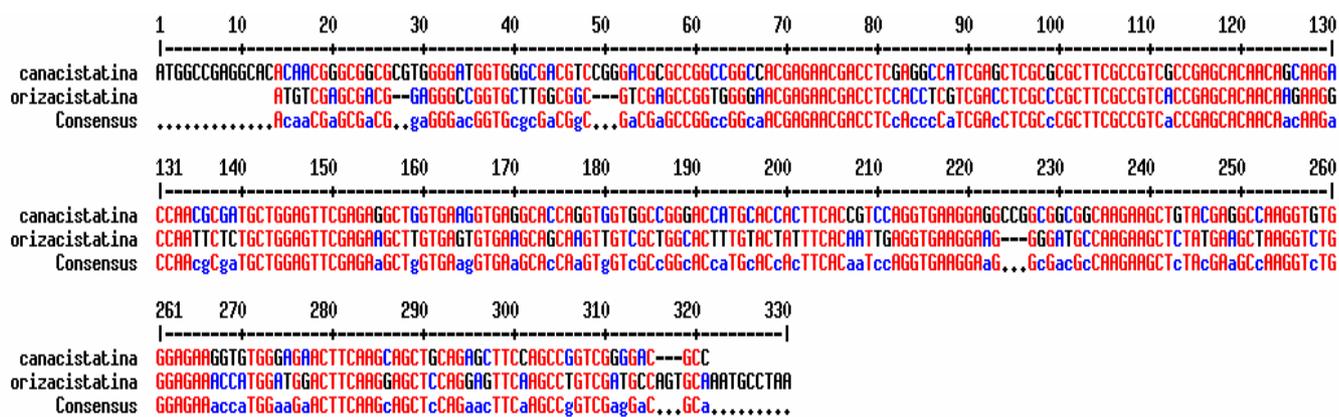


Figura 9. Alinhamento representativo das fases de leitura das proteínas Canacistatina e Orizacistatina-I.

Uma biblioteca foi construída então a partir dos insertos contidos nos clones pET28RZ2001, pET28OC-I pela técnica de “DNA shuffling”. Os experimentos de “DNA shuffling” foram iniciados após um treinamento realizado na Pennsylvania State University, Department of Chemistry, Wartik Laboratory sob supervisão do professor Dr. Stephen Benkovic, utilizando os clones da cana-de-açúcar mencionados anteriormente (SCSFST3081D05 e SCSFHR1043A02), mas após dificuldades na amplificação das ORFs, utilizou-se a Orizacistatina para a recombinação. A ORF que codifica para a Orizacistatina-I foi obtida em nosso laboratório a partir de RNA mensageiro de sementes de arroz. A região que codifica para a fase aberta de leitura desta proteína foi inserida no vetor pET28a, resultando no clone pET28aOC-I.

Para aplicação da técnica de DNA shuffling os genes a serem recombinados foram fragmentados ao acaso por DNase I os fragmentos com tamanhos entre 40-120 pb foram selecionados e purificados em gel de agarose. Estes fragmentos foram então recombinados utilizando ciclos de desnaturação, hibridização e extensão por uma polimerase. A recombinação ocorreu quando fragmentos de diferentes parentais se hibridizaram em uma região com identidade de seqüências. Seguindo esta reação de recombinação, uma amplificação por PCR com primers específicos foi feita para gerar um “full-length” apropriado para clonagem em vetor de expressão.

A figura 10, mostra uma esquema representativo da técnica de “DNA shuffling”.

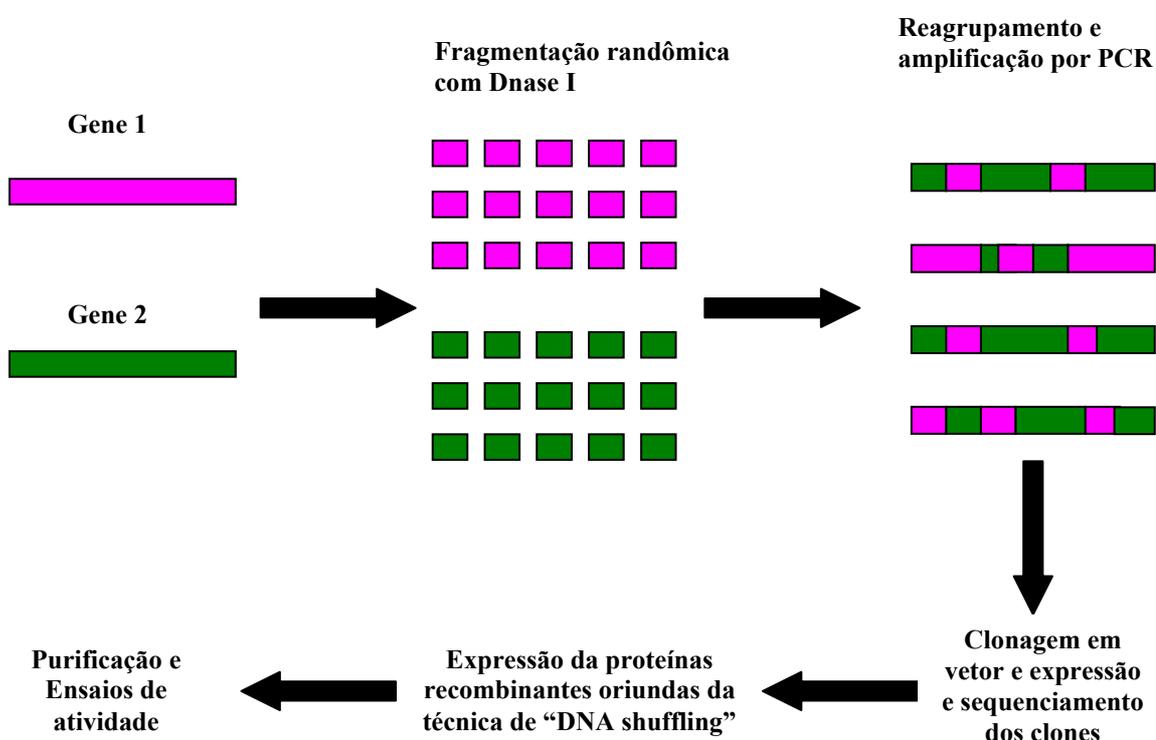


Figura 10: Esquema representativo da técnica de “DNA shuffling”. Os genes homólogos serão selecionados e fragmentados com DNase I, haverá recombinação dos sítios de homologia criando novos recombinantes, que serão amplificados para a construção das bibliotecas de novos genes.

3.2.15-ISOLAMENTO DA REGIÃO CODANTE DE INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASES

As ORFs foram amplificadas a partir dos clones pET28aRZ2001 e pET28aOC-I. Foi feita uma reação de amplificação utilizando o clone pET28aRZ2001 como molde e uma segunda reação de amplificação utilizando o clone pET28aOC-I como molde.

As regiões codantes foram obtidas através de reações de amplificação utilizando os “primers”: RZ2001 F: 5’ tcg aag gtc gtc ata tga tgg ccg agg cac e T7 “terminator”:5’ tag tta ttg ctc agc ggt gg 3’ para o gene RZ2001 e os “primers”: T7 “promoter”: ‘5 taa tac gac tca cta tag gg 3’ e T7 terminator para o gene OC-I.

3.2.16- TRATAMENTO COM DNase I:

Os produtos de amplificação, aproximadamente 3µg, foram pré- incubados a 15 ° C por 10 minutos. Em seguida foram preparados dois tampões, o tampão (1) (Tris-HCl 250mM pH 7,4 e MnCl₂ 50mM e água para 500µl) e um tampão (2) contendo (5µl de DNase I (10 U/µl estoque), 25µl de glicerol 87 % e 1,25 µl de Tris-HCl 1M pH 7,4 e água para 50µl).

As amostras submetidas a fragmentação foram preparadas pela adição de 3µg dos produtos de amplificação que foram pré-incubados a 15°C por 10 minutos, 10µl da solução (1), 10µl da solução (2) e 2.0 unidades de DNase I e água para 50µl. A reação foi mantida a 15° C por mais 2 minutos. Ao final da incubação foram adicionados 5µl de EDTA 0,5M nas amostras para finalizar a reação. Estes procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo desenvolvido por Benkovic *et al*, 2001.

Os fragmentos resultantes do tratamento com DNase I foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3.5% e os fragmentos de 40-120pb foram recuperados do gel utilizando o Kit QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol (QIAGEN). O DNA foi eluído em 30µl de água.

3.2.17- REAGRUPAMENTO DOS cDNAS FRAGMENTADOS

Os fragmentos de 40-120pb de RZ2001 e OC-I purificados a partir de gel de agarose foram misturados em um único tubo (5µl de cada) e utilizados como molde para as reações de extensão sem iniciador. A primeira extensão foi realizada utilizando 10µl da solução contendo os fragmentos, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,1 µl de *Taq* DNA polimerase (5U/µl), 0,1µl de Pfu Turbo DNA polimerase (2.5 U/µl), 2µl de Taq “buffer”10X e água para 20µl. A solução foi submetida a um “round” de extensão de 40 ciclos de 95° C 30 seg, 50 ° C 30 seg, 72° C 2 min + 2 seg/ciclo. Ao final, 10µl desta solu’ção foram utilizados como molde em uma nova extensão utilizando as mesmas condições da primeira.

3.2.18- OBTENÇÃO DE UM “FULL LENGTH”

O próximo passo é uma reação de PCR para amplificação de uma região em recombinação utilizando “primers” específicos para as extremidades da fase aberta de leitura de RZ2001 e OC-I. Os “primers” utilizados para RZ2001 foram RZ2001F: 5’ gcc atg gcg cat atg gcc gag gca cac aac ggg 3’ e RZ2001R: 5’ ccg aat tct tag gcg tcc ccg acc ggc t 3’ e para OC-I os “primers” OC-IF: 5’ggc ata tgt cga gcg acg gag ggc cg 3’ e OC-I R: 5’ccg aat tct tag gca ttt gca ctg gca tc 3’. Quatro reações foram preparadas fazendo uma combinação de “primers” intercalando os “primers” da RZ2001 com os da OC-I. Sítios para as enzimas *Nde* I e *Eco* RI foram inseridos nos “primers” 5’ e 3’ tanto de RZ2001 quanto para OC-I, respectivamente para facilitar a posterior subclonagem em vetor de expressão.

Quatro reações de amplificação foram preparadas, cada uma delas contendo, 8µl de de produto de recombinação, dNTP 0.2mM, 10µL de tampão de amplificação 10x, 3µl MgCl₂ (50mM), 2 µl primer OCI R (10 pmol/µl) e 2µl primer RZ2001F (10 pmol/µl) ou 2µl primer OCI F (10 pmol/µL) e 2µl primer RZ2001R (10 pmol/µL), 2.5 U de Taq DNA polimerase e água para completar um volume final de 100 µl. As condições de amplificação foram: 1X [94° C a 1 min], 35X [94° C 1 min, 47° C 1 min e 72° C 1.5 min] e 1X [72° C for 5 min]. O produto de amplificação foi submetido à análise em gel de agarose por eletroforese e o DNA amplificado foi purificado a partir do gel utilizando o Kit QIAEX II GEL EXTRATION (QIAGEN).

O produto desta amplificação purificado aproximadamente (3µg) foi digerido com enzimas de restrição *Eco* RI e *Nde* I e clonado no vetor de expressão pET28a clivado com as mesmas enzimas e defosforilado. O vetor pET28a foi defosforilado com fosfatase alcalina de

camarão (SAP), seguindo o protocolo: 30µl de pET28a (100ng/µl), 5µl de tampão SAP (Tris 200mM pH 8.0 e MgCl₂ 100mM); 1µl de fosfatase alcalina (1U/µl) e água para 50µl. Foi feita uma incubação de 1 hora a 37°C e inativação a 70°C por 20 minutos. Esta solução foi submetida a uma precipitação com etanol e eluída em água para um volume final de 30µl .

3.2.19- OBTENÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE “SHUFFLING”

A mistura de ligação contendo 400ng de pET28a defosforilado e 150ng de inserto foi utilizada para transformar células *E.coli* BL21 (DE3) competentes, as quais serão utilizadas para expressão das proteínas híbridas. As colônias resultantes foram analisadas para a busca de um clone recombinado.

3.2.20- ANÁLISE DA BIBLIOTECA DE SHUFFLING

Para a análise da biblioteca feita a partir de um inibidor de cisteíno protease de cana-de-açúcar e outro de arroz, partiu-se então para o sequenciamento dos clones. O sequenciamento foi feito a partir de reações de PCR das colônias transformantes.

Assim, as colônias foram picadas com palitos estéreis e inoculadas em poços contendo 100µl de meio LB broth contendo antibiótico canamicina. Estas foram incubadas em estufa a 37°C por aproximadamente 14 horas. Após o período de incubação foram adicionados 100µl de glicerol 30% estéril por poço e as amostras foram congeladas.

Um “mix” para 100 reações de PCR foi preparado em banho de gelo contendo: “primers”: T7 promoter e T7 terminator (100pmol/µl estoque): 2,6 µl, dNTP (25 mM estoque): 7,5µl, MgCl₂ (50mM estoque): 45µl, Tampão Taq 10X:150µl, Biolase DNA polimerase (5U/µl): 10µl e água milli-Q autoclavada. Foram distribuídos 15µl do mix por poço na microplaca de PCR. Um replicador de 96 agulhas previamente flambado foi colocado na microplaca de cultura e utilizado para transferir aproximadamente 1µl de cultura para a placa de PCR contendo o mix. Em seguida a reação foi colocada em termociclador com o programa: 95°C 4 min, 95° C 45 seg, 55° C 45 seg, 72°C 1 min, 40 ciclos, 72 ° C 5 min. Para a análise de qualidade do PCR de colônia foi preparado um gel de agarose 1,2 % em tampão TAE (1X).

Para o sequenciamento, os produtos de amplificação foram diluídos 1:5 em água Milli-Q. Desta diluição 3µl foram utilizados em uma reação de sequenciamento. Para a reação de

sequenciamento foi feito um mix contendo: 3µl do DNA molde, 2µl de Dyenamic ET terminator (Amersham Biosciences), 1µl de primer T7 promoter (10pmol/µl), 2µl tampão Save Money (Tris-HCl 200mM, MgCl₂5mM, pH 9.0) em um volume final de 10µl. A reação foi colocada em termociclador com o programa : 96°C 2 min, (40x) 95° C 20 seg, 50° C 15 seg, 60° C 1 min.

A reação foi submetida a um protocolo de precipitação de DNA com adição de 1µl de acetato de sódio 1.6M contendo EDTA 259mM e 40µl de etanol 95%. A mistura foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 3200g por 60 minutos a 20°C. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e 150 µl de etanol 70% foram adicionados. Uma nova centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos a 20°C foi feita, o sobrenadante foi descartado e a microplaca permaneceu à temperatura ambiente para evaporação do etanol residual. As amostras foram ressuspensas em tampão “formamide loading dye”(Amersham Biosciences). As amostras foram sequenciadas pelo método dideoxi (SANGER, 1977) e analisadas em equipamento ABI Prism 377.

As sequências obtidas foram então analisadas através de BLAST e alinhamentos utilizando o software Multalin. Estas análises foram feitas pela procura de um clone que apresentasse uma recombinação, mas que mantivesse os três domínios característicos de cistatina e apresentassem regiões de homologia da Canacistatina e da Orizacistatina.

3.2.21- ANÁLISE DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO CLONE RECOMBINADO (A10PL3)

Após análise de 400 sequências da biblioteca de shuffling, das quais a maioria apresentava similaridade de sequência com a Orizacistatina I, um clone com recombinação foi encontrado. Este clone denominado A10PL3 continha uma mistura de aminoácidos das duas proteínas, a canacistatina I e da Orizacistatina I. Este clone foi então selecionado para expressão, purificação e estudos de atividade.

O clone em BL21(DE3) foi cultivado em meio seletivo com antibiótico canamicina (25µg/ml) a 37°C sob agitação até atingir uma densidade óptica (D.O) de 0,6 no comprimento de onda de 600nm. Nesta densidade óptica coletou-se 1ml da amostra como controle sem

indução e foi adicionado IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) para uma concentração final de 0.4mM.

Foram coletadas amostras até 4 horas (intervalo de 1 hora) de indução e a expressão foi analisada em SDS-PAGE 15% segundo LAEMMLI (1970).

Após a indução as células foram coletadas, centrifugadas e submetidas a teste de solubilidade. Para tanto as células foram sonicadas 5 vezes 60 segundos com intervalos de 30 segundos. Após a sonicação procedeu-se nova centrifugação e coletou-se o sobrenadante e precipitado, que foram analisados em SDS-PAGE 15% segundo LAEMMLI (1970) para teste de solubilidade da proteína.

O sobrenadante foi utilizado para purificação da proteína na sua forma nativa em coluna de resina de níquel (Ni-NTA superflow – QIAGEN). A purificação em cromatografia de afinidade e a diálise foram realizadas como descrito na seção 3.2.5.

3.2.22- TESTE DE INIBIÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASES COM A PROTEÍNA A10PL3

Os ensaios foram feitos em colaboração com a Dra. Adriana K. Carmona e Dra. Maria Luiza Oliva da UNIFESP e foram realizados utilizando as cisteino proteases humanas (recombinantes) catepsina V, K, L e B. Os testes de inibição enzimática com a proteína A10PL3 foram realizados como descrito na seção 3.2.13. Os mesmos ensaios foram feitos com as proteínas recombinantes Canacistatina I e Orizacistatina I, independentemente. Após o cálculo das constantes de inibição (K_i) em relação as catepsinas V, K L e B, foi feita uma comparação de atividade destas proteínas com a atividade da proteína híbrida A10PL3 após a utilização da técnica de DNA shuffling .

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO CLONE SCCCRZ2001G09

O cDNA que codifica a proteína inibidora de cisteino protease da cana-de-açúcar está contida no clone SCCCRZ2001G09 (nº de acesso AY119689), proveniente do SUCEST.

O clone SCCCRZ2001G09 da cana-de-açúcar foi sequenciado e este processo resultou na determinação da sequência completa de nucleotídeos da fase aberta de leitura do cDNA que codifica a proteína RZ2001. A proteína RZ2001 apresenta uma fase aberta de leitura que

codifica uma proteína de 106 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 12 kDa. A sequência do clone que codifica a proteína RZ2001 esta representada na figura 11 e o códon de iniciação é o primeiro codon após a UTR 5' sublinhada

TTCTTCGTGGAGCAACAACATTCGGTGGTGTAGTGCTACTCCTGCTCCCCTAGCG

GTAGTGGCCGTGTCTCGCTCTCGCCGCCGCTTCCTCTCCCTCCCGCCGCCGGACCG

M A E A H N G R R V G M V G D
CGTCAGCG**ATG**GCCGAGGCACACAACGGGCGGCGCGTGGGGATGGTGGGCGAC

V R D A P A G H E N D L E A I E L A
 GTCCGGGACGCGCCGGCCGGCCACGAGAACGACCTCGAGGCCATCGAGCTCGCG

R F A V A E H N S K T N A M L E F E
 CGCTTCGCCGTCGCCGAGCACAACAGCAAGACCAACGCGATGCTGGAGTTCGAG

R L V K V R H Q V V A G T M H H F T
 AGGCTGGTGAAGGTGAGGCACCAGGTGGTGGCCGGGACCATGCACCACTTCACC

V Q V K E A G G G K K L Y E A K V W
 GTCCAGGTGAAGGAGGCCGGCGGCAAGAAGCTGTACGAGGCCAAGGTGTGG

E K V W E N F K Q L Q S F Q P V G D
 GAGAAGGTGTGGGAGAACTTCAAGCAGCTGCAGAGCTTCCAGCCGGTCCGGGGAC

A
 GCC

Figura 11. Sequência de nucleotídeos do cDNA que codifica a RZ2001. A região codificante da proteína é mostrada a partir do códon de iniciação (ATG). Nota-se que não há códon de terminação.

4.2- SUBCLONAGEM DO cDNA QUE CODIFICA PARA CPI

A fase aberta de leituta da CPI da cana-de-açúcar foi obtida através de amplificação utilizando como molde o plasmídeo pSPORT1-RZ2001. O produto de amplificação da proteína RZ2001, resultou em um fragmento de aproximadamente 0,4Kb (figura 13). O resultado da amplificação é mostrado na a seguir:

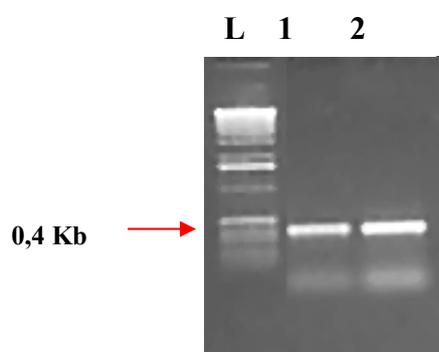


Figura 13. Amplificação do cDNA do gene que codifica para CPI a partir do plasmídeo pSPORT RZ2001. Legendas: L: “Ladder” 1Kb; 1 E 2: inserto amplificado com aproximadamente 0,4 Kb.

Na reação de amplificação foi utilizado um oligonucleotídeo específico para o início do gene, com inclusão de um sítio de restrição de *Nde* I para facilitar a subclonagem no vetor de expressão pET28a (NOVAGEN). O fragmento amplificado da ORF foi purificado e subclonado no plasmídeo pGEM-T easy (PROMEGA). O plasmídeo recombinante foi denominado pGEM-T-RZ2001.

O recombinante pGEM-T-RZ2001 quando digerido com as enzimas *Nde* I e *Eco* RI que flanqueiam a construção, liberou um fragmento de 0,4Kb confirmando o sucesso da subclonagem.(figura 14).

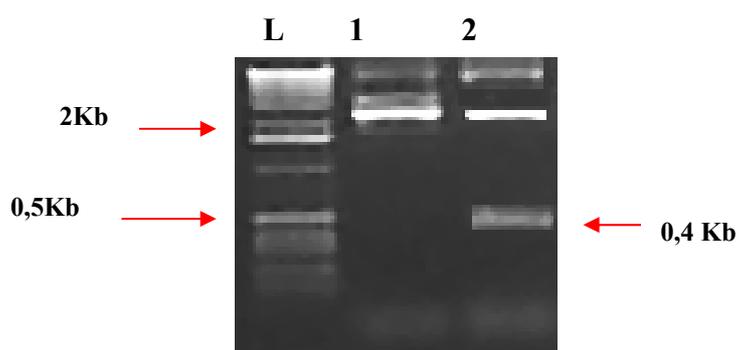


Figura 14. Caracterização do plasmídeo pGEM-T RZ2001 com *Nde* I e *Eco* RI. Em L: “Ladder” 1Kb; 1: subclone não recombinante; 2: subclone recombinante (notar banda de aproximadamente 400 pb).

A partir do plasmídeo pGEMT-RZ2001 foi feita uma nova reação de amplificação com oligonucleotídeos específicos, utilizando então um novo oligonucleotídeo que hibrida exatamente na região 3' da ORF. O produto de amplificação da CPI a partir do plasmídeo pGEMT-RZ2001 resultou em um fragmento de aproximadamente 0,3Kb (figura 15).

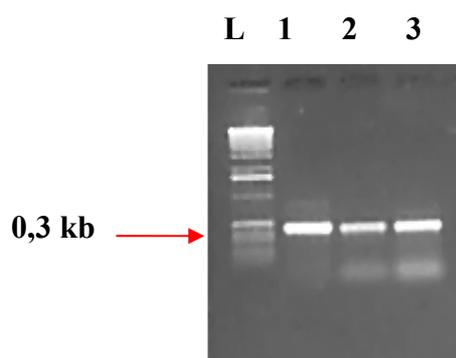


Figura 15. Amplificação do cDNA do RZ2001a a partir do plasmídeo pGEMT-RZ2001. Em L, "Ladder" 1Kb; 1, 2 e 3 visualização de uma banda de aproximadamente 0,3 Kb, correspondente à ORF da CPI.

O produto da amplificação visualizado tinha o tamanho esperado (aproximadamente 0,4Kb), após clivagem com as enzimas adequadas (*Nde* I e *Eco* RI) foi subclonado no plasmídeo pET28a clivado com as mesmas enzimas.

Os clones recombinantes foram identificados por PCR de colônias de bactérias que cresceram na placa com meio seletivo. As colônias de bactérias foram utilizadas como molde na reação diretamente, como descrito anteriormente em material e métodos. As colônias com plasmídeos recombinantes apresentaram amplificação do inserto com aproximadamente 0.3Kb. O resultado das colônias que amplificaram está mostrado na figura 16.

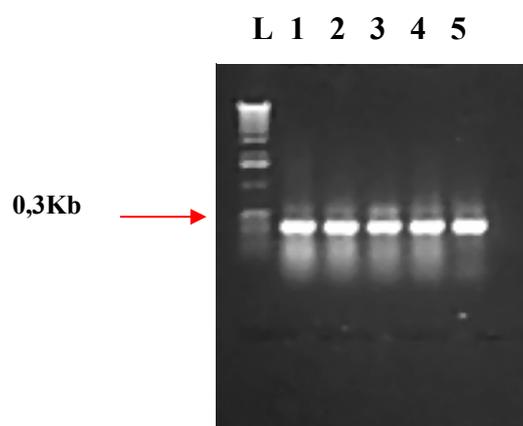


Figura 16. Amplificação do pET28aRZ2001 por PCR de colônia. Em L, "Ladder" 1Kb; 1, 2, 3, 4 e 5 amplificações de clones recombinantes.

Cinco clones recombinantes foram selecionados após a amplificação e todos apresentaram 100% de identidade com a ORF contida no clone SCCCRZ2001G09 depositada no banco de dados do SUCEST.

4.3- EXPRESSÃO DA RZ2001 (CPI) NO VETOR PET28a

Os resultados de expressão do sistema pET28a-RZ2001 foram bem sucedidos pois foi observada a banda de expressão esperada. Como a ORF tem 318 pb ela codifica uma proteína de aproximadamente 12 KDa, que aparece em SDS-PAGE um pouco maior devido às fusões com HIS-Tag e sítio de clivagem com protease (figura 17).

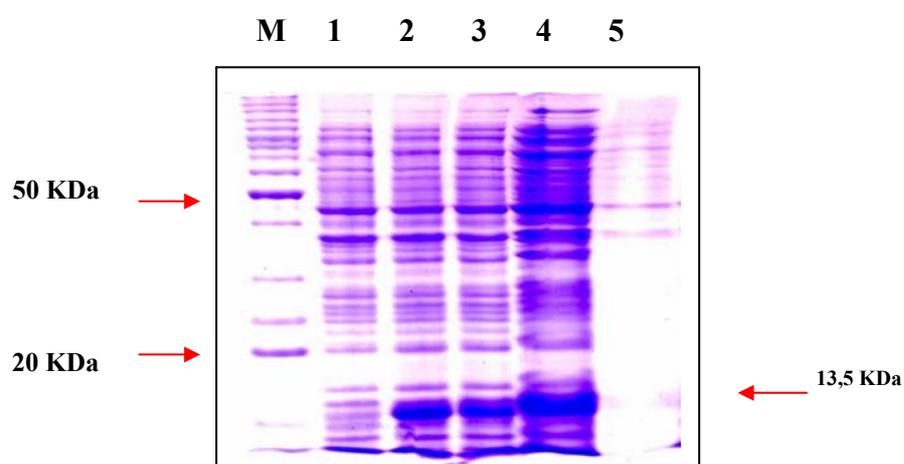


Figura 17. Análise de Expressão da proteína Canacistatina em *E.coli*. SDS-PAGE corado com azul comassie (15%) referente a indução do plasmídeo pET28a RZ2001. M: marcador de proteína (GIBCO-BRL); 1: BL21 (DE3) pET28aRZ2001 não induzida; 2: BL21(DE3) pET28aRZ2001 após uma hora de indução; 3: BL21(DE3) pET28aRZ2001 após 2 horas de indução; 4: BL21(DE3) pET28aRZ2001 após 3 horas de indução; 5: BL21(DE3) pET28a RZ2001 após 4 horas de indução.

Não há um aumento significativo na quantidade de proteína induzida com o aumento do tempo. Desta forma, induções de 4 horas são suficientes para produzir proteína para purificação.

Foi realizado um teste de solubilidade, pois deste dependeria a escolha da melhor estratégia para purificação ou mesmo um outro sistema de expressão. Se a proteína estivesse solúvel ela poderia ser purificada na sua forma nativa. Se a proteína estivesse insolúvel, a purificação da proteína deveria ser feita na forma desnaturante da proteína com grandes possibilidades da enzima se renaturar em forma diferente da nativa, modificando sua estrutura e talvez perdendo sua atividade. O teste de solubilidade realizado demonstrou que a proteína expressa apresenta-se quase que totalmente na forma solúvel quando induzida na concentração de 0.4mM de IPTG em um período de 4 horas, com 200 rpm de rotação a 37°C como mostrado na figura 18.

Para o teste de solubilidade optou-se por lisar a célula bacteriana através de sonicação, que foi padronizada para 5 pulsos de 1 minuto cada.

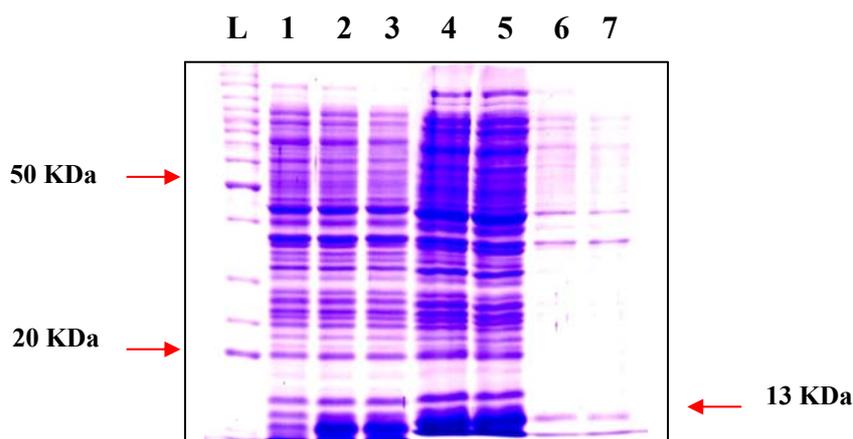


Figura 18. Teste de Solubilidade da RZ2001 expressa em *E.coli*. SDS-PAGE corado com azul comassie (15%) referente a indução da proteína Canacistatina com 0.4mM de IPTG M: marcador de proteína (GIBCO-BRL) 1: Controle sem indução; 2: BL21(DE3)pET28aRz2001 com uma hora de indução; 3: BL21(DE3) pET28aRz2001 com 3 horas de indução; 4 e 5: sobrenadante, contendo proteína solúvel; 6 e 7: precipitado.

4.4- PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RZ2001

A purificação de proteínas é feita através de sucessivos fracionamentos considerando algumas propriedades da proteína, tais como solubilidade, carga iônica, massa molecular, ponto isoelétrico, propriedades de adsorção e especificidade de ligação a outras moléculas. As técnicas utilizadas para purificação de proteínas utilizam colunas verticais nas quais as amostras são colocadas de modo que as moléculas se acomodem em duas fases, uma fixa e outra móvel. A fase móvel corresponde ao solvente cujo fluxo arrasta a maioria das moléculas. E a fase fixa inclui um elemento imóvel (NELSON and COX, 2000). O método de purificação escolhido foi a cromatografia de afinidade em coluna contendo resina de níquel. O sistema de purificação escolhido foi eficiente, pois o resultado do SDS-PAGE mostrou que a proteína, fixou-se na resina, e foi eluída nas frações coletadas a partir de 100mM de imidazol (figura 19).

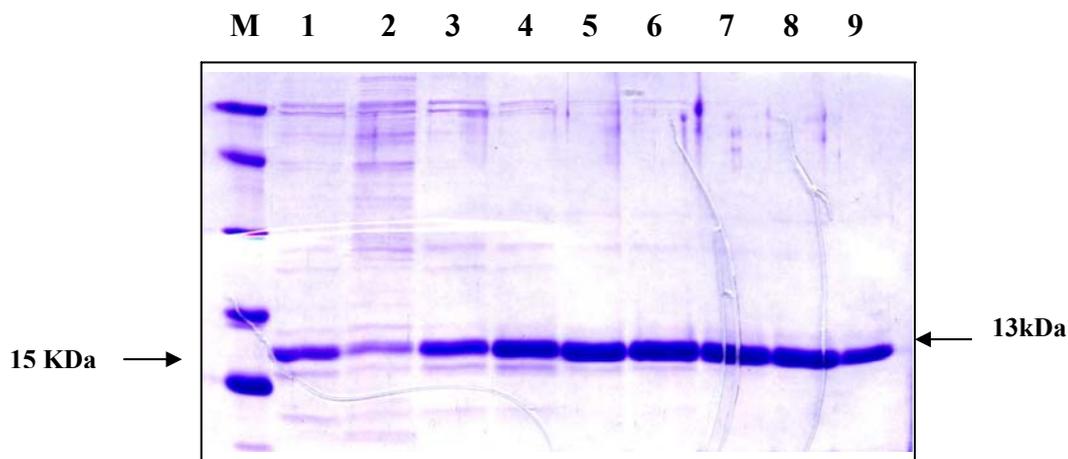


Figura 19. SDS-PAGE mostrando o gradiente de imidazol utilizado na eluição da RZ2001. M: marcador de proteína; 1 e 2 gradiente tampão 3 (50mM de Imidazol); 3 e 4 gradiente tampão 4 (75 mM de Imidazol); 5 e 6 gradiente tampão 5 (100mM de Imidazol); 7, 8 e 9 gradiente tampão 6 (250 mM de Imidazol).

Na figura 20 observa-se em gel de poliacrilamida a banda referente a proteína Canacistatina de aproximadamente 13,5 KDa após 4 horas de indução. Nesta etapa obtivemos a proteína Canacistatina pura. O imidazol possui afinidade pelo níquel e compete com a proteína ligada a ele, deslocando-a da resina. Assim, dependendo da concentração de imidazol contida no tampão de eluição a proteína é eluída.

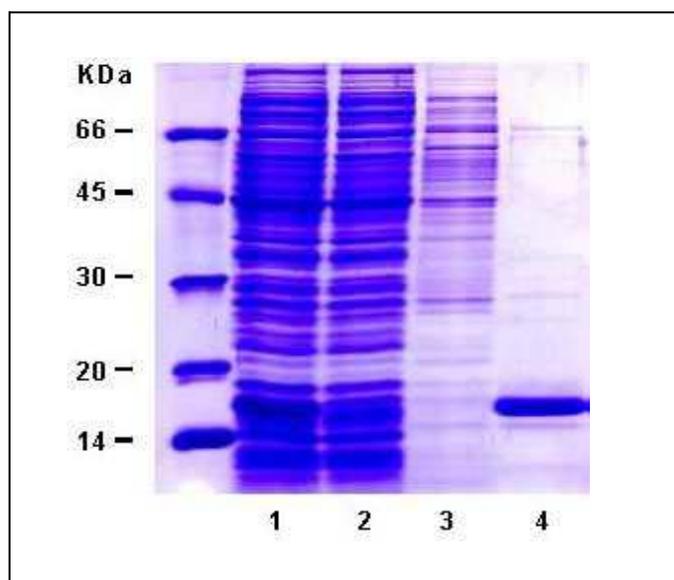


Figura 20. Purificação da Canacistatina. SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue, indução da proteína canacistatina e purificação. 1: BL21(DE3) pET28aRZ2001 extrato celular bruto após indução com IPTG; 2: eluato; 3: lavagem; 4: fração eluída com 250mM de imidazol da coluna de afinidade.

A proteína Canacistatina apresentou-se pura e o rendimento foi em torno de 10mg de proteína por litro de cultura. Os resultados obtidos são bastante satisfatórios visto que foi possível purificar a proteína de interesse em quantidade e pureza suficientes para a realização de estudos iniciais de estrutura.

4.5-TESTES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO

Trichoderma reesei

O *Trichoderma reesei* foi o fungo escolhido para a primeira análise da atividade antifúngica da proteína RZ2001. Ele foi escolhido por ter sido o organismo adotado nos testes de uma outra cistatina, já descrita, denominada “Pearl Millet cysteine protease inhibitor”, encontrada em Painço (*Pennisetum glaucum*) que é a quarta maior cultura da Índia (JOSHI, 1999). Foram feitos inicialmente testes de inibição de crescimento do fungo *Trichoderma reesei* utilizando a proteína purificada. A atividade da proteína RZ2001 foi verificada colocando-se a proteína purificada em contato com esporos do fungo para inibição de sua germinação, e conseqüentemente, crescimento do micélio. Ocorreu um perfeito crescimento micelial na cultura controle contendo 2.5×10^6 esporos no meio de cultura. A inibição quantitativa do crescimento do fungo foi investigada. As mesmas quantidades de esporos do fungo *Trichoderma reesei*, no mesmo volume de meio PDB, foram colocadas em quatro tubos teste, mas com quantidades crescentes de proteína purificada (12,5, 50, 100 e 200 μ g/ml). Como mostrado na figura 21, a proteína RZ2001 na concentração de 50 μ g/ml foi capaz de inibir o crescimento do fungo *T. reesei*, mas não totalmente. Já em concentrações de 100 e 200 μ g/ml, o crescimento do fungo foi claramente inibido. Estes resultados mostram que a proteína Canacistatina pode inibir o crescimento deste fungo, similarmente como a cistatina de painço como descrito em JOSHI, 1999.

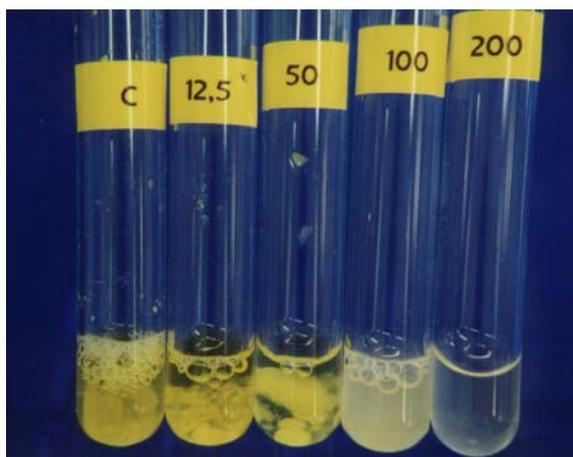


Figura 21: Ensaio de inibição do crescimento do fungo filamentoso *Trichoderma reesei*. C: Controle sem proteína; 1: 12.5 μ g/ml de proteína Canacistatina; 2: 50 μ g/ml de proteína purificada; 3: 100 μ g/ml de proteína Canacistatina purificada; 4: 200 μ g/ml de proteína Canacistatina purificada.

A proteína RZ2001 é capaz de inibir o crescimento do fungo *Trichoderma reesei* e a dose mínima inibitória da proteína está em torno de 50µg/ml. Foram feitas várias repetições deste ensaio, confirmando a ação da proteína RZ2001 na inibição do crescimento do fungo filamentososo *Trichoderma reesei*. O uso de inibidores de cisteína proteases como um agente antifúngico foi observado também em cistatinas de painço e a dose mínima inibitória para *Trichoderma reesei* foi em torno de 2mg/ml de proteína (JOSHI *et al.*, 1998). Fazendo uma comparação entre as duas proteínas, observamos que a proteína da cana-de-açúcar apresentou-se mais eficiente na inibição do crescimento de *Trichoderma reesei* do que a cistatina de painço.

A atividade anti-fúngica da proteína Canacistatina foi também observada em microscópio óptico OLYMPUS, sendo a inibição do crescimento do *Trichoderma reesei* fotodocumentada (Figura 22). Observa-se no controle, sem a proteína RZ2001, crescimento micelial, pois houve germinação dos esporos e o desenvolvimento de hifas. Na figura 22 B observa-se o ensaio na presença de 200µg/ml de proteína RZ2001 purificada. Nesta fotomicrografia observa-se que houve inibição total do crescimento micelial com a presença de esporos sem germinação e ausência das hifas. O mecanismo de ação da proteína Canacistatina em fungos ainda é desconhecido, entretanto, alguns estudos correlacionaram a ausência de proteases em fungo com a sua sobrevivência (BALL, 1991).

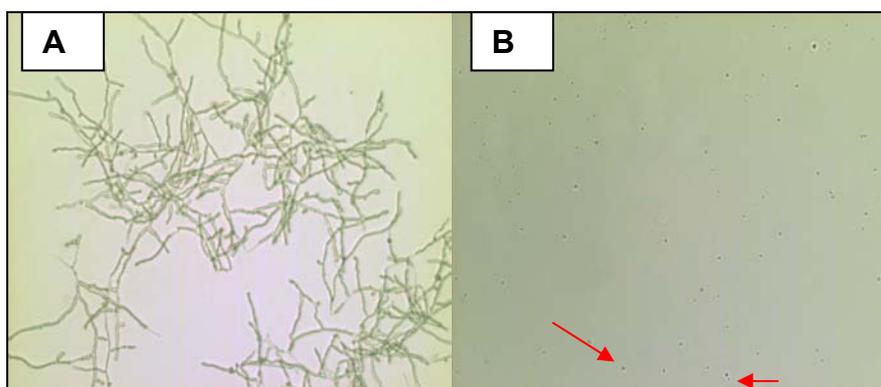


Figura 22: Fotomicrografias do produto da incubação de *Trichoderma reesei* com a proteína purificada. As imagens foram feitas em microscopia utilizando luz branca. 22A: controle sem proteína Canacistatina, 22B: inibição com 200µg /ml de proteína Canacistatina purificada

4.6- TESTES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Apesar do fungo *Trichoderma reesei* não ser patógeno de planta, os resultados obtidos com a inibição do seu crescimento sugeriram que a Canacistatina também poderia ser aplicada para inibir crescimento de fungos patogênicos. A inibição do *Trichoderma reesei* pela RZ2001 deu margem para novos testes, agora com fungos fitopatogênicos. As plantas normalmente são expostas a um grande número de fungos patogênicos, visto que os fungos vivem em diversos ambientes e substratos de origem animal e vegetal, excretando enzimas digestivas poderosas e absorvendo matéria orgânica morta. Eles podem crescer pela formação de filamentos chamados de hifas, no caso dos fungos filamentosos, ou ainda por lêvedos no caso das leveduras, que são fungos unicelulares. Os fungos têm se destacado pelo grande impacto que causam na economia de todo o mundo, a partir de suas associações com a agricultura, indústria e medicina, assumindo o papel de grandes “vilões” quando causam doenças como as micoses, ao parasitar o homem, animais e sérios prejuízos na agricultura. A escolha dos fungos utilizados neste teste foi baseada primeiramente na susceptibilidade da cana-de-açúcar a uma doença fúngica. Esta doença é a “podridão vermelha do colmo”, causada pelo fungo *Fusarium moniliforme*. O fungo *Fusarium moniliforme* também ataca a cultura do sorgo, trazendo redução na produção e qualidade de grãos e de forragem que é atribuída a ela por afetar o enchimento dos grãos e provocar o enfraquecimento do colmo, causando, geralmente, o seu tombamento ou quebraimento. Esse patógeno pode infeccionar as raízes, o colmo e o pedúnculo da planta, comprometendo a firmeza do tecido interno, também causa podridão de sementes e morte das plântulas. Os sintomas da doença são evidenciados, normalmente após o florescimento das plantas. Estas secam prematuramente e tombam com facilidade. Internamente, os tecidos do colmo e do pedúnculo infeccionados adquirem uma coloração avermelhada, que progride de forma uniforme e continua do ponto inicial da infecção em direção à parte superior da planta. O *Fusarium moniliforme* sobrevive no solo em resto de cultura, em várias espécies de plantas hospedeiras nas formas de conídios (esporo produzido por fungos na fase de reprodução assexual), de micélio (conjunto de hifas do fungo) e de clamidósporo (estrutura de resistência dos microrganismos as condições adversas), que são fontes primárias de inócuo. O fungo penetra nas raízes e no colmo através de aberturas naturais ou de ferimentos provocados por insetos, máquinas e nematóides. Entre

o estágio de florescimento e de maturação da planta, a severidade da doença pode aumentar sob condições de baixa temperatura e alta umidade seguido de um período de alta temperatura e baixa umidade (WARD et al., 1999).

Com a informação de que a proteína Canacistatina foi capaz de inibir um fungo *Trichoderma reesei*, partimos para testes com outros fungos fitopatogênicos de outras culturas. O segundo fungo utilizado no teste foi o *Colletotrichum sp* agente causal de uma doença chamada Antracnose. Esta é uma importante doença que ocorre em diversas culturas, entre elas sorgo e milho, pela sua ocorrência generalizada é capaz de reduzir, sensivelmente, a produção e a qualidade dos grãos e da forragem. Este patógeno incide nas folhas, pedúnculo, colmo, panícula, grãos e raízes. Várias espécies de gramíneas são hospedeiras de *Colletotrichum sp*, tais como *Sorghum bicolor*, *S. halepense*, *S. verticilliphorum*, *S. arundinacerum*, *S. margaritifera*, *S. sudanense* e *S. dochna*. Os sintomas de infecção no colmo e no pedúnculo aparecem normalmente no período de maturação da planta. Esses órgãos infectados adquirem, internamente, uma coloração avermelhada ou amarelada com pontuações brancas correspondentes aos pontos de penetração do fungo. Nestes pontos, externamente, o fungo frutifica, sob condições de alta umidade e temperatura há formação de uma massa de esporos de cor rosa. A fonte primária de inóculo de *Colletotrichum* é constituída pelos conídios produzidos nas espécies selvagens de gramíneas, em plantas remanescentes ou de restos de culturas. A disseminação dos conídios dá-se por meio do vento e de respingos de chuva. A sobrevivência do fungo, de um ano para outro, ocorre nos restos de cultura, em espécies selvagens e em sementes. A sobrevivência é drasticamente reduzida quando se faz um enterramento dos restos de cultura (WARD et al., 1999).

As linhagens de *Colletotrichum sp* utilizadas nestes ensaios foram isoladas de pupunha (*Bactris gasipaes*), caju (*Anacardium humile*) e guaraná (*Paullinia cupana*) e cedidas pelo professor José Odair Pereira, da Universidade do Amazonas.

O terceiro fungo utilizado no ensaio de inibição de crescimento foi o *Aspergillus niger*, foi escolhido primeiramente pela disponibilidade no laboratório e pela característica que ele têm de se desenvolver em grãos de café afetando a qualidade da bebida. O *Aspergillus niger* é a espécie mais comum do gênero *Aspergillus*. Ele causa coloração preta em certos tipos de frutas e vegetais, mas não é um agente causador de doenças. Também é usado na produção de ácido cítrico e ácido glucônico. Este fungo é um contaminante comum em alimentos, mas não é patogênico. Alguns casos de alergias pulmonares causadas pelo *Aspergillus niger* têm sido relatados, mas somente em pacientes imunocomprometidos (SCHUSTER et al., 2002).

Assim, para a análise da atividade antifúngica da proteína Canacistatina foram feitos testes de inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos *Fusarium moniliforme*; *Colletotrichum sp* p25 (pupunha); *Colletotrichum sp* p28 (pupunha); *Colletotrichum sp* C09 (caju) e *Aspergillus niger* utilizando a proteína purificada.

A atividade da antifúngica da proteína inibidora de cisteína protease da cana-de-açúcar foi verificada colocando-se a proteína Canacistatina purificada em contato com esporos do fungo para inibição de sua germinação, e conseqüentemente, crescimento do micélio. Testes foram realizados utilizando-se a proteína Canacistatina purificada, em diferentes concentrações e esta foi adicionada em placa de ELISA contendo o mesmo volume de meio de cultura PDB (potato dextrose agar) e mesma quantidade de esporos dos fungos (2.5×10^6) (Tabela 2).

Concentração Canacistatina	<i>Colletotrichum</i> p28	<i>Aspergillus</i> <i>niger</i>	<i>Fusarium</i> <i>moniliforme</i>	<i>Colletotrichum</i> p25	<i>Colletotrichum</i> C09
500µg/ml	-	-	-	-	-
250µg/ml	-	+	-	-	-
125µg/ml	-	+	+	-	-
62.5µg/ml	+	+	+	+	-
32.25µg/ml	+	+	+	+	-
15.6µg/ml	+	+	+	+	+
7.8µg/ml	+	+	+	+	+

Tabela 2: Ensaio de inibição de crescimento de fungos fitopatogênicos.

Como observado na tabela 2, nos poços controle (C) contendo 2.5×10^6 esporos em meio de cultura PDB, houve crescimento dos fungos. Nos outros poços, nos quais foram colocadas quantidades iguais de esporo dos fungos no mesmo volume de meio PDB, porém, com adição da proteína Canacistatina purificada em quantidades crescentes, houve uma diminuição do crescimento diretamente proporcional ao aumento da concentração da proteína Canacistatina.

A concentração mínima inibitória (MID) para *Fusarium moniliforme* foi 250µg/ml; para *Aspergillus niger* 500µg/ml, para *Colletotrichum sp p25* 125µg/ml e finalmente para *Colletotrichum sp C09* foi 32.25 µg/ml. Assim pode-se concluir que a proteína canacistatina é capaz de inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Fusarium moniliforme*; *Colletotrichum sp p25*; *Colletotrichum sp p28* e *Colletotrichum sp C09* e também do fungo *Aspergillus niger*. A inibição mais eficaz foi observada em relação ao fungo *Colletotrichum sp C09*, isolado de caju. Estes resultados podem contribuir na melhoria do cultivo das plantas hospedeiras dos fungos analisados, diminuindo a incidência de doenças causadas por estes fitopatógenos garantindo melhor produtividade.

Foram feitas várias repetições deste ensaio, confirmando a ação da proteína canacistatina na inibição do crescimento destes fungos filamentosos.

A atividade anti-fúngica da proteína canacistatina foi também observada em microscópio óptico OLYMPUS. A figura 23 mostra as fotomicrografias do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos. No experimento controle, figura 23, sem a proteína purificada o crescimento micelial foi normal (1A, 2A e 3A), entretanto, nos ensaios com a proteína canacistatina purificada (1B, 2B e 3B) com 500µg/ml de proteína canacistatina utilizada, foi observada a inibição do crescimento micelial. Em 1A, 2A e 3A e observa-se ensaios controle sem a proteína Canacistatina obtendo-se crescimento micelial, pois houve germinação dos esporos e o desenvolvimento de hifas. Em 1B, 2B e 3B observa-se os ensaios na presença de 500µg/ml de proteína Canacistatina purificada. Nesta foto observa-se que houve inibição total do crescimento micelial, com a presença de esporos sem germinação e ausência das hifas. Estes resultados indicam que a proteína pode atuar inibindo a germinação e também prejudicando o desenvolvimento normal das hifas.

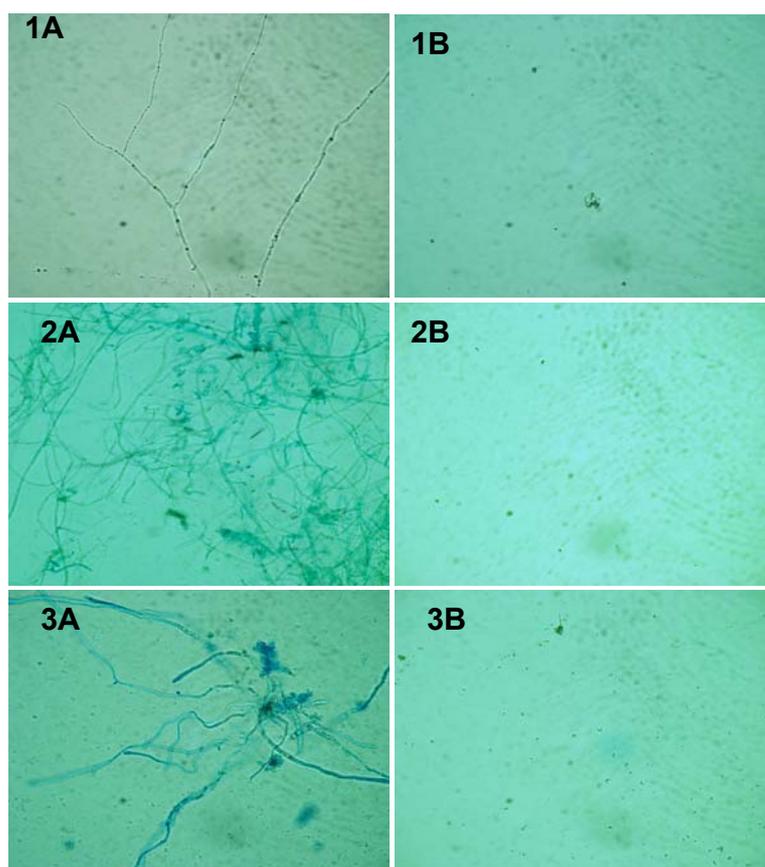


Figura 23: Fotomicrografias dos produtos de incubação da proteína canacistatina purificada com os fungos fitopatogênicos *Fusarium moniliforme*; *Aspergillus niger*; *Colletotrichum* sp p25. As imagens foram feitas em microscopia de luz branca. 2A: *Colletotrichum* sp P25-controle sem a proteína canacistatina purificada. 2B: inibição do fungo *Colletotrichum* sp P25 com 500µg /ml de proteína canacistatina purificada. 2C: *Fusarium moniliforme* - controle sem a proteína canacistatina purificada. 2D: inibição do fungo *Fusarium moniliforme* com 500µg /ml de proteína canacistatina purificada, 2E: *Aspergillus niger* – controle sem a proteína canacistatina purificada. 2F: inibição do fungo *Aspergillus niger* com 500µg/ml de proteína canacistatina purificada

4.7-ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR E ESTRUTURA SECUNDÁRIA ESTIMADA

O Dicroísmo circular (CD) é uma técnica importante para se estimar a porcentagem dos componentes da estrutura secundária das proteínas (hélice- α , folhas- β , voltas- β e sequências desordenadas). Assim, foi feita uma análise da distribuição dos componentes de estrutura secundária da proteína Canacistatina. A técnica foi empregada para determinar se a proteína recombinante está corretamente enovelada através de comparação com proteína homóloga. Foi verificado que a proteína Canacistatina teve sua composição de estrutura secundária apresentando dois mínimos locais em 209nm e 217 nm e uma intersecção com o zero em 195.6nm como mostrado na figura 24.

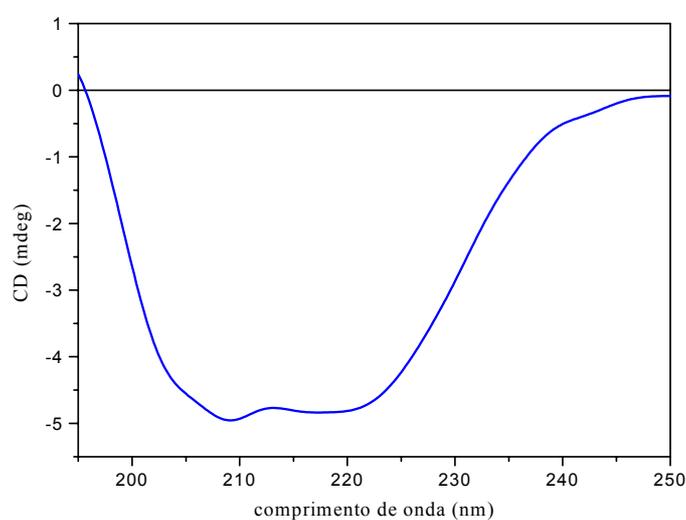


Figura 24: Espectro de CD da proteína Canacistatina. A amostra estava em Tris-HCl pH 8.0 contendo NaH_2PO_4 50mM e NaCl 100mM, em uma concentração de 0.17mg/ml em cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico.

O espectro de CD foi utilizado para estimativas do conteúdo de estrutura secundária, através da desconvolução do espectro da proteína Canacistatina, pelo método SELCON-2 utilizando um banco de dados com 33 proteínas. Os resultados obtidos para estas frações são mostrados na tabela 3.

Tabela 3: Composição de estrutura secundária da proteína Canacistatina utilizando o método de desconvolução SELCON-2

<i>Amostra</i>	<i>Hélice -α</i>	<i>Folha β-antiparalela</i>	<i>Turns</i>	<i>Não ordenadas</i>
<i>RZ2001</i>	<i>10 %</i>	<i>40 %</i>	<i>29 %</i>	<i>21 %</i>

Para avaliar a funcionalidade dos resultados obtidos, foi comparado o espectro de CD da proteína Canacistatina com os dados estruturais da Orizacistatina I, uma proteína inibidora de cisteína protease de arroz que possui a sua estrutura resolvida (NAGATA *et al.*, 2000). A proteína Canacistatina tem alta similaridade com esta proteína. As frações de estimadas de estrutura secundária da proteína Canacistatina foram comparadas com a estrutura obtida por Ressonância Magnética Nuclear da proteína Orizacistatina I. Esta possui 10% α -hélice, 40% β -sheet anti paralelas, 29% de “turns” e 20% de estrutura não ordenada (NAGATA *et al.*,2000). Desta forma podemos observar que os dados obtidos por CD da Canacistatina são coerentes com a estrutura observada da Orizacistatina-I, indicando que a primeira deva ser realmente uma cistatina. A proteína Orizacistatina foi escolhida para a comparação, porque é a cistatina de origem vegetal melhor estudada até hoje e porque há alta similaridade de sequência entre elas, em torno de 70%.

4.8- ANÁLISE POR EXCLUSÃO MOLECULAR

Na tentativa de verificar qual o estado oligomérico da proteína Canacistatina, ela foi submetida a filtração em coluna de exclusão de peso molecular SUPERDEX-075.

Foram filtradas também na coluna de exclusão de peso molecular três proteínas de massa molecular conhecido, a ACB (Anidrase Carbônica Bovina) com massa molecular 29.000Da, o Citocromo C com 12.000Da e a riboflavina de 375 Da para fins de comparação de volume de eluição destas proteínas com a Canacistatina

Assim pode-se observar na figura 25 o perfil cromatográfico da separação da proteína Canacistatina.

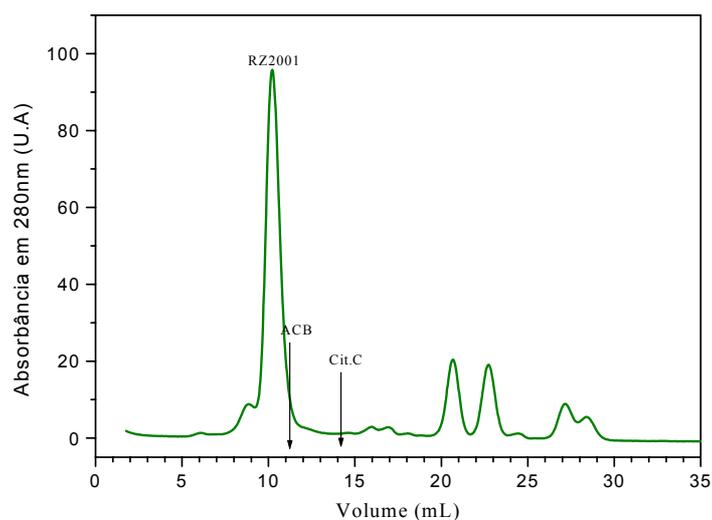


Figura 25: Perfil cromatográfico da separação da proteína Canacistatina em SUPERDEX-75 (Amersham Pharmacia Biotech).

Utilizando o volume de eluição de cada proteína padrão e o Log da massa molecular construiu-se um gráfico de regressão linear que apresenta uma equação da reta que descreve o comportamento apresentado pela curva é $\text{Log MW} = 2,92252 - 0,14512 \times V_e$ (figura 26).

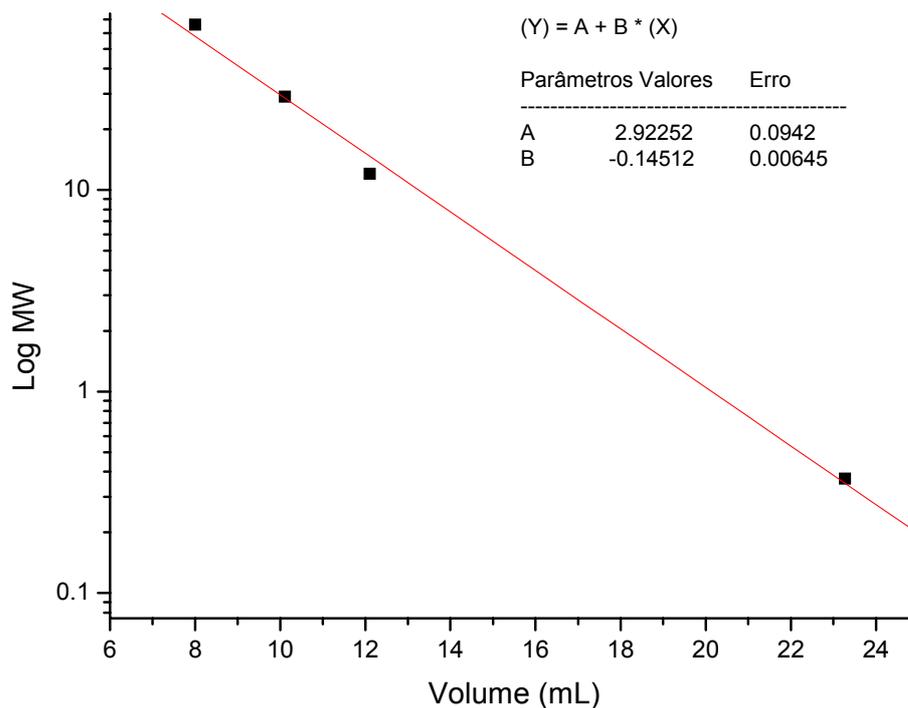


Figura 26. Curva de calibração da coluna Superdex-75. Foram utilizadas proteínas conhecidas com diferentes massas moleculares. A equação da reta é representada por $\text{Log MW} = 2,92252 - 0,14512 \times V_e$.

O perfil obtido no cromatograma da figura 26 forneceu o volume de eluição para a RZ2001 o valor de 10,21 ml que aplicado na equação da reta determinou o valor da massa molecular da proteína recombinante como sendo de 27KDa , tendo um monômero de massa molecular 13.5KDa pode-se dizer a RZ2001 apresenta-se sob a forma de um homodímero, o que não significa que a proteína nativa atue como dímero pois geralmente estas proteínas atuam na forma monomérica.

4.9- OBTENÇÃO DE CRISTAIS

Tendo obtido proteína em boa quantidade e pureza, resolvemos utiliza-la para estudos estruturais adicionais aqueles de Dicroísmo Circular. Estes estudos estão sendo realizados junto ao Centro de Biotecnologia Molecular e Estrutural, do qual somos laboratório participante. Estes estudos representam os primeiros estudos estruturais de uma provável

cistatina da cana-de-açúcar e poderão contribuir para elucidação do mecanismo de atividade inibitória da proteína Canacistatina, inclusive, com a possibilidade de futuros experimentos de co-cristalização desta proteína com proteases.

Entretanto, para realização destes estudos faz-se necessário o estabelecimento de condições ótimas de cristalização, com o objetivo final de se obter cristais de qualidade para a difração e coleta de dados.

Os experimentos iniciais de cristalização resultaram em vários cristais, porém os melhores cristais foram obtidos nas seguintes condições:

Fatorial 1, condição nº 1 contendo cloreto de cálcio 0.02M dihidratado tampão 0,1 molar de acetato de sódio pH 4,6, precipitante 30% volume/volume 2-metil-pentametiol. Fatorial 1, condição nº 16 contendo precipitante sulfato monohidratado de lítio 1,5 molar e tampão Hepes de sódio 0,1 molar pH 7,5.

Os cristais foram observados após 30 dias e analisados em microscópio óptico OLYMPUS no aumento de 640 vezes. E podem ser observados na figura 27. Os cristais obtidos com Fatorial I , condições 1 e 16 são mostrados na fig.27

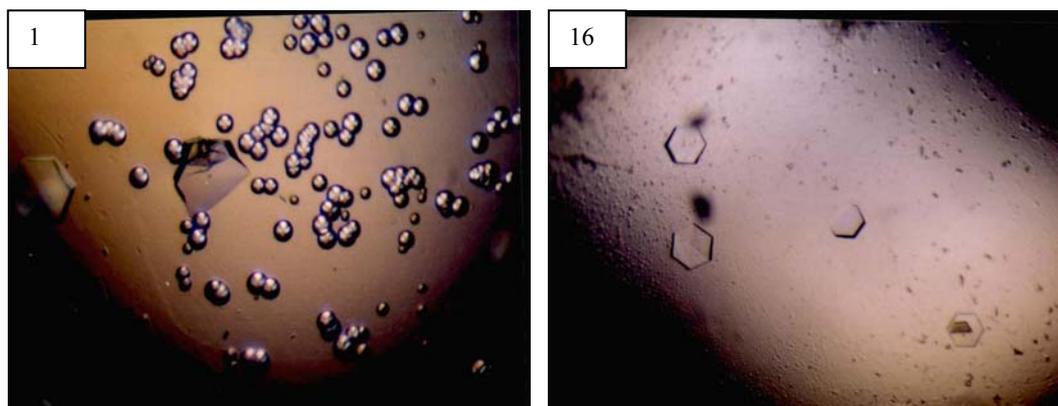


Fig.27. Ensaio de cristalização com Fatorial I da Hampton Research. Condição 1 (precipitante cloreto de cálcio 0,02M dihidratado tampão 0,1 M de acetato de sódio pH 4,6). Condição 16 (precipitante sulfato monohidratado de lítio 1,5 M e tampão Hepes de sódio 0,1 molar pH 7,5).

A obtenção destes cristais é um passo para na resolução da estrutura tridimensional da proteína Canacistatina por cristalografia de raios X. As condições nas quais houve presença de cristais estão sujeitas a refinamentos nos parâmetros de cristalização com o intuito de melhorá-los deixando-os nas condições ideais para posterior submissão à difração de raios X e coleta de dados.

4.10- AÇÃO INIBITÓRIA DA PROTEÍNA RZ2001

A importância deste ensaio se deu primeiramente pela confirmação de que a RZ2001 é um inibidor específico de cisteíno proteases. A partir destes resultados, dados interessantes foram surgindo e deram margem para estudos de atividade da proteína RZ2001 em relação a Catepsinas, que são cisteíno proteases humanas da família das papaínas. As cisteíno proteases humanas, estão envolvidas em uma série de funções fisiológicas, tais como degradação de matriz extracelular, reabsorção óssea, invasão entre outras. Um desbalanço da atividade normal da enzima, pode levar a condições patológicas. Estas cisteíno proteases têm sido associadas com um grande número de eventos patológicos, tais como artrite reumatóide, osteoartrite, câncer, desordens neurológicas e osteoporose (CHAPMAN *et al.*, 1997 e BARRET, *et al.*, 1998)

Para verificação da atividade inibidora de protease da proteína RZ2001 foram feitos ensaios inibição de proteases humanas (catepsinas V, K, B e L recombinantes).

A catepsina V é expressa significativamente em várias células cancerígenas, mas não em tecido normal correspondente, sugerindo que ela possa estar envolvida em processos tumorais. A catepsina K, é candidata a ser responsável pela degradação da matriz óssea, é abundantemente expressa em osteoclastos, cuja localização é nos lisossomos na borda e lacuna de reabsorção na superfície do osso. Esta localização celular e extracelular sugere uma importante função na reabsorção óssea. A catepsina B tem sido associada a progressão de tumores malignos e especificamente ao processo de invasão pela destruição da barreira da matriz extracelular, ou indiretamente pela ativação de outras proteases capazes de digerir a matriz extracelular. Ela também tem uma função no crescimento do tumor. A catepsina L é expressa principalmente em tímus humano, pare ser interessante para o desenvolvimento de imunidade ontológica, mas nenhuma função tem sido descrita (DICKINSON, 2001).

A busca de inibidores para estas enzima poderia abrir caminho para a aplicação destes resultados na área médica, especificamente para sugerir um aplicação em doenças como osteoporose, poliartrite e artrite reumática. A cultura de bactéria foi induzida momentos antes do teste, visto que a atividade bioquímica pode ser alterada com o tempo.

A tabela 4 mostra os valores de K_i (constante de inibição) da proteína RZ2001 em relação as enzimas catepsina V, K, L e B.

CISTEÍNO PROTEASES	K_i(nM) RZ2001
Catepsina V	1
Catepsina K	0.76
Catepsina L	0.6
Catepsina B	125

Tabela 4: Atividade das proteína RZ2001 em relação às catepsinas humanas.

Como pode ser observado na tabela 4, a proteína RZ2001 é capaz de inibir cisteíno proteases humanas. Este resultado é importante primeiramente porque confirma que a

proteína é realmente uma cistatina e depois, porque indica que esta proteína pode ser utilizada para inibição de catepsinas. Como observado, a proteína RZ2001 inibiu mais eficientemente as catepsinas V, K e L, na faixa de nanomolar. Já a catepsina B foi inibida com menor especificidade. Os ensaios realizados trouxeram os primeiros relatos da atividade inibitória de uma cistatina de cana-de-açúcar em cisteíno proteases e este trabalho foi publicado recentemente na revista *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Estes resultados contribuíram para o estabelecimento de um teste sensível de medida da atividade inibitória da RZ2001 que poderá ser utilizado para a realização de futuros estudos com outras cistatinas de cana-de-açúcar, os quais o LBM- UFSCar pretende realizar.

Além disso, a busca de inibidores para estas enzimas poderia abrir caminho para a aplicação destes resultados na área médica, especificamente para sugerir um aplicação em doenças como osteoporose, poliartrite e artrite reumática.

A partir destes resultados resolvemos renomear a proteína RZ2001 para “canacistatina”.

4.11- CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE SHUFFLING

Buscando proteínas com atividades melhoradas e ou com diferentes especificidades, foi construída uma biblioteca formada pela mistura das proteínas Canacistatina de cana-de-açúcar (*Saccharum sp*) e da proteína Orizacistatina I de arroz (*Oryza sativa*). A escolha destas duas proteínas para a construção de uma biblioteca de “shuffling”, foi baseada primeiramente na similaridade de sequências de DNA, estas duas proteínas possuem identidade em torno de 70% e este fato seria uma condição a para a aplicação da técnica. A junção destas duas proteínas poderia ser interessante no aspecto funcional, visto que são proteínas que apresentam homologia de sequências e através da uma recombinação poderíamos criar quimeras, que poderiam apresentar uma nova função ou uma proteína híbrida com atividade melhorada. Assim, foi construída a biblioteca a partir da amplificação da região codante das duas proteínas.

4.11.1- AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODANTE DA CISTATINA DE CANA-DE-AÇÚCAR (RZ2001)

A figura 28 mostra a banda de amplificação referente a região que codifica para a proteína Canacistatina.

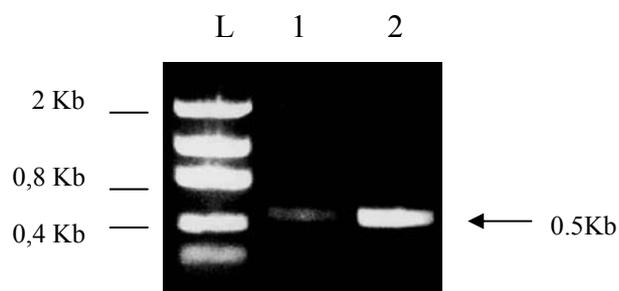


Figura 28. Produto de amplificação partir do plasmídeo pET28a RZ2001. Legendas: 1 e 2: inserto amplificado com aproximadamente 0,5 Kb. Foram utilizados os “primers”: T7 promoter e T7 terminator

4.11.2 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODANTE DA CISTATINA DE ARROZ

A região que codifica para o gene da CPI do arroz OC-I foi obtida através de amplificação utilizando como molde o plasmídeo pET28aOC-I. Este plasmídeo foi construído em nosso laboratório. O cDNA foi obtido a partir da extração de RNA mensageiro de sementes de arroz. E a região que codifica para a fase aberta de leitura da proteína Orizacistatina I foi clonada no vetor de expressão pET28a, resultando no pET28aOC-I. O resultado da amplificação é mostrado na figura 29:

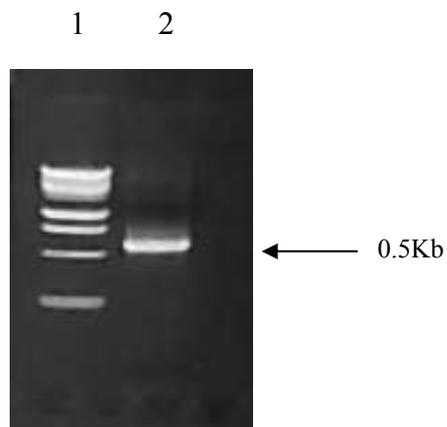


Figura 29. Gel de agarose 1% mostrando o produto de amplificação da região codante da Orizacistatina. Coluna 1: “ladder”1Kb, coluna 2: inserto amplificado com aproximadamente 0,5 Kb.

4.11.3- TRATAMENTO COM DNase I

A figura 30 mostra os produtos de amplificação obtidos a partir dos clones pET28aRZ2001 e pET28aOC-I após tratamento com DNase I. Os fragmentos de 40 a 120pb (figura 29) serão recombinados inicialmente sem primers.

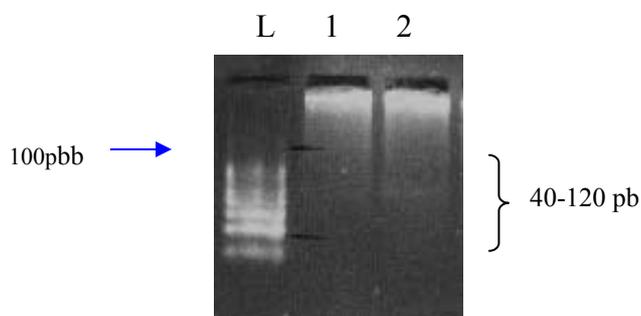


Figura 30: Gel de agarose 3.5% com fragmentos de 40-120pb após a digestão com DNase I. L: Ladder 10pb, em 1: fragmentos provenientes da Canacistatina e 2: fragmentos provenientes da Orizacistatina

4.11.4 RECOMBINAÇÃO DOS FRAGMENTOS DA CANACISTATINA E ORIZACISTATINA

Os fragmentos de 40-120pb provenientes da digestão do produto de amplificação com DNase I foram recombinados. Ocorre um pareamento das fitas de DNA de acordo com a complementariedade de sequências dos DNAs homólogos, através de uma extensão sem “primers”. O produto resultante da extensão é mostrado na figura 31, aparece como um rastro (“smear”), quase imperceptível.

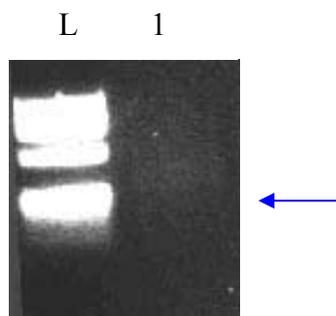


Figura 31. Gel de Agarose 3.5%. Análise do produto de extensão dos fragmentos purificados na ausência de primers (recombinação). Legenda:L: Low DNA mass ladder ; 1: produto de recombinação

4.11.5 -AMPLIFICAÇÃO POR PCR DOS PRODUTOS RECOMBINADOS

Após a recombinação dos fragmentos foi feita uma reação de PCR utilizando “primers” específicos para os cDNA RZ2001 e OC-I. Foi feita uma combinação de “primers”, da Canacistatina e da Orizacistatina, para amplificar um produto de recombinação entre as duas e o produto de amplificação foi obtido como esperado, já que os genes parentais apresentavam fragmentos em torno de 300pb (fig 32).

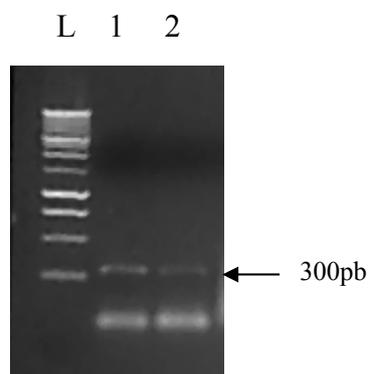


Figura 32. Gel de agarose 1% mostrando o produto de amplificação dos fragmentos recombinados de RZ2001 e OC-I. Legenda: L "Ladder": Low DNA mass ; 1 e 2: visualização de uma banda de aproximadamente 300 pb, correspondente ao cDNA da da CPI.

4.11.6- ANÁLISES DAS BIBLIOTECAS DE SHUFFLING

Inicialmente foram construídas duas bibliotecas de shuffling, a primeira denominada "canacistina wild type", onde utilizamos somente o gene da Canacistina fragmentado para a recombinação. A segunda biblioteca foi a "canacistatina I e II", onde utilizamos fragmentos dos genes da Canacistina I e de uma outra proteína denominada Canacistatina II. Após a construção destas bibliotecas vários clones foram analisados e verificou-se que a qualidade desta biblioteca estava comprometida. Havia muitos falsos positivos, impossibilitando assim, a procura de um clone recombinante. A partir deste fato partiu-se então para a construção da terceira biblioteca, agora formada pelas proteínas Canacistatina I e Orizacistatina I. Foram analisados até o momento 260 clones e pretende-se analisar em torno de 10.000 clones para varrer a biblioteca completamente. Após o sequenciamento, vários alinhamentos foram feitos entre os clones e foi possível encontrar um clone denominado

A10PL3. Este clone é um híbrido formado a partir das proteínas Canacistatina I e Orizacistatina I. Como é observado na figura 33, um alinhamento entre as três proteínas mostra a formação do híbrido A10PL3 formado por aminoácidos provenientes das duas proteínas.

4.11.7-ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA BIBLIOTECA DE SHUFFLING CANACISTATIANA / ORIZACISTATINA

Após o sequenciamento de cerca de 400 clones da biblioteca, foram feitas análises das sequências de aminoácidos em busca de proteínas formadas pela mistura das proteínas Canacistatina I e a Orizacistatina I. Na formação da proteína híbrida espera-se que ocorra uma mistura de aminoácidos das duas proteínas, mas que os domínios conservados entre as duas se mantenham, pois estes domínios são importantes para a atividade da proteína. Entre os clones com sequências de boa qualidade analisados, houve a formação de proteínas “homoduplex”, que são formadas somente por uma das proteínas, em 206 clones. O sucesso na obtenção da proteína híbrida requer a hibridização entre a simples fita de um fragmento da Orizacistatina e a simples fita do fragmento da Canacistatina antes da elongação do DNA na molécula heteroduplex. Se a probabilidade da formação de heteroduplex é menor que o homoduplex, uma fita da Canacistatina se hibridizada com outra fita da Orizacistatina e a frequência de recombinação entre as duas se torna baixa. Uma simulação computacional demonstrou que hibridizações preferenciais entre fitas de DNA homólogos podem explicar a seletiva formação de moléculas não híbridas como produtos finais (KIKUCHI *et al.*, 1999). Para se obter uma alta frequência de recombinação pela família “shuffling”, a probabilidade de formação de uma molécula heteroduplex deve ser aumentada. Em uma tentativa de se aumentar esta probabilidade, a temperatura de hibridização usada nas reações de PCR foi diminuída. Entretanto, a maioria dos produtos de shuffling ainda possuem uma estrutura similar de Orizacistatina ou de Canacistatina e não uma mistura das duas. Foram analisados em 266 clones dos quais 206 eram similares em sequência com a proteína Orizacistatina, mas apresentavam uma pequena região deletada LGGVEPV no N-terminal. Outros 60 clones eram idênticos a Orizacistatina I com exceção da região 3’ do primer RZ2001. Analisando o clone selecionado A10PL3, observamos que ele possui uma mistura de aminoácidos provenientes das duas proteínas e podemos ressaltar que os domínios conservados entre as duas cistatinas se

mantiveram, característica esta importante para este clone, visto que estes domínios podem interferir na atividade da proteína formada.

No alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas Canacistatina I, Orizacistatina I e A10PL3, mostrado na figura 33, é possível fazer uma comparação entre elas e verificar as mudanças obtidas após a evolução “in vitro”.

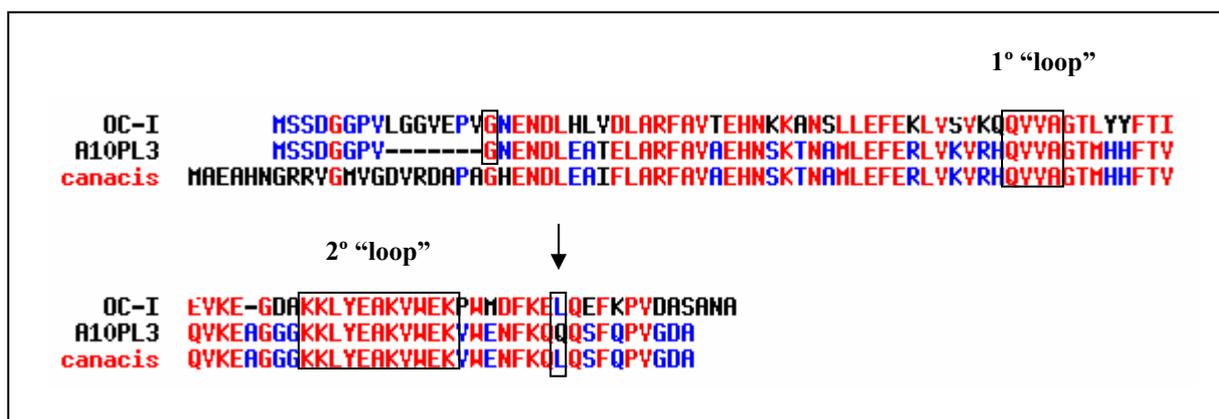


Figura 33. Alinhamento de seqüências de aminoácidos das proteínas (OC-I), Canacistatina e A10PL3. Em vermelho os aminoácidos em comum entre as três proteínas. As três prováveis regiões de contato do inibidor estão destacadas. Uma seta indica uma troca do aminoácido (Leucina) por uma (Glutamina).

Analisando a proteína A10PL3, observa-se que os aminoácidos iniciais MSSDGGPV são provenientes da Orizacistatina I, como era de se esperar, pois o oligonucleotídeo utilizado hibrida com a OC-I. Como as cistatinas são inibidores reversíveis, que competem com o substrato para a ligação no sítio ativo da enzima, alguns estudos funcionais concluíram que um resíduo de glicina (G) entre as posições 9 e 11 da região N-terminal, pode ser importante para a atividade dos inibidores contra cisteína peptídeos (ABRAHAMSON *et al.*, 1987). Este resíduo de glicina se manteve conservado na posição 9 no caso da proteína A10PL3, este fato se torna ainda mais relevante porque a glicina se posiciona na provável região de ligação do inibidor no sítio ativo da enzima (TURK *et al.*, 1991). Um pequeno motivo ENDL se manteve conservado entre as três. O motivo LARFAV muito conservado entre as cistatinas de plantas também se manteve na proteína A10PL3. Em seguida observamos alguns resíduos intercalados provenientes da Canacistatina, outros da Orizacistatina e algumas regiões conservadas entre as três. Houve uma substituição do aminoácido leucina (L) na posição 86, por uma glutamina Q, provavelmente foi oriunda de recombinação. Esta substituição ocorreu em uma região próxima a região de formação do segundo “loop”, região que contém um resíduo de triptofano, esta região faz parte de um outro provável sítio de ligação da enzima,

porém alguns estudos demonstram que substituições mesmo fora do sítio de interação também podem interferir na atividade da proteína. Além disso, o resíduo de Leucina se mantém conservado nesta posição entre as cistatinas e a substituição do resíduo de Leucina pelo resíduo de Glutamina na proteína A10PL3 poderia interferir na estrutura e atividade da proteína. Assim, podemos sugerir uma hipótese de que esta substituição esteja relacionada com a melhora na atividade da proteína. Estudos de modelagem molecular poderão ser realizados com a proteína A10PL3 para verificar a veracidade desta informação. Para tanto é interessante que a estrutura da canacistatina seja resolvida.

Um domínio considerado importante para a atividade dos inibidores de cisteína protease foi mantido na proteína A10PL3, QVVAG. Este segmento é muito conservado nas cistatinas e faz parte do primeiro “loop”. Alguns estudos realizados com a cistatina A, demonstraram que substituições de aminoácidos nesta região não afetaram a atividade inibitória da cistatina, portanto a região QVVAG deve ter uma função de estabilização do complexo entre a enzima e o inibidor, enquanto que a região N-terminal poderia ser essencial para a atividade inibitória (NIKAWA *et al.*, 1989). Segundo BODE *et al.*, 1988, o motivo QVV estabiliza o complexo fornecendo uma extensa área de contato com o sítio de ligação da protease.

O segundo “loop” corresponde a um segmento contendo um resíduo de triptofano que também interage com o sítio de ligação da enzima. Substituições do resíduo triptofano por um resíduo Glicina na região C-terminal da Cistatina C levaram a uma diminuição na atividade inibitória da Cistatina C em relação a Catepsinas B e H (ABRAHAMSON *et al.*, 1998). Estes dados trazem mais um indício de que esta é uma região de possível interação com o sítio de ligação da enzima.

A proteína A10PL3 é mais parecida com a proteína Canacistatina do que com a Orizacistatina. Observamos uma semelhança da proteína A10PL3 com a Orizacistatina em relação aos aminoácido iniciais MSSDGGPV, o que é esperado, pois o oligonucleotídeo sense foi desenhado para a anelamento neste região. Houve uma deleção na região N-terminal subsequente a esta região MSSDGGPV, esta deleção também poderia interferir na atividade da proteína A10PL3, modificando o rearranjo estrutural da proteína. Alguns estudos de mutagênese demonstraram que alguns aminoácidos da região N-terminal da Cistatina C precedentes a Glicina na posição 11, estariam envolvidos na melhora da afinidade deste

inibidor em relação a catepsina B (PAVLOVA *et al.*, 2003). Análise de atividade daqueles clones que apresentaram apenas a deleção no N-terminal podem ajudar a esclarecer este fato.

Estes dados poderiam contribuir com informações importantes para o estudo e desenvolvimento de inibidores de cisteíno proteases mais eficientes que possam ser utilizados futuramente.

4.11.8- ANÁLISE DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HÍBRIDA A10PL3

A expressão da proteína A10PL3 em *E.coli* foi analisada em SDS-PAGE 15% após a indução da cultura com IPTG (figura 34). Nesta análise foram coletadas 4 amostras, onde foi possível observar a banda de expressão a partir de 1 hora de indução. Após a confirmação da banda de expressão com massa molecular de aproximadamente 12 KDa, a proteína A10PL3 foi submetida a teste de solubilidade e apresentava-se solúvel. Uma observação interessante é que a proteína A10PL3 é menos solúvel do que a proteína Canacistatina, bem como a proteína Orizacistatina. A partir da obtenção da proteína no sobrenadante, o próximo passo A10PL3 em relação a proteína Canacistatina foi a purificação da proteína A10PL3 em etapa única através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A purificação foi realizada com sucesso e obtivemos a proteína híbrida totalmente pura e em quantidades suficientes para a realização dos ensaios de atividades de grande importância para a finalização dos experimentos de evolução “in vitro”

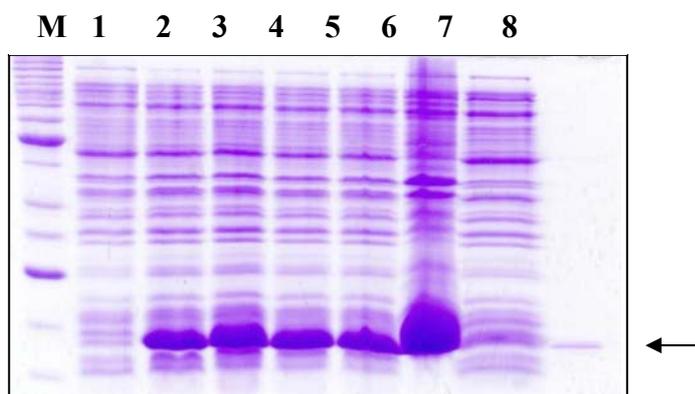


Figura 34. Análise de Expressão da proteína A10PL3 em *E.coli*. SDS-PAGE corado com azul comassie (15%) referente a indução do clone recombinante pET28aA10PL3. M: marcador de proteína (Invitrogen); 1: BL21(DE3)pET28aA10PL3 não induzido; 2: BL21(DE3)pET28aA10PL3 induzido 1 hora; 3: BL21(DE3)pET28aA10PL3 induzido 2 horas; 4: BL21(DE3)pET28aA10PL3 induzido 3 horas; 5: BL21(DE3)pET28aA10PL3 induzido 4 horas. 6: BL21(DE3)pET28aA10PL3 precipitado; 7: BL21(DE3)pET28aA10PL3 sobrenadante; 8: BL21(DE3)pET28aA10PL3 após purificação

4.11.9- TESTES DE INIBIÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CATEPSINAS PELA PROTEÍNA A10PL3

Para a finalização dos experimentos de evolução “in vitro” foram realizados ensaios de atividade com a proteína A10PL3 purificada. As proteínas Canacistatina e Orizacistatina I, já apresentavam atividades descritas de inibição de proteases, porém pretendia-se com a evolução “in vitro” aumentar e ou modificar a atividade da proteína Canacistatina utilizando a técnica de DNA shuffling, para formar uma quimera entre uma proteína da cana-de-açúcar e a Orizacistatina de arroz. Nos testes de atividade inibidora de protease da proteína A10PL3 foram feitos ensaios inibição de proteases humanas (catepsinas V, K, L e B recombinantes) utilizando a proteína purificada. O valor de K_i (constante de inibição) da proteína A10PL3 em relação à enzima catepsina V foi de 16nM, para a enzima catepsina K foi de 39nM, para a catepsina L foi de 9.8nM e finalmente para catepsina B o K_i foi 16nM. A tabela 5 mostra os valores de K_i (constante de inibição) das proteínas Canacistatina I, Orizacistatina I e A10PL3 em relação às enzimas catepsina V, K, L e B para fins de comparação.

CISTEÍNO PROTEASES	K_i(nM) Canacistatina I	K_i(nM) Orizacistatina I	K_i(nM) A10PL3
Catepsina V	1	2	16
Catepsina K	0.76	21	39
Catepsina L	0.6	4.4	9.8
Catepsina B	125	112	16

Tabela 5: Atividade das proteínas Canacistatina I, Orizacistatina I e A10PL3 em relação às catepsinas humanas.

Como pode ser observado na tabela 5, a proteína A10PL3 também é capaz de inibir cisteíno proteases humanas. O K_i da proteína A10PL3 em relação a catepsina V foi de 16 nM, observa-se que a proteína A10PL3 teve menor atividade inibitória em relação as proteínas Canacistatina I e Orizacistatina I. Em relação a Catepsina K, o K_i foi de 39nM, enquanto que o K_i da Canacistatina em relação a catepsina K é um pouco melhor, 0.76nM. Para catepsina L, observamos que o K_i da proteína A10PL3 foi de 9.8 nM enquanto que o K_i para a

Canacistatina e Orizacistatina foi de 0.6nM e 4.4, respectivamente. Onde podemos observar que houve menor especificidade da A10PL3 em relação a Canacistatina e Orizacistatina I. Estes resultados foram também importantes, primeiramente porque confirmam que a proteína continua ativa após a evolução “in vitro”. A evolução de proteínas foi aplicada neste trabalho com a intenção de melhorar a atividade da proteína e o objetivo foi alcançado considerando que houve uma melhora de especificidade da proteína A10PL3 em relação a catepsina B, que antes apresentava um K_i em torno de 125nM e passou a apresentar um K_i de 16 nM . A catepsina B é uma enzima possui um “loop” de oclusão, compreendendo os resíduos 104-106, que bloqueia o sítio ativo da enzima, limitando o acesso a esta região pelo inibidor (BJORK et al., 1998). Este fato nos leva a concluir que foi possível a obtenção de um clone com atividade melhorada após a utilização da técnica de DNA shuffling. A Catepsina B é uma das mais abundantes cisteíno proteases de mamíferos e sua eficiente inibição tem uma considerável importância patofisiológica, pois a catepsina B tem sido associada a progressão de tumores malignos (XING, 1998). Uma vez que a atividade da Catepsina B poderia ser inibida, estes dados poderiam fornecer novas estratégias para reduzir a atividade da catepsina B em tumores. As catepsinas K, L e V (cisteíno proteases humanas), estão envolvidas em uma série de funções fisiológicas, tais como degradação de matriz extracelular, reabsorção óssea, invasão entre outras. Um desbalanço da atividade normal da enzima, pode levar a condições patológicas. Assim, estas cisteíno proteases têm sido associadas com um grande número de eventos patológicos, tais como artrite reumatóide, osteoartrite, câncer, distúrbios neurológicos e osteoporos (CHAPMAN *et al.*, 1997 e BARRET, *et al.*, 1998).

Podemos concluir que houve melhora na atividade inibitória da proteína A10PL3 em relação a catepsina B enquanto que sua atividade em relação às catepsinas K, L e V foi menos específica, pois foram obtidos K_i (s) maiores quando comparados com as proteínas Canacistatina e Orizacistatina I. A proteína A10PL3 foi analisada e observamos que ela tem diferentes especificidades para cada uma das enzimas testadas. O objetivo principal de se aplicar a evolução *in vitro* neste trabalho foi justamente obter proteínas com melhora de atividade e com diferentes especificidades. A obtenção de uma proteína com atividade inibitória melhorada foi uma conquista importante, que poderá abrir possíveis caminhos para o desenho de novos inibidores de cisteíno proteases lisossomais que possam ser utilizados em aplicações na área médica.

6.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-ABE, K., KONDO, H., ARAI, S. Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. *Agric Biol Chem.*, v.51, p.2763-2768, 1987.
- 2-ABE, K., EMORI, Y., KONDO, H. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). *J Biol Chem.*, v.262, p.16793-16797, 1987.
- 3-ABELS, FB., FORRENCE, L.E. (1970). *Plant Physiology.*, v.45, 395-400.
- 4-ABRAHAMSON, M., RITONJA, A, BROWN, M.A, GRUBB, A, MACHLEIDT and BARRET, AJ. Identification of the Probable Inhibitory Treactive Sites of the Cysteine Proteinase Inhibitors Human Cystatin C and Chicken Cystatin. *The Journal of Biology Chemistry.* V.262(20), p.9688-9694, 1987.
- 5-ABRAHAMSON, M. Cystatins-Proteins Inhibitors of papain-like cysteine proteinases. *Journal of the Braziliam Association for the Advancement of Science.*v.45(5), p.299203, 1993.
- 6-ABRAHAMSON, M; FERNANDEZ, M.A; NATHANSON, C.M. Cystatins. *Biochemical Society*; v. 70, p.179-199, 2003.
- 7-ALTSCHUL, STEPHEN F., THOMAS L. MADDEN, ALEJANDRO A. SCHÄFFER, JINGHUI ZHANG, ZHENG ZHANG, WEBB MILLER, AND DAVID J. LIPMAN. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997).
- 8-ARNOLD, H.F; VOLKOV, A.A . Direct evolution of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology.*, v.3, p.54-59, 1999.
- 9-BALL, A., ASHBY, A., DANIELS, M.J. Evidence for the requirement of intracellular protease in the pathogenic interaction of *Pyrenopeziza brassicae* with oilseed rape. *Physiol Mol Plant.*, v.38, p.147-161, 1991.

- 10-BARRET, A., FRITZ, H., GRUB, A. Nomenclature and classification of the homologous with the cysteine proteinases inhibitor chicken cystatin. Biochem J., v.236, p.3-12, 1986.
- 11- BARBOSA, L.P., KEMMELMEIER, C. Chemical Composition of the hyphal wall from *Fusarium oxysporium*. *Exposition Mycology.*,v.17,p.274-283, 1993.
- 12-BARRETT, A. J., RAWLINGS,N.D., and WOESSNER, J.F. *Handbook of Proteolytic Enzymes.* Academic Press, London, UK.(1998).
- 13-BEYNON, R.J., BOND, J.S. *Proteolytic enzymes: a practical approach.* Oxford, England., p.87-89, 1989.
- 14-BODE, W., ENGH, R., MUSIL, D., THIELE, U., HUBER, R., KARSHIKOV, A, BRZIN, J., KOS, J and TURK, V. The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO J.* 7(8):2593-9, 1988
- 15-BOL,J.F.,LINTHORST,H.J.M.,CORNELISSEM,B.J.C.(1990).*Annu.Rev.Phytopatol.*, v.28, 113-138.
- 16-BRADFORD, M.M. A Rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyses Biochemical.*, v. 72, p.248-254. 1976.
- 17-BRANDEN, C and TOOZE, J. *Introduction to Protein structure.* New York. Garland Publishing, Inc.169-273.
- 18-BRODWAY, R.M., DUFFEY, S.S. Plant proteinase Inhibitor: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua* . *Journal Insect Physiology.*, v.32, p.827-833, 1986.

- 19-BRUGNARO, C., Manual de Orientação. Cultura da cana-de-açúcar, Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar Planalsucar. Instituto do açúcar e Álcool. Piracicaba. 1986.
- 20-BUGS, R.K.B. Transformações estruturais e Função de Fosfolipase. Tese de Doutorado, Departamento de Física, IBRCE, UNESP, Brasil.2001
- 21-CHAPMAN,H.A ., RIESE, R.J and SHI, G.P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. Annual Review in Physiology, v.59, p.63-88, 1997.
- 22- CHEN, Z.-Y., R. L. BROWN, A. R. LAX, T. E. CLEVELAND, AND J. S. RUSSIN. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. Appl. Environm. Microbiol. 65:1320-1324,1999.
- 23-CORPET,F. Nucl. Acids Res. V.16, p. 10881-10890, 1988.
- 24- CRAMERI, A., RAILLARD, S.A, BERMUDEZ, E., STEMMER, WPC. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. Nature., v.391, p.288-291, 1998.
- 25-DICKINSON, D.P. Cysteine peptidases os Mammals:their niological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.v.13,3,p.238-275, 2002.
- 26-DOBINSON, K., LECOMTE, N., LAZAROVITZ, G. Production of na extracellular trypsin-like protease by the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. J microbiol., v.43, p.227-233, 1997.
- 27-ELDEN, T.C. Selected proteinase inhibitor effects on alfafa weenil growth and development. Journal Econ Entomol., v.88, p.1586-1590, 1995.
- 28-GALLO, D. Manual de Entomologia Agrícola. São Paulo : Ed. Agronômica Ceres. 1988., 649p.

- 29-GLEDDIE, S., LELLER, W.A. Protoplast fusion technology. *J Tissue Culture Meth.*, v.12, p.157-162, 1989.
- 30- GRUDEN, K. The cysteine protease activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) guts, which is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. In: *Insect Biochemistry and Molecular biology*. V.28, p.549-560, 1998.
- 31-HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology.*, v.55, p.77-84, 1999.
- 32-HANSSON, L.O., GROB, B., MASSOUD, T. Evolution of Differential Substrate Specificities in Umu Class glutathione transferases Probed by DNA Shuffling. *Journal Molecular Biology*. V.287, p.265-276, 1999.
- 33-HARAYAMA, S., KIKUCHI, M., OHNISHI, K. Novel family shuffling methods for the vitro evolution of enzymes. *Gene*. V.236, p.159-167, 1999.
- 34-HEATH, R.L., MCDONALD, G., CHRISTELLER, J.J., LEE, M., BATEMAN, K., WEST, J. Proteinase Inhibitors from *Nicotiana glauca* Enhance Plant Resistance to Insect pests. *Journal Insect Physiology.*, v.43, p.833-842, 1997.
- 35-JEFFREY, C.W., KANNIAH, R., JESSE, M.J. Transgenic expression of a gene encoding a synthetic antimicrobial peptide results in inhibition of a fungal growth in vitro and in plant. *Plant Science.*, v.154, p.171-181, 2000.
- 36-JOSHI, B.N., SAINANI, M.N., BASTAWADE, K.B., GUPTA, V.S & RANJEKAR, P.K. Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. *Biochem. Biophys. Reserch. Commum.*, v.245, p.382-387, 1998.

- 37-JOSHI, B.N., SAINANI, M.N., BASTAWADE, K.B., GUPTA, S & RANJEKAR, P.K. Pearl millet cysteine protease inhibitor, evidence for the presence of two distinct sites responsible for anti-fungal and anti-feedent activities. *Euro Journal Biochem.*, v.265, p.556-563, 1999.
- 38- KIKUCHI, M., OHNISHI, K., HARAYAMA, S. An effective family shuffling method using single-stranded DNA. *Gene*. V.243, p.133-137, 2000
- 39-LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, v.227, p.680-685,1970.
- 40.LORITO,M.,BROADWAY,K.M.,HAYES,C.K.,WOO,S.L.,NAVIELLO,C.,WILLIAMS,D.L.& HERMAN, G.E. Proteinase inhibitors in plants as a novel class of fungicides. *Mol. Plant. Microbe.Interact.*, v.7,p.525- 527, 1994.
- 41-MACEDO, N., FILHO, J., TOKESHI, H. Seja doutor do seu canavial. *Potafós*, Arquivo agrônômico nº 6, Encarte de informações agrônômicas, v.67. Setembro/1994.
- 42-MACEDO, M.L.R., MATOS, D.G., MACHADO, OT. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. *Phytochemistry.*, v.54, p.553-558, 2000.
- 43-MARGIS, R., REIS, E.M., VILLERET, V. Structural and Phylogenetic Relationships among Plant and Animal Cystatins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.359(1), p.24-30, 1998
- 44-MARGIS, R and REIS, E.M. Sugarcane phytocystatins: Identification, classification and expression pattern analysis. *Genetics and Molecular Biology*, v.24(1-4), p.291-296, 2001.
- 45-MCHENRY, J., CHRISTELLER, J.T., SHADE, E. The major extracellular proteinases of the silverleaf fungus, *chondrosterum purpureum*. *Plant Pathology.*, v.45, p.552-563, 1996.

- 46- MIYAZAKI, K., WINTRODE, P.L., GRAYLING, R.^a, RUBINGH, D.N., ARNOLD, H.F. Directed Evolution Study of Temperature Adaptation in a Psychrophilic Enzyme. *Journal Molecular Biology*. V.297., p.1015-1026, 2000.
- 47-NAGATA,K., KUDO, N., ABE, K., ARAI, S., TANOKURA, M. Three-Dimensional Solution Structure of Oryzacin I, a cysteine proteinase Inhibitor of the rice, *Oryza sativa* L. japonica. *Biochemistry*., v.39, p.14753-14760, 2000.
- 48-NAKANISH, K., BEROVA, N., AND WOODY, R.W. Circular Dichroism-Principles and Applications. Nova York, V.CH Publishers, INC 1994.
- 49- NELSON, D.L and COX, M.M. Principles of Biochemistry. 3^o ed. New York. Worth Publishers. 848-849.2000
- 50-NIKAWA, T., TOWATARI, T., IKE, Y., KATUNUMA, N. Studies on the reactive site of the cystatin superfamily using recombinant cystatin A mutants. *Febs Letters*., v.255 (2), p.309-314. 1989.
- 51- PATTEN, P.A., HOWARD, R.J., STEMMER, W.P.C. Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Current Opinion in Biotechnology*. V.8., p.724-733, 1997.
- 52-PARK, S.K., CHEONG, J.J., LEE, S. A novel proteinase inhibitor gene transiently induced by tobacco mosaic virus infection. *Biochimical et Biophysical Acta*., v.1492,p.509-512, 2000.
- 53-PAVLOVA, A and BJORK, I. Grafting of Features of Cystatins C end B into N-terminal Region or Second Binding Loop of Cystatin A (Stefin A) Substantially Enhances Inhibition of Cysteine Proteinases. *Biochemistry*, v.42, p.11326-11333, 2003.
- 54-RAO, G.P., BERGAMIN, F.A, MARGAREY, R.C., AUTREY, L.J.C. Sugarcane Pathology. *Plant science*., v.158, p.185-186, 2000.

- 55-RICHARDSON, M.J. Seeds Storage Protein: The enzyme inhibitors. Methods in Plant Biochemistry., V.5, p.259-305, 1991.
- 56-RYAN, C.A. Proteinase inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. Annual Review Phytopathology., v.28, p.425-449, 1990.
- 57-SAMBROOK, J., FRIEDMAN, E.F. and MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual” 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- 58-SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc.Natl.Acad.Science,USA., v.74, p.5463-5467, 1977.
- 59-SCHOFFELMEER, E.A.M., KLIS, F.M., SIETSMAN, J.H. The cell wall of *Fusarium oxysporium*. Fungal Genetics and Biology., v.27, p.275-282, 1999.
- 60-SCHUSTER, E.N., DUNN-COLEMAN, J., FRISVAD, J.C., VAN DIJCK P. W. M. Enzyme Technology .Mini-Review published in: Applied Microbiology and Biotechnology 59(2002) 426-435
- 61-SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal Proteins. Applied and Environmental Microbiology.v.67(7), p.2883-2894, 2001.
- 42-SREERAMA, N., WOODY, R.W. A self consistent method for the analysis of proteins secondary structure from circular dichroism. Anal Biochem., v.209, p.32-44, 1993.
- 62- STEMMER, W.P.C., ZHANG, J., DAWES, G., Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. Proceedings of the National Academy of Sciences., v. 94., p.4504-4509, 1997.
- 63-STEMMER, W.P.C. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. Nature. V.370., p.389-391.1994

- 64-TERRA, W.R., FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Biochemical Physiology., v.109b, p.1-62, 1994.
- 65-TURK, V., BODE, W. The cystatins protein inhibition of cystein proteinase. FEBS Letters, v.282, p.213-219, 1991.
- 66- VENYAMINOV, S.Y and VASSILENKO, KS. Determination of tertiary Structure class from Circular Dichroism Spectra. Anal. Biochem. V.222. p.176-184, 1994
- 67-VETTORE, A .L., SILVA F.R., KEMPER E.L AND ARRUDA P. The libraries that made SUCEST. Genetics and Molecular Biology. 24 (1-4):1-7.2001.
- 68-WARD, J.M.J.; STROMBER, E.L.; NOWELL, D.C.; NUTTER JR.; F.W.Gray leaf spot: a disease of global importance in maize production. Plant Disease, St. Paul, v.83, p.884-895, 1999
- 69-WILHITE, S.E., ELDEN, T.C., BRZIN, J. Inhibition of a cysteine and aspartyl proteinases in the alfafa weevil midgut with biochemical and plant derived proteinase inhibitors. Insect Biochemistry and Moleccular Biology.,v.30, p.1181-1188, 2000.
- 70-WOLFSON, J.L & MURDOCK,L.L. Potencial use of protease inhibitors for host plant resistance: a test case. Enviromental Entomology., v.24

