

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

**PRODUÇÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO
DE UMA CISTEÍNO PROTEASE (TIPO CATEPSINA B)
DE CANA-DE-AÇÚCAR.**

SIMONE MICHELAN DUARTE

SÃO CARLOS - SP

2008

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

**PRODUÇÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO
DE UMA CISTEÍNO PROTEASE (TIPO CATEPSINA B)
DE CANA-DE-AÇÚCAR.**

SIMONE MICHELAN DUARTE

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

SÃO CARLOS

2008

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

D812pr

Duarte, Simone Michelan.

Produção recombinante e caracterização de uma cisteíno protease (tipo catepsina B) de cana-de-açúcar / Simone Michelan Duarte. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
69 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Genética molecular. 2. Proteínas recombinantes. 3. Cisteíno protease. 4. Cistatina. 5. Cana-de-açúcar. I. Título.

CDD: 574.87328 (20^a)

Orientador:

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva

Dedico este trabalho ao grande amor da minha vida, meu avô João Michelan Filho (*in memorian*), quem sempre me deu exemplo de amor, honestidade e prosperidade.

Perseverar é um dos grandes segredos do êxito. Muitas coisas na vida dependem da continuidade da perseverança que tudo alcança.

(Roque Schneider)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo que Ele tem me oferecido: pela vida, amor, proteção e pela minha família.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, agradeço pela oportunidade de realizar este mestrado e pela forma amistosa que ele me recebeu em seu laboratório. Obrigada pela paciência, pela atenção e pelos ensinamentos.

À minha família, pelo amor, confiança e apoio incondicionais; por me ensinar as diretrizes do bem e de onde tirar forças nos momentos de dor e sofrimento. Amo muito vocês.

À Profa. Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona, pelos materiais cedidos e auxílios prestados para a realização dos ensaios enzimáticos.

À EMBRAPA - Pecuária Sudeste – São Carlos, pela doação de amostras de cana-de-açúcar.

À Andréia e Andréa, pela total atenção e ajuda prestadas, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Kelly, pela amizade, pela convivência e pela cumplicidade. Uma pessoa muito querida que aprendi a admirar e a gostar de forma muito carinhosa. Obrigada pela atenção, confiança e ombro amigo.

À Márcia, pessoa maravilhosa e companheira, pela amizade, pelos momentos de grande conversas e risadas, pelos conselhos, por tudo.

Aos companheiros do LBM, Andréia, Andréa, César, Kesser, Kelly, Fernando, Luciano, Márcia, Raquel, Rosseli e Viviane, pela excelente convivência, pelos ensinamentos de todos importantes para a execução deste trabalho.

Ao Diego, meu futuro marido, por todos esses anos de convivência que repercutiram na construção de uma relação de muito amor, amizade, paciência, paz, compreensão e alegria de viver; que me transformaram numa pessoa muito melhor e feliz. Obrigada pelo apoio, atenção e incentivo.

Aos pequenos de casa, Yuri, Fofão, Lully, Laika, Nina, Tobias, Mel, Lady, Giuly, Malu, Luiz, Laila, Fred e Maria, pela total demonstração de carinho, amor e afeto. Animais de estimação que me fazem sentir querida e importante, e me fornecerem paz e alegria.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da UFSCar (PPG-GeV) pelo suporte e auxílio na realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

Ao Centro de Biotecnologia Molecular e Estrutural (CBME-CEPID) pelo financiamento deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO..... | i |
| LISTA DE FIGURAS..... | ii |
| LISTA DE TABELAS..... | iv |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | v |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 Proteases..... | 1 |
| 1.2 Cisteíno proteases..... | 4 |
| 1.3 Catepsinas B | 10 |
| 1.4 Inibidores de cisteíno proteases..... | 15 |
| 2 OBJETIVOS..... | 19 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 20 |
| 3.1 Análises <i>in silico</i> da seqüência da cisteíno protease..... | 20 |
| 3.2 Amplificação da ORF (fase aberta de leitura) que codifica a cisteíno protease tipo Catepsina B da cana-de-açúcar..... | 21 |
| 3.3 Construção do plasmídeo de expressão..... | 22 |
| 3.4 Expressão e purificação da cisteíno protease recombinantes..... | 24 |
| 3.5 Produção de anticorpos policlonais contra a cisteíno protease recombinante e ensaio de <i>Western blot</i> | 25 |
| 3.6 Zimografia reversa..... | 27 |
| 3.7 Ensaio de atividade enzimática e de inibição da cisteíno protease..... | 28 |
| 4 RESULTADOS..... | 31 |
| 4.1 Análises <i>in silico</i> da seqüências da cisteíno protease..... | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 Amplificação das ORFs da cisteíno protease..... | 38 |
| 4.3 Expressão e purificação da proteína recombinante..... | 38 |
| 4.4 Detecção da cisteíno protease recombinante e endógena da cana-de-açúcar..... | 39 |
| 4.5 Detecção da atividade da cisteíno protease recombinante em gel de gelatina (zimografia reversa)..... | 42 |
| 4.6 Ensaios de atividade enzimática da CaneCPB..... | 43 |
| 4.7 Inibição da cisteíno protease recombinante por cistatinas recombinantes..... | 44 |
| 4.8 Inibição da cisteíno protease recombinante inibidor específico para catepsina B..... | 46 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 49 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 58 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 59 |
| 8 ANEXOS..... | 68 |

RESUMO

As cisteíno proteases são enzimas proteolíticas que possuem os resíduos de cisteína e histidina em seu sítio catalítico. Essa classe de enzimas está presente na grande maioria dos organismos, desde bactérias, fungos, protozoários, plantas e animais. As propriedades físico-químicas destas proteases têm sido amplamente caracterizadas, entretanto suas funções biológicas ainda não foram completamente elucidadas. Trabalhos com cisteíno proteases de plantas têm sugerido diversas funções biológicas para estas enzimas. O presente estudo tem como objetivo a produção recombinante e a caracterização de uma cisteíno protease (tipo catepsina B) de cana-de-açúcar. A produção recombinante da enzima foi realizada em *E. coli* nas formas solúvel e insolúvel, sendo que esta última foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A caracterização da enzima foi realizada pela análise da hidrólise de substratos fluorescentes. Testes de inibição contra a cisteíno protease foram feitos utilizando-se inibidores recombinantes endógenos produzidos em nosso laboratório (CaneCPI-1 e CaneCPI-4), como também o inibidor específico para cisteíno proteases (E64) e o inibidor específico para catepsinas B (CA074). A inibição foi realizada com sucesso com os inibidores endógenos, como também com os inibidores sintéticos específicos. A atividade inibitória do CA074 demonstrada contra a cisteíno protease da cana-de-açúcar sugere que esta enzima seja uma cisteíno protease tipo catepsina B.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1: Modelo de Schechter e Berger 1967)..... | 04 |
| Figura 1.2: Estrutura da papaína..... | 05 |
| Figura 1.3: Mecanismo catalítico das cisteíno proteases..... | 06 |
| Figura 1.4: Diagrama esquemática das subfamílias da família C1 das cisteíno proteases..... | 09 |
| Figura 1.5: Estrutura tridimensional das catepsinas L e B e da papaína..... | 13 |
| Figura 3.1: Mapa do vetor de expressão pET28a..... | 23 |
| Figura 4.1: Peptídeo sinal identificado na seqüência da cisteíno protease..... | 32 |
| Figura 4.2: Seqüências nucleotídica e protéica da cisteíno protease..... | 34 |
| Figura 4.3: Alinhamento entre a seqüência protéica da CaneCPB e de diferentes catepsinas humana..... | 35 |
| Figura 4.4: Alinhamento entre a seqüência protéica da CaneCPB e das catepsinas B de <i>Oriza sativa</i> , <i>Hordeum vulgare</i> e <i>Tritium aestivum</i> | 36 |
| Figura 4.5: Amplificação da ORF da cisteíno protease..... | 38 |
| Figura 4.6: Expressão heteróloga e purificação da cisteíno protease..... | 39 |
| Figura 4.7: Imunodeteccção da cisteíno protease recombinante..... | 40 |
| Figura 4.8: Imunodeteccção da cisteíno protease recombinante na fração purificada e nos diferentes extratos da cana..... | 41 |
| Figura 4.9: Detecção da atividade da enzima em SDS-PAGE 15% contendo gelatina 0,04%..... | 42 |
| Figura 4.10: Perfil de atividade enzimática da proteína frente a diferentes condições de pH..... | 44 |

| | |
|---|----|
| Figura 4.11: Perfil de atividade enzimática da proteína frente a concentrações crescentes de NaCl..... | 44 |
| Figura 4.12: Inibição da CaneCPB pelas cistatinas recombinantes..... | 45 |
| Figura 4.13: Inibição da CaneCPB pelos inibidores específicos E64 e CA074..... | 47 |
| Figura A1: Seqüência nucleotídica da cisteíno protease da cana-de-açúcar no vetor pET 28a..... | 68 |
| Figura A2: Seqüência da proteína <i>HIS</i> CaneCPB..... | 69 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Porcentagens de identidade entre as seqüências protéicas das catepsinas humanas e da cisteíno protease da cana-de-açúcar..... | 37 |
| Tabela 2: Porcentagens de identidade entre as seqüências protéicas das catepsinas B de plantas e da cisteíno protease da cana-de-açúcar..... | 37 |
| Tabela 3: Valores de K_m obtidos na hidrólise dos substratos fluorogênicos pela CaneCPB..... | 43 |
| Tabela 4: Constantes de inibição (K_i) das cistatinas CaneCPI-1 e CaneCPI-4 contra a CaneCPB..... | 45 |
| Tabela 5: Constantes de inibição (K_i) dos inibidores E64 e CA074 contra a CaneCPB..... | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------|--|
| μg | micrograma |
| μL | microlitro |
| μM | micromolar |
| μm | micrômetro |
| λ_{em} | comprimento de onda de emissão |
| λ_{ex} | comprimento de onda de excitação |
| $^{\circ}\text{C}$ | graus Celsius |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| CA074 | <i>N</i> -(<i>L</i> -3- <i>trans</i> -propylcarbamoil-oxirane-2-carbonyl)- <i>L</i> -isoleucyl- <i>L</i> -proline |
| cDNA | DNA complementar |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| dNTPs | desoxirribonucleotídeos trifosfato |
| DO | densidade óptica |
| DTT | ditiotreitól |
| EDTA | ácido etileno-diamino-tetra-acético |
| E64 | transepoxi-succinil- <i>L</i> -leucilamido-(4-guanidino)butano |
| G | grama |
| h | hora |
| IPTG | isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo |
| Kb | quilobase |
| K_i | constante de inibição |
| $K_i \text{ app}$ | constante de inibição aparente |
| KDa | quilodalton |
| K_m | Constante de Michaelis |
| L | litro |
| M | molar |
| mA | miliampéres |
| mg | miligrama |
| min | minuto |

| | |
|----------|---|
| mL | mililitro |
| mm | milímetro |
| mM | milimolar |
| MW | <i>molecular weight</i> |
| tRNA | RNA transportador |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| ng | nanograma |
| nm | nanômetros |
| nM | nanomolar |
| ORF | <i>open reading frame</i> – fase aberta de leitura |
| pb | pares de bases |
| PCR | <i>Polimerase chain reaction</i> – reação em cadeia da polimerase |
| pH | potencial de hidrogênio |
| pmol | picomol |
| PVPP | polivinilpolipirrolidona |
| SDS-PAG | eletroforese em gel de poliacrilamida sódio dodecil sulfato |
| TBS | solução salina tamponada com tris |
| U | unidade enzimática |
| UV | ultravioleta |
| V | volts |
| x | vezes |
| Z-FR-MCA | carbобенzoícarbonil-Phe-Arg-7-amido-4-metilcoumarina |
| Z-LR-MCA | carbобенzoícarbonil-Leu-Arg-7-amido-4-metilcoumarina |

1) INTRODUÇÃO

1.1) Proteases

Um grupo de enzimas de grande importância é o das proteases, que são também denominadas peptidases ou enzimas proteolíticas. As proteases são encontradas em diversos organismos, como plantas, animais e microorganismos, cuja função é de catalisar a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas de proteínas. Na ausência desses catalisadores biológicos a hidrólise de uma ligação peptídica levaria centenas de anos para ocorrer (Sajid e McKerrow, 2002).

Essas enzimas regulam numerosos processos bioquímicos e fisiológicos tais como digestão de alimentos, coagulação sangüínea e fibrinólise, ativação de proenzimas, liberação de peptídeos fisiologicamente ativos, ativação do sistema do complemento, processos de inflamação, entre outros (Leung-Toung *et al.*, 2002). Assim, o funcionamento das células e dos organismos no geral depende deste controle preciso e específico do processo proteolítico realizado pelas proteases (Rzychon *et al.*, 2004).

Devido à existência de uma grande diversidade de proteases, elas podem ser agrupadas em famílias e clãs. As famílias derivam de um mesmo ancestral comum e compreendem as enzimas proteolíticas que apresentam alto grau de identidade na seqüência de aminoácidos da região responsável pela atividade catalítica. Já os membros de um clã pertencem a um conjunto de famílias de enzimas que evoluíram a partir de um único ancestral comum, contudo divergiram de tal maneira que suas relações por comparação com as estruturas primárias não podem ser comprovadas (Rawlings e Barret, 1995).

A classificação das proteases é bastante complexa pelo fato de apresentarem uma variada especificidade em relação aos substratos. De maneira mais simples, podem ser classificadas como exopeptidases, hidrolisam ligações peptídicas nas extremidades N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxipeptidases) da cadeia polipeptídica; ou endopeptidases, hidrolisam ligações peptídicas internas da cadeia polipeptídica. Outro critério utilizado para classificação baseia-se em seus mecanismos catalíticos, agrupando as proteases em seis classes principais: serino proteases, cisteíno proteases, aspartil proteases, metalo proteases, treonino proteases e glutamato proteases (Barrett, 1994; Rawlings *et al.*, 2006). No entanto, outros fatores também podem ser levados em consideração na classificação, como as similaridades de seqüências de aminoácidos e estruturas tridimensionais das proteínas e similaridades de inibidores (Barrett *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 1998).

A classe das serino proteases é caracterizada pela presença de um grupo serino no seu sítio ativo. Dentre as famílias pertencentes a este grupo, temos, por exemplo, a quimotripsina e a subtilisina, com estruturas tridimensionais e seqüências de aminoácidos diferentes. Contudo possuem o mesmo mecanismo utilizado para a atividade catalítica (Beynon e Bond, 1989).

As cisteíno proteases são enzimas proteolíticas que possuem os resíduos de cisteína e histidina em seu sítio catalítico (Rzychon *et al.*, 2004); entretanto algumas destas enzimas apresentam outros dois resíduos importantes para a catálise que incluem um glutamato e uma asparagina, com diferentes papéis desempenhados. Como exemplo temos a papaína, extraída de *Carica papaya*, e diversas cathepsinas lisossomais presentes em mamíferos.

As aspartil proteases, conhecidas como proteases ácidas, apresentam dois resíduos de ácido aspártico, constituindo a díade catalítica (Beynon e Bond, 1989; Barrett *et al.*, 2004), tendo como exemplo a pepsina (enzima digestiva).

As metalo proteases são enzimas cujas atividades dependem da ligação de um metal, geralmente o zinco, em seu sítio catalítico. Essas enzimas são encontradas em uma variedade de organismos, desde bactérias até mamíferos (Beynon e Bond, 1989; Barrett *et al.*, 2004).

As treonino proteases, também encontradas desde bactérias até mamíferos, dependem do aminoácido treonina em seu sítio ativo para a atividade enzimática. Estão presentes nas subunidades catalíticas do proteossomo, o qual é envolvido no *turnover* intracelular de proteínas (Barrett *et al.*, 2004; Rawlings *et al.*, 2006).

As glutamato proteases, enzimas recentemente descritas, foram primeiramente classificadas como aspartil proteases, sendo em 2004 reclassificadas como um sexto tipo catalítico de proteases. Até o presente momento, sua distribuição limita-se a fungos filamentosos, e sua atividade proteolítica depende de uma díade catalítica que consiste dos resíduos glutamato e glutamina (Fujinaga *et al.*, 2004; Sims *et al.*, 2004; Rawlings *et al.*, 2006).

Cada classe de protease apresenta, portanto, especificidade singular e para descrevê-la utilizamos o modelo desenvolvido por Schechter e Berger (1967), no qual os subsítios do sítio ativo da enzima (designados pela letra “S”) são locais onde os resíduos de aminoácidos do substrato (designados pela letra “P”) se ligam; cada subsítio acomoda um único resíduo de aminoácido (Figura 1.1).

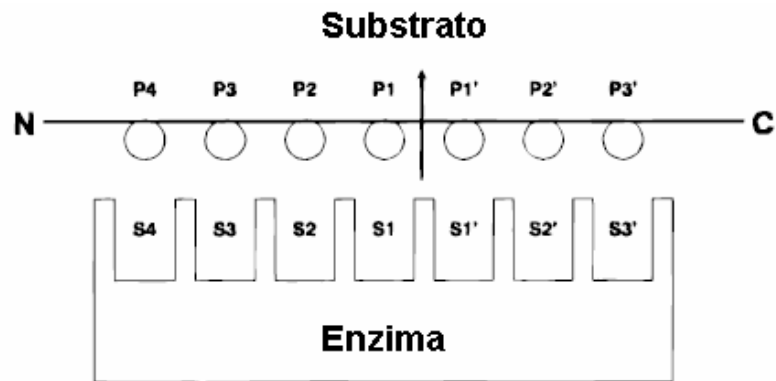


Figura 1.1: Modelo de Schechter e Berger (1967), que explica a especificidade da interação substrato-enzima. O esquema ilustrativo mostra a interação do substrato peptídico e a enzima. Os resíduos do peptídeo são designados com a letra “P” e os subsítios com os quais os peptídeos interagem na enzima, com a letra “S”. Adaptado de Otto e Schirmeister, 1997.

A numeração dos resíduos do substrato a ser clivado depende de sua direção, sendo numerados P1, P2, P3... se direcionados ao N-terminal e P1', P2', P3'... se direcionados ao C-terminal da ligação peptídica do substrato. Igualmente, os subsítios da protease são numerados ...S3, S2, S1, S1', S2', S3'... recebendo os resíduos correspondentes do substrato.

1.2) Cisteíno proteases

As cisteíno proteases são uma classe de enzimas presentes na grande maioria dos organismos, desde bactérias, fungos, protozoários, plantas e animais. Podem ser classificadas em clãs de proteínas independentemente evoluídas, baseando-se na organização estrutural do sítio ativo.

Independentemente do organismo, todas as cisteíno proteases com estrutura tridimensional determinada apresentam estrutura bilobada com o sítio catalítico, onde o substrato se liga, localizado na reentrância dos lobos,

denominados de domínios L (C-terminal) e R (N-terminal) (McGrath, 1999) (Figura 1.2). No sítio catalítico dessas enzimas encontramos os aminoácidos cisteína no domínio L e histidina no domínio R; auxiliados, em algumas famílias, por uma glutamina (que ajuda na formação do “buraco” do oxianion) e uma asparagina na seguinte ordem: Gln19, Cys25, His159 e Asn175 (numeração da papaína). A glutamina estabiliza a estrutura tetraédrica intermediária durante a hidrólise do substrato e a histidina orienta o anel imidazólico (Rawlings e Barret, 2000). O estado ionizado do resíduo de cisteína nucleofílico no sítio ativo é independente da ligação do substrato (Polgar e Halasz, 1982).

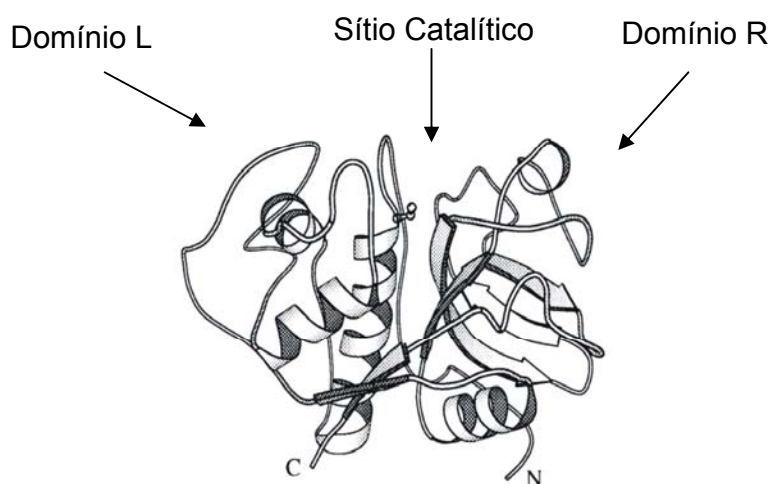


Figura 1.2: Estrutura da papaína. A figura mostra os domínios L e R da estrutura bilobada da enzima, com o sítio catalítico na reentrância dos domínios. Adaptado de Fujishima *et al.*, 1997.

O mecanismo catalítico geral das cisteíno proteases pode ser observado na figura 1.3. O processo inicia-se com a ligação do substrato peptídico à enzima (complexo de Michaelis), quando o grupo tiol do resíduo cisteínico da enzima reage

com a carbonila do substrato que perde a porção C-terminal ($R'NH_2$), deixando a enzima acilada num processo denominado acilação. Esta acil-enzima reage com água para formar o segundo produto ($RCOOH$) por deacilação, regenerando a estrutura da enzima, o que inicia novamente o ciclo catalítico.

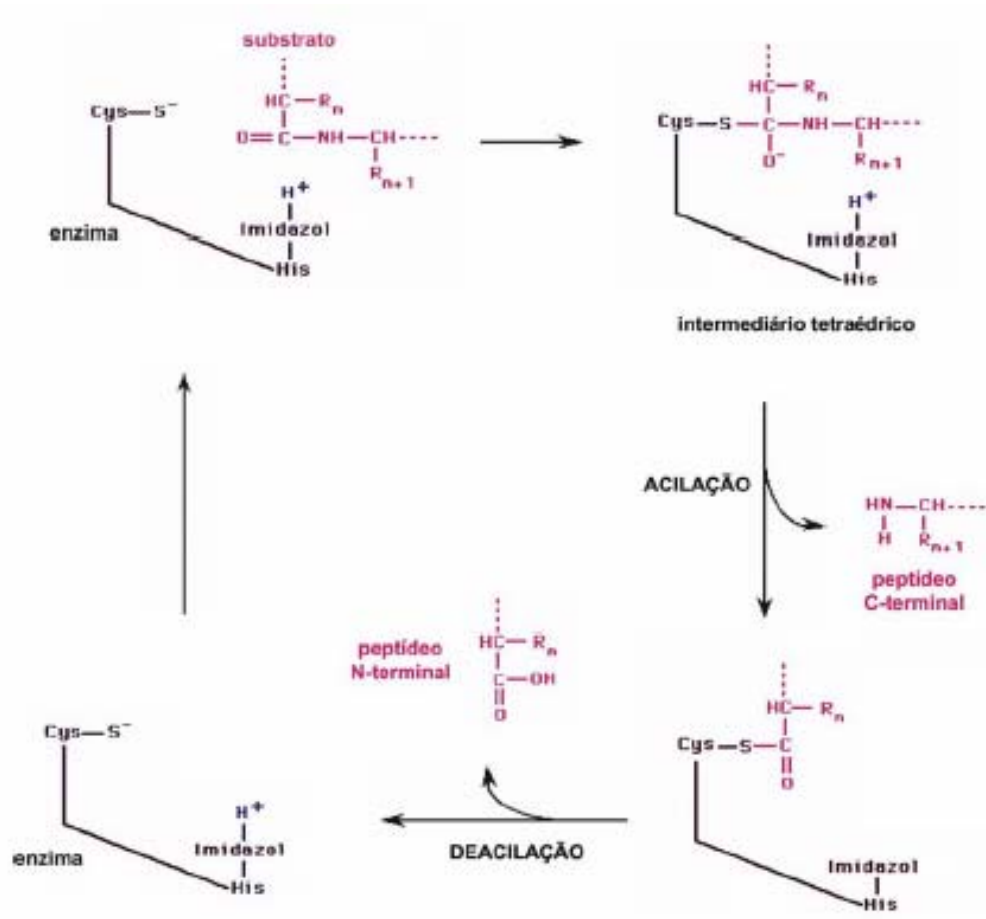


Figura 1.3: Mecanismo catalítico das cisteíno proteases. Esquema ilustrativo das várias etapas do mecanismo de catálise utilizado por cisteíno proteases. Na figura observamos o grupo tiol do resíduo cisteínico da enzima reagindo com a carbonila do substrato, que perde a porção C-terminal ($R'NH_2$), deixando a enzima acilada. A acil-enzima reage com água para formar o produto ($RCOOH$) por deacilação.

Um aspecto importante para a atividade catalítica das cisteíno proteases é a alta nucleofilicidade (velocidade de ataque de um nucleófilo sobre um carbono eletrófilo) do grupo tiol da cisteína do sítio ativo. Na forma ativa da enzima ambos

os resíduos do sítio ativo são carregados, formando o par tiol-imidazol (Polgar, 1974). A existência de grupos ionizados essenciais para a atividade catalítica está consistente com a dependência do pH para a atividade destas proteases.

As propriedades físico-químicas destas proteases têm sido amplamente caracterizadas, entretanto suas funções biológicas ainda não foram completamente elucidadas. Trabalhos com cisteíno proteases de plantas têm apresentado diversas funções biológicas para estas enzimas.

Como exemplo, temos cisteíno proteases estocadas em tecidos de cereais (Bewley e Black, 1994) e em sementes (Schlereth *et al.*, 2001) ativadas após a germinação, que degradam proteínas armazenadas. Outro processo celular que envolve a participação destas enzimas é a morte celular programada e senescência (Yuan *et al.*, 1993; Solomon *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002), e no controle da proliferação e diferenciação de células (Ahn *et al.*, 2004).

Trabalhos relatam também o papel de cisteíno proteases como potencial colagenase, hidrolizando colágenos tipo I e II (Kim *et al.*, 2007; Mostafaie *et al.*, 2008).

Tem-se, hoje, nove clãs e setenta e uma famílias de cisteíno proteases (MEROPS database (<http://merops.sanger.ac.uk/>)). Dentre os clãs, o CA comporta as famílias de cisteíno protease que apresentam semelhança com a papaína em suas estruturas terciárias ou em seus motivos. Dentre as famílias do clã CA há a C1, denominada família da papaína, encontrada em diversos organismos, desde bactérias, fungos, protozoários, plantas e animais.

A papaína, extraída do látex de *Carica papaya*, foi a primeira cisteíno protease com estrutura tridimensional determinada (Kamphuis *et al.*, 1984). A

papaína e membros de sua família são sintetizados na forma de precursores inativos (preproenzimas), ou seja, contendo peptídeo sinal na porção N-terminal (que encaminha a enzima para correta destinação), pró região (necessita ser clivada para que a enzima se torne ativa) e enzima madura.

Fox e colaboradores (1992) descreveram a forte ação inibitória de um peptídeo sintetizado a partir de 56 resíduos correspondentes aos aminoácidos 7-62 da pró região da catepsina B de rato. Outros trabalhos avaliaram também a seletividade da ação inibitória com base nas diferenças estruturais dos propeptídeos das cisteíno proteases da família C1, mostrando que estes são elementos reguladores da atividade destas enzimas (Volkel *et al.*, 1996; Guay *et al.*, 2000).

A ativação da proenzima pode ocorrer através da autocatálise ou, no caso das catepsinas lisossomais, pela atividade de catepsinas presentes nos lisossomos ou de outras proteases da matriz extracelular (Wiederanders, 2003). O propeptídeo removido (parcial ou total) durante a ativação é responsável pelo correto enovelamento e para sua estabilidade (Tao *et al.*, 1994).

As cisteíno proteases da família C1 são na sua maioria endopeptidases, possuindo algumas enzimas atividade exopeptidase. Elas são divididas em duas subfamílias C1A e C1B (figura 1.4), sendo membros da subfamília C1A a papaína (que dá nome à família), as catepsinas lisossomais, dentre outras proteases.

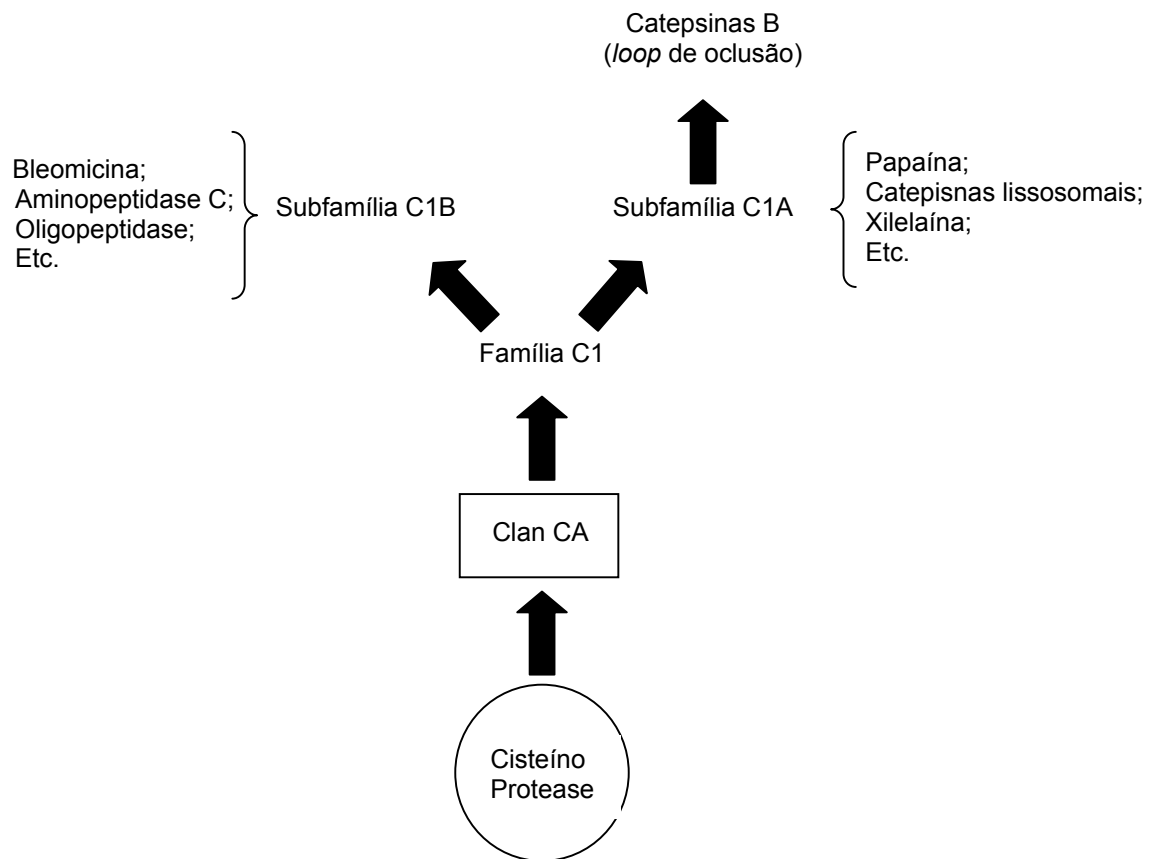


Figura 1.4: Diagrama esquemático das subfamílias da família C1 das cisteíno proteases.

Os lisossomos são organelas citoplasmáticas responsáveis pela digestão intracelular. Eles possuem diversas proteases ácidas capazes de hidrolisar proteínas exógenas e autofagocitar constituintes celulares sob condições fisiológicas e patológicas variadas. Diversas enzimas proteolíticas ativas em pH ácido, tais como as catepsinas B, C, D, H, L localizadas no interior do lisossomo foram identificadas, às quais se atribui a degradação de proteínas de meia-vida longa, de receptores de membrana, entre outras.

As catepsinas lisossomais estão distribuídas em diferentes classes de proteases, como por exemplo, as catepsinas D e E (aspartil proteases) e as

catepsinas A e G (serino proteases) (Takahashi e Tang, 1981; Barrett e McDonald, 1980).

As proteases cisteínicas lisossomais (catepsinas B, C, H, K, L, M, N, S, T, V e W) são componentes importantes da família C1. Na grande maioria são enzimas monoméricas, com massa molecular entre 20-30 kDa. As catepsinas L, B, D e H representam a maior parte das proteases lisossomais e são elas que determinam primariamente a capacidade proteolítica dos lisossomos. Para suas atividades ótimas, as proteases lisossomais requerem meio com pH ácido. A diminuição do pH, devido às bombas de H⁺ (próton) presentes nas membranas dos lisossomos, enfraquece as interações entre o propeptídeo e o sítio ativo, o que leva à exposição do sítio ativo. A maioria das cisteíno proteases lisossomais possui apenas atividade de endopeptidase, entretanto a catepsina B possui também atividade exopeptidase.

Com exceção da catepsina S, essas enzimas são expressas em uma grande variedade de células e estudos revelam que a função primária é degradar proteínas no interior do lisossomo, embora possam ser encontradas fora desta organela em condições patológicas do organismo (Turk, B. *et al.*, 2000).

1.3) Catepsinas B

As catepsinas B são as cisteíno proteases de mamíferos mais bem estudadas e encontram-se presentes na maioria das células e tecidos. Por serem enzimas lisossomais, atuam principalmente na degradação intracelular de proteínas. No entanto, podem agir extracelularmente quando liberadas em determinadas circunstâncias, degradando componentes da matriz extracelular

(Dickinson, 2002).

A catepsina B humana é sintetizada como uma preproenzima de 339 resíduos de aminoácidos. A remoção do peptídeo sinal gera a molécula da procatepsina B. A ativação da procatepsina B ocorre nos lisossomos, devido a clivagem e dissociação dos resíduos da pró região. Muitos resíduos da pró região estão em contato com a parte madura da enzima bloqueando o sítio ativo (Cygler *et al.*, 1996; Turk *et al.*, 1996). Esta interação é responsável pela força inibitória da região, devido a orientação contrária da pró região ao que é requerido para a hidrólise do substrato. Esse complexo é estável em pH neutro (Mach *et al.*, 1994), já em pH ácido (interior dos lisossomos) ocorre a ativação da proenzima.

A catepsina B apresenta características estruturais e funcionais que a distingue de catepsina L. A primeira delas é a presença de um segmento peptídico adicional na estrutura desta enzima denominado *loop* de oclusão (*occluding loop*) (Musil *et al.*, 1991) (Figura1.5). Este segmento de 20 resíduos está posicionado entre os resíduos 90 e 91 da papaína. Este *loop* bloqueia a porção C-terminal da fenda do sítio ativo por posicionar estrategicamente duas histidinas (His110 e His111) sobre a região dos subsítios S'.

O resíduo His110 forma com o resíduo Asp22 uma ponte salina que confere rigidez ao *loop*, e atribui-se a esta ligação a forte dependência ao pH da inibição exercida pelo propeptídeo (Musil *et al.*, 1991, Quraishi *et al.*, 1999). Estes dois resíduos de histidina são considerados importantes para a atividade exopeptidase da enzima e para o modo de ligação do substrato. Deleções de porções deste *loop* por mutagênese sítio-dirigida que resultam na perda das histidinas geram perda da atividade exopeptidase (Illy *et al.*, 1997).

A interação do *loop* de oclusão na catepsina B com o restante da molécula se dá por ligações deste em ambos os subsítios S e S' da enzima (Illy *et al.*, 1997). Esta interação bloqueia o acesso de inibidores reversíveis de cisteíno protease membros da família cistatina, tornando incompatível a inibição destas enzimas pela maioria destes inibidores. A inibição só é possível através de um mecanismo executado em duas etapas, onde é requerido o deslocamento do *loop* de oclusão antes da ligação à fenda do sítio ativo (Nycander *et al.*, 1998; Pavlova *et al.*, 2000). Conseqüentemente esta interação do *loop* acarreta a uma inibição menos efetiva contra catepsina B do que contra outros membros da família da papaína quando as cistatinas são utilizadas.

Outros dois resíduos presentes no *loop* de oclusão, as cisteínas 108 e 119, formam uma ponte dissulfeto que gera sua estrutura circular, fechada e rígida. Os segmentos Pro106-Pro107-Cys108 e Pro117-Pro118-Cys119 também conferem rigidez e estabilidade ao *loop*. Essa inflexibilidade exerce um importante papel na diminuição da atividade endopeptidase (Musil *et al.*, 1991).

Outra característica distinguível é a especificidade ao substrato, que na família da papaína é determinada principalmente pelo subsítio P2 (Coulombe *et al.*, 1996; Fujishima *et al.*, 1997), onde a catepsina L prefere resíduos aromáticos em P2 e a catepsina B prefere resíduos hidrofóbicos; além de aceitar o resíduo de arginina em P2 devido a presença de uma glutamina (Gln245) na posição S2. No entanto este resíduo não apresenta papel significativo na hidrólise de substratos contendo fenilalamina em P2 (Hasnain *et al.*, 1993; Jia *et al.*, 1995).



Figura 1.5: Estruturas tridimensionais das catepsinas L e B e da papaína. Pode-se observar na figura o *loop* de oclusão exclusivo da catepsina B. O resíduo de cisteína do sítio ativo é mostrado na representação *ball-and-stick*. Adaptado de Fujishima et al, 1997.

Têm sido propostos vários papéis para as catepsinas B tanto fisiológicos quanto patológicos. Estudos têm revelado que os níveis de mRNA e de proteína, como também a atividade das catepsinas B e L em linhagens de células cancerosas estão consideravelmente aumentados e correlacionados, e crescem progressivamente com a tumorigenicidade das linhagens celulares de carcinoma mamário humano (Zajc *et al.*, 2003; Zajc *et al.*, 2002). Tem sido sugerido que a maior produção e a liberação destas catepsinas em células tumorais resultam na invasão celular e metástase devido ao desequilíbrio entre a expressão e/ou atividade das catepsinas e seus respectivos inibidores endógenos, cuja atividade e concentração encontram-se significativamente reduzidas nas células cancerosas (Skrzydłowska *et al.*, 2005; Ervin e Cox, 2005; Shridhar *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005).

Outros estudos, utilizando inibidores exógenos de proteases, evidenciaram o envolvimento das catepsinas B e L com o potencial invasivo de várias linhagens

celulares tumorais de diferentes origens (Kolkhorst *et al.*, 1998; Colella *et al.*, 2004).

Em plantas, ainda há poucos relatos sobre trabalhos com cisteíno proteases do tipo catepsina B, sendo a grande maioria dos estudos com aquelas isoladas de animais.

O projeto genoma da cana-de-açúcar (SUCEST) gerou um banco de dados com aproximadamente 238.000 ESTs obtidas através do seqüenciamento de mais de 260.000 clones de cDNA. Estes clones fazem parte de 26 bibliotecas geradas a partir dos diferentes tecidos da cana (Vettore *et al.*, 2003).

Correa e colaboradores (2001) identificaram 76 *clusters* agrupados em 12 grupos que codificam para possíveis cisteíno proteases da cana-de-açúcar. Cinco *clusters* foram identificados como pertencentes ao grupo das catepsinas B, e um deles, cuja ORF (Fase Aberta de Leitura) está contida no clone SCSGAD1142H04.g, foi escolhido para este trabalho. Uma vez que nenhuma cisteíno protease de cana-de-açúcar foi anteriormente estudada e caracterizada, este trabalho é pioneiro e representa um passo inicial para estudos de novos membros de cisteíno proteases em plantas.

Dado a importância da cana-de-açúcar na agricultura brasileira, novos estudos sobre as classes de proteases, em nosso caso as cisteínicas, fornecerão informações sobre suas possíveis funções tanto para o desenvolvimento, crescimento e senescência da planta.

A cana-de-açúcar é o vegetal mais eficiente para a produção de etanol quando comparado ao milho, trigo ou beterraba, um combustível renovável que

reduz em 50% a emissão de monóxido de carbono dos motores de veículos. Em grandes centros urbanos essa queda na emissão tem conseqüências diretas na redução da poluição do ar.

A colheita de cana-de-açúcar da safra 2007/2008 no Centro-Sul do país resultou numa moagem que alcançou 375 milhões de toneladas de cana, com uma produção de 17,2 bilhões de litros de álcool e 23,7 milhões de toneladas de açúcar. (Disponível em: <www.unica.com.br>. Em dez. de 2007).

1.4) Inibidores de cisteíno proteases

Proteólises não controladas, acarretadas por proteases endógenas, podem prejudicar o funcionamento coordenado do organismo. As atividades de cada enzima devem ser cuidadosamente reguladas por inibidores específicos (Abrahamson, 1993). Para as cisteíno proteases existem os inibidores endógenos chamados cistatinas. O nome cistatina foi proposto primeiramente por Barrett (Barrett, 1981) e foi mais tarde usado para descrever proteínas homólogas em uma mesma superfamília (Barrett *et al.*, 1986). A primeira cistatina foi isolada de ovos de galinha (Anastasi *et al.*, 1983).

Esses inibidores podem ser agrupados em três tipos ou famílias de proteínas, definidos pela análise de semelhança em mamíferos. Além do alinhamento das seqüências de aminoácidos, tem-se utilizado outros critérios para agrupar as cistatinas, tais como: similaridade da seqüência primária, presença de pontes dissulfeto e a sua massa molecular (Rawlings & Barrett, 2000).

As cistatinas do tipo I, ou família estefina, são proteínas intracelulares

presentes no citosol de muitos tipos celulares, mas podem também estar presentes nos fluidos corpóreos (Abrahamson *et al.*, 1986). Elas são polipeptídeos de aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos, sem pontes dissulfeto, nem cadeias laterais de carboidratos, com massa molecular de aproximadamente 11 kDa; conservam um *loop* Gln-Val-Val-Ala-Gly na região central.

As cistatinas do tipo II, ou família cistatina são principalmente extracelulares, glicosiladas e/ou fosforiladas, com 120-122 resíduos de aminoácidos, com peptídeo sinal (necessário para a secreção da proteína para o espaço extracelular), apresentam duas pontes dissulfeto conservadas próximas ao seu C-terminal e massa molecular entre 13 e 24 kDa. Em sua maioria são encontradas nos líquidos corpóreos (Abrahamson *et al.*, 1986). Igualmente ao tipo I, estas proteínas contêm o segmento conservado Gln-X-Val-X-Gly, conhecido como “motivo cistatínico” na parte central da sua seqüência.

As cistatinas do tipo III, pertencentes à família dos cininogênios, são glicoproteínas que apresentam múltiplos domínios, maior massa molecular (60-120 kDa) e três repetições seguidas do “motivo cistatínico” o que permite serem inibidores competitivos de cisteíno proteases (Colman & Schmaier, 1997). Estas proteínas formam pontes dissulfeto, são moléculas glicosiladas e também secretadas (Turk e Bode, 1991).

Há três pontos de interação entre o inibidor e a protease. O primeiro está na extremidade do N-terminal com resíduos Gly9, o qual interage com os subsítios S ativos da enzima. Os outros dois estão no β -*hairpin loop* Gln-Val-Val-Ala-Gly e no segundo *loop* que contem os resíduos Pro-Trp interagindo com os subsítios S'.

Juntos, os três pontos formam um segmento hidrofóbico, o qual é

complementar ao sítio ativo na fissura de enzimas do tipo papaína (*papain-like*), com a conformação que não permitirá a clivagem da cadeia polipeptídica da cistatina (Bode *et al.*, 1998). As cistatinas são inibidores reversíveis, competindo com o substrato para ligação ao sítio de fissura ativo das enzimas alvos.

Nos últimos anos, o número de novas proteínas identificadas como cistatinas, como também as seqüências dos cDNAs e do genoma de clones de *cistatin-like*, tem aumentado consideravelmente, e vários novos membros têm sido caracterizados, não somente para vertebrados, mas também para insetos e plantas.

Em adição às três regiões de interação entre inibidor e protease, as cistatinas de plantas possuem uma seqüência consenso L-A-R-[FY]-A-[VI]-X(3)-N, utilizada para caracterizar a nova subfamília denominada fitocistatinas, que forma uma α -hélice conservada na porção N-terminal (Margis *et al.*, 1998).

As fitocistatinas são proteínas de baixa massa molecular entre 12 e 16 kDa. A ausência de pontes dissulfeto as aproxima de membros da família estefina. Assume-se que estas proteínas regulam as atividades de cisteíno proteases em resposta ao estresse biótico e abiótico durante o desenvolvimento e germinação das sementes, quando as reservas armazenadas são empregadas na embriogênese e crescimento da muda (Abe, K *et al.*, 1987; Callis, 1995). As primeiras cistatinas de origem vegetal a serem clonadas e caracterizadas foram a orizacistatina I (Abe *et al.*, 1987) e a orizacistatina II (Kondo *et al.*, 1990), ambas expressas em semente de arroz. Acredita-se que essas duas orizacistatinas estejam envolvidas na regulação da atividade proteolítica causada por diferentes proteases (Kondo *et al.*, 1990).

Em estudos desenvolvidos em nosso grupo com cana-de-açúcar foi descrita a primeira cistatina de cana, denominada Canacistatina. Este inibidor, produzido de forma recombinante (Soares-Costa *et al.*, 2002), mostrou-se eficiente na inibição de catepsinas humanas, assim como outras cisteíno proteases (Oliva *et al.*, 2004). Recentemente, três novas cistatinas de cana também foram descritas, denominadas CaneCPI-2 , CaneCPI-3 e CaneCPI -4. As três cistatinas recombinantes apresentaram atividade inibitória *in vitro* contra a catepsina L humana, enquanto somente a CaneCPI-4 foi capaz de inibir eficientemente a atividade da catepsina B humana. Além da capacidade de inibir a atividade destas catepsinas, CaneCPI-4 foi capaz de inibir também a invasão das células tumorais de mama (MDA-MB-231) em uma matriz de Matrigel® (Gianotti *et al.*, 2005, Gianotti *et al.*, 2008).

2) OBJETIVOS

O presente trabalho visa a caracterização da primeira cisteíno protease recombinante de cana-de-açúcar, de sua atividade enzimática e seu perfil inibitório frente às cistatinas de cana-de-açúcar obtidas em nosso laboratório de forma recombinante. Assim os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Análise *in silico* de uma cisteíno protease de cana-de-açúcar;
- Isolamento e caracterização do clone que codifica a cisteíno protease tipo catepsina B da cana-de-açúcar;
- Clonagem da ORF contida neste clone em plasmídeo de expressão pET-28a;
- Expressão recombinante em *Escherichia coli* da cisteíno protease da cana-de-açúcar e subsequente purificação da proteína;
- Produção de anticorpos policlonais contra esta proteína recombinante e ensaios de *Western blotting*, utilizando a proteína purificada e extratos protéicos de diferentes partes da cana-de-açúcar;
- Realização de ensaios de atividade enzimática da proteína recombinante;
- Realização de ensaios de inibição enzimática utilizando-se inibidores recombinantes de cisteíno proteases (cistatinas) provenientes da cana-de-açúcar e específicos para cisteíno protease (E64 e CA074).

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Análises *in silico* da seqüência da cisteíno protease

Segundo Correa e colaboradores (2001), as possíveis cisteíno proteases de cana-de-açúcar foram divididas em 12 grupos. Um dos grupos pertence à classe de cisteíno proteases do tipo catepsina B. Baseado nestas informações o clone SCSGAD1142H04.g foi escolhido para a realização deste estudo. Este clone foi obtido a partir do banco de ESTs do SUCEST gerado a partir do projeto genoma da cana-de-açúcar.

O clone foi reseqüenciado em nosso laboratório segundo a técnica desenvolvida por Sanger et al. (1977), utilizando o Kit ET-Dye terminator (GE - Health care) em seqüenciador automático MegaBace 500 (GE).

A presença de um possível peptídeo sinal foi determinada utilizando os programas SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (Nielsen e Krogh, 1998) e PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/form.html>) (Nakai e Horton, 1999).

Para a análise da seqüência do clone foram utilizados os softwares Multalin (Corpet, 1988) (<http://probes.toulouse.inra.fr/multalin.html>), T-coffee (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/t-coffee/index.html>) e BLAST – (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) (Altschul *et al.*, 1997).

Vários alinhamentos foram feitos entre a seqüência protéica da cisteíno protease da cana, diferentes catepsinas lisossomais e catepsinas B de plantas, cujo o objetivo era de avaliar as identidades encontradas e propor a origem da protease da cana, ou seja, sua família.

3.2) Amplificação da ORF (fase aberta de leitura) que codifica a cisteína protease tipo Catepsina B da cana-de-açúcar

O DNA plasmidial do clone SCSGAD1142H04.g foi obtido através do método de lise alcalina como descrito em Sambrook *et al.*, 1989. A ORF, de 987 pb, foi amplificada utilizando oligonucleotídeos específicos, construídos baseados na seqüência do cluster obtida no site da SUCEST-FAPESP e nas seqüências por nós realizadas. As seqüências dos oligonucleotídeos são as seguintes: AD1142_F: 5'-CATATGTCAGGTAGTTGGAGTTGGGGT-3' e AD1142_R: 5'-GCGGCCGCAACTACAGCTGTTCCAACGGCACC-3', nos quais foram inseridos sítios para as enzimas de restrição (destacados em itálico na seqüência) *Nde* I (CATATG) e *Not* I (GCGGCCGC), respectivamente, para posterior subclonagem direcional no vetor de expressão.

Para cada PCR, com volume final de 50 μ L, foram utilizados 20 ng do plasmídeo molde, 200 μ M de dNTPs (Promega), tampão de reação 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM), 20 pmoles de cada oligonucleotídeo e 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). O termociclador, modelo PTC-100 MJ Research Thermocycler, foi utilizado para a amplificação com o programa: 94 °C - 3 min, seguido por 35 ciclos de amplificação de 94 °C – 45 segundos (desnaturação), 63 °C – 30 segundos (hibridização) e 72 °C – 1 min (extensão), finalizando com uma extensão final de 10 min a 72 °C. Para a visualização dos produtos da amplificação foi utilizado gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo (1 μ g/mL), submetido à luz UV.

3.3) Construção do plasmídeo de expressão.

Os fragmentos amplificados foram purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega) e ligados no vetor de propagação pTZ57R (Fermentas). Para a ligação foi utilizado o Kit “Ins T/A clone PCR Product Cloning” (Fermentas). Os produtos da ligação (pTZ57R + fragmento) foram utilizados para transformar, pelo método de choque térmico, células competentes da cepa de propagação *E. coli* DH5 α preparadas por tratamento com CaCl₂ (Sambrook *et al.*, 1989). Os clones recombinantes (colônias brancas) foram selecionados através de PCR de colônia, utilizando para isto os oligonucleotídeos específicos para o gene amplificado, com o protocolo de PCR e programa de amplificação utilizados para a obtenção dos fragmentos. Os clones selecionados pela PCR de colônia foram extraídos pelo método lise alcalina para que fossem, então, seqüenciados utilizando oligonucleotídeos cujas seqüências flanqueiam o gene, e alinhados com a seqüência da cisteíno protease em estudo.

Posteriormente, os DNAs plasmidiais foram clivados com as enzimas de restrição *Nde* I e *Not* I para recuperação do fragmento correspondente à ORF da cisteíno protease. Nas reações de clivagem foram digeridos 2 μ g de DNA, utilizando-se tampão de reação 1x e 1U de cada uma das enzimas. As reações de clivagem foram mantidas a 37 °C durante 3 horas. Assim, o fragmento contendo extremidades coesivas seria subclonado de forma direcional no vetor de expressão pET28a (Novagen) (Figura 3.1) previamente clivado com as mesmas enzimas. Após análise em gel de agarose 1%, os fragmentos correspondentes à cisteíno protease e ao vetor pET28a clivados foram recuperados do gel de agarose e

purificados com kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega).

O gene da cisteíno protease e o vetor pET28a foram utilizados nas reações de ligação contendo em volume final de 10 μ L, 70 ng do vetor e 130 ng do fragmento, 1 U da enzima T4 DNA ligase e tampão da enzima 1x. As reações foram mantidas a 4 °C durante 16 h. O fragmento foi ligado em fase com duas seqüências codificadoras de seis histidinas, uma na região N-terminal e outra na C-terminal, ao vetor de expressão pET28a. Os produtos da ligação (pET28a + fragmento) foram utilizados para transformar, por choque térmico, células de *E. coli* DH5- α competentes.

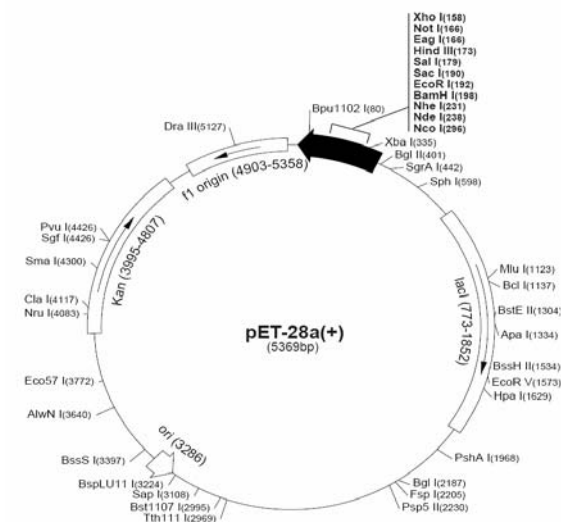


Figura 3.1: Mapa do vetor de expressão pET28a (Novagen).

Os plasmídeos recombinantes, ou seja, plasmídeos que continham os genes da cisteíno protease inseridos, foram identificados e selecionados pela técnica de PCR de colônia; e posteriormente seqüenciados.

3.4) Expressão e purificação da cisteína protease recombinante.

Para expressão da proteína, o plasmídeo recombinante, denominado pET28SC-CPB, foi utilizado para transformar células de *E. coli* Rosetta (DE3), que possuem genes para tRNAs raros para os códons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC e GGA.

De um clone isolado foi feito um pré-inóculo de 5 mL em meio LB líquido contendo 25 µg/mL dos antibióticos canamicina e cloranfenicol, o qual foi mantido sob agitação de 200 rpm a 37 °C por 16 h. Após este período foi realizada uma diluição 1:100 em 500 mL de meio LB líquido contendo 25 µg/mL de canamicina e cloranfenicol, também mantido sob agitação constante de 200 rpm a 37 °C até que fosse atingida uma densidade óptica de aproximadamente 0,5 a um comprimento de onda de 600 nm. A temperatura, então, foi reduzida para 20 °C mantendo-se a agitação de 200 rpm. Após 1 h a agitação foi reduzida para 150 rpm, e adicionado o IPTG a uma concentração final de 0,2 mM.

Após 16 h de indução, a cultura foi centrifugada a 6.000 g a 4 °C por 5 min na Sorvall RC5C plus e, desta forma, formou-se um precipitado de células bacterianas. Este precipitado foi ressuspendido em tampão de lise pH 8,0 (NaCl 100 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, Tris 10 mM) e submetido à lise celular por meio de sonicação com 11 pulsos de 1 min à potência de 20%, com intervalos de 30 s, utilizando-se o sonicador Sonic Dismembrator 500 (Fisher Scientific). O lisado foi centrifugado a 13.000 rpm, a 4 °C por 15 min para separação das frações solúvel e insolúvel.

O precipitado (fração insolúvel) foi novamente ressuspendido em tampão de

lise adicionando 0,5 M de uréia durante 3h em gelo; e em seguida centrifugado 13.000 rpm, a 4°C por 15 min. A fração solúvel obtida da centrifugação foi esterilizada em filtro Millex® GV de 0,22 µm / 25 mm (Millipore) e purificada por cromatografia de afinidade em resina de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen), conforme descrito por Soares-Costa e colaboradores (2002).

A resina foi previamente equilibrada com 5 volumes de tampão de lise contendo 0,5 M uréia. Para que fosse permitida a eluição da proteína recombinante é necessário que passe pela resina um tampão que irá competir com as histidinas pela ligação ao metal. Assim passou-se 2 volumes de tampão de lise contendo 0,5 M uréia para cada concentração crescente de imidazol (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM), que apresenta também forte afinidade pelo níquel. Coletadas, as frações eluídas foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

Após análise, as frações contendo a proteína pura foram dialisadas utilizando membranas (Pierce) de 14000 MW em tampão 100 mM acetato de sódio pH 5,0 a 4°C durante 3h, renovando o tampão a cada 1h. As concentrações das frações dialisadas foram determinadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) usando o reagente *Bio Rad Protein Assay* (Bio-Rad) e a albumina sérica bovina como padrão.

3.5) Produção de anticorpos policlonais contra a cisteína protease recombinante e ensaio de *Western blot*.

A produção de anticorpos policlonais (antisoro) contra a proteína recombinante foi feita em camundongos seguindo protocolo padrão de imunização

(Sambrook *et al.*, 1989). Uma mistura de 50 µg de cisteíno protease recombinante com igual volume de adjuvante completo de Freund (Sigma) foi injetada em quatro camundongos, resultando assim na primeira imunização. Após 45 dias foi aplicada a segunda imunização, uma mistura de 50 µg de cisteíno protease recombinante com igual volume de adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Depois de dez dias os animais foram sacrificados, o sangue foi coletado, centrifugado a 13.000 rpm por 5 min, separando o soro posteriormente utilizado nos ensaios de *Western blot*.

Para os ensaios de *Western blot* as amostras foram primeiramente separadas em SDS–PAGE 15%, sendo, então, transferidas para uma membrana de PVDF [poli(fluoreto de vinilideno)] (Bio-Rad) em tampão de transferência (tris 200 mM, glicina 50 mM, metanol 20%) durante 1 h e 30 min a 150 V e 150 mA. Finalizada a transferência, as membranas foram coradas por 3 min em solução de Ponceau (Merck) (Ponceau 0,5%, ácido acético 0,1%) para que as bandas pudessem ser visualizadas e marcadas com agulha.

Para bloqueio das membranas foi utilizada solução de leite em pó desnatado (Molico) 5% diluído em TBS 1x (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM) a 4°C por 16 h. Finalizado o bloqueio, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS (5 min cada) sob agitação, e incubadas por 1 h e 30 minutos com o anticorpo primário (proveniente do soro dos camundongos imunizados) diluído 1:30.000 em TBS, sob agitação lenta à temperatura ambiente. Novamente membranas foram lavadas como descrito anteriormente, e incubadas com o anticorpo secundário Anti-Mouse IgG (conjugado à fosfatase alcalina – Sigma) diluído 1:10.000 em TBS por 1 h e 30 minutos sob agitação lenta à temperatura ambiente. Para finalizar o experimento as

membranas foram lavadas e as bandas de proteínas reconhecidas pelos anticorpos foram reveladas com o kit *AP Conjugate Substrate* (BioRad).

Para a detecção da cisteína protease endógena da cana-de-açúcar, foi utilizada a variedade RB 85536 cedida pela Embrapa Pecuária Sudeste. Diferentes tecidos da planta (bainha, colmo, folha, gema lateral, meristema apical e rizoma) foram homogeneizados em nitrogênio líquido. Cada 1g de tecido foi ressuspenso em 2 mL de tampão de extração pH8,0 (Tris 0,2 M, Na₂HPO₄ 32 mM, ácido cítrico 84 mM, β-mercaptoetanol 0,1%) adicionado PVPP 0,02 g a cada 1 mL de tampão, agitando durante 1h e 30 m. Em seguida foi adicionado sulfato de amônio a uma concentração final de 80%, mantido sob agitação durante 30 minutos; sendo, então, centrifugado a 10.000g durante 15 minutos. O precipitado formado foi então ressuspenso em tampão de extração, e a solução foi dialisada em Tris 0,01M e NaCl 0,05 M (Rosenberg, 2005). As amostras de proteínas foram utilizadas em ensaios de *Western blot* como descrito acima. A diluição do anticorpo utilizada para este ensaio foi 1: 7500, diluído em TBS 1x (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM).

3.6) Zimografia reversa

A atividade da cisteína protease foi detectada pelo método de coloração negativa. Neste método a atividade das enzimas é detectada pela não coloração do gel nas regiões onde tenha ocorrido a clivagem hidrolítica das ligações peptídicas da gelatina. Assim, três diferentes amostras foram aplicadas no gel, sendo a papaína (0,5 µg) usada como controle positivo, cisteína protease recombinante (25 µg) não incubada com E64 e incubada com E64 (32 µM), esta última usada para controle negativo. Estas amostras foram preparadas em

condições não redutoras e separadas em gel SDS-PAGE 15 % contendo 0,04 % de gelatina, de acordo com Schlereth e colaboradores (2000).

Imediatamente após a corrida da eletroforese a 4 °C, o gel foi incubado por 1 h a temperatura ambiente com solução 2,5 % triton X-100 para remoção do SDS. Em seguida, o gel foi incubado por 20 h a 37 °C com 0,02 M Na₂HPO₄, 0,1 M ácido cítrico pH 5,0 contendo 2 mM de DTT para ativação da protease. Após a incubação, a atividade da enzima e sua inibição por E64 foram visualizadas pela coloração com solução de "Coomassie blue" R-250.

3.7) Ensaios de atividade enzimática e de inibição da cisteíno protease

Os ensaios foram realizados no espectrofluorímetro Hitachi F-2500, utilizando substratos com esquema geral Z-XR-MCA (Z = carbobenzoxicarbonil; X = Phe ou Leu; R= Arg; MCA = 7-amino-4-metilcoumarina) (Calbiochem). As fluorescências são medidas devido à hidrólise do substrato, onde são liberadas as moléculas de MCA, que ao serem excitadas no comprimento de onda de 380 nm, emite uma fluorescência no comprimento de onda de 460 nm que é detectada pelo fluorímetro.

Todos os ensaios foram realizados utilizando o tampão acetato de sódio 100 mM, EDTA 2,5 mM, DTT 2,5 mM pH 5,2, e a cisteíno protease a uma concentração de 40,7 µM, pré-ativada a 25 °C em tampão acetato de sódio 100 mM, o mesmo tampão da diálise, diminuindo o pH do tubo contendo a enzima de 5,0 para 4,5. Em uma cubeta de quartzo de 500 µL, a enzima já ativada foi encubada com 2,5 mM de DTT durante 2 minutos a 30 °C. O DTT é utilizado como agente redutor do

resíduo de cisteína presente no sítio ativo das cisteíno proteases. A influência da temperatura sobre a atividade da enzima é geralmente representada em termos de velocidade de reação em função da temperatura; a maioria das reações químicas se processo numa velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. Após esta incubação foram feitas seis leituras a cada 150 segundos para cada substrato, sendo Z-FR-MCA utilizado a uma concentração de 0,0032 μM e Z-LR-MCA a 0,188 μM . Para cada leitura foram adicionados 1 μL e 2 μL dos substratos mencionados, respectivamente. O aumento da fluorescência, devido à hidrólise dos substratos pelo tempo, foi monitorado continuamente a $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ no espectrofluorímetro Hitachi F-2500. Após as leituras, os valores obtidos de fluorescência foram utilizados para calcular o K_m de cada substrato usando o programa GraFit (Leatherbarrow, 1992).

Na cinética enzimática, o valor de K_m (constante de Michaelis) indica a “afinidade” da enzima pelo seu substrato. O substrato com valor de K_m menor tem uma afinidade aparente melhor para a enzima. Esta constante é numericamente igual à concentração de produto com a qual se obtém uma velocidade inicial igual a metade da velocidade máxima.

Para se avaliar o pH ótimo no qual a cisteíno protease apresentar maior atividade foram utilizados tampões acetato de sódio 100 mM com diferentes valores de pH (3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0).

Para avaliar o comportamento da atividade catalítica da cisteíno protease frente a diferentes concentrações de sal, foram feitos ensaios utilizando-se tampões acetato de sódio 100 mM com diferentes concentrações de NaCl (0; 50; 100; 200; 300; 400; 500 mM).

Para os ensaios de inibição, os inibidores utilizados foram CaneCPI-1 e CaneCPI-4, que são cistatinas recombinantes da cana-de-açúcar produzidas em nosso laboratório pelas doutoras Andrea Soares Costa Fuentes e Andréia Gianotti. Outros dois inibidores, E64 (inibidor de cisteíno proteases em geral) e CA074 (inibidor de catepsina B) (Calbiochen), foram utilizados com o objetivo de afirmar a enzima como um cisteíno protease tipo catepsina B.

Primeiramente foi medida a atividade da cisteíno protease sem a adição de nenhum inibidor, utilizando-se para isto o tampão acetato de sódio 100 mM, EDTA 2,5 mM, DTT 2,5 mM pH 5,2 e a cisteíno protease a uma concentração de 40,7 μM ativada como descrito anteriormente. A atividade da enzima na ausência dos inibidores foi considerada como sendo 100%. Sob as mesmas condições, foram adicionadas concentrações crescentes de inibidor na cubeta, 1 μL a cada 150 seg, medindo a fluorescência a cada adição.

As concentrações de inibidores utilizadas foram: 1,338 μM de CaneCPI-1; 8,8 nM de CaneCPI-4; 0,55 μM de E64 e 6,5 nM de CA074.

Os valores das constantes de inibição (K_i) das diferentes cistatinas, como também do E64 e CA074, contra a enzima são calculados segundo o procedimento de Morrison (Knight, 1986) usando o programa GraFit (Leatherbarrow, 1992).

4) RESULTADOS

4.1) Análise *in silico* da seqüência da cisteíno protease.

A seqüência completa do clone SCSGAD1142H04.g obtida em nosso laboratório foi alinhada com a seqüência do cluster depositada no banco de dados do SUCEST. Na análise pode-se observar a identidade entre as seqüências nucleotídicas (dado não mostrado). Este clone foi identificado em uma biblioteca de cDNAs gerada a partir de plantas infectadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicans*. A fase aberta de leitura contida no clone é de 987 nucleotídeos e massa molecular predita da proteína é de 36,2 KDa.

A classificação da enzima no MEROPS “The Peptidase Database” a revelou como pertence ao Clan CA e Família C1 de cisteíno proteases.

Esta ORF codifica uma cisteíno protease provavelmente secretada, uma vez que a análise realizada utilizando os programas PSORT e SignalP indicaram a provável presença e localização de uma seqüência característica de peptídeo sinal na região N-terminal.

O programa PSORT revelou um possível sítio de clivagem no resíduo 24 (prolina) da seqüência protéica da cisteíno protease, como também o gráfico gerado com o programa SignalP revelou a presença de uma região N-terminal altamente hidrofóbica, a qual apresenta as características de um peptídeo sinal (Figura 4.1). Assim, analisando os resultados de ambos os programas, os oligonucleotídeos foram desenhados a partir do resíduo 25 (glutamina) excluindo, então, a região do provável peptídeo sinal.

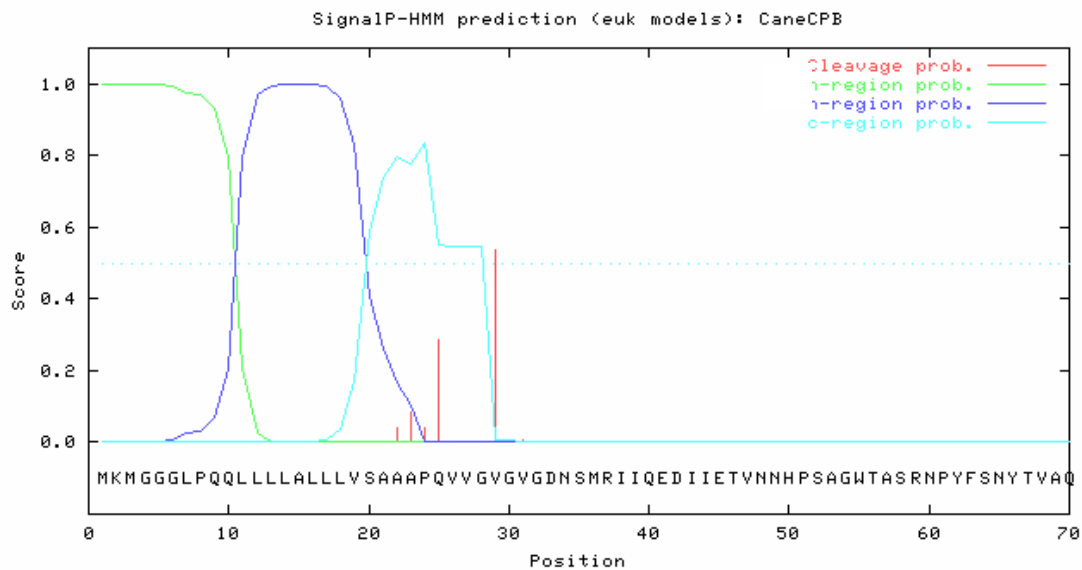


Figura 4.1: Peptídeo sinal identificado na seqüência da cisteíno protease. O gráfico gerado com o programa SignalP mostra a presença de uma seqüência com características de peptídeo sinal na cisteíno protease. Os prováveis sítios de clivagem do peptídeo sinal são mostrados em vermelho; as regiões N-terminal e C-terminal do peptídeo sinal são mostradas em verde e azul claro, respectivamente, e a região central altamente hidrofóbica, em azul escuro.

A figura 4.2 refere-se à seqüência nucleotídica e protéica da cisteíno protease, notar a presença de um códon de terminação antecedendo o primeiro aminoácido, uma metionina, da preproenzima, e posterior ao códon de terminação da seqüência protéica, pertencente à região UTR 3'.

A figura 4.3 mostra o alinhamento entre a seqüência da proteína da cana CaneCPB e as catepsinas humanas B (AAH95408.1), L (NP_001903.1), S (NP_004070.3), V (BAA25909.1) e W (NP_001326.2) feito no programa MultalinT-Coffee. Na figura podemos observar os domínios conservados em cinza e preto entre as seqüências. As porcentagens de identidade entre cada catepsina humana e a proteína da cana estão mostradas na tabela 1 e foram obtidas no programa T-Coffee.

A figura 4.4 mostra o alinhamento feito no programa Multalin entre as seqüências das proteínas CaneCPB e catepsinas B de *Oriza sativa* (AAX11351.1), *Hordeum vulgare* (CAC83720.1) e *Tritium aestivum* (CAA46811.1). As porcentagens de identidade entre cada catepsina B e a proteína da cana estão mostradas na tabela 2 e foram obtidas no programa T-Coffee.

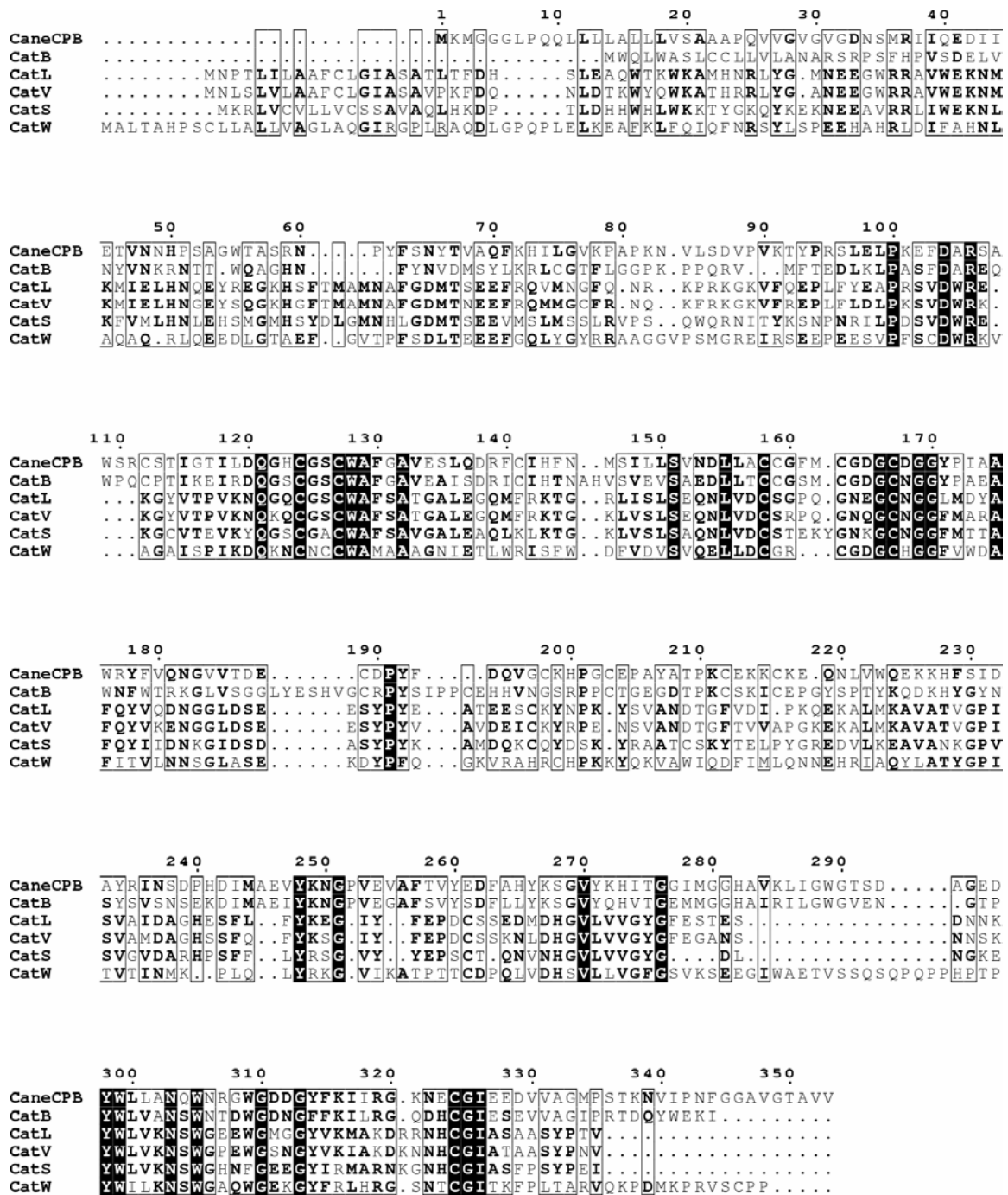


Figura 4.3: Alinhamento entre a seqüência protéica da CaneCPB e de diferentes catepsinas humanas. As caixas em preto correspondem a 100% de identidade de aminoácidos; as caixas vazias correspondem a identidades entre algumas seqüências, onde os resíduos em negrito apresentam mesma classificação ou são conservados. A região do *loop* de oclusão da catepsina B está entre as posições 191 a 212.

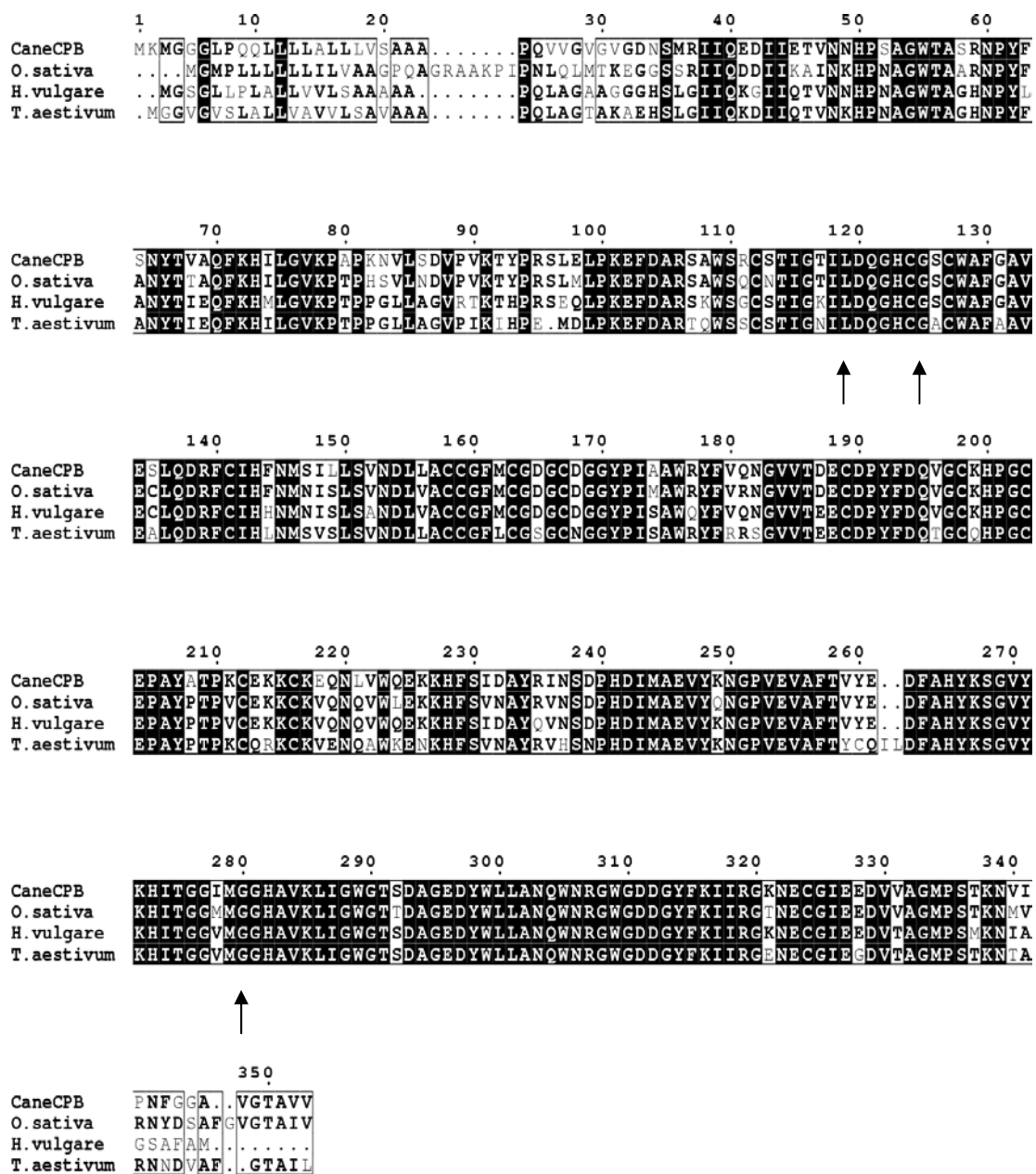


Figura 4.4: Alinhamento entre CaneCPB e catepsinas B de *Oriza sativa*, *Hordeum vulgare* e *Tritium aestivum*. As caixas em preto correspondem a 100% de identidade de aminoácidos; as caixas vazias correspondem a identidades entre as seqüências onde os resíduos em negrito apresentam mesma classificação ou são conservados. As regiões do *loop* de oclusão estão dispostas entre os aminoácidos nas posições 191 a 212, notar a presença de um resíduo de histidina em cada seqüência. As setas indicam os aminoácidos dos sítios ativos conservados.

Tabela 1: Porcentagens de identidade entre as seqüências protéicas das catepsinas humanas e a cisteíno protease da cana-de-açúcar.

| Protease | % |
|--------------------|-----------|
| Catepsina B | 76 |
| Catepsina L | 61 |
| Catepsina V | 68 |
| Catepsina S | 64 |
| Catepsina W | 59 |

Tabela 2: Porcentagens de identidade entre as seqüências protéicas das catepsinas B de plantas e da cisteíno protease da cana-de-açúcar

| Protease | % |
|---------------------------|-----------|
| <i>O. sativa</i> | 88 |
| <i>H. vulgare</i> | 86 |
| <i>T. aestivum</i> | 83 |

4.2) Amplificação da ORF da cisteíno protease

A amplificação da ORF que codifica a protease foi feita a partir do clone SCSGAD1142H04.g com os oligonucleotídeos anteriormente mencionados. Na Figura 4.5 pode ser observada uma banda de 987 pb em gel de agarose 1% correspondente a respectiva ORF.

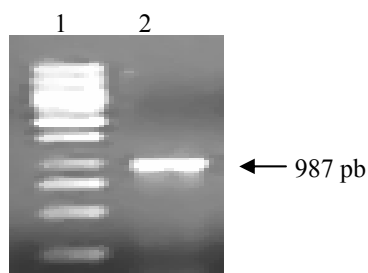


Figura 4.5: Amplificação da ORF da cisteíno protease. O produto de amplificação foi analisado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. A figura mostra em 1 o marcador de 1Kb (invitrogen) e em 2 a banda da ORF amplificada com tamanho esperado de 987 pb.

4.3) Expressão e purificação da proteína recombinante

Após a subclonagem do fragmento correspondente a ORF da cisteíno protease no vetor pET28a, foi feita a transformação da construção (pET28SC-CPB) em cepa *E. coli* Rosetta (DE3).

Para verificar o perfil da expressão do clone bacteriano recombinante, alíquotas das amostras sem induzir e induzida e as frações solúvel e insolúvel, obtidas após sonicação, foram aplicadas em SDS PAGE 15%. Como observado na Figura 4.6, houve expressão da cisteíno protease recombinante com tamanho de banda tamanho esperado de 39 kDa (protease + duas His-tag + alguns aminoácidos proveniente do vetor pET28a), sendo que a maior parte da cisteíno protease encontra-se na fase insolúvel. A fração insolúvel foi utilizada para a

purificação por cromatografia de afinidade em coluna contendo resina de níquel. A proteína foi eluída, em maior concentração em tampão de lise contendo 100 mM de imidazol. A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) obtendo-se um rendimento de 2,5 mg de proteína, doravante denominada *HIS*CaneCPB, por litro de cultura.

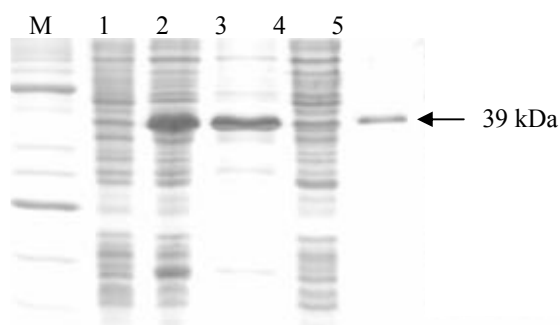


Figura 4.6: Expressão heteróloga e purificação da cisteíno protease. Análise em SDS-PAGE 15% das amostras coletadas da cultura. **M:** marcador de massa molecular (Invitrogen), **1:** fração não induzida, **2:** fração induzida, **3:** fração insolúvel, **4:** fração solúvel e **5:** fração purificada em coluna de níquel.

4.4) Detecção da cisteíno protease recombinante e endógena da cana-de-açúcar por anticorpos policlonais

Através da técnica de *Western blot* foi realizado ensaios de detecção da cisteíno protease utilizando anticorpos policlonais produzidos em camundongos. Nas membranas seriam reveladas somente regiões onde o anticorpo secundário anti-mouse IgG, conjugado a fosfatase alcalina, estivesse associado ao anticorpo primário (específico para a cisteíno protease). O primeiro ensaio foi realizado contra amostras da bactéria recombinante expressando o pET28SC-CPB. Como controles foram utilizadas células transformadas apenas com o pET28a e sem

nenhum plasmídeo, que não foram reconhecidas pelo anticorpo. A figura 4.7A mostra SDS-PAGE 15% com os padrões de banda obtido das expressões acima detalhadas; a figura 4.7B mostra o resultado do Western Blotting correspondente ao mesmo gel. O segundo ensaio foi realizado contra amostras de diferentes tecidos de plantas de cana-de-açúcar.

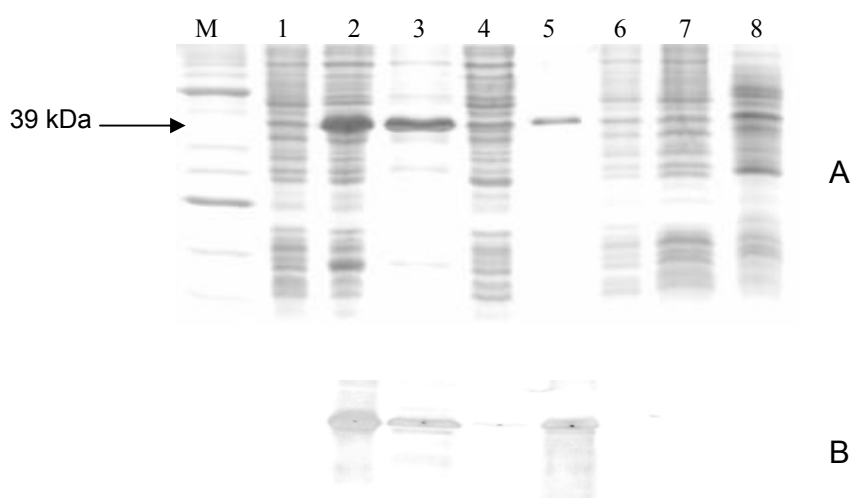


Figura 4.7: Imunodeteção da cisteíno protease recombinante. A figura **A** mostra SDS-PAGE 15% corado com comassie blue mostrando os padrões de banda nas diferentes amostras de indução. **M**: marcador de massa molecular, **1**: cultura não induzida; **2**: cultura induzida; **3**: fração insolúvel; **4**: fração solúvel; **5**: fração purificada; **6**: cultura não induzida com vetor pET28a sem a ORF da cisteíno protease; **7**: cultura induzida com vetor pET28a sem a ORF da cisteíno protease; **8**: cultura induzida sem a presença do vetor pET28a. A figura **B** mostra resultado de Western Blotting com as bandas referentes às cisteíno proteases detectadas nas respectivas amostras detalhadas no gel.

A figura 4.8A mostra SDS-PAGE 15% contendo amostras de proteínas extraídas de diferentes tecidos da cana. A figura 4.8B mostra o Western Blotting correspondente ao mesmo gel.

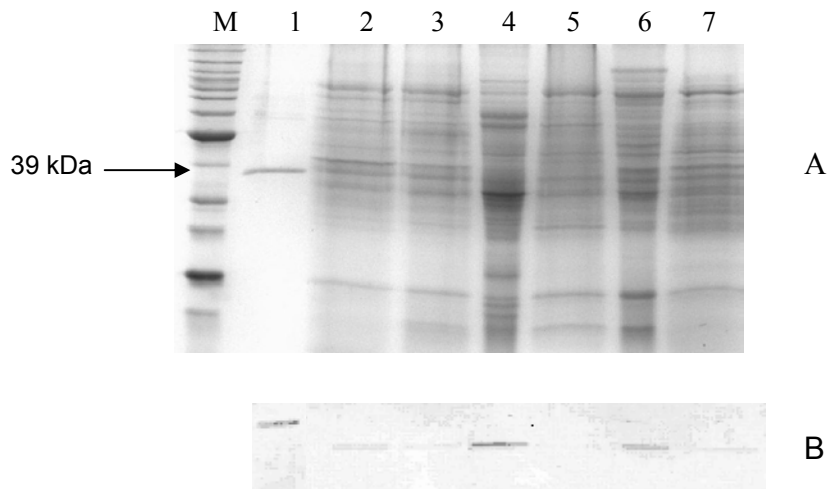


Figura 4.8: Imunodeteccção da cisteíno protease recombinante na fração purificada e nos diferentes extratos da cana. A figura **A** mostra SDS-PAGE 15% corado com comassie blue mostrando os padrões de bandas nas amostras dos extratos de diferentes tecidos. **M**: marcador de massa molecular, **1**: fração purificada; **2**: rizoma; **3**: meristema apical; **4**: gema lateral; **5**: folha; **6**: colmo; **7**: bainha. A figura **B** mostra resultado de Western Blotting com as bandas referentes às cisteíno proteases endógenas detectadas nas respectivas amostras detalhadas no gel.

As análises das imunodeteccções revelaram que o anticorpo anti-*HIS*CaneCPB foi capaz de detectar a proteína de massa molecular esperada para a cisteíno protease tanto nas bactérias recombinantes quanto em extratos protéicos da cana-de-açúcar. A diferença de tamanho entre a banda da proteína recombinante e dos tecidos é devido às “caudas” de histidinas fusionadas nas extremidades da enzima e da presença de alguns aminoácidos provenientes do vetor, que resultou num aumento de tamanho em torno de 3,4 kDa.

4.5) Detecção da atividade da cisteíno protease recombinante em gel de gelatina (zimografia reversa)

A eletroforese do SDS-PAGE contendo 0,04% de gelatina foi realizada a 4°C, e após seu tratamento com as soluções detalhadas em materiais e métodos, a atividade da enzima e sua inibição por E64 foram visualizadas pela coloração das proteínas com solução de "Coomassie blue" R-250. A figura mostra as atividades das enzimas (papaína e cisteíno protease da cana) visualizadas por bandas não marcadas em um fundo escuro, representando as áreas de proteólise do substrato (gelatina), e a inibição da proteólise, devido à presença de E64 (concentração final de 32 µM) na amostra da cisteíno protease, detectada pela coloração do gel. Na figura 4.9 podemos ver a detecção da atividade da cisteíno protease como também sua inibição por E64.

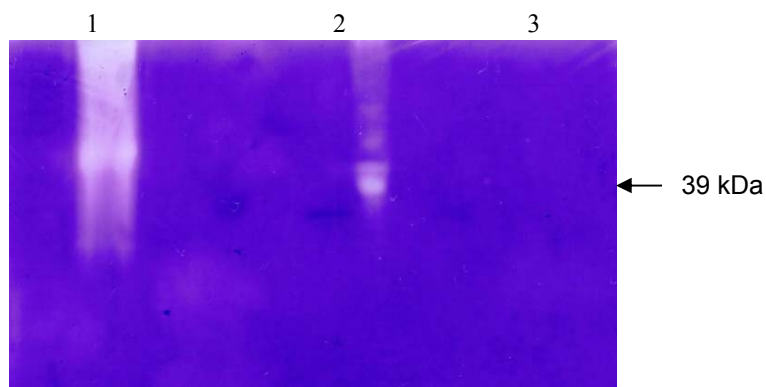


Figura 4.9: Detecção da atividade da enzima em SDS-PAGE 15% contendo gelatina 0,04%. Em 1: papaína (como controle positivo), 2: enzima *HIS*CaneCPB e 3:enzima *HIS*CaneCPB previamente incubada com E64.

4.6) Ensaios de atividade enzimática da CaneCPB

A atividade enzimática da cisteíno protease recombinante foi avaliada utilizando-se dois substratos peptídicos fluorescentes. A enzima hidrolisou ambos os substratos apresentando diferença na eficiência de hidrólise de cada um. Os valores de K_m para a hidrólise de cada substrato pode ser visto na tabela 3.

O substrato contendo o resíduo fenilalanina em P2 foi hidrolisado mais eficientemente quando comparado ao substrato com resíduo leucina em P2. Este resultado corrobora com trabalhos que mostram a preferência de cisteíno proteases da família da papaína por resíduos hidrofóbicos.

Tabela 3: Valores de K_m obtidos na hidrólise dos substratos fluorogênicos pela CaneCPB.

| Substrato | K_m |
|------------------|-------------------------------|
| Z-FR-MCA | 3,68 nM |
| Z-LR-MCA | 1,29 μM |

Os efeitos do pH e NaCl para a atividade da enzima podem ser observados respectivamente nas figuras 4.10 e 4.11. A cisteíno protease apresentou melhor atividade em pH 5,0 e sua eficiência para a hidrólise do substrato decai conforme há um aumento nas concentrações de NaCl.

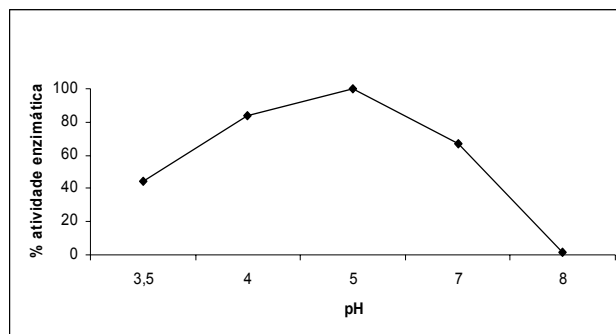


Figura 4.10: Perfil de atividade enzimática da proteína frente a diferentes condições de pH.

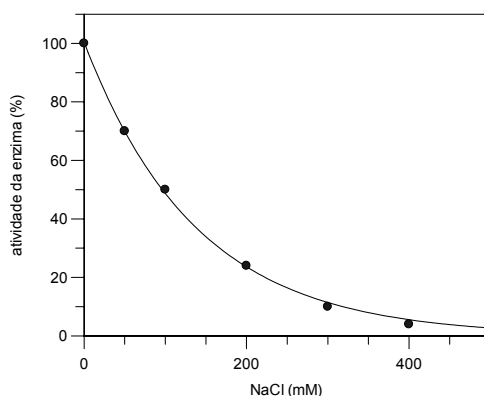


Figura 4.11: Perfil de atividade enzimática da proteína frente a concentrações crescentes de NaCl.

4.7) Inibição da cisteína protease recombinante por cistatinas recombinantes da cana-de-açúcar

A atividade inibitória das cistatinas recombinantes contra a cisteína protease foi medida em um espectrofluorímetro, utilizando-se o substrato fluorogênico Z-FR-MCA. Os resultados dos ensaios de inibição estão expostos na figura 4.12. Os resultados revelam diferentes atividades inibitórias das cistatinas contra a enzima quando observamos os valores das constantes de inibição (K_i) para cada inibidor.

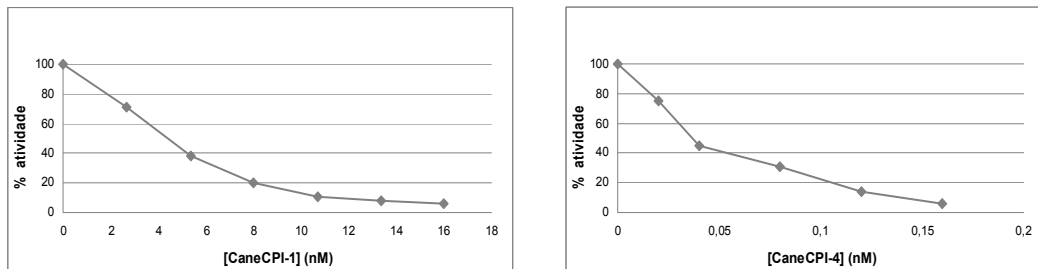


Figura 4.12: Inibição da CaneCPB pelas cistatinas recombinantes. A atividade inibitória das cistatinas contra a protease da cana foi medida em um espectrofluorímetro utilizando-se substrato fluorogênico Z-FR-MCA. A atividade residual da enzima foi expressa em porcentagem em relação ao controle (sem inibidor).

A constante de inibição nos mostra qual é a concentração de inibidor que determina uma diminuição em 50% da velocidade de hidrólise do substrato pela enzima; sendo o inibidor considerado potente se o K_i for menor ou igual à concentração total de enzima utilizada no ensaio de inibição (Copeland, 2005).

Na tabela 3 encontramos os valores de K_i app obtidos na inibição da cisteíno protease pelas cistatinas da cana-de-açúcar.

Tabela 4: Constantes de inibição (K_i) das cistatinas CaneCPI-1 e CaneCPI-4 contra a CaneCPB. As constantes de inibição foram calculadas segundo o procedimento de Morrison, utilizando o programa GraFit.

| Cistatinas | Valores de K_i app para Cisteíno Protease |
|------------|---|
| CaneCPI-1 | 0,7 nM |
| CaneCPI-4 | 0,010 nM |

Considerando os valores de K_i app encontrados para a inibição da cisteíno protease da cana pelas cistatinas recombinantes, bem como a concentração final da enzima na cubeta utilizada nos ensaios (81,4 nM), pode-se concluir que as

cistatinas apresentam alto poder inibitório contra a cisteíno protease da cana, sendo a CaneCPI-4 apresentando um valor de K_i 70 vezes menor.

4.8) Inibição da cisteíno protease recombinante por inibidores específicos para cisteíno proteases e catepsina B

Com o objetivo de investigar a identidade da cisteíno protease em estudo como sendo uma catepsina B de cana-de-açúcar conforme classificação feita por Correa e colaboradores (2001) e de acordo com os resultados de alinhamento realizados no BLAST, foram realizados teste de inibição utilizando um inibidor contra cisteíno protease da família C1; e outro específico contra catepsina B. A seletividade e potência dos inibidores são devido à especificidade dos componentes peptídicos aos sítios das proteases. As atividades inibitórias foram medidas nas mesmas condições das cistatinas recombinantes.

O E64 é um inibidor natural de cisteíno protease, isolado de culturas de *Aspergillus japonicus* e relatado pela primeira vez por Hanada e colaboradores (1978). Diversos trabalhos têm demonstrado a capacidade inibitória de E64 contra cisteíno proteases da família da papaína (Barrett *et al.*, 1981; Barrett *et al.*, 1982; Otto e Schirmeister, 1997). Sua interação com a enzima ocorre tanto nos subsítios S como S' (Varughese *et al.*, 1989).

O inibidor sintético específico para catepsina B utilizado foi o CA074, desenhado e sintetizado como derivado do E64, e que apresenta capacidade inibitória seletiva contra catepsina B tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Sua especificidade se deve aos resíduos Ile e Pro presentes em sua seqüência

(Towatari *et al.*, 1991; Murata, *et al.*, 1991). Os resultados dos ensaios de inibição estão expostos na figura 4.13.

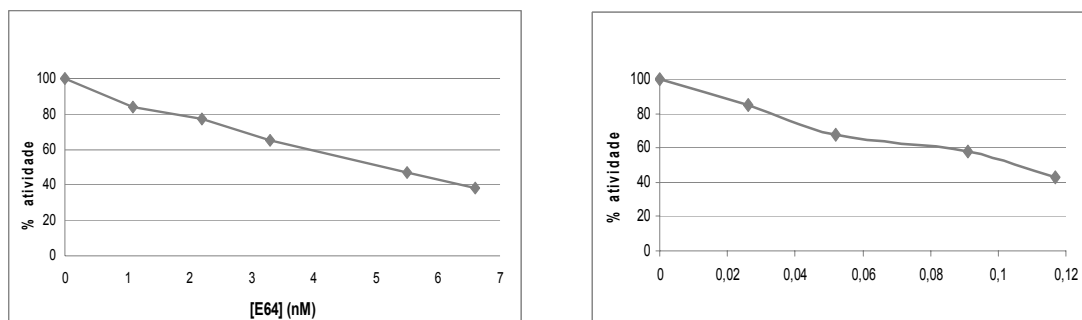


Figura 4.13: Inibição da CaneCPB pelos inibidores específicos E64 e CA074. As atividades inibitórias contra a protease da cana foi medida em um espectrofluorímetro utilizando-se substrato fluorogênico Z-FR-MCA. A atividade residual da enzima foi expressa em porcentagem em relação ao controle (sem inibidor).

Na tabela 4 encontramos os valores de K_i app obtidos na inibição da cisteíno protease pelos inibidores específicos.

Tabela 5: Constantes de inibição (K_i) dos inibidores E64 e CA074 contra a CaneCPB. As constantes de inibição foram calculadas segundo o procedimento de Morrison, utilizando o programa GraFit.

| Inibidores | Valores de K_i app para Cisteíno Protease |
|------------|---|
| E64 | 4,8 nM |
| CA074 | 0,13 nM |

O inibidor E64 foi capaz de inibir a enzima, entretanto apresentou maior valor para K_i app, esse resultado está coerente com o que era esperado encontrarmos, visto que é um inibidor geral para cisteíno proteases.

Já o inibidor específico CA074 foi capaz de inibir eficientemente a enzima, o

que caracteriza essa cisteína protease como a primeira provável catepsina B de cana-de-açúcar obtida de forma recombinante em *E. coli*.

5) DISCUSSÃO

O projeto genoma da cana-de-açúcar (SUCEST) gerou um banco de dados com aproximadamente 238.000 ESTs obtidas através do seqüenciamento de mais de 260.000 clones de cDNA. Estes clones fazem parte de 26 bibliotecas geradas a partir dos diferentes tecidos da cana (Vettore *et al.*, 2003).

Correa e colaboradores (2001) identificaram 76 *clusters* consenso agrupados em 12 grupos para possíveis cisteíno proteases da cana-de-açúcar. Cinco *clusters* foram identificados como pertencentes ao grupo das catepsinas B, e o clone deste grupo escolhido para a realização deste trabalho foi o SCSGAD1142H04.g. Para fazer a divisão destes clones nos diferentes grupos foram utilizadas 24 seqüências bem caracterizadas e definidas como cisteíno proteases, para que se encontrasse homologia com os clusters da SUCEST.

No alinhamento entre a CaneCPB e as diversas catepsinas humanas nota-se uma maior identidade com a catepsina B (Tabela 1) e grande diferença na região do *loop* de oclusão entre a enzima da cana e catepsina B humana. Primeiramente observamos que a enzima da cana possui um *loop* menor, com a perda de cinco aminoácidos. Os segmentos Pro106-Pro107-Cys108 e Pro117-Pro118-Cys119, que conferem à catepsina B humana rigidez ao *loop* (Musil *et al.*, 1991), não estão presentes desta forma na enzima da cana, na qual encontramos os segmentos Val-Gly-Cys e Pro-Gly-Cys que podem não exercer o papel do segmento presente na catepsina B humana, e conseqüentemente a rigidez na região ser minimizada.

Outro ponto interessante que podemos ressaltar é a presença de uma única

histidina no *loop* de oclusão na seqüência protéica da enzima da cana, sendo antecedida por uma Lys, um aminoácido altamente flexível. A ausência de um resíduo de His na seqüência da proteína da cana pode repercutir algumas modificações no perfil da atividade enzimática da CaneCPB como também no perfil inibitório das cistatinas contra esta enzima, baseando-se em trabalhos que analisaram o papel destes resíduos para a atividade exopeptidase da catepsina B humana e sua inibição por cistatinas (Illy *et al.*, 1997; Krupa *et al.*, 2002).

Do alinhamento entre a cisteíno protease da cana e catepsinas B de plantas é possível sugerir que a pró região da CaneCPB contenha 13 aminoácidos e que a enzima madura inicie sua seqüência protéica na isoleucina da posição 38 (...IIQED... figura 4.4). Dentro desta pró região podemos observar a seqüência QVVG, muito similar à seqüência do primeiro *loop* de cistatinas em geral, inclusive as cistatinas de cana-de-açúcar produzidas em nosso laboratório e utilizadas nos ensaios de inibição da CaneCPB (Soares-Costa *et al.*, 2002; Gianotti *et al.*, 2005; Gianotti *et al.*, 2008). Esta similaridade na seqüência sugere que esta possa conferir à pró região uma função inibitória, tornando necessária sua remoção, parcial ou total, para a atividade da enzima.

A análise deste alinhamento também demonstra a identidade entre os aminoácidos dos sítios ativos das enzimas Gln, Cys e His. Na possível região do *loop* de oclusão os resíduos das diferentes cisteíno proteases apresentam identidade entre si.

Devido à presença de um peptídeo sinal indicada na análise da seqüência da cisteíno protease pelos programas PSORT e SignalP, os oligonucleotídeos

foram desenhados excluindo esta região e inserindo sítios para enzimas de restrição, sendo *Nde* I (forward) e *Not* I (reverse). Houve a inclusão de 28 aminoácidos provenientes das duas His-tag inseridas e do restante do próprio vetor, o que representa um aumento de 3,4 kDa na massa da proteína. A massa molecular da enzima é de 36,3 kDa, adicionando 3,4 kDa temos uma massa final de 39,7 kDa (figura A1 em anexo).

O ponto isoelétrico (pI) predito da cisteína protease é de 5,57. Este é o valor de pH onde a proteína, ou qualquer outra molécula, apresenta carga elétrica igual a zero, ou seja, há um equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupos iônicos das moléculas.

A ORF que codifica uma provável catepsina B de cana-de-açúcar foi amplificada com sucesso utilizando oligonucleotídeos desenhados com base na seqüência obtida do clone SCSGAD1142H04.g. A clonagem desta ORF no vetor de propagação pTZ57R, como também sua subsequente subclonagem no vetor de expressão pET28a foram realizadas com sucesso.

A produção recombinante da enzima foi realizada em *E. coli*, primeiramente a 37 °C por 4 horas sendo possível analisar a expressão de uma proteína com massa molecular esperada de 39 kDa. Entretanto, a proteína recombinante ficou localizada quase que exclusivamente no precipitado. Uma nova tentativa de produção da enzima foi realizada diminuindo a temperatura para 30 °C, o que não alterou o perfil de expressão encontrado a 37 °C. Assim, uma pequena parte da proteína foi localizada no sobrenadante somente na temperatura de 20 °C, com uma indução de 16 horas, que apresentou um nível menor de expressão. A porção

solúvel foi purificada com rendimento insignificante, devido possivelmente à sua pequena quantidade (dados não mostrados). Desta forma a purificação foi realizada da porção insolúvel utilizando solubilização por adição de uréia, sendo que a menor concentração e que conseguiu solubilizar a proteína do precipitado foi a de 0.5 M. Assim, a elegemos para prosseguimento do trabalho. A temperatura de indução de 20 °C, foi a que mais se adequou para a solubilização com uréia da cisteíno protease a partir do precipitado, comparada com induções realizadas a temperaturas maiores (30 °C e 37 °C - dados não mostrados). A temperatura de crescimento, muitas vezes, afeta diretamente os níveis de expressão e solubilidade de uma proteína. Temperaturas menores podem reduzir os níveis de expressão, mas possibilitam um correto enovelamento e aumento da solubilidade da proteína expressa. Com uma menor quantidade de proteína no precipitado da indução a 20 °C, a solubilização com uréia resultou numa maior quantidade de enzima solúvel.

A purificação foi feita em coluna com resina de níquel devido a presença das “caudas” de histidina (His-tag) acopladas nas duas extremidades da proteína, C-terminal e N-terminal. Não houve necessidade da remoção das “caudas”, pois aparentemente elas não interferiram na atividade da enzima.

Depois de purificada e dialisada, a enzima foi diretamente estocada a -80 °C. Estudos realizados neste trabalho mostraram que quando armazenada a 4 °C e -20 °C, a enzima apresentou perda de atividade em um prazo menor. Entretanto testes de atividade revelaram que após 15 dias a -80 °C a enzima apresentava-se com cerca de 5% da atividade inicial, o que demonstra a instabilidade da enzima (dados não mostrados).

Com a obtenção da provável catepsina B recombinante pura foi possível produzir anticorpos policlonais em camundongos para serem utilizados nos ensaios de *Western blotting*. Os ensaios revelaram que estes anticorpos são específicos para a cisteíno protease recombinante, sendo capazes também de detectar a enzima endógena em diferentes tecidos da cana-de-açúcar. Com a produção deste anticorpo permitirá desenvolver estudos futuros que analisem a expressão da cisteíno protease durante o desenvolvimento da planta, tanto em diferentes condições normais, quanto estresse causado por condições ambientais variadas, ataque de parasitas, e outros.

Uma diferença verificada na figura foi o tamanho das bandas detectadas. A cisteíno protease recombinante apresentou uma diferença de tamanho quando comparadas com as bandas dos extratos da cana-de-açúcar. Esta diferença se deve possivelmente aos 3,4 kDa adicionais na seqüência da proteína, como justificado anteriormente. Por outro lado, a enzima da planta pode estar na forma ativa, com o propeptídeo removido de forma parcial ou total.

A atividade enzimática foi realizada utilizando dois peptídeos fluorescentes, que diferenciavam exclusivamente pelo aminoácido presente na posição P2, como mostrado na tabela 3. Sabe-se que catepsinas B tem preferência por substratos que apresentem na posição P2 aminoácidos hidrofóbicos, tendo uma preferência maior por fenilalamina. Assim é de se esperar que a provável catepsina B em estudo hidrolisasse melhor o substrato Z-FR-MCA, ou seja, menor quantidade de substrato seriam necessária para se chegar à metade da velocidade máxima da reação de hidrólise. Os resultados foram coerentes com esses dados, uma vez que o K_i app

obtido para o substrato Z-FR-MCA é bem menor que o K_i app para o substrato Z-LR-MCA (cerca de 350 vezes).

Para uma melhor caracterização da enzima, com sendo uma cisteíno protease, foram realizados os testes de inibição com duas cistatinas da cana-de-açúcar produzidas de forma recombinante em nosso laboratório; além de dois inibidores sintéticos (sendo um específico para cisteíno proteases, o E64, e outro específico para catepsinas do tipo B, o CA074).

As cistatinas são inibidores que agem através da ligação competitiva ao sítio ativo das cisteíno proteases. Entretanto a catepsina B apresenta em sua estrutura uma seqüência adicional não encontrada nas demais cisteíno proteases. Este elemento estrutural é denominado *loop* de oclusão (“*occluding loop*”), que bloqueia a fenda do sítio ativo (Musil *et al.*, 1991) modulando as propriedades de ligação tanto do substrato quanto dos inibidores da enzima (Illy *et al.*, 1997). Sua conformação torna o sítio ativo inacessível às cistatinas. Esse obstáculo representado pelo *loop* reflete em valores de K_i altos para a maioria das cistatinas contra catepsina B, quando comparados àqueles obtidos contra as demais cisteíno proteases que não possuem o *loop* (Barrett *et al.* 1986; Abrahamson, 1994; Ohtsubo *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2005).

Nycander e colaboradores (1997) mostraram o mecanismo de inibição da cistatina C, um inibidor natural de catepsina B. Este mecanismo ocorre em duas etapas: primeiro ocorre uma interação inicial da região N-terminal da cistatina com os subsítios S2 e S3, em seguida há o deslocamento do *loop* de oclusão concomitante à ancoragem da cistatina, que introduz os seus dois *loops*, o central

e o da região C-terminal nos subsítios S' (Nycander *et al.*, 1998; Pavlova *et al.*, 2000).

Estudos sugerem que o segmento N-terminal da cistatina está fortemente relacionada à eficiência na inibição da catepsina B (Abrahamson *et al.*, 1991; Björk *et al.*, 1994) como também a capacidade em deslocar o *loop* de oclusão e se ligar à protease por meio de seus dois *loops*. Dentro desta região, dois resíduos de histidinas, His110 e His111, localizados sobre a região dos subsítios S', estabilizam o carboxilato C-terminal do substrato, posicionando a ligação peptídica a ser clivada a dois resíduos a partir do C-terminal, o que contribui para a atividade peptidil dipeptidase da catepsina B (Musil *et al.*, 1991). A importância da ligação entre os resíduos de His110 e Asp22 para a manutenção da estrutura rígida do *loop* de oclusão, e, portanto, para dificuldade de acesso das cistatinas ao sítio ativo, para a atividade endopeptidase baixa e para singular atividade exopeptidase encontrada na catepsina B é discutida em diversos trabalhos (Polgar e Csoma, 1987; Musil *et al.*, 1991; Illy *et al.*, 1997; Nägler *et al.*, 1997; Krupa *et al.*, 2002).

Nos testes de inibição realizados neste trabalho utilizando cistatinas endógenas da cana-de-açúcar contra a provável catepsina B recombinante, os resultados diferem dos trabalhos realizados com os mesmos inibidores contra catepsina B humana.

Como observado na figura 4.2, na seqüência protéica da cisteíno protease o *loop* de oclusão não possui um dos resíduos de histidina. É considerado, portanto, que a ligação entre a His110 e Asp22 observada na enzima humana possa não estar presente na enzima da cana, pelo fato de haver somente um resíduo de His,

o que pode repercutir em algumas modificações estruturais e no perfil da atividade enzimática. Como esta ligação é a grande responsável pela força que mantém o *loop* de oclusão inflexível e obstruindo o sítio ativo, é de se esperar que em sua ausência o *loop* torne-se mais flexível, permitindo, então, o acesso facilitado das cistatinas ao sítio ativo. Com maior acessibilidade ao sítio ativo pelas cistatinas, garante uma inibição mais eficaz contra catepsina B da cana-de-açúcar.

Estes dois resíduos de histidina são considerados importantes para a atividade exopeptidase da enzima e para o modo de ligação do substrato. Deleções de porções deste *loop* por mutagênese sítio-dirigida que resultam na perda das histidinas geram perda da atividade exopeptidase (Illy *et al.*, 1997). Assim estudos futuros devem ser realizados no intuito de averiguar se a enzima da cana apresenta atividade exopeptidase, considerando a ausência de uma das histidinas no *loop* de oclusão.

Quando comparamos os valores de K_i app encontrados para CaneCPI-1 e CaneCPI-4 contra catepsina B humana (Oliva *et al.*, 2004; Gianotti *et al.*, 2005; Gianotti *et al.*, 2008) e da cana observamos valores muito maiores para a primeira, o que corrobora com a hipótese acima apresentada. Os resultados obtidos com as diferentes cistatinas podem também nos indicar quais seriam os “parceiros”, para a cisteíno protease estudada, na cana-de-açúcar. No entanto, ensaios de interação proteína-proteína poderiam ser mais eficientes neste sentido.

O E64 é um inibidor natural de cisteíno protease, isolado de culturas de *Aspergillus japonicus*, e relatado pela primeira vez por Hanada e colaboradores (1978). Diversos trabalhos têm demonstrado a capacidade inibitória de E64 contra

cisteíno proteases da família da papaína (Barrett *et al.*, 1981; Barrett *et al.*, 1982; Otto e Schirmeister, 1997). Sua interação com a enzima ocorre tanto nos subsítios S como S' (Varughese *et al.*, 1989). A inibição também foi avaliada com o uso de E64, obtendo-se K_i app de 4,8 nM.

O inibidor sintético específico e potente para catepsina B utilizado foi o CA074, desenhado e sintetizado como derivado do E64, e que apresenta capacidade inibitória seletiva contra catepsina B tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Sua especificidade se deve aos resíduos Ile e Pro do motivo dipeptidil presente em sua seqüência (Towatari *et al.*, 1991; Murata, *et al.*, 1991), assistida por uma dupla ponte de hidrogênio entre o grupo carboxil da porção C-terminal do CA074 e os grupos imidazólicos das histidinas 110 e 111 da catepsina B humana. Sua ligação se dá nos subsítios S' da catepsina B humana.

Nos testes de inibição utilizando CA074, foi obtido valor de K_i app de 0,13 nM, resultado próximo ao obtido por Murata e colaboradores (1991), onde compararam a atividade inibitória deste inibidor frente às catepsinas humanas B, L e H obtendo os seguintes valores de IC_{50} : 2,24 nM, 172.000 nM e 420.000 nM respectivamente.

6) CONCLUSÕES

- O clone contendo a ORF para a cisteíno protease da cana-de-açúcar foi caracterizado por completo.
- A cisteíno protease de cana-de-açúcar foi expressa na forma recombinante em sistema *E. coli* com sucesso.
- A purificação da enzima foi realizada com sucesso com rendimento de 2,5 mg por litro de cultura.
- A proteína recombinante mostrou-se ativa e capaz de hidrolizar substratos fluorogênicos.
- A cisteíno protease expressa utiliza preferencialmente o substrato Z-FR-MCA, característica de enzimas da classe das papaínas.
- Os inibidores endógenos de cisteíno protease da cana-de-açúcar (cistatinas) produzidos em nosso laboratório foram capazes de inibir a atividade da enzima em estudo. Ao contrário da catepsina B humana, que só é inibida pela CaneCPI-4, a CaneCPB foi também inibida eficientemente pelas CaneCPI-1.
- Ensaio de inibição com o inibidor específico para catepsina B, CA074, demonstraram atividade inibitória eficiente contra a cisteíno protease da cana-de-açúcar, sugerindo que esta enzima seja uma catepsina B-like.

7) REFERÊNCIAS

ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H.; SUZUKI, K.; ARAI, S. (1987) Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). **J. Biol. Chem.**, 262: 16793-16797.

ABRAHAMSON, M. (1993) Cystatin – Protein inhibitor of papain-like cysteine proteinases. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, 45(5): 299-304.

ABRAHAMSON, M. (1994) Cystatins. **Methods Enzymology**, 244: 685-700.

ABRAHAMSON, M.; BARRETT, A. J.; SALVESEN, G.; GRUBB, A. (1986) Isolation of six cysteine proteinase inhibitor from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentration in biological fluids. **J. Biol. Chem.**, 261: 11282-11289.

ABRAHAMSON, M.; MASON, R. W.; HANSSON, H.; BUTTLE, D.; GRUBB, A.; OHLSSON, K. (1991) Human cystatin C, Role of the N-terminal segment in the inhibition of human cysteine proteinases and in its inactivation by leucocyte elastase. **Biochemical Journal**, 273: 621-626.

AHN, J.W.; KIM, M.; LIM, J.H.; KIM, G.T.; PAI, H.S. (2004) Phytocalpain controls the proliferation and differentiation fates of cells in plant organ development. **Plant J.**, 38(6):969-981.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, R.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, 25: 3389-3402.

ANASTASI, A.; BROWN, M.A.; KEMBHAVI, A.A.; NICKLIN, M.J.; SAYERS, C.A.; SUNTER, D.C.; BARRETT, A.J. (1983) Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. **Biochem J.**, 211(1):129-138.

BARRETT, A. J. (1981) Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. **Methods Enzymol.**, 80: 771-778.

BARRETT, A.J. (1994) Classification of peptidases. **Methods in enzymology**, 244: 1-15.

BARRETT, A.; McDONALD, J. (1980) Mamalian Proteases. **New York: Academic.**

BARRETT, A.J.; FRITZ, H.; GRUBB, A.; ISEMURA, I.; JARVINEN, M.; KATUNUMA, N.; MACHLEIDT, W.; MULLER-ESTERL, W.; SASAKI, M.; TURK, V. (1986) Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. **Biochem J.**, 236(1): 312.

BARRETT, A.J.; KEMBHAVI, A.A.; HANADA, K. (1981) E-64 [L-trans-epoxysuccinyl-leucyl-amido(4-guanidino)butane] and related epoxides as inhibitors of cysteine proteinases. **Acta Biol Med Ger.**, 40(10-11):1513-1517.

BARRETT, A.J.; KEMBHAVI, A.A.; BROWN, M.A.; KIRSCHKE, H.; KNIGHT, C.G.; TAMAI, M.; HANADA, K. (1982) L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. **Biochem. J.**, 201: 189-198.

BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D.; DAVIES, M.E.; MACHLEIDT, W.; SALVESEN, G.; TURK, V. (1986) Cysteine proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. In: **Proteinase Inhibitors. Amsterdam: Barrett, A. J.; Salvesen, G. eds., Elsevier Science Publisher**, 515-569.

BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D.; WOESSNER, J.F. (2004) **Handbook of Proteolytic Enzymes. London: Academic Press.**

BEYNON, R.J.; BOND, J.S. (1989) **Proteolytic Enzymes: A practical approach. England: Oxford University Press.**

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. (1994) **Physiology of development and germination. Seeds 2nd edition. New York, London: Plenum Press.**

BJÖRK, I.; POL, E.; RAUB-SEGALL, E.; ABRAHAMSON, M.; ROWAN, A. D.; MORT, J. S. (1994) Differential changes in the association and dissociation rate constants for binding of cystatins to target proteinases occurring on N-terminal truncation of the inhibitors indicate that the interaction mechanism varies with different enzymes. **Biochemical Journal**, 299: 219-225.

BODE, W.; ENGH, R.; MUSIL, D.; THIELE, U.; HUBER, R.; KARSHIKOV, A.; BRZIN, J.; KOS, J.; TURK, V. (1998) The 2.0 Å x-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinase. **EMBO J.**, 7: 2593-2599.

BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254.

CALLIS, J. (1995) Regulation of protein degradation. **Plant Cell**, 7: 845-857.

CHEN, G.H.; HUANG, L.T.; YAP, M.N.; LEE, R.H.; HUANG, Y.J.; CHENG, M.C.; CHEN, S.C. (2002) Molecular characterization of a senescence-associated gene encoding cysteine proteinase and its gene expression during leaf senescence in sweet potato. **Plant Cell Physiol.**, 43(9): 984-991.

COLELLA, R.; JACKSON, T.; GOODWYN, E. (2004) Matrigel® invasion by the prostate cancer cell lines, PC3 and DU145, and cathepsin L + B activity. **Biotechnic & Histochemistry**, 79(3-4): 121-127.

COLMAN, R. W.; SCHMAIER, A. H. (1997) Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. **Blood**, 90: 3819-3843.

COPELAND, R. A. (2005) Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists. **New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.**

CORPET, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, 16(22): 10881-10890.

CORREA, G.C.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. (2001) Identification, classification and expression pattern analysis of sugarcane cysteine proteinases. **Genetica and molecular Biology**, 24(1-4): 275-283.

COULOMBE, R.; GROCHULSKI, P.; SIVARAMAN, J.; MÉNARD, R.; MORT, J.S.; CYGLER, M. (1996) Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. **The EMBO Journal**, 15(20): 5492-5503.

CYGLER, M.; SIVARAMAN, J.; GROCHULSKI, P.; COULOMBE, R.; STORER, A.C.; MORT, J.S. (1996) Structure of rat procathepsin B. Model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. **Structure**, 4: 405-416.

DICKINSON, D.P. (2002) Cysteine Peptidases of Mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in healthy and disease. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, 13(3): 238-275.

ERVIN, H.; COX, J. L. (2005) Late stage inhibition of hematogenous melanoma metastasis by cystatin C over-expression. **Cancer Cell International**, 5(1): 14.

FOSKET, D. E. (1994) Plant Growth and Development: a Molecular Approach. **Academic Press**.

FOX, T.; DEMIGUEL, E.; MORT, J.S.; STORER, A.C. (1992) Potent slow-binding inhibition of cathepsin-B by its propeptide. **Biochemistry**, 31:12571-12576.

FUJISHIMA A.; IMAI, Y.; NOMURA, T.; FUJISAWA, Y.; YAMAMOTO, Y.; SUGAWARA, T. (1997) The crystal structure of human cathepsin L complexed with E-64. **FEBS Letters**, 407(1): 47-50.

FUJINAGA, M.; CHERNEY, M.M.; OYAMA, H.; ODA, K.; JAMES, M.N.G. (2004) The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101(10): 3364-3369.

GIANOTTI, A.; SOMMER, C.A.; CARMONA, A.K.; HENRIQUE-SILVA, F. (2008) Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L and human breast cancer cell invasion. **Biol Chem.**, 389(4): 447-453.

GIANOTTI, A.; RIOS, W.M.; SOARES-COSTA, A.; NOGAROTO, V.; CARMONA, A.K.; OLIVA, M.L.; ANDRADE, S.S.; HENRIQUE-SILVA, F. (2005) Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein Expr Purif.**, 47(2):483-489.

GUAY, J.; FAGUEYRET, J.P.; DUCRET, A.; PERCIVAL, M.D.; MANCINI, J.A.; (2000) Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides. **Eur J Biochem.**, 267: 6311-6318.

HANADA, K.; TAMAI, M.; YAMAGISHI, M.; OHMURA, S.; SAWADA, J.; TANAKA, I. (1978) **Agric. Biol. Chem.**, 42: 523-528.

HASNAIN, S.; HIRAMA, T.; HUBER, C.P.; MASON, P.; MORT, J.S. (1993) Characterization of cathepsin B specificity by site-directed mutagenesis. The importance of Glu²⁴⁵ in the S₂-P₂ specificity for arginine and its role in transition state stabilization. **J. Biol. Chem.**, 268: 235-240.

ILLY, C.; QURAIISHI, O.; WANG, J.; PURISIMA, E.; VERNET, T.; MORT, J.S. (1997) Role of the occluding loop in cathepsin B activity. **The Journal of Biological Chemistry**, 272(2): 1197-1202.

JIA, Z.; HASNAIN, S.; HIRAMA, T.; LEE, X.; MORT, J.S.; TO, R.; HUBER, C.P. (1995) Crystal structure of recombinant rat cathepsin B and a cathepsin B-inhibitor complex. Implications for structure-based inhibitor design. **J. Biol. Chem.**, 270: 5527-5533.

KAMPHUIS, I.G.; KALK, K.H.; SWARTE, M.B.A.; DRENTH, J. (1984) Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, 179: 233-256.

KIM, M.; HAMILTON, S.E.; GUDDAT, L.W.; OVERALL, C.M. (2007) Plant collagenase: unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. **Biochim Biophys Acta**, 1770(12): 1627-1635.

KOLKHORST, V.; STÜRZEBECKER, J.; WIEDERANDERS, B. (1998) Inhibition of tumor cell invasion by protease inhibitors: correlation with the protease profile. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, 124(11): 598-606.

KONDO, H.; ABE, K.; NISHINURA, I.; WATANABE, H.; EMORI, Y.; ARAI, S. (1990) Two Distinct Cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, 265; 15832-15837.

KRUPA, J.C.; HASNAIN, S.; NÄGLER, D.K.; MÉNARD, R.; MORT, J.S. (2002) S'₂ substrate specificity and the role of His 110 and His 111 in the exopeptidase activity of human cathepsin B. **Biochem J.**, 361: 613-619.

LEATHERBARROW, R. J. Grafit Version 3.0, Erithacus Software Ltd., Staines, UK.

LEUNG-TOUNG, R.; LI, W.; TAM, T.F.; KARIMIAN, K. (2002) Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a Review. **Current Medicinal Chemistry**, 9(9): 979-1002.

LI, W.; DING, F.; ZHANG, L.; LIU, Z.; WU, YU.; LUO, A.; WU, M.; WANG, M.; ZHAN, Q.; LIU, Z. (2005) Overexpression of stefin A in human esophageal squamous cell carcinoma cells inhibits tumor cell growth, angiogenesis, invasion, and metastasis. **Clinical Cancer Research**, 11(24): 8753-8762.

MACH, L.; MORT, J.S.; GLÖSSL, J. (1994) Non-covalent complexes between the lysosomal proteinase cathepsin B and its propeptide account for stable, extracellular, high molecular mass forms of the enzyme. **J. Biol. Chem.**, 269: 13036–13040.

MARGIS, R.; REIS, E.M.; VILLERET, V. (1998) Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 359: 24-30.

MARTINEZ, M.; ABRAHAM, Z.; GAMBARDILLA, M.; ECHAIDE, M.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. (2005) The strawberry gene Cyf1 encodes a phytocystatin with antifungal properties. **Journal of Experimental Botany**, 56 (417): 1821-1829.

McGRATH, M. E. (1999) The Lysosomal cysteine proteases. **Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure**, 28: 181-204.

MOSTAFAIE, A.; BIDMESHKIPOUR, A.; SHIRVANI, Z.; MANSOURI, K.; CHALABI, M. (2008) Kiwifruit actinidin: a proper new collagenase for isolation of cells from different tissues. **Appl Biochem Biotechnol.**, 144(2): 123-131.

MURATA, M.; MIYASHITA, S.; YOKOO, C.; TAMAI, M.; HANADA, K.; HATAYAMA, K.; TOWATARI, T.; NIKAWA, T.; KATUNUMA, N. (1991) Novel epoxysuccinyl peptides. Selective inhibitors of cathepsin B, in vitro. **FEBS Lett.**, 280(2): 307-310.

MUSIL, D.; ZUCIC, D.; ENGH, R.A.; MAYR, I.; HUBER, R.; POPOVI, C.T.; TURK, V.; TOWATARI, T.; KATUNUMA, N.; BODE, W. (1991) The refined 2.15 Å x-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. **EMBO J.**, 10: 2321–2330.

NÄGLER, D.K.; STORER, A.C.; PORTARO, F.C.V.; CARMONA, E.; JULIANO, L.; MÉNARD, R. (1997) Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. **Biochemistry**, 36: 12608-12615.

NAKAI, K.; HORTON, P. (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. **Trends in Biochemical Sciences**, 24(1): 34-36.

NIELSEN, H.; KROGH, A. (1998) Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. **California: AAI Press**.

NYCANDER, M.; ESTRADA, S.; MORT, J.S.; ABRAHAMSON, M.; BJÖRK, I. (1998) Two-step mechanism of inhibition of cathepsin B by cystatin C due to displacement of the proteinase occluding loop. **FEBS Letters**, 422(1): 61-64.

OHTSUBO, S.; KOBAYASHI, H.; NORO, W.; TANIGUSHI, M.; SAYITO, E. (2005) Molecular cloning and characterization of Oryzacystatin-III, a novel member of phytocystatins in rice (*Oryza sativa* L. japonica). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53: 5218-5224.

OLIVA, M. L. V.; CARMONA, A. K.; ANDRADE, S. S.; COTRIN, S. S.; SOARES-COSTA, A.; HENIQUE-SILVA, F. (2004) Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine protease inhibitor from sugarcane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 320(4): 1082-1086.

OTTO, H. H.; SCHIRMEISTER, T. (1997) Cysteine proteases and their Inhibitors. **Chemical Reviews**, 97: 133-171.

PAVLOVA, A.; KRUPA, J.C.; MORT, J.S.; ABRAHAMSON, M.; BJÖRK, I. (2000) Cystatin inhibition of cathepsin B requires dislocation of the proteinase occluding loop. Demonstration by release of loop anchoring through mutation of His110. **FEBS Letters**, 487(2): 156-160.

POLGAR, L. (1974) Mercaptide-imidazolium ion-pair: the reactive nucleophile in papain catalysis. **FEBS Letters**, 47(1):15-18.

POLGAR, L.; HALASZ, P. (1982) Current problems in mechanistic studies on serine and cysteine proteinases. **Biochem J.**, 207: 1-10.

POLGAR, L.; CSOMA, C. (1987) Dissociation of Ionizing Groups in the Binding Cleft Inversely Controls the Endo- and Exopeptidase Activities of Cathepsin B*. **J. Biol. Chemistry**, 262(30): 14448-14453.

QURAIISHI, O.; NÄGLER, D.K.; FOS, T.; SIVARAMAN, J.; CYGLER, M.; MORT, J.S.; STORER, A.C. (1999) The occluding loop in cathepsin B defines the pH dependence of inhibition by its propeptide. **Biochemistry**, 38: 5017-5023.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62: 597-635.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J. (1995) Evolutionary families of metalloproteinases. **Methods enzymol**, 248: 183-228.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J. (2000) The peptidase database. **Nucleic Acids res**, 28: 323-325.

RAWLINGS, N.D.; MORTON, F.R.; BARRETT, A.J. (2006) MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, 34: 270-272.

ROSENBERG, I.M. (2005) Protein Analysis and Purification. **Benchtop Techniques. Second Edition.**

RZYCHON, M.; CHMIEL, D.; STEC-NIEMCZYK, J. (2004) Modes of inhibition of cysteine protease. **Acta Biochim Pol.**, 51: 861-873.

SAJID, M.; MCKERROW, J.H. (2002) Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 120: 1-21.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. (1989) Molecular Cloning: A laboratory Manual. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.**

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 74: 5463-5467.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. (1967) On the size of the active site in proteases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 27: 157-162.

SCHLERETH, A.; STANDHARDT, D.; MOCK, H. P.; MUTZ K. (2001) Stored cysteine proteinases start globulin mobilization in protein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch. (*Vicia sativa* L.) seed germination. **Planta**, 212: 718-727.

SCHLERETH, A.; BECKER, C.; HORSTANN, C.; TIEDEMANN, J.; MÜNTZ, K. (2000) Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). **Jornal of Experimental Botany**, 51(349): 1423-1433.

SHRIDHAR, R.; ZHANG, J.; SONG, J.; BOOTH, B. A.; KEVIL, C. G.; SOTIROPOULOU, G.; SLOANE, B. F.; KEPPLER, D. (2004) Cystatin M suppresses the malignant phenotype of human MDA-MB-435S cells. **Oncogene**, 23(12): 2206-2215.

SIMS, A. H.; DUNN-COLEMAN, N. S.; ROBSON, G. D.; OLIVER, S. G. (2004) Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi. **FEMS Microbiology Letters**, 239(1): 95-101.

SKRZYDLEWSKA, E.; SULKOWSKA, M.; KODA, M.; SULKOWSKI, S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. (2005) *World Journal of Gastroenterology*, 11(9): 1251-1266.

SOARES-COSTA, A.; BELTRAMINI, L.M.; THIEMANN, O. H.; HENRIQUE-SILVA, F. (2002) A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 296(5): 1194-1199.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, 11: 431–443.

SKRZYDLEWSKA, E.; SULKOWSKA, M.; KODA, M.; SULKOWSKI, S. (2005) Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, 11(9): 1251-1266.

TAO, K.; STERNS, N.A.; DONG, J.; WU, Q.L.; SAHAGIAN, G.G. (1994) The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. **Arch Biochem Biophys.**, 311: 19-27.

TAKAHASHI, T., TANG, J. (1981) Cathepsin D from porcine and bovine spleen. **Methods enzymol**, 80: 565-581.

TOWATARI T.; NIKAWA, T.; MURATA, M.; YOKOO, C.; TAMAI, M.; HANADA, K.; KATUNUMA, N. (1991) Novel epoxysuccinyl peptides. A selective inhibitor of cathepsin B, in vivo. **FEBS Lett.**, 280(2): 311-315.

TURK, V.; BODE, W. (1991) The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Letters**, 285: 213-219.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. (2000) Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1477(1-2): 98-111.

TURK, D.; PODOBNIK, M.; KUHELJ, R.; DOLINAR, M.; TURK, V. (1996) Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Å resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. **FEBS Lett.**, 384: 211–214.

VARUGHESE, K.I.; AHMED, F.R.; CAREY, P.R.; HASNAIN, S.; HUBER, C.P.; STORER, A.C. (1989) Crystal structure of a papain-E-64 complex. **Biochemistry**, 28(3): 1330-1332.

VETTORE, A.L.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; SOUZA, G.M.; DA SILVA, A.M.; FERRO, M.I.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTI, E.A.; LEMOS, M.V.; COUTINHO, L.L.; NOBREGA, M.P.; CARRER, H.; FRANÇA, S.C.; BACCI JÚNIOR, M.; GOLDMAN, M.H.; GOMES, S.L.; NUNES, L.R.; CAMARGO, L.E.; SIQUEIRA, W.J.; VAN SLUYS, M.A.; THIEMANN, O.H.; KURAMAE, E.E.; SANTELLI, R.V.; MARINO, C.L.; TARGON, M.L.; FERRO, J.A.; SILVEIRA, H.C.; MARINI, D.C.; LEMOS, E.G.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; TAMBOR, J.H.; CARRARO, D.M.; ROBERTO, P.G.; MARTINS, V.G.; GOLDMAN, G.H.; DE OLIVEIRA, R.C.; TRUFFI, D.; COLOMBO, C.A.; ROSSI, M.; DE ARAUJO, P.G.; SCULACCIO, S.A.; ANGELLA, A.; LIMA, M.M.; DE ROSA JÚNIOR, V.E.; SIVIERO, F.; COSCRATO, V.E.; MACHADO, M.A.; GRIVET, L.; DI MAURO, S.M.; NOBREGA, F.G.; MENCK, C.F.; BRAGA, M.D.; TELLES, G.P.; CARA, F.A.; PEDROSA, G.; MEIDANIS, J.; ARRUDA, P. (2003) Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Res.**, 13(12): 2725-2735.

VOLKEL, H.; KURZ, U.; LINDER, J.; KLUMPP, S.; GNAU, V.; JUNG, G.; SCHULTZ, J.E. (1996) Cathepsin L is an intracellular and extracellular protease in *Paramecium tetraurelia*. Purification, cloning, sequencing and specific inhibition by its expressed propeptide. **Eur J Biochem**, 238: 198-206.

WIEDERANDERS, B. (2003) Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. **Acta Biochimica Polonica**, 50(3): 691-713.

YUAN, J.; SHAHAM, S.; LEDOUX, S.; ELLIS, H.M.; HORVITZ, H.R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. **Cell.**, 75(4): 641-652.

ZAJC, I.; SEVER, N.; BERVAR, A.; LAH, T. T. (2002) Expression of cysteine peptidase cathepsin L and its inhibitors stefins A and B in relation to tumorigenicity of breast cancer cell lines. **Cancer Letters**, 187: 185-190.

ZAJC, I.; FRANGES, L.; LAH, T. T. (2003) Expression of cathepsin B is related to tumorigenicity of breast cancer cell lines. **Radiol. Oncol.**, 37(4): 233-240.

ZHANG, J.; SHRIDHAR, R.; DAI, Q.; SONG, J.; BARLOW, S. C.; YIN, L.; SLOANE, B. F.; MILLER, F. R.; MESCHONAT, C.; LI, B. D. L.; ABREO, F.; KEPPLER, D. (2004) Cystatin M: A novel candidate tumor suppressor gene for breast cancer. **Cancer Research**, 64(19): 6957-6964.

ANEXOS

Seqüência nucleotídica da cisteíno protease da cana-de-açúcar no vetor pET 28a

CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGC
AGGTAGTTGGAGTTGGGGTCGGAGACAATTCATGAGAATCATCCAGGAGGA
TATCATCGAGACAGTCAACAACCATCCCAGCGCTGGGTGGACAGCCTCACGTA
ATCCTTACTTCTCAAACCTATACCGTTGCGCAATTTAAGCACATACTTGGAGTGA
AACCAGCACCGAAGAATGTAATAAGTGATGTTCCCTGTCAAACCTTATCCAAGAT
CACTGGAACCTCCAAAAGAGTTTGACGCTAGATCTGCATGGTCCCGTTGCAGC
ACAATTGGGACCATACTTGATCAAGGTCATTGTGGCTCTTGTTGGGCTTTTGGT
GCTGTGGAGTCCCTCCAGGACCGTTTTTGCATTCACCTTCAACATGAGCATTTTA
CTATCAGTCAATGACCTGCTGGCATGCTGCGGTTTTATGTGCGGCGATGGGTG
TGATGGAGGCTATCCTATAGCGGCATGGCGCTACTTTGTTCAAATGGTGTTG
TACTGATGAGTGTGATCCATACTTCGATCAGGTCGGTTGCAAGCATCCTGGA
TGTGAACCTGCTTATGCTACACCTAAGTGTGAAAAGAAATGCAAGGAGCAGAA
CCTAGTTTGGCAGGAAAAGAAGCATTTCAGCATTGATGCGTATAGAATAAATTC
AGATCCACACGACATAATGGCAGAGGTCTACAAAATGGTCCTGTAGAAGTTG
CTTTCACAGTTTACGAGGATTTGCGACACTACAAATCTGGAGTATACAAGCACA
TCACCGGTGGCATTATGGGTGGCCATGCCGTCAAGTTGATTGGATGGGGAAC
CAGTGATGCTGGAGAGGATTACTGGCTTCTT*GCAAATCAGTGAATAGAGGCT
GGGGCGATGATGGATACTTCAAGATCATAAGGGGCAAAAATGAATGTGGCATC
GAGGAGGACGTTGTTGCTGGAATGCCGTCTACAAAGAATGTGATTCCAAACTT
CGGCGGTGCCGTTGGAACAGCTGTAGTTGCGGCCGCACTCGAGCACCA
CCACCACCACTGA

Figura A1: Seqüência nucleotídica da cisteíno protease da cana-de-açúcar no vetor pET 28a. Em negrito estão destacadas as bases que codificam as duas “caudas” de seis histidinas presentes nas duas extremidades (N- e C-terminal). As bases provenientes do vetor pET28a estão sublinhadas, e em itálico estão as seqüências das enzimas de restrição. O códon de terminação proveniente do vetor está indicado por um asterisco

Seqüência protéica da cisteíno protease da cana-de-açúcar no vetor pET28a

HHHHHSSGLVPRGSHMQVVGVGVDNSMRIIQEDIETVNNHPSAGWTASRNP
YFSNYTVAQFKHILGVKPAPKNVLSDVPVKTYPRSLELPKEFDARSAWSRCSTIGTI
LDQGHCGSCWAFGAVESLQDRFCIHFNMSILLSVNDLLACCGFMCGDGDGGYP
IAAWRYFVQNGVVTDECDPYFDQVGCKHPGCEPAYATPKCEKKCKEQNLVWQE
KKHFSIDAYRINSDPHDIMAENVYKNGPVEVAFTVYEDFAHYKSGVYKHITGGIMGG
HAVKLGWGTSDAGEDYWLLANQWNRGWGDDGYFKIIRGKNECGIEEDVVAGMP
STKNVIPNFGGAVGTAVVAAALEHHHHHH

Figura A2: Seqüência da proteína *HIS*CaneCPB. Os aminoácidos não sublinhados são provenientes do vetor pET28a.