

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

**CLONAGEM, EXPRESSÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO
DE UMA SERPINA DA CANA-DE-AÇÚCAR**

Kelly Pereira da Silva

SÃO CARLOS - SP
2008

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

**CLONAGEM, EXPRESSÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO
DE UMA SERPINA DA CANA-DE-AÇÚCAR**

Kelly Pereira da Silva

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

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Silva

Co-orientador: Dr. Luciano Puzer

SÃO CARLOS - SP

2008

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

S586ce

Silva, Kelly Pereira da.

Clonagem, expressão recombinante e caracterização de uma serpina da cana-de-açúcar / Kelly Pereira da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

39 f.

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

1. Genética molecular. 2. Proteína serpina. 3. Cana-de-açúcar. 4. Serino protease. 5. Inibidor de serino protease. 6. Proteínas recombinantes. I. Título.

CDD: 574.87328 (20^a)

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

**CLONAGEM, EXPRESSÃO RECOMBINANTE E
CARACTERIZAÇÃO DE UMA SERPINA DA CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação de Mestrado de Kelly Pereira da Silva

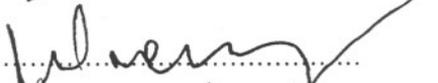
Banca Examinadora

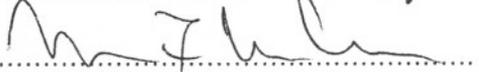
Prof. Dr. Flávio Henrique Silva

Dr. Luciano Puzer

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo

Dr. Marcio Fernando Madureira Alves


.....

.....

.....

.....

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Edir Pereira da Silva, Maria do Carmo da Silva e ao meu irmão Kleber Pereira da Silva pelo apoio e amor incondicionais.

“Paciência e perseverança têm o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem”

John Quincy Adams

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela dádiva da vida e por iluminar meu caminho, guiando todos os meus passos.

Sou muito grata ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Henrique Silva, pela oportunidade de desenvolver o começo da minha carreira acadêmica, pela orientação e amizade, que durante esses anos contribuíram não apenas para minha formação, mas também para meu amadurecimento pessoal e profissional, além da aprendizagem obtida no dia a dia. Ao meu co-orientador Dr. Luciano Puzer, pela ajuda e incentivo durante esse tempo de trabalho e convivência, contribuindo para a minha formação pessoal e profissional.

Agradeço ao auxílio oferecido pelo grupo do Prof. Dr. Luiz Juliano Neto da Universidade Federal de São Paulo ao ceder os substratos utilizados nos ensaios de inibição enzimática.

Agradeço a minha família, que é tudo em minha vida, meu porto seguro, os responsáveis por eu conseguir chegar até aqui e ter coragem para seguir em frente. Obrigada pelo amor incondicional, pela força nos piores momentos da minha vida, por acreditarem na minha capacidade e nunca me deixarem desistir do meu sonho.

À minha amiga-irmã Simone Michelin, pela amizade fraterna que Deus colocou em minha vida, nós sabemos como foi árduo esse tempo, mas uma amizade como a nossa faz todo esforço valer a pena. Obrigada por estar sempre ao meu lado, sem você tudo seria mais difícil. “A linguagem da amizade não é de palavras, mas de significados”. Conseguimos, Si!!!

Obrigada a Daniel Véras, pelo incentivo e força nos momentos de desânimo e cansaço, pela amizade e companheirismo fundamentais para me ajudar a vencer minhas dificuldades, com muito carinho.

À Andréia Gianotti, Viviane Nogaroto pela amizade, força e ajuda em tudo que precisei nesse tempo, pessoas que admiro muito e que terão meu carinho para sempre.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular, minha segunda casa, por todos os anos de amizade, histórias, conquistas, fracassos, aprendizado, especialmente as minhas amigas Márcia, Mylene, Rosseli, Raquel e Kesser. Agradeço também ao Fernando, pela grande ajuda com as várias placas de seqüenciamento e amizade. Em especial também à Andréa Costa e César Sommer, pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar prontamente, com todas suas experiências e dedicação. Agradeço a todos os estagiários, por toda a ajuda oferecida, auxiliando nas tarefas diárias, meu reconhecimento.

À Jacqueline Novoletti e Débora Fonseca, pelos anos de convivência e amizade, obrigada por todo o apoio e carinho que sempre me ofereceram durante o tempo que convivemos na república.

A meus demais amigos por fazerem parte da minha vida, estando perto ou distante, obrigada pela força, incentivo, carinho, atenção e torcida durante esses anos. Em especial, quero agradecer à Laura Masuda, Marina Ravanelli, Magali Vargas, Rafael Anchescki, Thiago Borin, Edmilson Gomes, Paulo Romero, Marcela Miranda, Melina Bason, Daniella Rossetto e Juliana Hori. Cada um de vocês tem um lugar especial no meu coração e me faz acreditar que o mundo pode ser melhor se houver fidelidade entre as pessoas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (PPGEv) pelo suporte e ajuda na realização deste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e ao Centro de Biotecnologia Molecular e Estrutural (CBME-CEPID) pelo financiamento do trabalho.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização de mais um sonho.

RESUMO

As serpinas são conhecidos inibidores de serino proteases, enzimas notáveis por participarem de inúmeros processos fisiológicos importantes. A proteólise não regulada pode levar ao surgimento de doenças e problemas funcionais e, portanto, a função dos inibidores é fundamental para o bom funcionamento do organismo. No genoma da cana-de-açúcar foi identificada uma ORF (*Open Reading Frame*) que codifica uma serpina. Visto que essa planta é de grande importância para a economia brasileira e muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos visando à melhora da produção e estratégias de defesa contra parasitas e, dado que na literatura não se tem descrita nenhuma serpina de cana-de-açúcar, o objetivo desse trabalho foi caracterizar uma serpina presente nessa planta, denominada cana-serpina. Para isso, a ORF contida no clone SCJLRT1015H07.g foi isolada e subclonada para posterior expressão recombinante e purificação da proteína. A canaserpina recombinante pura foi capaz de inibir a atividade enzimática da quimiotripsina e tripsina, com um valor de IC_{50} de 0,46 e 0,50 μ M, respectivamente. Além disso, a formação do complexo covalente SDS-estável foi visualizado no ensaio com tripsina, embora fracamente e no ensaio com a quimiotripsina foi possível visualizar apenas um possível complexo clivado. Portanto, esse trabalho procura contribuir para a identificação e caracterização da primeira serpina descrita para a cana-de-açúcar e trabalhos posteriores poderão identificar a especificidade em relação a outras enzimas, buscando relacioná-las a possíveis alvos endógenos.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	i
SUMÁRIO	ii
ÍNDICE DE TABELAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 PROTEASES	3
2.1.1 SERINO PROTEASES	3
2.2 INIBIDORES DE SERINO PROTEASES.....	5
2.2.1 Serpinas.....	5
2.2.2 Nomenclatura.....	6
2.2.3 Características estruturais e mecanismo de inibição	6
2.2.4 Importância dos resíduos de aminoácidos para a formação do complexo covalente	9
2.2.5 Fatores que influenciam a especificidade das serpinas em relação às proteases.....	11
2.2.6 Diversidade Funcional.	12
2.2.7 Serpinas de plantas.	13
3 OBJETIVOS.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Materiais	17
4.2 Métodos	18

4.2.1	Análises <i>in silico</i> da canaserpina	18
4.2.2	Isolamento da ORF do gene canaserpina e subclonagem no vetor de expressão pET28a.	18
4.2.3	Expressão da proteína canaserpina recombinante.....	20
4.2.4	Purificação da canaserpina.....	21
4.2.5	Ensaio de inibição contra serino proteases.....	22
4.2.6	Ensaio para verificar a formação do complexo covalente SDS-estável	23
5	RESULTADOS.....	24
5.1	Análises <i>in silico</i> da canaserpina	24
5.2	Isolamento da ORF do gene <i>canaserpina</i> que codifica a proteína canaserpina e subclonagem no vetor de expressão pET28a	26
5.3	Expressão e purificação da canaserpina	27
5.4	Ensaio de inibição contra serino proteases.....	28
5.5	Ensaio para verificar a formação do complexo covalente SDS-estável	28
6	DISCUSSÃO.....	30
7	CONCLUSÕES.....	35
8	REFERÊNCIAS	36

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 2.1 Seqüências de aminoácidos das alças do centro de reação de algumas serpinas. S: serpina, A1 (α 1-PI), A3 (α 1-ACT), A4 (calistatina), B2 (PAI-2), C1 (antitrombina), E2 (nexina 1), I1 (neuroserpina), A6 (CBG), B5 (maspina), F1 (PEDF) (Gettins, 2002).	11
Tabela 2.2. Funções e disfunções de algumas serpinas humanas (Law <i>et al.</i> , 2006).	13

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1. Representação da tríade catalítica da quimiotripsina (Polgár, 2005).	4
Figura 2.2. Representação da estrutura terciária de uma serpina no seu estado nativo. As folha- β as, sB e sC estão representadas em vermelho, azul e verde, respectivamente. A RCL situa-se no topo da molécula (Irving <i>et al.</i> , 2000).	7
Figura 2.3. Representação esquemática do mecanismo de inibição de uma protease pela serpina. (a): serpina no estado nativo em contato com a protease; (b): complexo não covalente tipo-Michaelis e; (c): complexo covalente final em que a protease encontra-se inativa (Gettins, 2002).	8
Figura 2.4. Representação esquemática resumida do mecanismo de inibição de uma protease pela serpina (Gettins, 2002).	8
Figura 4.1. Representação esquemática do plasmídeo pET28a usado como vetor de expressão.	20
Figura 5.1. Seqüências nucleotídica e protéica da canaserpina.	24
Figura 5.2. Alinhamento da proteína canaserpina com outras serpinas de plantas. WZCI (trigo: <i>Triticum aestivum</i>), Zx (cevada: <i>Hordeum vulgare</i>), canaserpina (<i>Saccharum officinarum</i>), AtSerp1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>). As caixas pretas indicam regiões com alta identidade. Os círculos destacam a região conservada P15-P10 (GT/SEAAA) e a cisteína na posição P1.	25
Figura 5.3. Amplificação da ORF correspondente à canaserpina. Análise em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando em 1: marcador Ladder 1kb (Invitrogen); 2: controle negativo; 3: canaserpina.	26

- Figura 5.4. Análise da expressão, teste de solubilidade e purificação da proteína canaserpina em SDS-PAGE 15% corado com Comassie Blue. Em 1: marcador de peso molecular; 2: pET28canaserpina em Rosetta (DE3) não induzido; 3: pET28canaserpina em Rosetta (DE3) após 16 horas de indução; 4: precipitado; 5: sobrenadante; 6 e 7: eluição da proteína canaserpina com tampão de eluição contendo 100 mM de imidazol..... 27
- Figura 5.5. Análise da atividade inibitória da canaserpina sobre a quimiotripsina (a) e tripsina (b)..... 28
- Figura 5.6. Análise da formação do complexo SDS-estável canaserpina: quimiotripsina após incubação por 30 minutos a 37 °C. Em 1: marcador de peso molecular; 2: canaserpina; 3: quimiotripsina; 4: razão molar inibidor: enzima de 5:1; 5: razão molar inibidor:enzima de 10:1. C* (complexo clivado) e I* (inibidor clivado). SDS-PAGE 15% corado com Comassie-Blue..... 29
- Figura 5.7. Análise da formação do complexo SDS-estável canaserpina: tripsina após incubação por 30 minutos a 37°C. Em 1: marcador de peso molecular; 2: canaserpina; 3: tripsina; 4: razão molar inibidor: enzima de 5:1; 5: razão molar inibidor:enzima de 10:1. C (complexo intacto), C* (complexo clivado) e I* (inibidor clivado). SDS-PAGE 15% corado com Comassie-Blue..... 29

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
cDNA	DNA complementar ao RNA mensageiro
cm	Centímetro
dNTPs	Desoxirribonucleosídeos 5'-trifosfatados (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kb	Quilobases
kDa	Quilo Dalton
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
M	Molar
mA	Miliampere
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MW	<i>Molecular Weight</i>
ng	Nanograma
Ni-NTA	Níquel-Ácido Nitriloacético
nm	Nanômetro
pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonylfluoride</i>
RCL	<i>Reactive Centre Loop</i> (alça do centro de reação)
Rpm	Rotações por Minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida sódio dodecil sulfato

1 INTRODUÇÃO

As peptidases vêm sendo objeto de estudo por muitos anos, já que constituem um grupo diversificado de proteínas com atividades catalíticas distintas. Essa especificidade relaciona-se às inúmeras funções fisiológicas desempenhadas em importantes processos biológicos. O grupo mais estudado das proteases é o das serino proteases, que são assim classificadas por possuírem um resíduo de serina no seu sítio catalítico. Estas enzimas desempenham papéis fundamentais para o bom funcionamento dos organismos.

A atividade destas enzimas deve ser estritamente controlada. Nesse sentido, o estudo de inibidores de serino proteases é importante, já que participam da regulação da proteólise. Dentre estes inibidores, destacam-se as serpinas, que apresentam uma grande diversidade funcional e estão presentes em vegetais, animais, bactérias e alguns vírus. Os membros dessa superfamília de proteínas possuem características estruturais terciárias comuns, como a presença de 3 folhas β (sA com 5 filamentos, sB com 6 filamentos e sC com 4 filamentos) e 8 a 9 α -hélices (hA-hI). As serpinas possuem ainda uma alça chamada alça do centro de reação, que interage com a protease e é fundamental para a atividade inibitória. O mecanismo de inibição envolve mudanças conformacionais e a formação de um complexo covalente entre a serpina e a protease, resultando na protease inativa e a serpina clivada na região da alça do centro de reação. Dependendo da composição de aminoácidos dessa região, as serpinas possuem distintas especificidades em relação a inúmeras proteases, com diferentes velocidades de reação. Por meio da comparação de seqüência de aminoácidos de diversas serpinas, sabe-se

que existem resíduos que ocupam posições conservadas e estudos são feitos para determinar as respectivas funções de acordo com as particularidades de cada proteína.

Além de participarem de processos fisiológicos, as serpinas estão envolvidas em determinadas doenças (serpinopatias), devido à formação de polímeros ou perda de função inibitória que está relacionada a uma via metabólica fundamental para o funcionamento normal de um organismo.

Em plantas, os estudos sobre as serpinas vêm aumentando, visando investigar o possível papel dessas proteínas contra patógenos que atacam os vegetais. Dentre esses, os mais estudados são trigo, cevada, arroz e centeio. Porém já foram identificadas serpinas em tomate, soja, abóbora, *Arabidopsis* e coníferas.

Os recentes projetos genoma de diversos organismos vegetais vêm contribuindo para o estudo sobre as serpinas e suas possíveis enzimas alvo, assim como na contribuição para encontrar as funções desempenhadas por tais proteínas nos próprios organismos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROTEASES

As peptidases são proteínas que causam a hidrólise de ligações peptídicas (Rawlings e Barrett, 1999). Também chamadas enzimas proteolíticas ou peptidases, estão presentes em plantas, animais e microorganismos, participando de funções e disfunções biológicas através do controle de síntese e degradação protéica (Leung-Toung et al., 2002).

As proteases podem ser classificadas e divididas em cinco grupos, de acordo com seus mecanismos catalíticos, o grupo reativo presente no sítio ativo, similaridades de seqüência e estruturas (Barret, 2004):

- cisteíno-proteases (apresentam um resíduo de cisteína no sítio ativo);
- serino-proteases (requerem um resíduo de serina nucleofílico);
- metalo-proteases (presença de um metal no sítio ativo);
- aspartil-proteases (possuem um resíduo de aspartato ativado) e;
- treonino-proteases (o sítio ativo apresenta um resíduo de treonina).

2.1.1 SERINO PROTEASES

Serino proteases são encontradas em vírus, bactérias e eucariotos, distribuídas em mais de vinte famílias (Rawlings *et al.*, 1993). Elas possuem importantes funções em processos biológicos, incluindo digestão, coagulação, fibrinólise, apoptose, migração celular, remodelagem tecidual e inflamação (Kapadia, *et al.*, 2003). Essas proteases compõem seis clãs (SA, SB, SC, SE, SF, SG), cada um sendo constituído por um variado número de famílias, como por exemplo: Família Quimotripsina (S1), Subtilisina (S8), Lisil endopeptidase (S5), Carboxipeptidase C (S10), entre outras (Rawlings *et al.*, 1993).

Em relação ao mecanismo catalítico, a tríade catalítica de três aminoácidos: serina (nucleófilo), aspartato (eletrófilo) e histidina (base) pode ocorrer com variações em determinados representantes das serino proteases. Além disso, a maioria das famílias apresenta resíduos de glicina conservados próximos à serina do sítio catalítico (Barrett, 1994). A primeira serino protease a ter sua estrutura terciária resolvida foi a quimiotripsina, contribuindo para a elucidação do mecanismo de ação. A tríade catalítica da quimiotripsina está representada na Figura 2.1 (Matthews *et al.*, 1977).

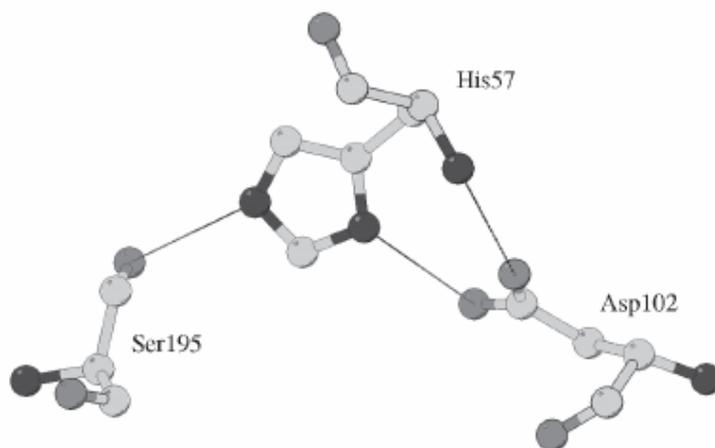


Figura 2.1. Representação da tríade catalítica da quimiotripsina (Polgár, 2005).

O mecanismo de catálise de serino proteases em geral envolve o ataque nucleofílico do átomo de carbono da carbonila do substrato, promovido pelo OH da serina que está presente no sítio ativo. Isso resulta em um intermediário tetraédrico, que carrega um oxianion. O ataque nucleofílico é auxiliado por uma base geral (grupo imidazol da histidina do sítio catalítico), que aceita o próton do grupo OH nucleófilo. O intermediário tetraédrico é rompido por um processo de catálise ácida geral, formando um intermediário acil enzima e

liberando o primeiro produto. O acil enzima é desacilado, com a molécula de água promovendo o ataque nucleofílico. O segundo produto é liberado e a enzima é regenerada (Polgár, 2005).

2.2 INIBIDORES DE SERINO PROTEASES

Levando-se em consideração a grande importância das proteínas nos processos biológicos, proteólises não reguladas ou indesejáveis podem levar a uma série de problemas funcionais e doenças como câncer, mal de Alzheimer, artrite, enfisema, entre outros. Portanto, inibidores de proteases têm potenciais utilidades em diversas intervenções terapêuticas (Powers *et al.*, 2002).

Muitos inibidores de serino proteases formam moléculas tetraédricas que mimetizam o estado intermediário tetraédrico formado durante o mecanismo de catálise enzimática, como é o caso do PMSF. Outros formam compostos estáveis de intermediários acil enzimas, como por exemplo, as serpinas (Hedstrom, 2002).

2.2.1 Serpinas

Dentre os inibidores de serino proteases, destacam-se as serpinas. Serpina é o nome dado à maior superfamília de inibidores de proteases e mais amplamente distribuída entre os reinos Archaea, Bactéria e Eukarya, além de estar presente também em vírus (Rawlings, *et al.*, 2004). As proteínas homólogas foram reconhecidas na década de 80, tendo como principal característica a inibição de serino-proteases, de onde provém o nome da superfamília, "Serine Protease Inhibitor" (Hunt e Dayhoff, 1980).

A partir dos estudos iniciais feitos com as proteínas humanas antitrombina, inibidor de protease- α_1 e ovalbumina, identificaram-se

similaridades na seqüência de aminoácidos, posteriormente relacionadas a um domínio estrutural altamente conservado na estrutura terciária das proteínas, de aproximadamente 350 resíduos de aminoácidos. Esse domínio está presente em todas as serpinas, porém há uma variação de tamanho devido a extensões nas regiões N- e/ou C-terminal, além de glicosilação, o que coloca a maioria das serpinas dentro de uma variação de massa molecular entre 40 a 60 kDa (Gettins, 2002).

2.2.2 Nomenclatura

Baseado em estudos filogenéticos, as serpinas foram classificadas em 16 clados (A-P), com os seguintes nomes: clado A (inibidor de protease- α_1), B (ovalbuminas intracelulares), C (antitrombina), D (co-fator II da heparina), E (nexina), F (α_1 -antiplasmina), G (inibidores de C1), H (HSP47), I (neuroserpina), J (serpinas do caranguejo ferradura), K (serpinas de insetos), L (serpinas de nemátodos), M (serpinas do *Schistosoma*), N (serpinas do vírus SPI1-2/CrmA-like), O (serpinas do vírus tipo SPI3-) e P (serpinas de plantas). Além disso, existem dez serpinas altamente divergentes, que não são classificadas em nenhum desses clados (Irving *et al.*, 2000 e Silverman *et al.*, 2001). As proteínas são nomeadas SERPINXy, onde X é o clado e y é o número dentro do clado.

2.2.3 Características estruturais e mecanismo de inibição

A estrutura terciária típica das serpinas (figura 2.2) é constituída por 3 folhas β (sA com 5 filamentos, sB com 6 filamentos e sC com 4 filamentos) e 8 a 9 α -hélices (hA-hI). Além disso, nas serpinas inibitórias, é fundamental a

presença da alça do centro de reação (RCL – “*reactive centre loop*”), que interage com a protease (Irving *et al.*, 2000).

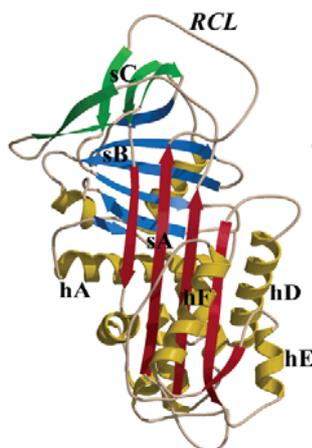


Figura 2.2. Representação da estrutura terciária de uma serpina no seu estado nativo. As folha- β as, sB e sC estão representadas em vermelho, azul e verde, respectivamente. A RCL situa-se no topo da molécula (Irving *et al.*, 2000).

O mecanismo de inibição envolve mudanças conformacionais, essenciais para a inibição efetiva da protease, que reconhece a alça do centro de reação como um potencial substrato. Assim, ocorre a formação de um complexo não covalente tipo-Michaelis (Figura 2.3b) e posterior clivagem da alça pela protease, seguindo-se um mecanismo de catálise típico de uma serino protease, levando à formação de um intermediário tetraédrico. Porém, a partir da formação do último intermediário acil enzima, podem ser seguidos dois caminhos, gerando produtos diferentes. Um deles é a continuação da reação de proteólise, em que o intermediário acil enzima é hidrolisado, resultando na liberação da serpina clivada e da enzima livre. O outro caminho resulta na inibição da protease em que a RCL é inserida dentro da folha- β sA, formando um filamento extra. Isso gera uma mudança conformacional dentro da serpina

e conseqüente deslocamento da protease do topo à base da molécula, resultando em um complexo covalente serpina-protease (figura 2.3c) no qual a protease se encontra cataliticamente inativa, devido às distorções sofridas no sítio ativo (Gettins, 2002).

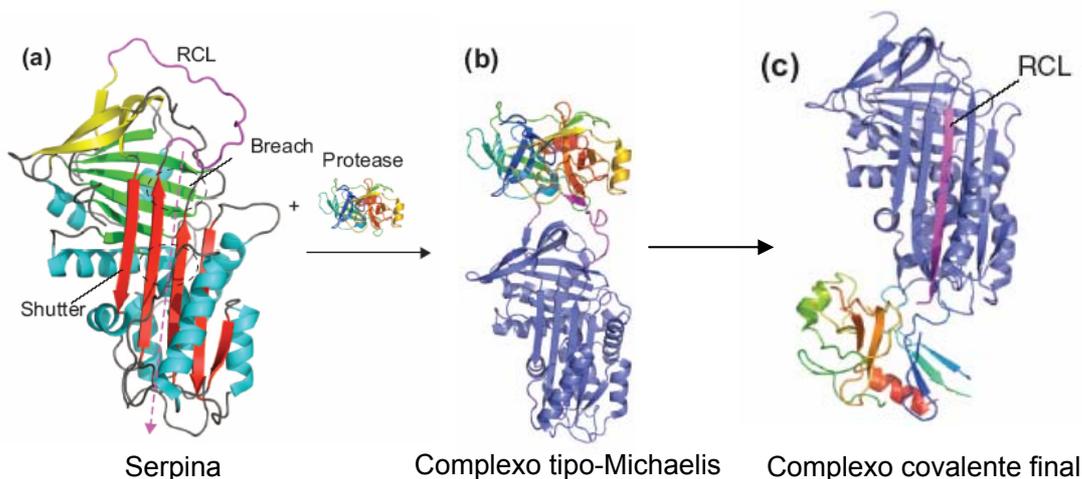


Figura 2.3. Representação esquemática do mecanismo de inibição de uma protease pela serpina. (a): serpina no estado nativo em contato com a protease; (b): complexo não covalente tipo-Michaelis e; (c): complexo covalente final em que a protease encontra-se inativa (Gettins, 2002).

Esse mecanismo pode ser resumido na figura 2.4, abaixo:

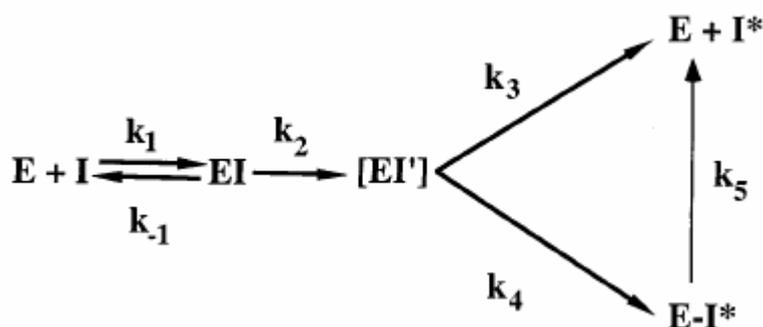


Figura 2.4. Representação esquemática resumida do mecanismo de inibição de uma protease pela serpina (Gettins, 2002).

A interação da enzima (E) e da serpina (I) leva à formação reversível do complexo não covalente tipo-Michaelis (EI) de acordo com a constante de velocidade k_1 . Em seguida ocorre a clivagem da ligação peptídica e o intermediário acil enzima (EI') é formado entre o sítio ativo da protease e o grupo carbonila do resíduo P1 da RCL, seguindo a constante de velocidade k_2 . A partir desse ponto, a RCL pode ser inserida dentro da folha- β sA, levando a enzima para a base da molécula e inibindo a sua atividade catalítica (E-I*) com velocidade controlada pela constante k_4 . Ou então a proteólise pode ser continuada, liberando a serpina clivada e a enzima livre, com a constante de velocidade k_3 . A constante k_5 indica a velocidade em que o acil enzima pode ser desacilado, sendo muito menor que k_3 . Portanto, a velocidade de inserção da alça do centro de reação no interior da serpina determina a eficiência da inibição, que é melhor quanto maior k_4 em relação à k_3 .

2.2.4 Importância dos resíduos de aminoácidos para a formação do complexo covalente

Os sítios que conferem especificidade às enzimas flanqueiam o sítio catalítico. São numerados do sítio catalítico S1-S n em direção à porção N-terminal da enzima e S1'-S n' em direção ao C-terminal. Os resíduos de aminoácidos do substrato que esses sítios acomodam são numerados P1-P n , em direção ao N-terminal e P1'-P n' , em direção ao C-terminal (Barrett, 2004).

A inserção da alça do centro de reação envolve a incorporação de uma seqüência de aminoácidos previamente exposta ao solvente e a composição dessa seqüência é importante para determinar a taxa de inserção. O

aminoácido que ocupa a posição P14 é o primeiro da seqüência que é inserido na folha- β sA, além de ser importante para manter a estabilidade (Gettins, 2002). O estudo com PAI-2 (*Plasminogen inhibitor activator*, tipo2) examinando interações da treonina em P14 com resíduos internos na estrutura do complexo PAI-2-peptídeo mostrou que a o par treonina/serina:tirosina é altamente conservado (Jankova *et al.*, 2001).

Embora a maioria das serpinas possua propriedades inibitórias frente a diferentes proteases, já foram identificadas serpinas que assumem outras funções, chamadas de serpinas não inibitórias. A comparação de seqüências de aminoácidos de diversas serpinas demonstrou uma alta conservação nos resíduos P15-P10 (GT/SEAAA), para as que possuem capacidade inibitória. Além disso, os resíduos P12-P9 mostram conservação de alanina maior que 50% em cada posição. Essas informações podem ser vistas na tabela 2.1 (Gettins, 2002).

Tabela 2.1 Seqüências de aminoácidos das alças do centro de reação de algumas serpinas. S: serpina, A1 (α 1-PI), A3 (α 1-ACT), A4 (calistatina), B2 (PAI-2), C1 (antitrombina), E2 (nexina 1), I1 (neuroserpina), A6 (CBG), B5 (maspina), F1 (PEDF) (Gettins, 2002).

S	P15	P14	P13	P12	P11	P10	P9	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
A1	G	T	E	A	A	G	A	M	F	L	E	A	I	P	M	S	I	P	P
A3	G	T	E	A	S	A	A	T	A	V	K	I	T	L	L	S	A	L	V
A9	G	T	E	A	A	A	A	T	T	F	A	I	K	F	F	S	A	Q	T
A4	G	T	E	A	T	A	A	T	T	T	K	F	I	V	R	S	K	D	G
B2	G	T	E	A	A	A	G	T	G	G	V	M	T	G	R	T	G	H	G
C1	G	S	E	A	A	A	S	T	A	V	V	I	A	G	R	S	L	N	P
E2	G	T	K	A	S	A	A	T	T	A	I	L	I	A	R	S	S	P	P
I1	G	S	E	A	A	A	V	S	G	M	I	A	I	S	R	M	A	V	L
A6	G	V	D	T	A	G	S	T	G	V	T	L	N	L	T	S	K	P	I
B5	G	G	D	S	I	E	V	P	G	A	R	I	L	Q	H	K	D	E	L
F1	G	A	G	T	T	P	S	P	G	L	Q	P	A	H	L	T	F	P	L

2.2.5 Fatores que influenciam a especificidade das serpinas em relação às proteases.

A região da alça do centro de reação (P4-P4') contribui para as diferentes especificidades das serpinas em relação às proteases, já que possui uma grande variação de aminoácidos. Muitos estudos têm sido feitos no sentido de verificar efeitos de mutações nessas posições. Mutantes em P1 do inibidor de protease- α , em que a metionina foi mutada para valina, isoleucina, alanina, leucina, fenilalanina e arginina, demonstraram diferenças nas taxas de reação

com proteases e aumento ou diminuição da inibição frente a catepsina G e elastase (Jallat, *et al.*, 1986).

Em geral, pode-se concluir de estudos como o citado acima, que em ordem de importância na contribuição para a especificidade da serpina, seguem-se os resíduos que ocupam a posição P1, P2 e P3. Além disso, destacam-se também as interações entre as moléculas da serpina-protease e serpina-RCL (Gettins, 2002).

2.2.6 Diversidade Funcional.

Em humanos, a maioria das serpinas possui atividade inibitória e estão envolvidas em processos de resposta inflamatória, como a antitripsina e antiqumiotripsina (Law *et al.*, 2006), coagulação e fibrinólise (antitrombina, cofator II de heparina, nexina, inibidor de protease C). São importantes serpinas extracelulares a α_1 -PI (inibidor de elastase), α -antiplasmina (inibidor de plasmina), inibidor de C1 (inibe os componentes C1r e C1s do complemento) e neuroserpina (inibidor de tpa, uPA e tripsina), inibidores de proteínas relacionadas a diversos processos biológicos. Entre as serpinas que não possuem propriedades inibitórias e, portanto, assumem outras funções, destacam-se aquelas que se ligam a hormônios ou contribuem para a supressão de tumor (maspina), além de chaperonas (CBP-1 e CBP-2) (Gettins, 2002).

Por participarem de processos biológicos importantes, a deficiência de algumas serpinas pode levar a disfunções denominadas serpinopatias, resultantes ou do acúmulo de polímeros intracelulares que se tornam tóxicos para as células ou da perda de função de inibidores importantes (Davies e

Lomas, 2008). Em 1972, Berg e Eriksson identificaram a ocorrência de doenças no fígado, como a cirrose, com a deficiência de α -antitripsina e em 2001, Bradshaw *et al.* descreveram a encefalopatia familiar por meio do acúmulo de corpos de inclusão de neuroserpina.

Algumas serpinas, suas funções e disfunções podem ser vistas na tabela 2.2.

Tabela 2.2. Funções e disfunções de algumas serpinas humanas (Law *et al.*, 2006).

Serpina	Nome alternativo	Proteína alvo ou função	Envolvimento em doença
SERPINA1	Antitripsina	Extracelular: inibidor de neutrofil elastase	Deficiência: enfisema Polímeros: cirrose
SERPINA3	Antiquimiotripsina	Extracelular: inibidor de catepsina G	Deficiência: enfisema
SERPINA5	Inibidor de proteína C (PAI-3)	Extracelular: inibidor da proteína C ativa	Angiodema
SERPINB5	Maspina	Intracelular: não-inibitória, inibe metástase por um mecanismo não conhecido	Down-regulação e/ou localização intracelular ligada à progressão do tumor
SERPINC1	Antitrombina	Extracelular: inibidor de trombina e fator Xa	Deficiência: trombose
SERPIND1	Cofator II de heparina	Extracelular: inibidor de trombina	Pode contribuir para o risco de trombose quando junto com outras deficiências
SERPINF2	α 2-antiplasmina	Extracelular: inibidor de plasmina	Atividade fibrinolítica irrestrita, sangramento
SERPIN11	Neuroserpina	Extracelular: inibidor de tPA, uPa e plasmina	Polímeros: demência

2.2.7 Serpinas de plantas.

Dentre as plantas investigadas em relação à presença de serpinas, estão o trigo, cevada, centeio, aveia, arroz, soja, algodão, tomate, pepino, abóbora,

Arabidopsis e semente de maçã, além de serem encontradas também em musgo e coníferas (Roberts e Hejgaard, 2008).

No final da década de 70, foi descoberta uma proteína de aproximadamente 43 kDa em cevada, que posteriormente, foi denominada de proteína Z e identificada como serpina do grão de cevada (Hejgaard *et al.*, 1985).

Desde então, novas serpinas foram sendo identificadas e caracterizadas. Dahl *et al.*, em 1996, realizaram a expressão heteróloga de três serpinas de plantas, sendo uma de trigo e duas de cevada: WSZ1, BSZ4 e BSZx. Investigando as propriedades inibitórias de cada uma, verificaram diferentes especificidades inibitórias em relação à tripsina, quimiotripsina e catepsina G, resultado importante já que a BSZx pode ter uma possível função regulatória associada com desenvolvimento da planta ou polinização (Dahl *et al.*, 1996a). Em outro trabalho no mesmo ano, Dahl *et al.* demonstraram que BSZx inibe e forma complexos SDS-estáveis com alguns fatores de coagulação humanos, como calicreína plasmática, fator VIIa/STF, trombina e fator Xa (Dahl *et al.*, 1996b).

No trigo, cinco serpinas foram expressas de forma recombinante e foi verificada a presença de Gln-Gln em P1-P1' ou apenas Gln em P1'. Apesar de não ser comum encontrar essas seqüências compondo essa região das serpinas, elas possuem atividade inibitória frente a proteases, além de serem semelhantes no domínio rico em glutamina presente em proteínas de armazenamento prolaminas, sugerindo uma possível função inibitória de proteases de insetos que as utilizam para degradar proteínas de plantas (Ostergaard *et al.*, 2000).

Uma serpina presente no floema de *Cucurbita maxima* foi identificada como sendo capaz de inibir especificamente elastase, sendo que a expressão da proteína é regulada com o desenvolvimento da planta e pode exercer uma função nos elementos crivados do floema. Além disso, a correlação inversa entre a expressão dessa serpina e a sobrevivência de afídios propõe um função de defesa contra patógenos, embora não tenha sido encontrada a mesma relação em experimentos *in vitro* (Yoo *et al.*, 2000).

Em 2006, Vercammen *et al.* identificaram a serpina AtSerp1 de *Arabidopsis thaliana* como um potente inibidor da metacaspase AtMC9, que não tem sua função determinada ainda, porém ambas as proteínas se localizam no espaço extracelular e suas funções provavelmente estão interligadas (Vercammen *et al.*, 2006).

Considerando a importância das serpinas, e da cana-de-açúcar, estabelecemos para este trabalho os objetivos a seguir.

3 OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo geral a caracterização *in silico* de uma serpina da cana-de-açúcar e produção recombinante dessa proteína em sistema procarionte para posteriores análises de inibição enzimáticas.

Para isso, atingiram-se os seguintes objetivos específicos:

- 1) Análises *in silico* de uma serpina da cana-de-açúcar denominada canaserpina, que teve a sua ORF identificada no clone SCJLRT1015H07.g (SUCEST-Fapesp);
- 2) Isolamento e amplificação da ORF que codifica a canaserpina;
- 3) Subclonagem em vetor de expressão;
- 4) Expressão da proteína canaserpina recombinante em *E. coli*;
- 5) Purificação da canaserpina por meio de cromatografia de afinidade;
- 6) Testes de inibição enzimática utilizando substratos fluorogênicos
- 7) Ensaio com as enzimas quimiotripsina e tripsina para verificar se há formação do complexo covalente SDS-estável

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

O clone contendo o gene que codifica a canaserpina foi adquirido comercialmente junto ao Banco de Clones da UNESP-Jaboticabal (BCCC), que mantém os clones gerados no Projeto Genoma da Cana-de-Açúcar (SUCEST, Sugar Cane EST Project -Fapesp).

Oligonucleotídeos específicos foram sintetizados pela Prodimol Biotecnologia S/A.

Para realizar a subclonagem do gene canaserpina foi utilizado o vetor pET28a (Novagen). As enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI* foram adquiridas da Fermentas, assim como a T4 DNA ligase e a *Taq* DNA polimerase. Foi utilizada a cepa da bactéria *E. coli* DH5 α competente (Novagen).

Para a expressão da proteína canaserpina, foi utilizada a cepa de *E. coli* competente Rosetta (DE3) (Novagen), IPTG (USB) e para purificação, resina de níquel Ni-NTA Superflow da Qiagen.

Os ensaios de atividade enzimática foram feitos no fluorímetro F-2500 HITACHI e os substratos Abz-K-L-F-S-S-K-Q-EDDnp e Abz-K-L-R-S-S-K-Q-EDDnp cedidos pelo grupo do Prof. Dr Luiz Juliano Neto da Universidade Federal de São Paulo.

A maioria dos reagentes utilizados para o preparo de soluções durante o trabalho foi da marca Merck (grau analítico P.A.). Os marcadores de peso molecular utilizados foram o *GeneRuler 1Kb DNA Ladder* (Fermentas) e o *Bench Mark Protein Ladder* (Invitrogen). Os antibióticos utilizados foram Ampicilina (USB), Cloranfenicol (USB), Kanamicicina (GIBCO), o IPTG da

Invitrogen e o X-GAL da USB. Os meios de cultura LB (*Luria-Bertani*) líquido e ágar foram da marca USB.

4.2 Métodos

4.2.1 Análises *in silico* da canaserpina.

Foram utilizados os softwares Multalin (Corpet, 1998) (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>), BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul *et al.*, 1997) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) para a análise das seqüências dos clones e PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/form.html>) (Nakai & Horton, 1999) para predição de seqüência sinal. Para tais análises foi utilizada a proteína contendo 400 aminoácidos que compõem a proteína madura.

4.2.2 Isolamento da ORF do gene canaserpina e subclonagem no vetor de expressão pET28a.

A região codificadora do gene da canaserpina, correspondente à proteína madura foi amplificada a partir do clone SCJLRT1015H07.g (SUCEST), utilizando oligonucleotídeos específicos, sendo que no *sense*, foi inserido o sítio para a enzima de restrição *NdeI* e no oligonucleotídeo *antisense* foi inserido o sítio para a enzima de restrição *EcoRI*.

A amplificação deu-se por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se: 30 ng de DNA, 10 pmol de cada oligonucleotídeo (serp1F CATATGGCCGCGCCGACATC, com o sítio de *NdeI* sublinhado e serp1R GAATTCTATGGAGCAAGCAGGGGATTC, com o sítio da *EcoRI* sublinhado),

0,16 mM de DNTP, 0,83 mM de $MgCl_2$, 3 uL de tampão 10x da *Taq* DNA polimerase, 0,5 uL de *Taq* DNA polimerase e um volume final de 30 uL. Essa reação foi realizada no termociclador PTC-100™ MJ Research Thermocycler da seguinte maneira: 2 minutos a 95 °C, 45 segundos a 95 °C, um minuto a 48 °C, um minuto a 72 °C, 35 repetições a partir do passo2 e 20 minutos a 72 °C.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% (GibCo BRL) e purificados do gel usando-se kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Em seguida o fragmento de interesse foi ligado ao vetor de propagação pTZ57/RT por meio de uma reação com a enzima T4 DNA ligase, durante 16 horas a 4 °C, numa proporção 3:1 de inserto:vetor. Os plasmídeos de propagação contendo a ORF da canaserpina foram submetidos à clivagem com as enzimas *NdeI* e *EcoRI*. O fragmento de interesse foi então ligado ao vetor de expressão pET28a (figura 4.1) previamente clivado com as mesmas enzimas. Isso possibilitou a subclonagem direcionada do fragmento de interesse por meio da reação com a T4 DNA ligase durante 16 horas a 4 °C, na proporção de inserto:vetor de 3:1.

Com isso, foi possível fazer a ligação do fragmento de interesse em fase com uma seqüência codificadora de 6 histidinas, na região N-terminal desse vetor de expressão, usando para isso a enzima T4 DNA ligase, durante 16 horas a 4°C, com a proporção de inserto:vetor de 3:1.

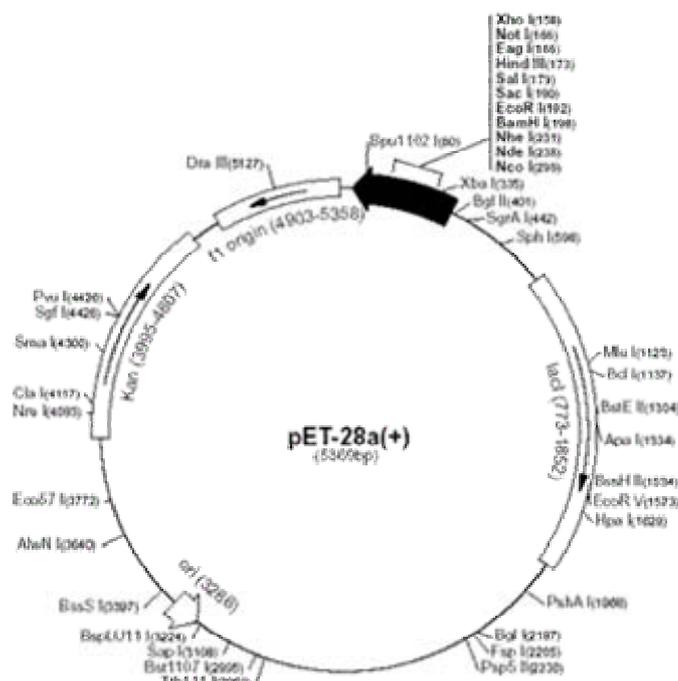


Figura 4.1. Representação esquemática do plasmídeo pET28a usado como vetor de expressão.

As ligações foram utilizadas para transformar células de *E.coli* DH5 α CaCl₂ competentes (5 μ L da reação de ligação) das quais foram selecionadas aqueles clones contendo o plasmídeo recombinante pET28canaserpina.

Os recombinantes selecionados foram confirmados por meio de PCR, usando os oligonucleotídeos que flanqueiam o gene, observando-se tamanho esperado de 1200 pb e em seguida, seqüenciados utilizando-se o MEGABACE.

4.2.3 Expressão da proteína canaserpina recombinante

Células de *E. coli* Rosetta (DE3) CaCl₂ competentes foram transformadas com o plasmídeo recombinante pET28canaserpina. A partir de uma colônia, foi feito um pré-inóculo contendo 10 mL de LB adicionado de kanamicina (25 mg/ μ L) e cloranfenicol (25 mg/ μ L). Em seguida, foi feita uma diluição 1:100, colocando-se 5 mL do inóculo em 500 mL de LB líquido contendo kanamicina

(25 mg/ μ L) e cloranfenicol (25 mg/ μ L). A cultura foi mantida sob agitação de 200 rpm a 37 °C até atingir uma densidade óptica de 0,5 a 600 nm, quando a expressão das proteínas foi induzida pela adição de IPTG para concentração final de 0,2 mM, na temperatura de 30 °C durante 16 horas.

4.2.4 Purificação da canaserpina

Após a indução, a cultura foi recolhida em frascos apropriados e centrifugada por 5 minutos a 4 °C, 8000 rpm, em uma centrífuga Sorval (RC5C plus). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 25 mL de tampão de lise (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8,0).

As células foram rompidas utilizando-se um sonicador Vibra cell™ (Sonic & Materials Inc.), em uma amplitude de 20 mA, durante 1 minuto, com intervalos de 30 segundos, num total de 13 vezes.

O produto lisado foi centrifugado por 15 minutos a 13000 rpm, 4 °C para separação das frações solúveis e insolúveis, as quais foram analisadas em SDS-PAGE 15% para o teste de solubilidade (Laemmli, 1970).

Após o teste de solubilidade, verificou-se que a maior parte da proteína encontrava-se insolúvel. Porém, também havia proteína na fração solúvel, o que possibilitou a posterior purificação por meio de cromatografia de afinidade em resina contendo níquel. Para isso, uma coluna de 15 cm foi preenchida com 3 ml de resina; foi lavada com 3 volumes de água (1 volume = 3 mL) e recarregada com 1 volume de sulfato de níquel 0,1M. Em seguida, foi lavada novamente com 3 volumes de água e equilibrada com 5 volumes de tampão de lise. O sobrenadante foi adicionado à coluna e recolhido (eluato). Então a

coluna foi lavada com 3 volumes de tampão de lise e a fração recolhida foi denominada eluato 1.

Após esse processo iniciou-se a eluição da proteína utilizando-se o tampão de eluição pH 8,0 (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, imidazol 250 mM) nas concentrações de imidazol: 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM e 250mM. Foram aplicadas duas vezes cada tampão (cada um com um volume de 3 mL em um gradiente crescente e alíquotas foram recolhidas). As frações obtidas na purificação foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

A diálise das frações contendo a proteína pura foi feita utilizando-se uma membrana de diálise de 14000 MW (Pierce) mergulhada em 1 litro de tampão Tris-HCl 40 mM, pH 7,5 durante 16 horas sob agitação a 4 °C.

4.2.5 Ensaios de inibição contra serino proteases

A proteína pura foi utilizada nos ensaios de inibição contra as serino proteases quimiotripsina e tripsina. Nestes ensaios, foram utilizados dois peptídeos sintéticos com supressão intramolecular de fluorescência contendo o ácido *orto*-aminobenzóico (Abz) como sonda fluorescente e o N-[2,4-dinitrofenil]-etilenodiamino (EDDnp) como grupamento supressor de fluorescência. As variações da fluorescência foram detectadas no fluorímetro Hitachi 2500, nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 320 nm e 420 mn, respectivamente.

Para fazer a curva de inibição da quimitripsina pela serpina, foi utilizado o substrato Abz-K-L-F-S-S-K-Q-EDDnp. A enzima (0,16 nM final) foi incubada a 37 °C sob agitação por 5 minutos, seguida da adição do substrato para uma

concentração final de 3 ng e a fluorescência foi monitorada por 200 segundos. Em seguida, realizou-se o mesmo procedimento, com adições de concentrações crescentes de serpina (0,25, 0,5, 0,96, 1,4 μ M finais). Para verificar a atividade inibitória da serpina sobre a tripsina, os passos foram os mesmos, porém utilizando-se o substrato Abz-K-L-R-S-S-K-Q-EDDnp e concentrações de serpina finais de 0,25, 0,5, 0,96, 1,4, 2,2 μ M. Os dados foram analisados com a ajuda do programa GRAFIT versão 3.0, para construir as curvas de inibição e calcular os valores de IC₅₀.

4.2.6 Ensaio para verificar a formação do complexo covalente SDS-estável

Para verificar se a canaserpina estava formando o complexo covalente com quimiotripsina e tripsina, duas razões de massa molecular (inibidor:enzima) de 5:1, e 10:1 foram incubadas durante 30 minutos a 37 °C. As amostras adicionadas de tampão redutor foram fervidas por 5 minutos e analisadas em SDS-PAGE 15%.

5 RESULTADOS

5.1 Análises *in silico* da canaserpina

A ORF contida no clone SCJLRT1015H07.g e subclonada no vetor de expressão pET28a está representada na figura 5.1.

M	A	A	A	D	I	R	L	S	I	A	G	Q	T	R
ATG	GCC	GCC	GCC	GAC	ATC	CGC	CTC	TCC	ATC	GCT	GGC	CAG	ACA	CGA
F	A	L	R	L	T	A	A	L	S	S	N	T	A	A
TTC	GCG	CTC	CGC	CTC	ACC	GCC	GCG	CTC	TCC	TCG	AAC	ACC	GCC	GCT
P	A	R	N	T	A	F	S	P	L	S	L	H	V	V
CCC	GCC	AGA	AAC	ACC	GCC	TTC	TCC	CCG	CTC	TCC	CTC	CAC	GTC	GTG
L	S	L	L	A	A	G	A	G	H	A	T	R	D	Q
CTC	AGC	CTC	CTC	GCC	GCC	GGC	GCG	GGC	CAC	GCC	ACG	CGC	GAT	CAG
L	L	T	A	L	G	G	G	D	E	P	V	A	A	E
CTG	CTC	ACC	GCG	CTC	GGC	GGA	GGC	GAT	GAG	CCG	GTC	GCA	GCC	GAG
I	L	H	A	L	S	E	Q	M	V	Q	L	V	L	A
ATC	CTG	CAC	GCG	CTC	TCT	GAG	CAG	ATG	GTG	CAG	CTT	GTG	CTC	GCT
D	G	S	G	A	G	G	P	R	V	A	F	A	D	A
GAC	GGG	TCC	GGA	GCC	GGC	GGC	CCG	CGG	GTC	GCC	TTC	GCC	GAC	GCT
V	F	V	D	A	S	L	K	L	K	S	A	F	E	D
GTC	TTC	GTC	GAC	GCG	TCG	CTG	AAG	CTG	AAG	TCG	GCC	TTC	GAG	GAT
V	A	V	G	K	Y	K	A	E	T	H	S	V	D	F
GTC	GCC	GTC	GGA	AAG	TAC	AAG	GCC	GAG	ACG	CAC	TCT	GTC	GAC	TTC
R	E	K	A	A	Q	V	A	G	E	V	N	S	W	V
AGG	GAA	AAG	GCA	GCA	CAA	GTT	GCT	GGT	GAA	GTG	AAC	TCC	TGG	GTA
E	K	V	T	S	G	L	I	K	E	L	L	A	T	G
GAG	AAA	GTG	ACC	TCA	GGT	CTA	ATC	AAA	GAG	CTG	CTT	GCC	ACC	GGG
D	L	L	I	R	P	T	R	L	V	L	G	N	A	L
GAT	CTG	TTG	ATC	AGA	CCC	ACC	AGG	CTG	GTT	CTT	GGC	AAT	GCA	CTC
Y	F	K	G	A	W	T	E	K	F	D	A	S	Q	T
TAT	TTC	AAA	GGA	GCT	TGG	ACT	GAG	AAG	TTC	GAC	GCA	TCT	CAG	ACA
K	D	G	E	F	H	L	L	D	G	S	V	Q	A	A
AAA	GAC	GGT	GAG	TTC	CAC	CTT	CTT	GAT	GGG	GGC	TCA	GTT	CAA	GCA
P	F	M	S	S	R	K	D	Q	Y	I	A	S	Y	D
CCT	TTC	ATG	TCC	AGC	AGA	AAG	GAT	CAA	TAT	ATT	GCG	TCT	TAC	KAC
N	F	K	V	L	K	L	P	Y	Q	R	G	E	D	K
AAC	TTT	AAG	GTG	CTT	AAG	CTC	CCT	TAC	CAA	CGA	GGT	GAG	GAT	AAG
R	Q	F	S	M	Y	I	L	L	P	E	A	R	D	G
AGG	CAG	TTC	TCC	ATG	TAC	ATA	CTT	CTT	CCA	GAA	GCA	CGA	GAT	GGA
L	W	S	L	A	E	K	L	S	S	E	P	E	F	M
CTC	TGG	AGC	TTG	GCT	GAA	AAA	TTG	AGC	TCT	GAG	CCC	GAG	TTC	ATG
E	E	H	V	P	T	R	K	V	P	V	G	Q	F	K
GAG	GAG	CAT	GTC	CCG	ACG	AGG	AAG	GTT	CCG	GTT	GGG	CAG	TTC	AAA
V	P	K	F	K	L	S	F	G	F	E	A	T	D	L
GTC	CCC	AAG	TTC	AAG	TTA	TCC	TTT	GGG	TTC	GAA	GCA	ACC	GAT	TTG
L	K	G	L	G	V	E	L	P	F	S	S	E	A	D
CTA	AAA	GGA	TTG	GGG	GTT	GAG	CTA	CCA	TTT	AGC	TCA	GAA	GCA	GAT
L	S	E	L	V	H	L	P	A	G	Q	K	Q	N	L
CTG	TCA	GAG	TTG	GTT	CAT	TTG	CCA	GCA	GGA	CAG	AAA	CAG	AAC	CTG
C	V	S	S	I	F	H	K	S	F	V	E	V	N	E
TGT	GTT	TCA	TCC	ATT	TTC	CAC	AAG	TCG	TTT	GTC	GAA	GTA	AAC	GAG
E	G	T	E	A	A	A	A	S	A	V	V	V	R	F
GAA	GGA	ACG	GAG	GCC	GCC	GCC	GCA	TCT	GCT	GTA	GTG	GTT	AGG	TTC
C	S	F	T	M	P	T	D	F	I	A	D	H	P	F
TGT	TCA	TTC	ACG	ATG	CCC	ACG	GAT	TTC	ATC	GCG	GAT	CAC	CCT	TTC
L	F	L	I	R	E	D	T	T	G	V	L	L	F	V
CTG	TTC	CTG	ATT	CGT	GAA	GAC	ACA	ACT	GGT	GTG	CTG	CTG	TTC	GTC
G	H	V	V	N	P	L	L	A	P	@				
GGT	CAT	GTG	GTG	AAT	CCC	CTG	CTT	GCT	CCA	TAG				

Figura 5.1. Sequências nucleotídica e protéica da canaserpina.

Com o alinhamento da seqüência de aminoácidos da canaserpina com outras serpinas de plantas foi possível identificar a presença da região conservada nos resíduos P15-P10 (GT/SEAAA), que é encontrada nas serpinas com capacidade inibitória e a presença de uma cisteína na posição P1 (Figura 5.2).

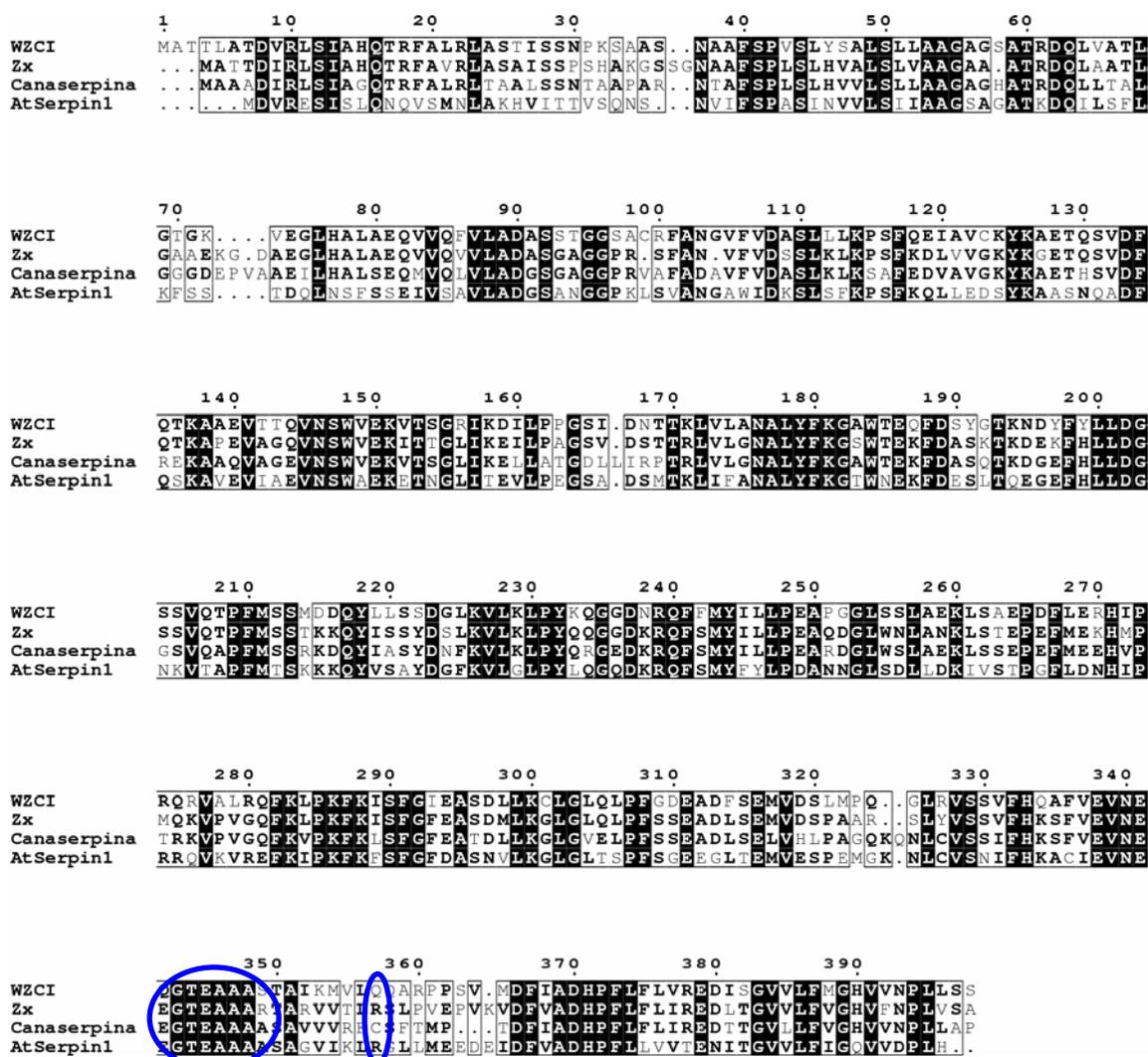


Figura 5.2. Alinhamento da proteína canaserpina com outras serpinas de plantas. WZCI (trigo: *Triticum aestivum*), Zx (cevada: *Hordeum vulgare*), canaserpina (*Saccharum officinarum*), AtSerp1n1 (*Arabidopsis thaliana*). As caixas pretas indicam regiões com alta identidade. Os círculos destacam a região conservada P15-P10 (GT/SEAAA) e a cisteína na posição P1.

Analisando a ORF, observamos que a identidade com outras serpinas baseada em alinhamentos ocorre a partir da segunda metionina e, portanto, ela foi considerada como sendo a metionina iniciadora. (MGPFLSCVSKKPPPRPRSTMAAADIRLSIAGQTRFA...).

A partir da análise de predição de seqüência sinal, verificou-se que a proteína não possui provável seqüência de peptídeo sinal, provavelmente localizando-se na região intracelular.

5.2 Isolamento da ORF do gene *canaserpina* que codifica a proteína *canaserpina* e subclonagem no vetor de expressão pET28a

O isolamento da ORF correspondente à *canaserpina* realizado por meio de PCR, foi analisado em gel de agarose 1%, com o correspondente tamanho esperado de aproximadamente 1200 pb (Figura 5.3).

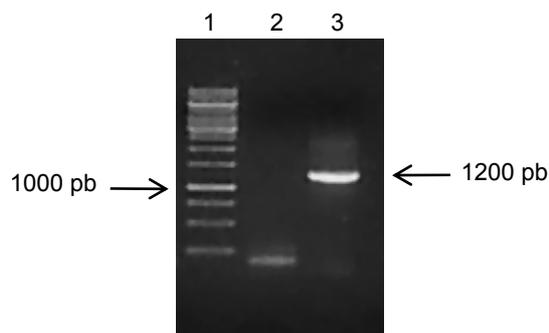


Figura 5.3. Amplificação da ORF correspondente à *canaserpina*. Análise em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando em 1: marcador Ladder 1kb (Invitrogen); 2: controle negativo; 3: *canaserpina*.

O fragmento de interesse foi ligado no vetor de expressão pET28a e o produto de ligação foi transformado em *E. coli* DH5 α CaCl₂ competentes para análise de recombinantes, que tiveram suas seqüências confirmadas por meio de seqüenciamento.

5.3 Expressão e purificação da canaserpina

A expressão da canaserpina em *E. coli* Rosetta (DE3), transformada com o plasmídeo recombinante pET28canaserpina, se deu por meio da indução com 0,2 mM de IPTG. A indução em 30 °C durante 16h, sob agitação de 200 rpm possibilitou a obtenção de proteína solúvel suficiente para ser purificada por meio de cromatografia de afinidade em resina de níquel. Sendo assim, a proteína canaserpina contendo a seqüência de histidinas proveniente do vetor pET28a (1,5 kDa) ligou-se especificamente à resina de níquel, sendo eluída com tampão de eluição contendo 100 mM de imidazol (Figura 5.4).

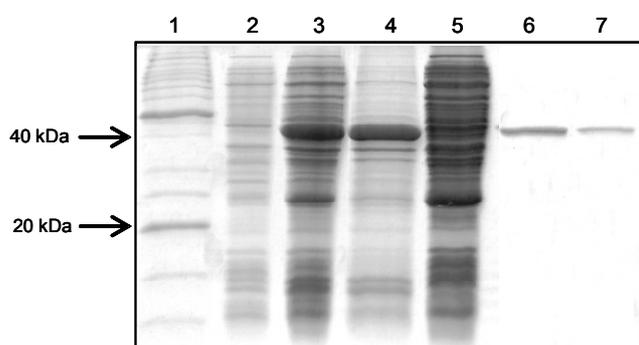


Figura 5.4. Análise da expressão, teste de solubilidade e purificação da proteína canaserpina em SDS-PAGE 15% corado com Comassie Blue. Em 1: marcador de peso molecular; 2: pET28canaserpina em Rosetta (DE3) não induzido; 3: pET28canaserpina em Rosetta (DE3) após 16 horas de indução; 4: precipitado; 5: sobrenadante; 6 e 7: eluição da proteína canaserpina com tampão de eluição contendo 100 mM de imidazol.

5.4 Ensaios de inibição contra serino proteases

Com os resultados obtidos por análise de unidade arbitrária de fluorescência por minuto (UAF/min) em relação à atividade inibitória da canaserpina sobre quimiotripsina e tripsina, foi possível construir uma curva de inibição e calcular o valor de IC_{50} (concentração de inibidor necessária para reduzir em 50% a atividade da enzima em estudo), como mostram as figuras 5.5a e 5.5b.

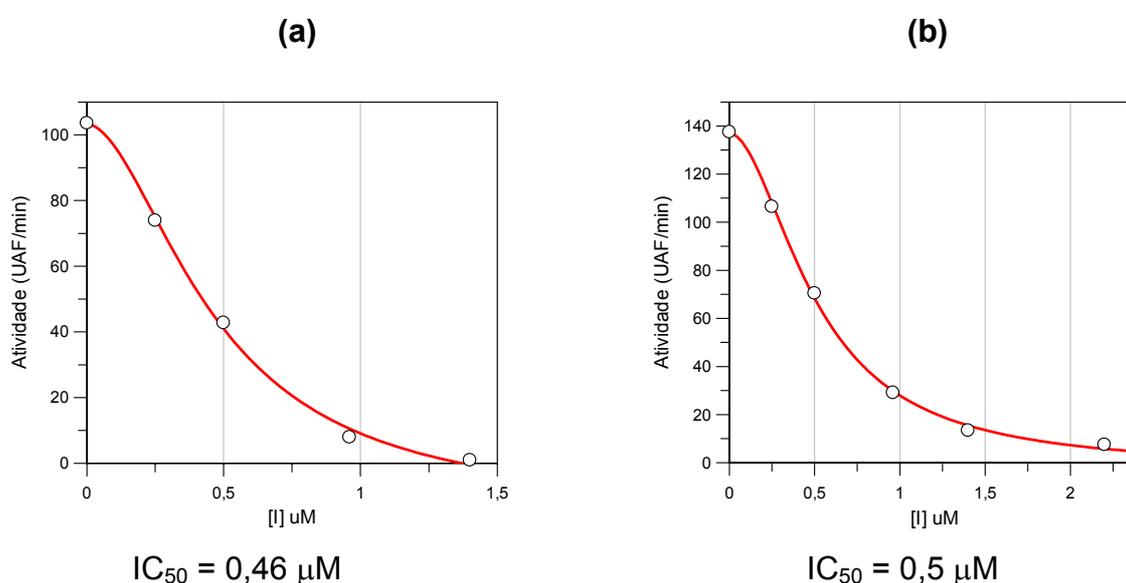


Figura 5.5. Análise da atividade inibitória da canaserpina sobre a quimiotripsina (a) e tripsina (b).

5.5 Ensaio para verificar a formação do complexo covalente SDS-estável

Para o ensaio feito com a quimiotripsina, não foi possível observar a formação do complexo intacto canaserpina:quimiotripsina, com o tamanho esperado de aproximadamente 70 kDa. Porém, nas duas razões molares utilizadas, foi possível visualizar uma banda correspondente ao complexo

clivado, além de verificar a clivagem da cana-serpina, como pode ser visto na Figura 5.6.

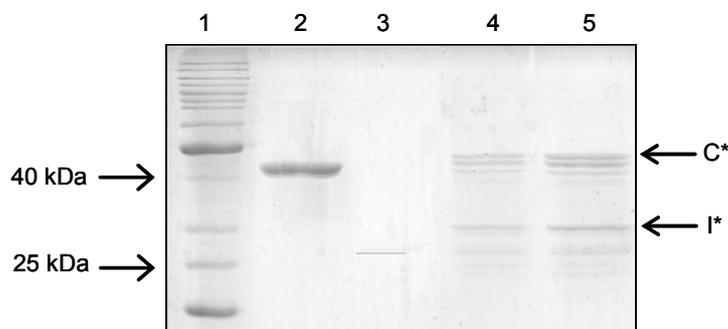


Figura 5.6. Análise da formação do complexo SDS-estável canaserpina: quimiotripsina após incubação por 30 minutos a 37 °C. Em 1: marcador de peso molecular; 2: canaserpina; 3: quimiotripsina; 4: razão molar inibidor: enzima de 5:1; 5: razão molar inibidor:enzima de 10:1. C* (complexo clivado) e I* (inibidor clivado). SDS-PAGE 15% corado com Comassie-Blue.

No ensaio feito com a tripsina, foi possível visualizar a banda correspondente ao complexo intacto canaserpina:tripsina (68 kDa). Também pode-ser verificar a presença do complexo e inibidor clivados (Figura 5.7).

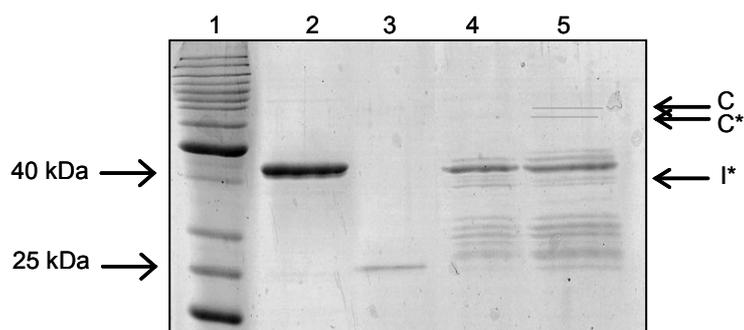


Figura 5.7. Análise da formação do complexo SDS-estável canaserpina: tripsina após incubação por 30 minutos a 37°C. Em 1: marcador de peso molecular; 2: canaserpina; 3: tripsina; 4: razão molar inibidor: enzima de 5:1; 5: razão molar inibidor:enzima de 10:1. C (complexo intacto), C* (complexo clivado) e I* (inibidor clivado). SDS-PAGE 15% corado com Comassie-Blue.

6 DISCUSSÃO

O seqüenciamento da cana-de-açúcar, realizado a partir de 26 bibliotecas de cDNA de várias partes da planta (Vettore *et al.*2003), possibilitou o maior entendimento da complexidade do genoma dessa planta. A partir disso, muitos estudos têm sido realizados, levando-se em conta a importância dessa planta para a economia brasileira, e visando o melhoramento da produção. Sendo assim, é de fundamental importância o estudo dos inibidores de proteases da cana-de-açúcar para auxiliar no entendimento das estratégias de defesa utilizadas pelas plantas e também para o desenvolvimento de metodologias que aprimorem esse sistema de defesa, como por exemplo, plantas transgênicas.

O Laboratório de Biologia Molecular coordenado pelo Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, vêm desenvolvendo trabalhos com inibidores de cisteíno proteases provenientes da cana-de-açúcar (cistatinas) e obtendo resultados importantes. A identificação de um *cluster* codificando uma serpina da cana-de-açúcar possibilita a realização de uma nova gama de trabalhos relacionando inibidores e proteases, além de não haver descrição na literatura de nenhuma serpina dessa planta.

As serpinas são conhecidos inibidores de serino proteases, enzimas notáveis por participarem de inúmeros processos fisiológicos importantes como coagulação, fibrinólise, apoptose, entre outros. A proteólise não regulada pode levar ao surgimento de doenças e problemas funcionais e, portanto, a função dos inibidores é fundamental para o bom funcionamento dos organismos. Em plantas vêm-se investigando o possível envolvimento de serpinas no sistema

de invasão utilizado por parasitas, assim como também na defesa da planta contra o ataque de patógenos.

Para estudar as características de uma serpina presente na cana-de-açúcar, a ORF completa contida no clone SCJLRT1015H07.g. obtido junto ao Banco de Clones do SUCEST foi amplificada utilizando oligonucleotídeos específicos. O tamanho da banda visualizado em gel de agarose 1% de aproximadamente 1200 pb corresponde ao tamanho esperado para a proteína madura. Embora apresente uma metionina anterior, o início da proteína foi considerado na segunda metionina, pois é a partir dessa que se observa uma identidade com outras serpinas de plantas, baseando-se em alinhamentos.

A partir disso, foi possível realizar a subclonagem em vetor de expressão pET28a, levando-se em conta trabalhos já publicados que descrevem a expressão de serpinas recombinantes em sistema procaríotos. A ORF foi subclonada em fase com uma seqüência de 6-His provenientes do vetor para facilitar a posterior purificação por meio de cromatografia de afinidade.

O clone contendo o plasmídeo recombinante pET28canaserpina foi transformado em *E.coli* Rosetta (DE3) e a expressão realizada a 37 °C, 200 rpm durante 16 horas após indução com 0,2 mM de IPTG. Porém, nessas condições, a proteína foi produzida na sua forma insolúvel. Portanto, a temperatura de indução foi modificada para 30 °C e, mantendo-se as condições de agitação e tempo, foi possível obter a proteína solúvel em quantidade suficiente para purificação em coluna de níquel. A proteína foi expressa com a massa molecular esperada de aproximadamente 43 kDa, o que está de acordo com dados da literatura que descrevem o tamanho de 40 a 60 kDa para a maioria das serpinas (Gettins, 2002).

A proteína solúvel foi purificada por meio de cromatografia de afinidade ao níquel, sendo eluída pura em tampão contendo 100 mM de imidazol, uma molécula que compete com a seqüência de histidinas presente na proteína pela ligação ao níquel, confirmando assim que o sistema de expressão escolhido se demonstrou eficiente. O rendimento total da proteína foi de 4,6 mg por litro de cultura induzida, um bom rendimento quando comparado a outros obtidos na produção de diferentes serpinas de plantas: 0,2-1,5 mg de serpinas de trigo por litro e 0,1-1 mg de serpinas de cevada por litro de cultura induzida (Ostergaard *et al.*, 2000, Dahl, *et al.*, 1996a).

Para caracterizar a proteína recombinante, foram feitos testes de inibição enzimáticos, visto que nas análises *in silico*, foi identificada a região conservada P15-P10, indicando a possibilidade da canaserpina possuir propriedade inibitória frente à serino proteases. Analisando-se as curvas de inibição feitas com as enzimas quimiotripsina e tripsina, verificou-se que a canaserpina foi capaz de inibir essas serino proteases, embora com um valor de IC₅₀ semelhante para ambas e na ordem de 0,46-0,5 µM. Isso indica que é preciso uma concentração grande de inibidor para que a enzima tenha sua atividade inibida, comparado com outras serpinas também com propriedades inibitórias. Isso pode ser devido a uma fraca especificidade da canaserpina para as enzimas utilizadas no ensaio, sendo necessários testes adicionais com outras enzimas.

O teste para verificar se o complexo covalente serpina:enzima estava sendo formado possibilitou a visualização, no caso do ensaio com tripsina, da banda correspondente a esse complexo de aproximadamente 67 kDa (23,8 kDa da tripsina somados aos 43 kDa da canaserpina), porém com uma razão

molar de 10:1 (inibidor:enzima), o que pode estar relacionado ao alto valor do IC_{50} . Além disso, também foi possível identificar bandas de peso molecular menores, correspondentes ao complexo e inibidor clivados. No ensaio com a quimiotripsina, na mesma razão molar de 10:1 (inibidor:enzima), não foi possível visualizar a banda correspondente ao complexo que seria de aproximadamente 68 kDa (25 kDa da quimiotripsina adicionados aos 43 kDa da cana-serpina). Porém, pode-se visualizar uma banda de massa molecular maior que o da canaserpina, indicando a presença do complexo clivado.

Analisando o gel de poliacrilamida, pode-se verificar que a canaserpina é degradada por ambas as enzimas, tripsina e quimiotripsina. Porém, no mesmo gel também é possível detectar a formação do complexo serpina:enzima. Isso nos leva a concluir que a serpina ao mesmo tempo que tem a capacidade de inibir as duas proteases, também pode agir como substrato para ambas. Desta forma, os valores de IC_{50} determinados estariam mascarados por essa capacidade da serpina agir como substrato para as enzimas.

Outro fato relevante é a presença de um resíduo de cisteína na posição P1 da alça do centro de reação. Chen *et al.*, em 2000, mostraram que a inserção de uma cisteína na posição P1 da calistatina, serpina humana que inibe a calicreína tecidual 1, provoca a perda da atividade inibitória desta serpina (Chen *et al.*, em 2000). Esses dados sugerem que a canaserpina, embora iniba as enzimas quimiotripsina e tripsina, necessita de ensaios adicionais para verificar se a canaserpina está agindo como substrato para as enzimas, devido à presença de uma cisteína na posição P1.

Também são necessários ensaios para verificar onde está sendo o ponto de clivagem da canaserpina, pois há trabalhos que demonstram a clivagem em

outros sítios que não em P1. Por exemplo, a serpina de trigo WSZ2b inibiu de forma irreversível a plasmina na arginina presente em P1, a quimiotripsina em leucina em P2, e a catepsina G provavelmente em ambos os sítios.(Ostergaard *et al.*, 2000). Além disso, outras regiões além de P1-P1' demonstraram ser importantes para a formação do complexo covalente e capacidade inibitória (Plotnick *et al.*, 1997).

7 CONCLUSÕES.

- Tanto a expressão recombinante quanto purificação da proteína canaserpina foram eficientes, permitindo a produção de quantidade suficiente de proteína pura para ensaios de inibição;
- Os ensaios de inibição demonstraram que a cana-serpina é capaz de inibir as serino proteases quimiotripsina e tripsina, com um valor de IC_{50} em torno de $0,5 \mu M$;
- Embora fracamente, o complexo covalente é formado entre canaserpina e tripsina;
- Não foi possível visualizar a formação do complexo covalente entre canaserpina e quimiotripsina, apenas uma banda com massa molecular maior que a canaserpina, sugerindo ser o complexo clivado;
- São necessários ensaios adicionais para verificar a especificidade da canaserpina em relação a outras serino proteases, além de verificar o ponto de clivagem e a possibilidade da canaserpina estar agindo como substrato para as enzimas.

8 REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BARRET, A. J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, v. 244, 1994.

BARRET, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of proteolytic enzymes**. London: Academic Press, 2004.

BERG, N. O.; ERIKSSON, S. Liver disease in adults with alpha-1-antitrypsin deficiency. **N. Engl. J. Med.**, v. 287, p. 1264-1267, 1972.

BRADSHAW, C. B. *et al.* Cognitive deficits associated with a recently reported familial neurodegenerative disease: Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies. **Arch Neurol.**, v. 58, p. 1429-1434, 2001.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p.10881-10890, 1998.

CHEN, V.C.; CHAO, L.; CHAO, J. Roles of the P1, P2, and P3 residues in determining inhibitory specificity of kallistatin toward human tissue kallikrein. **J. Biol. Chem.**; v. 275, n.49, p. 38457-66, 2000.

DAHL, S. W.; RASMUSSEN, S. K.; HEJGAARD, J. Heterologous expression of three plant serpins with distinct inhibitory specificities. **Biol. Chem.**, v. 271, n. 14, p. 25083-8, 1996a.

DAHL, S. W. *et al.* Inhibition of coagulation factors by recombinant barley serpin BSZx. **FEBS Letters**, v. 394, p. 165-168, 1996b.

DAVIES, M. J.; LOMAS, D. A. The molecular aetiology of the serpinopathies. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 40, n. 6-7, p.1273-1286, 2008.

GETTINS, P. G. W. Serpin structure, mechanism, and function. **Chem. Rev.**, v. 102, n. 12, p. 4751-4803, 2002.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chem. Rev.**, v. 102, n 12, p. 4501-4523, 2002.

HEJGAARD, J. *et al.* Sequence homology between barley endosperm protein Z and protease inhibitors of the α 1-antitrypsin family. **FEBS Letters**, v. 180, n.1, p. 89-94, 1985.

HUNT, L. T.; DAYHOFF, M. O. A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 95, n. 2, p. 864-871, 1980.

IRVING, J. A. *et al.* Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. **Genome Res.**, v. 10, n. 12, p. 1845-1864, 2000.

JALLAT, S. *et al.* Altered specificities of genetically engineered alpha 1 antitrypsin variants. **Protein Eng.**, v. 1, n. 1, p. 29-35, 1986.

JANKOVA, L. *et al.* Crystal structure of the complex of plasminogen activator inhibitor 2 with a peptide mimicking the reactive center loop. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 46, p. 43374-82, 2001.

KAPADIA, C. *et al.* Human kallikrein 13: production and purification of recombinant protein and monoclonal and polyclonal antibodies, and development of a sensitive and specific immunofluorometric assay. **Clin. Chem.**, v. 49, n.1, p.77-86, 2003.

LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAW, R. H. *et al.* An overview of the serpin superfamily. **Genome Biol.**, v. 7, n. 5, p. 216.1-216.10, 2006.

LEUNG-TOUNG, R. *et al.* Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a review. **Curr. Med. Chem.**, v. 9, n. 9, p. 979-1002, 2002.

MATTHEWS, D. A. *et al.* Re-examination of the charge relay system in subtilisin comparison with other serine proteases. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 8875–8883, 1977.

NAKAI, K.; HORTON, P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. **Trends Biochem. Sci.**, v. 24, p. 34–36, 1999.

OSTERGAARD, H. *et al.* Inhibitory serpins from wheat grain with reactive centers resembling glutamine-rich repeats of prolamin storage proteins. Cloning and characterization of five major molecular forms. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 43, p. 33272-9, 2000.

PLOTNICK, M. I. *et al.* Role of the P6-P3' of the Serpin Reactive Loop in the Formation and Breakdown of the Inhibitory Complex. **Biochem.**, v. 36, n. 47, 1997.

POLGÁR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 62, p. 2161–2172, 2005.

POWERS, J. C. *et al.* Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. **Chem. Rev.**, v. 102, n. 12, p. 4639-750, 2002.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRET, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochem. J.**, v.290, pt. 1, p. 205-18, 1993.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRET, A. J. Merops: the peptidase database. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, D160-D164, 2004.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res.**, v. 27, n. 1, 1999.

ROBERTS, T. TH.; HEJGAARD, J. Serpins in plant and green algae. **Funct Integr. Genomics**, v. 8, p. 1-27, 2008.

SILVERMAN, G. A. *et al.* The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 36, p. 33293-6, 2001.

VERCAMMEN, D. *et al.* Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9. **J. Mol. Biol.**, V. v. 364, n. 4, p. 625-36, 2006.

VETTORE, A. L. *et al.* Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Res.**, v. 13, n. 12, p. 2725-35, 2003.

YOO, B. C. *et al.* Characterization of cucurbita maxima Phloem Serpin-1 (CmPS-1). A developmentally regulated elastase inhibitor. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 45, p. 35122-8.