

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular
Departamento de Genética e Evolução
Laboratório de Biologia Molecular

ADELITA CAROLINA SANTIAGO

**CISTATINAS RECOMBINANTES DA CANA-DE-AÇÚCAR: ESPECIFICIDADE,
PRODUÇÃO EM BIORREATOR E CONSERVAÇÃO POR LIOFILIZAÇÃO**

Orientador: Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva

SÃO CARLOS – SP

2018

ADELITA CAROLINA SANTIAGO

**CISTATINAS RECOMBINANTES DA CANA-DE-AÇÚCAR: ESPECIFICIDADE,
PRODUÇÃO EM BIORREATOR E CONSERVAÇÃO POR LIOFILIZAÇÃO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Doutora em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva

**SÃO CARLOS – SP
2018**

Santiago, Adelita Carolina

CISTATINAS RECOMBINANTES DA CANA-DE-AÇÚCAR:
ESPECIFICIDADE, PRODUÇÃO EM BIORREATOR E CONSERVAÇÃO
POR LIOFILIZAÇÃO / Adelita Carolina Santiago. -- 2018.

85 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos,
São Carlos

Orientador: Flavio Henrique da Silva

Banca examinadora: Fernanda de Freitas Anibal, Flavio Henrique da Silva,
Leila Maria Beltramini, Marcia Aparecida Silva Graminha, Paulo Teixeira
Lacava

Bibliografia

1. Fitocistatinas. 2. Cisteíno peptidases. 3. Cana-de-açúcar. I. Orientador.
II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

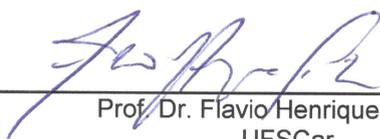


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Adelita Carolina Santiago, realizada em 02/03/2018:



Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva
UFSCar



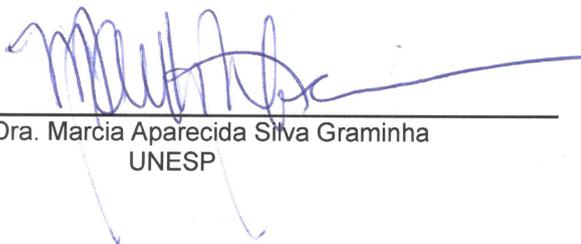
Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar



Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
UFSCar



Profa. Dra. Leila Maria Beltrami
IFSC/USP



Profa. Dra. Marcia Aparecida Silva Graminha
UNESP

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”

(Albert Einstein)

Dedico este trabalho aos meus pais Gino e Zilda,
por todo o carinho e apoio.
Ao meu amigo e namorado Rodrigo,
pela paciência e incentivo.

SÚMULA CURRICULAR

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- **Doutorado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (em andamento)**. Tese: “Cistatinas recombinantes da cana-de-açúcar: especificidade, produção em biorreator e conservação por liofilização”. Orientador: Flavio Henrique-Silva. Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar.
- **Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (2013)**. Dissertação: “Construção e caracterização de uma enzima quimérica obtida pela fusão gênica endoglucanase-xilanase de *Trichoderma harzianum*”. Orientador: Flavio Henrique-Silva. Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar.
- **Graduação em Ciências Biológicas (2008)**. TCC: “Análise de associação de um polimorfismo do gene da leptina com espessura de gordura subcutânea em bovinos da raça Canchim criados a pasto”. Orientadora: Luciana Correia de Almeida Regitano. Iniciação Científica no Laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa Pecuária Sudeste. Graduação em Bacharelado, Centro Universitário Central Paulista, UNICEP.

PUBLICAÇÕES

- Santiago, A.C.; Khan, Z.N.; Miguel, M.C.; Gironde, C.C.; Soares-Costa, A.; Pelá, V.T.; Leite, A.L.; Edwardson, J.M.; Buzalaf, M.A.R.; Henrique-Silva, F. A new sugarcane cystatin strongly binds to dental enamel and reduces erosion. *Journal of Dental Research*, v. 96, p. 1051-1057, 2017.
- Nakayama, D.G.; Santos Júnior, C.D.; Kishi, L.T.; Peduzzi, R.; Santiago, A.C.; Soares-Costa, A.; Henrique-Silva, F. A transcriptomic survey of *Migdolus fryanus* (sugarcane rhizome borer) larvae. *Plos One*, v. 12, p. e0173059, 2017.
- Veneroni-Gouveia, G.; Tizioto, P.C.; Meirelles, S.L.C.; Santiago, A.C.; Alencar, M. M.; Regitano, L.C.A. Candidate genes for carcass traits in a tropical-adapted Brazilian composite beef breed. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, p. 16667-16674, 2015.
- Franco, F.P.; Santiago, A.C.; Henrique-Silva, F.; de Castro, P.A.; Goldman, G.H.; Moura, D.S.; Silva-Filho, M.C. The sugarcane defense protein SUGARWIN2 causes cell death in *Colletotrichum falcatum* but not in non-pathogenic fungi. *Plos One*, v. 9, p. e91159, 2014.
- Afonso, A.S.; Zanetti, B.F.; Santiago, A.C.; Henrique-Silva, F.; Mattoso, L.H.C.; Faria, R.C. QCM immunoassay for recombinant cysteine peptidase: A potential protein biomarker for diagnosis of citrus canker. *Talanta (Oxford)*, v. 104, p. 193-197, 2013.
- Veneroni, G.B.; Meirelles, S.L.; Grossi, D.A.; Santiago, A.C.; Sonstegard, T.S.; Yamagishi, M.E.B.; Matukumalli, L.K.; Coutinho, L.L.; Alencar, M.M.; Oliveira, H. N.; Regitano, L.C.A. Whole-genome analysis for backfat thickness in a tropically adapted, composite cattle breed from Brazil. *Animal Genetics*, v. 43, p. 518-524, 2011.

CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO

- Santiago, A.C.; Veneroni, G.B.; Regitano, L.C.A. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). In: Regitano, L.C.A.; Niciura, S.C.M.; Ibelli, A.M.G.; Gouveia, J.J.S.; Veneroni, G.B.; Gasparin, G. (Org.). *Protocolos em Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal*. 1ed. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva, por me permitir fazer parte de seu grupo de pesquisa, pela orientação e por confiar que eu era capaz de desenvolver este trabalho. Agradeço também pela amizade e incentivo, principalmente naqueles momentos em que pensei em desistir. Seus ensinamentos estarão sempre bem guardados;

À Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes por sempre estar disposta em ajudar e pelo suporte nos experimentos;

Ao Prof. Dr. Richard Charles Garratt pela colaboração e ajuda com os mutantes da CaneCPI-4;

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior, ao Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior e aos seus alunos por me ajudarem na produção das proteínas em biorreator;

À Profa. Adriana Karaoglanovic Carmona, por disponibilizar algumas cisteíno peptidases utilizadas neste trabalho;

À técnica Isabel, do Laboratório de Biofísica Molecular (Instituto de Física de São Carlos – USP), pela ajuda com a liofilização das proteínas;

À Vanessa Karine Schneider pela ajuda com o fluorímetro;

À minha querida amiga Danyelle Toyama, pela preciosa amizade ao longo destes anos e que quero para a vida toda, pela cumplicidade e por estar comigo em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins;

Aos antigos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, que mesmo não estando mais juntos todos os dias, ainda se fazem presentes de alguma maneira;

Aos novos colegas do LBM, Andrés, Camilo, Chakra, Heloísa e Priscila por toda ajuda, convivência e momentos de descontração;

À secretária Ivanildes, pela simpatia e atenção com cada aluno da pós-graduação;

Ao PPGGEv, pela oportunidade;

Ao CNPq pela concessão da bolsa e pelo auxílio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho;

Aos meus pais, Gino e Zilda, pelo amor, dedicação, apoio e por nunca medirem esforços para que eu chegasse até aqui;

Ao meu namorado e grande amigo Rodrigo Pierobon, pelo carinho, paciência, compreensão, incentivo e principalmente por sempre me fazer ver o lado bom das coisas, mesmo nas situações mais difíceis;

Aos meus orelhudinhos dentuços Lolly, Dora, Libbit e Laila que me proporcionaram tantos bons momentos e descontração nas horas em que eu mais precisava;

E a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente estiveram envolvidos na execução e conclusão deste trabalho.

RESUMO

As fitocistatinas são inibidores de cisteíno peptidases encontradas naturalmente em plantas. As cistatinas de cana-de-açúcar destacam-se pela sua alta atividade inibitória e possíveis aplicações biotecnológicas. Neste trabalho, um painel comparativo das atividades inibitórias das CaneCPIs 1, 2, 3, 4, 5 e 6 contra relevantes catepsinas humanas e uma catepsina L de um inseto praga da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*, demonstrou a eficiência inibitória destas cistatinas. A partir deste painel foi possível observar que as CaneCPIs 4 e 5 possuem potente atividade inibitória com valores de K_i bastante baixos para todas as catepsinas testadas. Devido a insolubilidade da CaneCPI-4 produzida em *E. coli*, mutações no C-terminal foram realizadas para torná-la mais solúvel, porém não foram capazes de alterar sua solubilidade, mas sim sua capacidade inibitória. A CaneCPI-4 também foi expressa em *Pichia pastoris*. Um aumento de escala foi realizado para a produção das CaneCPIs 4 e 5 em biorreator, sendo a CaneCPI-5 expressa com sucesso e utilizada em um trabalho que mostrou sua capacidade de adesão ao esmalte dentário e proteção contra a erosão ácida. A CaneCPI-4 foi submetida à liofilização com diferentes estabilizadores e mostrou-se estável mesmo sem o uso dos mesmos, provando que essa cistatina é bastante estável mesmo em condições estressantes para a molécula. Portanto, neste trabalho é demonstrado o potencial inibitório das CaneCPIs, a possibilidade de produzi-las em biorreator e de serem liofilizadas, todas essas informações são importantes para uma futura produção industrial e uso comercial das cistatinas de cana-de-açúcar para diversos fins biotecnológicos.

Palavras-chave: cistatina, fitocistatinas, cisteíno peptidases, cana-de-açúcar, biorreator, liofilização

ABSTRACT

Phytocystatins are inhibitors of cysteine peptidases found naturally in plants. Sugarcane cystatins are distinguished by their high inhibitory activity and possible biotechnological applications. In this work, a comparative panel of the inhibitory activities of CaneCPIs 1, 2, 3, 4, 5, and 6 against relevant human cathepsins and a cathepsin L of the sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*, demonstrated the inhibitory efficiency of these cystatin. From this panel it was possible to observe that CaneCPIs 4 and 5 have potent inhibitory activity with very low K_i values for all cathepsins tested. Due to the insolubility of CaneCPI-4 produced in *E. coli*, C-terminal mutations were performed to make it more soluble, but were not able to alter solubility of the protein, but rather its inhibitory capacity. CaneCPI-4 was also expressed in *Pichia pastoris*. An increase in scale was carried out for the production of CaneCPIs 4 and 5 in bioreactor, and CaneCPI-5 was successfully expressed and used in a study that showed its ability to adhesion to dental enamel and protection against acid erosion. CaneCPI-4 was subjected to lyophilization with different stabilizers and it was shown to be stable even without the use of them, proving that this cystatin is quite stable even under stressful conditions for the molecule. Therefore, this study demonstrates the inhibitory potential of CaneCPIs, the possibility of producing them in bioreactor and of being lyophilized, all this information is important for a future industrial production and commercial use of sugarcane cystatin for various biotechnological purposes.

Keywords: cystatin, phytocystatins, cysteine peptidases, sugarcane, bioreactor, freeze-drying

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura tridimensional da orizacistatina.....	17
Figura 2. Representação da interação entre cistatina e cisteíno peptidase.....	18
Figura 3. Alinhamento das sequências de aminoácidos das CaneCPIs.....	22
Figura 4. Modelo tridimensional da estrutura da papaína.....	25
Figura 5. Análise da purificação das CaneCPIs em SDS-PAGE 15%.....	28
Figura 6. Predição estrutural das CaneCPIs 4 e 5.....	37
Figura 7. Alinhamento das sequências de aminoácidos de CaneCPI-4 e CaneCPI-5.....	38
Figura 8. Predição da estrutura secundária de CaneCPI-4 e CaneCPI-5.....	39
Figura 9. Análise de solubilidade das CaneCPI-4 mutantes e CaneCPI-5Del em SDS-PAGE 15%.....	40
Figura 10. Análise da purificação da CaneCPI-4 e seus mutantes e CaneCPI-5Del em SDSPAGE 15%.....	41
Figura 11. Inibição das catepsinas B e L pelos mutantes de CaneCPI-4.....	42
Figura 12. Inibição das catepsinas B e L por CaneCPI-5Del.....	42
Figura 13. Análise da expressão da CaneCPI-5 em transformantes de <i>Pichia pastoris</i> cepa X-33.....	57
Figura 14. Análise de deglicosilação da CaneCPI-4.....	58
Figura 15. Análise da expressão de CaneCPI-5 em biorreator.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Painel comparativo das constantes de inibição (K_i) das CaneCPIs.....	29
Tabela 2. Inibição das catepsinas B e L pelos mutantes de CaneCPI-4.....	42
Tabela 3. Inibição das catepsinas B e L por CaneCPI-5Del.....	43
Tabela 4. Inibição da papaína por CaneCPI-4 não liofilizada e liofilizada com estabilizadores.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMGY	meio glicerol complexo tamponado (<i>Buffered Glycerol-complex Medium</i>)
BMMY	meio metanol complexo tamponado (<i>Buffered Methanol-complex Medium</i>)
BSA	soro albumina bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
Cath	catepsina
cm	centímetro
C-terminal	carboxi-terminal
DNA	ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados (<i>deoxynucleotide triphosphates</i>)
DO ₆₀₀	densidade óptica a 600 nm
DTT	ditiotreitól
g	grama
<i>g</i>	gravidade
h	hora
HCl	ácido clorídrico
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfônico
IC50	concentração inibitória média
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
KCl	cloreto de potássio
kDa	quilodalton
KH ₂ PO ₄	fosfato monopotássico
<i>K_i</i>	constant de inibição
kV	quilovolts
L	litro
LB	meio Luria-Bertani
M	molar
mg	miligrama
MgSO ₄	sulfato de magnésio
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio

Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio dibásico
NaH ₂ PO ₄	fosfato de sódio monobásico
ng	nanograma
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfato de amônio
nM	nanomolar
nm	nanômetro
N-terminal	amino-terminal
ORF	fase aberta de leitura (<i>open reading frame</i>)
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato salino (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG 400	polietilenoglicol 400
pH	potencial de hidrogênio
rpm	rotação por minuto
s	segundos
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
U	unidade enzimática
vvm	volume de oxigênio por volume de cultura fermentada por minuto
YEPD	extrato de levedura, peptona e dextrose (<i>yeast extract peptone dextrose</i>)
YEPDS	extrato de levedura, peptona, dextrose e sorbitol (<i>yeast extract peptone dextrose sorbitol</i>)
YNB	base nitrogenada para leveduras (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)
Z-Leu-Arg-MCA	benziloxicarbonil-Leu-Arg-7-amino-4-metilcoumarina
Z-Phe-Arg-MCA	benziloxicarbonil-Phe-Arg-7-amino-4-metilcoumarina
°C	graus Celcius
μF	microfarad
μg	micrograma
μHg	micrômetro de mercúrio
μL	microlitro
μM	micromolar
Ω	ohm

LISTA DE ABREVIATURA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Abreviatura (3 letras)	Abreviatura (1 letra)
ÁCIDO ASPÁRTICO	Asp	D
ÁCIDO GLUTÂMICO	Glu	E
ALANINA	Ala	A
ARGININA	Arg	R
ASPARAGINA	Asn	N
CISTEÍNA	Cys	C
FENILALANINA	Phe	F
GLICINA	Gly	G
GLUTAMINA	Gln	Q
HISTIDINA	His	H
ISOLEUCINA	Ile	I
LEUCINA	Leu	L
LISINA	Lys	K
METIONINA	Met	M
PROLINA	Pro	P
SERINA	Ser	S
TIROSINA	Tyr	Y
TREONINA	Thr	T
TRIPTOFANO	Trp	W
VALINA	Val	V

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1 Cistatinas.....	17
1.2 Fitocistatinas.....	19
1.3 Cistatinas de cana-de-açúcar.....	19
2. OBJETIVO	23
CAPÍTULO 1 - Painel comparativo de atividade inibitória de cistatinas de cana-de-açúcar contra relevantes catepsinas	24
3. INTRODUÇÃO	25
3.1 Cisteíno catepsinas.....	25
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.2.1 Expressão recombinante e purificação das CaneCPIs.....	27
3.2.2 Atividade inibitória das cistatinas de cana-de-açúcar.....	27
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.3.1 Produção heteróloga das cistatinas.....	29
3.3.2 Inibição de cisteíno catepsinas por CaneCPIs.....	29
CAPÍTULO 2 - Mutações sítio dirigidas em CaneCPI-4 e deleção do C-terminal em CaneCPI-4 e CaneCPI-5	32
4. INTRODUÇÃO	33
4.1 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1.1 Mutações sítio dirigidas em CaneCPI-4.....	34
4.1.2 Expressão recombinante e purificação das CaneCPIs mutantes.....	36
4.1.3 Determinação do IC ₅₀ de cistatinas mutantes.....	36
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.2.1 Mutantes de CaneCPI-4 e CaneCPI-5 e expressão em <i>E. coli</i>	37
4.2.2 Comparação de IC ₅₀ das CaneCPIs 4 e 5 e seus mutantes.....	41
CAPÍTULO 3 - Expressão de CaneCPI-4 e CaneCPI-5 em <i>Pichia pastoris</i> e produção em larga escala em biorreator	45
5. INTRODUÇÃO	46
5.1 O sistema de expressão em <i>Pichia pastoris</i>	46
5.1.1 Aumento de escala de produção de <i>P. pastoris</i>	47
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	50

5.2.1 Construção dos vetores de expressão de CaneCPI-4 em <i>P. pastoris</i>	50
5.2.2 Otimização de códons da CaneCPI-5 e construção do vetor de expressão em <i>P. pastoris</i>	50
5.2.3 Transformação dos plasmídeos pGAP-CaneCPI4PP, pPIC-CaneCPI4PP, pGAP-CaneCPI5Opt e pPIC-CaneCPI5Opt.....	51
5.2.4 Produção em <i>shaker</i> e purificação das cistatinas recombinantes.....	52
5.2.5 Deglicosilação da CaneCPI-4 expressa em <i>Pichia pastoris</i> e ensaio de inibição da proteína glicosilada e deglicosilada.....	53
5.2.6 Expressão das cistatinas em larga escala.....	54
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.3.1 Expressão das CaneCPIs 4 e 5 em <i>Pichia pastoris</i>	55
5.3.2 Efeito da glicosilação na atividade da CaneCPI-4 expressa em <i>Pichia pastoris</i>	57
5.3.3 Produção das CaneCPIs 4 e 5 em biorreator.....	58
CAPÍTULO 4 - Liofilização de CaneCPI-4 e o uso de estabilizadores	64
6. INTRODUÇÃO	65
6.1 MATERIAL E MÉTODOS	65
6.1.1 Processo de liofilização da CaneCPI-4.....	65
6.1.2 Determinação do IC50 da CaneCPI-4 liofilizada.....	66
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
6.2.1 CaneCPI-4 liofilizada com e sem estabilizadores.....	67
6.2.2 Comparação de IC50 da CaneCPI-4 liofilizada e não liofilizada, com e sem estabilizador.....	67
7. CONCLUSÕES	71
8. PERSPECTIVAS	72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO I	82
ANEXO II	83
ANEXO III	84

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Cistatinas

Cistatinas são inibidores competitivos reversíveis de cisteíno peptidases, que são enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações peptídicas e possuem um resíduo de cisteína em seu sítio ativo (RAWLINGS e BARRET, 1994).

As cistatinas são formadas por cinco fitas- β antiparalelas em torno de uma α -hélice de cinco voltas (BODE *et al.*, 1988; TURK e BODE, 1991). A inibição ocorre por meio do bloqueio da atividade proteolítica devido a três regiões que interagem com as peptidases alvo, sendo um resíduo de glicina na porção N-terminal, um motivo altamente conservado QxVxG na região central formando o primeiro *loop* e na porção C-terminal o dipeptídeo prolina-triptofano localizado em um segundo *loop* (Figura 1) (BARRETT *et al.*, 1986a; BARRETT, 1987).

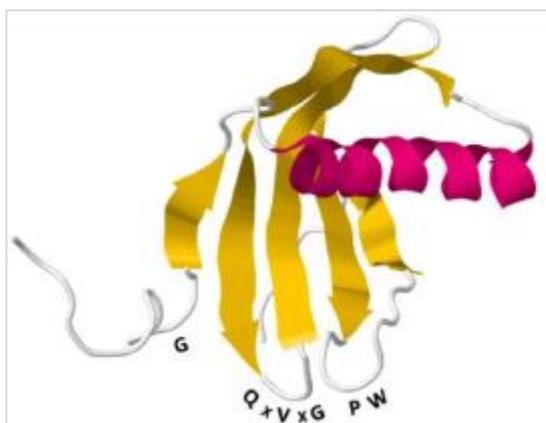


Figura 1. Estrutura tridimensional da orizacistatina. A estrutura tridimensional de uma cistatina de arroz mostra as regiões central e C-terminal compostas por 4 fitas- β antiparalelas dobradas sobre uma α -hélice, a qual está localizada na porção N-terminal juntamente com uma fita- β . Os três domínios característicos de cistatinas são mostrados na figura. Modificado do PDB: 1EQK.

Essas três regiões formam uma estrutura semelhante a uma cunha complementar à fenda do sítio ativo de cisteíno peptidases tipo papaína, a conformação adotada bloqueia o sítio ativo, mas não permite a clivagem da cistatina (BODE *et al.*, 1988). A glicina conservada no N-terminal interage no subsítio S2 da peptidase obtendo uma conformação inapropriada que impede que o próximo resíduo de aminoácido da cistatina interaja com o subsítio S1, impossibilitando a clivagem do inibidor. Os *loops* da região central e C-terminal do inibidor interagem com os subsítios S1' e S2', respectivamente, na fenda do sítio ativo da enzima

(Figura 2) (ABRAHAMSON, 1993; ALVAREZ-FERNANDEZ e ABRAHAMSON, 2006, BODE *et al.*, 1988; TURK e BODE, 1991).

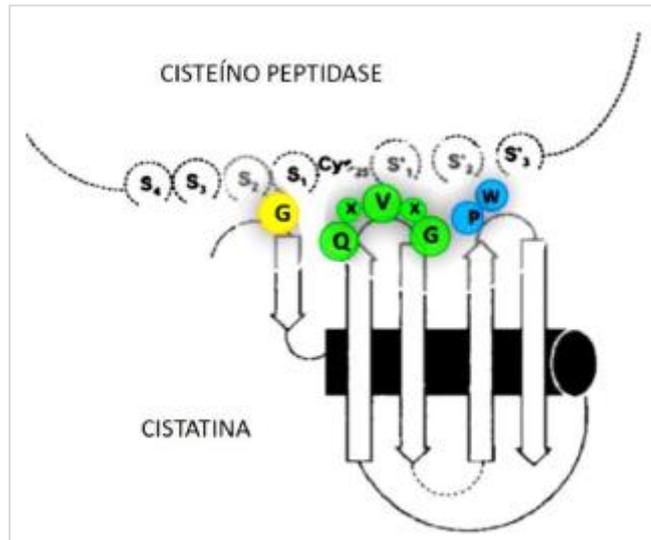


Figura 2. Representação da interação entre cistatina e cisteína peptidase. Na parte superior é representado o sítio ativo da enzima e logo abaixo estão representados os *loops* da cistatina com seus respectivos resíduos de aminoácidos que interagem com a cisteína peptidase. A glicina, em amarelo, na região N-terminal interage com o subsítio S2 da enzima. As outras duas regiões, o *motif* QxVxG, em verde, e o domínio conservado PW, em azul, interagem diretamente na fenda do sítio ativo da peptidase. Modificado de Alvarez-Fernandez e Abrahamson (2006).

A superfamília das cistatinas compreende três famílias de cistatinas de origem animal (BARRETT *et al.*, 1986b) e uma família de origem vegetal (MARGIS; REIS; VILLERET, 1998). A família 1, ou das estefinas, é formada por proteínas de aproximadamente 11 kDa, de cadeia simples que não formam ligações dissulfeto, não sofrem glicosilação e apresentam apenas um domínio inibitório. A família 2, ou das cistatinas, inclui proteínas com aproximadamente 13 kDa, também de cadeia simples e que possuem quatro resíduos conservados de cisteína formando duas ligações dissulfeto na região C-terminal. Elas sofrem glicosilação e possuem um único domínio inibitório. A família 3, ou dos cininogênios, compreende proteínas de 60 a 120 kDa, possuem um fragmento consecutivo de cininas e também formam ligações dissulfeto. Elas sofrem glicosilação e apresentam múltiplos domínios inibitórios (TURK e BODE, 1991). A quarta família foi sugerida por Margis; Reis e Villerete (1998) e inclui a família de cistatinas de plantas, denominada de fitocistatinas.

1.2 Fitocistatinas

Os motivos inibitórios das cistatinas são conservados entre plantas e animais (MARGIS; REIS; VILLERET, 1998), assim como a estrutura terciária apresenta alta similaridade e sugere um mecanismo inibitório também conservado (NAGATA *et al.*, 2000; NISSEN *et al.*, 2009). Apesar das sequências e estruturas conservadas, uma característica estrutural levou a inclusão das cistatinas de plantas em uma família específica, a das fitocistatinas (KONDO *et al.*, 1991; MARGIS; REIS; VILLERET, 1998). A presença de uma sequência consenso [LVI]-[AGT]-[RKE]-[FY]-[AS]-[VI]-x-[EDQV]-[HYFQ]-N na α -hélice do N-terminal, exclusiva de fitocistatinas, permitiu agrupar estas cistatinas em um clado evolucionário específico. Evolutivamente, algumas hipóteses indicam um caminho independente e paralelo de cistatinas de plantas e animais, envolvendo um ancestral comum que surgiu antes da divisão evolutiva entre eles, ou seja, a ocorrência de cistatinas em algumas algas e bactérias suporta fortemente este caminho evolutivo (BENCHABANE *et al.*, 2010).

A maioria das fitocistatinas têm massa molecular entre 12 e 16 kDa, são desprovidas de ligações dissulfeto e sítios de glicosilação (MARTINEZ e DIAZ, 2008). O principal alvo dessas proteínas são as cisteíno peptidases da subfamília do tipo papaína C1A (BENCHABANE *et al.*, 2010; MARTINEZ e DIAZ, 2008). Em plantas, essas cistatinas estão envolvidas na regulação de cisteíno peptidases endógenas durante o desenvolvimento e germinação de sementes, morte celular programada, resposta a estresse biótico e abiótico e inibição de peptidases exógenas como àquelas presentes no trato digestivo de insetos e patógenos herbívoros (BENCHABANE *et al.*, 2010; LEPELLEY *et al.*, 2012; PIERRE *et al.*, 2014; ZHANG; LIU; TAKANO, 2008).

As fitocistatinas também possuem aplicações biotecnológicas, pois têm propriedades antimicrobiana e antiviral, podem ser usadas em estratégias antitumorais e, além disso, podem aumentar a resistência contra insetos praga e fungos em plantas transgênicas superexpressando este tipo de inibidor (van WYK *et al.*, 2016).

1.3 Cistatinas de cana-de-açúcar

O banco de dados de ESTs da cana-de-açúcar, SUCEST (*Sugarcane Expressed Tags Project*) permitiu a Reis e Margis (2001) identificar e descrever as características estruturais, localização e supostas funções das primeiras cistatinas

dessa monocotiledônea. As vinte e cinco prováveis fitocistatinas de cana-de-açúcar foram analisadas filogeneticamente e classificadas em quatro grupos. O grupo I possui as três regiões conservadas de cistatinas e a sequência consenso característica de fitocistatinas, LARFAV. O grupo II é representado por fitocistatinas com as mesmas características do grupo I, porém há uma extensão da sequência na região C-terminal e como observado por Martinez *et al.* (2007), um motivo conservado SNSL envolvido na inibição de um tipo especial de cisteíno peptidases, as legumaínas. O grupo III compreende as cistatinas de plantas que diferem de todas as outras justamente por não possuírem a sequência consenso LARFAV característica da família das fitocistatinas. O grupo IV apresenta fitocistatinas que não possuem o motivo QxVxG.

A primeira cistatina de cana-de-açúcar foi expressa de forma recombinante e caracterizada no Laboratório de Biologia Molecular (LBM), Departamento de Genética e Evolução da UFSCar por Soares-Costa *et al.* (2002). Essa fitocistatina foi denominada CaneCPI-1, possui 109 resíduos de aminoácidos e aproximadamente 12 kDa (JANGPROMMA *et al.*, 2014). A CaneCPI-1 eficientemente inibiu catepsinas humanas e outras cisteíno peptidases (OLIVA *et al.*, 2004). Além disso, a CaneCPI-1 superexpressa e purificada das folhas de uma cana-de-açúcar transgênica foi capaz de inibir a atividade catalítica de cisteíno peptidases parcialmente purificadas do intestino médio do inseto praga bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Outras cinco cistatinas de cana-de-açúcar, denominadas de CaneCPI-2, 3, 4, 5 e 6, foram isoladas, produzidas de forma heteróloga e caracterizadas no LBM utilizando sistema bacteriano (*E. coli*).

As CaneCPIs 2, 3 e 4 foram expressas e caracterizadas por Gianotti *et al.* (2006, 2008), e possuem aproximadamente 14, 27 e 13 kDa, respectivamente. Todas inibiram papaína e a catepsina humana L, sendo que a CaneCPI-3 também inibiu um tipo especial de cisteíno peptidase, a legumaína (SANTOS-SILVA *et al.*, 2012). A CaneCPI-4 mostrou eficiente atividade inibitória contra as catepsinas humanas B e L (GIANOTTI *et al.*, 2008). Além disso, a CaneCPI-4 demonstrou atenuar a habilidade invasiva de células de câncer de mama, inibição do crescimento de melanoma, angiogênese e metástase (GIANOTTI *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As CaneCPIs 5 e 6 foram expressas e caracterizadas por Miguel (2014), possuindo aproximadamente 14 e 19 kDa, respectivamente, sendo a CaneCPI-5 um bom inibidor de catepsina humana B, a qual é de difícil inibição por possuir um *loop* de oclusão que bloqueia a fenda do sítio ativo.

A atividade inibitória de todas as CaneCPIs, com exceção da CaneCPI-6, foi testada contra uma catepsina L digestiva do inseto praga da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* e demonstraram capacidade inibitória (FONSECA *et al.*, 2012; MIGUEL, 2014).

As CaneCPIs também foram analisadas filogeneticamente e classificadas nos quatro grupos existentes de fitocistatinas de cana-de-açúcar (MIGUEL, 2014). De acordo com essas análises, as CaneCPIs 1 e 2 pertencem ao grupo I por possuírem todas as regiões de fitocistatinas conservadas; a CaneCPI-3 foi incluída no grupo II devido ao seu C-terminal estendido e por ter o motivo SNSL; as CaneCPIs 4 e 5 foram categorizadas no grupo III, pela ausência da sequência consenso LARFAV e a CaneCPI-6 faz parte do grupo 4, o qual foi primeiramente caracterizado por Reis e Margis (2001) por não possuir o motivo QxVxG. Porém, Miguel (2014) verificou que todos os membros desse grupo possuem essa sequência, além de terem um curto C-terminal estendido e uma substituição de leucina por alanina no LARFAV. O alinhamento das CaneCPIs é mostrado na figura 3.



Figura 3. Alinhamento das sequências de aminoácidos das CaneCPIs. Os *motifs* LARFAV e QxVxG estão entre colchetes. As setas indicam o resíduo de glicina no N-terminal e triptofano no C-terminal. As caixas pretas indicam as sequências com 100 % de identidade e as caixas vazias indicam as sequências que possuem entre 50% e 80% de identidade.

Neste trabalho foram comparadas as atividades inibitórias de todas as CaneCPIs contra as catepsinas humanas B, K, L, S e V, além da catepsina L do inseto praga *Sphenophorus levis*. Também foram realizadas mutações na CaneCPI-4 para melhorar sua solubilidade quando expressa em bactéria, assim como, também foi feita sua clonagem e expressão em levedura *Pichia pastoris*. A CaneCPI-4 e a CaneCPI-5 foram cultivadas em biorreator para melhorar a produtividade (*Scale-up*). Além disso, a CaneCPI-4 foi submetida ao processo de liofilização para verificar sua estabilidade. Com o intuito de facilitar a leitura deste trabalho, ele foi dividido em quatro capítulos que descrevem: 1) o painel comparativo de atividade inibitória das CaneCPIs; 2) mutações realizadas na CaneCPI-4; 3) cultivo em biorreator e 4) liofilização da CaneCPI-4.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo estudar a especificidade das CaneCPIs expressas e caracterizadas no LBM a fim de estabelecer um painel comparativo que permita selecionar a melhor CaneCPI para controlar a atividade de determinadas cisteíno peptidases, assim como analisar a expressão em larga escala e liofilização para provável uso comercial.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar ensaios de inibição usando as CaneCPIs (1 a 6) contra as catepsinas humanas B, K, L, S e V, assim como de uma cisteíno peptidase do bicudo da cana-de-açúcar (SI-CathL) e estabelecer um painel de inibição;
- Realizar mutações sítio dirigidas e uma deleção no C-terminal da CaneCPI-4 para melhorar sua solubilidade quando expressa em bactéria;
- Realizar uma deleção no C-terminal da CaneCPI-5 para fins de comparação com CaneCPI-4;
- Desenvolver um sistema de expressão em *Pichia pastoris* para a CaneCPI-4;
- Produzir a CaneCPI-4 em biorreator usando as mesmas condições determinadas em agitador metabólico (concentração de glicerol, tempo de indução, temperatura, concentração de metanol e pH);
- Produzir e CaneCPI-5 em biorreator nas mesmas condições de CaneCPI-4;
- Liofilizar a CaneCPI-4 de forma a manter sua atividade biológica usando diferentes estabilizadores em diferentes concentrações.

CAPÍTULO 1

Painel comparativo de atividade inibitória de cistatinas de cana-de-açúcar contra catepsinas

3. INTRODUÇÃO

3.1 Cisteíno catepsinas

As peptidases são responsáveis por catalisarem a hidrólise de ligações peptídicas e estão envolvidas em vários processos biológicos, como os de inflamação, digestão de alimentos, coagulação sanguínea, ativação de proenzimas e muitos outros (LEUNG-TOUNG *et al.*, 2002), além de processos patológicos (FONOVIĆ e TURK, 2014). Essas enzimas são encontradas em todas as formas de vida (BUGG, 2004).

O nome catepsina é derivado do grego *kathēpsein* (digerir) e foi proposto para peptidases ativas em pHs ligeiramente ácidos (WILLSTÄTTER e BAMANN, 1929 apud TURK *et al.*, 2012). Entre as catepsinas estão as cisteíno catepsinas, as quais são caracterizadas por uma tríade catalítica Cys (nucleófilo) -His (doador de prótons) -Asn (orienta His) em seu sítio ativo (Figura 4) e formam um par iônico imidazol-tiolato (TURK *et al.*, 1998). As cisteíno peptidases estão distribuídas em 118 famílias, sendo a família C1, denominada de família das papaínas, a mais bem caracterizada (RAWLINGS *et al.*, 2014).

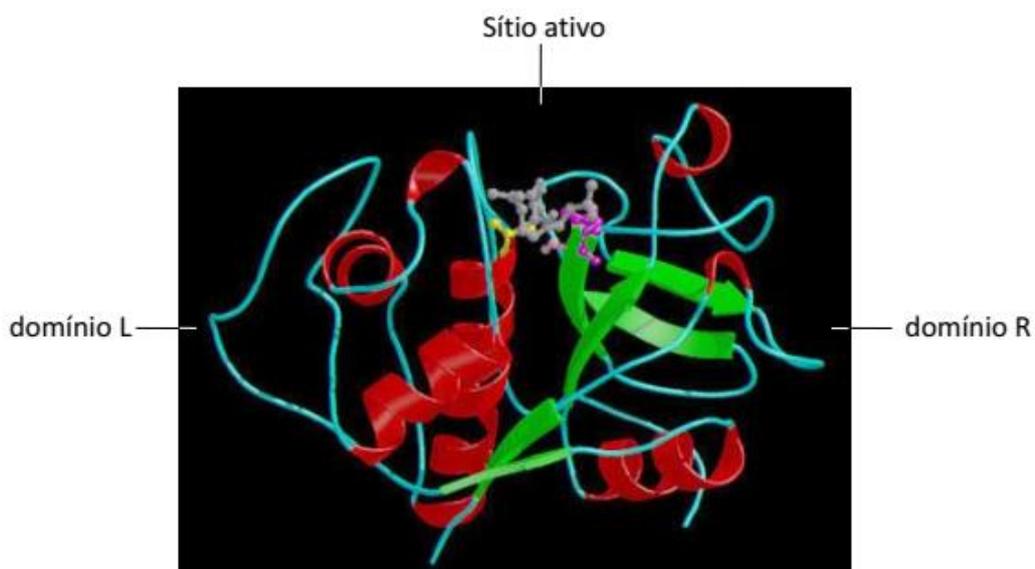


Figura 4. Modelo tridimensional da estrutura da papaína. De maneira geral, as cisteíno peptidases da família C1 são formadas por um N-terminal composto por α -hélices e um C-terminal que contém um β -barril. Os domínios L e R são separados pela fenda do sítio ativo, no qual a cisteína está representada em amarelo, a histidina em lilás e a asparagina em rosa. Em cinza é mostrado o inibidor E-64. Modificado do banco de dados MEROPS.

Há 11 cisteíno catepsinas humanas lisossomais pertencentes à família C1: B, C, F, H, K, L, O, S, V, X e W (ROSSI *et al.*, 2004), sendo a maioria delas expressas ubiquamente em tecidos humano, com exceção das catepsinas K, W e S, que são tecido específicas (TURK *et al.*, 2012). As catepsinas lisossomais da família C1 estão envolvidas em importantes processos fisiológicos e também participam de várias condições patológicas quando superexpressas ou secretadas no espaço extracelular. No entanto, sua atividade pode ser controlada por inibidores de cisteíno peptidases, ou seja, as cistatinas endógenas (FONOVIC e TURK, 2014).

As cisteíno catepsinas têm sido investigadas por companhias farmacêuticas como alvos para fármacos, principalmente devido a doenças associadas à inflamação causada pela desregulação do sistema imune, gerada pela elevada atividade de catepsinas. Portanto, os inibidores destas cisteíno peptidases possuem um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos (KRAMER; TURK, D.; TURK, B., 2017).

As peptidases também possuem fundamental importância para artrópodes fitófagos, pois o processo digestivo destes insetos depende da atividade hidrolítica dos nutrientes e eficiente proteólise das proteínas de plantas para obtenção de aminoácidos livres (MARTINEZ *et al.*, 2016). A maioria dos coleópteros e hemípteros que se alimentam de plantas possuem um pH levemente ácido no intestino médio, portanto, as cisteíno peptidases fornecem a maior atividade proteolítica para estes insetos (TERRA e FERREIRA, 2012). Sendo assim, as cisteíno peptidases são potenciais alvos para o controle de pragas e as cistatinas podem atuar no combate destes insetos praga.

Neste capítulo é apresentado um painel comparativo das atividades inibitórias de todas as CaneCPIs previamente expressas de forma recombinante e caracterizadas no LBM. Essas cistatinas foram testadas contra as catepsinas humanas B, K, L, S e V, além de uma catepsina L intestinal da larva do inseto praga da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis*, denominada SI-CathL. Os dados obtidos podem ajudar a selecionar a melhor CaneCPI para aplicações que requerem a inibição de cisteíno catepsinas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Expressão recombinante e purificação das CaneCPIs

As CaneCPIs 1, 2, 3, 4, 5 e 6 clonadas no vetor de expressão pET28a (Novagen) foram expressas em *E. coli* Rosetta (DE3), usando meio LB contendo 25 µg/mL dos antibióticos canamicina e cloranfenicol sob agitação de 200 rpm a 37 °C até atingir a DO₆₀₀ de 0,5, quando a expressão foi induzida pela adição de IPTG a uma concentração final de 0,4 mM, como descrito anteriormente por Soares-Costa *et al.* (2002), Gianotti *et al.* (2006) e Miguel (2014). Após 4 horas de indução as células foram coletadas por centrifugação (13000 g) e submetidas à sonicação em tampão de lise pH 8,0 (NaCl 100 mM, NaH₂PO₄ 50 mM e Tris 10 mM). Novamente as células foram centrifugadas e a fração solúvel purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna contendo resina de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen).

Para eluição das proteínas recombinantes, as colunas foram lavadas com tampão de lise contendo diferentes concentrações de imidazol (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM) e cada uma das frações recolhidas foram analisadas em SDS-PAGE 15% (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). As proteínas foram dialisadas em tampão fosfato salino, PBS pH 8,0 (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM e KH₂PO₄ 1,8 mM) e quantificadas por *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific).

3.2.2 Atividade inibitória das cistatinas de cana-de-açúcar

O potencial inibitório das CaneCPIs (1 a 6) foi avaliado contra as catepsinas humanas B (1,8 nM), K (4,2 nM), L (4,6 nM), S (30 nM), V (38 nM) e a catepsina do inseto *S. levis*, Sl-CathL (42 nM). As enzimas, nas concentrações supracitadas foram previamente incubadas em cubeta de quartzo contendo 100 mM de tampão acetato de sódio pH 5,5 e 2,5 mM de DTT a um volume final de 500 µL por 5 min a 37 °C. Os substratos fluorogênicos Z-Phe-Arg-MCA (20 µM) e Z-Leu-Arg-MCA (10 µM) foram usados para determinar a atividade catalítica das catepsinas humanas e Sl-CathL, respectivamente. Concentrações crescentes de cistatinas (0,1 a 130 nM) foram adicionadas a reação a cada 50 seg. A fluorescência foi monitorada continuamente em espectrofluorímetro Hitachi F-2500 a $\lambda_{\text{ex}} = 380$ e $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm. O potencial inibitório de cada CaneCPI foi determinado pela atividade enzimática residual das catepsinas após adicionar cada inibidor. Os valores dos *slopes* foram obtidos pelo programa FL solutions 2.0 e a constante de inibição (K_i) foi calculada de

acordo com a equação de Morrison (MORRISON, 1982) usando o *software* GraFit 5 (LEATHERBARROW, 2001). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e os erros foram menores que 5% para quaisquer dos valores de K_i determinados.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Produção heteróloga das cistatinas

As cistatinas foram eficientemente expressas em sua forma solúvel. Por serem fusionadas a uma cauda de histidinas, elas foram purificadas em único passo usando coluna de afinidade de níquel. As análises em SDS-PAGE 15% revelaram as massas moleculares esperadas para as CaneCPIs 1, 2, 3, 4, 5 e 6 que foram de aproximadamente 12, 14, 27, 13, 14 e 19 kDa, respectivamente (Figura 5). É possível observar que as CaneCPIs 2 e 3 possuem uma outra banda de aproximadamente 30 e 55 kDa, respectivamente, as quais são referentes à dimerização, assim como foi observado por Valadares *et al.* (2013) em estudo cristalográfico e de espectroscopia NMR (ressonância magnética nuclear) multidimensional da CaneCPI-1, demonstrando a formação de um homodímero da proteína em solução e a superestimação da massa molecular.

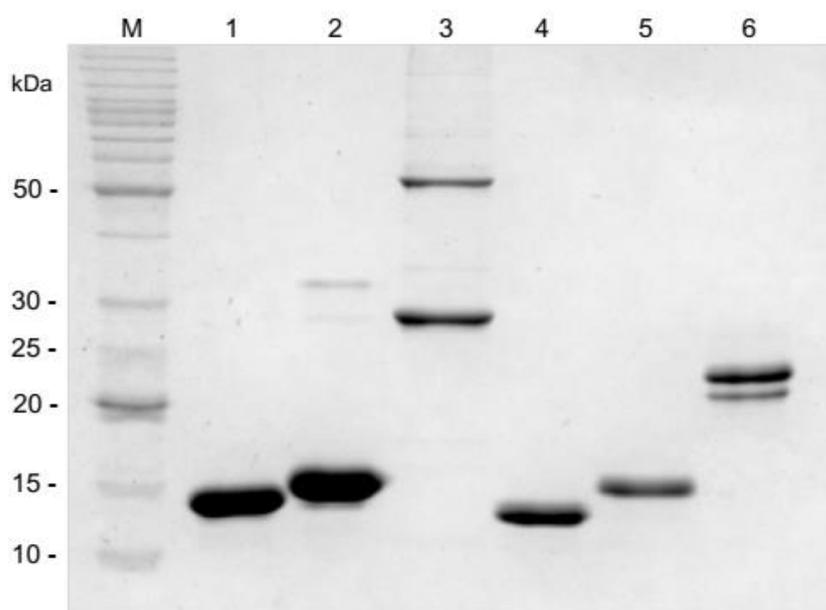


Figura 5. Análise da purificação das CaneCPIs em SDS-PAGE 15%. M, marcador de massa molecular BenchMark (Thermo Fisher Scientific); 1, CaneCPI-1 (12 kDa); 2, CaneCPI-2 (14 kDa); 3, CaneCPI-3 (27 kDa); 4, CaneCPI-4 (13 kDa); 5, CaneCPI-5 (14 kDa); 6, CaneCPI-6 (19 kDa).

3.3.2 Inibição de cisteíno catepsinas por CaneCPIs

Em geral, as cistatinas de cana-de-açúcar demonstraram boa atividade inibitória contra catepsinas humanas e a catepsina L digestiva de *S. levis*. Para completar o painel comparativo das atividades inibitórias das CaneCPIs, neste trabalho foi analisado o potencial inibitório da CaneCPI-1 contra a catepsina humana S, da CaneCPI-5 contra as catepsinas K, L, S e V e da CaneCPI-6 contra as mesmas analisadas para a 5, além da SI-CathL. De acordo com a tabela 1, é possível verificar que as CaneCPIs 4 e 5 são potentes inibidores de todas as catepsinas humanas e da SI-CathL, enquanto a CaneCPI-6 possui menor atividade inibitória quando comparada às outras CaneCPIs.

Tabela 1. Painel comparativo das constantes de inibição (K_i) das CaneCPIs.

Inibidor	K_i (nM)					
	Cath B	Cath K	Cath L	Cath S	Cath V	SI-Cath L
CaneCPI-1	1,25 x 10 ² (1)	0,76 (1)	0,6 (1)	30,0	1,0 (1)	2,38 (6)
CaneCPI-2	4,7 x 10 ² (2)	3,52 (3)	0,17 (2)	0,28 (3)	0,01 (3)	0,9 (6)
CaneCPI-3	2,44 x 10 ³ (2)	1,06 (3)	0,6 (2)	3,23 (3)	1,05 (3)	0,3 (6)
CaneCPI-4	0,83 (2)	2,9 (4)	0,02 (2)	4,38 (4)	0,01 (3)	0,2 (6)
CaneCPI-5	6,87 (5)	0,49	0,34	0,82	1,29	0,06 (5)
CaneCPI-6	1,83 x 10 ³ (5)	11,9	6,94	24	4,91	28,6

Referências para dados obtidos em estudos anteriores estão entre parênteses. (1) Oliva *et al.*, 2004. (2) Gianotti *et al.*, 2008. (3) Oliveira, 2011. (4) Oliveira *et al.*, 2011. (5) Miguel, 2014. (6) Fonseca *et al.*, 2012. Cath refere-se a catepsina.

Com exceção das CaneCPIs 1 e 6, as quais pouco inibiram a catepsina S, todas as outras CaneCPIs apresentaram boa inibição das catepsinas K, L, S e V.

As catepsina K sofreu uma grande inibição pelas CaneCPIs 1 e 5. Esta catepsina está associada a doenças ósseas, tais como osteoporose e osteoartrite, devido a sua relação com reabsorção óssea (DEJICA *et al.*, 2008; SVELANDER *et al.*, 2009; VOTTA *et al.*, 1997). De acordo com Das e Crockett (2013), inibidores de

catepsina K são considerados como terapêuticos de nova geração para tratamento de osteoporose.

A catepsina L foi fortemente inibida pela CaneCPI-4, com exceção da CaneCPI-6, todas as outras cistatinas de cana-de-açúcar apresentaram uma inibição potente da catepsina L, a qual está envolvida em câncer e metástase, bem como em cardiomiopatias (HASHIMOTO *et al.*, 2006; SPIRA *et al.*, 2007). A inibição desta cisteína peptidase deve diminuir vários estágios de progressão tumoral e ajudar na quimioterapia (OLSON e JOYCE, 2015; PALERMO e JOYCE, 2008).

As CaneCPIs 2 e 5 inibiram eficientemente a catepsina S, uma enzima que contribui para artrite reumatoide e aterosclerose (LIU *et al.*, 2006; WEITOFTE *et al.*, 2015), e parecem ser terapêuticamente promissoras para estas doenças.

CaneCPIs 2 e 4 demonstraram potente inibição da catepsina V. Esta catepsina tem alterado a expressão de certos tipos de câncer e problemas imunológicos (MOHAMED e SLOANE, 2006; TOLOSA *et al.*, 2003).

A catepsina B foi inibida efetivamente somente pelas CaneCPIs 4 e 5. Esta cisteína peptidase costuma ser fracamente inibida por cistatinas devido à presença de um loop de oclusão que bloqueia o sítio ativo (ILLY *et al.*, 1997). Acredita-se que a seletividade para catepsina B está relacionada a um resíduo de serina no *motif* QxVxG de cistatinas (AUERSWALD *et al.*, 1992; BARRET *et al.*, 1986b; GIANOTTI *et al.*, 2008). Gianotti (2008) verificou que quando a serina do *motif* QxVSG foi substituída por uma alanina, houve uma redução de 30% na atividade inibitória contra a catepsina B, essa redução foi observada por Auerswald *et al.* (1992) quando igual substituição foi realizada para cistatina do ovo de galinha, o que indica que a serina no motivo QxVSG é importante para a inibição de catepsina B. O *motif* QxVSG está presente em ambas CaneCPIs 4 e 5.

A atividade de catepsina B é correlacionada com vários tipos de câncer (KOS *et al.*, 2000; NOUH *et al.*, 2011; ROZHIN *et al.*, 1994; SLOANE *et al.*, 1981). Gianotti *et al.* (2008) demonstrou *in vitro* que a CaneCPI-4 inibe as catepsinas B e L e reduz a invasão de células cancerosas de mama. Oliveira *et al.* (2011) verificou *in vivo* a capacidade de CaneCPI-4 inibir o crescimento de melanoma, angiogênese e metástase. Além disso, foi visto que a CaneCPI-4 é capaz de inibir cisteína peptidases (falcipainas) relacionadas a um processo bioquímico chave para o crescimento do parasita causador da malária, o *Plasmodium falciparum* (MELO *et al.*, 2018).

Avanços significativos têm sido alcançados na compreensão dos processos de degradação de proteínas em condições normais e patológicas e as catepsinas são promissores alvos para fisiopatologias humanas. Além disso, o desenvolvimento de fármacos que visam e inibem catepsinas tem avançado em testes clínicos (TURK, 2006; VICIK *et al.*, 2006). Portanto, as cistatinas podem ser importantes inibidores de uso terapêutico.

Neste trabalho, também foi analisada a inibição de uma cisteína peptidase de inseto, a SI-CathL, que é a mais abundante enzima digestiva identificada na larva do inseto praga da cana-de-açúcar *S. levis* (FONSECA *et al.*, 2012). Todas as CaneCPIs, exceto a CaneCPI-6, inibiram fortemente a SI-CathL. Entre as CaneCPIs, a CaneCPI-5 foi a que inibiu mais eficientemente a catepsina L do inseto.

As cistatinas são consideradas ideais para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a insetos fitófagos, principalmente aos da ordem coleóptera, porque elas podem inibir a atividade de cisteína catepsinas presentes no intestino médio e interferir na digestão proteica (LAWRENCE e KOUNDAL, 2002; MARTINEZ e DIAZ, 2008). Elas são consideradas seguras, pois não há evidências de que tenham efeitos nocivos sobre os mamíferos (HAQ; ATIF; KHAN, 2004; van WYK *et al.*, 2016).

Uma cana-de-açúcar transgênica superexpressando a CaneCPI-1 demonstrou aumento da resistência ao ataque da larva de *S. levis* (SCHNEIDER *et al.*, 2017). Muitos estudos descrevendo a superexpressão de fitocistatinas em plantas transgênicas mostraram um aumento da resistência a pragas, incluindo coleóptera (LECARDONNEL *et al.*, 1999), hemíptera (ISHIMOTO *et al.*, 2012), lepidoptera (FERRY *et al.*, 2003) e ácaros (CARRILLO *et al.*, 2011) (para revisão ver MARTINEZ *et al.*, 2016). Portanto, as CaneCPIs, particularmente a CaneCPI-5, são promissoras para o controle de *S. levis* em cana-de-açúcar.

Recentemente, foi observada a habilidade da CaneCPI-5 se ligar ao esmalte dentário e protegê-lo contra a erosão ácida, o que sugere a inclusão desta cistatina em produtos odontológicos para a proteção dos dentes (SANTIAGO *et al.*, 2017).

Portanto, ao analisar o painel comparativo das atividades inibitórias das CaneCPIs é possível afirmar que elas possuem uma relevante capacidade de inibição sobre importantes cisteína catepsinas.

CAPÍTULO 2

Mutações sítio dirigidas em CaneCPI-4 e deleção do C-terminal em
CaneCPI-4 e CaneCPI-5

4. INTRODUÇÃO

O método mais apropriado para expressão de proteínas recombinantes deve ser determinado individualmente. Hoje existem vários sistemas de expressão criados para numerosos hospedeiros, entretanto, nem sempre o hospedeiro escolhido expressa uma quantidade suficiente de proteína e/ou de forma solúvel. Cada hospedeiro possui vantagens particulares, mas geralmente a primeira escolha para a expressão heteróloga é a *E. coli*, pela simplicidade e rapidez para a produção de proteínas. Porém, muitas vezes as proteínas expressas em *E. coli* formam corpos de inclusão insolúveis (TRIMPIN e BRIZZARD, 2009). Sabe-se que a superexpressão de proteínas não nativas, assim como a presença de resíduos hidrofóbicos e também a formação de ligações dissulfeto, fazem com que as proteínas se tornem insolúveis. Em algumas situações, mutações na sequência de DNA são necessárias para que a sequência de aminoácidos seja modificada e faça com a que proteína seja solúvel.

De acordo com Gianotti *et al.* (2008), a expressão e a solubilidade da CaneCPI-4 são baixas. Inicialmente acreditava-se que essa característica era consequência do N-terminal hidrofóbico dessa cistatina e por isso foi retirada a sequência do peptídeo sinal para clonagem, porém, esta estratégia não surtiu efeito.

Após a descoberta da CaneCPI-5, observou-se que as sequências de aminoácidos da CaneCPI-4 e CaneCPI-5 possuíam uma alta identidade, classificando-as filogeneticamente em um mesmo grupo de cistatinas de cana-de-açúcar (MIGUEL, 2014). Porém, apesar delas possuírem sequências bastante similares, a expressão recombinante da CaneCPI-5 em *E. coli* produziu aproximadamente oito vezes mais proteína solúvel que a CaneCPI-4, o que sugere que as diferenças na sequência de ambas contribuem para maior solubilidade da CaneCPI-5.

Visando a maior solubilidade da CaneCPI-4, algumas mutações sítio dirigidas foram realizadas tomando como base a sequência de aminoácidos da CaneCPI-5. As mutações foram feitas por PCR para a substituição de uma fenilalanina (F) por valina (V), de uma valina (V) por alanina (A) e para uma mutação dupla F→V e V→A. Foram feitas também deleções no C-terminal tanto de CaneCPI-4 quanto de CaneCPI-5.

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Mutações sítio dirigidas em CaneCPI-4

Os resíduos a serem mutados na CaneCPI-4 foram eleitos baseados em uma predição estrutural das CaneCPIs 4 e 5 realizada pelo doutorando Diego Antonio Leonardo Cabrejos orientado pelo Prof. Dr. Richard Charles Garratt do Instituto de Física de São Carlos (USP), com o qual mantemos estreita colaboração em estudos estruturais das cistatinas.

Para a modelagem das estruturas de CaneCPI-4 e CaneCPI-5, a sequência de aminoácidos de ambas proteínas foram alinhadas com uma cistatina de batata (PDB: 2W9P) utilizando o *software* Jalview 2.8.2 (WATERHOUSE *et al.*, 2009) e o algoritmo de alinhamento do ClustalW (LARKIN *et al.*, 2007). Para preservar os elementos da estrutura secundária, os *gaps* presentes dentro das α -hélices e fitas- β foram removidos e transferidos para os *loops* usando um ajuste manual. Foram gerados 30 modelos para cada cistatina usando o *software* Modeller 9.18 (SALI e BLUNDELL, 1993) e tendo como modelo a cistatina de batata. A otimização dos modelos foi feita com um *Variable Target Function Method* (VTFM) seguida de uma hibridização simulada. Para incluir todas as restrições de distância tanto para a cadeia principal quanto para as cadeias laterais, valores padrões foram utilizados. O resultado da modelagem foi avaliado em termos da pseudo-energia usando as opções DOPE e GA341 do Modeller. A estereoquímica foi avaliada com Procheck (LASKOWSKI *et al.*, 1993), o ambiente dos resíduos com Verify-3D (EISENBERG; LÜTHY; BOWIE, 1997) e os contatos atômicos com What_check. Finalmente, a análise das estruturas e as figuras foram feitas utilizando o programa PyMol (DeLANO, 2002).

As mutações F102V e V115A foram realizadas por PCR usando como molde o clone da CaneCPI-4 em pET28a (GIANOTTI *et al.*, 2008). A mutação F102V foi incorporada usando o *primer forward* T7 promotor, 5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3' e o *primer reverse* Cana4_F102V, 5'- AAAGAATTCTCAGTCGGCCGACGCGAAGGATACGAGCTCGCGGGTGTGGTCC ACGACTGCTCGTACAC**GAC**GGCCCCGTACGC -3'. A mutação V115A foi amplificada usando o mesmo *primer* T7 promoter e o *primer reverse* Cana4_V115A 5'- CCGAATTCTCAGTCGGCCGACGCGAAGGAT**GCG**GAGCTCGCGG -3' (as

sequências grifadas indicam o sítio da enzima de restrição *EcoRI*, em negrito estão os códons mutados, TTC foi substituído por GTC na mutação referente a F102V e GTA por GCA na mutação referente a V115A).

As amplificações foram realizadas em uma reação de 25 µL utilizando 50 ng de DNA plasmidial, 10 mM de cada dNTP (Promega), 1x tampão da enzima (2 mM MgSO₄; 10 mM KCl; 16 mM (NH₄)₂SO₄; 20mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.05% Triton X100, 0,1 mg/ml BSA), 10 µM de cada *primer* e 2,5 U de *ACTaq High Fidelity DNA Polymerase* (ACTGene). O ciclo de reação foi de 94 °C por 3 min de desnaturação, seguido por 35 ciclos de 30 seg a 94 °C de desnaturação, 30 seg a 50 °C de hibridização e 30 seg a 72 °C de alongação e uma etapa final de 1 min a 72 °C.

Os produtos amplificados incorporando as mutações foram clivados em uma reação de 30 µL com 10 U das enzimas de restrição *EcoRI* e *NdeI* (Thermo Fisher Scientific), 1x do tampão Orange e 100 ng de DNA. A mesma reação foi realizada para a clivagem do vetor pET28a. A reação foi incubada a 37 °C por 16 h.

Os produtos clivados foram purificados com o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega). Os mutantes F102V e V115A foram ligados no vetor pET28a em uma proporção 3:1 (inserto/plasmídeo). A ligação foi feita em uma reação de 20 µL, usando 1 U de T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific) e 1x tampão da enzima. A ligação foi incubada a 4 °C por 16 h e após este período, 10 µL da reação foram adicionados a 200 µL de células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes. A transformação ocorreu por incubação da mistura por 90 s a 42 °C e 1 min em gelo, posteriormente foram adicionados 800 µL de meio LB líquido (Sigma) e a reação incubada por 50 min a 37 °C. Foram plaqueados 50 µL desta transformação em placas de Petri contendo 15 mL de meio LB Ágar (Sigma) com 25 µg/mL do antibiótico canamicina. As placas foram incubadas por 16 h a 37 °C. As colônias selecionadas de cada mutante foram usadas para extração de DNA plasmidial e os clones sequenciados em MegaBACE 1000 Flexyble com o *kit DYEnamic ET Dye Terminator* (GE Healthcare), usando os *primers* específicos do vetor pET28a, T7 promoter e T7 terminator.

Após a confirmação dos clones mutantes por sequenciamento, o duplo mutante F102V e V115A foi obtido sob as mesmas condições de amplificação dos mutantes individuais, porém, usando como molde o mutante F102V e o *primer reverse* Cana4_V115A. Os mesmos procedimentos de clivagem, ligação,

transformação e sequenciamento para obtenção dos mutantes individuais foram realizados para o duplo mutante.

Além das mutações sítio dirigidas foram realizadas deleções no C-terminal da CaneCPI-4 e CaneCPI-5. Para a deleção em CaneCPI-4 foi usado como molde o clone da CaneCPI-4 em pET28a (Gianotti, 2008) e a amplificação foi realizada usando o *primer* T7 promoter e o *primer reverse* Cane4_DelC-term, 5'-AAAGAATTCTTAGGGCGTCCGTGGCGTTCGAG -3'. Para a deleção em CaneCPI-5, foi usado como molde o clone de CaneCPI-5 em pET28a (MIGUEL, 2014) e a amplificação realizada usando o *primer* T7 promoter e o *primer reverse* Cane5_DelC-term, 5'- AAAGAATTCTTAGGGGTTCGGCGGCGTTCGAC (as sequências grifadas indicam o sítio da enzima de restrição *EcoRI*). Os mesmos protocolos de amplificação, clivagem, ligação, transformação e sequenciamento usados para as mutações sítio dirigidas foram usados para as deleções.

4.1.2 Expressão recombinante e purificação das CaneCPIs mutantes

A expressão das CaneCPIs mutantes ocorreu da mesma forma que a expressão das CaneCPIs no subitem 3.2.1 de Material e métodos do capítulo 1, com modificações no tempo e temperatura de indução. Além de induzir por 4h a 37 °C, os mutantes também foram induzidos por 20 h a 20 °C. O protocolo de purificação e diálise foi o mesmo utilizado no subitem 3.2.1 de Material e métodos do capítulo 1.

4.1.3 Determinação do IC50 de cistatinas mutantes

O IC50, definido como a concentração de inibidor necessária para alcançar 50% de inibição da atividade enzimática, foi estabelecido para todas as CaneCPIs mutantes.

O IC50 das cistatinas foi avaliado contra as catepsinas humanas B e L para as concentrações finais de 18,8 nM e 15,5 nM, respectivamente. As enzimas foram previamente incubadas em cubeta de quartzo contendo 100 mM de tampão acetato de sódio pH 5,5 e 2,5 mM de DTT a um volume final de 500 µL por 3 min a 37 °C. O substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA (20 µM) foi adicionado após a incubação das enzimas para determinar a atividade catalítica das catepsinas. As cistatinas foram adicionadas à reação após 60 seg. de reação depois de adicionar o substrato. A concentração final de CaneCPI-4 necessária para inibir 50% de atividade das catepsinas B e L foi de 92 nM e 19 nM, respectivamente. A concentração final

necessária de CaneCPI-5 para alcançar o IC50 das catepsinas B e L foi de 69 nM e 14 nM, respectivamente. As mesmas concentrações usadas para CaneCPI-4 e CaneCPI-5 foram estabelecidas para os mutantes F102V, V115A, F102V V115A, CaneCPI-4Del e CaneCPI-5Del, a fim de comparar se eles permaneceriam com a mesma capacidade para atingir o IC50. A fluorescência foi monitorada em espectrofluorímetro Hitachi F-2500 a $\lambda_{ex} = 380$ e $\lambda_{em} = 460$ nm. O potencial inibitório (IC50) de cada CaneCPI foi determinado pela atividade enzimática residual das catepsinas após adicionar cada inibidor. Os valores dos *slopes* foram obtidos pelo programa FL solutions 2.0. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Mutantes de CaneCPI-4 e CaneCPI-5 e expressão em *E. coli*

As mutações em CaneCPI-4 foram realizadas com o intuito de melhorar sua solubilidade. Ao comparar as predições estruturais de CaneCPI-4 e CaneCPI-5, notou-se que o C-terminal de CaneCPI-4 era mais hidrofóbico do que o de CaneCPI-5. Por isso, alguns aminoácidos foram selecionados em CaneCPI-4 para serem substituídos pelo os que haviam na mesma posição em CaneCPI-5 e acreditava-se influenciar na maior solubilidade desta cistatina (Figura 6). No alinhamento mostrado na figura 7 estão indicadas essas mutações.

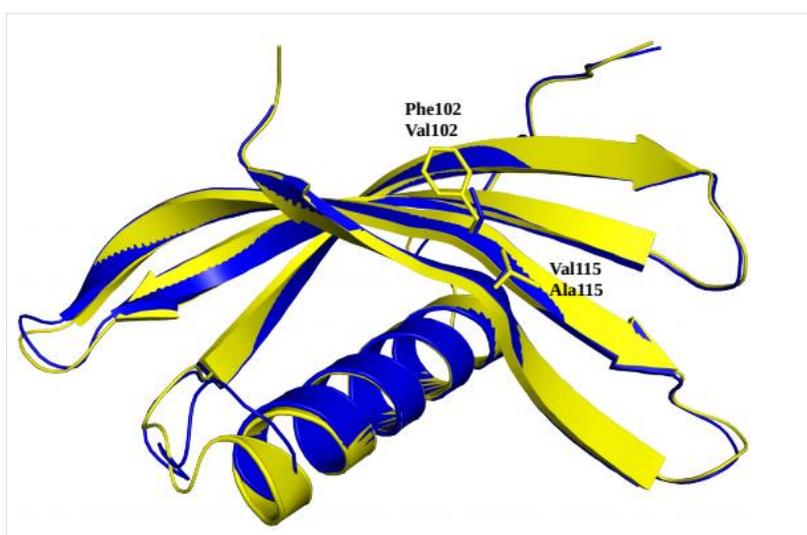


Figura 6. Predição estrutural das CaneCPIs 4 e 5. Os modelos estruturais de CaneCPI-4 (amarelo) e CaneCPI-5 (azul) foram sobrepostos. Os resíduos destacados são os que foram eleitos à mutação (F102V e V115A).



Figura 7. Alinhamento das sequências de aminoácidos de CaneCPI-4 e CaneCPI-5. As setas em vermelho indicam as mutações sítio dirigidas.

Os aminoácidos a serem substituídos foram: uma fenilalanina na posição 102, substituída por uma valina (F102V, denominada CaneCPI-4FV); uma valina na posição 115, substituída por uma alanina (V115A, denominada CaneCPI-4VA); um mutante duplo contendo ambas mutações (F102V e V115A, denominada CaneCPI-4FVVA). As mutações encontram-se nas duas últimas fitas betas, respectivamente (Figura 8).

Além das mutações sítio dirigidas, o C-terminal das CaneCPIs 4 e 5 foram deletados (Figura 8). Como já sabido, o C-terminal da CaneCPI-4 apresenta maior hidrofobicidade que o da CaneCPI-5, porém, para fins comparativos de solubilidade e atividade inibitória, o C-terminal de CaneCPI-5 também foi deletado. As CaneCPIs deletadas foram nomeadas de CaneCPI-4Del e CaneCPI-5Del.



Figura 8. Predição da estrutura secundária de CaneCPI-4 e CaneCPI-5. (A) CaneCPI-4; (B) CaneCPI-5. A caixa verde destaca a sequência do peptídeo sinal, a qual foi retirada para a construção do plasmídeo de expressão; as caixas vermelhas indicam quais resíduos da CaneCPI-4 foram selecionados para mutação sítio dirigida e a caixa preta indica a sequência que foi deletada. A predição estrutural das CaneCPIs foi realizada no *software* PSIPRED (<http://bioinfadmin.cs.ucl.ac.uk/downloads/psipred/>).

Primeiramente a indução da expressão foi realizada a 37 °C por 4 h, porém os mutantes não apresentaram melhora na solubilidade. Então, a indução foi realizada a 20 °C por 20 h, para reduzir a taxa de síntese proteica e aumentar a estabilidade e enovelamento correto (SCHEIN, 1989; SØRENSEN E MORTENSEN, 2005). Foi observada uma breve melhora somente na CaneCPI-4Del (Figura 9). O mesmo protocolo foi usado para a expressão de CaneCPI-5Del. Apesar da baixa solubilidade, foi possível purificar todos os mutantes (Figura 10).

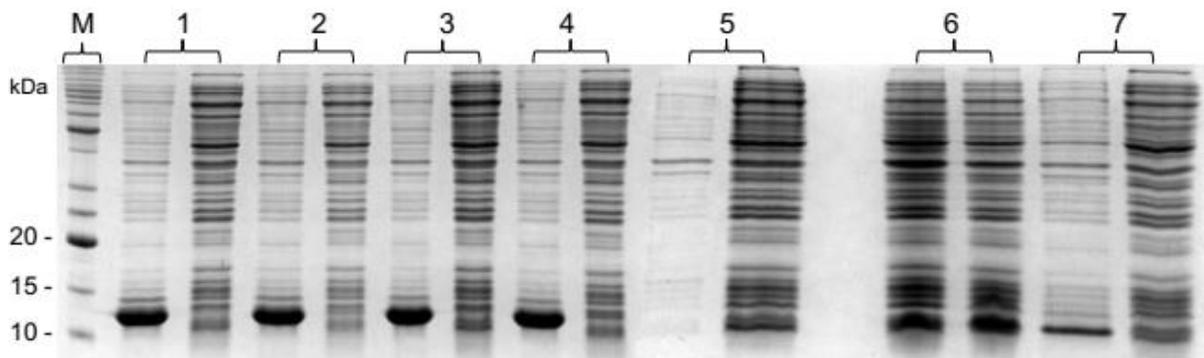


Figura 9. Análise de solubilidade das CaneCPI-4 mutantes e CaneCPI-5Del em SDS-PAGE 15%. M, marcador de massa molecular BenchMark (Thermo Fisher Scientific); 1, CaneCPI-4 insolúvel e solúvel; 2, CaneCPI-4FV insolúvel e solúvel; 3, CaneCPI-4VA insolúvel e solúvel; 4, CaneCPI-4FVVA insolúvel e solúvel; 5, CaneCPI-4Del insolúvel e solúvel; 6, CaneCPI-5Del não induzida e induzida; 7, CaneCPI-5Del insolúvel e solúvel.

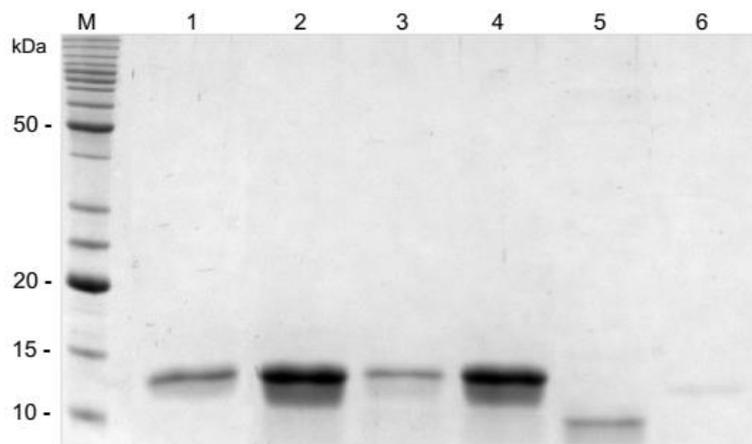


Figura 10. Análise da purificação da CaneCPI-4 e seus mutantes e CaneCPI-5Del em SDSPAGE 15%. M, marcador de massa molecular BenchMark (Thermo Fisher Scientific); 1, CaneCPI-4; 2, CaneCPI-4FV; 3, CaneCPI-4VA; 4, CaneCPI-4FVVA; 5, CaneCPI-4Del (10 kDa); 6, CaneCPI-5Del (11 kDa).

4.2.2 Comparação de IC50 das CaneCPIs 4 e 5 e seus mutantes

Os mutantes foram testados para o ensaio de IC50. A concentração de CaneCPI-4 necessária para inibir as catepsinas B e L foi assumida também para os mutantes para verificar se eles permaneciam com a mesma capacidade inibitória de CaneCPI-4. Os dados obtidos nos ensaios para IC50 da CaneCPI-4 e seus mutantes estão expostos em um gráfico (Figura 11) e na tabela 2. O mesmo foi feito para CaneCPI-5 e CaneCPI5-Del, utilizando a concentração de CaneCPI-5 necessária para o IC50 das catepsinas B e L, sendo a mesma concentração usada para CaneCPI-5Del a fim de comparar a atividade inibitória de ambas. Os resultados para IC50 da CaneCPI-5 e CaneCPI-5Del são mostrados na figura 12 e tabela 3.

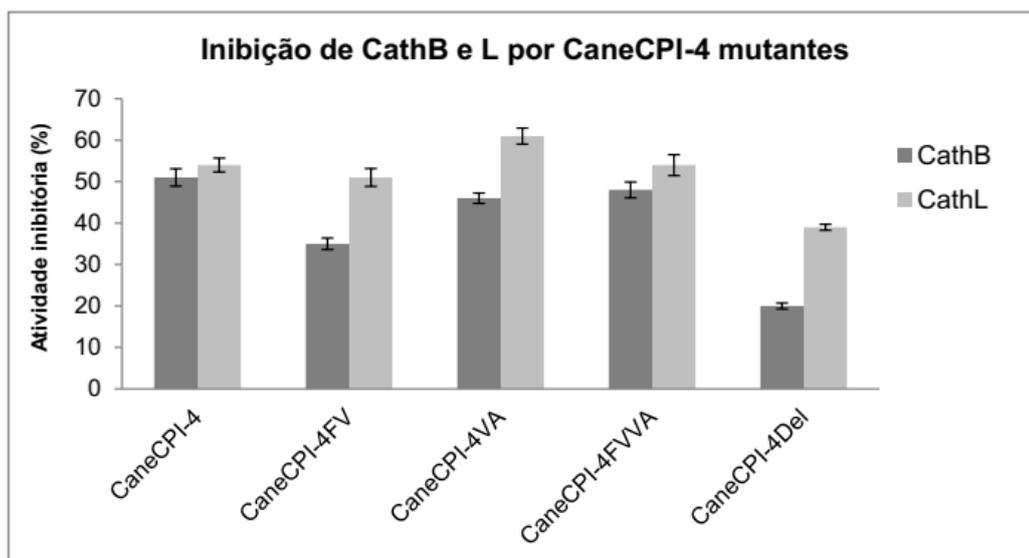


Figura 11. Inibição das catepsinas B e L pelos mutantes de CaneCPI-4. O IC50 para CaneCPI-4 foi estabelecido e comparado à capacidade inibitória de seus mutantes.

Tabela 2. Inibição das catepsinas B e L pelos mutantes de CaneCPI-4. O IC50 para CaneCPI-4 foi estabelecido e comparado à capacidade inibitória de seus mutantes.

	CaneCPI-4	CaneCPI-4 FV	CaneCPI-4 VA	CaneCPI-4 FVVA	CaneCPI-4 Del
Inibição CathB	51% ($\pm 2,1$)	35% ($\pm 1,4$)	46% ($\pm 1,3$)	48% ($\pm 1,9$)	20% ($\pm 0,7$)
Inibição CathL	54% ($\pm 1,7$)	51% ($\pm 2,2$)	61% ($\pm 1,9$)	54% ($\pm 2,5$)	39% ($\pm 0,7$)

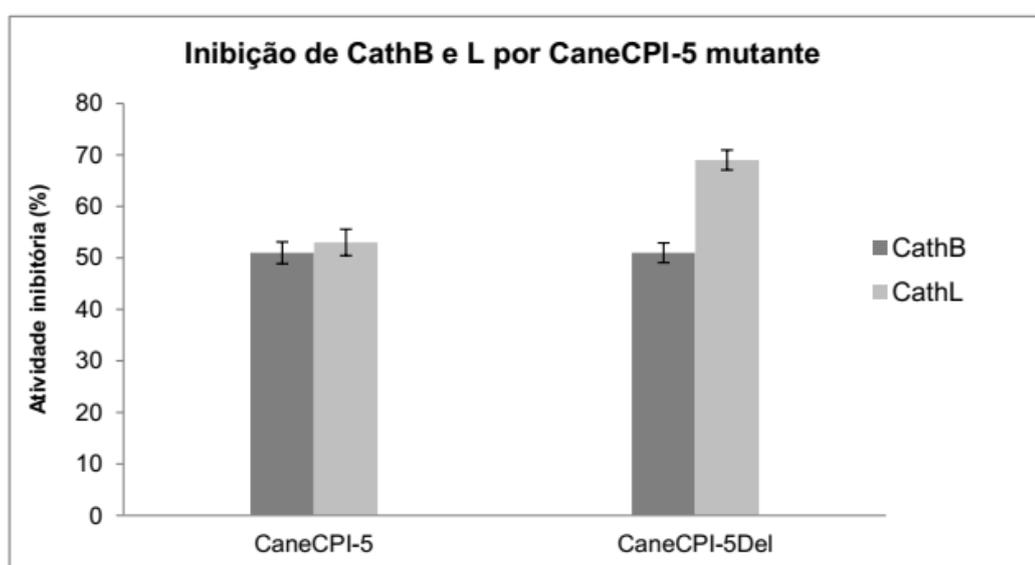


Figura 12. Inibição das catepsinas B e L por CaneCPI-5Del. O IC50 para CaneCPI-5 foi estabelecido e comparado à capacidade inibitória de CaneCPI-5Del.

Tabela 3. Inibição das catepsinas B e L por CaneCPI-5Del. O IC50 para CaneCPI-5 foi estabelecido e comparado à capacidade inibitória de CaneCPI-5Del.

	CaneCPI-5	CaneCPI-5Del
Inibição CathB	51% (\pm 2,1)	51% (\pm 1,9)
Inibição CathL	53% (\pm 2,5)	69% (\pm 1,9)

De acordo com a figura 11 e tabela 2, pode-se observar que os mutantes CaneCPI-4FV e CaneCPI-4Del perderam atividade inibitória frente à catepsina B, enquanto os mutantes CaneCPI-4VA e CaneCPI-4FVVA não tiveram mudanças relevantes de inibição de catepsina B quando comparados com a CaneCPI-4. Os resultados mostram que a mutação de F102V na penúltima fita- β e a deleção no C-terminal excluindo as duas últimas fitas- β têm importância para a inibição de catepsina B. É possível verificar também que o mutante duplo (CaneCPI-4FVVA) possui uma atividade inibitória bastante próxima a de CaneCPI-4, o que sugere que a mutação V115A recupera algum prejuízo causado pela mutação F102V. Ainda na mesma figura e tabela observa-se a inibição da catepsina L por CaneCPI-4 e seus mutantes. Somente a deleção (CaneCPI-4Del) teve uma perda significativa de atividade inibitória. Supreendentemente, a atividade inibitória do mutante V115A (CaneCPI-4VA) foi um pouco maior que a de CaneCPI-4, o que leva a crer que esta mutação pode alterar a estrutura do inibidor fazendo com que ele interaja melhor com a catepsina L.

Na figura 12 e tabela 3, verifica-se que a deleção do C-terminal da CaneCPI-5 não afetou sua capacidade inibitória contra a catepsina B. Além disso, a CaneCPI-5Del demonstrou uma significativa melhora na inibição de catepsina L quando comparada com a CaneCPI-5. Deste modo, a interação de CaneCPI-5 com a catepsina L parece ser melhor quando exclui-se suas duas últimas fitas- β .

Gianotti (2008), realizou mutações no N-terminal de CaneCPI-4 e analisou a atividade inibitória destes mutantes contra as catepsinas humanas B e L. Alguns mutantes perderam completamente a atividade e outros tiveram perda significativa de inibição e foi concluído que o mecanismo de inibição não depende somente do N-terminal, mas sim de toda a estrutura. No mesmo trabalho foi feita uma mutação pontual no *motif* QxVxG, substituindo uma serina por uma alanina, já que a maioria das cistatinas possuem o motivo QxVAG, e as CaneCPIs 4 e 5 possuem um motivo

QxVSG. Foi observado que quando a serina é substituída por alanina, a CaneCPI-4 perde 30% da sua capacidade de inibir catepsina B.

Como já elucidado por Turk e Bode (1991), o segundo elemento estrutural de cistatinas que interage fisicamente com o sítio ativo de cisteíno peptidases é o *loop* formado entre as duas últimas fitas- β no C-terminal, onde se encontra o resíduo de triptofano conservado. Portanto, esta região tem fundamental importância para interação inibidor/enzima.

A importância deste segundo *loop* foi confirmada por mutagêneses envolvendo deleções parciais na região C-terminal (ARAI *et al.*, 1991). O papel funcional deste *loop* localizado na região C-terminal também foi verificado por deleções únicas de aminoácidos, substituições ou mutações aleatórias nesta região em cistatina de arroz e soja, as quais mostraram que essas variantes do inibidor alteraram sua capacidade de inibição contra a papaína (ARAI *et al.*, 1991; KOIWA *et al.*, 2001). Arai *et al.* (1991) constataram que o mutante truncado com ausência de 11 resíduos no C-terminal exibia atividade equivalente a da orizacistatina original, porém, verificaram também que o mutante contendo uma deleção de 35 resíduos no C-terminal não era completamente capaz de inibir papaína. Já Koiwa *et al.* (2001) em suas variedades mutantes de cistatina de soja, verificaram que havia variantes tanto com menor quanto maior atividade inibitória à cistatina parental.

Portanto, as mutações realizadas neste trabalho não foram capazes de tornar a CaneCPI-4 mais solúvel, mostrando que a questão da solubilidade é mais complexa e deve depender de outros resíduos que não aqueles mutados ou de interações mais complexas. No entanto, elas elevaram ou reduziram a capacidade inibitória tanto de CaneCPI-4 quanto de CaneCPI-5, provavelmente devido a mudanças estruturais que afetaram a interação com a enzima.

CAPÍTULO 3

Expressão de CaneCPI-4 e CaneCPI-5 em *Pichia pastoris* e produção em larga-escala em biorreator

5. INTRODUÇÃO

5.1 O sistema de expressão em *Pichia pastoris*

Como citado no capítulo anterior, a escolha do melhor método de expressão heteróloga deve ser individual para cada proteína. Visto que muitas proteínas são expressas de forma insolúvel em bactéria *E. coli*, a escolha de outro sistema de expressão é necessária.

Em 1985, Cregg *et al.*, desenvolveram um sistema de expressão heteróloga na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. A expressão em *P. pastoris* é uma boa alternativa à *E. coli*, sendo um sistema de expressão simples, rápido e com melhor custo-benefício que outros sistemas de expressão eucarióticos. Além de ter uma alta produção de proteínas recombinantes, há a vantagem de processamento e enovelamento de proteínas, assim como modificações pós-traducionais e a vantagem de secretar a proteína para o meio de indução, o que não ocorre em um sistema de expressão procariótico.

A padronização dos vetores para expressão em *P. pastoris* em um sistema bifuncional permite que a replicação ocorra em *E. coli* e a manutenção em *P. pastoris*. A integração do plasmídeo no genoma da levedura ocorre de maneira estável e geralmente por recombinação homóloga (AHMAD *et al.*, 2014). Os vetores mais recentes possuem o gene de resistência ao antibiótico zeocina, o qual permite a fácil seleção de clones recombinantes.

Há dois tipos de promotores mais comumente usados para a expressão de proteínas em *P. pastoris*. O promotor do gene AOX (álcool oxidase), que é induzido por metanol (CEREGHINO e CREEG, 2000) e o promotor do gene GAP, que codifica a proteína GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-dehidrogenase), o qual permite a expressão constitutiva de proteínas recombinantes (ZHANG *et al.*, 2009).

Existe uma variedade de cepas a serem usadas como hospedeiras de acordo com a necessidade de expressão: a cepa de tipo selvagem X-33, as autotróficas KM71, KM71H e GS115 e as deficientes em proteases SMD1168 e SMD1168H. Dependendo da cepa a ser utilizada, os recombinantes podem apresentar dois fenótipos: Mut⁺, capazes de metabolizar metanol ou Mut^S, não capazes de metabolizar metanol.

As CaneCPIs 4 e 5 foram clonadas tanto em vetor contendo o promotor GAP quanto com o promotor AOX, nos plasmídeos pGAPZαA e pPICZαA (ANEXO I),

respectivamente. Para a CaneCPI-4 foi usada como hospedeira a cepa KM71H Mut^S e para CaneCPI-5 foram usadas as cepas KM71H e X-33 Mut⁺.

5.1.1 Aumento de escala de produção de *P. pastoris*

A levedura *P. pastoris*, assim como *Saccharomyces cerevisiae*, é capaz de atingir altas densidades celulares durante a fermentação, o que pode melhorar o rendimento geral de proteínas. Ao contrário do que ocorre na produção em *shakers*, em biorreatores é possível monitorar e controlar as condições ideais para o crescimento celular em um longo período de tempo. Estas condições incluem temperatura, pH, suprimento de nutrientes e oxigênio (LIU *et al.*, 2016; LOOSER *et al.*, 2015; RAMEY, 2006). Em condições ótimas, a produção de proteína em *P. pastoris* pode aumentar em até 140% com aumento de escala de *shaker* para biorreator (CINO, 1999).

Há sete tipos de biorreatores: STR (*Stirred Tank Bioreactors*); BCR (*Bubble Column Bioreactors*); ARL (*Airlift Bioreactors*); FB (*fluidized bed*); PBR (*Packed Bed Bioreactors*); photo-biorreator e MBR (*membrane bioreactors*).

O biorreator STR consiste de um recipiente cilíndrico com eixo central acionado por um motor contendo um ou mais agitadores. O ar é adicionado ao meio de cultura sob pressão e os impulsores (agitadores) quebram as bolhas de ar geradas permitindo melhor dispersão no meio de cultivo, criando um ambiente homogêneo para o crescimento celular e com condições operacionais flexíveis (SPIER *et al.*, 2011).

O BCR é um reator misto pneumático, desenvolvido para cultura de células como fungos filamentosos, células de mamíferos e plantas. É basicamente constituído por um recipiente cilíndrico com um distribuidor de ar no fundo. O ar é pulverizado sob a forma de bolhas em fase líquida ou suspensão sólido-líquida, quando existe uma fase sólida. São geralmente usados em indústrias químicas, petroquímicas, bioquímicas e metalúrgicas (DEGALEESAN, 2001; KANTARCIA *et al.*, 2005).

O biorreator airlift (ARL) é uma variação do BCR, tendo como principal diferença um tubo central ou canais responsáveis pela mistura e recirculação eficiente de fluidos, que reduz a coalescência das bolhas circulantes no reator e igualam o esforço de cisalhamento que é provocado pela mistura (FLICKINGER e DREW, 1999). São geralmente usados para bioprocessamento aeróbico. Eles

garantem um fluxo de líquido controlado em um sistema de reciclagem por bombeamento. Devido à alta eficiência, estes biorreatores são usados para a produção de metanol, tratamento de águas residuais e produção de proteína em *single-cell* (SPIER *et al.*, 2011).

O FB possui um topo expandido e uma coluna estreita para reduzir a velocidade do fluido, desta forma, os sólidos ficam retidos no reator enquanto o líquido flui para fora. Este tipo de biorreator é adequado para reações envolvendo biocatalisadores em suspensão de fluidos, como enzimas e células imobilizadas ou flocos microbianos (SPIER *et al.*, 2011).

O PBR é composto por partículas sólidas com biocatalisadores dentro de uma matriz, embalados em um coluna. Os sólidos usados podem ser géis porosos ou não porosos. Um caldo nutritivo flui continuamente sobre os biocatalisadores imobilizados e os produtos são liberados no fluido e removidos. São geralmente usados em reações que são inibidas pelo produto (SPIER *et al.*, 2011).

Os photo-biorreatores realizam fermentação pela exposição à luz solar ou artificial. São compostos por vidro ou plástico. Um conjunto de tubos ou painéis planos constitui um sistema de recepção de luz e a cultura é circulada por bombas centrífuga ou a ar. Microalgas e cianobactérias são normalmente utilizadas. Os organismos crescem durante a luz do dia enquanto os produtos são produzidos durante a noite (SINGH e SHARMA, 2012).

Os biorreatores de membrana são compostos por instalações construídas em configuração externa, em que os módulos das membranas ficam fora do biorreator e a biomassa é recirculada em um circuito de filtração. O substrato é introduzido de um lado da membrana por ultrafiltros com uma bomba, o produto é forçado a sair através da membrana. Este tipo de biorreator tem sido usado em bioconversões microbianas, como fermentação alcoólica, produção de ácido orgânico e tratamento de águas residuais (MENG *et al.*, 2009).

O modo de operação em biorreator é classificado como: processo de batelada, batelada alimentada e contínuo.

O processo de batelada ocorre em um sistema fechado no qual a maioria dos materiais necessários são colocados no biorreator asséptico e removidos no final da operação, a única troca existente durante este o processo é a troca de ar/gás, antiespumante e reagentes para controle de pH (CINAR *et al.*, 2003).

O processo de batelada alimentada, ou também chamado de semi-contínuo, é o mais utilizado pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas. É caracterizado pela alimentação do substrato estéril, ausência de saída do fermentador e aumento de volume, assim como de acúmulo de massa total. Além do substrato, os nutrientes necessários também são adicionados de forma contínua ou intermitente ao meio inicial após o início do cultivo (DUNN, 2003). Este tipo de processo é usado principalmente para evitar a utilização de substratos que inibem a taxa de crescimento, superar a repressão catabólica, exigir menos biomassa inicial, superar o problema de contaminação e para evitar a mutação e a instabilidade do plasmídeo encontradas em cultura contínua (NAG, 2008).

Na cultura contínua, o meio fresco é adicionado ao sistema de batelada na fase exponencial de crescimento microbiano com uma retirada correspondente do meio contendo os produtos. O cultivo contínuo possui um crescimento quase equilibrado, com pouca flutuação de nutrientes, metabólitos, número de células ou biomassa (BINOD et al, 2008).

Há três fases para o cultivo de *P. pastoris* e a indução de proteínas quando usado o promotor AOX. A fase 1 é a de batelada da fermentação, que se inicia com a inoculação e permanece até o glicerol ser consumido pelas células, com o objetivo de produzir biomassa. A fase 2 é a de batelada alimentada de glicerol, acontece quando ocorre a depleção do glicerol inicial (fase 1) e é iniciada a alimentação limitada de glicerol com o objetivo de começar a desreprimir o promotor AOX e preparar as células para a indução. A fase 3 consiste na batelada alimentada de metanol, quando o metanol é adicionado para iniciar a indução após o esgotamento do glicerol (LIU et al.,2016; RAMEY, 2006).

Os parâmetros do processo de fermentação devem ser monitorados e controlados. Todos os parâmetros, tais como pH, temperatura, aeração, rotação, composição do meio de cultura e até mesmo cepas e promotores usados são importantes, porém, a taxa de oxigênio dissolvido é um parâmetro crucial para controlar o processo de batelada alimentada, pois a concentração específica do produto depende linearmente do oxigênio dissolvido (BUSHELL et al., 2003).

Para a produção em larga escala das CaneCPIs 4 e 5 com promotor AOX foi usado o biorreator do tipo STR e o processo de fermentação foi por batelada alimentada.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Construção dos vetores de expressão de CaneCPI-4 em *P. pastoris*

A ORF da CaneCPI-4 excluindo-se o seu peptídeo sinal foi amplificada a partir do clone pET28a CaneCPI-4, construído por Gianotti (2008). O protocolo de amplificação foi o mesmo usado para a construção das CaneCPIs-4 mutantes (capítulo 2, subitem 4.1.1 de Material e métodos). Os *primers* para a clonagem nos vetores pGAZαA e pPICZαA foram: CaneCPI-4PP_Fw, 5'-AAAGAATTCGCGCGTGCGGGGGCCCCTGCA -3' e CaneCPI-4PP_Rw, 5'-AAAGTCGACGTCGGCCGACGCGAAGGATAC -3' (as sequências grifadas indicam os sítios das enzimas de restrição *EcoRI* e *SalI*, respectivamente). A temperatura de hibridização foi de 60 °C. A clivagem do produto amplificado e dos vetores pGAPZαA e pPICZαA com as enzimas *EcoRI* e *SalI*, assim como a purificação, ligação e transformação em bactéria DH5α para obtenção do DNA plasmidial foram realizadas como descrito no capítulo 2, subitem 4.1.1 de Material e métodos.

Para uma confirmação efetiva dos clones denominados de pGAP-CaneCPI4PP e pPIC-CaneCPI4PP, foi realizado o sequenciamento em MegaBACE 1000 Flexyble, usando o *kit DYEnamic ET Dye Terminator* (GE Healthcare) e os *primers* do vetor, fator α (5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3') e AOX3' (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3').

5.2.2 Otimização de códons da CaneCPI-5 e construção do vetor de expressão em *P. pastoris*

A ORF da CaneCPI-5, excluindo-se o seu peptídeo sinal e com otimização dos códons para expressão em *P. pastoris*, foi sintetizado pela empresa GenOne. Os sítios das enzimas de restrição *EcoRI* e *SalI* foram adicionados às extremidades 5' e 3' da sequência, respectivamente. O gene sintetizado foi clonado em pUC e enviado liofilizado. Após a solubilização do liofilizado em água, o gene sintético da CaneCPI-5 foi amplificado usando os *primers* universais M13 *forward* e *reverse*. O produto amplificado e os vetores pGAPZαA e pPICZαA foram clivados com as enzimas *EcoRI* e *SalI*, como descrito no capítulo 2, subitem 4.1.1 de Material e métodos. Os plasmídeos recombinantes foram denominados pGAP-CaneCPI5Opt e pPIC-CaneCPI5Opt.

A construção dos plasmídeos de expressão da CaneCPI-5 em *P. pastoris* foi parte do projeto de iniciação científica “Expressão recombinante da canacistatina 5 (CaneCPI-5) em *Pichia pastoris*: otimização de códons e testes de liofilização” da bolsista FAPESP Patrícia da Silva Lima.

5.2.3 Transformação dos plasmídeos pGAP-CaneCPI4PP, pPIC-CaneCPI4PP, pGAP-CaneCPI5Opt e pPIC-CaneCPI5Opt

Para a transformação do plasmídeo pGAP-CaneCPI4PP em *P. pastoris*, aproximadamente 2 µg de DNA plasmidial foram linearizados com 10 U da enzima de restrição *Xma*JI (Thermo Fisher Scientific). A mesma quantidade do plasmídeo pPIC-CaneCPI4PP foi linearizada com 10 U da enzima *Pme*I (Thermo Fisher Scientific). A linearização de ambos os plasmídeos foi incubada a 37 °C por 16 h. O vetor linearizado foi precipitado adicionando-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e 2,5 vezes o volume de etanol absoluto gelado, a mistura foi homogeneizada e incubada por 15 min a -80 °C. Após a centrifugação (16000 g, 10 min), o DNA precipitado foi lavado com etanol 80%, mais uma vez centrifugado e o sobrenadante descartado. Após secagem, o DNA foi ressuspensionado em 10 µL de água.

Os plasmídeos pGAP-CaneCPI5Opt e pPIC-CaneCPI5Opt também foram linearizados com as mesmas enzimas e protocolo usados para pGAP-CaneCPI4PP e pPIC-CaneCPI4PP.

As células competentes de *P. pastoris* cepas KM71H e X-33 foram produzidas de acordo com Cregg, Vedvick e Raschke (1993) com algumas modificações. Uma pequena quantidade de massa celular, pega com a ponta de um palito de dente, foi usada para inocular 5 mL de meio YEPD (1% de extrato de levedura - Himedia, 2% de peptona - Himedia, 2% de dextrose – JTBaker). O inóculo foi incubado por 8 h a 28 °C, 250 rpm. Passadas as 8 h, 50 µL desse inóculo foram utilizados para inocular 50 mL de meio YEPD, na mesma temperatura de incubação e rotação citadas anteriormente, até atingir DO₆₀₀ entre 1,0 a 1,5 (aproximadamente 16 h). A suspensão celular (25 mL) foi centrifugada a 1500 g por 5 min a 4° C e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensionadas em 5 mL de YEPD, juntamente com 1 mL de HEPES (JT Baker) 1M, pH 7,0 e 125 µL de DTT (USB) 1M, pH 5,2 e incubou-se por 15 min a 28 °C. Em seguida, o volume da mistura foi completado com água gelada para 25 mL. A solução foi centrifugada nas mesmas

condições e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 12,5 mL de água gelada e novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 1 mL de sorbitol (JT Baker) 1M gelado e centrifugou-se, descartando-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 50 μ L de sorbitol 1M gelado e alíquotas de 40 μ L usadas para a transformação. Aproximadamente 1 μ g (10 μ L) do plasmídeo linearizado foi adicionado e misturado aos 40 μ L de células competentes, que após homogeneização foram incubadas por 5 min em gelo. Após o tempo decorrido, as células foram eletroporadas em cubetas de 0,2 cm (BioRad) a 1,5 kV, 25 μ F e 200 Ω . Adicionou-se às células 1 mL de sorbitol 1 M e incubou-se por 2 h a 28 °C, sem agitação. Posteriormente, as células foram inoculadas em meio YEPDS ágar (1% de extrato de levedura - Himedia, 2% de peptona - Himedia, 2% de dextrose - Merck, 2% de ágar - Himedia, 1 M de sorbitol – JT Baker), contendo 100 e 500 μ g/mL do antibiótico Zeocina (Thermo Fisher Scientific). Após quatro dias de incubação, foram isoladas as colônias com os prováveis recombinantes.

5.2.4 Produção em *shaker* e purificação das cistatinas recombinantes

As colônias supostamente recombinantes foram avaliadas quanto à produção das proteínas CaneCPI-4 e CaneCPI-5 em pGAPZ α A e pPICZ α A nas cepas KM71H e X-33, em um processo de indução da expressão em pequena escala, usando uma placa de cultura de 24 poços (Whatman). Dentre as colônias recombinantes, 22 foram selecionadas. Em um dos poços restantes foi inoculado um clone já caracterizado de uma proteína expressa no LBM como controle positivo e em outro foi inoculada a KM71H ou X-33 sem transformante. As 24 colônias foram inoculadas em 3 mL de meio de cultivo. Para os clones em vetor pGAP (promotor constitutivo) foi usado o meio YEPD e em vetor pPIC (promotor induzível) o meio BMGY (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0, 1,34% de YNB, 4 x 10⁻⁵% de biotina e 1% de glicerol). A placa de cultura foi então incubada a 28 °C sob agitação de 250 rpm em *shaker*. Os clones em pPIC cresceram no meio BMGY por 48 h e após este período foram submetidos à centrifugação (1500 g, 10 min). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2 mL do meio indutor BMMY (a mesma composição do meio BMGY, porém o glicerol é substituído por 0,75% de metanol). Seguindo intervalos de 24 h, foram retirados 100 μ L do sobrenadante, até completar 96 h e 144 h de indução para pGAP e pPIC, respectivamente. Cada um dos intervalos foi analisado

em SDS-PAGE 15% (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). O clone selecionado para a produção da enzima recombinante em maior escala em *shaker* foi o que apresentou maior produção de proteína em um menor intervalo de tempo. O clone selecionado foi então produzido da mesma maneira que em pequena escala, porém em um volume de 200 mL (em um erlenmeyer de 2 L) de meio YEPD para o clone em pGAP e BMMY para o clone em pPIC.

A protocolo de purificação das CaneCPIs expressas em levedura e diálise foram os mesmos já mencionados no subitem 3.2.1 de Material e métodos do capítulo 1.

5.2.5 Deglicosilação da CaneCPI-4 expressa em *Pichia pastoris* e ensaio de inibição da proteína glicosilada e deglicosilada

A deglicosilação da CaneCPI-4 foi realizada usando dois protocolos diferentes, um em qual a proteína foi desnaturada antes da deglicosilação, seguindo o protocolo da enzima Endo H (Biolabs) e outro em qual a proteína foi deglicosilada sem desnaturar. Em ambos protocolos foram usados 4 µg da proteína.

No protocolo desnaturante, a proteína foi desnaturada usando 1 µL do tampão desnaturante (5% SDS, 0,4 M DTT) 10x em uma reação de 10 µL. A reação foi incubada a 100 °C por 10 min. Em seguida foram adicionados à reação 2 µL do tampão de reação G5 10x (0.5 M citrato de sódio pH 5.5) e 1 uL da enzima Endo H (500.000 U/mL). O volume de reação foi ajustado para 20 uL com água. A reação foi incubada a 37 °C por 4 h.

No protocolo não desnaturante a proteína foi adicionada à reação contendo 2 µL do tampão de reação G5 10x (0.5 M citrato de sódio pH 5.5) e 1 uL da enzima Endo H (500.000 U/mL). O volume de reação foi ajustado para 20 uL com água. A reação foi incubada a 37 °C por 4 h.

Após incubação, a CaneCPI-4 glicosilada, deglicosilada desnaturada e não desnaturada foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

Em seguida a CaneCPI-4 glicosilada, deglicosilada desnaturada e não desnaturada e a produzida em *E. coli* foram usadas em ensaios de inibição contra a papaína para fins comparativos. Foram adicionados 500 µM de papaína à cubeta de quartzo contendo 100 mM de tampão acetato de sódio pH 5,5 e 2,5 mM de DTT a um volume final de 500 µL por 3 min a 37 °C. O substrato Z-Phe-Arg-MCA (20 µM) foi adicionado à reação e após 60 seg, 0,8 µM de CaneCPI-4 glicosilada foi

adicionada à cubeta. O mesmo foi feito usando 0,8 μM de CaneCPI-4 deglicosilada desnaturada e não desnaturada e também usando 0,8 μM da CaneCPI-4 produzida em *E. coli*.

A fluorescência foi monitorada em espectrofluorímetro Hitachi F-2500 a $\lambda_{\text{ex}} = 380$ e $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm. A atividade inibitória de cada uma das proteínas foi determinada pela atividade enzimática residual da papaína após adicionar o inibidor. Os valores dos *slopes* foram obtidos pelo programa FL solutions 2.0. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

5.2.6 Expressão das cistatinas em larga escala

Primeiramente o clone pPIC-CaneCPI4PP cepa KM71H foi induzido antes de CaneCPI-5 em Biorreator New Brunswick Scientific BioFlow/CelliGen 115 com a colaboração do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior (Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

O biorreator suportava o volume máximo de 4 L, então 2,52 L de base de meio de cultura (1% extrato de levedura e 2% peptona) foram adicionados ao biorreator. A sonda de oxigênio dissolvido, a de pH e o termômetro foram também inseridos e autoclavados por 30 min a 121 °C. Após a autoclavagem e o resfriamento da dorna, os outros componentes do meio (tampão fosfato de potássio, YNB, biotina e glicerol) foram acrescentados totalizando um volume de 3,6 L. As sondas de pH e oxigênio e o termômetro foram conectados a unidade de controle. Depois de 4 h de polarização da sonda de oxigênio dissolvido, foi realizada a calibração zerando o oxigênio dissolvido com nitrogênio e esperava-se novamente atingir a taxa de 100 % de oxigênio dissolvido. Esse procedimento de calibração foi realizado 3 vezes. Também foram calibrados a sonda de pH e termômetro. A calibração foi feita a 700 rpm, 1 vvm a 30 °C pH 6,0.

Antes de inocular em biorreator, foi feito um pré-inóculo do clone pPIC-CaneCPI4PP com 40 mL de BMGY, incubado a 30 °C, 250 rpm por 24h em *shaker* New Brunswick. Após as 24h foi feita a inoculação em 360 mL de meio BMGY sob as mesmas condições de incubação do pré-inóculo. Seguido este período, os 400 mL ($\text{DO}_{600} = 43$) foram inoculados aos 3,6 L de meio no biorreator, a 600 rpm, 1 vvm, pH 5,5, temperatura 28 °C. A partir do momento da inoculação em biorreator a taxa de oxigênio dissolvido de 100% foi caindo e passadas 12 h, a taxa de oxigênio

dissolvido voltou a 100%, indicando que o glicerol havia esgotado. Neste momento, a expressão foi induzida com 1% de metanol. A indução foi monitorada pela taxa de oxigênio dissolvido por 18 h, quando necessário era controlada variando rotação e aeração.

O clone pPIC-CaneCPI5Opt cepa X-33 foi induzido em biorreator New Brunswick Scientific BioFlow IIC com a colaboração do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior (Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Engenharia Química – UFSCar).

O biorreator suportava o volume máximo de 5 L, porém decidiu-se induzir 3 L de meio de cultura inoculado. Para isso, foi feito um pré-inóculo com 30 mL de meio BMGY incubado a 28 °C, 250 rpm por 24h em *shaker* New Brunswick, o qual foi inoculado em 270 mL do mesmo meio e incubado sob as mesmas condições do pré-inóculo por 16 h. Após este período, os 300 mL ($DO_{600} = 67,2$) foram inoculados aos 2,7 L de meio de cultura no biorreator a 400 rpm, 0,5 vvm, pH 5,5, temperatura 28 °C. Conforme foi necessário, de acordo com o monitoramento do oxigênio dissolvido, a rotação chegou a 600 rpm antes da indução. Após 7 h de inoculação, a expressão foi induzida com 1% de metanol, mas diferentemente da indução de CaneCPI-4 em que o metanol foi adicionado em batelada, para a CaneCPI-5 o metanol foi adicionado em batelada-alimentada de acordo com o Guia de Processo de Fermentação em *Pichia* (INVITROGEN, 2002), começando com uma vazão de 0,5 rpm = 10,8 mL/h. A vazão era elevada quando o oxigênio dissolvido chegava próximo a 100 %. Três horas após a indução, a vazão foi aumentada para 1,0 rpm = 20,6 mL/h e 6 h após a indução, a vazão foi elevada a 1,3 rpm = 28,9 mL/h. Após 2 h de indução a rotação foi aumentada para 700 rpm e a aeração para 0,9 vvm, sendo assim mantidos até o final da indução (22 h).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Expressão das CaneCPIs 4 e 5 em *Pichia pastoris*

A sequência codificadora de CaneCPI-4 referente à proteína madura possui 330 pb, considerando os sítios das enzimas de restrição usadas na clonagem e a cauda de histidinas fusionada (sequência no ANEXO II). A proteína secretada contém 110 resíduos de aminoácidos e massa molecular teórica de 12092,30 Daltons.

A CaneCPI-4 usando como hospedeiro a cepa KM71H (Mut^S) foi expressa com sucesso em *Pichia pastoris*, porém só houve expressão do clone usando o vetor pPICZαA, ou seja, aquele que possui o promotor AOX induzido por metanol. Como já sabido, a KM71H é uma cepa que metaboliza pobremente o metanol, portanto o uso do metanol é para indução e produção de proteínas e não como fonte de carbono para crescimento celular. O promotor AOX permanece reprimido na presença de glicerol e há somente crescimento celular quando esta fonte de carbono é utilizada. Ao esgotar o glicerol e adicionar metanol, o promotor AOX é fortemente induzido e a fonte de carbono neste caso é em sua maior parte destinada para a produção de proteína e não para crescimento celular. Já para o promotor constitutivo GAP, a fonte de carbono é o glicerol, que é usado tanto para crescimento quanto para produção proteica (LOOSER *et al.*, 2015).

A otimização de genes heterólogos de acordo com seu hospedeiro, assim como da composição GC e estrutura secundária do RNA, podem aumentar os níveis de expressão de uma determinada proteína recombinante (ARJMAND *et al.*, 2013).

A sequência codificadora referente à proteína madura da CaneCPI-5 otimizada possui 369 pb, considerando os sítios das enzimas de restrição usadas na clonagem e a cauda de histidinas fusionada (sequência no ANEXO II). A proteína secretada contém 123 resíduos de aminoácidos e massa molecular teórica de 13459.29 Daltons. Porém, em SDS-PAGE observa-se uma banda de aproximadamente 15 kDa. Uma análise usando a enzima Endo H é necessária para verificar se a CaneCPI-5 sofre glicosilação quando expressa em *P. pastoris*, assim como foi realizado para CaneCPI-4.

Neste trabalho, a proteína CaneCPI-5 foi expressa eficientemente em *Pichia pastoris* cepa X-33 (Mut⁺), tanto utilizando o plasmídeo pGAP-CaneCPI5Opt, quanto o pPIC-CaneCPI5Opt (Figura 13). Esta cepa foi escolhida por ser capaz de metabolizar qualquer fonte de carbono, o que facilita seu uso em expressão em larga escala.

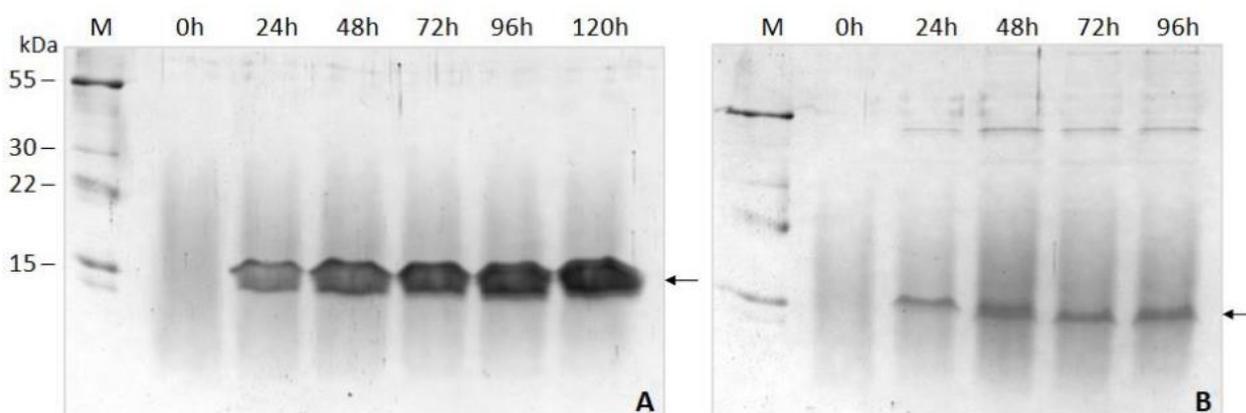


Figura 13. Análise da expressão da CaneCPI-5 em transformantes de *Pichia pastoris* cepa X-33. SDS-PAGE 15% mostrando em M: marcador de massa molecular; **(A)** expressão da CaneCPI-5 de 0 – 120h (intervalos de 24h) usando o vetor pPICZ α A; **(B)** expressão da CaneCPI-5 de 0 – 96h usando o vetor pGAPZ α A. A seta indica a banda de expressão de aproximadamente 15 kDa.

5.3.2 Efeito da glicosilação na atividade da CaneCPI-4 expressa em *Pichia pastoris*

Sabe-se que proteínas produzidas por *P. pastoris* podem sofrer modificações pós-traducionais, como as glicosilações. De acordo com análise em SDS-PAGE 15%, observou-se uma banda de aproximadamente 19 kDa de CaneCPI-4 expressa em levedura. Segundo o software NetNGlyc 1.0 (GUPTA; JUNG; BRUNAK, 2004) há um potencial sítio para N-glicosilação na sequência de aminoácidos de CaneCPI-4.

Para garantir que essa diferença de massa molecular era consequência da glicosilação foi realizada uma deglicosilação usando a enzima Endoglicosidase H (Biolabs), a qual é responsável por clivar manoses e alguns oligossacarídeos híbridos a partir de glicoproteínas N-ligadas.

Foram utilizados dois protocolos de deglicosilação, um exatamente de acordo com as instruções do fabricante, no qual a proteína é desnaturada antes da deglicosilação e um outro, no qual a proteína foi deglicosilada sem ser desnaturada.

A proteína deglicosilada desnaturada e não desnaturada foi analisada em gel de poliacrilamida e uma banda de aproximadamente 12 kDa foi observada (Figura 14), confirmando que a CaneCPI-4 sofre N-glicosilação quando produzida em *P. pastoris*. O protocolo usado sem desnaturar a proteína demonstrou que a enzima Endo H foi capaz de deglicosilar a CaneCPI-4 mesmo sem o processo de desnaturação.

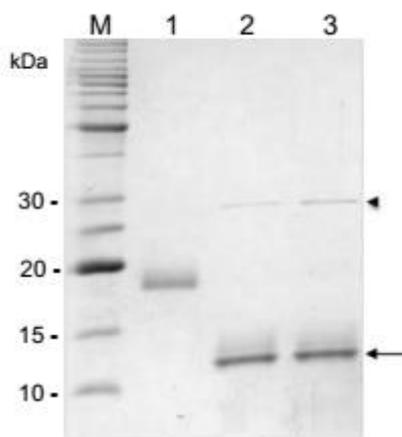


Figura 14. Análise de deglicosilação da CaneCPI-4. Análise de deglicosilação utilizando a enzima Endo-H. M: marcador de massa molecular BenchMark (Thermo Fisher Scientific); 1: CaneCPI-4 sem deglicosilar; 2: CaneCPI-4 desnaturada e deglicosilada; CaneCPI-4 não desnaturada e deglicosilada. A seta indica a banda de CaneCPI-4 deglicosilada com aproximadamente 12 kDa, a cabeça de seta indica a banda referente à Endo-H, que possui 29 kDa.

Foram testados dois protocolos diferentes de deglicosilação para verificar se ao desnaturar a CaneCPI-4 para posterior deglicosilação, esta perderia sua capacidade inibitória.

Uma análise das atividades inibitórias da CaneCPI-4 produzida em *E. coli* e em *P. pastoris* (glicosilada, desnaturada antes de deglicosilar e não desnaturada deglicosilada) contra a enzima papaína foi realizada. Todas permaneceram com a mesma capacidade inibitória, inibindo 30% da atividade catalítica de papaína, comprovando que a glicosilação não afeta sua atividade inibitória, e mesmo sofrendo desnaturação para o processo de deglicosilação, a CaneCPI-4 é capaz de manter seu poder de inibição.

5.3.3 Produção das CaneCPIs 4 e 5 em biorreator

O clone pPIC-CaneCPI4PP foi induzido em 4 L de meio de cultura em biorreator, porém a tentativa em aumentar a escala de produção dessa cistatina não teve sucesso. Durante as 18 h de indução o oxigênio dissolvido não caiu desde o momento em que o metanol foi adicionado, ou seja, permaneceu em 100%, indicando que as células não estavam consumindo oxigênio. Após este tempo, foi realizado um teste de viabilidade celular com azul de metileno e constatou-se que as células estavam mortas. Isso provavelmente ocorreu devido à batelada de metanol adicionada de uma só vez, e não por batelada alimentada. A alta concentração de

metanol tornou-se tóxica para as células, já que a cepa utilizada era a KM71H, a qual é incapaz de metabolizar metanol.

Devido ao insucesso na produção de CaneCPI-4 usando a cepa KM71H, optou-se por transformar o plasmídeo pPIC-CaneCPI5Opt na cepa X-33, pela sua capacidade em metabolizar qualquer fonte carbono, inclusive metanol. Para a produção de CaneCPI-5 em biorreator foram seguidas as recomendações do Guia de Processo de Fermentação em *Pichia* (INVITROGEN, 2002).

Apesar da conveniência de se utilizar plasmídeos com o promotor GAP para expressão em larga escala, por ser economicamente mais viável e porque em determinadas quantidades o metanol acaba tornando-se tóxico para as células, optou-se por usar clones transformados com o plasmídeo pPIC-CaneCPI5Opt para expressão em biorreator. Essa escolha foi feita pelo fato da CaneCPI-5 ser mais expressa quando este vetor foi usado e porque esta proteína estava sendo utilizada em grande quantidade em experimentos de proteção do esmalte dentário, demandando grande quantidade.

A CaneCPI-5 foi expressa com sucesso em 3 L de meio de cultura em biorreator, produzindo estimativamente 100 mg/L de proteína, aproximadamente 6 vezes mais do que o rendimento da proteína expressa em *E. coli* e a mesma quantidade que aquela produzida em *Pichia pastoris* cultivada em *shaker*.

Conforme mostrado na figura 15, após 4 h de indução já há produção da cistatina, sendo que em *shaker* essa produção começa próxima a 24 h. Em *shaker* é possível induzir apenas 200 mL de meio de cultivo utilizando erlenmeyers de 2 L, e ainda é necessário a troca de meio contendo glicerol pelo meio contendo metanol, sendo que em biorreator a produção ocorre em 3 L de meio indutor, o meio de cultivo não precisa ser trocado, aguarda-se a depleção do glicerol e posteriormente o metanol é adicionado. Estes fatores são importantes quando a proteína possui aplicação industrial.

É também possível observar que os níveis de expressão não aumentaram no decorrer do tempo. Verificou-se que após 10 h de indução o pH estava abaixo de 5, segundo o Guia de Processo de Fermentação em *Pichia* (INVITROGEN, 2002), o pH ideal para a fermentação de *Pichia pastoris* é entre 5,0 e 6,0, sendo um fator importante para o crescimento celular e secreção da proteína. Nas horas seguintes, o pH foi diminuindo cada vez mais, chegando a 4,5 no final da

indução, o que pode ter interferido no aumento de produção da proteína no decorrer das horas.

Uma banda de aproximadamente 15 kDa pode ser observada, porém a massa molecular teórica de CaneCPI-5 produzida em levedura é de aproximadamente 13,5 kDa, provavelmente isso ocorre devido à glicosilação. Isso deve ser testado, como já explicado no subitem 5.3.1. No entanto, acredita-se que esta possível glicosilação não deve interferir em sua atividade inibitória, assim como foi verificado para a CaneCPI-4.

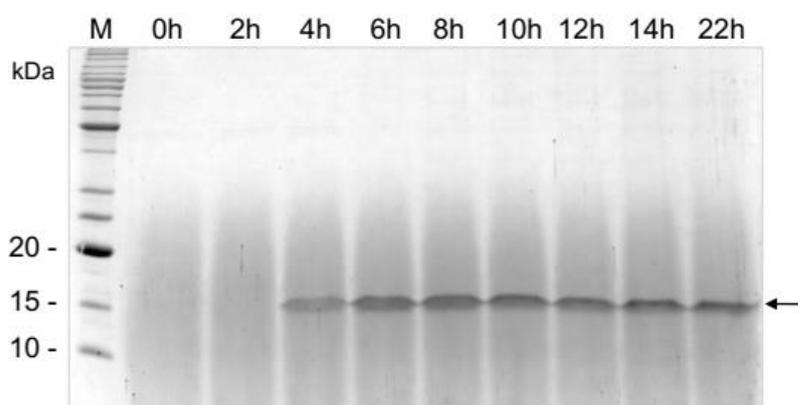


Figura 15. Análise da expressão de CaneCPI-5 em biorreator. SDS-PAGE 15% mostrando a expressão de CaneCPI-5 até 22h após a indução com metanol. M: marcador de massa molecular BenchMark (Thermo Fisher Scientific). A seta indica a banda de expressão de aproximadamente 15 kDa.

Como bem elucidado por Looser *et al.* (2015), muitos fatores influenciam na obtenção de proteínas produzidas em biorreator. Deve ser levado em consideração a construção gênica (promotores e cepas utilizados), as condições de cultura (meio de cultura, concentração de biomassa, temperatura, pH, rotação e aeração) e até mesmo o biorreator usado. Para a produção de CaneCPI-5 em biorreator somente foi seguido o Guia de Processo de Fermentação em *Pichia* (INVITROGEN, 2002) com procedimentos e parâmetros padrões. Como já dito anteriormente, o pH não foi controlado, e este é um parâmetro que afeta diretamente a produção proteica. Outro fator a ser levado em consideração é o meio utilizado, pois foi usado o meio de cultura padrão para produção em *shaker*, sendo que em biorreator outros meios enriquecidos devem ser testados e padronizados, como os meios BSM e PTM indicados no Guia de Processo de Fermentação em *Pichia* (INVITROGEN, 2002).

A CaneCPI-5 produzida e caracterizada neste trabalho foi utilizada em

ensaios de proteção de esmalte dentário frente à erosão dentária, mostrando-se altamente efetiva e permitindo a publicação de um artigo em importante revista científica na área de odontologia (Journal of Dental Research, IF: 4,75), assim como o depósito de uma patente (cujas páginas iniciais são mostradas a seguir).

A New Sugarcane Cystatin Strongly Binds to Dental Enamel and Reduces Erosion

A.C. Santiago^{1*}, Z.N. Khan^{2*}, M.C. Miguel¹, C.C. Gironda²,
A. Soares-Costa¹, V.T. Pelá², A.L. Leite², J.M. Edwardson³, M.A.R. Buzalaf²,
and F. Henrique-Silva¹

Journal of Dental Research
2017, Vol. 96(9) 1051–1057
© International & American Associations
for Dental Research 2017
Reprints and permissions:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0022034517712981
journals.sagepub.com/home/jdr

Abstract

Cystatin B was recently identified as an acid-resistant protein in acquired enamel pellicle; it could therefore be included in oral products to protect against caries and erosion. However, human recombinant cystatin is very expensive, and alternatives to its use are necessary. Phycocystatins are reversible inhibitors of cysteine peptidases that are found naturally in plants. In plants, they have several biological and physiological functions, such as the regulation of endogenous processes, defense against pathogens, and response to abiotic stress. Previous studies performed by our research group have reported high inhibitory activity and potential agricultural and medical applications of several sugarcane cystatins, including CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3, and CaneCPI-4. In the present study, we report the characterization of a novel sugarcane cystatin, named CaneCPI-5. This cystatin was efficiently expressed in *Escherichia coli*, and inhibitory assays demonstrated that it was a potent inhibitor of human cathepsins B, K, and L ($K_i = 6.87, 0.49, \text{ and } 0.34 \text{ nM}$, respectively). The ability of CaneCPI-5 to bind to dental enamel was evaluated using atomic force microscopy. Its capacity to protect against initial enamel erosion was also tested *in vitro* via changes in surface hardness. CaneCPI-5 showed a very large force of interaction with enamel (e.g., compared with mucin and casein) and significantly reduced initial enamel erosion. These results suggest that the inclusion of CaneCPIs in dental products might confer protection against enamel erosion.

Keywords: cysteine peptidases, human cathepsin, phycocystatin, cysteine peptidase inhibitor, dental erosion, atomic force microscopy

Introduction

Cystatins are competitive inhibitors of cysteine peptidases (Barrett 1987). Different isoforms of cystatins have been identified in human saliva (Van Nieuw Amerongen et al. 2004; Fábíán et al. 2012) and in acquired enamel pellicle (AEP) (Yao et al. 2003; Vitorino et al. 2008; Siqueira and Oppenheim 2009; Delecrode et al. 2015), where they are believed to play a role in the defense against microorganisms. Recently, cystatin B was identified as an acid-resistant protein in AEP (Delecrode et al. 2015), suggesting that cystatins might be included in dental products to protect against caries and erosion. However, the cost of human recombinant cystatins is prohibitive, and alternative homologs are required.

Sugarcane cystatins were first described by Reis and Margis (2001), who identified 25 cystatin-like sequences in the Sugarcane Expressed Sequence Tag (SUCEST) project database (Vettore et al. 2003). Based on their report, our research group carried out several studies involving sugarcane cystatins. CaneCPI-1 was the first sugarcane cystatin to be recombinantly expressed and characterized (Soares-Costa et al. 2002). This protein showed inhibitory activity against human cathepsins B, K, L, and V (Oliva et al. 2004). CaneCPI-2 and CaneCPI-3 were characterized by Gianotti et al. (2006) and were shown to inhibit papain; CaneCPI-3 also inhibits legumain (Santos-Silva et al. 2012). CaneCPI-4 showed inhibitory

activity against human cathepsins B and L (Gianotti et al. 2008). In addition, CaneCPI-4 prevented the invasion of breast cancer cells, melanoma growth, angiogenesis, and metastasis (Gianotti et al. 2008; Oliveira et al. 2011).

In this study, we report the cloning and heterologous expression of a novel sugarcane cystatin, named CaneCPI-5, and demonstrate its inhibitory activity against human cathepsins. During our studies on its ability to inhibit cysteine peptidases,

¹Laboratory of Molecular Biology, Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil

²Laboratory of Biochemistry, Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, Brazil

³Department of Pharmacology, University of Cambridge, Cambridge, UK

*Authors contributing equally to this article.

Corresponding Authors:

F. Henrique-Silva, Laboratory of Molecular Biology, Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, Rodovia Washington Luis, Km 235, 13565-905, São Carlos, SP, Brazil.
Email: dfhs@ufscar.br

M.A.R. Buzalaf, Laboratory of Biochemistry, Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Alameda Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, 17012-901, Bauru, SP, Brazil.
Email: mbuzalaf@fob.usp.br

J.M. Edwardson, Department of Pharmacology, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1PD, UK.
Email: jme1000@cam.ac.uk



26/04/2017 870170027588
16:25

00.000.2.2.17.0317830.5

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 008691 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Fundação Universidade Federal de São Carlos

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 45358058000140

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: Rodovia Washington Luiz, Km 235, 13565-905, Monjolinho

Cidade: São Carlos

Estado: SP

CEP: 13565-905

País: Brasil

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): CISTATINA RECOMBINANTE DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA REDUÇÃO DO DESGASTE DENTÁRIO EROSIVO E PROTEÇÃO CONTRA CÁRIE DENTÁRIA

Resumo: Descreve a expressão heteróloga, purificação e inserção em produtos odontológicos de uma cistatina recombinante da cana-de-açúcar para redução do desgaste dentário erosivo e proteção contra cárie dentária, denominada CaneCPI-5. A qual, apresenta grande importância no segmento odontológico devido a sua ação inibitória contra a catepsina B e que por ser uma proteína ácido-resistente, quando incorporada à película adquirida do esmalte dentário, apresenta potencial para proteger a estrutura dentária de ataques de ácidos, de origem microbiana ou não, por impedir a dissolução do mesmo e, de aumentar a resistência ao desgaste dentário erosivo.

Figura a publicar: 6

CAPÍTULO 4

Liofilização de CaneCPI-4 e o uso de estabilizadores

6. INTRODUÇÃO

A liofilização consiste no processo de remoção de água de uma amostra congelada por sublimação e adsorção. Esse processo ocorre em três fases: 1 – congelamento da amostra, 2 – secagem primária (sublimação) e 3 – secagem secundária (adsorção) (ARAKAWA *et al.*, 2001; CRAIG *et al.*, 1999).

Este processo é bastante utilizado para aumentar a estabilidade de proteínas por longos períodos, pois evita a desnaturação e agregação das mesmas (MENSINK *et al.*, 2017). Além disso, permite que a proteína seja armazenada em temperatura ambiente, facilitando e tornando mais barata a sua estocagem e também transporte, o que é particularmente importante quando a proteína tem aplicação industrial.

Porém, a liofilização envolve duas condições estressantes para a proteína, que podem alterar sua estabilidade e atividade: o congelamento e a secagem. A estabilização das proteínas durante o processo pode ser alcançada pela adição de excipientes que protegem a estrutura proteica (ROY e GUPTA, 2004).

Geralmente algum tipo de açúcar é usado como estabilizador, sendo adicionado à proteína em solução antes da liofilização. Não existe uma única teoria que explique completamente como os açúcares estabilizam as proteínas, mas sabe-se que eles podem desacelerar a degradação físico-química de proteínas em estado sólido (MENSINK *et al.*, 2017).

A escolha do melhor estabilizante depende da sua eficácia, mas também de seu custo, visto que o processo pode encarecer o produto final. Os estabilizadores mais comumente usados são glicerol, sorbitol e PEG. Destes o que seria mais apropriado, em questão de custos, seria o glicerol. Desta forma, o melhor estabilizador é aquele que permite maior estabilidade da proteína a um menor custo.

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

6.1.1 Processo de liofilização da CaneCPI-4

A liofilização da CaneCPI-4 foi realizada em Liofilizador Liotop L101 utilizando os seguintes parâmetros: congelamento a -70 °C, secagem a ± 10 °C, condensador a -48 °C e vácuo a 153 μ Hg, em um período de 96 h a 168 h.

A CaneCPI-4 (750 μ g) foi liofilizada em eppendorf de 1,5 mL contendo tampão PBS com ou sem estabilizador em um volume final de 200 μ L. Os estabilizadores

usados foram: glicerol, eritritol, PEG 400, sorbitol e xilitol, nas concentrações de 0,5%, 1,5% e 2,5%.

Foi preparado 1 tubo de 1,5 mL com 200 μ L de CaneCPI-4 sem estabilizador e 1 tubo de 1,5 mL com 200 μ L de CaneCPI-4 com cada estabilizador em suas diferentes concentrações que não foram liofilizados e usados como amostras controle. Para a liofilização foram preparados 3 tubos de 1,5 mL contendo 200 μ L de CaneCPI-4 sem estabilizador e 3 tubos de 1,5 mL contendo 200 μ L de CaneCPI-4 com cada estabilizador em suas diferentes concentrações, para realização de triplicatas experimentais.

Antes de serem liofilizadas, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e depois estocadas a -80 °C até o momento da liofilização.

Após a liofilização, as amostras proteicas foram solubilizadas em água e imediatamente analisadas quanto à sua atividade inibitória.

6.1.2 Determinação do IC50 da CaneCPI-4 liofilizada

O IC50 da CaneCPI-4 com e sem estabilizador, antes e após liofilização foi avaliado contra a cisteína peptidase papaína. Para a reação em 500 μ L foram adicionados à cubeta de quartzo 100 mM de tampão acetato de sódio pH 5,5, 2,5 mM de DTT e 100 mM de papaína, e então incubados a 37 °C por 3 min. O substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA (20 μ M) foi adicionado após a incubação da enzima para determinar a atividade catalítica da papaína. Após 60 seg de reação, foram adicionados 115 μ M de CaneCPI-4 à cubeta para inibir 50% de atividade de papaína.

As mesmas condições e concentrações foram usadas para a CaneCPI-4 contendo 0,5%, 1,5% e 2,5% dos estabilizadores glicerol, eritritol, PEG 400, sorbitol e xilitol. A atividade inibitória foi avaliada em duplicata para cada um dos tubos, totalizando 6 medidas para cada estabilizador em cada uma de suas três diferentes concentrações. Para as amostras contendo estabilizadores, mas que não foram liofilizadas havia apenas um tubo e as medidas foram realizadas em triplicata.

A fluorescência foi monitorada em espectrofluorímetro Hitachi F-2500 a $\lambda_{ex} = 380$ e $\lambda_{em} = 460$ nm. O potencial inibitório (IC50) de cada tubo contendo CaneCPI-4 com seus respectivo estabilizadores em diferentes concentrações foi determinado pela atividade enzimática residual da papaína após adicionar o inibidor. Os valores dos *slopes* foram obtidos pelo programa FL solutions 2.0.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 CaneCPI-4 liofilizada com e sem estabilizadores

A CaneCPI-4 liofilizada sem estabilizador, com glicerol e eritritol (0,5%, 1,5% e 2,5%), PEG 400 (0,5% e 1,5%), sorbitol e xilitol (0,5 %) foram liofilizadas com sucesso em 96 h, porém a amostra contendo 0,5% de PEG 400 sofreu uma leve precipitação ao ser solubilizada. As amostras contendo maiores concentrações de PEG 400 (2,5%), sorbitol e xilitol (1,5 % e 2,5%) foram liofilizadas até 168 h, porém elas não liofilizaram completamente, ficando no fundo do tubo com um aspecto de calda. Após serem solubilizadas, as amostras contendo 1,5% de PEG e 2,5% xilitol sofreram uma leve precipitação.

6.2.2 Comparação de IC50 da CaneCPI-4 liofilizada e não liofilizada, com e sem estabilizador

Os resultados obtidos para IC50 da CaneCPI-4 liofilizada e não liofilizada, com e sem estabilizador, podem ser observados na tabela 4 (gráficos no ANEXO III).

Tabela 4. Inibição da papaína por CaneCPI-4 não liofilizada e liofilizada com estabilizadores. O IC50 para CaneCPI-4 não liofilizada e liofilizada, com e sem estabilizador, foi estabelecido e comparado à capacidade inibitória de CaneCPI-4 não liofilizada e liofilizada com diferentes estabilizadores em três diferentes concentrações.

	Não liofilizadas	Liofilizadas
CaneCPI-4 sem estabiliz.	50% (\pm 2,3)	63% (\pm 1,5)
CaneCPI-4 + 0,5% glicerol	49% (\pm 2,7)	57% (\pm 1,8)
CaneCPI-4 + 1,5% glicerol	49% (\pm 2,0)	53% (\pm 2,7)
CaneCPI-4 + 2,5% glicerol	51% (\pm 2,8)	43% (\pm 2,4)
CaneCPI-4 + 0,5% eritritol	52% (\pm 1,3)	54% (\pm 2,6)
CaneCPI-4 + 1,5% eritritol	51% (\pm 0,1)	52% (\pm 2,2)
CaneCPI-4 + 2,5% eritritol	53% (\pm 2,8)	55% (\pm 2,3)
CaneCPI-4 + 0,5% PEG	59% (\pm 1,9)	43% (\pm 2,6)
CaneCPI-4 + 1,5% PEG	55% (\pm 2,4)	59% (\pm 2,6)
CaneCPI-4 + 2,5% PEG	59% (\pm 2,0)	42% (\pm 2,3)
CaneCPI-4 + 0,5% sorbitol	54% (\pm 1,9)	57% (\pm 1,7)
CaneCPI-4 + 1,5% sorbitol	48% (\pm 1,7)	51% (\pm 2,8)
CaneCPI-4 + 2,5% sorbitol	53% (\pm 2,4)	48% (\pm 3,4)
CaneCPI-4 + 0,5% xilitol	62% (\pm 2,5)	60% (\pm 2,1)
CaneCPI-4 + 1,5% xilitol	61% (\pm 2,2)	61% (\pm 2,2)
CaneCPI-4 + 2,5% xilitol	60% (\pm 2,0)	46% (\pm 2,4)

Verifica-se que a CaneCPI-4 mesmo sem estabilizador não é afetada pela liofilização e ainda houve melhora da sua atividade inibitória após a liofilização. Como visto por Valadares *et al.* (2013), as cistatinas de cana-de-açúcar em solução tendem a dimerizar em *domain-swapping* e perdem atividade inibitória, portanto, possivelmente a CaneCPI-4 sem estabilizador em solução tenha mais proteína nesta forma do que quando liofilizada e por isso possui uma menor atividade inibitória.

Quando utilizado glicerol como estabilizador, nota-se uma melhor atividade inibitória da proteína liofilizada com 0,5 % deste estabilizador. A atividade inibitória dessa cistatina permaneceu a mesma antes e após a liofilização quando usado o eritritol. O PEG 400 pareceu ser um bom estabilizador para a proteína liofilizada somente na concentração de 1,5%, na qual a atividade inibitória foi mantida. Interessantemente, quando usado este estabilizador na cistatina sem liofilizar, há um aumento da atividade inibitória em relação à mesma sem estabilizador. O sorbitol manteve a mesma atividade inibitória da CaneCPI-4 antes e após a liofilização. O

xilitol pode ser considerado o melhor estabilizador para a CaneCPI-4, pois quando usado, a atividade inibitória deste inibidor aumentou para a proteína não liofilizada e manteve-se a mesma para a liofilizada, com exceção de quando foi usada a concentração de 2,5%.

Foi possível observar também que quando usadas algumas concentrações dos estabilizadores, como 2,5% de glicerol, 0,5% e 2,5% de PEG e 2,5% de xilitol houve uma queda da atividade inibitória da proteína liofilizada. Como visto no subitem anterior (6.2.1), as amostras contendo 1,5% de PEG e 2,5% de xilitol sofreram uma leve precipitação, o que indica uma possível desnaturação.

A precipitação pode acontecer pelo aumento da viscosidade e turbidez da amostra. Este precipitado geralmente resulta de agregações covalentes ou não covalentes (CHANG e PIKAL, 2009). As agregações covalentes ocorrem por moléculas de proteína desnaturada associadas intermolecularmente via interações hidrofóbicas, a fim de minimizar a exposição desfavorável de resíduos hidrofóbicos à água. As agregações covalentes são consequentes de alterações químicas que envolvem a formação de novas ligações (CHANG *et al.*, 2005; CHANG e PIKAL, 2009). Já na desnaturação, ocorre o desenovelamento da estrutura tridimensional da proteína e acontece com maior frequência quando a proteína é dissolvida em um líquido ou durante a secagem (MENSINK *et al.*, 2017).

Segundo Fink (1998) e Prestrelski *et al.* (1993), a desidratação que ocorre no processo de liofilização pode resultar em desnaturação e a reidratação em agregação, devido à formação de intermediários parcialmente enovelados durante o reenovelamento. A adição de estabilizadores, como açúcares, preservam efetivamente a conformação nativa da proteína após desidratação, assim como permite a retenção da estrutura nativa após reidratação (PRESTRELSKI *et al.*, 1993).

Existem duas teorias sobre o mecanismo de estabilização de proteínas liofilizadas por açúcares, a teoria da vitrificação e a teoria da substituição de água. A teoria da vitrificação descreve as alterações na reação cinética, baseada no conceito de imobilização da proteína em uma matriz rígida e amorfa de açúcar vítreo, diminuindo a mobilidade molecular da proteína (SLADE, LEVINE e REID, 1991). A teoria da substituição da água descreve a estabilização termodinâmica. Ela abrange o conceito de que durante a secagem os grupos hidroxila do açúcar formam ligações de hidrogênio com a proteína, substituindo as ligações de hidrogênio que havia entre

a água e a proteína, então a conformação nativa da proteína é mantida (ALLISON *et al.*, 1999; CROWE, J. H.; CLEGG e CROWE, L. M., 1999).

Como visto, a CaneCPI-4 pode manter-se estável à liofilização mesmo sem estabilizador, porém, dentre os estabilizadores utilizados, a melhor escolha considerando o custo/benefício seria o glicerol, que é o mais barato entre os estabilizadores usados e mantém a capacidade de inibição mesmo quando usado em baixa concentração (0,5%). Apesar de o xilitol ser o melhor estabilizador, porque além de proteger ainda melhorou a atividade inibitória de CaneCPI-4, seu custo elevado o torna inviável.

De acordo com Arai *et al.* (2002), as cistatinas possuem alta estabilidade térmica quando submetidas a altas temperaturas. Isso também foi confirmado para CaneCPI-4 por Gianotti (2008). Neste mesmo trabalho, foi observado que a CaneCPI-4 permanece estável por até três meses independente se armazenada a 4, -20 ou -80 °C, com ou sem glicerol. Com os resultados aqui obtidos, pode-se afirmar que a CaneCPI-4 também é estável quando submetida a liofilização até mesmo sem estabilizador. Logicamente ainda são necessários mais ensaios com as amostras liofilizadas armazenadas à temperatura ambiente ao longo do tempo para verificar se a CaneCPI-4 continua estável e se realmente resiste a condições estressantes. Deste modo, se confirmada a capacidade desta cistatina resistir a mudanças conformacionais sob diferentes condições de estresse, ela é um promissor inibidor de cisteíno peptidase a ser usado comercialmente.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir o seguinte:

- Um painel comparativo das atividades inibitórias das CaneCPIs 1 a 6 demonstrou que elas são eficientes inibidores de importantes cisteíno catepsinas, permitindo a seleção da CaneCPI mais apropriada para controlar a atividade de determinadas cisteíno peptidases;
- As CaneCPIs 4 e 5 são potentes inibidores de todas as cisteíno peptidases testadas, enquanto a CaneCPI-6 foi a menos eficiente;
- As mutações realizadas no C-terminal de CaneCPI-4 não aumentaram a solubilidade da proteína expressa em *E. coli*, porém elas foram capazes de alterar sua atividade inibitória;
- A expressão recombinante de CaneCPI-4 usando um sistema heterólogo em *Pichia pastoris* mostrou-se eficiente, gerando proteína pura e em quantidade suficiente para estudos de inibição. No entanto, sua expressão em biorreator não foi bem sucedida nas condições testadas;
- A CaneCPI-5 foi expressa com sucesso em biorreator, permitindo o aumento de escala de produção de *shaker* para fermentador. A proteína produzida foi utilizada com sucesso em trabalho que mostrou a sua capacidade de proteger o esmalte dentário da erosão ácida;
- A CaneCPI-4 submetida à liofilização se manteve estável mesmo sem o uso de estabilizadores, o que diminuirá o custo de produção e facilita a sua utilização industrial.

8. PERSPECTIVAS

Como visto no decorrer deste trabalho, o estudo das cistatinas de cana-de-açúcar fornece informações importantes para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas com o uso das CaneCPIs para aplicações terapêuticas e de controle de pragas na agricultura. O painel comparativo permitiu verificar que as CaneCPIs 4 e 5 podem ser promissoras para uso comercial.

As mutações pontuais, assim como a deleção no C-terminal da CaneCPI-4, não tornaram a proteína mais solúvel, porém interferiu em sua capacidade inibitória, em alguns casos até melhorando a atividade. Análises de dicróismo circular são necessárias para verificar como as mutações modificaram a estrutura deste inibidor e conseqüentemente sua interação com a enzima. Outras mutações, como N82R e V86Y já foram eleitas para também melhorar a solubilidade de CaneCPI-4 produzida em bactéria, essas mutações sítio dirigidas ou uma combinação de todas elas talvez aumente a solubilidade da proteína.

Pretende-se ampliar o uso dessas cistatinas, principalmente das CaneCPIs 4 e 5, dando seguimento aos trabalhos relacionados à proteção do esmalte dentário e aplicação destes inibidores de cisteíno peptidases em produtos odontológicos. Para isso, a produção em larga escala das CaneCPIs 4 e 5 precisa ser otimizada e padronizada, de forma que seja comercialmente viável, como a utilização de meios de cultivo mais baratos, produção em menos tempo e utilizando o promotor GAP, que não requer metanol, podendo usar o glicerol proveniente da indústria de biodiesel, que por ser um subproduto tem baixo custo.

A CaneCPI-5 inibiu fortemente a CathL de *S. levis* e provavelmente tenha a mesma capacidade inibitória para cisteíno peptidases digestivas de outros coleópteros, o que faz pensar em seu uso em plantas transgênicas ou a avaliação de seu potencial em inseticidas para ser pulverizado.

A CaneCPI-4 demonstrou até o presente momento ser estável à liofilização mesmo sem um estabilizador, porém é preciso verificar se essa estabilidade permanece no decorrer do tempo mantendo a proteína liofilizada à temperatura ambiente. O mesmo deverá ser feito com CaneCPI-5. Se essas cistatinas apresentarem essa estabilidade ao longo do tempo sem estabilizador, esta será mais uma característica que agrega valor para uso comercial.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSON, M. Cystatins—Protein inhibitors of papain-like cysteine proteinases. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 43, p. 299-304, 1993.
- AHMAD, M.; *et al.* Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 5301-5317, 2014.
- ALLISON, S. D.; *et al.* Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 365, p. 289-298, 1999.
- ALVAREZ-FERNANDEZ; ABRAHAMSON, M. Structural and protease inhibitory features of cystatins. In: Zerovnik, E.; Kopitar-Jerala, N. (Eds) **Human stefins and cystatins**. Nova York: Nova Science Publishers, Inc., 2006. p. 23-42.
- ARAI, S.; *et al.* Papain-inhibitory activity of Oryzacystatin, a rice seed cysteine proteinase inhibitor, depends on the central Gln-Val-Val-Ala-Gly region conserved among cystatin superfamily members. **The Journal of Biochemistry**, v. 109, p. 294-298, 1991.
- ARAI, S.; *et al.* Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6612-6617, 2002.
- ARAKAWA, T.; *et al.* Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 307-326, 2001.
- ARJMAND, S.; *et al.* Elevating the expression level of biologically active recombinant human alpha 1-antitrypsin in *Pichia pastoris*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 1, 2013.
- AUERSWALD, E. A. Recombinant chicken egg white cystatin variants of the QLVSG region. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 837-845, 1992.
- BARRETT, A. J. The cystatins: a new class of peptide inhibitor. **Trends in Biochemical Science**, v. 12, p. 193-196, 1987.
- BARRETT, A. J.; *et al.* Cysteine proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. In: BARRETT, A. J.; SALVESEN, G. (Eds) **Proteinase Inhibitors**. Amsterdam: Elsevier, 1986a. p. 519-569.
- BARRETT, A. J.; *et al.* Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. **Biochemical Journal**, v. 236, n. 1, p. 312, 1986b.
- BENCHABANE, M.; *et al.* Plant cystatins. **Biochimie**, v.92, p. 1657-1666, 2010.

- BINOD, P.; *et al.* Industrial Enzymes. In: Pandey, A.; Larroche, C.; Soccol, C. R.; Dussap, C. G. (Eds), **Advances in Fermentation Technology**. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc., 2008, p. 291-320.
- BODE, W.; *et al.* The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. **The EMBO Journal**, v. 7, n. 8, p. 2593-2599, 1988.
- BUGG, T. D. H. Enzymatic Hydrolysis and Group Transfer Reactions. In: **Introduction to enzyme and coenzyme chemistry**. 2. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. p. 82-95.
- BUSHELL, M. E.; *et al.* Cyclic fed-batch culture for production of human serum albumin in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, p. 678-683, 2003.
- CARRILLO, L.; *et al.* Expression of a barley cystatin gene in maize enhances resistance against phytophagous mites by altering their cysteineproteases. **Plant Cell Reports**, v. 30, p. 101-112, 2011.
- CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.
- CHANG, L. L.; *et al.* Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, p. 1427-1444, 2005.
- CHANG, L. L.; PIKAL, M. J. Mechanisms of protein stabilization in the solid state. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, p. 2886-2908, 2009.
- CINAR, A.; BIROL, G.; PARULEKAR, S. J.; UNDEY, C. **Batch Fermentation: Modeling Monitoring and Control**. CRC Press, 648 p., 2003.
- CINO, J. High-Yield Protein Production from *Pichia pastoris* Yeast: A Protocol for Benchtop Fermentation. **American Biotechnology Laboratory**, v. 17, p. 10-12, 1999.
- CRAIG, D. Q.; *et al.* The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, n. 2, p. 179-207, 1999.
- CREGG, J. M.; *et al.* *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 12, p. 3376-3385, 1985.
- CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, v.11, n.8, p.905-910, 1993.

- CROWE, J. H.; CLEGG, J. S.; CROW, L. M. Anhydrobiosis: the water replacement hypothesis. In: Reid, D. S. (Eds) **The properties of water in foods ISOPOW 6**. Boston: Springer, 1999. p. 440-455.
- DAS, S.; CROCKETT, J. C. Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 7, p. 435-448, 2013.
- DEGALEESAN, S.; DUDUKOVIC, M.; PAN, Y. Experimental study of gasinduced liquid-flow structures in bubble columns. **AIChE Journal**, v. 47, p. 1913-1931, 2001.
- DEJICA, V. M.; *et al.* Cleavage of type II collagen by cathepsin K in human osteoarthritic cartilage. **The American Journal of Pathology**, v. 173, p. 161-169, 2008.
- DeLANO, W. L. **PyMOL: An open-source molecular graphics tool**. 2002. Disponível em http://www.ccp4.ac.uk/newsletters/newsletter40/11_pymol.pdf.
- DUNN, I. J. **Biological reaction engineering: Dynamic modelling fundamentals with simulation examples**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 508 p., 2003.
- EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in Enzymology**, v. 277, p. 396-404, 1997.
- FERRY, N.; *et al.* Impact of oilseed rape expressing the insecticidal cysteine protease inhibitor oryzacystatin on the beneficial predator *Harmonia axyridis* (multicoloured Asian ladybeetle). **Molecular Ecology**, v. 12, p. 493-504, 2003.
- FLICKINGER, M. C.; DREW, S. W. **Encyclopedia of Bioprocess technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation**. USA: John Wiley & Sons, 1999.
- FONOVIĆ, M.; TURK B. Review: Cysteine cathepsins and their potential in clinical therapy and biomarker discovery. **Proteomics Clinical Application**, v. 8, p. 416-426, 2014.
- FONSECA, F. P. P.; *et al.* Recombinant expression, localization and in vitro inhibition of midgut cysteine peptidase (SI-CathL) from sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, p. 58-69, 2012.
- GIANOTTI, A. **Produção recombinante e estudos funcionais de três novas cistatinas da cana-de-açúcar e sua utilização em estudos de inibição da adesão, proliferação, migração e invasão celular**. 2008. 119 p. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

- GIANOTTI, A.; *et al.* Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L and human breast cancer cell invasion. **Biological Chemistry**, v. 389, p. 447-452, 2008.
- GIANOTTI, A.; *et al.* Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein Expression and Purification**, v. 47, p. 483-489, 2006.
- GUPTA, R.; JUNG, E.; BRUNAK, S. **Prediction of N-glycosylation sites in human proteins**. 2004. Disponível em: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>.
- HAQ, S. K.; ATIF, S. M.; KHAN, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 431, p. 145-159, 2004.
- HASHIMOTO, Y.; *et al.* Significance of 32-kDa cathepsin L secreted from cancer cells. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 21, p. 217-224, 2006.
- ILLY, C.; *et al.* Role of the occluding loop in cathepsin b activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 1197-1202, 1997.
- INVITROGEN. **Pichia fermentation process guidelines**. Catálogo K1719-91, p. 1-11, 2002.
- ISHIMOTO, M.; *et al.* Heterologous expression of corn cystatin in soybean and effect on growth of the stink bug. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, p. 2142-2145, 2012.
- JANGPROMMA, N.; *et al.* Molecular cloning and characterization in eukaryotic expression systems of a sugarcane cysteine protease inhibitor gene involved in drought tolerance. **Turkish Journal of Botany**, v. 38, p. 724-736, 2014.
- KANTARCI, N.; BORAK, F.; ULGE, K. O. Bubble column reactors. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2263-2283, 2005.
- KOIWA, H.; *et al.* Phage display selection of hairpin loop soyacystatin variants that mediate high affinity inhibition of a cysteine proteinase. **The Plant Journal**, v. 27, n. 5, p. 383-391, 2001.
- KONDO, H.; *et al.* Gene organization of oryzacystatin-II, a new cystatin superfamily member of plant origin, is closely related to that of oryzacystatin-I but different from those of animal cystatins. **FEBS Letter**, v. 278, p. 87-90, 1991.
- KOS, J., *et al.* Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer. **The International Journal of Biological Markers**, v. 15, p. 84-89, 2000.
- KRAMER, L.; TURK, D.; TURK, B. The future of cysteine cathepsins in disease management. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 10, p. 873-898, 2017.

- LARKIN, M. A.; *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.
- LASKOWSKI, R. A.; *et al.* PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 283-291, 1993.
- LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 93-109, 2002.
- LEATHERBARROW, R. **Grafit Version 5 User Manual**. 2001. Disponível em: [http://www.erithacus.com/grafit/binary/GraFit version 5.pdf](http://www.erithacus.com/grafit/binary/GraFit%20version%205.pdf).
- LECARDONNEL, A.; *et al.* Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. **Plant Science**, v. 140, p. 71-19, 1999.
- LEPELLEY, M.; *et al.* Coffee cysteine proteinases and related inhibitors with high expression during grain maturation and germination. **BMC Plant Biology**, v. 12, p. 31, 2012.
- LEUNG-TOUNG, R.; *et al.* Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 979-1002, 2002.
- LIU, J.; *et al.* Increased serum cathepsin S in patients with atherosclerosis and diabetes. **Atherosclerosis**, v. 186, p. 411-419, 2006.
- LIU, W. C.; *et al.* Scaling-up Fermentation of *Pichia pastoris* to demonstration-scale using new methanol-feeding strategy and increased air pressure instead of pure oxygen supplement. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.
- LOOSER, V.; *et al.* Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1177-1193, 2015.
- MARGIS, R.; REIS, E. M.; VILLERET, V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 359, p. 24-30, 1998.
- MARTINEZ, M.; DIAZ, I. The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, p. 198, 2008.
- MARTINEZ, M.; *et al.* Carboxy terminal extended phytocystatins are bifunctional inhibitors of papain and legumain cysteine proteinases. **FEBS Letter**, v. 581, p. 2914-2918, 2007.
- MARTINEZ, M.; *et al.* Phytocystatins: Defense proteins against phytophagous insects and acari. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1-16, 2016.

- MELO, P. M. S.; *et al.* Inhibition of Plasmodium falciparum cysteine proteases by the sugarcane cystatin CaneCPI-4. **Parasitology international**, v. 67, p. 233-236, 2018.
- MENG, F.; *et al.* Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): Membrane fouling and membrane material. **Water Research**, v. 43, p. 1489-1512, 2009.
- MENSINK, M. A.; *et al.* How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 114, p. 288-295, 2017.
- MIGUEL, M. C. **Produção recombinante e caracterização de duas cistatinas de cana-de-açúcar**. 2014. 66 p. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- MOHAMED, M.M.; SLOANE, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 764-775, 2006.
- MORRISON, J. F. The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 7, p. 102-105, 1982.
- NAG, A. **Biofuels refining and performance**. McGraw-Hill Professional, 312 p., 2008.
- NAGATA, K.; *et al.* Three-dimensional solution structure of oryzacystatin-I, a cysteine proteinase inhibitor of the rice, *Oryza sativa* L. japonica. **Biochemistry**, v. 39, p. 14753-14760, 2000.
- NISSEN, M. S.; *et al.* Characterization of *Solanum tuberosum* multicystatin and its structural comparison with other cystatins. **Plant Cell**, v. 21, p. 861-875, 2009.
- NOUH, M. A; *et al.* Cathepsin B: a potential prognostic marker for inflammatory breast cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, 2011.
- OLIVA, M. L. V.; *et al.* Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine peptidase inhibitor from sugarcane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 1082-1086, 2004.
- OLIVEIRA, J. P. **Efeito de cistatinas recombinantes de cana-de-açúcar na angiogênese e desenvolvimento tumoral**. 2011. 69 p. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.
- OLIVEIRA, J. P.; *et al.* Sugarcane cystatin CaneCPI-4 inhibits melanoma growth by angiogenesis disruption. **Journal of Cancer Science and Therapy**, v. 3, p. 161-167, 2011.

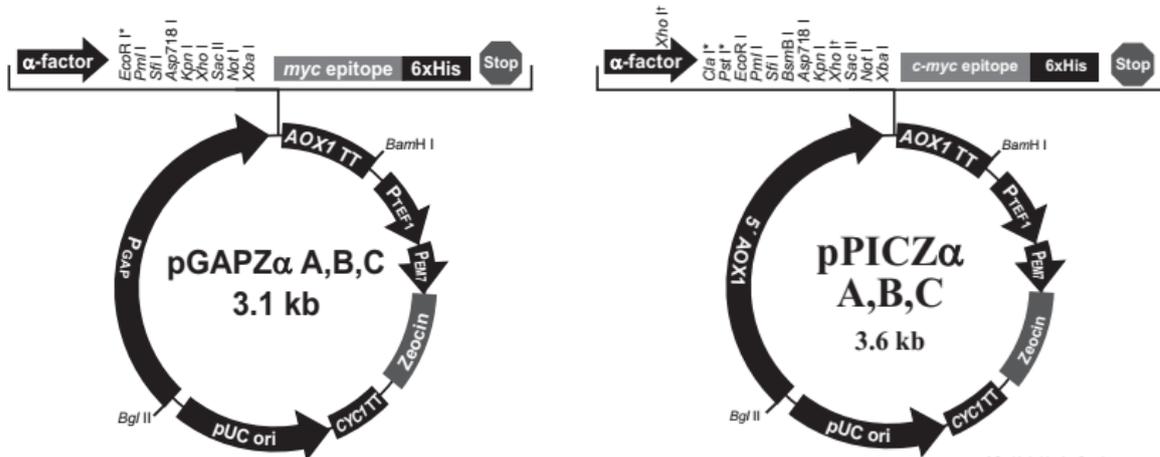
- OLSON, O. C.; JOYCE, J. A. Cysteine cathepsin proteases : regulators of cancer progression and therapeutic response. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, p. 712-729, 2015.
- PALERMO, C.; JOYCE, J. A. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, p. 22-28, 2008.
- PIERRE, O.; *et al.* Involvement of papain and legumain proteinase in the senescence process of *Medicago truncatula* nodules. **New Phytologist**, v. 202, p. 849-863, 2014.
- PRESTRELSKI, S. J.; *et al.* Dehydration-induced Conformational Transitions in Proteins and Their Inhibition by Stabilizers. **Biophysical Journal**, v. 65, p. 661-671, 1993.
- RAMEY, A. T. **Optimizing production methods for artificial silk proteins through bioreactor and purification studies of recombinant proteins expressed from pichia pastoris**. 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Clemson, Clemson, Carolina do Sul.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Families of cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, v. 244, p. 461-486, 1994.
- RAWLINGS, N. D.; *et al.* MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D503-D509, 2014.
- REIS, E. M.; MARGIS, R. Sugarcane phytocystatins: Identification, classification and expression pattern analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 291-296, 2001.
- RIBEIRO, C. W.; *et al.* Production of a His-tagged canecystatin in transgenic sugarcane and subsequent purification. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 1060-1066, 2008.
- ROSSI, A.; *et al.* Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. **Biological Chemistry**, v. 385, p. 363-372, 2004.
- ROY, I.; GUPTA, M. N. Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 39, p. 165-177, 2004.
- ROZHIN, J.; *et al.* Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. **Cancer Research**, v. 54, p. 6517-6525, 1994.
- SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, p. 779-815, 1993.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

- SANTIAGO, A. C.; *et al.* A new sugarcane cystatin strongly binds to dental enamel and reduces erosion. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 9, p. 1051-1057, 2017.
- SANTOS-SILVA, L. K.; *et al.* Recombinant expression and biochemical characterization of sugarcane legumain. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 57, p. 181-192, 2012.
- SCHEIN, C. H. Production of soluble recombinant proteins in bacteria. **Biotechnology**, v. 7, p. 1141-1148, 1989.
- SCHNEIDER, V. K.; *et al.* Transgenic sugarcane overexpressing CaneCPI-1 negatively affects the growth and development of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Plant Cell Reports**, v. 36, n. 1, p. 193-201, 2017.
- SINGH, R. N.; SHARMA, SHAISHAV. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2347-2353, 2012.
- SLADE, L.; LEVINE, H.; REID, D. S. Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, p. 115-360, 1991.
- SLOANE, B. F.; DUNN, J. R.; HONN, K. V. Honn, Lysosomal cathepsin B: correlation with metastatic potential. **Science**, v. 212, p. 1151–1153, 1981.
- SOARES-COSTA, A.; *et al.* A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 296, p. 1194-1199, 2002.
- SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*, **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 1, 2005.
- SPIER, M. R.; *et al.* Application of different types of bioreactors in bioprocesses. In: Antolli, P.G.; Liu, Z. (Eds) **Bioreactors: Design, Properties and Applications**. Nova Science Publishers, 2011, p. 55-90.
- SPIRA, D.; *et al.* Cell type-specific functions of the lysosomal protease cathepsin L in the heart. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 37045-37052, 2007.
- SVELANDER, L.; *et al.* Inhibition of cathepsin K reduces bone erosion, cartilage degradation and inflammation evoked by collagen-induced arthritis in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 613, p. 155-162, 2009.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry and molecular biology of digestion. In: GILBERT, L. I. (Ed) **Insect Molecular Biology and Biochemistry**. New York: Elsevier, 2012. p. 365–418.

- TOLOSA, E.; *et al.* Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 517-526, 2003.
- TRIMPIN, S.; BRIZZARD, B. Analysis of insoluble proteins. **Biotechniques**, v. 46, n. 5, p. 321-326, 2009.
- TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 785-799, 2006.
- TURK, D.; *et al.* Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. **Biological Chemistry**, v. 379, p. 137-147, 1998.
- TURK, V.; BODE, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Letter**, v. 285, n. 2, p. 213-219, 1991.
- TURK, V.; *et al.* Review: Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, p. 68-88, 2012.
- VALADARES, N. F.; *et al.* X-ray crystallography and NMR studies of domain-swapped canecystatin-1. **The FEBS Journal**, v. 280, p. 1028-1038, 2013.
- van WYK, S. G.; *et al.* Review: The future of cystatin engineering. **Plant Science**, v. 246, p. 119-127, 2016.
- VICIK, R.; *et al.* Inhibitors of cysteine proteases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 331-353, 2006.
- VOTTA, B. J.; *et al.* Peptide aldehyde inhibitors of cathepsin K inhibit bone resorption both in vitro and in vivo. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, p. 1396-1406, 1997.
- WATERHOUSE, A. M.; *et al.* Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189-1191, 2009.
- WEITTOFT, T.; *et al.* Cathepsin S and cathepsin L in serum and synovial fluid in rheumatoid arthritis with and without autoantibodies. **Rheumatology**, v. 54, p. 1923-1928, 2015.
- ZHANG, A. L.; *et al.* Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. **Molecular Biology Reports**, v. 36, p. 1611-1619, 2009.
- ZHANG, X.; LIU, S.; TAKANO, T. Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. **Plant Molecular Biology**, v. 68, p. 131-143, 2008.

ANEXO I

Mapa dos vetores de expressão pGAPZαA e pPICZαA. Abaixo o sítio de múltipla clonagem. As caixas em vermelho indicam os sítios das enzimas *EcoRI* e *Sall*.



5' end of AOX1 mRNA

811 AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA

871 CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTAAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT

931 ATTCGAAACG **ATG** AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala

983 TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA
Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala

α-factor signal sequence

1034 CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC
Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

1085 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe

α-factor priming site

1136 ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC
Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu

Kex2 signal cleavage

1187 GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT **GAATTC** AC GTGGCCAG CCGGCCGTC TCGGATCGGT
Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala

Ste13 signal cleavage

1244 ACCTCGAGCC GCGGCGGCC GCCAGCTTTC TA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu

c-myc epitope

polyhistidine tag

1299 GAT CTG AAT AGC GCC **GTC GAC** CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTAGCC
Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***

1351 TTAGACATGA CTGTTCTCA GTTCAAGTTG GGCACCTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA

3' AOX1 priming site

1411 TTCTAATCAA GAGGATGTCA GAATGCCATT TGCCCTGAGAG ATGCAGGCTT CATTTTTGAT

3' polyadenylation site

1471 ACTTTTTTAT TTGTAACCTA TATAGTATAG GATTTTTTTT GTCATTTTGT TTCTTCTCGT

ANEXO II

Sequência de nucleotídeos e aminoácidos das CaneCPIs 4 e 5. Em amarelo estão destacados os sítios das enzimas *EcoRI* e *SalI*, na caixa em vermelho está a cauda de histidinas.

CaneCPI-4

```

1 GAATTCGCGCGTGCG GGGGCCCTGCACGG CCGCTCGCCGGCGGG TGGTTCCCGATCAGG AACGTGAGCGACCCG
1 E F A R A G A P A R P L A G G W F P I R N V S D P
76 CACATCCAGGAGCTG GCGGCTGGGCGGTG ACGGAGCACGTCAGG CTGGCCAACGACGGA CTGAGGTTCCGGCGAG
26 H I Q E L G G W A V T E H V R L A N D G L R F G E
151 GTGACGAGCGGGGAG CAGCAGGTGGTGTCC GGGATGAACTACAGG CTCGTCTCGACGCC ACGGACGCCGACGGG
51 V T S G E Q Q V V S G M N Y R L V L D A T D A D G
226 AAGCTCGCGGCGTAC GGGGCCTTCGTGTAC GAGCAGTCGTGGACC AACACCCGCGAGCTC GTATCCTTCGCGTCC
76 K L A A Y G A F V Y E Q S W T N T R E L V S F A S
301 GCCGACGTCGACCAT CATCATCATCATCAT
101 A D V D H H H H H H

```

CaneCPI-5

```

1 GAATTCCTTAGCTCCA GTACCAGGTCCAGCC GTATTGGGTGGTGGT GGAAGAGGTCCTTTG TTGGGTGGATGGGCT
1 E F L A P V P G P A V L G G G G R G P L L G G W A
76 CCAATTCCAGACGTT GGAGACAAGCACATT CAAGAATTAGGTGGA TGGGCACTTGGTCAA GCTAAACACCAGAAG
26 P I P D V G D K H I Q E L G G W A L G Q A K H Q K
151 TTGGCTGCTGATGGA CTTCGTTTCAGGAGA GTGGTGCCTGGTGAG CAACAGGTTGTTTCA GGAATGAGGTATCGT
51 L A A D G L R F R R V V R G E Q Q V V S G M R Y R
226 CTGTATGTTGACGCA GCAGATCCAGCTGGA AGAACTGTCCCTTAT GTAGCTGTAGTTTAT GAGCAAGTTTGGACC
76 L Y V D A A D P A G R T V P Y V A V V Y E Q V W T
301 AGGACTAGGCAACTG GCATCCTTTAACCCCT GCTCCACGTGCACAT GTCGACCATCATCAT CATCATCAT
101 R T R Q L A S F N P A P R A H V D H H H H H H

```

ANEXO III

Gráficos de inibição da papaína por CaneCPI-4 não liofilizada e liofilizada com diferentes estabilizadores em três diferentes concentrações.

