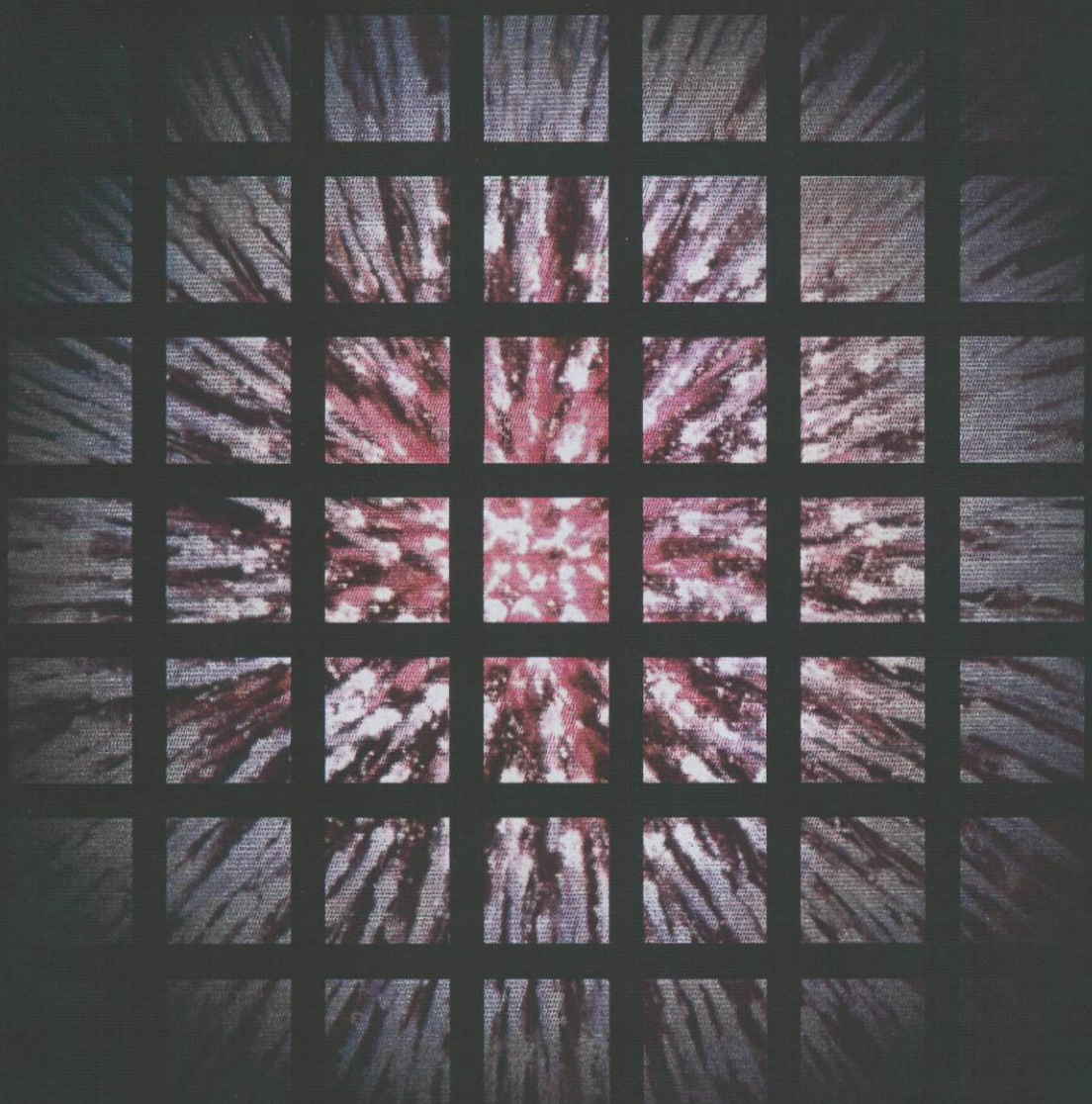
Patrícia Carla de Jesus Duarte Macedo

# Biogénese da cardosina A: estudo da expressão e do trajecto biossintético



Departamento de Botânica
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

**Março de 2005**

Patrícia Carla de Jesus Duarte Macedo

# Biogénese da cardosina A: Estudo da expressão e trajecto biossintético




*Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para obtenção do grau de Doutor em Biologia*

Departamento de Botânica
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Março de 2005

# AGRADECIMENTOS

O meu mais profundo agradecimento devo-o ao meu orientador, Professor Doutor José Pissarra, pela sua orientação neste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pelo encorajamento e apoio, mas acima de tudo, pela liberdade de escolha na progressão de um projecto que senti como muito meu.

I would also like to thank Dr. Ian Moore for the opportunity to work in his laboratory, for sharing my enthusiasm for this project, for all the great discussions and late hours in the lab, and above all, for making me believe in myself and introducing me to the fascinating world of plant endomembrane trafficking.

O meu agradecimento ao Professor Doutor Carlos Faro e à sua equipa (Centro de Neurociências de Coimbra e Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra) pela gentil cedência dos cDNAs das cardosinas A e B, assim como de todos os anticorpos dirigidos contra as cardosinas que foram usados neste trabalho.

Ao Professor Doutor Roberto Salema agradeço a oportunidade de realização deste estudo na Unidade de Biologia Funcional em Plantas do IBMC, bem como pelo incentivo e empenho que tornou possível a minha estadia no Departamento de *Plant Sciences* da Universidade de Oxford.

Os meus agradecimentos vão também para a Doutora Susana Pereira e ao Doutor Jorge Teixeira, por me terem aberto as portas para este mundo fantástico. Foi assim que tudo começou.

À Doutora Mariana Sottomayor agradeço as preciosas sugestões feitas a este trabalho, a confiança e incentivo, bem como a oportunidade de continuar a trabalhar num assunto que me fascina.

À Professora Doutora Isabel Santos, gostaria de expressar a minha mais profunda gratidão pelo saber partilhado, convivência e estímulo incondicional ao longo dos anos em que estive no IBMC.

Ao Júlio Santos, à Elsa Leitão e à Iolanda Almeida, mais do que colegas, grandes e valiosos amigos, o meu muito obrigada pelos *brain stormings,* optimismo e perseverança em todos os momentos. Espero um dia poder retribuir tudo o que fizeram por mim.

To Dr. Hazel Betts, Dr. Helen Townley, Dr. Steve Rutherford and Dr. Valérie Bourdon: my friends and mentors. Thank you so much for all the hard work, late nights in the lab, unconditional support, patience ("It's not a matter of language, it's comprehension!") and above all, friendship. I will never forget that "The sun will come out, Tomorrow!"

A todos os colegas, investigadores e pessoal técnico que directa ou indirectamente contribuíram para este trabalho.

Aos meus amigos por nunca terem deixado de o ser.

Aos meus sogros, agradeço o optimismo, incentivo e carinho indispensáveis à realização deste trabalho.

Aos meus pais, irmão e família, agradeço a paciência e compreensão para as minhas constantes ausências, pelo apoio, estímulo e amor incondicionais. Espero continuar a ser merecedora da vossa confiança nas minhas escolhas futuras.

Ao Sílvio, pelo amor. Por tudo, e por todos os pequenos nadas que o fazem tão especial.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do "Programa de Gestão de Recursos Humanos PRAXISXXI" (PRAXISXXI/BD/20318/99). Por tal, o meu profundo agradecimento.

# RESUMO

As proteinases aspárticas (PAs; EC3.4.23) são um grupo de enzimas bem definido e amplamente distribuído na natureza que tem sido objecto de intensa investigação dado o seu envolvimento em diversas patologias humanas e a sua importância na indústria dos lacticínios.

As cardosinas são PAs vegetais, originalmente isoladas de flores de *Cynara cardunculus* L. e responsáveis pela actividade coagulante exibida pelas últimas. Entre as PAs vegetais identificadas até à data, a cardosina A e a cardosina B são duas das que melhor se encontram caracterizadas, tanto do ponto de vista molecular como bioquímico. A acumulação de PAs nos órgãos florais de dicotiledóneas é um fenómeno raro, pelo que a presença das cardosinas no pistilo de *C. cardunculus* torna esta espécie um modelo interessante para o estudo das funções biológicas deste grupo de enzimas em plantas.

Na primeira parte deste trabalho procedeu-se à descrição da anatomia e ultra-estrutura do pistilo de *C. cardunculus* durante a ontogénese floral, bem como ao estudo da expressão da cardosina A (proteína e mRNA) e caracterização da distribuição desta PA nos órgãos do pistilo de cardo ao longo do desenvolvimento da flor.

Verificou-se que o mRNA da cardosina A está presente nos estados imaturos do desenvolvimento floral e que a sua presença está relacionada com o tipo específico de órgão sendo mais abundante no estigma do que no estilete ou ovário. Em estados mais avançados da ontogénese floral (inflorescência madura) o mRNA da cardosina A está ausente, indicando que a expressão da cardosina A é regulada durante o desenvolvimento. Os estudos de imunodetecção da cardosina A revelaram a sua presença principalmente em flores diferenciadas provenientes de inflorescências maduras. Finalmente, a imunolocalização das cardosinas A e B em pistilos de cardo em distintas fases de desenvolvimento revelaram que a cardosina A se acumula principalmente nas papilas epidérmicas e parênquima sub-epidérmico do estigma, estando também presente, em menor quantidade, na epiderme do estilete. Contrariamente à cardosina A, a cardosina B localiza-se predominantemente no tecido de transmissão do estilete, na região ventral da parede do ovário, no micrópilo e no nucelo do único óvulo de cardo. A distribuição diferencial das cardosinas A e B ao longo do pistilo de cardo sugere que, *in planta*, estas enzimas desempenham papéis fisiológicos distintos.

A segunda parte deste trabalho incidiu sobre o estudo do transporte intracelular e do processamento da cardosina A expressa em sistemas heterólogos, nomeadamente em plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* recorrendo a um sistema de expressão indutivo pela aplicação de um indutor químico, e na epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* recorrendo a um sistema de expressão transitória mediado por *Agrobacterium tumefaciens*.

Verificou-se que a cardosina A expressa nestes sistemas é eficientemente reconhecida, glicosilada, transportada para o compartimento subcelular correcto – o vacúolo, e processada até à forma madura. Os resultados obtidos confirmaram inequivocamente a sucessão de eventos de processamento previamente inferida para a cardosina A com base em extractos de cardo.

A expressão da cardosina A em *Nicotiana tabacum* revelou que esta proteinase segue a via secretora normal até ao vacúolo passando através do complexo de Golgi. Demonstrou-se ainda que a forma precursora da cardosina A (66 kDa), localizada no retículo endoplasmático (RE), é convertida na forma intermédia de processamento (35 kDa) após a saída da proteinase deste compartimento subcelular. Em *Nicotiana tabacum*, o exporte da cardosina A do RE para o complexo de Golgi ocorre via vesículas com revestimento COPII. Do complexo de Golgi, a cardosina A é transportada para o vacúolo onde sofre o último passo de processamento, originando-se a enzima madura (31 kDa). Não foi observado qualquer indício do exporte directo da cardosina A do RE para o vacúolo. Registou-se ainda que uma fracção da cardosina A sintetizada em *Nicotiana* é transportada para o apoplasto, provavelmente sob a forma de 35 kDa. De salientar que o último passo de processamento da cardosina A ocorre também no apoplasto, já que a forma madura (31 kDa) da PA foi também detectada no ambiente extracelular.

A integração dos dados anatómicos, ultra-estruturais, imunohistoquímicos e imunocitoquímicos obtidos neste trabalho, em combinação com a informação já disponível acerca das cardosinas, revelou que a cardosina A e a cardosina B estão diferentemente distribuídas nos órgãos do pistilo de cardo, que a expressão da cardosina A é regulada ao longo do desenvolvimento floral e que esta PA está maioritariamente presente nas inflorescências maduras, onde se acumula especificamente nos vacúolos de armazenamento de proteínas das papilas epidérmicas do estigma. Estes dados sugerem que a cardosina A possa desempenhar um papel na interacção polén-pistilo ao nível do estigma. Por sua vez, a presença da cardosina A em inflorescências abertas indica um possível envolvimento desta proteinase em mecanismos de morte celular programada e/ou senescência, um papel biológico previamente sugerido para outras PAs de origem vegetal. Os resultados obtidos neste trabalho revelaram ainda a presença ininterrupta da cardosina B ao longo do tecido de transmissão do estilete de cardo, passando pela região ventral da parede do ovário, pelo micrópilo e também na zona do nucelo do óvulo. Estas observações são muito interessantes e consistentes com a hipótese da cardosina B estar associada a interacções pólen-pistilo, a um nível do pistilo distinto do registado para a cardosina A, e que a actividade de cardosina B possa estar relacionada com a nutrição, atracção e orientação do tubo polínico até ao óvulo com o objectivo da fertilização. Os resultados apresentados

neste trabalho contribuem portanto para a elucidação das funções biológicas da cardosina A em particular, e das PAs vegetais em geral.

Este trabalho serviu ainda para a elucidação da sucessão de eventos de processamento sofridos pela cardosina A expressa em sistemas heterólogos, contribuindo com novos dados para o entendimento dos processos de maturação associados à conversão de zimogénios de PAs em enzimas proteoliticamente activas. Adicionalmente, os resultados obtidos com a expressão da cardosina A em *Nicotiana* e *Arabidopsis* revelaram parte do trajecto intracelular seguido por esta PA até ao vacúolo, trazendo novos dados à problemática relacionada com a caracterização dos mecanismos de direccionamento de proteínas para os vacúolos em plantas. De salientar que as cardosinas A e B podem vir a constituir óptimos modelos para o estudo da via secretora e dos sinais de endereçamento para os vacúolos em plantas, já que estas PAs, apesar de apresentarem um elevado grau de homologia em termos de sequência, possuem localizações subcelulares completamente distintas. Finalmente, é de referir a possibilidade da cardosina A, que mostrou ser bastante estável nos vacúolos de *Arabidopsis* e *Nicotiana*, poder vir a tornar-se uma ferramenta útil de trabalho para estudos dos mecanismos associados ao transporte e direccionamento intracelular de proteínas para o vacúolo, ou da via secretora em geral, funcionando como um marcador vacuolar válido nos sistemas heterólogos testados e possivelmente em outros modelos.

# ABSTRACT

Aspartic proteinases (APs; EC3.4.23) comprise a well defined group of enzymes, are widely distributed in nature, and have been the subject of intense research given their involvement in diverse human pathologies and importance to the dairy industry.

Cardosins are plant APs originally isolated from the flowers of *Cynara cardunculus* L. (cardoon) and are responsible for the milk-clotting activity of the latter. Among plant APs, cardosin A and cardosin B are two of the better characterised, both from a molecular and a biochemical point of view. The accumulation of APs in the floral organs of dicotyledonous plants is a rare phenomenon, and therefore the presence of cardosins in cardoon pistils renders this species an interesting model organism in which to study the biological functions of APs in plants.

In the first part of this work, the expression of cardosin A (protein and mRNA) in cardoon pistils during floral development was studied, and the distribution of this AP in cardoon pistils' organs was characterised. Furthermore, the description of the structure and histology of *C. cardunculus* flowers, from a developmental perspective throughout several floral maturation stages was assessed.

The results obtained showed that the mRNA of cardosin A is present in the immature stages of flower development and that its presence is related with the specific type of organ, being more abundant in the stigma than in the style or the ovary. At more advanced states of flower ontogeny (mature inflorescences) cardosin A mRNA was absent, indicating that the expression of the cardosin A is developmentally regulated. Conversely, the immunodetection of cardosin A revealed the presence of this protein mainly in differentiated flowers from mature inflorescences. Moreover, the immunolocalisation of cardosins A and B in cardoon pistils at distinct developmental stages showed that cardosin A mainly accumulates in the stigmatic epidermal papillae and sub-epidermal parenchyma layers. Cardosin A is also present in the style epidermis, although at a much lower levels. Conversely to what was observed for cardosin A, cardosin B is predominantly present in the transmission tissue of the style, the ventral region of the ovary wall, the micropyle and in the nucellus of the single cardoon's ovule. The differential distribution of cardosins A and B throughout the pistil of *C. cardunculus* suggests that, *in planta*, these enzymes have distinct physiological roles.

The second part of this project was devoted to the study of the intracellular transport and processing of cardosin A expressed in two heterologous systems, namely in *Nicotiana tabacum* leaf epidermis via *Agrobacterium* (transient expression), and in stable *Arabidopsis* transformants of the pOp/LhGR dexamethasone-inducible promoter system.

It was shown that cardosin A expressed in either of the heterologous expression systems is efficiently recognised, glycosylated, matured and sorted to the correct sub-cellular

compartment – the vacuole. In *Nicotiana* and in *Arabidopsis* cardosin A is processed into the mature form, unequivocally confirming the series of processing events previously inferred for this protein with cardoon extracts.

The expression of cardosin A in *Nicotiana tabacum* revealed that this proteinase follows the normal secretory pathway to the vacuole passing through the Golgi complex. It was also demonstrated that the precursor form (66 kDa) of cardosin A, localised in the endoplasmic reticulum (ER), is converted into the intermediate processing form (35 kDa) after export of the pro-cardosin A molecules from this sub-cellular compartment. In *Nicotiana tabacum*, cardosin A export from the ER to the Golgi complex occurred via COPII coated vesicles. From the Golgi complex, cardosin A was transported to the vacuole where the last processing step occurred, producing the mature enzyme (31 kDa). No obvious evidence of direct cardosin A export from the ER to the vacuole were observed. It was still established that a small fraction of the cardosin A synthesised in *Nicotiana* is in fact transported to the apoplast, apparently as the 35 kDa form. It is noteworthy that the last cardosin A processing event also occurs in the apoplast, as indicated by the detection of the mature form (31 kDa) of cardosin A in the extracellular environment.

Overall, the integration of the anatomical, ultrastructural, immunohistochemical and cytochemical data obtained in this work, combined with previous information on cardosins, indicated that cardosin A and cardosin B are differentially distributed in cardoon pistils, that the expression of cardosin A in cardoon pistils is developmentally regulated, and that this AP is mainly present in mature inflorescences where it specifically accumulates in the protein storage vacuoles of the stigmatic epidermal papillae. These data suggest that cardosin A may play a role in pollen-pistil interactions at the stigma level, and the presence of cardosin A in open inflorescences indicates a possible role for this proteinase in programmed cell death or senescence mechanisms, a role previously attributed to other plant APs. Results obtained in this work also revealed that cardosin B is present throughout the style transmitting tissue, the ventral region of the ovary wall, the micropylar region and in the nucellus of the ovule. These findings are very interesting and consistent with the hypothesis that cardosin B may be associated with pollen-pistils interactions at a distinct pistil level than cardosin A, and that cardosin B may be associated with pollen tube nurturing, attraction and guidance to the ovule with the ultimate objective of fertilisation. The results presented in this thesis thus contribute to the better understanding of the biological functions of cardosins in particular, and plant APs in general.

This work also clarified the series of processing events endured by cardosin A expressed in heterologous systems contributing to the better understanding of the maturation process associated to the conversion of AP zymogens into active proteolytic enzymes. Furthermore, the elucidation of the intracellular sorting route of cardosin A expressed in tobacco and

*Arabidopsis* adds relevant data to the controversial plant vacuolar sorting debate. In fact, in the future, cardosins A and B may prove particularly valuable as models to study the secretory pathway and vacuolar sorting signals in plants, since these APs, although possessing highly homologous sequences, show distinct subcellular localisations. Finally, it is important to refer that cardosin A, due to its stability in *Arabidopsis* and tobacco vacuoles, can become a useful work tool for the use in studies of the mechanisms associated with the transport and intracellular sorting of proteins to the vacuole, or in the secretory pathway in general, functioning as a vacuolar marker valid in the heterologous systems tested and possibly in other models.

# RÉSUMÉ

Les protéases acide aspartique (PAA) forment un groupe bien défini d'enzymes, largement distribuées dans la nature, et elles sont le sujet de recherche intense en raison de leur implication dans diverses pathologies humaines et de leur importance dans l'industrie laitière.

Les cardosines sont des PAA végétales extraites à l'origine des fleurs de *Cynara cardunculus* L. (cardon) et sont responsables de l'activité de coagulation du lait dans ces dernières. Parmi les PAA végétales identifiées jusqu'à présent, la cardosine A et la cardosine B sont les deux plus caractérisées, tant du point de vue moléculaire que de point de vue biochimique. L'accumulation de PAA dans les organes floraux des plantes dicotylédones est un phénomène rare, c'est pourquoi la présence de cardosines dans le pistil de cardon fait de cette espèce un modèle intéressant pour étudier les fonctions biologiques des PAA dans les plantes.

Dans la première partie de ce travail, l'expression de la cardosine A (aux niveaux protéique et ARNm) dans les pistils de cardon a été étudiée durant le développement de la fleur, et la distribution de cette PAA dans les organes floraux a été caractérisée. De plus, la structure et l'histologie des fleurs de *Cynara cardunculus* est décrite lors de plusieurs stades de maturation de la fleur.

Les résultats obtenus montrent que l'ARNm de cardosine A est présent dans les stades immatures du développement de la fleur et que cette présence varie selon le type d'organe: l'ARNm est plus abondant dans le stigmate que dans le style ou l'ovaire. Dans les états plus avancés de l'ontogénèse florale (inflorescence mature) l'ARNm de cardosine A était absent, indiquant que l'expression de la cardosine A est régulée pendant le développement. De plus, les résultats obtenus en immuno détection démontrent que la protéine cardosine A est présente surtout dans les fleurs différenciées contenu dans les inflorescences matures. Finalement, l'immunolocalisation des cardosines A et B dans le pistil de cardon montre que la cardosine A s'accumule principalement dans les papilles épidermiques stigmatiques et dans les couches sous-épidermiques du parenchyme. La cardosine A est également présente dans l'épiderme du style bien qu'à des niveaux beaucoup moins élevés. Contrairement à la cardosine A, la cardosine B est principalement présente dans le tissu de transmission du style, la région ventrale de la paroi de l'ovaire, le micropyle ainsi que dans le nucelle de l'unique ovule de cardon.

L'absence de l'ARNm de la cardosine A à des stades plus avancés du développement de la fleur (inflorescences ouvertes), indique que l'expression de la cardosine A est régulée lors du développement. De plus, la distribution différentielle des cardosines A et B dans le pistil de *C. cardunculus* suggère que, *in planta*, ces enzymes jouent différents rôles.

La deuxième partie de ce projet s'est concentrée sur l'étude du transport intracellulaire et sur la maturation de la cardosine A dans deux systèmes hétérologues.

Nous avons montré, en expression transitoire dans les feuilles de tabac, ainsi qu'en expression stable dans *Arabidopsis,* en utilisant le système pOp/LhGR inductible par la dexamethasone, que la cardosine A est correctement adressée vers les vacuoles. De plus, nos observations montrent clairement que la glycosilation et la maturation de la cardosine A sont similaires entre ces deux systèmes et le cardon. Ceci confirme que les mécanismes de glycosilation, de modification et de transport dans le tabac et *Arabidopsis* reconnaissent efficacement cette protéine.

L'expression de la cardosine A chez *Nicotiana tabacum*, révèle que cette protéine suit la voie normale de sécrétion vers la vacuole en passant à travers l'appareil de Golgi. Nous avons aussi démontré que la forme précurseur de la cardosine A, localisée dans le réticulum endoplasmique, est convertie en une forme intermédiaire après l'exportation des molécules de pro-cardosine A de ce compartiment. Dans le tabac, l'exportation de la cardosine A du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi s'opère grâce à des vésicules recouvertes de COPII. Depuis l'appareil de Golgi, la cardosine A est transportée vers la vacuole, lieu de sa dernière étape de maturation afin de produire l'enzyme mature. Aucune preuve de transport direct de la cardosine A du réticulum endoplasmique vers la vacuole a été observée. Nous avons également démontré qu'une faible proportion de la cardosine A synthétisée dans le tabac est en fait transportée dans l'apoplaste, apparemment sous sa forme 35kDa. Il est intéressant de noter que la dernière étape de maturation de la cardosine A a lieu dans l'apoplaste, comme nous l'indique la détection de la forme mature de la cardosine A dans l'environnement extracellulaire.

L'intégration des données anatomiques, structurales et immunologiques obtenues durant ce travail, avec les informations déjà connues sur les cardosines, indiquent que les cardosines A et B sont distribuées de manière différentielle dans le pistil de cardon, que leur expression est régulée lors du développement et que cardosine A est majoritairement présente dans les inflorescences matures où elle s'accumule spécifiquement dans les vacuoles des papilles épidermiques du stigmate. Ces données suggèrent que la cardosine A joue un rôle dans les interactions pistil–pollen et que la présence de cardosine A dans les inflorescences ouvertes indique un rôle possible de cette protéase dans les mécanismes de mort cellulaire et de sénescence, rôle préalablement attribué à d'autres PAA végétales. Les résultats obtenus durant ce travail démontrent également que la cardosine B est présente dans le tissu de transmission du style, la région ventrale de la paroi de l'ovaire, le micropyle ainsi que dans le nucelle de l'ovule. Ces résultats sont très intéressants et consistants avec l'hypothèse selon laquelle la cardosine B serait impliquée dans les interactions pollen-pistil à un niveau distinct de la cardosine A, la cardosine B pourrait être impliquée dans l'attraction

et le guidage du tube pollinique vers l'ovule en vue de la fertilisation. Les résultats présentés dans cette thèse contribuent à une meilleure compréhension du rôle biologique des cardosines en particulier et des PAA végétales en général.

Ce travail a également servi à élucider la succession d'évènements de maturation soufferts par la cardosine A expressée dans les systèmes hétérologues, contribuant pour la compréhension des procédés associés à la transformation des zymogènes en protéines protéolytiques actives. De plus, les résultats obtenus avec l'expression de la cardosine A dans le tabac et *Arabidopsis* révèlent une partie du trajet intracellulaire suivi par cette PAA jusqu'à la vacuole, apportant de nouvelles données à la problématique associée à la caractérisation des mécanismes de adressage des protéines vers les vacuoles dans les plantes. En fait, dans le future, les cardosines A et B pourraient devenir des modèles importants pour l'étude de la plasticité des voies de sécrétion et des signaux d'adressage pour les vacuoles, puisque ces PAA, bien que présentant une forte homologie en séquence, présentent des localisations distinctes. Finalement, la cardosine A, qui s'est révélée assez stable dans les vacuoles de *Arabidopsis* et du tabac, peut aussi devenir un instrument utile pour les études des mécanismes associés avec le transport de protéines vers la vacuole ou l'étude de la voie de sécrétion en général, en fonctionnant comme un marqueur vacuolaire dans les systèmes hétérologues examinés et possiblement aussi dans d'autres modèles.

# ÍNDICE

**RESUMO** ..... V

**ABSTRACT** ..... VIII

**RÉSUMÉ** ..... XI

**ÍNDICE** ..... XV

**ÍNDICE DE FIGURAS** ..... XVII

**ÍNDICE DE TABELAS** ..... XX

**LISTA DE ABREVIATURAS** ..... XXI

**INTRODUÇÃO GERAL** ..... 1

**CAPÍTULO I**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DA CARDOSINA A DURANTE A ONTOGÉNESE FLORAL EM *Cynara cardunculus* L.** ..... 5

1 INTRODUÇÃO ..... 7

*1.1 Cynara cardunculus L., a planta e suas aplicações* ..... 8

*1.2 Classificação e diversidade enzimática* ..... 10

*1.3 Proteinases aspárticas* ..... 12

*1.4 Proteinases aspárticas de origem vegetal* ..... 18

*1.5 As cardosinas* ..... 21

*1.6 Cardosina A* ..... 24

2 OBJECTIVOS ..... 33

3 MATERIAL E MÉTODOS ..... 35

*3.1 Material biológico* ..... 36

*3.2 Processamento do material biológico para microscopia* ..... 36

*3.3 Estudos estruturais em microscopia* ..... 37

*3.4 Histoquímica das flores de cardo* ..... 38

*3.5 Estudo da expressão da cardosina A em flores de cardo* ..... 39

*3.6 Imunodetecção da cardosina A em flores de cardo* ..... 43

*3.7 Imunolocalização das cardosinas* ..... 45

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 49

*4.1 Caracterização do pistilo de Cynara cardunculus durante a ontogénese floral* ..... 51

*4.2 Estudo da expressão da cardosina A no pistilo de Cynara cardunculus L. durante a ontogénese floral* ..... 62

*4.3 Imunodetecção da cardosina A no pistilo de Cynara cardunculus L. ao longo do desenvolvimento floral* ..... 66

*4.4 Imunolocalização da cardosina A no pistilo de Cynara cardunculus L. durante a ontogénese floral* ..... 72

**CAPÍTULO II**

**ESTUDO DO TRANSPORTE INTRACELULAR E DO PROCESSAMENTO DA CARDOSINA A EM SISTEMAS HETERÓLOGOS ..... 87**

1 INTRODUÇÃO ..... 89

*1.1 Organização das células eucarióticas – o Sistema Endomembranar ..... 91*

*1.2 Transporte de proteínas entre compartimentos subcelulares ..... 92*

*1.3 A via secretora e o transporte vesicular em plantas – A via secretora precoce ..... 93*

*1.4 A via secretora tardia em plantas – transporte de proteínas a partir da TGN ..... 111*

*1.5 Processamento e trajecto biossintético da cardosina A, uma proteinase aspártica de cardo com localização vacuolar ..... 118*

2 OBJECTIVOS ..... 121

3 MATERIAL E MÉTODOS ..... 125

*3.1 Obtenção dos constructos para expressão da cardosina A em sistemas heterólogos ..... 126*

*3.2 Estudo do transporte e processamento da cardosina A em Arabidopsis thaliana ..... 132*

*3.3 Estudo do transporte e processamento da cardosina A em Nicotiana tabacum SR1 cv. Petit Havana – expressão transitória mediada por Agrobacterium tumefaciens ..... 143*

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 153

*4.1 Selecção do anticorpo primário para detecção da cardosina A expressa nos sistemas heterólogos ..... 154*

*4.2 Estudo do transporte e do processamento da cardosina A em Arabidopsis thaliana. 154*

*4.3 Estudo do transporte e do processamento da cardosina A em Nicotiana tabacum var. SR1 – expressão transitória em epiderme foliar mediada por Agrobacterium tumefaciens ..... 172*

**CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS ..... 197**

**BIBLIOGRAFIA ..... 205**

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1 – A planta de *Cynara cardunculus* L. ..... 9
Figura I-2 – Estrutura tridimensional da pepsina A de *Homo sapiens*. ..... 13
Figura I-3 - Representação esquemática dos domínios constituintes de uma proteinase aspártica vegetal. ..... 21
Figura I-4 – Representação esquemática dos domínios das cardosinas A e B. ..... 24
Figura I-5 – Esquema representativo da possível evolução das *swaposins*. ..... 27
Figura I-6 – Estrutura tridimensional da cardosina A madura. ..... 28
Figura I-7 – Estrutura dos oligossacarídeos presentes nos dois locais de glicosilação da cardosina A – $Asn^{71}$ e $Asn^{364}$. ..... 29
Figura I-8 – Inflorescências de *Cynara cardunculus* em diferentes estados de desenvolvimento. ..... 50
Figura I-9 – Anatomia geral das flores de *C. cardunculus* . ..... 52
Figura I-10 – Ultra-estrutura dos feixes vasculares do estigma (secções transversais). ..... 53
Figura I-11 – Ultra-estrutura de papilas estigmáticas em três diferentes estádios de ontogénese floral. ..... 54
Figura I-12 – Estrutura do estilete de *C. cardunculus* . ..... 57
Figura I-13 – Testes histoquímicos em estiletes de cardo. ..... 58
Figura I-14 – Ultra-estrutura do tecido de transmissão do estilete representado em três diferentes estados de desenvolvimento floral. ..... 59
Figura I-15 – Estrutura do ovário de *C. cardunculus* num estádio inicial de ontogénese floral. ..... 61
Figura I-16 – Estrutura do ovário de *C. cardunculus* num estádio tardio de ontogénese floral. ..... 62
Figura I-17 – Electroforeses dos produtos das reacções de RT-PCR para detecção do mRNA da cardosina A. ..... 63
Figura I-18 – Análise da expressão do mRNA da cardosina A por *Northern blotting*. ..... 65
Figura I-19 – Electroforeses de extractos proteicos de flores de cardo em geles SDS-PAGE 12,5% corados com nitrato de prata. ..... 67
Figura I-20 – Imunodetecção da cardosina A em extractos de pistilos de cardo por *Western blotting*. ..... 68
Figura I-21 - Imunolocalização da cardosina A por imunofluorescência em secções transversais de ápice floral de cardo. ..... 73
Figura I-22 - Imunolocalização da cardosina A por imunofluorescência em secções longitudinais de ápice floral de cardo com primórdios florais diferenciados. ..... 74
Figura I-23 - Imunolocalização da cardosina A por imunofluorescência em secções transversais de flores muito jovens. ..... 75
Figura I-24 – Imunolocalização da cardosina A por imunofluorescência em secções transversais de estigma de inflorescência fechada. ..... 76
Figura I-25 – Imunolocalização da cardosina A por imunofluorescência em secções transversais de estigma de inflorescência aberta. ..... 77
Figura I-26 – Imunolocalização da cardosina A com o HISTOSTAIN-PLUS (Zymed) em secções transversais de estigma de inflorescência fechada. ..... 78
Figura I-27 – Imunolocalização da cardosina A por imunofluorescência em secções transversais de estilete de inflorescência aberta. ..... 79
Figura I-28 – Imunolocalização das cardosinas A e B com o "HISTOSTAIN-PLUS" (Zymed) em secções longitudinais de estilete de inflorescência fechada. ..... 78
Figura I-29 – Imunolocalização da cardosina B com o "HISTOSTAIN-PLUS" (Zymed) em secções longitudinais de ovário de inflorescência fechada. ..... 80
Figura I-30 – Imunolocalização da cardosina B com o "HISTOSTAIN-PLUS" (Zymed) em secções transversais de ovário de inflorescência fechada. ..... 81
Figura I-31 – Imunolocalização da cardosina A, por microscopia electrónica, nas papilas epidérmicas. ..... 84

Figura II-1 – Diagrama simplificado dos diferentes trajectos intracelulares seguidos pelas proteínas. ..... 93
Figura II-2– Representação esquemática do processamento sofrido pelos *N*-glicanos no RE e no complexo de Golgi de plantas..... 97
Figura II-3 – Estrutura dos diferentes tipos de *N*-glicanos presentes em plantas..... 98
Figura II-4 - Modelos de transporte de proteínas do RE para o complexo de Golgi. ..... 103
Figura II-5 – Representação esquemática da formação de uma vesícula COP II. ..... 106
Figura II-6 – Representação esquemática da formação de uma vesícula COPI. ..... 107
Figura II-7 – Representação esquemática da distribuição e passos de transporte intracelular em que estão envolvidas distintas Rab GTPases. As..... 109
Figura II-8- Representação esquemática da formação de uma vesícula com revestimento de clatrina. ..... 116
Figura II-9 - Representação esquemática das diferentes vias seguidas por proteínas solúveis para os distintos compartimentos vacuolares. ..... 118
Figura II-10 – Modelo proposto para o processamento do precursor da cardosina A. ..... 119
Figura II-11 – Representação esquemática das diferentes vias seguidas por proteínas solúveis para distintos compartimentos vacuolares e para o apoplasto. ..... 123
Figura II-12 – Transformação de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* var. Landsberg erecta por transferência directa de DNA ..... 134
Figura II-13 – Esquema representativo do procedimento usado para o isolamento de protoplastos a partir de folhas de *Nicotiana tabacum*. ..... 146
Figura II-14 – Imunodetecção da cardosina A em diferentes quantidades de proteínas de estigmas de cardo com distintos anticorpos primários. ..... 154
Figura II-15 – Resultados de uma experiência tipo de transformação de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* var. Landsberg erecta com pRT103-GUS e pKI102-CdA..... 156
Figura II-16 – Transformação de protoplastos de *Arabidopsis* para sobre-expressão da cardosina A. ..... 157
Figura II-17 – Representação esquemática do sistema de activação de transcrição LhG4.159
Figura II-18 – Representação esquemática do sistema de activação de transcrição LhGR, quimicamente indutivo. ..... 159
Figura II-19 – Coloração histoquímica de GUS com folhas de plantas da T1 (transformantes primários). ..... 162
Figura II-20 – Coloração histoquímica de GUS com plântulas da T2. ..... 163
Figura II-21 – Imunodetecção da cardosina A em linhas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* (T2). ..... 164
Figura II-22 – Coloração histoquímica para GUS e imunodetecção da cardosina A em descendentes da linha A6 (T3 e T4). ..... 166
Figura II-23 – Imunodetecção da cardosina A em linhas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. ..... 167
Figura II-24 – Imunodetecção da cardosina A em extractos proteicos de plântulas de *Arabidopsis* tratados com endoHf. ..... 168
Figura II-25 – Imunodetecção da cardosina A em extractos proteicos de protoplastos e vacúolos obtidos de plântulas transgénicas de *Arabidopsis* . ..... 170
Figura II-26 – Imunodetecção de α-TIP em extractos proteicos de protoplastos e vacúolos obtidos de plântulas transgénicas de *Arabidopsis* . ..... 171
Figura II-27 – Representação esquemática do constructo pVKH18EN6-CdA, usado para a expressão transitória da cardosina A em epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*. ..... 172
Figura II-28 – Imunodetecção da cardosina A em extractos de regiões foliares de plantas de *Nicotiana tabacum* infiltradas com *Agrobacterium tumefaciens*. ..... 173
Figura II-29 – Imunodetecção da cardosina A em extractos de regiões foliares de *Nicotiana tabacum* ao longo do tempo após infiltração com *Agrobacterium tumefaciens*. ..... 174
Figura II-31 – Esquema representativo e simplificado de uma célula vegetal indicando o domínio de acção das GTPases AtRabD1/D2a e NtSar1. ..... 178

Figura II-32 – Imagens de microscopia confocal de células de epiderme foliar de folhas de *Nicotiana tabacum* transfectadas com o constructo marcador sec-GFP, isoladamente e em conjunto com formas mutantes de AtRabD. ..... 179
Figura II-33 – Folha de *Nicotiana tabacum* 20 dias após infiltração com diferentes constructos. ..... 179
Figura II-34 – Imunodetecção da cardosina A em folhas de *Nicotiana tabacum* co-expressando esta PA e diferentes mutantes de efeito dominante negativo de GTPases envolvidas no transporte vesicular entre RE e Golgi. ..... 180
Figura II-35 – Esquema representativo de uma célula vegetal sob a acção do inibidor da via secretora brefeldina A (BFA). ..... 183
Figura II-36 – Imagens de confocal de células de epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* ilustrando o efeito inibidor da BFA sobre o transporte vesicular. ..... 183
Figura II-37 – Imagens de autoradiografia com extractos proteicos de protoplastos de folha de *Nicotiana tabacum* colhidos logo após o pulse. ..... 184
Figura II-38 – Autoradiografia de experiências de *pulse-chase* com protoplastos de folha de *Nicotiana tabacum* para testar o efeito da BFA sobre o processamento da cardosina A. ..... 185
Figura II-39 – Representação esquemática do processamento a nível da região *C*-terminal do PSI da cardosina A. ..... 186
Figura II-40 – Imunodetecção da cardosina A em extractos proteicos de protoplastos (Ppts) e vacúolos (Vac) de folhas de *Nicotiana tabacum*. ..... 187
Figura II-41 – Imunodetecção da cardosina A e da GFP em extractos de folha (Fl), protoplastos (Ppts) e vacúolos (Vac) obtidos de folhas de *Nicotiana tabacum* transfectadas via *Agrobacterium*. ..... 189
Figura II-42 – Imunodetecção da cardosina A e da GFP em extractos de folha (Fl), protoplastos (Ppts) e vacúolos (Vac) obtidos de folhas de *Nicotiana tabacum* transfectadas via *Agrobacterium*. ..... 190
Figura II-43 – Ensaios de actividade da α-manosidase com extractos das fracções celular (Ppts) e vacuolar (Vac). ..... 191
Figura II-44 – Imunodetecção da cardosina A em extractos proteicos de protoplastos (Ppts) e vacúolos (Vac) igualizados para valores de α-manosidase. ..... 192
Figura II-45 – Imunodetecção da cardosina A em protoplastos de folhas de *Nicotiana tabacum* e no seu meio de incubação. ..... 193
Figura II-46 – Imunodetecção da cardosina A em extractos de protoplastos e de folhas de *Nicotiana tabacum* infiltradas com o constructo pVKH18EN6-CdA via *Agrobacterium*. ..... 194
Figura II-47 – Imunodetecção da cardosina A em extractos proteicos obtidos de folhas de *Nicotiana tabacum* transfectadas com pVKH18EN6-CdA (Fl), em protoplastos (Ppts) e na fracção do apoplasto (Apo). ..... 195

# ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I-1 – Descrição das diferentes classes de enzimas e a sua respectiva função. ..... 11
Tabela I-2 – Descrição das diferentes classes de hidrolases e respectiva função. ..... 11
Tabela I-3 – Sumário das propriedades de algumas proteinases aspárticas vegetais. ..... 19
Tabela I-4 – Generalização das condições de execução da transcrição reversa. ..... 40
Tabela I-5 – Resumo das condições de síntese da segunda cadeia e subsequente amplificação. ..... 41
Tabela I-6 – Programa de PCR utilizado para a amplificação após síntese da segunda cadeia. ..... 41
Tabela I-7 – Sumário dos resultados obtidos na detecção do mRNA da cardosina A e imunodetecção desta proteína. ..... 70
Tabela II-1 – Lista de primers utilizados na modificação das sequências de cDNA das cardosinas A ([a]) e B ([b]). ..... 128
Tabela II-2 – Composição da reacção de PCR para modificação/amplificação do cDNA da cardosina A. ..... 128
Tabela II-3 – Tabela com a descrição dos constructos utilizados em experiências de expressão transitória. ..... 144

# LISTA DE ABREVIATURAS

aa – aminoácido

Abs – absorvância

AP – *adaptor protein*

ATP – Adenosina Tri-Fosfato

BFA – brefeldina A

BiP – *binding protein*

bp – pares de bases (*base pairs*)

BSA – albumina bovina sérica

BSE – encefalopatia espongiforme bovina

BY2 –*Bright Yellow* 2

CaMV – vírus do mosaico da couve flor

CCV – vesículas com revestimento de clatrina (*Chlatrin Coated Vesicles*)

cDNA – DNA complementar (*complementary* DNA)

CFP – *cyan fluorescent protein*

CLSM – microscópio laser confocal (*confocal laser scanning microscopy*)

cm – centímetro

COP – *coat protein complex*

DAN – diazoacetilnorleucina

DMP-30 – 2,4,6-tri(dimetilaminometilfenol)

DNA – ácido desoxirribonucleico (*Desoxiribonucleic Acid*)

DV – vesículas de conteúdo electrono-denso (*Dense Vesicles*)

EC – *Enzyme Classification Number*

endoH – endoglucosidase H nativa

endo$H_f$ – forma recombinante de endoH

EPNP – 1,2-epoxi 3- (p-nitrofenoxipropano)

GAP – *GTPase activating proteins*

GDP - guanina difosfato

GEF – *guanine-nucleotide-exchange factor*

GFP – *green fluorescent protein*

GR – glucocorticoide

GUS – β-glucuronidase

h – hora(s)

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

IUPAC-IUBMB –*International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

JCBN – *Joint Comission on Biochemical Nomenclature*

kb – kilo base

kDa – kilo Dalton

LV – vacúolos líticos (*Lytic Vacuoles*)

M-6-P – manose-6-fosfato

MCS – local de clonagem múltipla (*multiple cloning site*)

min – minuto(s)

mm – milímetro

m.m.a. – massa molecular aparente

MNA – anidrido metil nádico

mRNA – RNA mensageiro (*messenger* RNA)

MS – meio de cultura para plantas Murashige e Skoog

MVB – *multivesicular bodies*

NAcGlc – *N*-acetilglucosamina

NC-IUBMB – *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

nm – nanómetro

nos – nopalina sintetase

ocs – octopina sintetase

ON – *overnight*

PA – proteinase aspártica

PAC – *precursor accumulating vesicles*

PBS – tampão fosfato salino

PCR – reacção de polimerização em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)

PRS – Partícula de Reconhecimento do Sinal

PSI – *Plant Specific Insert*

PSS – *Plant Specific Sequence*

PSV – vacúolos de armazenamento de proteínas (*Protein Storage Vacuoles)*

PVC – compartimento pré-vacuolar (*pre-vacuolar compartment*)

PVP – polivinil pirrolidona

RE – retículo endoplasmático

RER – retículo endoplasmático rugoso

RNA – ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

RNases – ribonuclease

r.p.m. – rotações por minuto

*RT-PCR – Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

Sap – saposina

*SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrlylamide Gel Electrophoresis*

SE – sinais de endereçamento

seg – segundo(s)

S.E.M. – microscopia electrónica de varrimento (*Scanning Electron Microscopy*)

SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

SNARE – *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor adaptor protein receptors*

SP – péptido sinal (*Signal Peptide*)

TBT – tampão tris salino

T-DNA – DNA de transferência

T.E.M. – microscopia electrónica de transmissão (*Transmission Electron Microscopy*)

TIP – proteínas intrínsecas do tonoplasto (*Tonoplast Intrinsic Proteins*)

TMV – vírus o mosaico do tabaco (*tobacco mosaic virus*)

TGN – rede *trans* do Golgi (*Trans Golgi Network*)

UV – ultravioleta

VSD – *vacuolar sorting determinant*

VSR – vírus do sarcoma de Rous

wt – *wild-type*

YFP – *yellow fluorescent protein*

Abreviaturas dos Nucleótidos

| Nucleotídeo | Abreviatura de uma letra |
|---|---|
| Adenosina | A |
| Citosina | C |
| Guanina | G |
| Timina | T |
| A/C/G/T | N |
| C/G/T | B |
| A/G/T | D |
| A/C/T | H |
| A/C/G | V |
| G/T | K |
| A/C | M |
| A/G | R |
| C/G | S |
| A/T | W |
| C/T | Y |

## Abreviaturas dos Aminoácidos

| Aminoácido | Abreviatura de três letras | Abreviatura de uma letra | Carga da cadeia lateral |
|---|---|---|---|
| Ácido aspártico | Asp | D | Polar Negativa |
| Ácido glutâmico | Glu | E | Polar Negativa |
| Alanina | Ala | A | Apolar |
| Arginina | Arg | R | Polar Positiva |
| Asparagina | Asn | N | Polar Neutra |
| Cisteína | Cys | C | Apolar |
| Fenilalanina | Phe | F | Apolar |
| Glicina | Gly | G | Apolar |
| Glutamina | Gln | Q | Polar Neutra |
| Histidina | His | H | Polar Positiva |
| Isoleucina | Ile | I | Apolar |
| Leucina | Leu | L | Apolar |
| Lisina | Lys | K | Polar Positiva |
| Metionina | Met | M | Apolar |
| Prolina | Pro | P | Apolar |
| Serina | Ser | S | Polar Neutra |
| Treonina | Thr | T | Polar Neutra |
| Triptofano | Trp | W | Apolar |
| Tirosina | Tyr | Y | Polar Neutra |
| Valina | Val | V | Apolar |

# INTRODUÇÃO GERAL

As cardosinas são proteinases aspárticas (PAs) vegetais que foram originalmente isoladas a partir das flores de *Cynara cardunculus* L., planta vulgarmente denominada cardo coalhador (Capítulo I, secções 1.1 e 1.5). As PAs (EC3.4.23) constituem um grupo de enzimas bem definido que se encontra amplamente distribuído na natureza e que tem sido objecto de intensa investigação, dado o seu envolvimento em diversas patologias humanas e a sua importância na indústria dos lacticínios (Capítulo I, secção 1.3).

Em Portugal, as flores de cardo são economicamente importantes visto serem utilizadas na manufactura de queijos de ovelha internacionalmente apreciados, como os queijos da Serra, Serpa e Azeitão. A capacidade de coalhar o leite, reconhecida nas flores de cardo desde há muitos séculos, transformou-as no mais popular agente coagulante de origem vegetal, sendo correntemente usado na produção de queijo de ovelha na Península Ibérica, constituindo uma importante alternativa à utilização de coagulantes animais ou recombinantes (Barros e Malcata, 2002, Roseiro, *et al.*, 2003) (Capítulo I, secção 1.1).

Apesar do reconhecimento geral da capacidade coagulante das flores de cardo, a bioquímica subjacente ao processo de coagulação era desconhecida até há poucos anos. Nos anos noventa, o grupo do Professor Euclides Pires e do Professor Carlos Faro da Universidade de Coimbra descobriu que a capacidade coagulante da flor do cardo resulta da presença de PAs no seu pistilo, proteinases estas que foram denominadas cardosinas (Faro, *et al.*, 1992, Faro, *et al.*, 1998) (Veríssimo, *et al.*, 1996, Veríssimo, *et al.*, 1998). Até ao momento, foram já identificadas e isoladas diversas cardosinas a partir dos pistilos de cardo (Faro *et al.*, resultados não publicados), e entre estas, a cardosina A e a cardosina B são as que se encontram melhor caracterizadas, molecular e bioquimicamente (Capítulo I, secções 1.5 e 1.6). A acumulação de proteinases aspárticas nos órgãos florais de dicotiledóneas é um fenómeno raro (Mutlu e Gal, 1999, Simoes e Faro, 2004), pelo que a simples presença das cardosinas nas flores de *C. cardunculus* , por si só, torna esta espécie um modelo interessante para o estudo das funções biológicas das proteinases aspárticas vegetais.

A cardosina A e a cardosina B apresentam características comuns a todas as PAs: são inibidas pela pepstatina, requerem pH baixo para óptimo funcionamento e clivam preferencialmente ligações estabelecidas entre aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas (Ramalho-Santos, *et al.*, 1996, Veríssimo, *et al.*, 1996). Tal como as restantes PAs de origem eucarionte, as cardosinas são sintetizadas sob a forma de zimogénios que sofrem processamento proteolítico de forma a atingir a forma madura. Ao contrário das PAs de origem animal ou microbiana, as cardosinas, bem como a grande maioria das PAs de origem vegetal, possuem um segmento interno adicional com cerca de 100 aminoácidos, o *Plant Specific Insert* (PSI), cuja função biológica permanece desconhecida (Capítulo I, secção 1.6.3).

Nas flores de cardo, a cardosina A é predominante sobre a cardosina B. A cardosina A está presente intra-celularmente e acumula-se maioritariamente nos vacúolos das papilas estigmáticas (Ramalho-Santos, *et al.*, 1997). Por sua vez, a cardosina B é uma proteína extracelular, localizando-se na parede celular e matriz extracelular do tecido de transmissão do estilete (Vieira, *et al.*, 2001). A presença abundante destas PAs na flor do cardo, associada à sua localização específica e diferencial, levanta a questão da função destas enzimas na planta, questão esta que se mantém largamente por responder.

Na primeira fase deste trabalho (Capítulo I), com o objectivo de obter informação relevante para o desvendar da(s) função(ões) das cardosinas A e B em *C. cardunculus* foi efectuada a descrição da estrutura apresentada pelas flores de cardo durante a sua ontogénese, algo que não se encontrava previamente descrito, juntamente com a caracterização do padrão de expressão da cardosina A ao longo dos diferentes estados de desenvolvimento dos órgãos florais femininos.

Até à realização do presente trabalho, não obstante a abundância de informação a nível de sequências (mRNA e aminoácidos), a nível da actividade específica e a nível da estrutura tridimensional da cardosina A (Egas, *et al.*, 2000, Faro, *et al.*, 1998, Faro, *et al.*, 1999, Frazão, *et al.*, 1999, Ramalho-Santos, *et al.*, 1998, Ramalho-Santos, *et al.*, 1997, Ramalho-Santos, *et al.*, 1998, Ramalho-Santos, *et al.*, 1996), pouco se sabia acerca da sucessão e localização subcelular dos eventos de processamento sofridos pela cardosina A no seu processo de maturação. Da mesma forma, eram também desconhecidos a localização subcelular das suas formas intermédias de maturação e o trajecto intracelular seguido por esta PA até ao vacúolo. Por estas razões, a segunda vertente deste estudo (Capítulo II) incidiu na clarificação da sequência de eventos de processamento envolvidos na maturação da cardosina A, bem como na caracterização do trajecto intracelular seguido por esta PA no seu transporte para o vacúolo. Para tal, recorreu-se à expressão da cardosina A em sistemas heterólogos, nomeadamente em *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana*.

Potencialmente, as cardosinas A e B constituem bons modelos para o estudo da via secretora em plantas já que pequenas diferenças entre as suas sequências de aminoácidos, altamente homólogas (Vieira, *et al.*, 2001), se traduzem em localizações subcelulares totalmente distintas. De referir que a homologia entre as sequências da cardosina A e da cardosina B é menor entre domínios PSI do que entre regiões N- ou C- terminais, levando à especulação de que a dissemelhança existente ao nível do PSI possa ser a base para as distintas localizações subcelulares registadas para as duas cardosinas. Com base nestas observações e hipóteses julgou-se ser importante que todos os passos de clonagem e geração de plantas transgénicas realizados neste trabalho fossem feitos em paralelo para a cardosina B, na expectativa de estas plantas poderem vir a ser úteis para futuros estudos de

expressão e transporte intracelular de proteínas em plantas, tendo as cardosinas como modelo.

A via de transporte mais comum seguida por proteínas direccionadas para o vacúolo em plantas envolve a passagem destas pelo complexo de Golgi (Capítulo II, secção 1.4) (Hadlington e Denecke, 2000, Neuhaus e Rogers, 1998). Há, no entanto, registos da identificação de vias de transporte de proteínas para vacúolos de armazenamento ou *protein storage vacuoles* (PSV) que são independentes de uma passagem através do complexo de Golgi (Capítulo II, secção 1.4) (Hara-Nishimura, *et al.*, 1998, Levanony, *et al.*, 1992). De facto, a visão de uma relação linear entre a presença de um sinal putativo de endereçamento para os vacúolos, e o transporte de uma proteína numa determinada via de endereçamento pós-Golgi há muito que foi rejeitada (Capítulo II, secção 1.4).

Na segunda parte deste trabalho (Capítulo II), e com o objectivo de estudar o transporte intracelular e o processamento da cardosina A, recorreu-se à expressão desta PA em sistemas heterólogos, nomeadamente em plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* recorrendo a um sistema de expressão indutivo pela aplicação de um indutor químico (Capítulo II, secção 4.2.2) e na epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* recorrendo a um sistema de expressão transitória mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (Capítulo II, secção 4.3). Os dados obtidos contribuiriam para a determinação da sucessão de eventos de processamento sofridos pela pro-cardosina A (66 kDa) até à geração da forma madura (31 kDa) da enzima, fornecendo informação acerca da localização subcelular das diversas formas e eventos de associados à maturação da enzima. Adicionalmente, os resultados obtidos com a expressão da cardosina A em *Nicotiana* e *Arabidopsis* desvendaram parte do trajecto intracelular seguido por esta PA até ao vacúolo, contribuindo com novos dados para a problemática relacionada com a caracterização dos mecanismos de direccionamento de proteínas para os vacúolos em plantas.

Até à realização deste trabalho, os únicos dados disponíveis relacionados com o estudo do transporte intracelular de uma PA de origem vegetal foram os publicados para a fitepsina (Glathe, *et al.*, 1998, Pimpl, *et al.*, 2003, Tormakangas, *et al.*, 2001), uma PA vacuolar isolada de grãos de cevada que se revelou pouco estável nos vacúolos de *Nicotiana*, sistema heterólogo em que foi expressa. A possibilidade da informação para o endereçamento vacuolar das PAs vegetais residir no PSI (Tormakangas, *et al.*, 2001), sob a forma de uma sequência até à data desconhecida ou como um possível sinal de endereçamento estrutural (*physical structure vacuolar sorting domain*, psVSD) (Neuhaus e Rogers, 1998) torna uma proteína como a cardosina A, potencialmente útil como modelo para o estudo de um putativo psVSD ou como um marcador vacuolar em estudos dos mecanismos associados ao transporte e direccionamento intracelular de proteínas para o vacúolo em plantas.

# CAPÍTULO I

## Estudo da expressão da cardosina A durante a ontogénese floral em *Cynara cardunculus* L.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Cynara cardunculus* L., a planta e suas aplicações

*Cynara cardunculus* L., vulgarmente chamado cardo coalhador, é uma das espécies do género *Cynara* mais abundantes em Portugal. Geograficamente podemos encontrar esta espécie na Europa, nomeadamente nas regiões oeste e sul da bacia do Mediterrâneo, bem como nas ilhas Canárias e Madeira (Rottenberg e Zohary, 1996). Esta espécie está também presente na costa oeste dos Estados Unidos onde se pensa ter sido introduzida por emigrantes europeus no início do século XIX. Em Portugal é possível encontrá-la nas regiões centro e sul, geralmente em sítios pedregosos, incultos ou pousios, e arrelvados secos, sobretudo em solos argilosos.

Taxonomicamente, *Cynara cardunculus* L. pertence a um género relativamente pequeno – *Cynara* L. – incluído na tribo *Cardueae* Cass., subfamília *Asteroideae*, por sua vez pertencente à família ASTERACEAE (COMPOSITAE), grupo das Dicotiledóneas (Coutinho, 1913, Franco, 1984, Tutin, *et al.*, 1976). A designação *Cynara* tem origem no Grego *kyon* que significa cão, dado o aspecto das suas brácteas, semelhante a dentes afiados (Faculty of Agricultural Sciences - University of British Columbia [Web], 2004).

O cardo é um hemicriptófito sub-arrosetado de caules lanosos com 20 – 100 cm (Figura I-1). Esta erva vivaz apresenta caracteristicamente folhas alternas grandes (até 50 x 35 cm), de consistência subcoriácea, verde-vivo, tomentulosas na página superior e branco-tomentosas na inferior. Os segmentos foliares são ovados a linear-lanceolados, sendo o terminal maior que os laterais, com espinhos rígidos de 15 – 35 mm, amarelos no ápice e fasciculados na base. As folhas proximais são pecíoladas e as distais são sésseis.

O cardo é uma planta monóica hermafrodita. Possui capítulos grandes (45 – 60 x 45 – 55 mm) circundados e envolvidos por invólucros globoso-ovóides cujas brácteas imbricadas, de forma ovada a elíptica, são gradual ou repentinamente atenuadas por um espinho (10 – 50 x 2 – 3 mm) erecto-patente, glaucescente ou purpurascente. O receptáculo é carnudo com brácteas interflorais setáceas. As flores possuem uma corola tubulosa e 5-fendida, que pode ser de cor azul, lilás ou esbranquiçada. As anteras apresentam-se reunidas em tubo ao redor do estilete e em cada flor existem cinco estames epipétalos. O ovário é ínfero, 2-carpelar mas 1-locular, contendo um óvulo solitário, basal e anatrópico. O estilete é simples e longo. Possui dois ramos estigmatíferos.

As cipselas, que podem ter 6 – 8 x 3 – 4 mm, são tetragonais, brilhantes, castanho marmoreadas e possuem um longo papilho (25 – 40 mm) com pêlos multisseriados, plumosos, branco-sujo e concrescentes na base.

A sua constituição cromossómica é $2n=34$.

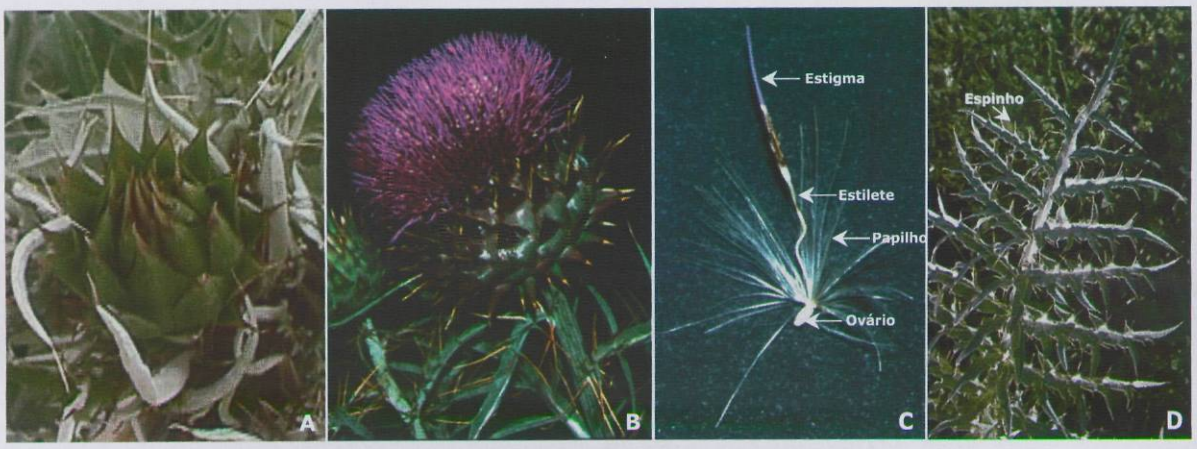



**Figura I-1 – A planta de *Cynara cardunculus* L.** A – Planta em estado muito inicial de desenvolvimento ainda sem inflorescência diferenciada. B – Inflorescência madura aberta. C – Flor isolada a partir de B. D – Pormenor de folha. Notar os folíolos lanceolados terminados por espinhos rígidos.

Pensa-se que o cardo é o progenitor silvestre da alcachofra, *Cynara scolymus* L., uma planta de cultivo tipicamente incluída na cozinha Mediterrânica (Rottenberg e Zohary, 1996). Esta hipótese surgiu de dados obtidos em estudos de compatibilidade de cruzamento e comparação entre isoenzimas das duas espécies. De entre os cruzamentos de *C. scolymus* L. e outras espécies do mesmo género, apenas o cruzamento entre *C. scolymus* L. x *C. cardunculus* L. foi compatível, dando origem a híbridos férteis (Rottenberg e Zohary, 1996). Mas nem só a alcachofra é usada na alimentação humana. Também as bases carnudas das folhas, as brácteas dos invólucros de capítulos muitos jovens e o caule de *C. cardunculus* L., podem ser usados na cozinha, comendo-se crus ou cozinhados. Há registos do uso das folhas de *C. cardunculus* L. em saladas pelos Romanos antigos (Michael Silveus [Web] 2004).

As aplicações do cardo não se limitam contudo à gastronomia. Esta espécie é conhecida também pelos seus benefícios medicinais devido à presença nas folhas da planta de um composto fenólico de sabor amargo, denominado cinarina ou ácido 1,3-dicafeilquínico (Interactive European Network for Industrial Crops and their Applications [Web] 2002) (Vesta Pharmaceuticals, 2004).

A cinarina, presente nas folhas e caules de cardo, confere-lhes uma actividade diurética, anti-colesterolémica, anti-reumática e promove também a secreção da vesícula biliar e a digestão. Esta substância funciona ainda como um óptimo tónico hepático com efeitos protectores e regeneradores do fígado.

As flores de cardo possuem também uma actividade coagulante sobre o leite de ovelha e por esta razão são usadas no fabrico de queijo tradicional desde há vários séculos. O nome vulgar de *C. cardunculus* L., cardo coalhador, deve-se a esta característica. As flores de *Cynara humilis* e *Centaurea calcitrapa* podem igualmente ser usadas como coagulantes, isoladamente ou em conjunto com flores de cardo.

O interesse crescente nos coagulantes de origem vegetal surgiu por emergência de necessidades específicas de consumidores. O uso de coagulantes animais ou recombinantes pode ser limitado por razões da natureza religiosa (ex. religiões judaica e muçulmana), dietética (ex.: vegetarianismo) ou prender-se com ideologias e/ou normas contrárias ao uso de organismos geneticamente modificados (ex.: Alemanha e Holanda proíbem o uso de quimosina recombinante). Mais recentemente, a incidência de encefalopatia espongiforme bovina (BSE) levou a uma redução da oferta e procura de agentes coagulantes de origem animal (Roseiro, *et al.*, 2003). Os extractos de flores de cardo funcionam assim como uma alternativa aos coagulantes de origem animal (bovina ou porcina) ou à quimosina recombinante (Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad del Zulia [Web], 2001).

A capacidade de formação de um coalho deve-se à actividade de proteinases aspárticas, enzimas com capacidade de hidrólise da caseína do leite. As proteinases aspárticas mais abundantes nos coalhos de origem animal são as quimosinas (A e B), pepsinas (A e B), gastricina e renina. Nas flores de cardo, a actividade coagulante sobre o leite advém da presença de duas proteinases aspárticas distintas – as cardosinas A e B, que serão descritas em pormenor mais à frente neste trabalho.

## 1.2 Classificação e diversidade enzimática

As enzimas são proteínas com actividade catalítica. Dentro das proteínas, as enzimas constituem o ramo mais numeroso e especializado.

Cada nova enzima descoberta é submetida à *International Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUPAC-IUBMB) Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)*, a que se segue a atribuição de um respectivo nome e número de classificação enzimática (***E**nzyme **C**lassification Number*). O número **EC** contém quatro elementos correspondendo a 4 níveis de classificação.

A atribuição do primeiro dígito, segundo este método de classificação, baseia-se no tipo de reacção catalisada pela enzima. Actualmente as enzimas encontram-se agrupadas em seis classes, sumariamente descritas na Tabela I-1 (Freire, 1997, IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature [Web] 2004).

As enzimas hidrolíticas ou hidrolases (EC 3), em que se incluem as cardosinas, são capazes de hidrolisar péptidos, lípidos, ésteres e nitrilos, assim como vários tipos de ligações de grupos fosfato a compostos orgânicos.

**Tabela I-1 – Descrição das diferentes classes de enzimas e a sua respectiva função.**

| Classe | Designação | Funções |
|---|---|---|
| EC 1 | Oxidoreductases | Catalisam reacções de oxidação-redução. |
| EC 2 | Transferases | Catalisam a transferência de diferentes grupos químicos entre dois compostos. |
| EC 3 | Hidrolases | Têm como função primária o desdobramento de compostos através da quebra de ligações por reacção com a água. |
| EC 4 | Liases | Catalisam reacções reversíveis, não hidrolíticas, de remoção-fixação. |
| EC 5 | Isomerases | Catalisam diferentes tipos de isomerização. |
| EC 6 | Ligases (sintetases) | Promovem a ligação entre duas moléculas, para formar um novo composto, recorrendo à energia libertada pela hidrólise de ATP. |

O segundo dígito da classificação refere-se ao tipo de ligação hidrolisada: éster, glicosídica, peptídica, ligações C-N em não péptidos e anidridos ácidos. Na Tabela I-2 encontram-se sucintamente descritas as subclasses de hidrolases existentes (Freire, 1997).

Como indicado na Tabela I-2, entre as hidrolases contam-se as enzimas proteolíticas ou proteases (EC 3.4), enzimas que actuam especificamente sobre ligações peptídicas e que estão envolvidas numa grande variedade de processos fisiológicos.

Relativamente à sua acção podemos ainda dividir as proteases em duas categorias distintas:

a) Proteólise limitada – a protease cliva apenas uma, ou um número limitado de ligações peptídicas numa proteína alvo, levando à activação ou maturação de uma forma precursora inactiva (ex.: conversão pro-hormonas a hormonas);
b) Proteólise ilimitada – acção em que há degradação das proteínas até ao nível aminoacídico. As proteínas a degradar são inicialmente conjugadas com o polipéptido ubiquitina, funcionando esta ligação como um sinal para a rápida hidrólise da proteína pelo proteossoma, na presença de ATP.

**Tabela I-2 – Descrição das diferentes classes de hidrolases e respectiva função.**

| Subclasse | Designação/ Função |
|---|---|
| EC 3.1 | Enzimas que actuam sobre ligações éster (Esterases). |
| EC 3.2 | Enzimas que actuam sobre ligações glicosídicas (Glicosilases). |
| EC 3.3 | Enzimas que actuam sobre éters. |
| EC 3.4 | Enzimas que actuam sobre ligações peptídicas (Proteases ou Peptidases). |
| EC 3.5 | Enzimas que actuam sobre ligações C-N diferentes das ligações péptido. |
| EC 3.6 | Enzimas que actuam sobre anidridos de ácidos. |
| EC 3.7 | Enzimas que actuam sobre ligações C-C. |
| EC 3.8 | Enzimas que actuam sobre halidos. |
| EC 3.9 | Enzimas que actuam sobre ligações P-N. |
| EC 3.10 | Enzimas que actuam sobre ligações S-N. |
| EC 3.11 | Enzimas que actuam sobre ligações C-P. |
| EC 3.12 | Enzimas que actuam sobre ligações S-S. |
| EC 3.13 | Enzimas que actuam sobre ligações C-S. |

O NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) recomenda o uso do termo peptidase para designar a generalidade das enzimas proteolíticas, sendo os termos peptidase e protease considerados sinónimos. As peptidases ou proteases englobam dois grupos enzimáticos: as exopeptidases (EC3.4.11-19.-), enzimas que actuam nas regiões amino (N)- ou carboxi (C)- terminais da proteína removendo aminoácidos (aa) de uma forma sequencial, e as endopeptidases ou proteinases (EC3.4.21-99.-) que actuam nas regiões internas das cadeias polipeptídicas.

As endopeptidases ou proteinases podem ser ainda agrupadas em quatro divisões com base no seu mecanismo catalítico (Khan e James, 1998). O terceiro dígito da classificação indica a sub-subclasse a que a enzima pertence. As sub-subclasses de proteinases existentes são as seguintes:

1. proteinases serínicas (EC3.4.21.-) – contêm no seu centro activo um resíduo catalítico de serina ou histidina que actua como um nucleófilo durante a catálise; pH óptimo 7 – 9 (ex.: quimotripsina e tripsina).
2. proteinases cisteínicas (EC3.4.22.-) – possuem no seu centro activo um resíduo catalítico de cisteína; pH óptimo 4 – 7 (ex.: papaína).
3. proteinases aspárticas (EC3.4.23.-) – contêm dois resíduos catalíticos de aspartato e uma tirosina no seu centro activo; pH óptimo <5 (ex.: quimosina, pepsina, cardosina).
4. metalo-proteinases (EC3.4.17.-) – contém um ião metálico no seu centro activo; pH óptimo 7 – 9 (ex.: carboxipeptidase de zinco).

Neste trabalho focaremos o nosso interesse nas proteinases aspárticas (EC3.4.23.-) cuja caracterização se segue na próxima secção.

## 1.3 Proteinases aspárticas

As proteinases aspárticas (PAs) (EC3.4.23.-) constituem um grupo de enzimas bem definido e amplamente distribuído na natureza, presentes em organismos tão distintos como vírus e mamíferos superiores.

Em linhas gerais, as proteinases aspárticas caracterizam-se por apresentarem actividade máxima a pH baixo (<5), possuírem dois resíduos catalíticos de ácido aspártico, serem inibidas pela pepstatina, clivarem preferencialmente ligações peptídicas entre resíduos de natureza hidrofóbica (ex.: Phe, Ile, Leu ou Val) e serem sintetizadas sob a forma de zimogénios.

Para uma endopeptidase ser incluída no grupo das PAs necessita de possuir no seu centro activo a sequência - Asp – Thr (Ser) – Gly -. Segundo a base de dados de peptidases MEROPS há seis famílias de PAs a considerar (Rawlings ND Tolle DP Barrett AJ [Web]

2004). Dentro destas, as maiores e mais importantes são a família A1, que engloba as PAs aparentadas com a pepsina, e a família A2, que inclui as PAs retrovirais (Dunn, 2002).

O enrolamento das PAs é conservado em todos os organismos, apesar de diferenças substanciais a nível de estrutura primária. As proteinases aspárticas de origem eucarionte são, geralmente, moléculas bilobadas e monoméricas em oposição às de origem vírica, que são funcionais sob a forma de dímeros formados por péptidos idênticos.

### 1.3.1 Estrutura tridimensional

A estrutura das proteinases aspárticas consiste fundamentalmente em dois domínios com folhas β-pregueadas antiparalelas e uma α-hélice, ligados por uma folha β central (Khan e James, 1998). Este arranjo a nível de estrutura secundária, confere às PAs a sua típica estrutura terciária bilobada (Koelsch, *et al.*, 1994). Os dois domínios (ou lobos) das PAs encontram-se separados por uma fenda onde se localiza o centro activo da enzima (Figura I-2). Neste centro activo estão presentes dois resíduos de aspartato – $Asp^{32}$ e $Asp^{215}$ segundo numeração da pepsina – sendo cada um proveniente de um domínio da proteína. Estes aspartatos catalíticos encontram-se ligados por pontes de hidrogénio a uma molécula de água que participará na reacção de hidrólise da ligação peptídica alvo. As PAs catalisam a clivagem de ligações amida em péptidos, preferencialmente entre aminoácidos hidrofóbicos, via um mecanismo de catálise ácido-base que envolve a permuta de iões $H^+$ (Bursavich e Rich, 2002), (Freire, 1997).

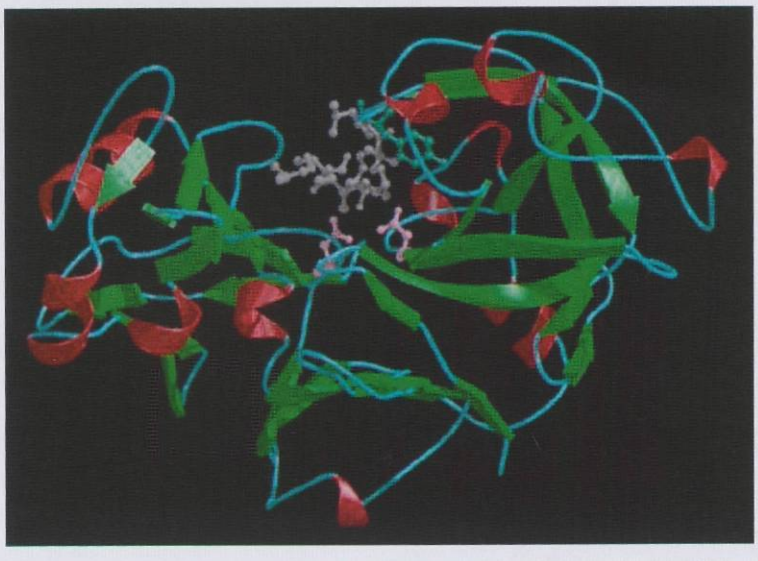


**Figura I-2 – Estrutura tridimensional da pepsina A de *Homo sapiens*.** Os resíduos catalíticos estão representados por bolas e traços, a cor-de-rosa Asp 32 e Asp 215 e a verde Tyr 75. Também representada por bolas e traços mas a cinzento, está a pepstatina, um composto inibidor de proteinases aspárticas.

A existência nas PAs de dois domínios intramoleculares simétricos com características muito semelhantes, sugere que a evolução destas enzimas terá possivelmente surgido por fenómenos de duplicação génica seguidos de fusão, a partir de um ancestral comum (Fruton, 2002). Foi sugerido por Tang *et al.* (Tang, *et al.*, 1978) que as PAs modernas teriam

evoluído por duplicação de um gene que codificaria uma proteína ancestral com aproximadamente 150 aa, com um enrolamento semelhante ao apresentado por cada um dos domínios da pepsina. Esta hipótese foi reforçada pela observação de que as proteinases aspárticas do HIV (*human immunodeficiency virus*) e do VSR (vírus do sarcoma de Rous) são proteínas diméricas, em que as duas subunidades distintas funcionam como o conjunto formado pelos dois lobos da proteína monomérica pepsina. Pensa-se portanto, que os dois lobos presentes na estrutura tridimensional das PAs de origem não viral estão relacionados em termos evolutivos.

### 1.3.2 Inibidores

No que respeita a inibidores da acção de PAs, foram já desenvolvidos diversos compostos com o objectivo de serem utilizados no tratamento de doenças em que a acção das PAs está envolvida, nomeadamente hipertensão, malária e doença de Alzheimer. Ao longo dos anos, as estruturas cristalinas de PAs nativas, bem como de complexos destas com diversos inibidores, têm sido investigadas e reveladas, não só para as proteinases aspárticas com relevância no campo da medicina, mas também para outras peptidases modelo. Até à data, foram identificados e desenvolvidos inúmeros inibidores das PAs. Um elemento estrutural chave, presente em quase todos os inibidores, é o grupo hidroxilo, através do qual se estabelece a ligação com os dois aspartatos catalíticos ocupando a posição onde, em condições nativas, se encontra a molécula de água envolvida na reacção de catálise (Bursavich e Rich, 2002). Os compostos inibidores das PAs podem ser divididos entre os que são de natureza peptídica (pepstatina, um hexapéptido isolado a partir de *Streptomyces*, e seus derivados) ou aqueles que não são desta natureza (inibidores da PA de HIV: ureia cíclica e derivados de pirona). O termo peptidomimético engloba os dois tipos de inibidores e advém do facto destes, independentemente da sua natureza, irem mimetizar o papel dos substratos nativos da enzima. Os inibidores peptidomiméticos derivados de péptidos são formados por cadeias de aa que irão imitar a conformação da região de ligação do substrato à enzima. Os inibidores peptidomiméticos não derivados de péptidos são estruturalmente pouco aparentados com os substratos nativos das PAs. A eficiência de ligação destes dois tipos de inibidores ao centro activo da enzima é muito semelhante e actualmente ambos são usados com fins terapêuticos.

O facto de proteinases aspárticas de origens filogeneticamente distintas serem sensíveis à inibição pelos mesmos compostos químicos, indicia a existência de um mecanismo de acção conservado e também suporta a hipótese de evolução das PAs modernas a partir de um ancestral comum.

### 1.3.3 Funções biológicas

As proteinases aspárticas estão envolvidas em inúmeros processos fisiológicos normais, assim como em situações de patologia, nos quais se incluem (Khan e James, 1998):

1. regulação da pressão sanguínea por acção sobre o precursor da angiotensina II (renina);
2. digestão de proteínas em ambientes com pH baixo como o estômago de mamíferos (Fruton, 2002);
3. activação de proteinases a partir de precursores inactivos em ambientes subcelulares seleccionados (lisossoma/vacúolo e matriz extracelular) (catepsina D);
4. envolvimento em mecanismos de defesa contra patogénios;
5. degradação intracelular de proteínas (pepsina, quimosina) (Shibata, *et al.*, 2002);
6. proteólise do precursor da poliproteína retroviral em proteínas estruturais, reguladoras e enzimas necessárias à replicação do vírus HIV no SIDA (e outros retrovírus) (McKeever, *et al.*, 1989);
7. papel na invasão de tecidos (cancro) (Cavailles, *et al.*, 1993) e virulência por fungos patogénicos para humanos (ex.: *Candida albicans*)
8. libertação de péptidos β-amiloides por acção sobre o péptido amiloide precursor na doença de Alzheimer (Cataldo e Nixon, 1990);
9. hidrólise da hemoglobina nos vacúolos do parasita da malária, que usará os produtos resultantes da digestão da hemoglobina como nutrientes para o seu crescimento e manutenção (plasmepsina IV) (Wyatt e Berry, 2002).

A catepsina D parece ter também um papel muito importante para o normal desenvolvimento de ratinhos (Dunn, 2002). Ratinhos cujo gene para a catepsina D foi silenciado, mostraram um desenvolvimento normal só até à terceira semana de vida, ao que se seguia uma atrofia da mucosa do íleo e posterior degradação dos órgãos intestinais. Os autores especularam que a proteólise limitada de factores de crescimento, possivelmente dependente da acção da catepsina D, é requerida para o desenvolvimento normal destes animais.

Há uma grande variedade de estratégias responsáveis pela regulação da actividade das peptidases como por exemplo (Lazure, 2002):

i) regulação mediada por inibidores específicos, o que providencia um mecanismo virtualmente infalível na paragem da actividade enzimática;

ii) regulação por influência de micro-ambientes, que permitem a acção das peptidases apenas em localizações determinadas e específicas;

iii) regulação por inibição do substrato e/ou produto resultante da actividade enzimática, especialmente no caso de enzimas metabólicas;

iv) regulação da expressão génica, permitindo uma regulação espacial e temporal de actividade;

v) regulação por cascata enzimática;

vi) regulação por activação de zimogénios, que correspondem à forma nascente, cataliticamente inactiva e imatura da enzima.

Nenhuma das estratégias acima citadas pode ser considerada exclusiva, uma vez que geralmente, o controlo da actividade das peptidases ocorre como resultado de múltiplos mecanismos de activação/inactivação.

### 1.3.4 Maturação e activação

Todas as enzimas proteolíticas conhecidas são sintetizadas sob a forma de precursores inactivos ou zimogénios, por forma a prevenir degradação proteica não desejada e permitir uma regulação temporal e espacial da actividade proteolítica. Depois do correcto direccionamento do precursor para um compartimento subcelular específico ou para a matriz extracelular, segue-se a conversão do zimogénio em enzima activa, o que geralmente envolve proteólise limitada e remoção de um fragmento de activação. O tamanho destes fragmentos pode variar entre segmentos com apenas dois resíduos aminoacídicos, até domínios proteicos completos, compostos por mais de cem aa (Khan e James, 1998).

São conhecidos exemplos de moléculas sintetizadas sob a forma de zimogénios para todos os tipos de endopeptidases – serínicas, cisteínicas, aspárticas e metalo-proteinases (Lazure, 2002). Contritamente no que respeita às PAs de origem não viral, sabe-se que são sintetizadas sob a forma de precursores inactivos, constituindo este o mecanismo principal de regulação da sua actividade proteolítica. De uma forma distinta, as PAs virais são sintetizadas como parte de uma poliproteína precursora estrutural única, da qual resultam após processamento as diversas proteínas necessárias para a manutenção e desenvolvimento dos viriões (Krausslich e Wimmer, 1988) (McKeever, *et al.*, 1989).

A grande maioria dos zimogénios possui extensões *N-terminais*, os pro-segmentos, que não farão parte da proteína madura e que impedem o acesso do substrato ao centro activo da enzima. Há também registos da existência de segmentos de activação embebidos na estrutura primária da enzima madura, entre os resíduos catalíticos. Nunca foram no entanto identificados fragmentos de activação na região *C*-terminal de um zimogénio, prevenindo desta forma a actividade proteolítica antes de concluída a síntese do polipéptido. Alguns segmentos de activação parecem ter também papéis adicionais, nomeadamente no correcto enrolamento da proteína (ex.: pro-carboxipeptidase Y e pro-proteinase A de *Saccharomyces cerevisiae*) e/ou direccionamento intracelular (ex.: pro-catepsina L humana) (Khan e James, 1998).

O processamento de proteinases aspárticas recém-sintetizadas é iniciado com a remoção de um péptido sinal *N*-terminal com aproximadamente 20 aa, o *signal peptide* (SP). Durante a síntese o SP direcciona a proteína nascente para o retículo endoplasmático rugoso (RER), onde ocorre a tradução por acção de ribossomas associados à membrana deste organelo e consequente co-translocação do péptido em formação para o lúmen do retículo endoplasmático (RE).

A completa activação dos zimogénios é acompanhada pela remoção proteolítica do pro-segmento *N*-terminal (Pro) com 44 – 50 aa. Este último passo de activação parece ser iniciado por um rearranjo conformacional dramático dos primeiros 60 aa do precursor, geralmente induzido por baixos valores de pH (Koelsch, *et al.*, 1994). Em ambientes com pH baixo, as pontes salinas existentes entre o pro-segmento e a região madura da proteína (mais especificamente, os aspartatos catalíticos) são desestabilizadas, expondo o centro activo da enzima e desencadeando desta forma o processo de activação do zimogénio, o que em última instância levará à excisão do fragmento de activação (Khan e James, 1998). O pro-segmento pode no entanto interagir com o centro activo da enzima de uma forma distinta daquela acima descrita. No caso das proteinases aspárticas aparentadas com a quimotripsina, o pro-segmento inibe a actividade catalítica, não por ligação directa aos resíduos de aspartato, mas pela manutenção de um afastamento entre os dois aa catalíticos, impedindo desta forma que o centro activo da enzima seja operacional (Lazure, 2002).

Foram observados três mecanismos de processamento dos pro-segmentos (Koelsch, *et al.*, 1994): i) auto-processamento completo, ii) processamento parcialmente assistido por uma proteinase distinta, iii) processamento totalmente assistido por outras proteinases. Um exemplo de auto-processamento completo é por exemplo o observado para o pepsinogénio A. A segunda categoria de processamento é geralmente observada nas proteinases aspárticas lisossomais e vacuolares, em que o processamento do pro-segmento depende também da acção de proteinases cisteínicas presentes no mesmo organelo (ex.: pro-catepsina D). O terceiro, é o tipo de activação observado para a pro-renina de ratinho, em que o processamento depende exclusivamente da acção de proteinases serínicas (Kim, *et al.*, 1990).

A previsão do tipo de processamento sofrido por uma proteinase aspártica pode ser conseguida analisando a estrutura primária da proteína. Para zimogénios capazes de auto-activação é possível propor que o local de clivagem da terminação da cadeia madura deva estar em concordância com a sua especificidade de activação (Koelsch, *et al.*, 1994). Os dois resíduos hidrofóbicos, preferidos nas regiões P1 e P1' pelas pepsinas, são encontrados nos locais de clivagem do seu zimogénio. Contrariamente, a catepsina D, que partilha com a pepsina a preferência por ligações peptídicas entre resíduos hidrofóbicos,

possui no seu local de clivagem os aa Glu-Gly, o que sugere um tipo de processamento assistido por enzimas com maior afinidade para ligações estabelecidas entre resíduos desta natureza (ácido – apolar).

Uma observação a salientar, prende-se com o facto de proteinases aspárticas cujo pH de actividade óptimo é baixo (um indicador da sua localização subcelular), possuírem a sequência Lys36P – Tyr37P (numeração da pepsina) como responsável pelo bloqueio do centro activo da enzima.

Em resumo, a presença de uma sequência no local de clivagem para maturação que não está de acordo com a especificidade da própria proteinase, geralmente indica que o controlo do processo de maturação é feito por acção de uma proteinase distinta e a presença ou ausência da sequência Lys-Tyr no pro-segmento pode ser usada como um indicador de activação fisiológica da proteinase aspártica dependente do pH.

Ao longo do seu trajecto biossintético as proteinases aspárticas seguem a via normal de transporte vesicular. A nível de localização subcelular, as PAs encontram-se mais vulgarmente no lisossoma ou no vacúolo, havendo ainda registo de numerosas PAs cuja localização é extracelular (Mutlu e Gal, 1999, Simoes e Faro, 2004). Para muitas das PAs vacuolares foi ainda observada uma secreção parcial de moléculas para o apoplasto.

## 1.4 Proteinases aspárticas de origem vegetal

A maior parte do conhecimento acerca de proteinases aspárticas resultou de trabalhos feitos essencialmente com modelos animais ou microbianos. Nestes modelos, as proteinases aspárticas parecem estar envolvidas em processos fisiológicos bastante diversos e o mesmo parece acontecer nas plantas.

Foram já identificadas numerosas PAs em espécies de Gimnospérmicas (ex.: *Pinus*), Monocotiledóneas (ex.: cevada – *Hordeum vulgare*, milho – *Zea mays*, arroz – *Oryza sativa*, trigo – *Triticum aestivum*) e Dicotiledóneas (ex.: *Arabidopsis thaliana*, cardo – *Cynara cardunculus* , *Brassica napus*, tomateiro – *Lycopersicon esculentum*, batateira – *Solanum tuberosum*, feijoeiro – *Phaseolus vulgaris*) (Mutlu e Gal, 1999). Apesar da maioria destas proteinases ter sido isolada a partir de sementes, há também registo de diversas PAs isoladas de outras partes da planta, como folhas (batateira, tomateiro), flores (cardo) e grãos de pólen (milho) (Mutlu e Gal, 1999).

A maioria das PAs vegetais apresenta as características típicas da sua sub-subclasse: actividade máxima a pH ácido, inibição pela pepstatina e clivagem preferencial de ligações peptídicas entre aa com cadeias laterais hidrofóbicas. Na maior parte das PAs eucarióticas, os resíduos catalíticos de Asp estão contidos num motivo Asp-Thr-Gly (motivo conservado DTG) presente em ambos os lobos da enzima. No entanto, nas PAs vegetais, numa das

posições do aspartato que compõem o centro activo da enzima encontramos a sequência Asp-Ser-Gly (motivo conservado DSG) (Mutlu e Gal, 1999).

As PAs vegetais purificadas até à data são ou monoméricas (ex.: *Brassica napus*, trigo) ou heterodiméricas (ex.: cevada, cardo) (Mutlu e Gal, 1999). Nas enzimas heterodiméricas, os dois dimeros que constituem a enzima madura resultam do processamento de uma pro-proteína única (Payie, *et al.*, 2003). Os genes e correspondentes pro-proteínas putativas de PAs monoméricas e de PAs diméricas apresentam-se muito semelhantes. Não é por isso evidente a razão pela qual pro-péptidos aparentemente similares e pertencentes a distintas espécies vegetais, originam uma diversidade tão grande de proteínas maduras. Para este facto não parece ser determinante o tipo de tecido onde as proteínas se localizam uma vez que há exemplos de PAs monoméricas isoladas de sementes de *Brassica napus* e arroz, e PAs heterodiméricas purificadas a partir de sementes de *Arabidopsis* e cevada. O facto da PA ser monomérica ou heterodimérica também não está directamente relacionado com a espécie da qual é originária, visto encontrarmos exemplos dos dois tipos de enzimas nos grupos das Mono e Dicotiledóneas. As diferenças prendem-se presumivelmente com a presença ou ausência de enzimas acessórias, responsáveis pelo processamento das PAs, e que convertem a pre-pro-forma da proteína na forma madura (Mutlu e Gal, 1999). Há algumas evidências relativas ao processamento diferencial de um mesmo precursor em diferentes tecidos de plantas (Yamada, *et al.*, 1999). As diferenças no tamanho de enzimas semelhantes podem dever-se a ligeiras diferenças no processamento de um precursor comum, a diferenças a nível de glicosilação ou ainda a modificações pós-translacionais das proteínas maduras (Mutlu e Gal, 1999).

A nível subcelular as PAs vegetais encontram-se localizadas principalmente em corpos proteicos, em vacúolos ou na matriz extracelular. Na Tabela I-3, encontra-se sumariada a informação acerca das propriedades de algumas PAs purificadas a partir de espécies vegetais.

**Tabela I-3 – Sumário das propriedades de algumas proteinases aspárticas vegetais.**

| Espécie | Órgão | Peso molecular (kDa) | M/H | Localização subcelular |
|---|---|---|---|---|
| *Arabidopsis thaliana* | semente | 31, 28.5, 15,6 | H | corpos proteicos |
| *Hordeum vulgare* | Grão | 31+16, 29+11 | H | corpos proteicos |
| *Brassica napus* | semente | 28 | M | desconhecida |
| *Cynara cardunculus* | Flor | 32+16, 33+16, 35+13, 31+15, 34+14 | H | vacúolos; matriz extracelular |
| *Zea mays* | Pólen | 60 | M | parede celular |
| *Oryza sativa* | Semente | 60-65 | M | desconhecida |
| *Nicotiana tabacum* | Folha | 36-40 | M | extracelular |
| *Lycopersicon esculentum* | Folha | 37 | M | extracelular |
| *Triticum aestivum* | semente | 58 | M | desconhecida |

M – estrutura monomérica;H – estrutura heterodimérica. O '+' aparece entre dois domínios que compõe a mesma PA dimérica (adaptado de Mutlu A. e Gal S., 1999).

Em relação às funções fisiológicas desempenhadas por PAs de origem animal, vegetal ou microbiana pode dizer-se que de uma forma geral estas participam em processos de degradação e processamento de proteínas. No caso específico das PAs vegetais foi já demonstrado o envolvimento destas no processamento e degradação de proteínas *in vitro*, e em muitos casos a expressão do gene ou localização da proteína parece suportar a hipótese de uma função semelhante *in vivo*. As PAs de *Arabidopsis* e *Hordeum vulgare* possuem a capacidade de processar a região *C*-terminal da pro-lectina de cevada *in vitro* pensando-se que o mesmo possa acontecer *in vivo* (Mutlu, *et al.*, 1998) (Runeberg-Roos, *et al.*, 1994). Ensaios realizados *in vitro* demonstraram que nem a albumina 2S nem a pro-lectina, ambas proteínas de armazenamento, sofrem um processamento completo por acção das PAs de *Arabidopsis* ou cevada, por isso a maturação completa destas proteínas de armazenamento deve depender da acção de outras proteinases presentes *in vivo* (D'Hondt, *et al.*, 1993) (Mutlu, *et al.*, 1998) (Runeberg-Roos, *et al.*, 1994). A co-localização subcelular das PAs e de proteínas de armazenamento parece suportar a hipótese de que a maturação de proteínas como as albuminas e lectinas seja dependente da acção das PAs *in vivo* (Mutlu e Gal, 1999).

Nas plantas carnívoras, os órgãos especializados no aprisionamento e digestão de insectos secretam, entre outras enzimas hidrolíticas, proteinases aspárticas (An, *et al.*, 2002) (An, *et al.*, 2002). As PAs extracelulares presentes nas folhas de *Lycopersicon esculentum* e *Nicotiana tabacum* degradam, *in vitro*, proteínas relacionadas com o ataque por patogénios (Rodrigo, *et al.*, 1989). É interessante notar que as PAs de tomateiro e *Nicotiana* são expressas em níveis semelhantes em folhas sãs e infectadas, no entanto não é reconhecido qualquer efeito destas PAs sobre proteínas endógenas e a sua função em tecidos sãos permanece desconhecida (Rodrigo, *et al.*, 1989).

Pensa-se que as PAs possam estar envolvidas em processos de morte celular programada e senescência (Chen e Foolad, 1997) (Runeberg-Roos e Saarma, 1998). A presença de PAs em tecidos senescentes sugere o envolvimento destas enzimas na degradação de proteínas e mobilização de azoto para tecidos em desenvolvimento (Mutlu e Gal, 1999).

De notar, no entanto, que para a grande maioria das PAs vegetais ainda não foram atribuídos quaisquer papéis definitivos e as suas funções biológicas ainda não passam de meras conjunturas.

De uma maneira geral, os zimogénios das proteinases aspárticas vegetais apresentam uma estrutura primária que pode ser dividida em cinco regiões (Simoes e Faro, 2004):

i) uma sequência sinal ou *signal peptide* com cerca de 25 aa (Pre) e que direcciona a PA para o RER;

ii) um pro-péptido (Pro) ou fragmento de activação *N*-terminal com aproximadamente 40 aa;

iii) um *Plant Specific Insert/Sequence* (PSI/PSS) geralmente com cerca de 100 aa;

iv) a região *N*-terminal;

v) a região *C*-terminal (Mutlu e Gal, 1999) (Figura I-3).

As regiões Pre e Pro bem como o PSI, são excisadas no processo de activação da enzima e estão ausentes da proteinase madura. Os domínios N- e C- terminais de PAs de várias espécies vegetais possuem um elevado grau de similaridade entre si e entre PAs isoladas de espécies animais e microbianas (Mutlu e Gal, 1999).




**Figura I-3 - Representação esquemática dos domínios constituintes de uma proteinase aspártica vegetal.**

Os dois resíduos de ácido aspártico pertencentes ao centro activo da enzima encontram-se localizados na região amino-terminal da proteína integrados nas sequências Asp-Thr-Gly (DTG) e Asp-Ser-Gly (DSG). Como já foi referido, as PAs animais e microbianas possuem apenas o motivo conservado DTG. A importância biológica e/ou evolutiva do aparecimento de uma segunda sequência catalítica – DSG - nas PAs de plantas é, até hoje, desconhecida (Mutlu e Gal, 1999).

O PSI (ou PSS) é uma inserção de aproximadamente 100 aa que surge exclusivamente em proteinases aspárticas de origem vegetal não possuindo regiões homólogas nas suas equivalentes de origem animal ou microbiana. A descrição da estrutura do PSI bem como a(s) sua(s) possível(is) função(ões) biológica(s) serão discutidas mais à frente na secção 1.6.3.

## 1.5 As cardosinas

As cardosinas A e B, são proteinases aspárticas presentes nas flores de *Cynara cardunculus* L.

Numa primeira abordagem ao estudo básico e aplicado de preparações de cardo, Faro *et al.* (Faro, *et al.*, 1992) mostraram que as flores de cardo são eficientes a coalhar o leite devido à presença de proteinases aspárticas que clivam a ligação peptídica Phe105-Met106 da k-caseína, uma ligação sensível à digestão por outras enzimas utilizadas na produção de queijo. A clivagem desta ligação é conhecida por induzir a desestabilização do agregado de caseína com a subsequente formação de um coalho. De realçar que as propriedades organolépticas dos produtos obtidos com flor de cardo são únicas e muito diferentes

daquelas encontradas em queijos feitos com o mesmo tipo de leite, mas utilizando outros agentes coalhadores como por exemplo a quimosina (Faro, *et al.*, 1998).

Além das cardosinas, outras proteinases aspárticas foram purificadas a partir de plantas do género *Cynara*:

a) as ciprosinas, previamente denominadas cinarases, também isoladas a partir de flores de *Cynara cardunculus* L.;

b) duas proteinases aspárticas isoladas a partir de pistilos de *Cynara scolymus* e aparentadas com as cardosinas;

c) e a *ChAP* (*Cynara humilis Aspartic Proteinase*), proteinase aspártica presente em *Cynara humilis* e cujas características estruturais são semelhantes às da cardosina A.

Estudos comparativos entre as PAs indicadas acima sugerem que a cardosina A constitui a forma ancestral das cardosinas e que a cardosina B pode ter surgido por duplicação génica ao longo da evolução (Veríssimo, *et al.*, 1998). A cardosina B representaria assim uma especialização entre as cardosinas, requerida para o desempenho de um papel fisiológico único no pistilo e que é ainda desconhecido (Veríssimo, *et al.*, 1998).

De entre as proteinases aspárticas purificadas a partir de espécies vegetais, a cardosina A, a fitepsina (PA de *Hordeum vulgare*) e a orizasina (PA de *Oryza sativa*) são aquelas que estão melhor caracterizadas tanto a nível molecular como bioquímico. Veríssimo *et al.* (Veríssimo, *et al.*, 1996) conseguiram a purificação das cardosinas partindo de estigmas isolados de flores frescas de *Cynara cardunculus*. A flor de cardo é muito rica em cardosinas. Estas proteínas constituem cerca de 60% do total de proteínas solúveis presente nos pistilos da planta sendo que esta acumulação massiva constitui um exemplo único em termos de abundância relativa deste tipo de enzimas em plantas superiores.

As cardosinas apresentam as típicas características das PAs (pH óptimo ácido, inibição pela pepstatina, clivagem entre aa com cadeias laterais hidrofóbicas) assim como um segmento com cerca de 100 aa presente apenas em proteinases aspárticas de origem vegetal e denominado PSI. O estudo das propriedades estruturais e cinéticas das cardosinas indicou que estas são produtos de genes distintos (Veríssimo, *et al.*, 1996). Por sua vez, as cardosinas são distintas das ciprosinas, PAs previamente purificadas a partir de flores de cardo, que se presume derivarem de um precursor único como resultado de diferentes processamentos (Veríssimo, *et al.*, 1996). Nas flores de cardo, a cardosina A é predominante sobre a cardosina B. Ambas são enzimas heterodiméricas com uma massa molecular aparente (m.m.a.) de 31 e 15 kDa para a cardosina A e 34 e 14 kDa no caso da cardosina B (Veríssimo, *et al.*, 1996). Ambas são sintetizadas sob a forma de precursores que sofrem processamento proteolítico dando origem à forma madura depois da excisão do PSI e do pro-segmento (Ramalho-Santos, *et al.*, 1996) (Veríssimo, *et al.*, 1996). Em termos de especificidade e cinética, utilizando como substrato a cadeia B da insulina, a cardosina A

parece assemelhar-se mais à quimosina, enquanto a cardosina B é aparentada com a pepsina. No que se refere à digestão da $\alpha_{s1}$-caseína bovina pelas cardosinas, Ramalho-Santos *et al.* (Ramalho-Santos, *et al.*, 1996) observaram que tal como outras PAs, as cardosinas atacam preferencialmente ligações entre aa com cadeias laterais hidrofóbicas, possuindo a capacidade de acomodar no seu centro activo sequências hidrofóbicas bastante longas. A cardosina B mostrou possuir uma actividade mais ampla (menos selectiva) do que a cardosina A, clivando ligações peptídicas com pelo menos um aa com cadeias laterais alifáticas ou aromáticas e ainda ligações envolvendo aa com cadeias laterais básicas (Ramalho-Santos, *et al.*, 1996). Também a taxa de proteólise apresentada pela cardosina B é mais elevada do que a da cardosina A. As características apresentadas pela cardosina B sugerem que os coalhos contendo uma maior proporção desta PA relativamente à cardosina A irão apresentar uma maior actividade proteolítica, não tanto por uma acção mais abrangente, mas sim por uma acção mais rápida da cardosina B do que da cardosina A (Ramalho-Santos, *et al.*, 1996, Veríssimo, *et al.*, 1996). Comparando a acção das cardosinas e da quimosina sobre a $\alpha_{s1}$-caseína, em condições de pH e concentração salina comparáveis, as primeiras parecem apresentar uma actividade proteolítica mais abrangente clivando mais eficientemente ligações entre aa com grandes cadeias laterais hidrofóbicas (Ramalho-Santos, *et al.*, 1996).

Apesar das diferenças de massa molecular aparente, de especificidade e de cinética enzimática, a nível de estrutura primária as cardosinas A e B, são bastante similares apresentando uma percentagem de homologia na ordem dos 70% (Vieira, *et al.*, 2001).

O cDNA da cardosina A, com 1515 bp, possui uma grelha de leitura aberta que codifica uma sequência com 504 aa. A cardosina A é sintetizada como um zimogénio constituído por um péptido sinal com aproximadamente 24 aa (Pre), um pro-segmento *N*-terminal com cerca de 42 aa, e um polipéptido com 438 aa contendo as subunidades maior (31 kDa) e menor (15 kDa) da enzima, por sua vez separadas pelo PSI com 102 aa (Figura I-4A) (Faro, *et al.*, 1999). As duas tríades catalíticas – $Asp_{35}$-Thr-Gly (DTG) e $Asp_{218}$-Ser-Gly (DSG) – encontram-se localizadas na cadeia de 31 kDa. Também nesta cadeia se encontra um resíduo de $Tyr_{75}$, presente na expansão que em geral se posiciona sobre o centro activo das proteinases aspárticas. Na cadeia polipeptídica da cardosina A estão também presentes dois locais consenso de *N*-glicosilação, nas sequências $Asn_{71}$-Gly-Thr e $Asn_{364}$-Val-Ser (Faro, *et al.*, 1999). Os dois locais de *N*-glicosilação, distribuídos pelas duas subunidades da cardosina A, foram analisados, verificando-se que de facto estão ocupados com glicanos de natureza complexa (Costa, *et al.*, 1997). O PSI da cardosina A, contrariamente ao que acontece em PSIs de outras PAs vegetais, não possui um local de glicosilação identificável.

O cDNA da cardosina B tem 1521 bp e apresenta uma grelha de leitura aberta que codifica uma sequência com 506 aa. A cardosina B, tal como a cardosina A, é sintetizada

como um precursor inactivo constituído por um péptido sinal para o RE (Pre), um pro-segmento *N*-terminal (Pro) e uma sequência polipeptídica a jusante que inclui as subunidades maior (34 kDa) e menor (14 kDa) da enzima, com o PSI entre estas (Figura I-4B) (Vieira, *et al.*, 2001).

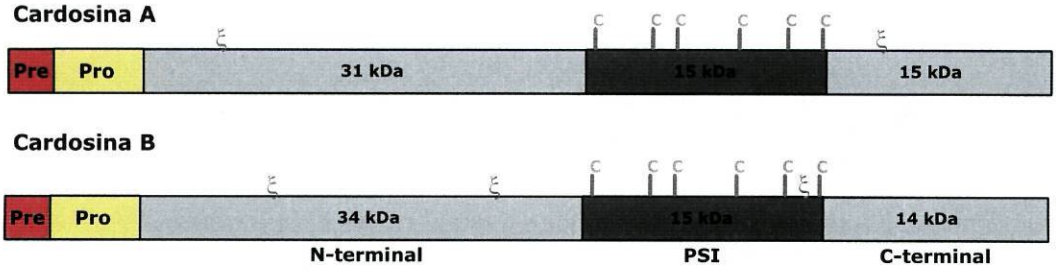



**Figura I-4 – Representação esquemática dos domínios das cardosinas A e B.** Os locais de glicosilação encontram-se assinalados com (ξ). Na cardosina B, assim como na maioria das PAs vegetais, há um local de glicosilação no PSI que está ausente na cardosina A. (C) cisteínas conservadas na região do PSI. Adaptado de Vieira M. *et al.* (Vieira, *et al.*, 2001).

As duas sequências catalíticas – Asp35-Thr-Gly e Asp222-Ser-Gly - estão localizadas na cadeia com 34 kDa. Na pro-cardosina B estão também presentes três locais consenso de N-glicosilação ocupados por glicanos, dois na subunidade maior e o terceiro no PSI. A presença de um local de N-glicosilação no PSI é uma característica conservada em proteinases aspárticas vegetais e também está presente nas saposinas (Vieira, *et al.*, 2001).

Na flor de cardo, a cardosina A pode ser detectada maioritariamente nas papilas estigmáticas e em menor quantidade nas camadas subepidérmicas do estigma. A cardosina A também se acumula na epiderme do estilete mas a um nível muito inferior àquele detectado no estigma (Ramalho-Santos, *et al.*, 1997). A nível subcelular, a cardosina A está presente intra-celularmente e acumula-se maioritariamente nos vacúolos das papilas estigmáticas (Ramalho-Santos, *et al.*, 1997), enquanto a cardosina B foi detectada nos tecidos de transmissão do estigma e do estilete (Vieira, *et al.*, 2001) e é uma proteína extracelular, localizando-se na parede celular e matriz extracelular (Vieira, *et al.*, 2001). As cardosinas A e B constituem bons modelos de estudo de trânsito intracelular já que pequenas diferenças entre duas sequências altamente homólogas se traduzem em localizações subcelulares totalmente distintas.

## 1.6 Cardosina A

### 1.6.1 Estrutura primária

A descrição sumariada da estrutura primária da cardosina A foi já abordada na secção 1.5. Recapitulando sucintamente, a cardosina A é uma glicoproteína com por 504 aa e que como todas as PAs de origem eucariótica é sintetizada como um zimogénio. O precursor da cardosina A é constituído por:

a) um péptido sinal com aproximadamente 24 aa (Pre);

b) um pro-segmento *N*-terminal com cerca de 42 aa;

c) um polipéptido com 438 aa composto pelas subunidades maior (31 kDa) e menor (15 kDa) da enzima; é na cadeia de 31 kDa que se encontram localizadas as duas tríades catalíticas – DTG e DSG;

d) um PSI com 102 aa que separa as cadeias de 31 e 15 kDa (Faro, *et al.*, 1999, Ramalho-Santos, *et al.*, 1998).

### 1.6.2 O Pro-segmento

Os pro-segmentos presentes nos zimogénios das proteinases constituem uma forma da natureza evitar a activação e consequente proteólise indesejadas (Lazure, 2002). Em grande parte das PAs, a região do pro-segmento (carregada positivamente) interage com a região catalítica (com carga negativa) por intermédio de pontes salinas. Estas pontes salinas criam um escudo sobre o centro activo da enzima, impedindo desta forma a sua ligação ao substrato e consequentemente inactivando-a (Khan e James, 1998). Num ambiente com pH baixo, as pontes salinas são enfraquecidas e o pro-segmento é removido como resultado de uma reacção geralmente auto-catalítica. A maioria das PAs vegetais possui uma Lys/Tyr na posição equivalente à $Lys^{11}/Tyr^{13}$ da pro-fitepsina sugerindo um mecanismo semelhante de inactivação. No entanto, nem a cardosina A nem a cardosina B contêm esta sequência no seu pro-segmento ou cadeia madura. De facto, estudos bioquímicos com precursores recombinantes das cardosinas revelaram que ao contrário dos outros zimogénios, as pro-cardosinas são activas (in (Simoes e Faro, 2004), M. Vieira e C. Faro, resultados não publicados). Estes dados sugerem que as pro-cardosinas não partilham o mecanismo de inactivação descrito acima e presente na maior parte das PAs vegetais. Apesar do pro-segmento ser apontado para a maioria das PAs como o responsável pela inactivação da enzima, na cardosina A este não parece ser o caso. Tendo em conta a especificidade das PAs vegetais em geral, e da cardosina A em particular, é expectável que o local de clivagem entre o pro-segmento e a cadeia de 31 kDa da cardosina A ($Arg^{68}$-$Arg^{69}$) seja processado por uma proteinase serínica ou cisteínica.

### 1.6.3 O PSI

O PSI é um segmento com cerca de 100 aa só presente em PAs de origem vegetal e cuja(s) função(ões) biológica(s) ainda não se encontra(m) determinada(s). Estudos comparativos entre PSIs de PAs de diferentes espécies vegetais revelam a presença de seis resíduos de cisteína em posições conservadas, bem como a conservação de um local de *N*-glicosilação nesta região. Verificou-se também que a homologia existente entre PSIs de diferentes PAs é muito menor do que aquela encontrada entre regiões amino- ou carboxi-

terminais destas enzimas, o que sugere a incidência de uma maior divergência evolutiva na região do PSI ao longo dos tempos, em comparação com a evolução sofrida nos restantes domínios da proteína (Mutlu e Gal, 1999). A busca de proteínas aparentadas com o PSI revelou uma elevada homologia entre este e o precursor das saposinas (Sap) de mamífero.

Existem quatro tipos de saposinas – A, B, C e D – todas derivadas de um precursor comum, a pro-saposina. Uma das funções atribuída às saposinas prende-se com a promoção de processos enzimáticos de degradação de esfingolípidos específicos no lisossoma. De entre as quatro saposinas conhecidas, aquela que partilha a maior homologia com o PSI é a saposina C (Tormakangas, *et al.*, 2001). A homologia entre Sap C e o PSI abrange uma estrutura básica muito semelhante que inclui a conservação de seis resíduos de cisteína, um local de *N*-glicosilação e a ocorrência de três pontes salinas em regiões conservadas. De salientar que a PA vegetal e o PSI derivam de um único gene que codifica uma molécula una – o precursor da PA – enquanto que nos mamíferos a saposina C e a catepsina D são produtos de dois genes distintos que passam depois por uma fase de associação (Tormakangas, *et al.*, 2001) (Ponting e Russell, 1995).

As diferenças entre o PSI e a Sap C incluem a existência de um domínio variável no primeiro, sem equivalente na segunda, e ainda uma alteração a nível das posições ocupadas pelas regiões N- e *C*-terminais. No PSI, a região terminal da saposina C é substituída por uma região variável, e a pequena extensão circular observada na saposina C, é aberta no PSI com duas extremidades resultantes que se estendem pelas regiões N- e *C*-terminais da PA. Ocasionalmente, encontram-se exemplos na natureza em que duas sequências adjacentes descontínuas e separadas por uma inserção apresentam elevada homologia com uma sequência contínua em que a ordem dos fragmentos é preservada (A➲B). No caso da Sap C e do PSI, estes constituem um exemplo antagónico ao acima descrito, em que dois genes e sequências proteicas claramente homólogos não preservam a ordem sequencial original e em vez disso apresentam uma ordem invertida (B➲A) (Ponting e Russell, 1995). Neste caso, o homólogo resultante é o equivalente a uma permutação circular, ou *swap*, da sequência original (Figura I-5A). O PSI constitui um destes exemplos e como tal pode também ser designado por *swaposin* (Figura I-5B) (Ponting e Russell, 1995).

Em células de mamífero observou-se que quer a pro-catepsina D quer a pro-saposina se associavam a membranas durante os seus processos de biossíntese. A associação entre a saposina e a catepsina D poderia explicar o direccionamento da última para o lisossoma, num processo independente da via clássica mediada por receptores para a M-6-P (Tormakangas, *et al.*, 2001). Como já foi referido, o PSI e a PA vegetal derivam de uma única molécula precursora, enquanto que genes diferentes codificam a saposina C e a catepsina D em células de mamífero. A última opção pode constituir uma vantagem selectiva, visto a saposina C desempenhar funções adicionais nos mamíferos, além da

reportada associação à catepsina D para assegurar o direccionamento correcto desta PA para o lisossoma (Tormakangas, *et al.*, 2001).

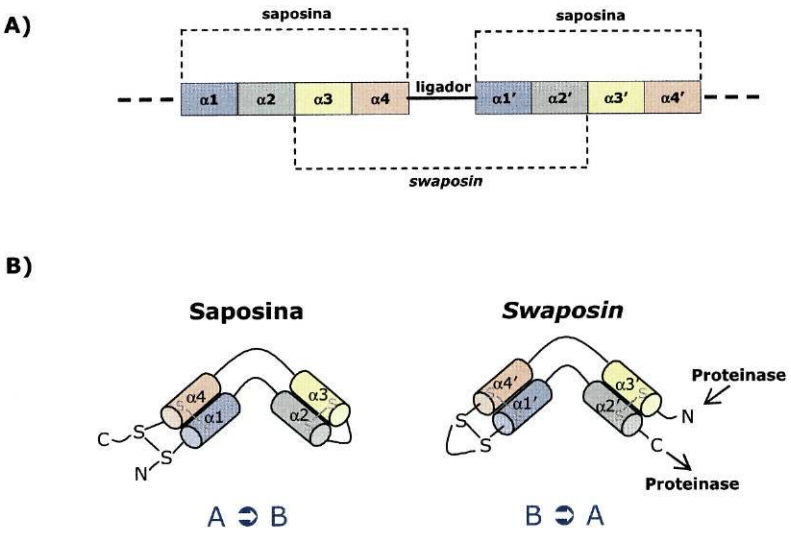



**Figura I-5 – Esquema representativo da possível evolução das *swaposins*.** A) Representação esquemática da possível origem de proteínas homólogas à saposina e *swaposins* ao longo da evolução a partir de um gene precursor ancestral da pro-saposina. B) Representação esquemática do hipotético enrolamento da saposina e análogo enrolamento apresentado pela swaposin. As localização das pontes dissulfito que estabilizam a proteína são indicadas por S-S. Adaptado de Ponting C.P. e Russel R.B. (Ponting e Russell, 1995).

Considerando o elevado grau de similaridade entre o PSI da fitepsina (PA de *Hordeum vulgare*) e a Sap C, Tormakangas *et al.* (Tormakangas, *et al.*, 2001) consideraram a hipótese da existência em plantas de um mecanismo semelhante ao observado em mamíferos, no qual o PSI estaria envolvido na mediação do transporte da fitepsina para o vacúolo. Estes investigadores verificaram que a delecção do PSI da fitepsina, causava uma secreção eficiente da versão truncada da proteína (fitepsinaΔPSI) sem afectar a sua actividade enzimática. Curiosamente, a delecção do PSI também alterava a forma como a proteína saía do RE. Este conjunto de observações sugere um papel importante do PSI no direccionamento das PAs para os vacúolos. Esta possível função do PSI pode ser resultante de uma interacção directa com a membrana, funcionando como um sinal (encriptado) de direccionamento, ou então pela interacção de uma região de ligação à membrana, formada por um complexo estrutural entre a fitepsina madura e o PSI. Esta região de ligação pode ainda possuir a capacidade de interagir directamente com a membrana ou de forma indirecta, se mediada por receptores específicos presentes na membrana do complexo de Golgi (Kervinen, *et al.*, 1999). O PSI pode ainda ser importante para que o enrolamento da PA ocorra correctamente, por forma a que esta não seja retida pelo controlo de qualidade do RE, e possa assim prosseguir o seu trajecto biossintético normal (White, *et al.*, 1999). A presença do PSI não parece no entanto ser essencial para a manutenção da actividade catalítica das PAs (Asakura, *et al.*, 2000) (Tormakangas, *et al.*, 2001).

Apesar destas últimas conjecturas não estarem confirmadas para a cardosina A, há um conjunto de observações descritas para o PSI desta PA de cardo que parecem apontar

numa mesma direcção a nível da função deste domínio na cardosina A. Ao estudarem a interacção entre o PSI da pro-cardosina A com microssomas, Egas *et al.* (Egas, *et al.*, 2000) verificaram que o PSI possuía a capacidade de interacção com membranas fosfolipídicas, promovendo a libertação do conteúdo de vesículas a pH ácido. Estas observações indicam que o PSI medeia uma interacção do precursor da cardosina A com fosfolípidos, induzindo a permeabilização das membranas, e estando possivelmente envolvido no correcto direccionamento da cardosina A para os vacúolos.

O processamento proteolítico da cardosina A será discutido no Capítulo 2.

### 1.6.4 Estrutura tridimensional

A cardosina A foi a primeira proteinase aspártica do reino vegetal a ter a sua estrutura tridimensional descrita. Frazão *et al.* (1999) (Frazão, *et al.*, 1999) descreveram a estrutura tridimensional da cardosina A madura e constataram que esta apresenta a estrutura típica desta classe de enzimas. Segundo estes autores, e tal como é característico da classe das PAs, a cardosina A é formada essencialmente pela duplicação de um motivo constituído por quatro folhas β-pregueadas antiparalelas e uma α-hélice, motivo este que é repetido duas vezes em cada domínio da proteína (Figura I-6). Os dois lobos (ou domínios) constituintes da cardosina A são separados por uma fenda profunda, onde está localizado o centro activo da enzima.



**Figura I-6 – Estrutura tridimensional da cardosina A madura.** Os resíduos catalíticos encontram-se representados por bolas e traços - a cor-de-rosa Asp 32 e Asp 215 e a verde Tyr 75. Os glicanos estão representados pelas esferas a branco.

O centro activo da cardosina A, uma das regiões mais conservadas entre PAs, é constituído por uma tríade DTG *N*-terminal, e, tal como já foi descrito para as outras PAs de origem vegetal, a tríade da região *C*-terminal está mutada para DSG. Esta mutação não perturba a distribuição tridimensional da rede de pontes de hidrogénio estabelecida à volta do centro activo e designada por *fireman's grip* (Frazão, *et al.*, 1999). O *fireman's grip*, resultante das ligações (pontes de hidrogénio) estabelecidas entre a cadeia peptídica

principal e as cadeias laterais dos aa constituintes, mantém as cadeias laterais dos aspartatos catalíticos no mesmo plano posicional.

Os aspartatos catalíticos estão ainda ligados, também por pontes de hidrogénio, a uma molécula de água. Esta última parece estar implicada na catálise enzimática, já que pode ser parcialmente deslocada e tornar-se polarizada (perdendo um protão) por um dos aspartatos catalíticos, aquando da ligação do substrato ao centro activo da enzima. Desta forma, a molécula de água pode atacar nucleofilicamente o péptido substrato e originar um complexo intermediário tetraédrico que se mantém ligado à enzima por ligações de natureza não-covalente (Frazão, *et al.*, 1999). É possível que a estabilização deste complexo intermediário seja alcançada através do estabelecimento de pontes de hidrogénio entre o complexo e o $Asp^{32}$, carregado negativamente. Assim sendo, a fissão da ligação C-N da cadeia peptídica alvo seria acompanhada da transferência de um protão, proveniente do $Asp^{215}$ ou do solvente, para o recém formado grupo carboxílico (Frazão, *et al.*, 1999).

A análise da estrutura da cardosina A revelou a existência de três pontes dissulfito na enzima madura – duas na cadeia peptídica de 31 kDa ($Cys^{45}$/$Cys^{56}$ e $Cys^{206}$/$Cys^{210}$) e a terceira na cadeia peptídica de 15 kDa ($Cys^{249}$/$Cys^{282}$) – e em regiões identificadas por formarem ligações inter-cisteínicas na classe da PAs. Estas três ligações covalentes não são no entanto, as responsáveis pela ligação entre as duas cadeias polipeptídicas que constituem a cardosina A madura. As duas cadeias constituintes da cardosina A são mantidas unidas apenas por interacções hidrofóbicas e pontes de hidrogénio, resultantes do enrolamento da proteína.

### 1.6.5 Estrutura dos *N*-glicanos

Tal como já foi referido, a cadeia polipeptídica da cardosina A apresenta dois locais consenso de *N*-glicosilação distribuídos pelas duas subunidades da cardosina A e ocupados por cadeias de oligossacarídeos de natureza complexa (Figura I-7) (Costa, *et al.*, 1997, Faro, *et al.*, 1999).




**Figura I-7 – Estrutura dos oligossacarídeos presentes nos dois locais de glicosilação da cardosina A – $Asn^{71}$ e $Asn^{364}$.**

A análise da sequência primária dos *N*-glicanos presentes na cardosina A revelou que o oligossacarídeo encontrado no primeiro local de glicosilação é de um tipo pouco comum em plantas, uma vez que não possui xilose (Xylβ1,2) ligada à Manβ1,4. Até há algum tempo atrás, não havia registo de glicoproteínas de origem vegetal apresentando *N*-glicanos

apenas com resíduos de fucose (Fucα1,3) e sem possuírem resíduos de xilose (Xylβ1,2). O exemplo contrário é no entanto, bastante comum. Staehelin e Moore (Staehelin e Moore, 1995) propuseram que, possivelmente, a acção da fucosiltransferase dependeria da adição prévia de uma resíduo de xilose à glicoproteína. A identificação, no primeiro local de glicosilação na cardosina A, deste tipo de oligossacarídeo, contribuiu para esta discussão, sugerindo que a fucosiltransferase vegetal não necessita da presença de xilose na glicoproteína para exercer a sua acção. A análise da estrutura 3D da cardosina A mostrou que a ponte de hidrogénio estabelecida entre o $Gln^{126}$ da proteína e a extensão Manβ4 do açúcar, é a responsável pela inacessibilidade de um oxigénio do monossacarídeo à acção da glucosiltransferase, que de outra forma adicionaria o resíduo de xilose ao glicano (Frazão, *et al.*, 1999). Este local de *N*-glicosilação ($Asn^{67}$) é conservado na catepsina D (PA de mamífero) e na proteinase A (PA de levedura). A presença de um local de glicosilação conservado em PAs de origens tão distintas sugere que este possa desempenhar um papel fisiológico comum. Presume-se assim que este glicano seja responsável pela protecção da PA à acção de hidrolases, o que aceleraria a clivagem proteolítica da proteína, podendo por isso ser importante para a estabilidade da enzima (Frazão, *et al.*, 1999).

O segundo local de *N*-glicosilação identificado na cardosina A é ocupado por glicanos contendo na sua estrutura resíduos de fucose (Fucα1,3) e xilose (Xylβ1,2), um tipo de *N*-glicano muito comum em plantas.

Ambos os locais de glicosilação se encontram localizados longe do centro activo da enzima e do local de ligação ao substrato. Por esta razão é pouco provável que os oligossacarídeos desempenhem um papel importante, quer para a actividade, quer para a determinação da especificidade da enzima (Frazão, *et al.*, 1999). Os *N*-glicanos presentes na cardosina A podem no entanto ser importantes para a manutenção da estabilidade conformacional desta enzima.

### 1.6.6 Possíveis funções biológicas

Ao analisar a sequência da cardosina A, Faro *et al.* (Faro, *et al.*, 1999) identificaram a presença de um motivo Arg-Gly-Asp (**RGD**) nesta PA. Este motivo é característico de ligandos de integrinas, como a fibronectina ou a vitronectina, e nunca antes tinha sido identificado numa proteinase aspártica vegetal. A estrutura tridimensional da cardosina A sugere que o motivo RGD está presente na superfície da proteína, num local de ligação entre folhas β-pregueadas. Na fibronectina, o tipo de estrutura encontrado é semelhante sugerindo que na cardosina A esta região possa ser funcionalmente activa e estar envolvida na promoção de ligação de integrinas ou proteínas relacionadas com estas.

A identificação de uma proteína do pólen com aproximadamente 100 kDa, que interage especificamente com o motivo RGD parece apoiar esta hipótese. Apesar desta teoria

carecer confirmação esta poderá ser a primeira evidência de envolvimento de uma proteinase aspártica em fenómenos de identificação mediada pelo motivo RGD em plantas. Uma vez que a cardosina A está presente nas papilas estigmáticas de cardo, e um possível receptor para esta PA foi isolado a partir de grãos de pólen da mesma planta, é possível que fenómenos de interacção pólen-pistilo possam ser mediados pelo motivo RGD identificado na cardosina A. Até à data não há ainda resultados conclusivos que permitam validar esta hipótese.

# 2 OBJECTIVOS

Esta parte do trabalho teve como objectivo geral a caracterização da expressão da cardosina A em flores de cardo ao longo de diferentes estados do desenvolvimento floral.

Uma vez que as cardosinas se acumulam maioritariamente nos estigmas e estiletes das flores de cardo, a descrição anatómica e análise ultra-estrutural destes órgãos ao longo de várias fases do desenvolvimento floral constituiu um dos objectivos do trabalho aqui documentado.

A caracterização do padrão de expressão espacial e temporal da cardosina A – mRNA e proteína – foi outro dos objectivos propostos. Pretendeu-se caracterizar a distribuição diferencial das cardosinas na flor de cardo, o que abrange a detecção destas nos diferentes órgãos florais desde a diferenciação do ápice floral até ao estado de inflorescência madura/senescente.

No seu conjunto, estes resultados visam contribuir para a elucidação da(s) função(ões) biológica(s) da cardosina A nas flores de cardo, assunto que tem sido foco de interesse do nosso e de outros grupos de investigação desde há alguns anos.

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1 Material biológico

Inflorescências de *Cynara cardunculus* L. em diferentes estados de desenvolvimento, foram colhidas periodicamente com intervalos quinzenais entre Abril e Junho, na região de Rabaçal, centro de Portugal. Parte do material foi processado para ser usado em estudos de microscopia enquanto o restante foi utilizado nas análises moleculares e bioquímicas.

## 3.2 Processamento do material biológico para microscopia

Nos estudos estruturais, histoquímicos e imunocitoquímicos foram usadas plantas de cardo em diferentes fases do desenvolvimento floral. Nas plantas mais jovens, que ainda não apresentavam uma inflorescência completamente diferenciada, procedeu-se ao isolamento dos ápices florais terminais que foram de seguida seccionados em pedaços suficientemente pequenos para serem fixados. Nas inflorescências cujo estado de desenvolvimento permitia a distinção dos diferentes órgãos do pistilo – estigma, estilete e ovário – estes foram separados, seccionados e posteriormente fixados isoladamente.

### 3.2.1 Processamento de material biológico para Microscopia Electrónica de Transmissão (T.E.M.) e Microscopia Electrónica de Varrimento (S.E.M.)

Esta parte do trabalho experimental teve como objectivo a preparação de material vegetal para posterior observação e caracterização ultra-estrutural das flores de cardo, ao longo de várias fases do desenvolvimento floral. As peças de material vegetal foram fixadas numa solução contendo glutaraldeído 2,5% (v/v) em NaPIPES 1,25% (v/v) pH 7,2, durante 1 hora (h) à temperatura ambiente. Seguiram-se 3 lavagens, cada uma de 10 minutos (min), em NaPIPES 2,5% (v/v) pH 7,2. Procedeu-se depois a uma pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2% (v/v) em NaPIPES 1,25% (v/v) pH 7,2, durante 2 h à temperatura ambiente (Salema e Brandão, 1973) ao que se seguiu uma fase de desidratação numa série de concentrações crescentes de álcool. De seguida procedeu-se à impregnação do material em Epon [48% Resina Epon 812 (TAAB), anidrido metil nádico 52% (MNA; TAAB) e 2,4,6-tri(dimetilaminometilfenol) 2% (DMP-30; TAAB)] em óxido de propileno. Finalmente, as peças foram incluídas em Epon, em moldes orientados e colocadas na estufa durante 12 h a 60ºC, para polimerização da resina.

Para ensaios de microscopia electrónica de varrimento, as peças de material vegetal foram pré-fixadas e lavadas como descrito acima. As peças foram directamente desidratadas numa série de etanol em concentrações crescentes e passou-se à sua secagem através de acetato isoamílico e dióxido de carbono, num aparelho de secagem por

ponto crítico Balzers CPD 020 (Balzers Union Ltd). Depois de secas, as amostras foram revestidas com uma monocamada de ouro de 30 nm e guardadas até posterior observação.

### 3.2.2 Processamento de material biológico para imunocitoquímica

As peças de material vegetal para posterior imunolocalização das cardosinas foram fixadas numa solução contendo paraformaldeído 4% (v/v), glutaraldeído 0,5% (v/v), sacarose 2% (m/v) e $CaCl_2$ 0,05% (m/v), em NaPIPES 1,25% (v/v) pH 7,2, durante 2 h à temperatura ambiente. Seguiram-se 3 lavagens de 10 min cada, em NaPIPES 2,5% (v/v) pH 7,2, sendo que na lavagem intermédia o tampão foi suplementado com glicilglicina a 1 mM. Procedeu-se depois à fase de desidratação numa série de álcool com concentrações crescentes. Seguiu-se a impregnação do material em séries crescentes de LR White (London Resin Co.)/etanol. Finalmente, as peças foram incluídas em LR White em cápsulas de gelatina e colocadas na estufa durante 12 h a 55ºC, para polimerização da resina.

## 3.3 Estudos estruturais em microscopia

### 3.3.1 Microscopia óptica

Para os estudos de microscopia óptica para observação da anatomia apresentada pelas flores de cardo ao longo de diferentes fases do seu desenvolvimento, secções semi-finas obtidas a partir de material processado como descrito nas secções 3.2.1 e 3.2.2, foram colocadas em lâminas de vidro e coradas numa solução 1:1 (v/v) de Azure II 1% (m/v) em água bidestilada e desionizada (bdd) e azul de metileno 1% (m/v) em borato de sódio 1% (m/v). Os cortes foram montados com Bálsamo do Canadá para melhor conservação e fotografados com um foto-microscópio modelo DMLB (Leica).

### 3.3.2 Microscopia electrónica – T.E.M. e S.E.M.

Este parte do trabalho laboratorial teve como objectivo a caracterização ultra-estrutural dos órgãos florais do cardo, ao longo de distintas fases do desenvolvimento da flor. As secções ultra-finas, obtidas a partir de material processado como descrito na secção 3.2.1, foram recolhidas em grelhas de cobre, contrastadas com acetato de uranilo e citrato de chumbo e observadas ao microscópio electrónico de transmissão (E.M. 10C, Zeiss) operando a 60 kV.

As amostras processadas para S.E.M., preparadas como descrito em 3.2.1, foram observadas com um microscópio electrónico de varrimento Jeol JSM-35C (Jeol Ltd,) operando a 25 kV.

## 3.4 Histoquímica das flores de cardo

Para a caracterização histoquímica dos estigmas e estiletes de cardo, as secções semi-finas obtidas a partir de material processado como descrito na secção 3.2.2, foram colocadas em lâminas de vidro revestidas com uma solução de poli-L-lisina a 0,01% (v/v) (Sigma), para melhor aderência dos cortes à superfície da lâmina de forma a perder o menor número de cortes possível durante o procedimento experimental. O revestimento das lâminas foi feito segundo o procedimento descrito de seguida. Lâminas de vidro foram mergulhadas em detergente durante 5 min, enxaguadas abundantemente e imersas em etanol a 70% por mais 5 min. Depois de uma passagem rápida por água bdd, as lâminas foram então mergulhadas numa solução de poli-L-lisina a 0,01% (v/v) durante 10 min. De seguida, e sem lavar, as lâminas foram postas a secar ao abrigo do pó, numa estufa a 55ºC, durante cerca de 2 a 3 h.

### 3.4.1 Detecção de Polissacarídeos – Coloração pelo reagente de Schiff

Para a detecção de polissacarídeos em estigmas e estiletes de cardo utilizou-se uma técnica de coloração com o Reagente de Schiff. Para tal, as lâminas contendo cortes semi-finos das estruturas acima citadas foram mergulhadas em etanol a 70% (v/v) durante 15 min e em seguida foram incubadas numa solução alcoólica de ácido *per*-iódico durante 20 min, à temperatura ambiente. A solução alcoólica de ácido *per*-iódico preparou-se juntando numa proveta 1 mL de uma solução concentrada de ácido *per*-iódico e 24 mL de água bdd. Em seguida, retiraram-se 20 mL da solução anterior e adicionam-se 10 mL de acetato de sódio a 0.5 M e 70 mL de etanol absoluto. Depois da incubação com o ácido *per*-iódico, as lâminas foram depois passadas por etanol a 70% (v/v) e lavadas mais 2 vezes com água. Após a lavagem, as lâminas foram mergulhadas durante 30 min em Reagente de Schiff, à temperatura ambiente e na obscuridade. O reagente de Schiff preparou-se dissolvendo 0,25 g de fucsina básica em 200 mL de água a ferver e, após filtração rápida, acrescentaram-se 5 mL de HCl 1N e 1 g de metabissulfito de sódio; passados 30 min, juntou-se 0,25 g de carvão activado. Após várias lavagens em água, as secções foram ainda brevemente passadas em etanol a 70% (v/v). Finalmente procedeu-se à montagem das lâminas, em glicerol, para observação num foto-microscópio óptico (Leica DMLB).

### 3.4.2 Detecção de Lípidos – Coloração pelo negro de Sudão B

Para a detecção de substâncias de natureza lipídica em estigmas e estiletes de cardo foi utilizado um método clássico de coloração pelo negro de Sudão B. Preparou-se uma solução saturada de Negro de Sudão B o que corresponde a cerca de 0,3% (m/v) em etanol

a 70% (v/v). A solução foi conservada na obscuridade durante 12 h a 37ºC até se proceder à sua filtração. Depois de filtrada, a solução foi colocada a 60ºC na obscuridade durante cerca de uma hora. Entretanto, as lâminas contendo cortes semi-finos das estruturas acima citadas foram mergulhadas em etanol a 70% (v/v) durante 2 min, ao que se seguiu uma incubação de 1 h na solução filtrada e aquecida de Negro de Sudão B, a 60ºC e na obscuridade. Procedeu-se depois a uma breve passagem das lâminas por etanol a 70% (v/v), seguida de uma lavagem mais abundante em água. Finalmente, as lâminas foram montadas em glicerol e observadas ao foto-microscópio óptico (Leica DMLB).

## 3.5 Estudo da expressão da cardosina A em flores de cardo

Esta parte do trabalho experimental teve como objectivo a caracterização da expressão da cardosina A em flores de cardo, ao longo de diferentes fases do desenvolvimento floral. A expressão da cardosina A foi avaliada recorrendo a metodologias para detecção da presença do seu mRNA, nomeadamente por *RT-PCR* (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) e *Northern blotting*.

### 3.5.1 Métodos de extracção de RNA total

Todo o material plástico utilizado, assim como as soluções (com a excepção das que contêm Tris e guanidina) foram tratadas com uma solução de dietil pirocarbonato (DEPC; Sigma) a 0,1% (v/v) durante 18 h, antes de se proceder à esterilização em autoclave. O material de vidro foi tratado com clorofórmio, e depois autoclavado. Os reagentes utilizados para a extracção de RNA eram, à partida, *RNase free* (livres da contaminação por ribonucleases).

O RNA total presente nas diferentes amostras usadas neste estudo foi isolado a partir de 100 mg de tecido, utilizando "RNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen) ou "TRIzol® Reagent" (GIBCO BRL), segundo as instruções dos fabricantes. Durante a extracção de RNA total com o "TRIzol® Reagent", foi introduzida uma modificação no passo da precipitação com isopropanol, que passou de 10 min à temperatura ambiente para *overnight* (ON; período correspondente a cerca de 16 h) a -20ºC, de forma a tentar aumentar o rendimento obtido no final do processo de isolamento.

A integridade do RNA total extraído foi testada recorrendo a uma electroforese em gel de agarose em condições não desnaturantes. Para tal, as tinas de electroforese foram tratadas com peróxido de hidrogénio a 3% (v/v) durante 15 min com posterior lavagem com água tratada com DEPC. O gel foi feito por dissolução a quente de agarose a 1% (m/v) em TAE autoclavado. Antes de verter o gel para o molde, foram-lhe adicionados 0,5 µg/mL de brometo de etídeo (Br Et) para permitir a visualização do RNA por fluorescência contra

radiação ultravioleta (UV; 302 nm). O tampão de corrida usado foi também TAE esterilizado. Durante a electroforese a amperagem foi mantida no valor máximo para que a corrida fosse rápida evitando assim a degradação do RNA.

A pureza das preparações de RNA obtidas foi estimada com base na razão $Abs_{260}/Abs_{280}$. A quantificação do RNA, em µg/mL, foi também estimada recorrendo ao método espectrofotométrico com a expressão $Abs_{260}$x40xfactor de diluição (Sambrook, *et al.*, 1989).

### 3.5.2 Análise por RT-PCR

Para a detecção do mRNA da cardosina A por esta técnica, foi utilizado um tipo de RT-PCR em que as reacções de transcrição reversa (*RT*) e de polimerização em cadeia (*PCR*) foram realizadas separadamente (*Two-Step* RT-PCR). A reacção de RT-PCR permite a detecção de uma sequência específica de mRNA partindo de uma amostra de RNA total e recorrendo a um *primer reverse* específico cuja sequência é complementar à sequência do mRNA a detectar. Na reacção de RT, e de uma forma dependente do emparelhamento do *primer reverse*, ocorre a formação da primeira cadeia de cDNA por acção da transcriptase reversa, cadeia esta que será amplificada na reacção de PCR subsequente, recorrendo a um par de *primers* específicos para o cDNA em causa.

Neste trabalho foi utilizado 1 µg de RNA total, isolado com o "RNeasy Plant Mini Kit" (QIAGEN), em cada reacção de RT. Todas as reacções de RT-PCR foram realizadas num termociclador PERKIN ELMER PCR System 2400 (PE Biosystems).

A síntese da primeira cadeia foi efectuada em reacções de 20 µL. A constituição destas reacções, bem como as condições em que foram realizadas, encontram-se descritas na Tabela I-4.

**Tabela I-4 – Generalização das condições de execução da transcrição reversa.**

| **Reagente** | **Volume (µL)** |
|---|---|
| *Primer Reverse* para Primeira Cadeia (20 µM) | 1,0 |
| Água Esterilizada | para volume final 12 µL |
| RNaseOUT™[a] (GIBCO BRL) | 1,0 |
| RNA Total | correspondente a 1 µg |
| **Aquecimento a 70°C durante 10 min; colocar em gelo; centrifugar brevemente** | |
| Tampão de Primeira Cadeia 5x[b] | 4,0 |
| DTT 0,1 M | 2,0 |
| Mistura de Nucleótidos 10 mM (GIBCO BRL) | 1,0 |
| **Agitação suavemente e incubar a 42°C durante 2 min** | |
| SuperScript ™ II RT[c] (GIBCO BRL) | 1,0 |
| **Incubação 50 min a 42°C; inactivação a 70°C 15 min** | |

[a] inibidor de RNases; [b] tampão fornecido com a "SuperScript ™ II"; [c] transcriptase reversa.

A síntese da segunda cadeia e sua amplificação foram efectuadas em reacções de 50 µL. A constituição e condições destas reacções encontram-se descritas na Tabela I-5. O programa de PCR utilizado para amplificação apresenta-se sumariado na Tabela I-6.

**Tabela I-5 – Resumo das condições de síntese da segunda cadeia e subsequente amplificação.**

| Reagente | Volume (µL) |
|---|---|
| Tampão de PCR 10x[a] | 5,0 |
| Mistura de Nucleótidos 10 mM (GIBCO BRL) | 1,5 |
| $MgCl_2$ 50 mM (GIBCO BRL) | 1,5 |
| *Primer Forward* (20 µM) | 1,0 |
| *Primer Reverse* (20 µM) | 0,5 |
| DNA-molde de cadeia simples (reacção de síntese da primeira cadeia) | 0,5 – 1,0 |
| Água Esterilizada | para volume final de 49,75 |
| **"Hot Start" 3 min a 94°C - → Pausa** | |
| *Taq* DNA Polimerase 5 U/µL (GIBCO BRL) | 0,25 |
| **Prosseguir com programa de PCR** | |

[a] tampão fornecido com a *Taq* DNA polimerase

**Tabela I-6 – Programa de PCR utilizado para a amplificação após síntese da segunda cadeia.**

| Número de ciclos | Temperatura | Tempo |
|---|---|---|
| | 94°C | 40 seg |
| 35 | 55-58°C | 2 min |
| | 72°C | 2 min |
| 1 | 72°C | 15 min |
| 1 | 4°C | manter |

Nas experiências de RT-PCR foram utilizados os *primers* F626 (*forward*, 5'-CTCGGCCTTTCACTTCAAACG-3') e R1022 (*reverse*, 5'-CGGGTTGTATCTTAGATCGG-3'), ambos previamente publicados (Faro, *et al.*, 1999). Os produtos resultantes do RT-PCR foram corridos em gel de agarose e visualizados como descrito na secção 3.5.1.

Todos os fragmentos amplificados resultantes deste conjunto de experiências foram isolados dos geles de agarose com o "QIAquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN), clonados em pBlueScript® II KS (Stratagene) e sequenciados num sequenciador automático de DNA (ABI Prism® 377, PE Biosystems) para confirmação da sua natureza.

### 3.5.3 Análise por *Northern blotting*

Para a detecção do mRNA da cardosina A recorreu-se ainda a uma outra metodologia, o *Northern blotting*, menos sensível do que o método de detecção por RT-PCR. Nesta metodologia, amostras de RNA total isoladas a partir dos órgãos nos quais se queria testar a presença do RNA da cardosina A foram submetidas a uma electroforese em condições desnaturantes, ao que se seguiram a detecção do mRNA desejado, recorrendo a sondas de

DNA de cadeia simples, complementares ao mRNA da cardosina A e marcadas radioactivamente.

i) Marcação radioactiva de sondas com $^{32}P$

Para a marcação radioactiva da sonda de DNA a ser utilizada no *Northern blotting* recorreu-se ao kit "Ready-To-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP)" (Amersham Biosciences), que foi usado segundo as instruções do fabricante. Na reacção de marcação foram utilizados cerca 50 ng de DNA, purificado a partir de uma reacção de PCR para obtenção de uma sonda específica para a cardosina A.

Depois da sonda marcada passou-se à sua purificação, utilizando para o efeito as micro colunas "ProbeQuant™ G-50" (Amersham Biosciences), segundo as instruções do fabricante.

ii) *Northern blotting*

Neste procedimento foram utilizados, para cada amostra experimental, 15 µg de RNA total isolado com o "Trizol® Reagent", como descrito em 3.5.1. Para a electroforese em condições desnaturantes, preparou-se um gel de agarose a 1,5% (m/v). Para tal, juntaram-se 3,75 g de agarose a 220 mL de água esterilizada e dissolveu-se a agarose a quente. À mistura anterior adicionaram-se de seguida 25 mL de tampão MOPS 10x concentrado aquecido a 60ºC [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) a 0,2 M; ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) a 0,01 M; acetato de sódio (NaAc) a 0,05 M e com o pH ajustado para 7,0 com NaOH. O tampão MOPS foi esterilizado em autoclave e armazenado ao abrigo da luz], 7,5 mL de formaldeído a 35% e 2 µL de Br Et (10 mg/mL). O gel foi vertido numa tina previamente tratada de forma a estar livre de contaminação com RNases (*RNase-Free*) e deixou-se solidificar, na hote, durante 1 h. As amostras de RNA foram carregadas e o gel foi corrido em tampão MOPS, na hote, a 100 V, durante 2 h e 30 min. Depois de terminada a corrida electroforética, o gel foi incubado durante 1 h numa solução de fosfato de sódio (50 mM) e EDTA (5 mM), pH 6,5 e fotografado contra a radiação UV (302 nm). Cortou-se uma membrana "Hybond-N+" (Amersham Biosciences) com o tamanho aproximado ao do gel e de seguida esta foi cuidadosamente colocada sobre o primeiro, evitando a formação de bolhas de ar ou dobras entre o gel e a membrana. Seguidamente, procedeu-se à montagem da ponte de transferência da forma descrita por Sambrook *et al.* (1989) (Sambrook, *et al.*, 1989). O processo de transferência foi efectuado com uma solução de acetato de sódio a 50 mM e EDTA a 5 mM, pH 6,5, durante a noite. Depois de terminada a transferência, o RNA foi fixado à membrana por UV *cross-linking*. Findado este processo, a membrana foi incubada a 42ºC, por 30 min e com agitação, em solução de pré-hibridação.

A solução de pré-hibridação usada era constituída por 50% (v/v) de formamida, SSPE 5x (a partir de um stock 20x preparado com 175,3 g de NaCl, 27,6 g de $NaH_2PO_4.H_2O$ e 7,4 g de EDTA; o pH foi ajustado para 7,4 com NaOH e o tampão foi esterilizado no autoclave) e 5% (v/v) de dodecil sulfato de sódio [SDS; (v/v)]. Após este processo, a sonda previamente marcada, purificada e desnaturada, foi adicionada à solução de pré-hibridação e procedeu-se à incubação da membrana nesta mistura durante a noite, com agitação e a 42ºC. Depois do passo de hibridação da membrana, seguiram-se as lavagens desta em solução de lavagem (2x SSPE e 0,1% de SDS), por dois períodos de 10 min cada, a 42ºC e com agitação. Finalmente, a membrana foi protegida por película aderente e foi-lhe sobreposto um filme apropriado que ficou a expor a -70ºC. O resultado foi obtido por revelação da autoradiografia, num revelador automático (X-Omat M43 Processor, Kodak), após exposição do filme durante 16-18 h.

## 3.6 Imunodetecção da cardosina A em flores de cardo

Parte das amostras de material biológico utilizadas nos estudos moleculares, foi reservada para extracção de proteínas e posteriores experiências de imunodetecção da cardosina A. Nesta parte do trabalho experimental, procedeu-se à detecção da presença da proteinase aspártica cardosina A nos órgãos florais de cardo por *Western blotting* e ao longo de diferentes fases do desenvolvimento da flor.

### 3.6.1 Preparação dos extractos proteicos

O material biológico foi homogeneizado em tampão de extracção constituído por Tris-HCl 25 mM e pH 8,0, $MgCl_2$ 10 mM, ditiotreitol (DTT) 1 mM, glicerol 10% (v/v), Triton X-100 0,05% (v/v) e polivinil pirrolidona (PVP) insolúvel 5% (m/v), numa razão de 1:1 de volume (mL) de tampão de extracção de proteínas por grama de tecido. Após homogeneização, seguiu-se uma centrifugação a 13000 rotações por minuto (r.p.m.) a 4ºC durante 10 min. Os sobrenadantes resultantes foram aproveitados e centrifugados como no passo anterior. Após a segunda centrifugação, voltaram a recolher-se os sobrenadantes e estes foram mantidos em gelo para se proceder à determinação da quantidade total de proteína presente em cada extracto segundo o método de Bradford (Bradford, 1976) e usando a albumina bovina sérica (BSA) como padrão. Para a preparação de 100 mL de Reagente de Bradford adicionaram-se 10 mg de azul brilhante de Comassie G-250 a 5 mL de etanol a 95% (v/v), aos quais se juntaram 10 mL de $H_2PO_4$ a 85% (v/v). Por fim perfez-se o volume com água bdd. A 1 mL de reagente de Bradford adicionaram-se 100 µL de extracto diluído 1:100 em água e após 15 min de incubação à temperatura ambiente, foram lidas as absorvâncias das misturas a 595 nm e determinada a concentração de proteína existente em cada amostra,

recorrendo à recta padrão obtida com os padrões de BSA. Após determinação da concentração total de proteínas nos extractos, procedeu-se ao processamento destes para posterior armazenamento a -20ºC. Para tal, aos extractos proteicos adicionaram-se volumes adequados de tampão de amostra de proteínas 5x concentrado [Tris-base 0,3345 M, glicerol 50% (v/v), pH 6,8, SDS 5% (m/v), azul de bromofenol 0,2% (m/v) e β-mercaptoetanol 5% (v/v)]. Seguiu-se uma fervura das misturas durante 5 min e uma centrifugação à velocidade máxima durante outros 5 min. Os sobrenadantes foram recolhidos e depois armazenados -20ºC até posterior uso.

### 3.6.2 Coloração por *Silver Staining*

Após preparação dos extractos proteicos como indicado na secção 3.6.1, alíquotas de extracto contendo cerca de 10 µg de proteínas foram carregados em geles de poliacrilamida a 12,5% (v/v) e submetidos a *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), de acordo com o método de Laemmli (1970) (Laemmli, 1970). A electroforese foi realizada numa unidade Hoefer™ miniVe (Hoefer Scientific Instruments) a 250 V/25 mA.

Após electroforese, o gel foi incubado em solução fixadora [etanol a 30% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v)] por 3 períodos de 30 min cada. Seguiu-se uma lavagem de 10 min em etanol a 20%, e uma outra lavagem, também de 10 min, com água bdd. Posteriormente, o gel foi imerso em solução de sensibilização [tiossulfato de sódio 0,02% (m/v)] durante 1 min, lavado em água bdd por 2 períodos de 20 seg cada e mergulhado numa solução de nitrato de prata ($AgNO_3$) 0,2% (m/v), durante 30 min. Após 3 lavagens de 15 segundos em água bdd, o gel foi incubado em solução de revelação [formaldeído a 37% (v/v), carbonato de sódio a 3% (v/v) e tiossulfato de sódio a 0,001% (m/v)] até à intensidade de coloração desejada (geralmente não mais de 5 min). O passo de revelação foi parado por substituição da solução de revelação por uma solução contendo Tris-base 5% (m/v) e ácido acético 2,5% (v/v) numa incubação de 1 min. Todos os passos deste protocolo foram realizados na obscuridade e com agitação.

### 3.6.3 Análise por *Western blotting*

Após preparados os extractos proteicos como indicado na secção 3.6.1, volumes de extracto contendo cerca de 20 µg de proteínas foram aplicados em geles de poliacrilamida a 12,5% (v/v) e submetidos a SDS-PAGE como descrito na secção 3.6.2. Após electroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose com a unidade de transferência Hoefer™ MiniVE (Hoefer Scientific Instruments), durante 2 h, a 25 V/300 mA.

Na imunodetecção da cardosina A foi utilizado o "ECL *Western blotting* analysis system" (Amersham Biosciences) segundo instruções do fabricante, mas com algumas modificações. As membranas de nitrocelulose foram incubadas em solução de bloqueio, composta por

leite em pó magro a 5% (m/v) em PBS-T (PBS suplementado com 0,1% de Tween-20) com agitação, durante 1 h à temperatura ambiente, ao que se seguiu uma lavagem de 10 min com leite em pó magro a 0,5% (m/v) em PBS-T. As membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-A recombinante (anti-rec A) (Faro, *et al.*, 1999) numa diluição de 1:500, ou com um anticorpo primário contra a cadeia de 31 kDa da cardosina A numa diluição de 1:200 (anti-A) (Veríssimo, *et al.*, 1996), em leite em pó magro a 0,5% (m/v) em PBS-T. A incubação com a diluição de anticorpo primário foi feita durante 1 h à temperatura ambiente ou, alternativamente, ON a 4ºC. Posteriormente, as membranas foram lavadas com leite em pó magro 0,5% (m/v) em PBS-T por 3 períodos de 10 min cada. Em seguida procedeu-se à incubação das membranas na solução contendo o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho produzido em burro) conjugado com fosfatase alcalina numa diluição 1:1000 em leite em pó magro 0,5% (m/v) em PBS-T durante 1 h à temperatura ambiente, ao que se seguiu a lavagem das membranas com leite em pó magro 0,5% (m/v) PBS-T por 3 períodos de 10 min. A revelação do sinal resultante da imunodetecção da cardosina A foi realizada com os reagentes de detecção do "ECL *Western blotting* analysis system" (Amersham Biosciences), segundo instruções do fabricante.

## 3.7 Imunolocalização das cardosinas

Com o objectivo de caracterizar a distribuição das cardosinas nos órgãos florais de cardo, procedeu-se à imunolocalização destas proteinases aspárticas ao longo de diferentes fases do desenvolvimento da flor, recorrendo a técnicas de imunohistoquímica e imunocitoquímica.

### 3.7.1 Imunohistoquímica

Para a imunolocalização das cardosinas em secções semi-finas de estigma e estilete, foram recolhidos os cortes em lâminas de vidro previamente revestidas com poli-L-lisina a 0,01%, circunscritos com tinta hidrofóbica e tratados, primeiro com uma solução saturada de meta-periodato de sódio (Sigma) durante 10 min, e depois com uma solução de HCl 0,01% pelo mesmo período.

Após esta fase de *etching* químico para melhor expor os antigénios, procedeu-se à imunolocalização das cardosinas utilizando o "HISTOSTAIN-PLUS KIT" (Zymed), segundo instruções do fabricante, às quais foram introduzidas as seguintes modificações: as lavagens foram feitas com TBS-T [TBS 500 (Tris-base 0,01 M, NaCl 500 mM, pH 7,5) suplementado com Tween-20 0,2% (v/v)]; o substrato cromogénico do kit, "Fast Red", foi substituído pelo substrato "SIGMA*FAST*™ BCIP/NBT" (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/azul nitrotetrazólio), específico para a fosfatase alcalina, diluído em polivinil-álcool (PVA) 10%

(m/v) de massa molecular de 40-70 kDa (Sigma). Os anticorpos primários (policlonais de coelho) dirigidos contra a cadeia pesada da cardosina A (anti-A) (Veríssimo, *et al.*, 1996) e contra a cardosina B (anti-B) (Vieira, *et al.*, 2001) foram usados nas diluições 1:40 e 1:60, respectivamente. As lâminas foram observadas num foto-microscópio óptico modelo DMLB (Leica).

### 3.7.2 Imunofluorescência

Além dos ensaios de imunohistoquímica para detecção da cardosina A descritos na secção anterior, foram ainda realizadas experiências de imunofluorescência recorrendo ao anticorpo secundário fluorescente Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes).

Os cortes semi-finos foram recolhidos em lâminas de vidro previamente revestidas com poli-L-lisina, circunscritos com tinta hidrofóbica e tratados com uma solução saturada de meta-periodato de sódio (Sigma) durante 10 min. Seguiram-se 2 lavagens breves com água bdd filtrada e uma incubação de 5 min com TBS 500 filtrado. O tampão foi substituído por solução de bloqueio [soro não imune de cabra 10% (v/v) (Sigma) em TBS-T] para uma incubação de 1 h à temperatura ambiente. Após o bloqueio, e sem lavar, procedeu-se à incubação dos cortes com uma diluição adequada de anticorpo primário em solução de bloqueio, geralmente ON a 4ºC em câmara húmida ou 1h à temperatura ambiente. Lavaram-se os cortes com TBS-T (3-5 vezes 2 min) e adicionou-se uma diluição de 1:400 de anticorpo secundário (Alexa Fluor® 488, Molecular Probes) produzido em cabra e contra IgG de coelho, em TBS-T, por um período de 1 h a 1:30 h, à temperatura ambiente e na obscuridade. Seguiu-se uma lavagem abundante dos cortes com TBS-T (3-5 vezes 2 min) e posterior montagem para observação com solução própria para fluorescência ("VECTASHIELD® Mounting medium", Vector Laboratories). O anticorpo primário dirigido contra a cardosina A recombinante (anti-rec A) (Faro, *et al.*, 1999) foi usado numa diluição de 1:60 enquanto que o anticorpo primário dirigido contra a cardosina B (anti-B) (Vieira, *et al.*, 2001) foi usado numa diluição de 1:40. As lâminas foram observadas num microscópio de fluorescência modelo Axiovert 200 Inverted High-end microscope (Zeiss).

### 3.7.3 Imunocitoquímica

De forma identificar a localização subcelular das cardosinas recorreu-se a técnicas de imunocitoquímica. Para tal, cortes ultra-finos de estigmas e estiletes de cardo foram recolhidos em grelhas de níquel não revestidas, e posteriormente incubados em solução de bloqueio durante 30 min à temperatura ambiente. A solução de bloqueio, composta por NaCl 0,8% (v/v) e soro não imune de cabra 5% (v/v) (Sigma) em TBS-T, foi filtrada antes de usar. Sem lavar, procedeu-se à incubação dos cortes com uma diluição adequada de anticorpo primário em solução de bloqueio durante 4h à temperatura ambiente ou ON a 4ºC em

câmara húmida. Após incubação em anticorpo primário, os cortes foram bem lavados com solução de bloqueio (6 vezes 5 min) e passou-se à incubação com o anticorpo secundário, durante 1 h. O anticorpo secundário, feito em cabra contra IgG de coelho e conjugado com partículas de ouro coloidal de 15 nm (Zymed), foi usado numa diluição de 1:50 em solução de bloqueio. Seguiram-se duas lavagens dos cortes, a primeira com solução de bloqueio (3 vezes 5 min) e a última com água bdd e filtrada (3 vezes 5 min). Posteriormente, as secções foram contrastadas com acetato de uranilo e citrato de chumbo, antes de serem observadas ao microscópio electrónico de transmissão (E.M. 10C, Zeiss) operando a 60 kV.

Os anticorpos relativos a este trabalho foram usados nas seguintes diluições: anti-rec A, 1:500 (Faro, *et al.*, 1999); anti-A, 1:400 (Veríssimo, *et al.*, 1996) e finalmente anti-B, 1:100 (Vieira, *et al.*, 2001). Todos os anticorpos primários aqui usados são policlonais e foram produzidos em coelho.

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos de expressão e imunolocalização da cardosina A no pistilo de cardo bem como a caracterização estrutural dos órgãos florais femininos desta espécie foram realizados com material em diferentes estados de ontogénese floral. O material vegetal usado neste trabalho foi colhido na região centro de Portugal, no Rabaçal, e as fases de desenvolvimento correspondentes às diversas colheitas encontram-se apresentadas na Figura I-8.

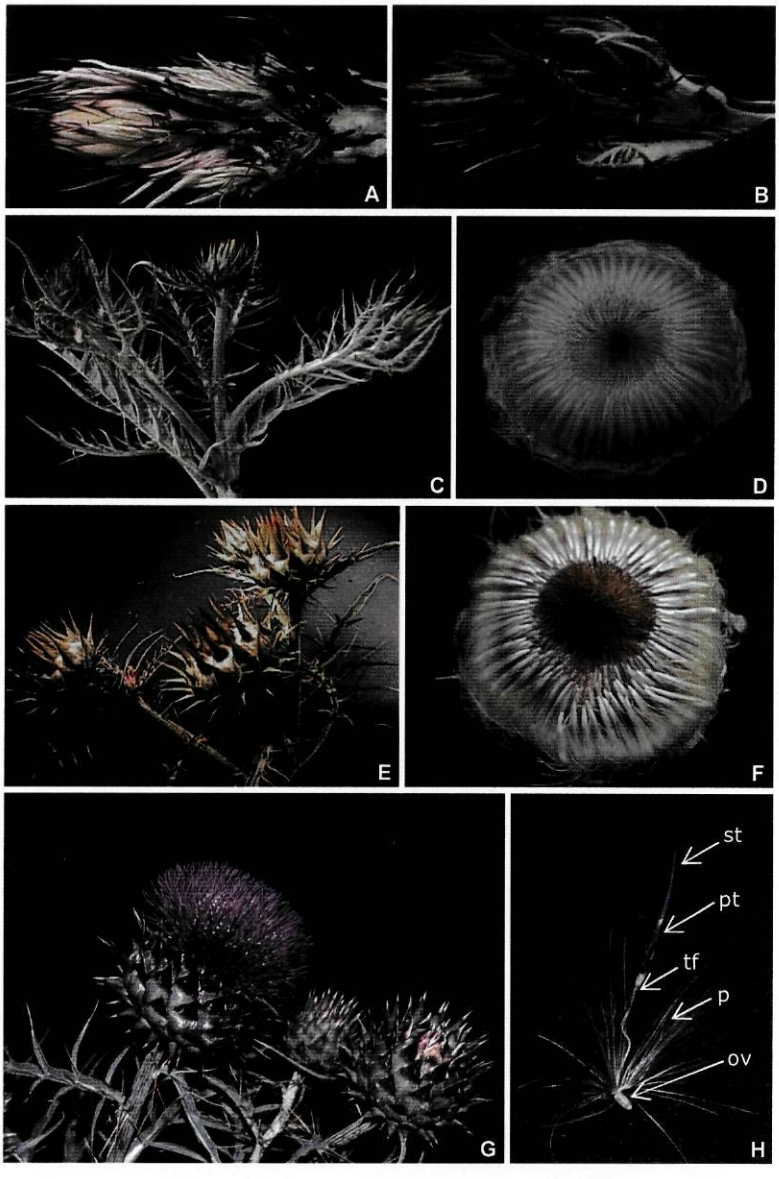



**Figura I-8 – Inflorescências de *Cynara cardunculus* em diferentes estados de desenvolvimento.** A-B) Ápices de inflorescências não diferenciadas e em dois distintos estádios de maturação, sendo (A) mais inicial do que (B). C-D) Inflorescências fechadas num estádio em que as flores ainda não apresentam diferenciação cromática; vistas de perfil ainda na planta (C) e inflorescência vista de topo depois de removidas as brácteas protectoras (D). E-F) Inflorescências fechadas num estado de desenvolvimento em que as flores já apresentam diferenciação cromática; vistas de perfil (E) e inflorescência vista de topo após remoção das brácteas do invólucro protector (F). G-H) Inflorescência aberta vista de perfil (G) e aspecto de uma flor madura isolada (H). (st) estigma; (pt) pétala; (tf) tubo floral; (p) papilho; (o) ovário.

A acumulação de proteinases aspárticas (PAs, EC3.4.23) nos órgãos florais de dicotiledóneas é um fenómeno raro (Mutlu e Gal, 1999, Simoes e Faro, 2004), pelo que a simples presença das cardosinas nas flores de *C. cardunculus* , por si só, torna esta espécie

um modelo interessante para o estudo das funções biológicas das proteinases aspárticas vegetais.

O interesse na caracterização das cardosinas e na sua descrição detalhada a nível molecular e bioquímico levou a que o estudo das flores de *C. cardunculus* , em particular da estrutura do seu pistilo, fosse relegado para segundo plano. Neste trabalho tentou-se colmatar este hiato no conhecimento desta espécie vegetal, dedicando parte da investigação à descrição da anatomia e ultra-estrutura da parte feminina das flores de cardo durante a ontogénese floral. Em simultâneo, procedeu-se ao estudo do padrão de expressão apresentado pela cardosina A durante o desenvolvimento floral, bem como ao estudo da distribuição específica desta proteinase no pistilo de cardo.

## 4.1 Caracterização do pistilo de *Cynara cardunculus* durante a ontogénese floral

### 4.1.1 Anatomia do desenvolvimento do estigma de *C. cardunculus*

As inflorescências de *C. cardunculus* organizam-se em capítulos grandes e solitários, com invólucros rodeados por brácteas pungentes com espinhos, sendo compostas por inúmeras flores sésseis de dimensões reduzidas arranjadas de forma compacta (Figura I-8H).

Os estigmas das flores de cardo são secos, longos, do tipo papilar e apresentam duas chanfraduras longitudinais resultantes da sua composição bicarpelar (Figura I-9). Nestes estigmas é possível distinguir cinco regiões estruturalmente diferentes: a epiderme papilar, a região sub-epidérmica com várias camadas de células de parênquima, uma área com tecido de sustentação e feixes vasculares e, mais internamente, o tecido de transmissão.

Nos estádios iniciais de ontogénese o estigma apresenta uma protoderme (Figura I-9A), camada celular a partir da qual se desenvolverão as papilas, assemelhando-se neste estádio específico à protoderme do estilete. Em estados de desenvolvimento intermédios, as células epidérmicas expandem originando as papilas estigmáticas onde a cardosina A se acumula (Figura I-24,Figura I-25 e Figura I-26). As papilas ocupam a região mais externa dos estigmas, estão abundantemente presentes e compõem a epiderme unisseriada deste órgão (Figura I-9). Esta epiderme papilar recobre várias camadas de células de parênquima, com paredes celulares finas e altamente vacuolizadas e que marcam positivamente para a presença da cardosina A (Figura I-24,Figura I-25 e Figura I-26). As camadas de parênquima sub-epidérmico rodeiam o tecido vascular em desenvolvimento e as fibras de esclerênquima (Figura I-9B). Em estádios de maturação tardios o estigma alarga, as papilas expandem e cuticularizam, e os tecidos vasculares e de sustentação completam a sua diferenciação (Figura I-9C). Os feixes vasculares do estigma, com floema e xilema, são rodeados por uma

camada compacta de células de parênquima, praticamente sem espaços intercelulares e com paredes celulares anticlinais sinuosas (Figura I-10A). As células condutoras de xilema apresentam paredes celulares secundárias bastante espessas (Figura I-10B). O floema é composto por células de parênquima, elementos de tubo crivoso (representando uma pequena porção do floema) e células associadas: as células de companhia e de transferência (Figura I-10C).

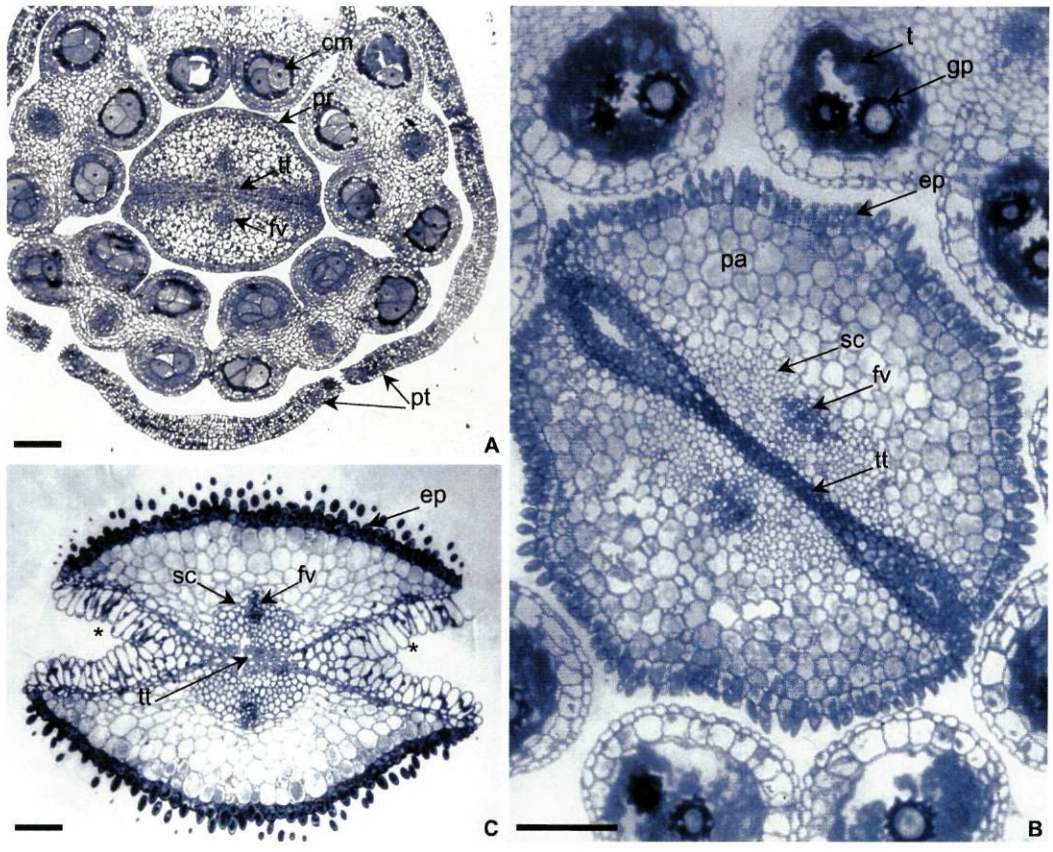



**Figura I-9 – Anatomia geral das flores de *C. cardunculus* .** A) Flor imatura de inflorescência fechada, num estado de desenvolvimento correspondente ao representado na Figura I-8C-D. Neste estádio inicial de ontogénese as papilas ainda não se diferenciaram na protoderme (pr). Nas anteras é possível observar células mãe dos micrósporos (cm); as anteras estão circundadas pelas pétalas (pt). B) Flor num estádio intermédio de desenvolvimento correspondente ao representado na Figura I-8E-F. A epiderme papilar já se encontra diferenciada (ep). Os feixes vasculares (fv) são rodeados por fibras de esclerênquima (sc) e ambos flanqueiam o centro da estrutura, ocupado pelo tecido de transmissão (tt) que se expande até às chanfraduras. O córtex é composto por células de parênquima (pa). Nas anteras podem ser observados grãos de pólen (gp) em processo de maturação, rodeados pelo tapete (t) em fase de desorganização. C) Estigma maduro correspondente ao estado de desenvolvimento representado na Figura I-8G-H. As duas chanfraduras longitudinais (*) do estigma são mais evidentes e as papilas localizadas nesta região não apresentam coloração visível. Barras=100 µm.

As células de transferência são caracterizadas por apresentarem invaginações de parede celular bem desenvolvidas em todos os lados da célula excepto naquele que contacta com o elemento de tubo crivoso, onde existem plasmodésmios (Figura I-10C). Também a comunicação entre um elemento de tubo crivoso e a sua respectiva célula de companhia é estabelecida via plasmodésmios (Figura I-10D).

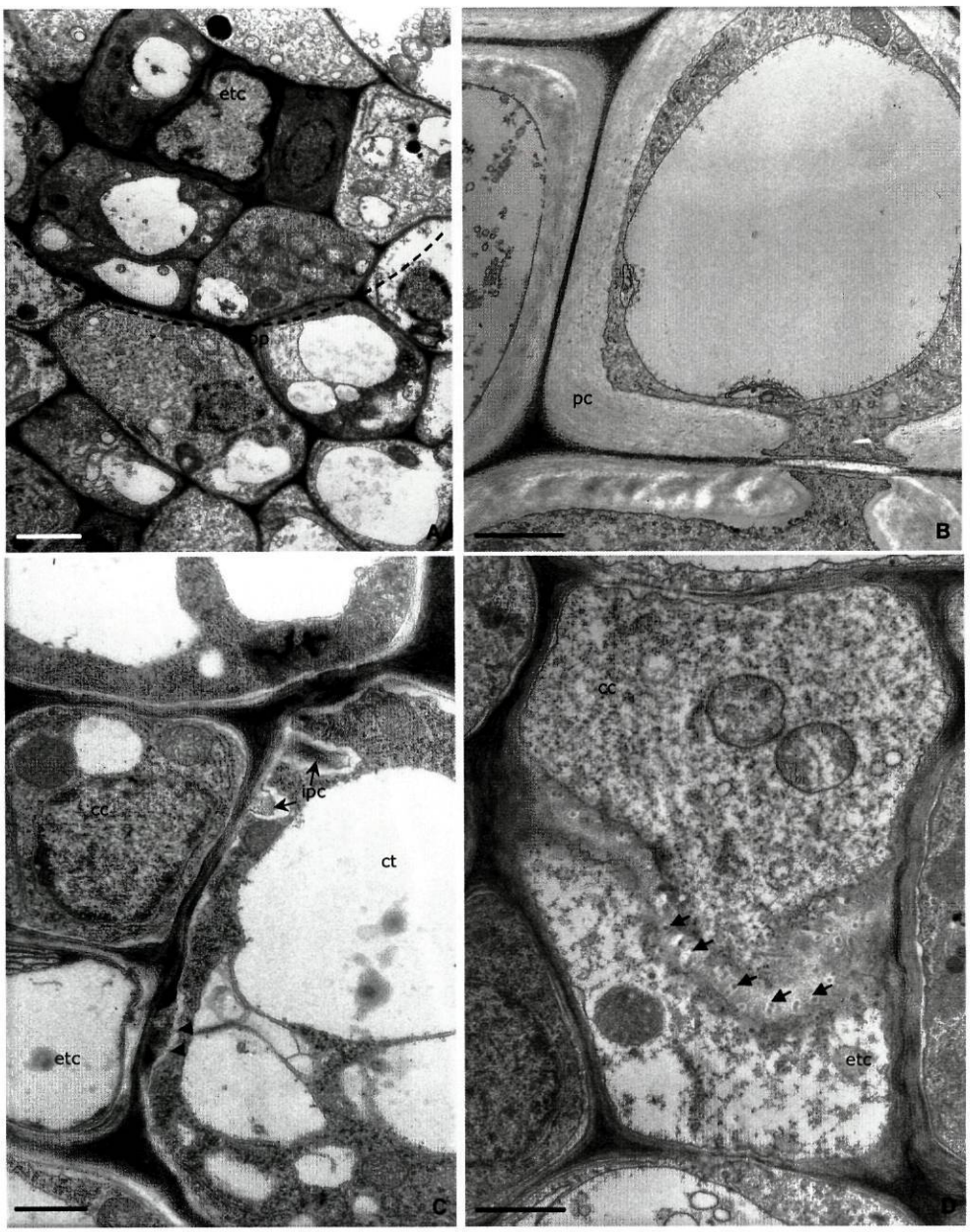



**Figura I-10 – Ultra-estrutura dos feixes vasculares do estigma (secções transversais).** A) Detalhe da camada envolvente de parênquima (cpp) que rodeia os feixes vasculares (linha a tracejado). Barra=1 µm. B) Elemento condutor de xilema numa fase final de maturação. De realçar a parede celular (pc) secundária caracteristicamente espessa e com ornamentações. Barra=0,25 µm. C) Detalhe de uma área floémica podendo observar-se um complexo formado por elemento de tubo crivoso (etc)-célula de companhia (cc) e células associadas. Notar as invaginações de parede celular (ipc) na célula de transferência (ct). As pontas de setas marcam locais de continuidade entre o elemento de tubo crivoso e a célula de transferência via plasmodésmios. Barra=0,25 µm. D) Ampliação de uma região entre um elemento de tubo crivoso e célula de companhia onde podem observar-se numerosos plasmodésmios (setas). Barra=0,25 µm.

As papilas estigmáticas do cardo derivam da protoderme, são claviformes unicelulares, cuticularizadas e durante o desenvolvimento floral apresentam um aumento do volume vacuolar. No estado imaturo, as células da protoderme aparecem cúbicas e com um citoplasma rico em ribossomas, mitocôndrias e pequenos vacúolos (Figura I-11A). À medida que a maturação avança, estas células assumem uma forma mais alongada e ocorre a fusão entre os numerosos pequenos vacúolos resultando no surgimento de vacúolos maiores mas em menor número, que ocupam a quase totalidade do volume da célula (Figura I-11B-C). É interessante notar que à medida que o desenvolvimento floral avança, é

possível observar uma aparente redução de conteúdo proteico nas papilas localizadas na região das chanfraduras um facto ilustrado pela fraca coloração observada nesta região no estado maduro (Figura I-9C).

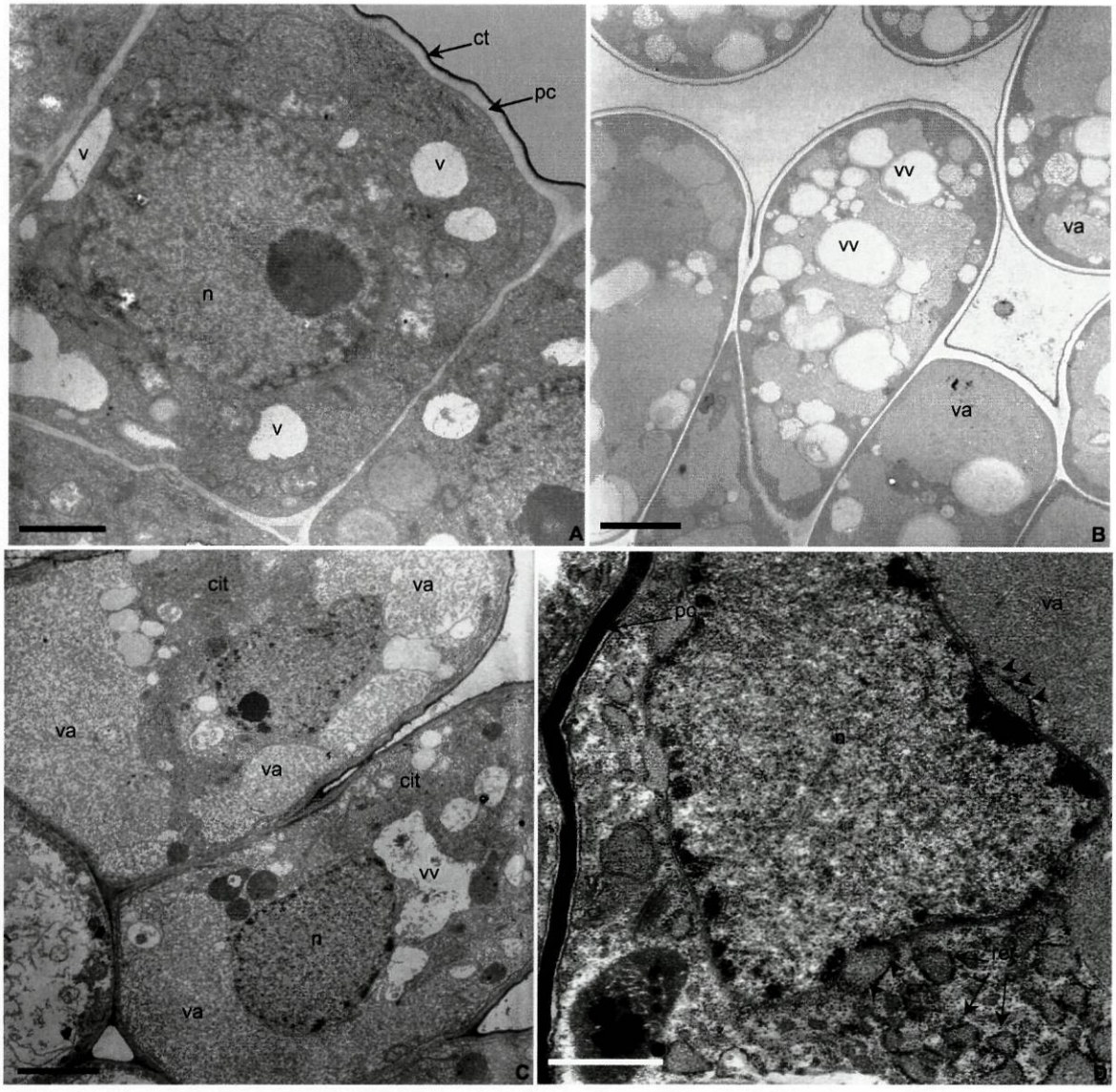



**Figura I-11 – Ultra-estrutura de papilas estigmáticas em três diferentes estádios de ontogénese floral.** A) Secção transversal de uma flor imatura ao nível do estigma. As papilas ainda não se diferenciaram da protoderme. As células aparecem quadradas revelando um núcleo grande central (n) e diversos pequenos vacúolos (v) espalhados pelo citoplasma rico e denso. A cutícula (ct) pode já ser observada recobrindo as paredes celulares exteriores (pc). Barra=0,5 µm. B) Estádio de maturação floral intermédio. A epiderme papilar já está diferenciada e as células aparecem com uma forma alongada. Podem observar-se dois tipos de vacúolos morfologicamente distintos: os vacúolos electrono-densos (va) ou de armazenamento de proteínas e vacúolos electrono-transparentes (vv) possivelmente correspondendo a vacúolos do tipo vegetativo. Barra=1 µm. C) Papila estigmática madura. Notar que o citoplasma (cit) da célula está quase totalmente ocupado por vacúolos electrono-densos (va). Barra=1 µm. D) Detalhe de células da epiderme papilar apresentando vacúolos bem desenvolvidos (va), cisternas dilatadas de RER (rer) e espaço perinuclear com ribossomas (pontas de seta). Um possível ponto de fusão entre uma vesícula derivada do RER e um vacúolo de armazenamento de proteínas está assinalado por um asterisco. Barra=0,5 µm.

Ao microscópio electrónico de transmissão (T.E.M.) é possível observar, nas papilas estigmáticas de flores de cardo, duas regiões morfologicamente distintas, sendo uma região mais electrono-densa do que outra, de aspecto mais electrono-transparente (Figura I-11B-C). É possível que estes dois tipos de estruturas subcelulares delimitadas por membranas, possam corresponder a duas populações vacuolares bem desenvolvidas co-existindo em

células epidérmicas maduras de estigmas de cardo. Um resultado que apoia a hipótese da existência de vacúolos putativamente distintos nas papilas epidérmicas, é a marcação diferencial apresentada por estas duas estruturas quando sujeitas a imunodetecção para a presença da cardosina A. Esta proteinase aspártica é apenas e especificamente detectada nas estruturas electrono-densas, onde se acumula até estádios tardios de maturação da flor (Ramalho-Santos, *et al.*, 1997). Os compartimentos electrono-densos observados nas papilas estigmáticas podem portanto corresponder a vacúolos de armazenamento de proteínas, enquanto as estruturas electrono-transparentes são possivelmente constituídas por vacúolos do tipo vegetativo. Apesar desta afirmação ser puramente especulativa, a co-existência de duas populações vacuolares funcionalmente distintas em células epidérmicas maduras, poderia revelar-se muito relevante uma vez que até à data a presença de diferentes tipos de vacúolos na mesma células tem sido apenas reportada para plantas imaturas ou protoplastos (Di Sansebastiano, *et al.*, 2001, Jauh, *et al.*, 1999, Paris, *et al.*, 1996). Os dois tipos de vacúolos identificados em células vegetais, bem como as diferentes vias de direccionamento associadas ao transporte de proteínas para estes compartimentos subcelulares, serão abordados mais detalhadamente na Introdução do Capítulo II.

Nas plantas, as proteínas que seguem a via secretora são exportadas do RE para o Golgi, de onde podem depois ser transportadas para o apoplasto, ou alternativamente ser direccionadas para os vacúolos (para detalhes acerca da via secretora vegetal ver Introdução do Capítulo II). O direccionamento de proteínas vacuolares, está ligado à presença de sinais de endereçamento que as orientam para duas vias distintas de transporte, desde a face *trans* do Golgi até aos vacúolos de armazenamento de proteínas, ou então até aos vacúolos vegetativos (Bassham e Raikhel, 2000, Hadlington e Denecke, 2000, Neuhaus e Rogers, 1998). Há no entanto relatos de uma via alternativa para os vacúolos de armazenamento, tal como aquela descrita para proteínas de armazenamento de sementes de abóbora, transportadas em *precursor-accumulating vesicles* (PACs), que se destacam do RE e se fundem directamente com o compartimento vacuolar, desviando-se de uma passagem pelo Golgi (Hara-Nishimura, *et al.*, 1998).

Nas papilas estigmáticas de cardo é possível observar cisternas dilatadas de retículo endoplasmático rugoso (RER) e também do espaço perinuclear (delimitado na membrana externa do invólucro nuclear por numerosos ribossomas), ambos apresentando um conteúdo lumenal de aparência idêntica àquele observado nos vacúolos electrono-densos e positivos para a presença da cardosina A (Figura I-11D). Aliás, em alguns cortes foi ainda registada a observação de aparentes pontos de fusão entre vesículas derivadas do RER e vacúolos de conteúdo electrono-denso (Figura I-11D). A observação, nestas células, daquilo que possivelmente são eventos de fusão entre vesículas destacadas do RE, com um lúmen electrono-denso, e vacúolos de armazenamento de proteínas, pode ser indicativa da

ocorrência da entrega directa de polipéptidos vacuolares de armazenamento, possivelmente não glicosilados, desde o RER até aos vacúolos de armazenamento, sem um ponto de paragem no Golgi. Isto não quer, contudo, dizer que seja esta a via de transporte seguida pela cardosina A no seu trajecto biossintético. O estudo do transporte intracelular e processamento da cardosina A expressa em sistemas heterólogos será apresentado no Capítulo II.

É também interessante constatar que, enquanto as papilas epidérmicas à superfície do estigma apresentam uma predominância de vacúolos de armazenamento de proteínas sobre vacúolos do tipo vegetativo, nas papilas das chanfraduras este rácio está invertido, sendo a maior parte do volume celular ocupado por vacúolos vegetativos ou líticos. Durante o desenvolvimento floral, a cardosina A acumula-se massivamente nas papilas estigmáticas de *C. cardunculus* constituindo cerca de 50% do total do conteúdo de proteínas solúveis presentes neste órgão. O elevado conteúdo proteico das papilas estigmáticas é bem patente na forte coloração apresentada por estas células quando coradas para posterior observação ao microscópio óptico (Figura I-9). A abundância relativa de vacúolos de armazenamento de proteínas, em detrimento dos do tipo vegetativo, encontrada nas papilas à superfície do estigma, pode estar relacionada com a elevada concentração de cardosina A que se acumula especificamente naquele tipo de compartimento vacuolar das papilas externas (secção 4.4). A presença da cardosina A na epiderme papilar do estigma, conjuntamente com a identificação de um receptor putativo para esta proteína isolado a partir de extractos de pólen (Faro, *et al.*, 1999), pode ser indicativo de um papel fisiológico da cardosina A em interacções pólen-pistilo, nomeadamente em fenómenos de auto-compatibilidade no reconhecimento dos grãos de pólen.

### 4.1.2 Anatomia do desenvolvimento do estilete de *C. cardunculus*

O estilete de *C. cardunculus* é do tipo sólido. Ao contrário do estigma, esta estrutura é cilíndrica e não apresenta chanfraduras (Figura I-12A-C). O estilete é composto por uma epiderme unisseriada com uma cutícula espessa (Figura I-12B e D), delimitando várias camadas de parênquima cortical composto por células altamente vacuolizadas (Figura I-12A-C). A cutícula do estilete vai espessando ao longo do desenvolvimento da flor e é basicamente constituída por material glicosídico e de natureza lipídica (Figura I-13A e C). Por sua vez, as células da epiderme do estilete, de forma prismática, possuem vacúolos bem desenvolvidos que não parecem acumular grandes quantidades de proteínas. As células epidérmicas do estilete marcam positivamente para a presença da cardosina A (Figura I-28).

O centro do estilete é ocupado por tecido de sustentação, nomeadamente fibras de esclerênquima, feixes vasculares e pela região do tecido de transmissão (Figura I-12A-C).

As células do tecido de transmissão ocupam uma posição central no complexo estigma-estilete e em corte transversal aparecem arredondadas (Figura I-12B), enquanto em corte longitudinal apresentam um perfil alongado. As células do tecido transmissão marcam positivamente para a presença da cardosina B (Figura I-28).

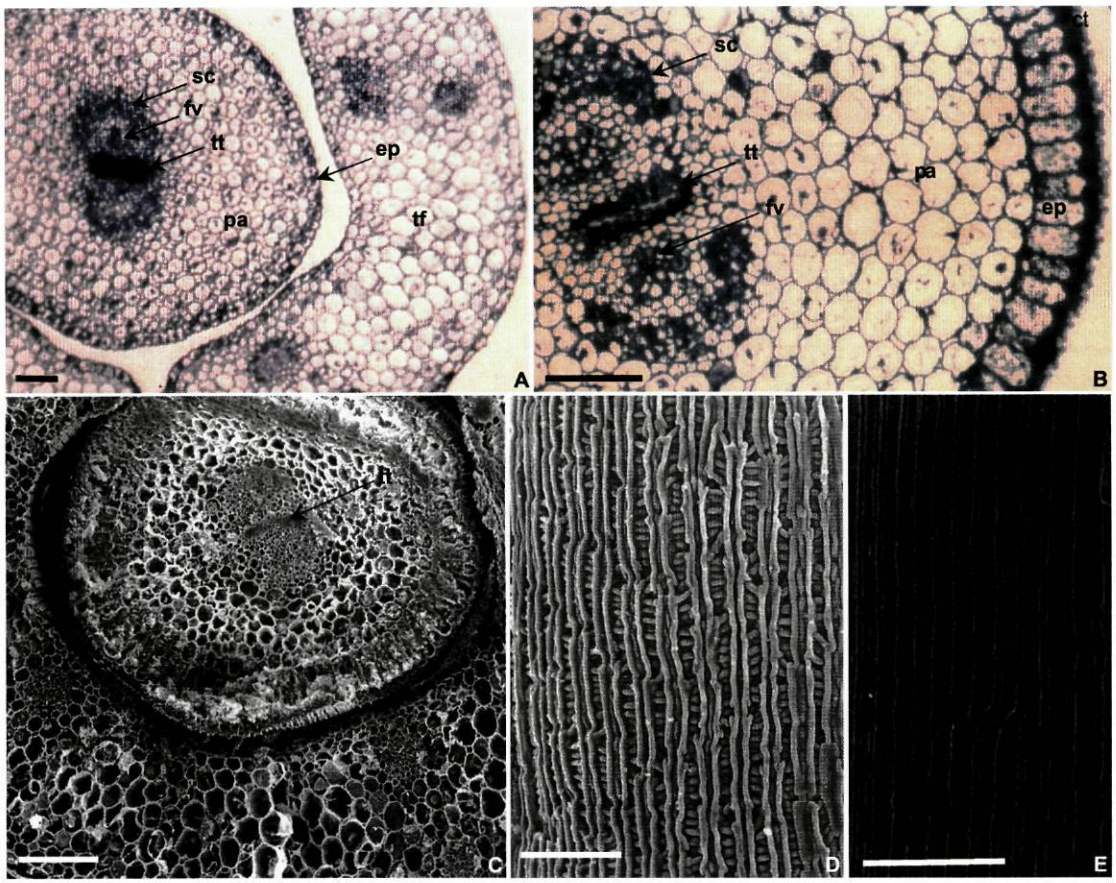



**Figura I-12 – Estrutura do estilete de *C. cardunculus* .** A) Corte transversal da região do estilete num estádio inicial de desenvolvimento floral. As células epidérmicas (ep) que rodeiam o parênquima cortical aparecem com uma forma quadrada e com uma cutícula fina. O centro do estilete é ocupado pelo tecido de transmissão (tt), flanqueado por feixes vasculares (fv) e esclerênquima (sc). O estilete é circundado pelo tubo floral (tf). Barra=100 µm. B) Estilete maduro evidenciando a sua epiderme (ep) característica composta por células alongadas recobertas por uma cutícula (ct) espessa. Barra=100 µm. C) Fotografia de microscopia electrónica de varrimento (S.E.M.) obtida com uma secção transversal de estilete rodeado pelo tubo floral (tf). Barra=100 µm. D) Detalhe da epiderme cuticularizada do estilete (S.E.M.; secção longitudinal). Barra=50 µm. E) Aspecto da superfície da epiderme interna do tubo floral (S.E.M.; secção longitudinal). Barra=100 µm.

Em estados iniciais de desenvolvimento, as células do tecido de transmissão apresentam um grande núcleo central, um citoplasma rico e inúmeros pequenos vacúolos (Figura I-14A). Tipicamente, estas células apresentam um citoplasma bem desenvolvido, típico de células metabolicamente activas, e paredes celulares frouxas imersas na matriz extracelular (Figura I-14B-D). Durante o processo de maturação da flor, as células do tecido de transmissão continuam a ser bastante ricas em RER e mitocôndrias, e os vacúolos expandem, ocupando a maior parte do volume celular (Figura I-14A-D). Ao longo do desenvolvimento floral é também possível observar que a matriz extracelular, constituída maioritariamente por polissacarídeos (Figura I-13B) e também por proteínas, aumenta consideravelmente, assumindo um aspecto cada vez mais laxo. O aspecto laxo da matriz extracelular é

característico do estado de maturação da flor apresentado durante o intervalo de tempo adequado ao alongamento do tubo polínico.

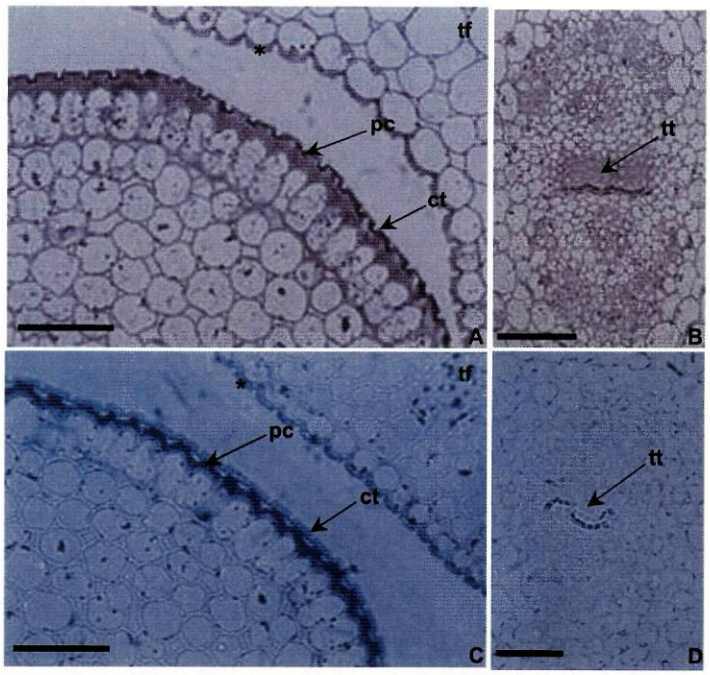



**Figura I-13 – Testes histoquímicos em estiletes de cardo.** A) Estilete maduro após técnica de coloração para detecção de polissacarídeos - *periodic acid Schiff staining* (PAS). A cutícula (ct) cora intensamente após este tratamento indicando que esta estrutura é rica em polissacarídeos. As paredes celulares (pc) exibem o típico tom rosa como resultado da reacção de Schiff devido à sua natureza maioritariamente glicosídica. A cutícula (*) da epiderme interna do tubo floral (ft) também reage com o reagente de Schiff. Barra=50 µm. B) Como anterior. A forte marcação da zona do tecido de transmissão (tt) é indicadora de uma região rica em polissacarídeos. Barra=50 µm. C) Estilete maduro após técnica de coloração para detecção de lípidos com o negro de Sudão B. A parede celular (pc) externa das células epidérmicas aparece corada após este tratamento evidenciando composição parcialmente lipídica,. Com esta técnica também na cutícula (ct) se observa o aparecimento de uma ligeira coloração, o mesmo acontecendo para a cutícula (*) da epiderme interna do tubo floral (ft). Barra=50 µm. D) Como anterior, mas não é possível observar qualquer marcação para a presença de lípidos na região do tecido de transmissão. Barra=50 µm.

Com esta expansão da matriz extracelular (Figura I-14A-D) aumenta a distância entre o lúmen das células do tecido de transmissão, no entanto, a comunicação intercelular, em cardo e tal como observado para outras espécies, é mantida via plasmodésmios, existentes entre paredes celulares finas (Figura I-14E). A presença de plasmodésmios nas paredes longitudinais das células do tecido de transmissão, sugere o seu envolvimento na transdução de sinais do ovário para o tubo polínico, para orientação e controlo de crescimento do último. Este tipo de ligações pode ainda ser importante para o transporte de nutrientes entre células do tecido de transmissão.

A presença, nas células do tecido de transmissão, de abundantes cisternas de RER e dictiossomas activos, é concordante com o facto destes compartimentos subcelulares serem os responsáveis pela síntese e secreção dos polissacarídeos e proteínas, requeridos para o aumento da matriz extracelular. É possível que estas células estejam também a segregar enzimas hidrolíticas, de forma a que estas actuem sobre o material constituinte da matriz extracelular, tornando-a mais laxa com o objectivo de facilitar a progressão do tubo polínico ao longo do estilete.

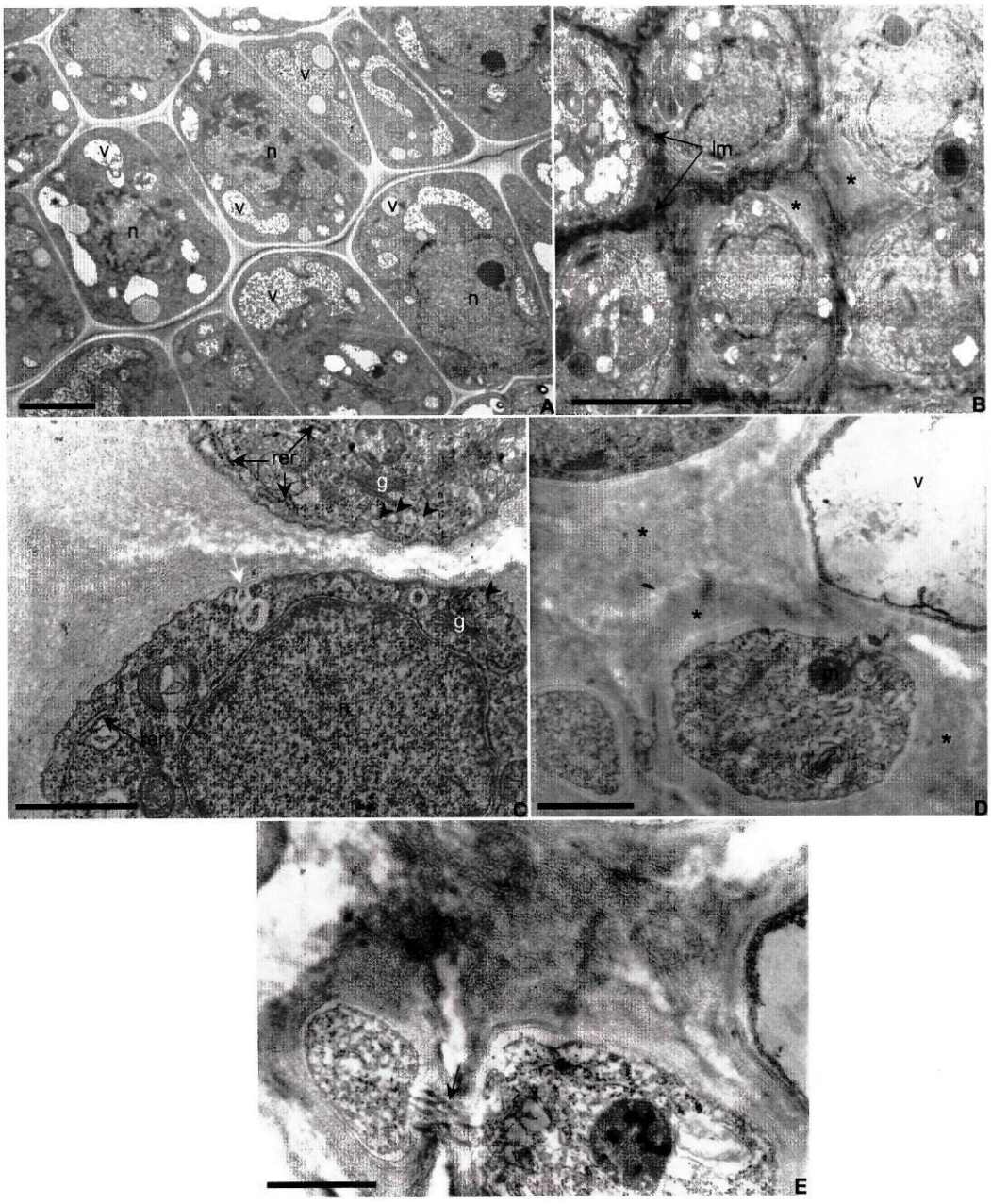



**Figura I-14 – Ultra-estrutura do tecido de transmissão do estilete representado em três diferentes estados de desenvolvimento floral.** A) Tecido de transmissão de uma flor imatura. As células apresentam um citoplasma rico, paredes celulares finas e a matriz extracelular é ainda muito incipiente. (v) vacúolo; (n) núcleo. Barra=1 µm. B) Num estado de maturação mais tardio, as paredes celulares já expandiram e adquiriram um aspecto laxo característico da presença da matriz extracelular (*); são visíveis as lamelas medianas (lm). Barra=1 µm. C) Pormenor do tecido de transmissão. As células apresentam um citoplasma rico em ribossomas, retículo endoplasmático rugoso (rer) e cisternas de Golgi (g), indicadores de elevada actividade secretora. Várias vesículas de transporte podem sem observadas (pontas de setas), possivelmente transportando material necessário à matriz extracelular, como sugerido na imagem pela fusão de uma vesícula exocítica com a membrana citoplasmática (seta branca). Barra=0,5 µm. D) Num estado de maturação mais avançado a maior parte do volume celular é ocupado por um vacúolo (v) e a matriz extracelular (*) expandiu grandemente. Barra=0,5 µm. E) Ampliação de uma região de ligação, por plasmodésmios (seta), entre duas células imersas em matriz extracelular. Barra=1 µm.

De facto foi demonstrado que a cardosina B se localiza especificamente na parede celular e matriz extracelular do tecido de transmissão, tanto do estigma como do estilete. A cardosina B foi a primeira enzima proteolítica a ser encontrada em concentrações relativamente elevadas na matriz extracelular do tecido de transmissão (Vieira, *et al.*, 2001). Outras hidrolases, como as S-RNases e quitinases, foram também localizadas nos tecidos de transmissão do estilete (Vieira, *et al.*, 2001).

Enquanto as S-RNases estão envolvidas em mecanismos de auto-incompatibilidade, as quitinases parecem estar envolvidas em fenómenos de defesa contra patogénios em Solanaceae (Vieira, *et al.*, 2001). As mesmas funções podem ser propostas para a cardosina B, uma hipótese que vai de encontro à especificidade mais abrangente desta enzima e sua elevada actividade proteolítica (Ramalho-Santos, *et al.*, 1996, Vieira, *et al.*, 2001).

Os resultados de imunolocalização da cardosina B obtidos neste trabalho, sugerem que esta enzima possa estar associada, ou ser responsável, pelo processo de afrouxamento da matriz extracelular do pistilo durante o crescimento do tubo polínico, uma hipótese avançada por outros autores (Simoes e Faro, 2004). Adicionalmente, a cardosina B pode ainda estar envolvida em fenómenos de sinalização requeridos para orientar e atrair o tubo polínico até à oosfera, hipótese apoiada pela observação da distribuição desta proteinase no ovário e óvulo da flor (secção 4.4).

### 4.1.3 Anatomia do ovário de *C. cardunculus*

Os resultados apresentados em relação aos estudos anatómicos da região do ovário de *C. cardunculus* , referem-se apenas a dois estados de desenvolvimento da flor, devido à dificuldade em obter peças bem fixadas a partir do momento em que ocorre a diferenciação de um tegumento.

desenvolvimento da flor, é já possível observar em cortes transversais de ovário, o desenvolvimento do futuro tegumento da semente (Figura I-16A). Na região central do nucelo conseguem visualizar-se vários núcleos, constituintes do saco embrionário (Figura I-16B). Os ensaios histoquímicos realizados com cortes de ovário para testar a presença das cardosinas neste órgão, revelaram que a cardosina A está ausente do ovário de cardo, enquanto a cardosina B foi detectada tanto no ovário como no óvulo (secção 4.4). A cardosina B é fortemente detectada no lado ventral da parede do ovário, no óvulo e ao longo da região micropilar bem como à volta de uma região diferenciada do nucelo correspondendo à zona onde a célula mãe do macrósporo está presente.

A descoberta que, no ovário, a cardosina B aparece em grandes quantidades na epiderme interior e no lado ventral da parede do ovário são interessantes e consistentes com a hipótese de que esta AP possa estar associada com fenómenos de atracção e orientação do tubo polínico com o objectivo da fertilização. A presença da cardosina B ao longo do tecido de transmissão do estilete, zona ventral do ovário e região micropilar do óvulo parece apoiar esta hipótese.

Num estádio mais avançado do desenvolvimento da flor, é já possível observar em cortes transversais de ovário, o desenvolvimento do futuro tegumento da semente (Figura I-16). Na

região central do nucelo conseguem visualizar-se vários núcleos, constituintes do saco embrionário (Figura I-16B).

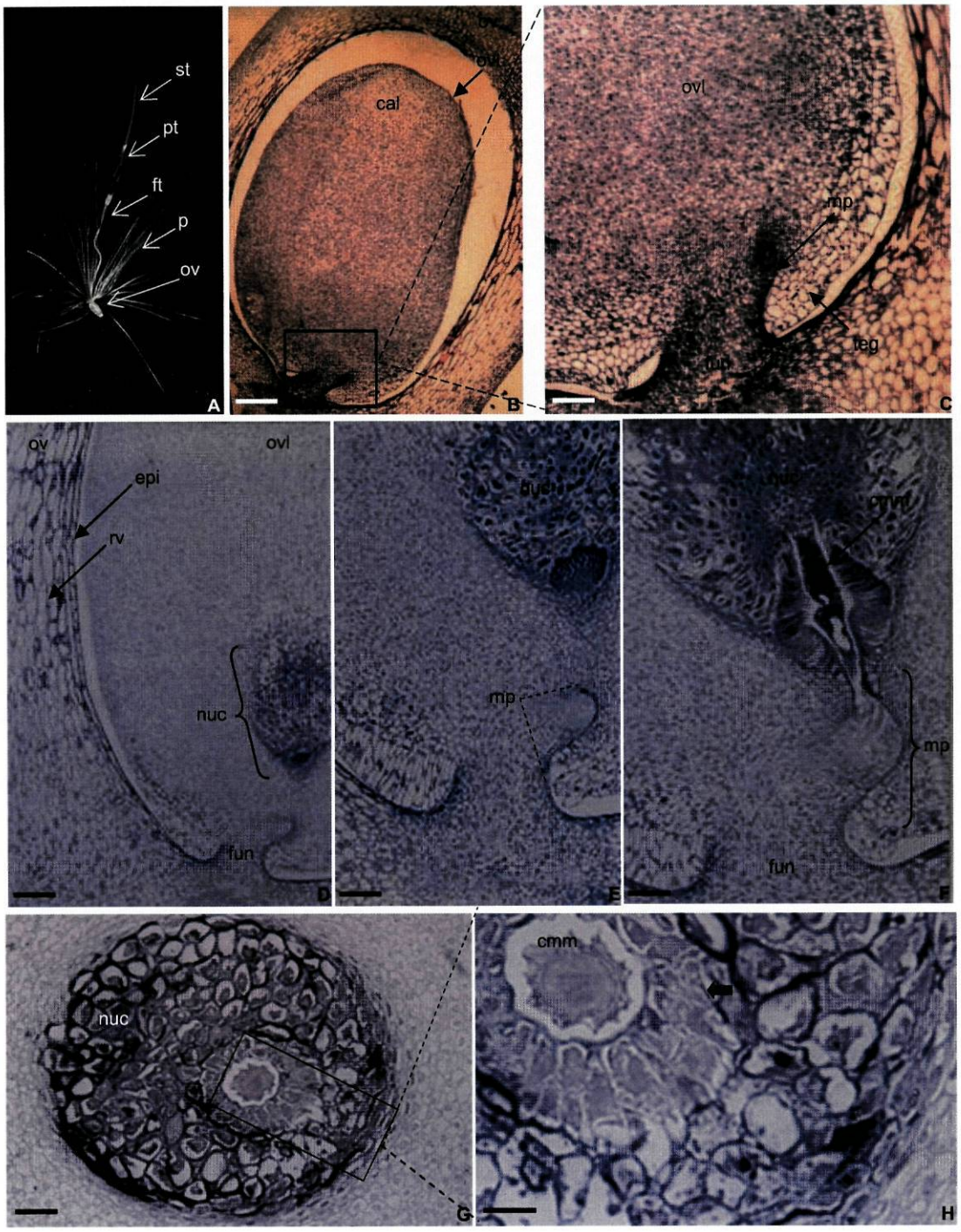



**Figura I-15 – Estrutura do ovário de *C. cardunculus* num estádio inicial de ontogénese floral.** A) Flor de cardo isolada, madura, a ilustrar a posição inferior ocupada pelo ovário (o). (st) estigma; (pt) pétala; (tf) tubo floral; (p) papilho; (o) ovário. B) Anatomia do óvulo de cardo (secção longitudinal). O ovário (ov) de cardo contém apenas um óvulo (ovl) anátropo, ou seja, completamente invertido, ligado basalmente à placenta. Barra=400 µm. C) Pormenor do funículo (fun) (secção longitudinal). Barra=50 µm. (cal) calaza; (mp) micrópilo; (teg) tegumento. D) Corte longitudinal evidenciando a epiderme interna do ovário (epi) e sua região ventral (rv), composta por células grandes e bastante vacuolizadas. O nucelo (nuc), localizado acima do micrópilo, aparece com a forma de cálice. Barra=25 µm. E) Como em D mas evidenciando a região do micrópilo (mp). Barra=50 µm. F) Corte longitudinal evidenciando a célula mãe do macrósporo (cmm), na região do nucelo. A camada de células do nucelo, dispostas radialmente, encontra-se assinalada por (*). Barra=100 µm. G) Corte transversal a nível do nucelo. Barra=50 µm. H) Ampliação da zona assinalada em G. A célula mãe do macrósporo (cmm) bem como a camada celular com disposição radial (seta) encontram-se assinaladas. Barra=25 µm.

Os ensaios histoquímicos realizados com cortes de ovário para testar a presença das cardosinas neste órgão, revelaram que a cardosina A está ausente do ovário de cardo, enquanto a cardosina B foi detectada tanto no ovário como no óvulo (secção 4.4). A cardosina B é fortemente detectada no lado ventral da parede do ovário, no óvulo e ao longo da região micropilar bem como à volta de uma região diferenciada do nucelo correspondendo à zona onde a célula mãe do macrósporo está presente.

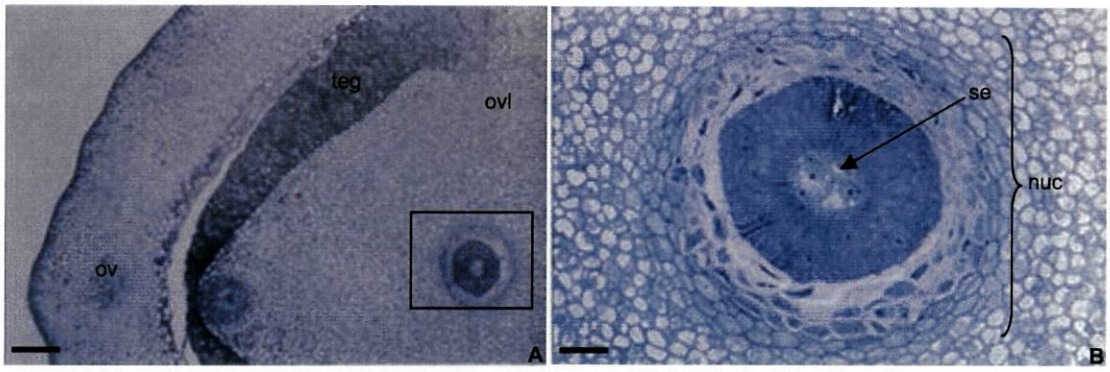



**Figura I-16 – Estrutura do ovário de *C. cardunculus* num estádio tardio de ontogénese floral.** A) Corte transversal de ovário (ov) e óvulo (ovl) ao nível do nucelo (zona delimitada). Neste estado de desenvolvimento, o futuro tegumento da semente (teg) já começou a diferenciar-se. Barra=100 µm. B) Ampliação da zona assinalada em A. Neste estádio de ontogénese floral a célula-mãe do macrósporo parece já ter-se diferenciado dando origem ao saco embrionário (se). Barra=200 µm.

## 4.2 Estudo da expressão da cardosina A no pistilo de *Cynara cardunculus* L. durante a ontogénese floral

Para a caracterização da expressão da cardosina A no pistilo de *C. cardunculus* realizaram-se extracções de RNA total sobre amostras provenientes dos diferentes estados de desenvolvimento apresentados na Figura I-8 e a detecção do mRNA da cardosina A foi realizada recorrendo a duas técnicas vulgarmente usadas para o efeito: *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) e *Northern blotting*.

### 4.2.1 Análise por RT-PCR

A técnica de RT-PCR é composta por duas fases e baseia-se na utilização da transcriptase reversa, uma enzima que sintetiza cadeias de cDNA (DNA complementar) a partir de cadeias molde de RNA. À fase de reacção de transcrição reversa segue-se uma de amplificação por *PCR* das moléculas de cDNA sintetizadas na primeira. A técnica de RT-PCR permite a detecção indirecta de um RNA específico presente numa amostra mesmo que este seja pouco abundante (Frohman, *et al.*, 1988).

Neste trabalho, a expressão do mRNA da cardosina A em cardo foi testada com amostras de ápices florais (Figura I-8A-B), flores diferenciadas de inflorescências fechadas ou imaturas (Figura I-8C-F) e flores diferenciadas provenientes de inflorescências abertas ou maduras (Figura I-8G-H).

O sucesso e a especificidade da técnica de RT-PCR dependem, entre outros, da escolha cuidadosa dos pares de *primers* específicos para o RNA a detectar. Na detecção do mRNA da cardosina A por RT-PCR foram utilizados primers específicos para esta cardosina (Faro, *et al.*, 1999) de forma a reduzir a amplificação de produtos inespecíficos na reacção de PCR. Os primers para a cardosina A emparelham na região com menor homologia entre os cDNAs das cardosinas mais abundantes nos pistilos de cardo, a cardosina A e a cardosina B.

Na Figura I-17 encontram-se apresentados os resultados obtidos nas experiências de RT-PCR. A presença do mRNA da cardosina A traduziu-se pelo surgimento de uma banda de cDNA com aproximadamente 430 bp, correspondente à amplificação de um fragmento entre os *primers* F626 e R1022, específicos para a cadeia de RNA em estudo e previamente publicados por Faro *et al.* (Faro, *et al.*, 1999).

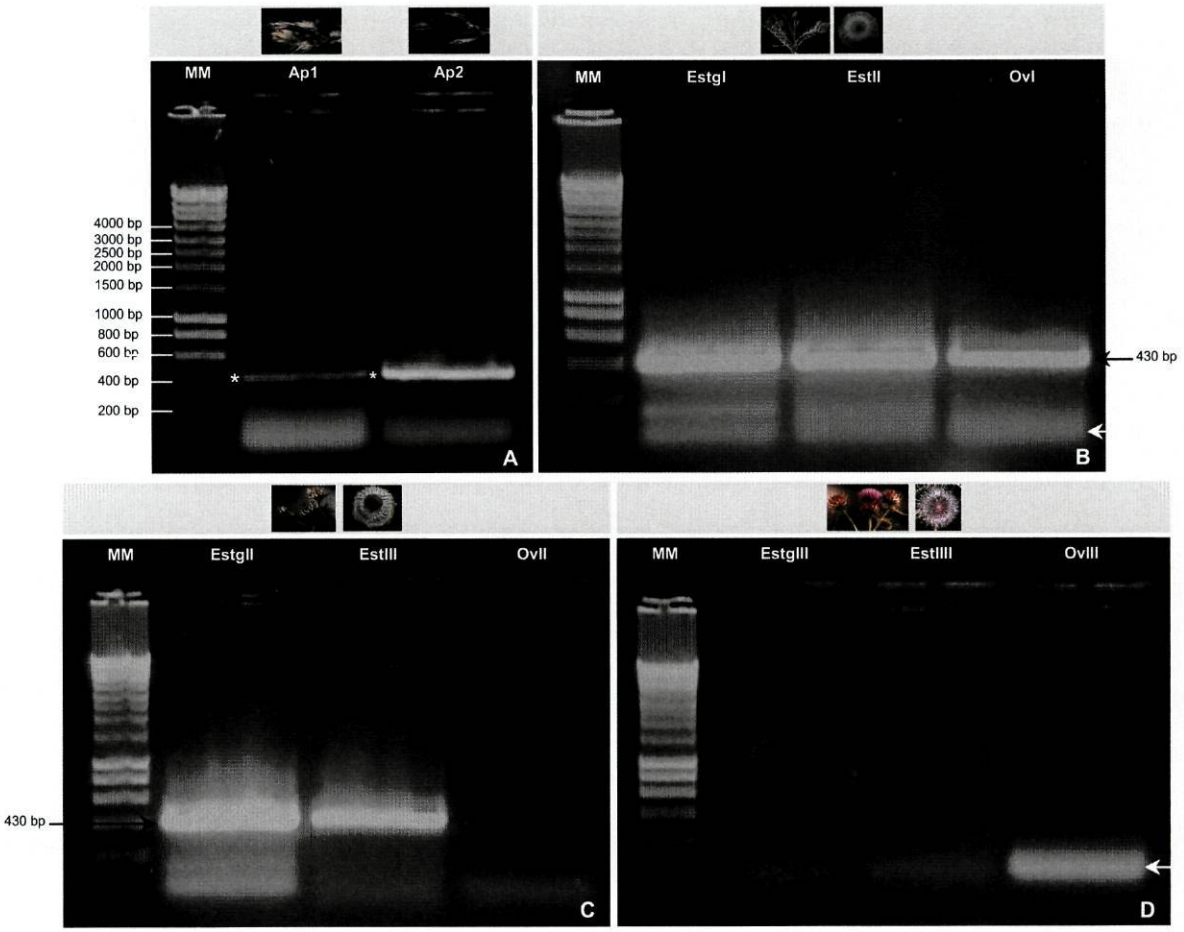



**Figura I-17 – Electroforeses dos produtos das reacções de RT-PCR para detecção do mRNA da cardosina A.** Geles de agarose a 1% (m/v) corados com brometo de etídeo. As imagens acima de cada gel ilustram o correspondente estado de desenvolvimento a partir do qual cada uma das amostras foi obtida. A) RT-PCR sobre amostras de ápices florais em duas distintas fases de desenvolvimento. (Ap1) ápice floral inicial; (Ap2) ápice floral tardio. B) RT-PCR sobre amostras de estigma (EstgI), estilete (EstII) e ovário (OvI) de inflorescência fechada em que as flores não evidenciavam diferenciação cromática. C) RT-PCR sobre amostras de estigma (EstgII), estilete (EstIII) e ovário (OvII) de inflorescência fechada composta por flores em que a diferenciação cromática já era visível. D) RT-PCR sobre amostras de estigma (EstgIII), estilete (EstIIII) e ovário (OvIII) de inflorescência aberta com flores maduras. A banda correspondente ao cDNA da cardosina A com cerca de 430 bp, está assinalada em A) por um asterisco, e em C) e D) por uma seta. As setas a branco (à direita) assinalam primers não incorporados nas cadeias amplificadas. (MM) marcador de pesos moleculares "HyperLadder I" (Bioline).

A análise por RT-PCR revelou a presença de um amplificado específico para o mRNA da cardosina A com cerca de 430 bp que foi detectado em amostras correspondentes a estádios iniciais de ontogénese floral, nomeadamente nos ápices florais e em inflorescências fechadas, antes e depois da diferenciação cromática das flores (Figura I-17A-C). É de realçar, que no estado mais avançado de diferenciação floral não foi possível detectar o cDNA específico para a cardosina A indicando que a presença do mRNA desta PA se restringe a estádios imaturos do desenvolvimento floral (Figura I-17D). Adicionalmente, e apesar deste ensaio ser meramente qualitativo, foi ainda possível relacionar a expressão do mRNA da cardosina A, não só com o estado de desenvolvimento do pistilo mas também com a diferenciação dos seus órgãos constituintes. A análise destes resultados tornou claro que o mRNA da cardosina A ocorre especificamente em flores jovens, e nestas, maioritariamente nos seus estigmas e estiletes.

Para obter a confirmação de que os amplificados resultantes das reacções de RT-PCR correspondiam realmente ao cDNA específico para a cardosina A procedeu-se à clonagem de todos os fragmentos obtidos nesta experimentação em pBlueScript® II (Stratagene), ao que se seguiu a sua sequenciação automática. As sequências obtidas foram submetidas a busca de homologias no *BLAST*, tendo sido registado para todas as ocorrências, o maior *score* no alinhamento com a sequência publicada do mRNA da cardosina A (GenBank, número de acesso AJ132884).

A técnica de RT-PCR baseia-se no aumento exponencial do número de cadeias de cDNA formadas a partir de um molde de RNA durante a reacção de transcrição reversa, não sendo a adequada se o objectivo é avaliar a abundância relativa de um determinado RNA numa amostra específica. Por esta razão, para se estimar a abundância relativa do mRNA da cardosina A nas amostras de pistilos de cardo recorreu-se à utilização da técnica de *Northern blotting*.

### 4.2.2 Análise por *Northern blotting*

Em comparação com a técnica de RT-PCR, a abordagem por *Northern blotting* é menos eficaz na detecção de RNAs pouco abundantes, uma vez que não recorre a uma estratégia de amplificação de sinal. Um *Northern blotting* revela a abundância relativa de um RNA específico numa amostra, num determinado ponto no tempo, permitindo a comparação entre populações de RNA de amostras distintas.

Na detecção do mRNA da cardosina A por *Northern blotting* foi utilizada uma sonda específica de DNA com cerca de 400 bp gerada por PCR sobre cDNA desta cardosina. Os cDNAs da cardosina A e da cardosina B, clonados em pCR®2.1 (Invitrogen), foram gentilmente cedidos pela equipa do Professor Carlos Faro, do Centro de Neurociências de Coimbra. O fragmento utilizado como sonda correspondia à mesma região amplificada nas

experiências de RT-PCR para detecção do mRNA específico da cardosina A e foi seleccionado por constituir a porção menos homóloga entre os cDNAs das cardosinas A e B.

Nas reacções de PCR para obtenção da sonda utilizaram-se os *primers* F626 e R1022 (Faro, *et al.*, 1999). Depois da amplificação seguiram-se a purificação e subsequente marcação radioactiva da sonda com $^{32}$P-dCTP. Na Figura I-18 encontram-se apresentados os resultados obtidos na análise por *Northern blotting*.

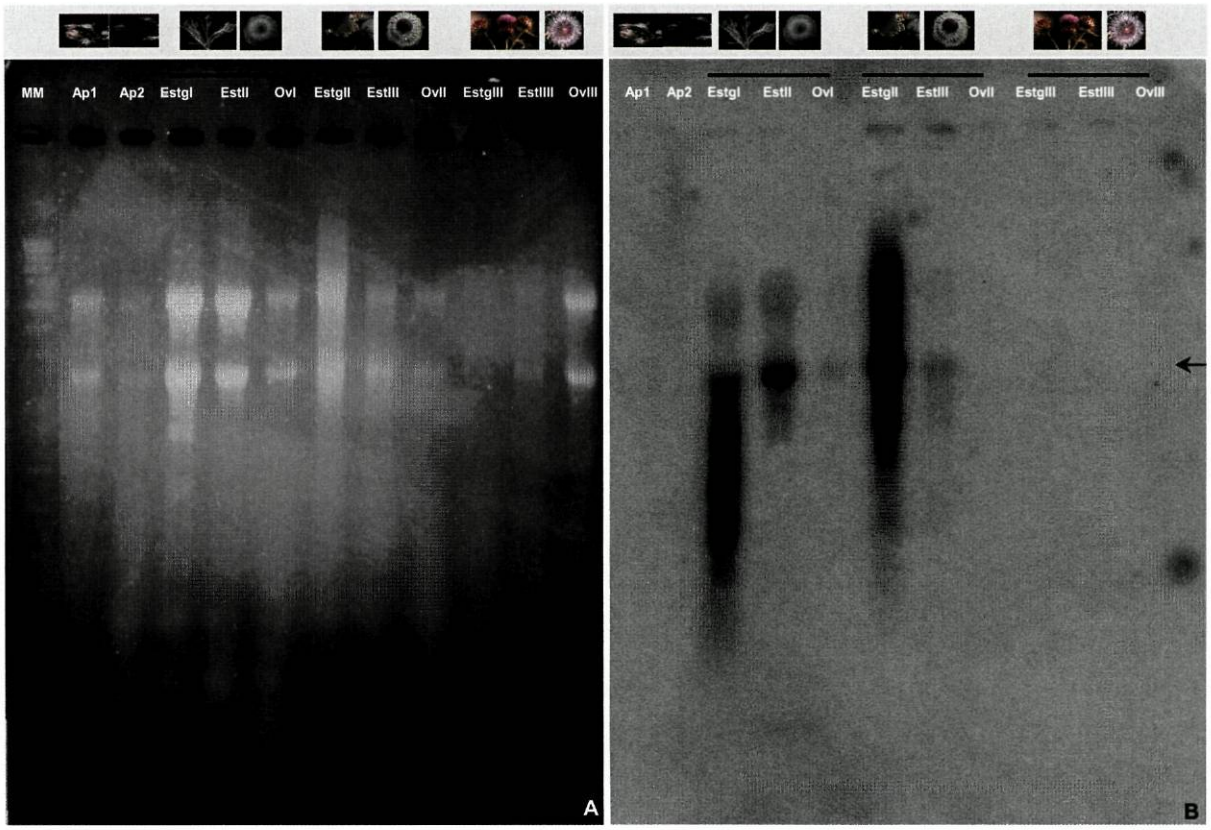



**Figura I-18 – Análise da expressão do mRNA da cardosina A por *Northern blotting*.** Os distintos estados de desenvolvimento floral testados nesta experimentação estão ilustrados nas imagens na parte superior da figura. A detecção do mRNA da cardosina A foi ensaiada para os mesmos estados de ontogenia da flor por RT-PCR e por *Northern blotting*. A) Electroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) e em condições desnaturantes, das amostras de RNA total (15 µg/poço) testadas por *Northern blotting*. B) Autoradiografia representativa da detecção do mRNA da cardosina A em pistilos de cardo utilizando uma sonda específica de DNA marcada com 32P-dCTP. A seta à direita assinala o fragmento correspondente ao mRNA da cardosina A com cerca de 1,5 kb. (MM) marcador de pesos moleculares "HyperLadder I" (Bioline).

A presença do mRNA da cardosina A nas diferentes amostras de pistilo de cardo foi revelada pelo surgimento da marcação radioactiva de moléculas com um peso molecular aproximado de 1500 bp, o tamanho esperado para o mRNA da cardosina A.

Os resultados obtidos por *Northern blotting* revelaram que nas amostras correspondentes aos dois estádios mais precoces do desenvolvimento floral, nomeadamente nos ápices, o mRNA da cardosina A está ausente (Figura I-18B, Ap1 e Ap2). Este resultado é discordante do obtido por RT-PCR onde nos mesmos estados de ontogénese foi possível detectar o mRNA da cardosina A. Este facto pode ser explicado pela maior sensibilidade da última técnica na detecção de mRNAs pouco abundantes. Mesmo que o mRNA da cardosina A esteja presente nos ápices florais em quantidades não detectáveis por uma abordagem

menos sensível como o *Northern blotting*, no RT-PCR, o aumento exponencial do número de cadeias de cDNA viabiliza a sua detecção. Adicionalmente, apesar de teoricamente ter sido aplicada a mesma quantidade de RNA total em cada poço (15 µg) foi possível observar alguma variabilidade no que respeita à quantidade de RNA presente nas diferentes pistas, o que também pode ter contribuído para diferenças nos resultados.

A marcação mais forte para a presença do mRNA da cardosina A foi observada em amostras de inflorescência fechada. De entre estas, a amostra de estigma proveniente de inflorescência fechada com coloração nas pétalas foi aquela que apresentou a marcação mais intensa (Figura I-18B, EstgII). Estes resultados corroboraram o observado na análise por RT-PCR, em que a banda com fluorescência mais forte surgiu na amostra de estigma no mesmo estado de desenvolvimento (Figura I-17C, EstgII). Adicionalmente e de uma forma concordante com o observado por RT-PCR, a análise por *Northern blotting* revelou que o mRNA da cardosina A está ausente das amostras de inflorescência aberta (Figura I-17D e Figura I-18B, estado III).

Conjuntamente, os resultados obtidos com estas duas técnicas de detecção de RNA permitiram-nos inferir que a expressão do mRNA da cardosina A ocorre em pistilos jovens diferenciados. Nestes, a presença do mRNA da cardosina A está relacionada, qualitativa e quantitativamente, com o tipo específico de órgão, sendo muito mais abundante nos estigmas do que nos estiletes, e estando ausente do ovário. Em inflorescências maduras, o mRNA da cardosina A não foi detectado em qualquer estrutura do pistilo.

Sumariando, a análise por RT-PCR revelou que a transcrição do gene da cardosina A ocorre em estados imaturos da ontogenia da flor sugerindo uma necessidade da presença desta proteinase aspártica nestas fases de desenvolvimento.

Porque a simples presença do produto de transcrição do gene da cardosina A não é suficiente para admitirmos que o produto da sua tradução também está presente, procedeu-se à imunodetecção e imunolocalização da cardosina A em todas as amostras testadas por RT-PCR e *Northern blotting*.

## 4.3 Imunodetecção da cardosina A no pistilo de *Cynara cardunculus* L. ao longo do desenvolvimento floral

Com o objectivo de verificar se a cardosina A está presente nos pistilos de cardo nos mesmos estados de desenvolvimento testados para a presença do seu mRNA, fizeram-se extracções de proteínas com as mesmas amostras representadas na secção 4.2, ao que se seguiram SDS-PAGE e imunodetecção da cardosina A.

### 4.3.1 *Silver Staining*

Depois de separadas por SDS-PAGE, as proteínas foram sujeitas a coloração com nitrato de prata (*Silver Staining*) para comparação das diversas amostras a nível de composição proteica (Figura I-19). De salientar o aparecimento das bandas assinaladas por asteriscos, que ocorrem especificamente nos estigmas e estiletes das flores de cardo. As bandas assinaladas na Figura I-19 possuem um peso molecular aproximado ao da cadeia pesada da cardosina A (cerca de 31 kDa). Uma vez que as cardosinas são as proteínas solúveis mais abundantes das flores de cardo (Ramalho-Santos, *et al.*, 1997), é provável que estas bandas correspondam à cadeia pesada da cardosina A, hipótese que será testada nos ensaios de imunodetecção.

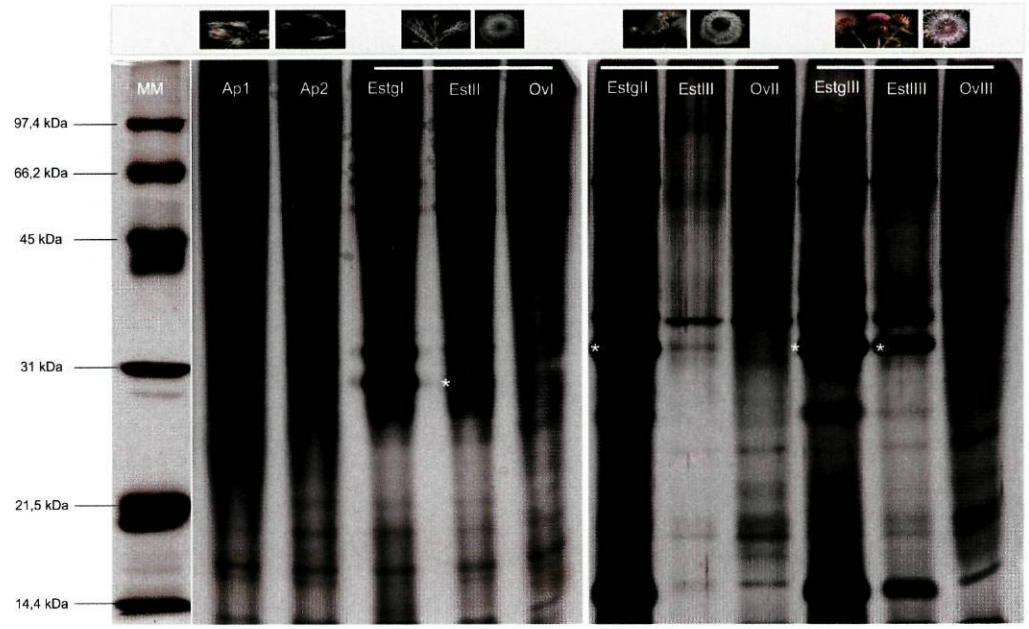



**Figura I-19 – Electroforeses de extractos proteicos de flores de cardo em geles SDS-PAGE 12,5% corados com nitrato de prata.** Em cada poço aplicaram-se 10 µg de proteínas quantificadas segundo o método de Bradford. As imagens acima de cada gel ilustram o correspondente estado de desenvolvimento a partir do qual cada uma das amostras, ou conjunto de amostras, foi obtido. De realçar que na pista com extracto de estilete de inflorescência fechada com diferenciação cromática (EstIII), a quantidade de proteína presente é menor do que nas restantes amostras. As bandas assinaladas por asteriscos e presentes em amostras de estigmas e estiletes de flores diferenciadas possivelmente correspondem à cadeia pesada da cardosina A. (Ap1) ápice floral mais precoce; (Ap2) ápice floral mais desenvolvido; (Estg) estigma; (Estl) estilete; (Ov) ovário; (MM) marcador de pesos moleculares "Low Range" (Biorad).

### 4.3.2 Análise por *Western blotting* – Electrotransferência e imunodetecção

Na imunodetecção da cardosina A por *Western blotting* utilizaram-se dois anticorpos específicos contra esta proteína. O primeiro foi produzido contra a cadeia de 31 kDa desta proteinase aspártica (anti-A) (Veríssimo, *et al.*, 1996) e o segundo contra a pro-cardosina A recombinante (anti-rec A) (Faro, *et al.*, 1999). Ambos foram gentilmente cedidos pela equipa do Professor Carlos Faro do Centro de Neurociências de Coimbra. Teoricamente, o anti-rec A teria a capacidade de reconhecer a cardosina A independentemente do seu estado de maturação, no entanto este anticorpo revelou uma maior afinidade para a cadeia pesada

desta PA tal como já tinha sido documentado (Faro, *et al.*, 1999). Na Figura I-20 encontram-se apresentados os resultados obtidos na imunodetecção da cardosina A por *Western blotting*.

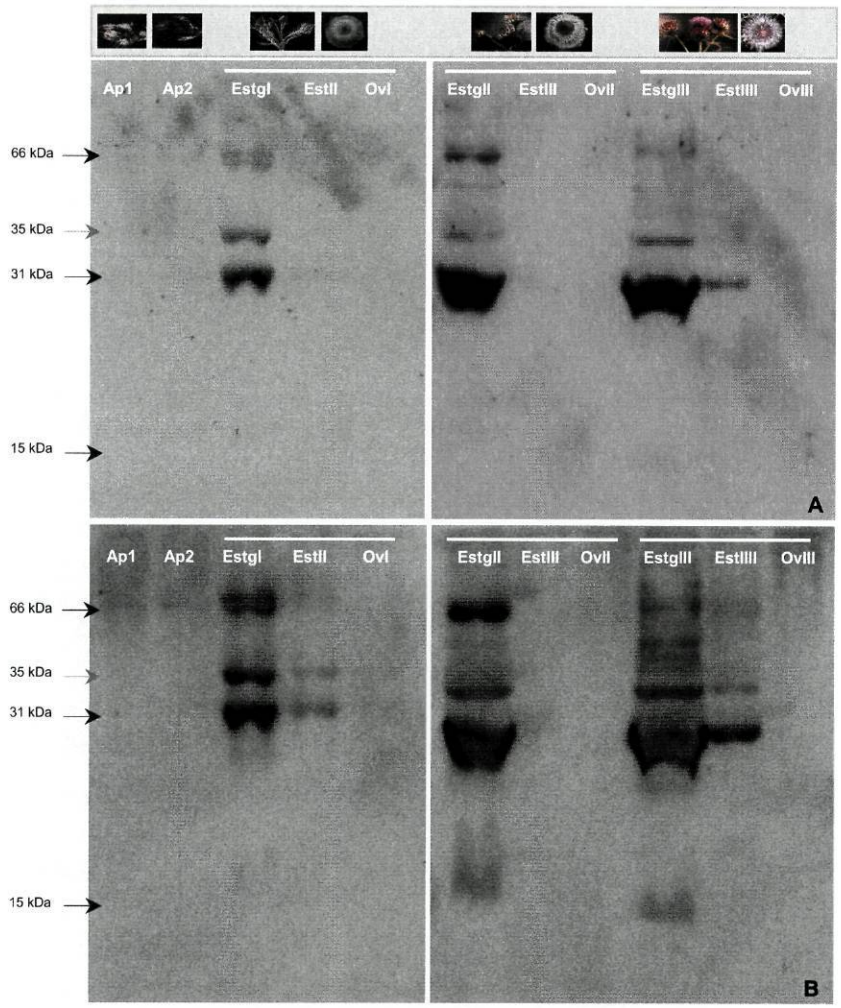



**Figura I-20 – Imunodetecção da cardosina A em extractos de pistilos de cardo por *Western blotting*.** As imagens acima de cada gel ilustram o correspondente estado de desenvolvimento a partir do qual cada uma das amostras foi obtida. Em cada pista foram aplicados volumes correspondentes a 20 µg de proteínas solúveis, quantificadas segundo o método de Bradford. A) Membranas incubadas com o anticorpo primário anti-A numa diluição de 1:200. B) Membranas incubadas com o anticorpo primário anti-rec A numa diluição de 1:500. As setas a negro assinalam as diversas bandas correspondentes às distintas formas de processamento da cardosina A. As setas a cinzento assinalam uma banda de 35 kDa discutida no texto. (Ap1) ápice floral mais inicial; (Ap2) ápice floral mais desenvolvido; (Estg) estigma; (Estl) estilete; (Ov) ovário; (MM) marcador de pesos moleculares "Low Range" (Biorad)

A imunodetecção da cardosina A por esta técnica revelou a presença desta PA em diversas amostras analisadas. Os polipéptidos cujos pesos moleculares se encontram assinalados na Figura I-20 (setas a negro) correspondem à forma precursora da cardosina A (pre-pro-cardosina A; 66 kDa), à sua cadeia pesada (31 kDa) e à cadeia leve (15 kDa) da proteína. As últimas constituem a cardosina A madura.

Na mesma figura podemos ainda observar uma banda com cerca de 35 kDa (setas cinzentas) que provavelmente corresponde à forma intermédia de processamento da cardosina A, prevista por Ramalho-Santos e colaboradores, resultante da clivagem da pro-cardosina A a nível da região *N*-terminal do PSI (Ramalho-Santos, *et al.*, 1998). O

processamento proteolítico da cardosina A será abordado e discutido mais aprofundadamente no Capítulo II.

A hipótese da banda de 35 kDa estar relacionada com a cardosina A é suportada pelo facto deste polipéptido ser reconhecido por ambos os anticorpos primários usados na imunodetecção desta PA, bem como a marcação mais forte para esta banda surgir nos extractos onde o sinal para a presença da cardosina A madura é também mais intenso. A marcação constantemente mais forte observada para a banda de 31 kDa poderia ser justificada por uma baixa estabilidade do intermediário de processamento que por essa razão seria rapidamente convertido na forma madura.

A análise da sequência da cardosina A revela a presença de um *signal peptide* (SP) que direcciona a proteína para o retículo endoplasmático rugoso (RER), onde é sintetizada pelos ribossomas à sua superfície ao mesmo tempo que é translocada para o lúmen deste compartimento subcelular. Depois de atingir o RER, a cardosina A seguirá ou uma via directa, ou a via secretora tradicional até ao seu destino subcelular final: o vacúolo. Ramalho-Santos *et al.* (Ramalho-Santos, *et al.*, 1997) mostraram que a cardosina A se localiza nos vacúolos das papilas estigmáticas, onde se acumula e é bastante estável.

Para muitas proteínas vacuolares é vulgar haver alguma divergência no seu trajecto de transporte, geralmente ao nível do Golgi, resultando no desvio de um determinado polipéptido para a parede celular. A cardosina A parece não ser excepção. Experiências de imunocitoquímica realizadas no nosso laboratório localizam a parte massiva da cardosina A nos vacúolos dos estigmas observando-se também alguma marcação, ainda que em muito menor proporção, na superfície das papilas estigmáticas, sugerindo secreção parcial da proteína. É também plausível considerar que a banda de 35 kDa, sempre menos intensa que a de 31 kDa, possa resultar de um processo de maturação alternativo, sofrido somente por moléculas de cardosina A secretadas, possivelmente por acção de proteinases do apoplasto. As experiências para o estudo do transporte e processamento da cardosina A expressa em sistemas heterólogos (consultar Capítulo II desta tese) contribuirão para o esclarecimento destas questões.

Os *Western blottings* realizados com o anticorpo contra a pro-cardosina A recombinante revelaram o aparecimento de bandas adicionais em relação às detectadas com o anti-A, que provavelmente provêm do reconhecimento não específico pelo anti-rec A de antigénios não relacionados com a cardosina A. Na Figura I-20B EstIII, as bandas de alto peso molecular reconhecidas pelo anti-rec A possivelmente correspondem ao precursor da cardosina B.

Os resultados obtidos pela análise por *Western blotting* evidenciaram a ausência da cardosina A em ápices florais de cardo e a sua presença em estigmas e estiletes da planta ao longo do desenvolvimento da flor. Nas amostras de inflorescência fechada sem coloração nas pétalas (Figura I-20A-B, Estado I), a cardosina A foi detectada maioritariamente no

estigma, mas também no estilete e ainda no ovário, ainda que neste último com uma marcação mais ténue e apenas com o anti-rec A. Os resultados observados em ovário poderiam ser justificados por uma maior sensibilidade do anti-rec A na imunodetecção da cardosina A em relação ao anti-A. Nas amostras de inflorescência fechada com diferenciação cromática (Figura I-20A-B, Estado II), a cardosina A foi maioritariamente detectada no estigma e em menor proporção, no estilete. Neste estado de desenvolvimento a cardosina A está ausente do ovário de cardo. O sinal fraco para a presença da cardosina A detectado na amostra de estilete deveu-se a uma notória deficiência na quantificação das proteínas presentes neste extracto, como é claramente ilustrado na Figura I-19 EstIII. Nas amostras de inflorescência aberta (Figura I-20A-B, estado III) detectou-se a presença de cardosina A no estigma e estilete e, mais uma vez, não no ovário.

Em conjunto, os resultados obtidos na imunodetecção da cardosina A mostraram que esta PA está ausente dos ápices florais de cardo e que passa a acumular-se nos pistilos das flores, desde a fase de inflorescência fechada mais precoce até à fase de inflorescência madura. A cardosina A ocorre apenas em flores diferenciadas e em níveis mais elevados nas inflorescências maduras.

Na Tabela I-7 encontram-se sumariados os resultados obtidos na detecção do mRNA da cardosina A bem como do produto da sua tradução.

**Tabela I-7 – Sumário dos resultados obtidos na detecção do mRNA da cardosina A e imunodetecção desta proteína.**

| Estádio de ontogenia floral | Flores indiferenciadas | | Inflorescência fechada sem diferenciação cromática | | | Inflorescência fechada com diferenciação cromática | | | Inflorescência aberta | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Estrutura | Ápice floral | Ápice floral | Estigma | Estilete | Ovário | Estigma | Estilete | Ovário | Estigma | Estilete | Ovário |
| RT-PCR | + | + | + | + | + | ++ | + | - | - | - | - |
| Northern blotting | - | - | + | + | +/- | ++ | +/- | - | - | - | - |
| Western blotting | - | - | ++ | + | +/- | +++ | +/- | - | ++++ | + | - |

Os resultados obtidos com ápices florais (Tabela I-7; fundo verde) indicam uma presença pouco abundante do mRNA da cardosina A nestas estruturas, apenas detectável por RT-PCR. Neste estado de desenvolvimento, o mRNA da cardosina A é possivelmente sujeito a um controlo pós-transcrição o que resulta num impedimento da síntese da proteína, confirmada pela ausência da sua detecção por *Western blotting*. A ausência da cardosina A

nestas estruturas sugere que neste estado de desenvolvimento a sua presença não seja fisiologicamente relevante.

Em todas as amostras de inflorescências fechadas sem coloração nas pétalas (Tabela I-7; fundo amarelo pálido) detectou-se a presença, tanto do mRNA da cardosina A (RT-PCR e *Northern blotting*) como da proteína (*Western blotting*). Neste estado de desenvolvimento já era visível a expressão diferencial da cardosina A no pistilo de cardo, ilustrada pelos sinais mais intensos para a presença do seu RNA (*Northern blotting*) e proteína observados em estigma e estilete.

Foi ainda possível observar a presença do mRNA da cardosina A e esta PA em amostras de inflorescências fechadas com diferenciação cromática (Tabela I-7; fundo laranja pálido), mas somente no estigma e estilete, estando ausentes do ovário.

Nas amostras de inflorescências abertas (Tabela I-7; fundo vermelho pálido) detectou-se a presença da cardosina A no estigma e estilete e, uma vez mais, não no ovário. De realçar que em nenhuma das amostras de inflorescências maduras foi detectada a presença de mRNA da cardosina A, o que sugere a existência de um espaçamento temporal entre o pico de expressão do mRNA e o pico de concentração do seu produto de tradução. Deste conjunto de resultados é ainda de salientar que a presença do mRNA da cardosina A bem como da proteína é condicionada pelo tipo de estrutura floral em questão, sendo claro que esta proteinase aspártica ocorre especificamente nos estigmas e estiletes de flores diferenciadas. No que respeita à transcrição do mRNA da cardosina A, esta pode ser dependente da presença e acção de factores activadores de transcrição expressos especificamente nos estigmas e estiletes e cuja expressão/localização se torna mais definida à medida que a diferenciação do pistilo avança. É também importante realçar que nos três estados de desenvolvimento do pistilo em que foi possível detectar a cardosina A, esta aparece tanto na forma imatura (66 kDa) como na forma madura (31+15 kDa). O surgimento das duas formas de maturação da cardosina A no pistilo de cardo sugere que, ou a proteína está constantemente a ser sintetizada ou então o seu processo de transporte e consequente maturação ocorrem de uma forma extremamente lenta. A primeira explicação não parece ser a correcta visto haver um espaçamento temporal claro entre o pico de transcrição do mRNA da cardosina e a concentração máxima da PA no pistilo. É portanto plausível admitir que a estabilidade das formas imatura e madura da cardosina A é bastante elevada, o que justificaria a marcação intensa para a sua presença mesmo em inflorescências maduras em que o mRNA para a cardosina A está ausente. Além disto, a marcação para a forma imatura da cardosina A no estado de inflorescência madura é mais fraca, observação que é concordante com a ideia de uma taxa de transporte/conversão baixa.

A presença mais forte da cardosina A madura em estigmas e estiletes de inflorescências abertas de cardo sugere o possível envolvimento da cardosina A na senescência das flores, nomeadamente contribuindo para a libertação das sementes, hipótese previamente considerada por outros autores (Faro, *et al.*, 1998). Estes resultados serão complementados por outros provenientes de experiências de imunolocalização da cardosina A.

## 4.4 Imunolocalização da cardosina A no pistilo de *Cynara cardunculus* L. durante a ontogénese floral

Para determinar a localização específica da cardosina A nos diferentes órgãos do pistilo procedeu-se à imunolocalização desta PA ao longo de diferentes fases do desenvolvimento da flor recorrendo a técnicas de imunohistoquímica e imunocitoquímica. As técnicas de imunolocalização são particularmente importantes se associadas a estudos moleculares e bioquímicos, pois ilustram a acumulação de determinadas proteínas durante a diferenciação celular e tecidular, o que por sua vez pode contribuir para revelar o papel fisiológico específico desempenhado por certos polipéptidos.

Na imunolocalização da cardosina A em pistilos de cardo utilizaram-se os mesmos anticorpos primários usados na imunodetecção desta proteína por *Western blotting* – anti-A e anti-rec A (Faro, *et al.*, 1999, Veríssimo, *et al.*, 1996). Para complementar o estudo da distribuição das cardosinas nos pistilos de cardo, foi ainda ensaiada a presença da cardosina B nos órgãos florais femininos recorrendo ao uso de um anticorpo primário produzido contra um péptido sintético específico para esta cardosina e descrito em Vieira *et al.* (Vieira, *et al.*, 2001). Todos os anticorpos usados nesta fase do trabalho foram gentilmente cedidos pela equipa do Professor Carlos Faro, do Centro de Neurociências de Coimbra.

### 4.4.1 Imunohistoquímica e imunofluorescência

Como já foi referido, Ramalho-Santos *et al.* (Ramalho-Santos, *et al.*, 1997) mostraram que a cardosina A se localiza maioritariamente nas papilas epidérmicas dos estigmas maduros de cardo, acumulando-se nos vacúolos destas células. Por sua vez, Vieira *et al.* (Vieira, *et al.*, 2001) demonstraram que a cardosina B se encontra sobretudo no tecido de transmissão do estilete, localizando-se extracelularmente, na parece celular e matriz extracelular deste tecido. Neste trabalho, investigou-se a distribuição da cardosina A nos órgãos constituintes do pistilo, durante o desenvolvimento da flor de cardo, recorrendo a técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência.

Os resultados obtidos com cortes de ápices em que os primórdios florais ainda não eram observáveis, revelaram que nesta fase de desenvolvimento a cardosina A está ausente destas estruturas, tal como ilustrado na Figura I-21.

Este resultado coincide com o observado na imunodetecção desta proteína por *Western blotting*, nos mesmos estádios de ontogenia (Figura I-20, Ap1).

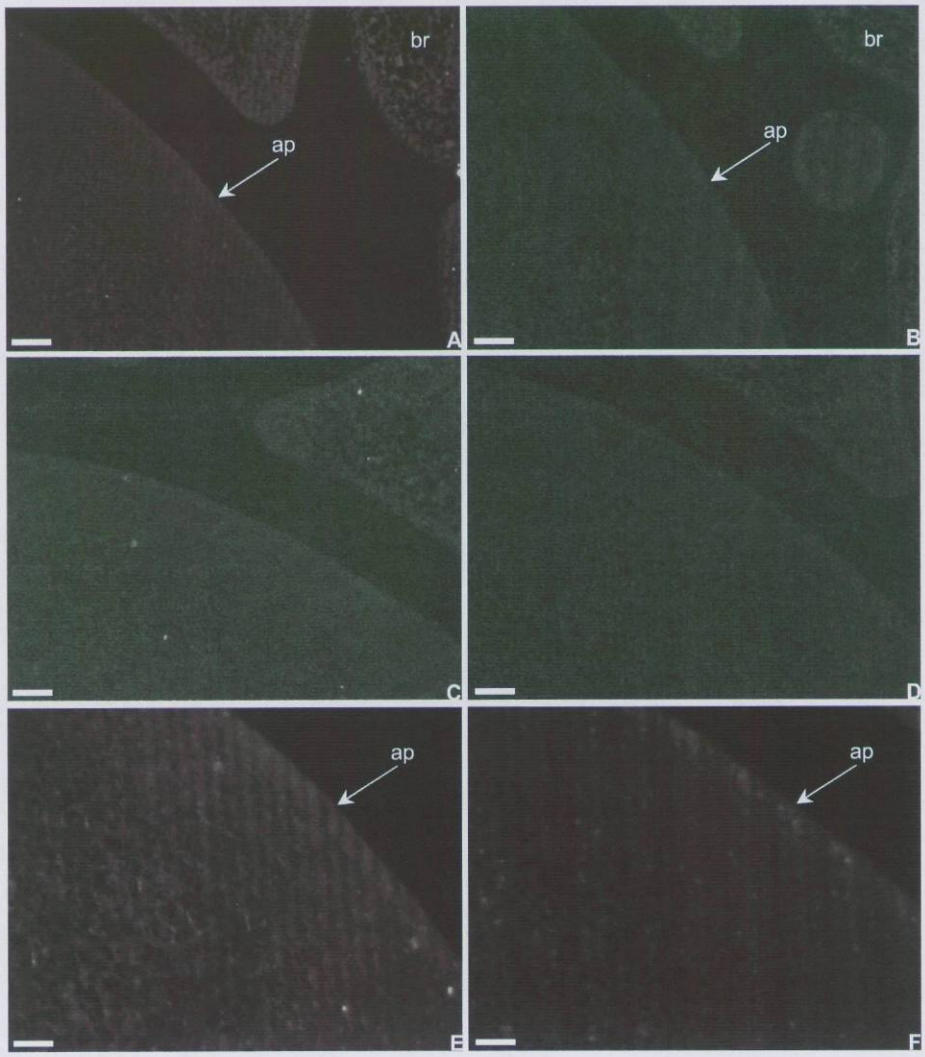



**Figura I-21 - Imunolocalização da cardosina A por imunofluorescência em secções transversais de ápice floral de cardo.** A, C e E) Secções testadas com o anticorpo primário contra a pro-cardosina A recombinante (anti-rec A) numa diluição de 1:60. Estes cortes não revelaram qualquer marcação que evidenciasse a presença da cardosina A, apresentando um aspecto muito semelhante ao observado nas secções controlo. B, D e F) Secções controlo incubadas em solução de bloqueio à qual não foi adicionada qualquer anticorpo primário. O anticorpo secundário utilizado foi o Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes) numa diluição 1:400. (ap) ápice floral; (br) brácteas. Barras: A-D, 50 µm; E-F, 100 µm.

Em cortes de ápice em que já havia ocorrido a diferenciação dos primórdios florais, os resultados obtidos (Figura I-22) foram muito semelhantes aos observados no estado de desenvolvimento anterior. Nesta fase de ontogénese floral é evidente a ausência da cardosina A nestas estruturas, observação concordante com a da análise por *Western blotting* (Figura I-20, Ap2). Ensaios com um anticorpo primário dirigido contra a cardosina B mostraram a ausência desta cardosina nos ápices florais.

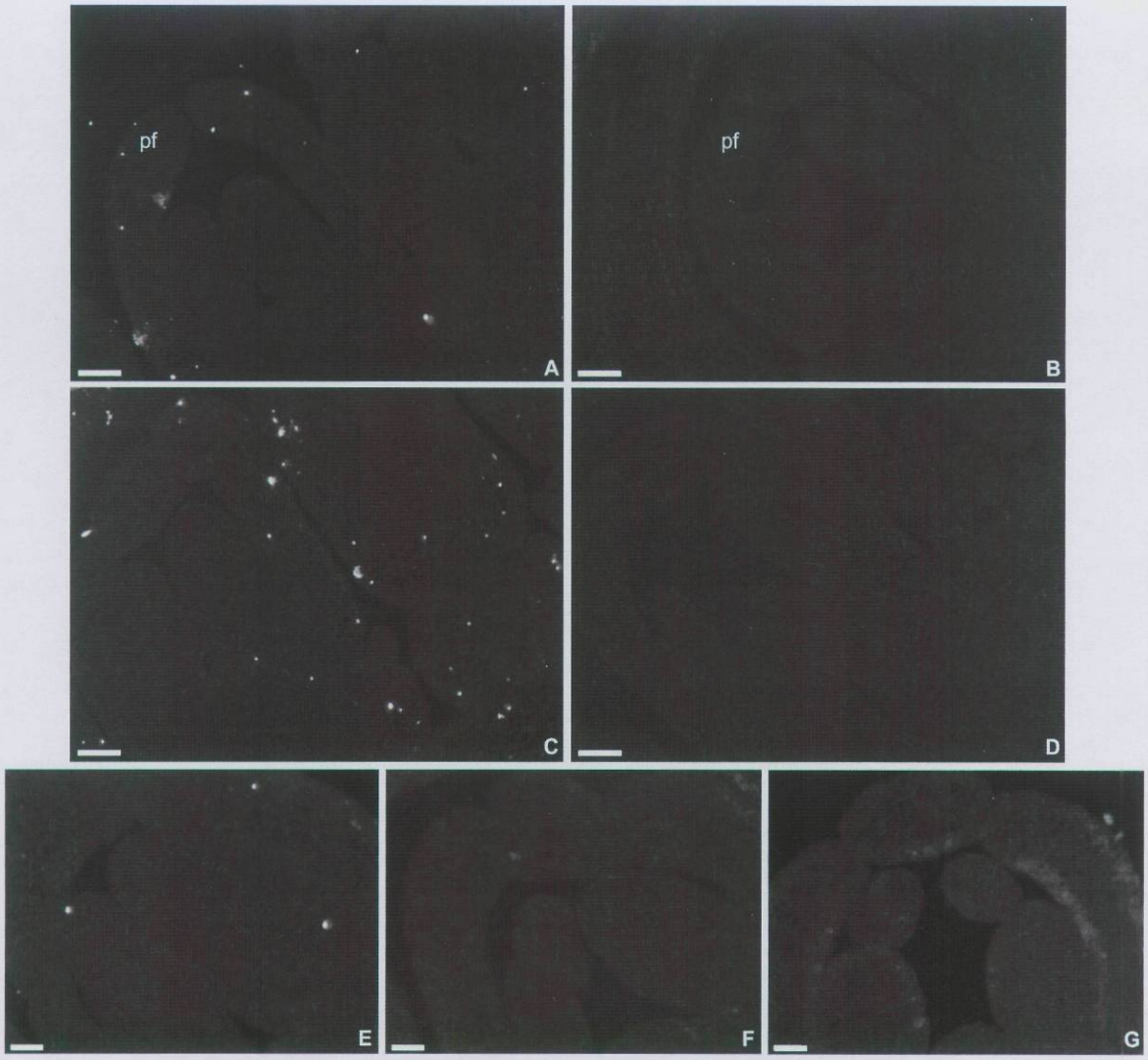



**Figura I-22 - Imunolocalização da cardosina A por imunofluorescência em secções longitudinais de ápice floral de cardo com primórdios florais diferenciados.** A, C e E) Cortes incubados com o anticorpo primário anti-rec A (1:60). Estas secções não revelaram qualquer marcação que evidenciasse a presença da cardosina A apresentando um aspecto muito semelhante ao observado no controlo. B, D e F) Secções controlo incubadas em solução de bloqueio. G) Os cortes incubados na presença do anticorpo primário contra a cardosina B numa diluição de 1:40 revelaram a ausência desta proteinase aspártica nestas estruturas. Os pontos fluorescentes observados nas imagens da esquerda resultaram de uma acumulação da solução com o anticorpo secundário e não correspondem a uma marcação específica. Em todos os ensaios foi usado o anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes) numa diluição 1:400. (pf) primórdio floral. Barras: A-D=50 µm; E-G=100 µm.

Nos ensaios de imunofluorescência realizados com secções de flores muito jovens foi detectada a presença da cardosina A, não no pistilo propriamente dito, mas na epiderme externa das pétalas (Figura I-23).

Ensaios de imunofluorescência com secções de estigma provenientes de flores de inflorescências fechadas e abertas revelaram uma marcação positiva para a presença da cardosina A, nas papilas epidérmicas e nas células de parênquima sub-epidérmico deste órgão (Figura I-24, Figura I-25 e Figura I-26). A marcação mais forte para a presença da cardosina A ocorreu, sem dúvida, na zona das papilas estigmáticas.

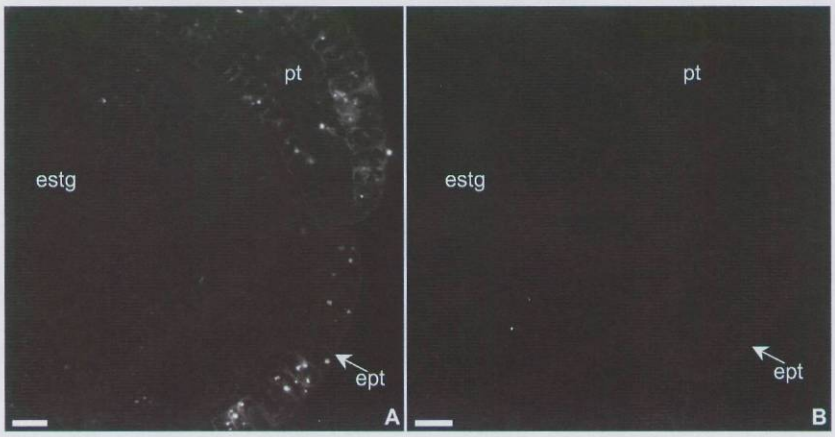



**Figura I-23 - Imunolocalização da cardosina A por imunofluorescência em secções transversais de flores muito jovens.** A) Secções testadas com o anticorpo primário anti-rec A (1:60). Estes cortes evidenciaram marcação para a cardosina A na epiderme externa (ept) das pétalas fundidas (pt) que circundam o estigma ainda pouco desenvolvido (estg). B) Secções controlo em que foi omitida a adição de anticorpo primário à solução de bloqueio e onde não se observou o surgimento de qualquer marcação. Barras=50 µm.

É de salientar que nestas há uma distribuição diferencial da cardosina A que se acumula somente nas papilas externas e não nas papilas das chanfraduras (Figura I-24). Cortes de estigma incubados com o anticorpo primário contra a cardosina B não evidenciaram qualquer marcação para a presença desta PA nesta estrutura (Figura I-24). Este resultado foi confirmado pelas observações registadas após experiências de imunohistoquímica com o "HISTOSTAIN-PLUS KIT" (Zymed) sobre secções de estigma, que confirmaram a presença da cardosina A nos tecidos marcados por imunofluorescência (Figura I-26). A última técnica revelou ainda a presença da cardosina B em estigmas de cardo, na região do tecido de transmissão.

Em conjunto, os resultados obtidos por imunofluorescência e imunohistoquímica coincidiram com o observado por *Western blotting*, confirmando a acumulação da cardosina A nos estigmas de cardo, em flores diferenciadas, durante todo o período de maturação das inflorescências.

Experiências de imunofluorescência com secções de estilete provenientes de flores de inflorescências fechadas ou abertas revelaram uma marcação positiva para a presença da cardosina A na região da epiderme deste órgão (Figura I-28 e Figura I-27).

Por sua vez, as secções incubadas com o anticorpo contra a cardosina B revelaram a acumulação desta proteinase aspártica na região do tecido de transmissão do estilete em estados de inflorescência fechada e aberta (Figura I-28 e Figura I-27). A cardosina B está ausente da epiderme deste órgão. As secções controlo em que não houve adição de anticorpo primário não evidenciaram qualquer marcação.

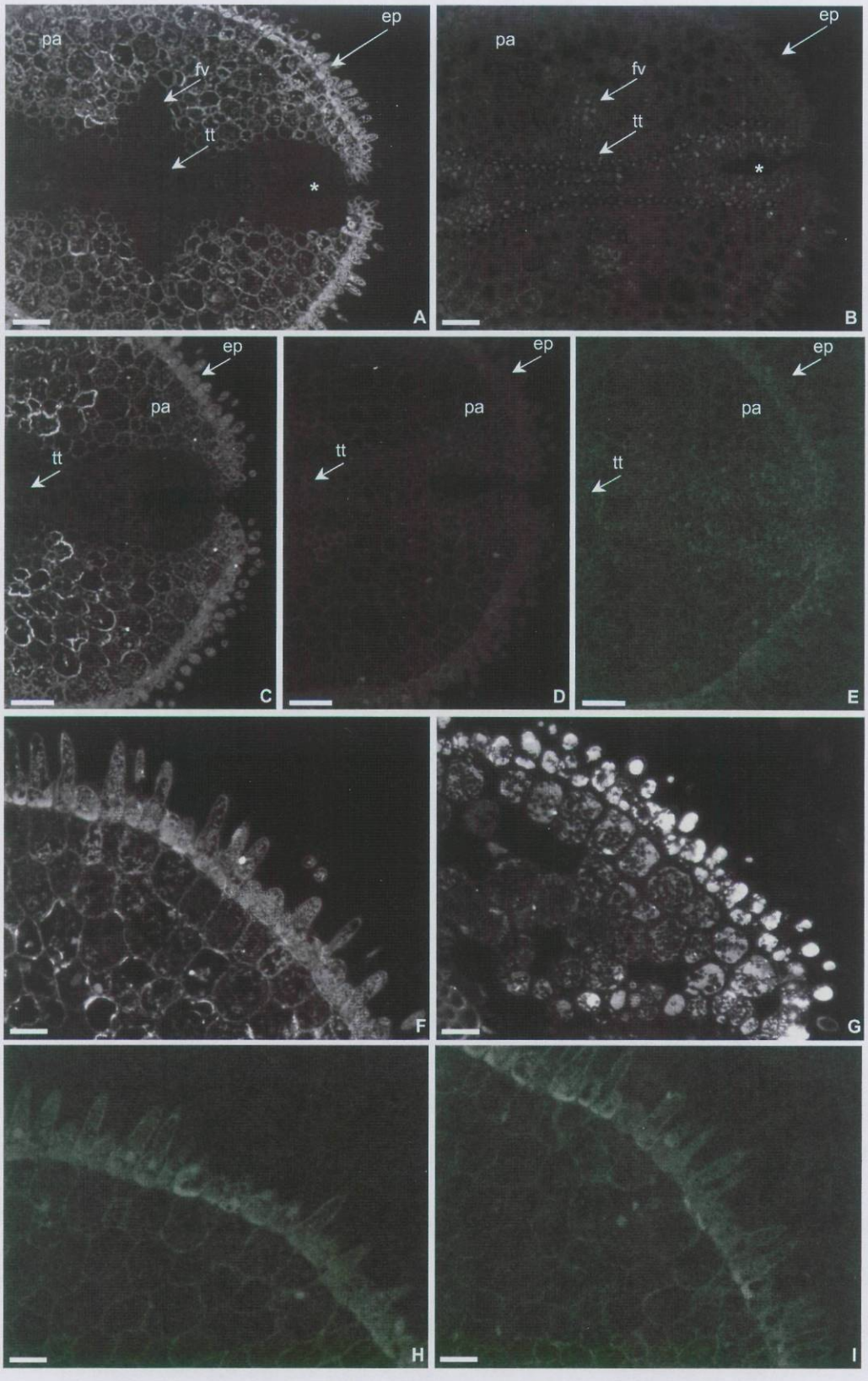



**Figura I-24 – Imunolocalização da cardosina A por imunofluorescência em secções transversais de estigma de inflorescência fechada.** A, C, F e G) Secções testadas com o anticorpo primário anti-rec A (1:60). Estes cortes revelaram marcação para a presença da cardosina A nas papilas epidérmicas (ep) e nas células do parênquima sub-epidérmico (pa). De realçar que as papilas localizadas nas região das chanfraduras (A, asterisco) não aparecem marcadas, o mesmo sucedendo para a região de tecido de transmissão (tt) do estigma. Nas secções controlo (B, E e I) e em cortes incubados com o anticorpo primário contra a cardosina B (1:40; D e H) não foi possível observar qualquer região marcada. (fv) feixe vascular. Barras=50 µm.

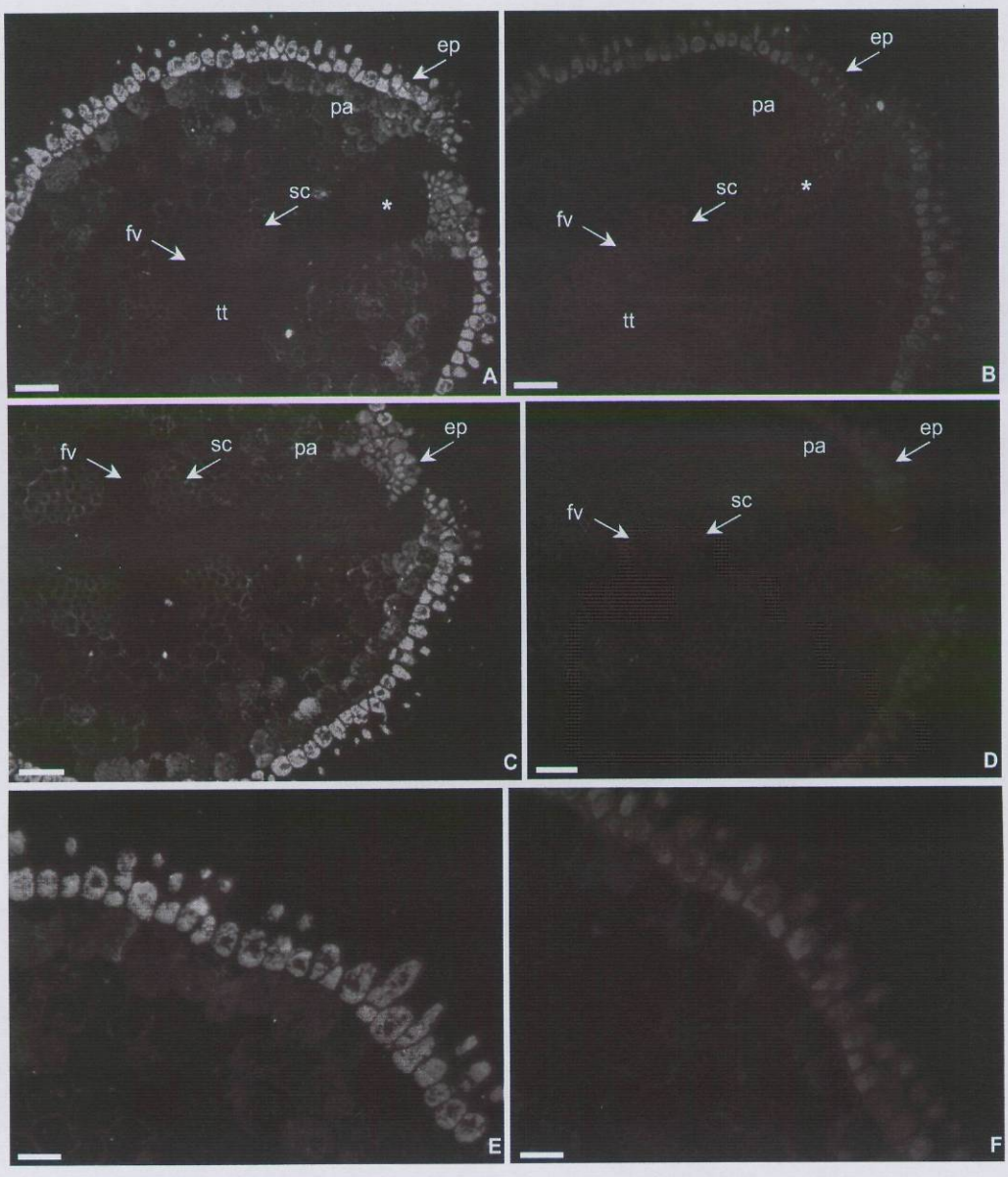



**Figura I-25 – Imunolocalização da cardosina A por imunofluorescência em secções transversais de estigma de inflorescência aberta.** A, C e E) Secções testadas com o anticorpo primário anti-rec A (1:60) evidenciando marcação nas papilas epidérmicas (ep) e nas células do parênquima sub-epidérmico (pa). As papilas localizadas nas região das chanfraduras (A, asterisco) não apresentam qualquer marcação, o mesmo sucedendo para a região de tecido de transmissão (tt) do estigma. B, D e F) Secções controlo, em que o anticorpo primário está ausente e nas quais não se observou qualquer região marcada. (fv) feixe vascular; (sc) esclerênquima. Barras: A-D=50 µm; E-F=100 µm.

Uma vez mais, os resultados obtidos na imunolocalização da cardosina A, por imunofluorescência e por imunohistoquímica foram coincidentes com o observado na análise por *Western blotting* que tinha revelado a presença desta proteinase no estilete de cardo, se bem que em menor proporção do que no estigma, ao longo do desenvolvimento da flor. O facto de apenas nos ensaios de imunofluorescência com anti-rec A ser possível observar marcação para a presença da cardosina A na epiderme do estilete traduz uma maior sensibilidade da técnica ou deste anticorpo primário na detecção da cardosina A.

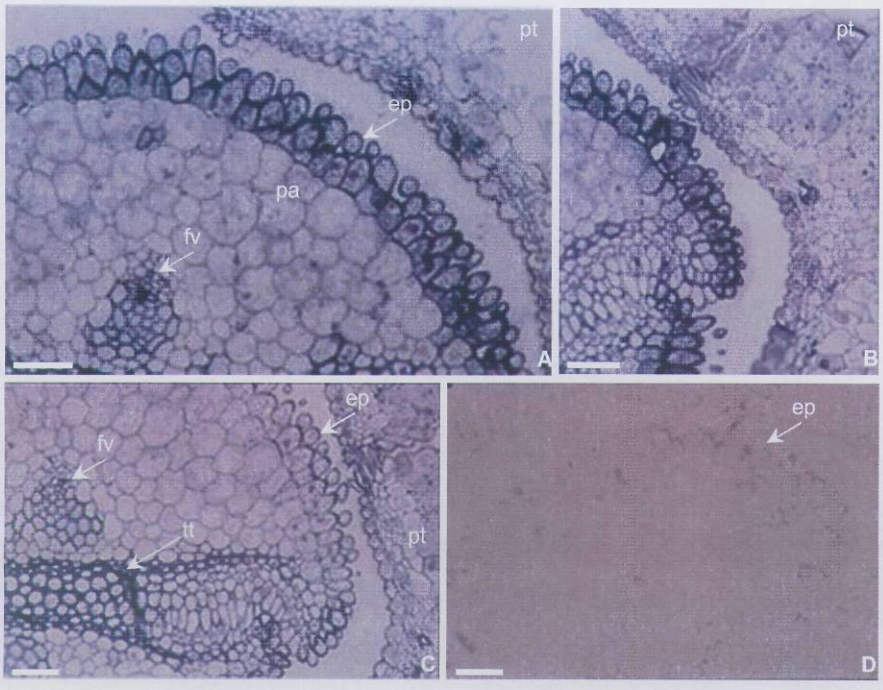



**Figura I-26 – Imunolocalização da cardosina A com o HISTOSTAIN-PLUS (Zymed) em secções transversais de estigma de inflorescência fechada.** A-B) Secções testadas com o anticorpo primário anti-A (1:40) evidenciando marcação nas papilas epidérmicas (ep) e nas células do parênquima sub-epidérmico (pa). C) Nas secções incubadas na presença do anticorpo primário contra a cardosina B (1:60) foi evidente a marcação na região do tecido de transmissão (tt) do estigma. Nestes cortes a região das papilas (ep) apareceu desprovida de qualquer marcação. D) Secções controlo incubadas com solução de bloqueio nas quais não foi possível observar qualquer região marcada. (fv) feixe vascular; (pt) pétala. Barras=25 µm.

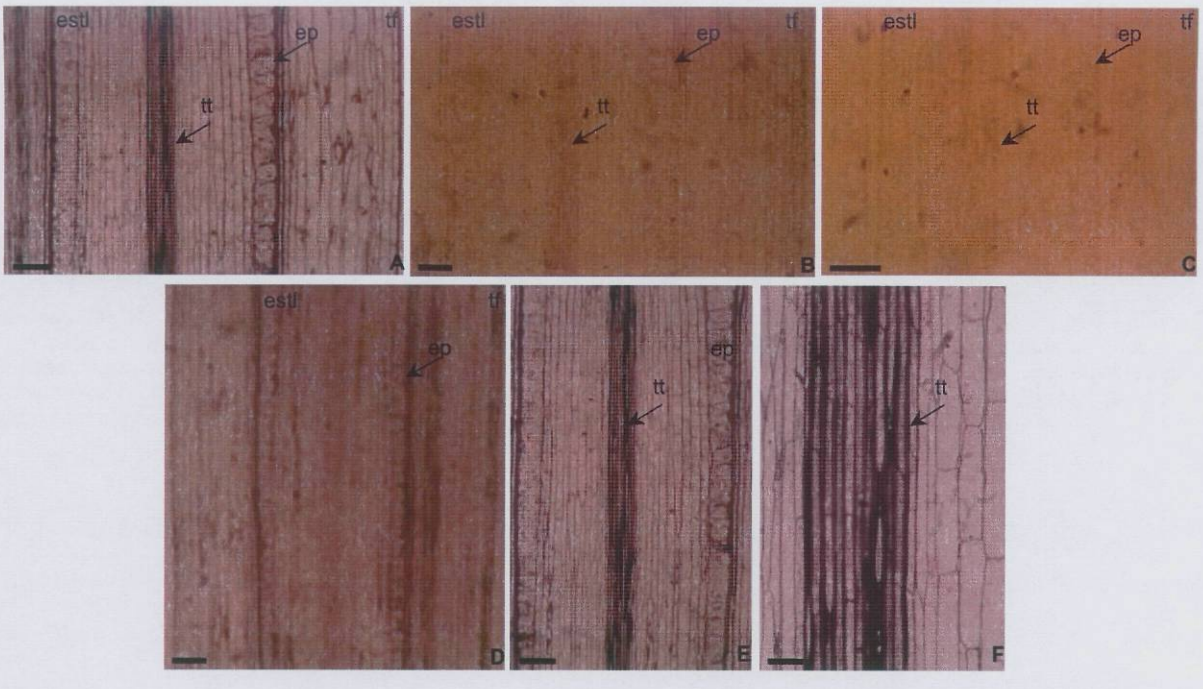



**Figura I-27 – Imunolocalização das cardosinas A e B com o "HISTOSTAIN-PLUS" (Zymed) em secções longitudinais de estilete de inflorescência fechada.** A, D-F) Secções testadas com o anticorpo primário contra a cardosina B (1:60). As secções testadas com este anticorpo evidenciaram marcação para a presença da cardosina B na região do tecido de transmissão (tt). Em secções tangenciais de estilete, que não apanham a região do tecido de transmissão, a incubação com anti-B não desencadeou qualquer tipo de marcação (D). B) Secções de estilete incubadas com o anticorpo anti-A (1:40). Estes cortes não evidenciaram qualquer marcação notória sendo no entanto de esperar ver-se um produto da reacção de marcação na região da epiderme (ep) tal como observado na Figura 13. C) Secções controlo em que foi omitida a adição do anticorpo primário à solução de bloqueio. Nestes cortes não foi possível observar qualquer região marcada. (estl) estilete; (tf) tubo floral. Barras: A-C=50 µm; D=25 µm; E=50 µm; F=100 µm.

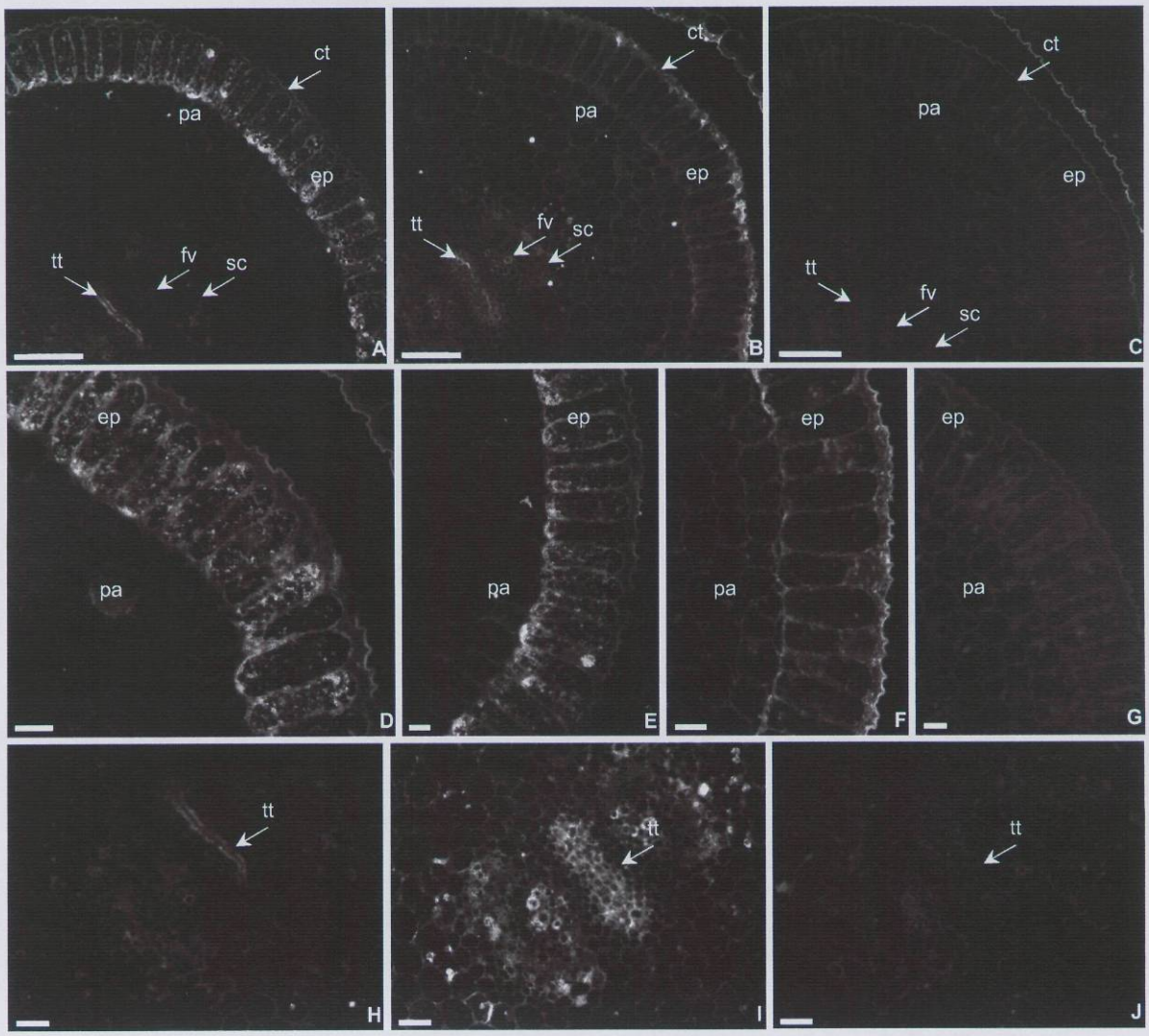



**Figura I-28 – Imunolocalização da cardosina A por imunofluorescência em secções transversais de estilete de inflorescência aberta.** A, D, E e H) Secções incubadas com o anticorpo primário anti-rec A (1:60). Estes cortes evidenciaram marcação para a presença da cardosina A na epiderme (ep) do estilete. Com este anticorpo o tecido de transmissão (tt) não apresenta qualquer marcação (A e H). C, G e J) Secções controlo em que o anticorpo primário está ausente. Nestas não foi possível observar qualquer região marcada. B, F e I) Secções incubadas com o anticorpo primário contra a cardosina B (1:40). Nestes cortes é evidente o surgimento de marcação para a cardosina B na região do tecido de transmissão (tt; B) enquanto a zona da epiderme aparece limpa (F). (ct) cutícula; (fv) feixe vascular; (pa) parênquima; (sc) esclerênquima. Barras: A-C=50 µm; D-J=100 µm.

Ensaios de imunohistoquímica com secções de ovário revelaram que neste órgão apenas a cardosina B está presente. Secções de ovário de inflorescências fechadas incubadas com anti-A não evidenciaram o aparecimento de qualquer marcação indicativa da presença desta cardosina neste órgão. As secções controlo, incubadas com solução de bloqueio, também apareceram limpas. Por sua vez, as secções incubadas com o anticorpo anti-B revelaram a acumulação desta proteinase aspártica no ovário de cardo, tendo-se verificado que a cardosina B ocorre na parede interna desta estrutura, bem como na região do funículo e ao longo do micrópilo. No óvulo, a presença da cardosina B está limitada à região do nucelo correspondente à zona onde se irá diferenciar o saco embrionário.

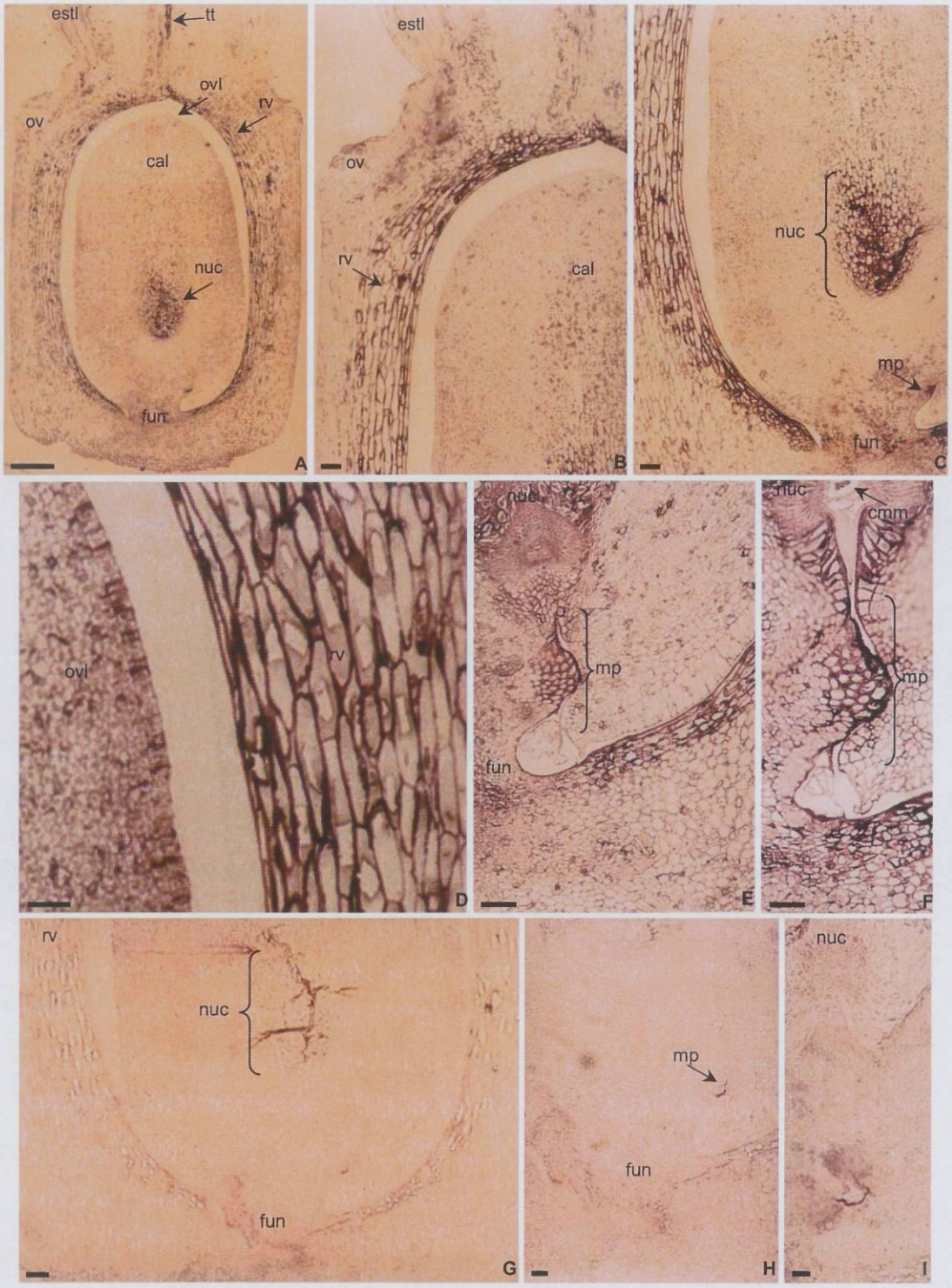



**Figura I-29 – Imunolocalização da cardosina B com o "HISTOSTAIN-PLUS" (Zymed) em secções longitudinais de ovário de inflorescência fechada.** A-F) Secções testadas com o anticorpo primário contra a cardosina B (1:60). Estas secções evidenciaram uma marcação contínua para a cardosina B, desde o tecido de transmissão (tt) do estilete (estl), ao longo da região ventral (rv) da epiderme interna do ovário (ov), até ao óvulo (ovl) estando presente no funículo (fun), micrópilo (mp) e nucelo (nuc). C) Ampliação da região ventral da epiderme interna do ovário evidenciando marcação intensa para a cardosina B. E-F) Ampliações da região do micrópilo que marcam fortemente para a presença da cardosina B. Em F é possível observar a célula mãe do macrósporo (cmm) em processo de diferenciação. G-I) Secções controlo em que foi omitida a adição do anticorpo primário à solução de bloqueio. Estes cortes não evidenciaram qualquer marcação notória. (cal) calaza. Barras: A=25 µm; B, C e G=50 µm; D-F, H-I=100 µm.

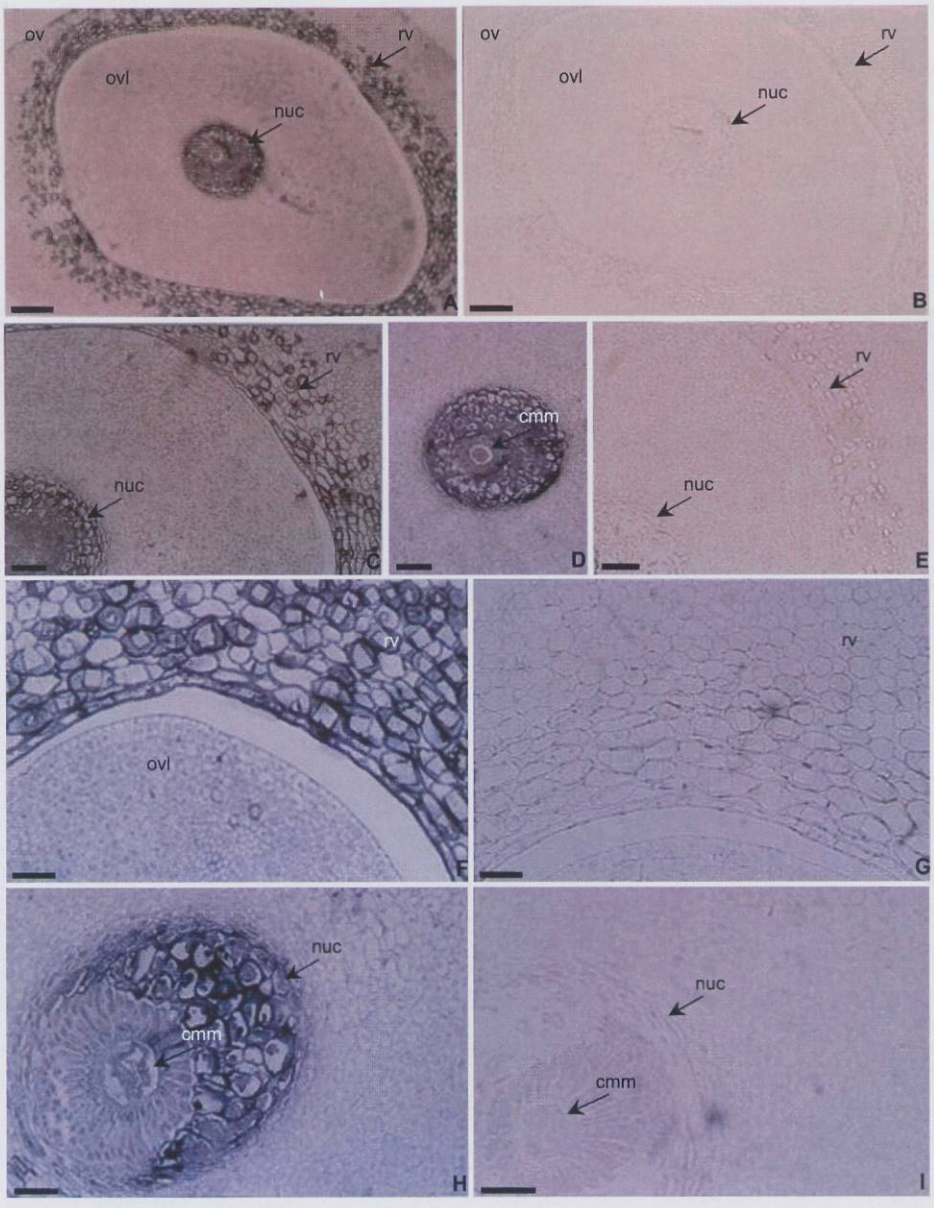



**Figura I-30 – Imunolocalização da cardosina B com o "HISTOSTAIN-PLUS" (Zymed) em secções transversais de ovário de inflorescência fechada.** A, C, D, F e H) Secções testadas com o anticorpo primário contra a cardosina B (1:60). Estas secções evidenciaram uma marcação para a cardosina B, na região ventral (rv) da epiderme interna do ovário (ov) e dentro do óvulo (ovl) na região do nucelo (nuc). No interior do nucelo é possível ver a célula mãe do macrósporo em diferenciação (cmm). B, E, G e I) Secções de ovário incubadas com o anticorpo anti-A (1:40). Estes cortes não apareceram marcados indicando a ausência da cardosina A no ovário de cardo. F e G) Ampliação da região ventral (rv) da epiderme interna do ovário evidenciando marcação intensa apenas com anti-B (F). Com anti-A, estes cortes não aparecem marcados (G). H e I) Ampliações da região do nucelo (nuc), que marcam fortemente para a presença da cardosina B. Em ambos os cortes possível observar a célula mãe do macrósporo (cmm) em processo de diferenciação. Barras: A-B=25 µm; C-E=50 µm; F-I=25 µm.

A distribuição de cardosina B no pistilo de cardo mostrou a continuidade da ocorrência desta proteinase aspártica entre o tecido de transmissão do estilete e o ovário, numa localização coincidente com aquela seguida por um tubo polínico em crescimento para fertilização da oosfera (Figura I-29).

Os resultados obtidos na imunolocalização das cardosinas no ovário são concordantes com o observado na análise por *Western blotting* que havia revelado a ausência da cardosina A em ovários de cardo ao longo de todo o desenvolvimento da flor. Mediante estes resultados surgem duas possíveis hipóteses para o observado: ou a cardosina A está

realmente ausente do ovário, ou a sua presença ocorre em quantidades tão baixas que escapam a detecção por estas metodologias.

Como foi já referido, as cardosinas são únicas no que respeita à sua abundância e localização na planta. A presença destas PAs nas flores de cardo indica que estas possam estar de algum modo envolvidas em interacções polén-pistilo durante o período de reprodução da planta. No entanto, a distribuição diferencial das cardosinas pelas flores de cardo sugere papéis fisiológicos distintos para estas enzimas, discutidos de seguida.

A ocorrência da cardosina A nas papilas estigmáticas e ao longo do desenvolvimento da flor parece indicar a participação desta proteinase aspártica em variados processos fisiológicos. As papilas estigmáticas constituem o primeiro local de contacto entre o grão de pólen e a parte feminina da planta aquando da fertilização. Por estar presente em elevada quantidade nos vacúolos das papilas epidérmicas do estigma, foi postulado que a cardosina A pudesse estar envolvida em processos de reconhecimento/resposta moleculares relacionados com a fertilização, papel atribuído a outras glicoproteínas (não proteinases aspárticas) abundantemente presentes nos estigmas de outras espécies (Faro, *et al.*, 1998). Faro *et al.* (Faro, *et al.*, 1999) identificaram um motivo RGD na cardosina A localizado num *loop* que se projecta da superfície da molécula. Este motivo é encontrado na fibronectina e sugere que a cardosina A possa ser funcionalmente activa ao promover a ligação a proteínas relacionadas com as integrinas (Faro, *et al.*, 1999). Esta hipótese foi reforçada pela identificação de uma proteína específica do pólen que interage especificamente com o motivo RGD (Faro, *et al.*, 1999). Uma vez que a cardosina A é abundantemente expressa nas papilas e o seu receptor específico foi isolado a partir do pólen, é provável que o reconhecimento pelo motivo RGD seja activo em interacções pólen-pistilo (Faro, *et al.*, 1999).

A acumulação da cardosina A nas células periféricas do estigma abre a possibilidade do envolvimento desta em fenómenos de defesa contra patogénios/insectos (Faro, *et al.*, 1998). O rebentamento dos vacúolos numa resposta hiper-sensitiva à invasão por patogénios poderia levar à destruição destes por acção das proteinases presentes no compartimento vacuolar.

A ocorrência da cardosina A em inflorescências maduras de cardo sugere ainda um papel desta proteína associado ao fenómeno de senescência ou morte celular programada (Faro, *et al.*, 1998), papéis já previamente documentados para outras PAs de origem vegetal (Chen e Foolad, 1997, Runeberg-Roos e Saarma, 1998).

Em relação à cardosina B, a sua localização no tecido transmissão do estigma e do estilete, bem como no ovário sugere que esta proteinase também tenha um papel nas interacções pólen-pistilo. É conhecido que o tecido de transmissão suporta o crescimento do tubo polínico até ao ovário, um processo que envolve a degradação da matriz extracelular

para assegurar a nutrição e facilitar o movimento do tubo polínico até à oosfera (Faro, *et al.*, 1998). A localização extracelular da cardosina B no tecido de transmissão sugere que esta proteinase possa estar envolvida no processo de degradação proteolítica deste tecido, facilitando a progressão do tubo polínico ao longo do estilete e do ovário. As observações registadas no estudo da distribuição da cardosina B no pistilo de cardo revelaram que esta proteinase se localiza de forma contínua entre o tecido de transmissão do estilete e o ovário. Estas observações sugerem um possível envolvimento da cardosina B em fenómenos de atracção e direccionamento do tubo polínico.

### 4.4.2 Localização intracelular da cardosina A nas papilas estigmáticas por imunocitoquímica

Os dados obtidos nas experiências de imunodetecção e imunolocalização da cardosina A realizadas neste trabalho demonstraram que esta proteína se localiza nos estigmas e estiletes de cardo, acumulando-se maioritariamente nas papilas estigmáticas. Foi também já referido que a cardosina A é uma proteína intracelular e que nas papilas epidérmicas do estigma esta se localiza especificamente nos vacúolos (Ramalho-Santos, *et al.*, 1997).

Nas papilas estigmáticas das flores de cardo é possível observar, ao microscópio electrónico de transmissão, duas regiões morfologicamente distintas, que apresentam uma marcação diferencial para a presença da cardosina A (Figura I-31B). Nestas, a cardosina A acumula-se conspícua e especificamente nas regiões mais electrono-densas que pensamos corresponderem a vacúolos de armazenamento de proteínas (Figura I-31A-B). As regiões electrono-transparentes também identificadas nas papilas epidérmicas correspondem possivelmente a vacúolos vegetativos (Figura I-31B; consultar secção 4.1.1).

Ensaios de imunocitoquímica com um anticorpo específico contra o PSI da cardosina A revelaram o surgimento de marcação com o ouro coloidal nos vacúolos de aspecto electrono-denso (Figura I-31C-D). Esta observação sugere que à chegada ao vacúolo, o PSI ainda está ligado à cardosina A. Após a sua remoção, este domínio é possivelmente degradado neste compartimento subcelular.

Tormakangas *et al.* (Tormakangas, *et al.*, 2001) demonstraram que a presença do PSI é determinante para o correcto direccionamento da fitepsina (proteinase aspártica de cevada) para o vacúolo. Estes autores sugeriram que a informação necessária para o correcto direccionamento da fitepsina para o vacúolo está contida no PSI (Tormakangas, *et al.*, 2001).

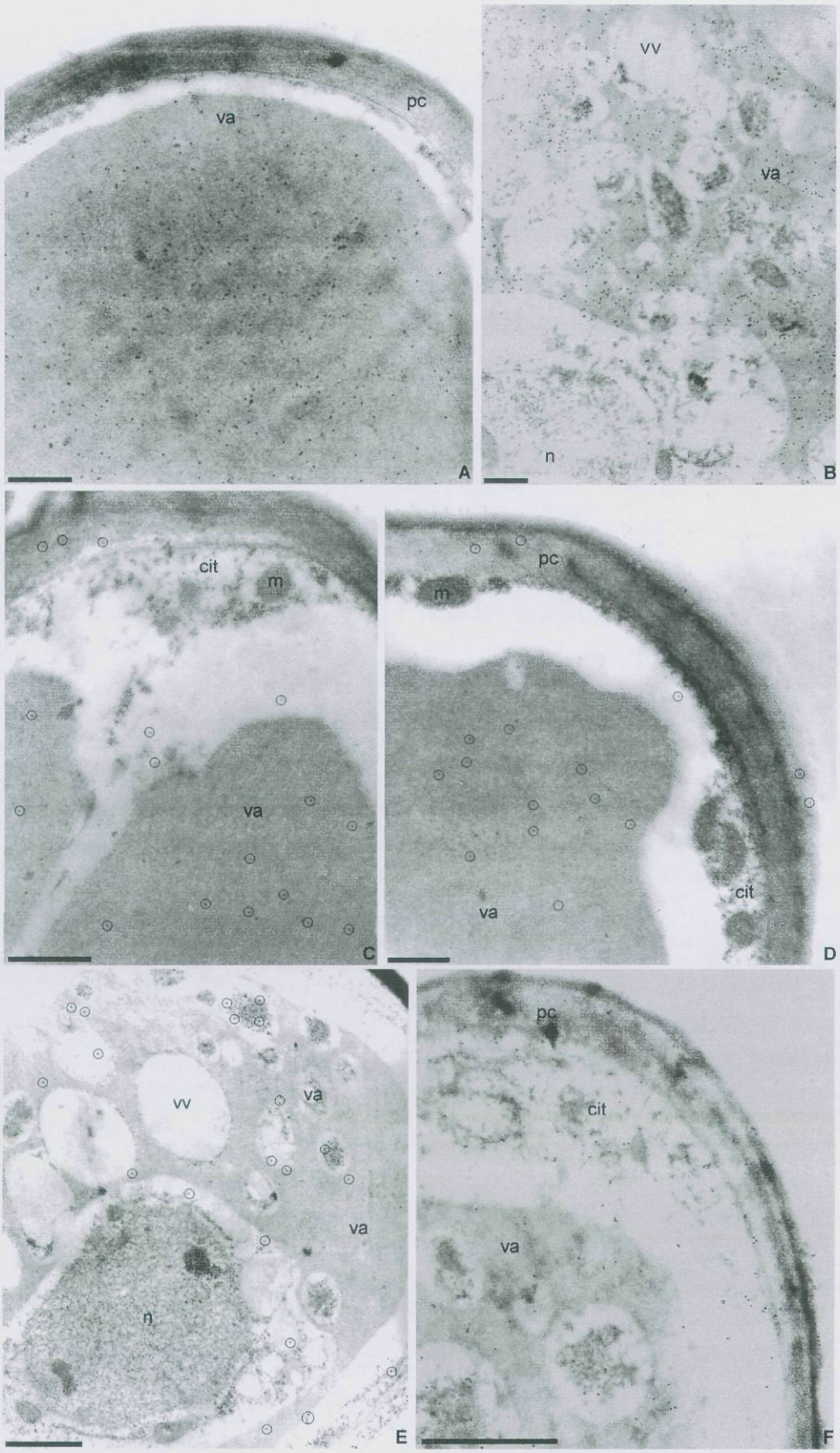



**Figura I-31 – Imunolocalização da cardosina A, por microscopia electrónica, nas papilas epidérmicas.** A-B) Secções de papilas epidérmicas incubadas com anti-A (1:400) revelaram marcação conspícua e específica no interior do vacúolo de aspecto electrono-denso (va) e alguma marcação na parede celular (pc). Nestas imagens podem ainda observar-se os vacúolos electrono-transparentes (vv). Barras=2 µm. C-D) Cortes de papilas epidérmicas incubadas com anti-PSI (1:200) evidenciaram marcação no interior do vacúolo de armazenamento (va) e na parede celular (pc). Barras=1 µm. E-F) Secções de papilas epidérmicas incubadas com anti-Pro (1:50) revelando marcação no interior do vacúolo electrono-denso (va), no citoplasma (cit) e na parede celular (pc). Barras=1 µm. (m) mitocôndria; (n) núcleo.

Por sua vez, Egas *et al.* (Egas, *et al.*, 2000), ao estudarem a interacção entre o PSI da pro-cardosina A com microssomas verificaram que o PSI possuía a capacidade de interacção com membranas fosfolipídicas, promovendo a libertação do conteúdo de vesículas a pH ácido. Estes autores sugeriram que o PSI da cardosina A está possivelmente envolvido no correcto direccionamento da cardosina A para os vacúolos uma vez que provaram que este domínio hidrofóbico medeia uma interacção do precursor da cardosina A com fosfolípidos, induzindo a permeabilização das membranas (Egas, *et al.*, 2000). A imunolocalização do PSI nos vacúolos suporta a hipótese deste domínio estar de alguma forma envolvido no direccionamento da cardosina A para este compartimento subcelular. Se o PSI contém a informação para o direccionamento da cardosina A para o vacúolo é lógico que esta porção só seja libertada no destino final da proteína. A marcação do PSI no vacúolo pode identificar moléculas de cardosina A ainda ligadas a este domínio ou a esta porção isolada da proteína. Se o transporte da cardosina A para os vacúolos é realmente mediado pela interacção do PSI com a membrana da vesícula de transporte, então a marcação com o anti-PSI pode estar a localizar o domínio hidrofóbico da cardosina A isolado. Após fusão das vesículas de transporte com o tonoplasto o PSI seria libertado para o lúmen vacuolar para posterior degradação, e seriam estas moléculas as detectadas pelo anticorpo.

As experiências de imunocitoquímica com um anticorpo primário contra a região Pro evidenciaram marcação no citoplasma e nos putativos vacúolos de armazenamento de proteínas (Figura I-31E-F) sendo possível que esta região só seja excisada à chegada ao vacúolo. Em grande parte das PAs, a região do pro-segmento interage com a região catalítica por intermédio de pontes salinas que criam um escudo sobre o centro activo da enzima, impedindo a sua ligação ao substrato e inactivando-a (Khan e James, 1998). Num ambiente com pH baixo, as pontes salinas são enfraquecidas e o pro-segmento é removido como resultado de uma reacção geralmente auto-catalítica. Apesar do pro-segmento ser apontado para a maioria das PAs como o responsável pela inactivação da enzima, na cardosina A este não parece ser o caso. Estudos bioquímicos com precursores recombinantes das cardosinas revelaram que ao contrário dos outros zimogénios, as pro-cardosinas são activas (*in* (Simoes e Faro, 2004), M. Vieira e C. Faro, resultados não publicados). A localização do pro-segmento no vacúolo sugere que a excisão desta região ocorre neste compartimento subcelular e que não é auto-catalítica. Se o processamento do pro-segmento dependesse da acção da própria cardosina A seria de esperar que este fosse excisado mais cedo no trajecto biossintético desta cardosina e que estivesse ausente do vacúolo. Na verdade, e tendo em conta a especificidade das PAs vegetais em geral, e da cardosina A em particular, é expectável que o local de clivagem entre o pro-segmento e a cadeia de 31 kDa da cardosina A seja processado por uma proteinase de serina ou de

cisteína, típicas residentes dos compartimentos vacuolares. Isto tornaria a maturação da cardosina A pelo menos em parte dependente de um processamento assistido por outra proteinase que não aspártica.

De salientar que tanto com o anti-A como com o anti-Pro e com o anti-PSI foi possível observar alguma marcação ao nível da parede celular das papilas, sugerindo a secreção de algumas moléculas de cardosina A.

Resumindo, a integração dos dados anatómicos, ultra-estruturais, imunohistoquímicos e imunocitoquímicos obtidos neste trabalho, em combinação com a informação previamente disponível acerca das cardosinas, revelou que a cardosina A e a cardosina B se distribuem desigualmente pelos órgãos do pistilo de cardo, que a expressão da cardosina A é regulada durante a ontogénese floral e que a cardosina A está maioritariamente presente nas inflorescências maduras, onde se acumula nos vacúolos de armazenamento de proteínas das papilas estigmáticas. Estes dados sugerem que a cardosina A possa desempenhar um papel relacionado com a interacção polén-pistilo ao nível do estigma. Por sua vez, a presença da cardosina A em inflorescências maduras indica um possível envolvimento desta PA em mecanismos de morte celular programada ou senescência, um papel biológico previamente sugerido para outras PAs de origem vegetal (Chen e Foolad, 1997, Runeberg-Roos e Saarma, 1998). Os resultados obtidos neste trabalho revelaram ainda a presença contínua da cardosina B ao longo do tecido de transmissão do estilete, passando pela região ventral da parede do ovário, pelo micrópilo e também na zona do nucelo do único óvulo de cardo. Estas observações são muito interessantes e suportam a hipótese da cardosina B estar associada a interacções pólen-pistilo, a um nível mais basal do pistilo, distinto do registado para a cardosina A, e que a actividade de cardosina B possa estar relacionada com a nutrição, atracção e orientação do tubo polínico até ao óvulo com o objectivo da fecundação. Os resultados apresentados neste trabalho contribuem portanto para a elucidação da(s) função(ões) biológica(s) da cardosina A em particular, e das PAs vegetais em geral.

# CAPÍTULO II

# Estudo do transporte intracelular e do processamento da cardosina A em sistemas heterólogos

# 1 INTRODUÇÃO

No capítulo anterior foram abordadas questões directamente relacionadas com a expressão da cardosina A em cardo durante a ontogénese floral e discutiram-se as possíveis funções biológicas desta proteinase aspártica (PA) nos estigmas da planta.

Apesar da informação abundante a nível de sequências (mRNA e aminoácidos), a nível da actividade específica e a nível da estrutura tridimensional da cardosina A (Egas, *et al.*, 2000, Faro, *et al.*, 1998, Faro, *et al.*, 1999, Frazão, *et al.*, 1999, Ramalho-Santos, *et al.*, 1998, Ramalho-Santos, *et al.*, 1997, Ramalho-Santos, *et al.*, 1998, Ramalho-Santos, *et al.*, 1996), até à realização deste trabalho, pouco era conhecido acerca da sucessão e localização subcelular dos eventos de processamento sofridos pela cardosina A durante a sua maturação. Eram igualmente desconhecidos a localização subcelular das suas formas intermédias de processamento e o trajecto intracelular seguido por esta PA até ao vacúolo.

Até à data, os únicos dados disponíveis relacionados com o estudo do transporte intracelular de uma PA de origem vegetal foram os publicados para a fitepsina (Glathe, *et al.*, 1998, Pimpl, *et al.*, 2003, Tormakangas, *et al.*, 2001), uma PA vacuolar isolada de grãos de cevada que se revelou pouco estável nos vacúolos de *Nicotiana*, sistema heterólogo em que foi expressa. Apesar da cardosina A e da fitepsina estarem presentes em diferentes órgãos nas espécies de plantas a partir das quais foram isoladas, a nível de localização subcelular estas PAs apresentam semelhanças, já que ambas são proteínas intracelulares e ambas se localizam nos vacúolos. Porque a cardosina A é uma proteína com reconhecida importância económica e objecto de crescente interesse científico, considerou-se ser importante proceder-se ao estudo do trajecto intracelular seguido por esta proteína bem como do processamento conducente à sua maturação.

Potencialmente, as cardosinas A e B constituem bons modelos para o estudo da via secretora em plantas uma vez que pequenas diferenças entre as suas sequências de aminoácidos (Vieira, *et al.*, 2001) se traduzem em localizações subcelulares distintas, o vacúolo e a parede celular, respectivamente. De salientar que a homologia entre as sequências da cardosina A e da cardosina B é menor entre domínios PSI do que entre regiões N- ou C- terminais, levando à hipótese de que as diferenças na estrutura primária registadas ao nível do PSI possam ser a base para as distintas localizações subcelulares registadas para estas PAs. Com base nestas observações e hipóteses julgou-se ser importante que todos os passos de clonagem e geração de plantas transgénicas realizados neste trabalho fossem realizados em paralelo para a cardosina B, na expectativa de estas plantas poderem vir a ser úteis para futuros estudos de expressão e transporte intracelular de proteínas em plantas, tendo as cardosinas como modelo. A possibilidade da informação para o endereçamento vacuolar das PAs vegetais residir no PSI (Tormakangas, *et al.*, 2001) sob a forma de uma sequência ainda desconhecida ou como um possível sinal de endereçamento estrutural (*physical structure vacuolar sorting domain*, psVSD) (Neuhaus e

Rogers, 1998) torna uma proteína como a cardosina A, potencialmente útil como modelo para o estudo de um putativo psVSD em estudos do transporte e direccionamento intracelular de proteínas para o vacúolo em plantas.

Neste capítulo serão abordadas questões relacionadas com a clarificação da sequência de eventos de processamento envolvidos na maturação da cardosina A, bem como a caracterização do trajecto intracelular seguido por esta PA no seu transporte para o vacúolo. Para tal, recorreu-se à expressão da cardosina A em dois sistemas heterólogos, nomeadamente em plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* recorrendo a um sistema de expressão indutivo pela aplicação de um indutor químico (secção 4.2.2) e na epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* recorrendo a um sistema de expressão transitória mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (secção 4.3). O trabalho realizado no âmbito deste estudo envolveu a adopção de novas metodologias que surgirão melhor enquadradas se a problemática relacionada com a via secretora e o direccionamento vacuolar em plantas for previamente descrita.

## 1.1 Organização das células eucarióticas – o Sistema Endomembranar

Ao contrário das células procarióticas, constituídas por um compartimento subcelular único delimitado pela membrana citoplasmática, as células eucarióticas encontram-se divididas em compartimentos subcelulares independentes, envolvidos por membranas e funcionalmente distintos. O surgimento e subsequente desenvolvimento da compartimentação do citoplasma foi uma das características chave que permitiu a evolução bem sucedida das células eucarióticas a partir dos seus ancestrais procariontes.

As células eucarióticas, sejam de origem animal, vegetal ou ainda de levedura, apresentam no seu citosol o mesmo conjunto básico de compartimentos subcelulares delimitados por membranas nomeadamente, o núcleo, os peroxissomas, as mitocôndrias e o sistema endomembranar (Alberts, *et al.*, 2002).

Apesar de células eucarióticas de diferentes origens possuírem o mesmo conjunto base de organelos e estruturas, as células vegetais e animais diferem em numerosos aspectos, que se reflectem directamente na organização e funcionalidade do seu sistema endomembranar.

O sistema endomembranar é composto por diversos organelos bioquimicamente distintos cuja comunicação é assegurada por transporte vesicular (secção 1.2) (Rutherford e Moore, 2002). Fazem parte do sistema endomembranar de uma célula eucariótica o retículo endoplasmático (RE) - liso (REL) e rugoso (RER), o complexo de Golgi, os endossomas e ainda os lisossomas nas células animais e os vacúolos nas células vegetais. As vesículas

de secreção, envolvidas no transporte intracelular de proteínas e que serão discutidas nas próximas secções, são também parte constituinte deste sistema.

O transporte vesicular de diferentes tipos de moléculas carga através do sistema endomembranar constitui a via secretora (secções 1.3 e 1.4). A via secretora desempenha um papel central no desenvolvimento e na morfogénese dos organismos eucariontes. A biossíntese de proteínas, lípidos e hidratos de carbono, a *N*- e *O*- glicosilação de proteínas, o transporte de membranas, a deposição de proteínas de armazenamento e a divisão celular, são todos processos dependentes de uma via secretora funcional e eficiente.

## 1.2 Transporte de proteínas entre compartimentos subcelulares

Todas as proteínas, à excepção da pequena minoria sintetizada pelos ribossomas das mitocôndrias ou plastídeos, começam a ser sintetizadas pelos ribossomas presentes no citosol. O destino subsequente destes polipéptidos vai depender da sua sequência primária, que pode conter ou não sinais de endereçamento (SE) que os direccionam para distintas localizações subcelulares.

A grande maioria das proteínas não possui SE na sua sequência de aminoácidos (aa), o que implica a sua retenção no citosol como residentes permanentes. Muitas outras no entanto, possuem SE específicos que orientam o seu transporte do citosol para o núcleo, o RE, as mitocôndrias, os plastídeos ou ainda os peroxissomas. As proteínas endereçadas para o RE poderão ainda possuir SE adicionais, responsáveis pelo direccionamento desde o RE até outros destinos subcelulares, seguindo a via secretora.

Para melhor compreender o funcionamento dos SE presentes nas proteínas é importante distinguir três diferentes formas de transporte, pelas quais ocorre o movimento destas macromoléculas entre compartimentos subcelulares (Figura II-1). São estas:

i) o transporte de proteínas através de poros, que funcionam como portões de acesso, permitindo a passagem seleccionada de determinadas macromoléculas – *gated transport* (via representada a violeta na Figura II-1). Estes poros permitem ainda a livre difusão de moléculas de tamanho inferior ao dos polipéptidos. Ex: transporte entre citosol e núcleo;

ii) o transporte através de translocadores membranares, responsáveis pela translocação de determinadas proteínas através de uma membrana, a partir do citosol – transporte transmembranar (a azul na Figura II-1). Normalmente, para passar através do translocador, uma proteína tem que ser desenrolada e posteriormente novamente enrolada, para assumir a sua conformação funcional. Ex: transporte entre o citosol e RE;

iii) o transporte de proteínas mediado por vesículas, ou transporte vesicular (a verde na Figura II-1). Este tipo de transporte inicia-se com uma fase de carregamento das

vesículas com moléculas específicas localizadas no lúmen de um primeiro compartimento a partir do qual as vesículas se irão destacar. Posteriormente, estas descarregarão o seu conteúdo num segundo compartimento, através da fusão da sua membrana com a membrana do compartimento alvo. Uma vez que os polipéptidos transportados desta forma não atravessam directamente as membranas, só poderão ser transportados entre compartimentos subcelulares topologicamente compatíveis. Ex: transporte entre RE e Golgi.

Cada uma das três formas de transporte de proteínas é geralmente guiada por SE presentes no polipéptido a transportar e que serão especificamente reconhecidos por proteínas, ou complexos proteicos, receptores. Neste trabalho iremos focar o nosso interesse no transporte do tipo vesicular.

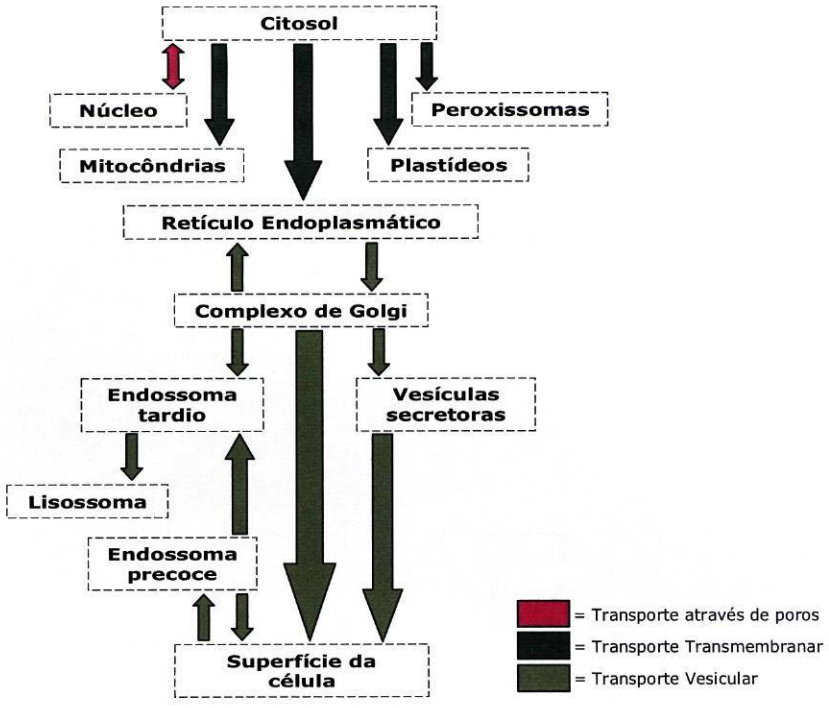



**Figura II-1 – Diagrama simplificado dos diferentes trajectos intracelulares seguidos pelas proteínas.** As proteínas podem mover-se entre compartimentos subcelulares através de poros (a violeta), ou ainda seguindo a via de transporte transmembranar (a azul) ou vesicular (verde). A jornada começa com a síntese nos ribossomas e termina no compartimento subcelular alvo e é determinada pela existência (ou não) de sinais de endereçamento específicos na sequência de aminoácidos do polipéptido. A via de transporte vesicular é a responsável pelo transporte de moléculas carga no sistema endomembranar. Adaptado de Alberts *et al.* (2002) (Alberts, *et al.*, 2002).

## 1.3 A via secretora e o transporte vesicular em plantas – A via secretora precoce

A acumulação de proteínas de armazenamento (algumas muito importantes na nutrição humana), a divisão celular, bem como a expansão da membrana citoplasmática e matriz extracelular, são todos fenómenos que requerem a síntese e transporte de membranas, proteínas e polissacarídeos ao longo da rede de estruturas e organelos da célula, e que estão dependentes de uma via secretora funcional e eficiente. Neste sentido, a via

biossintética secretora desempenha um papel fundamental, quer no desenvolvimento, quer na morfogénese das plantas.

A via secretora básica vegetal é composta por uma rede envolvida na síntese, modificação pós-translacional, endereçamento e transporte correctos de novas proteínas desde o RE, através do Golgi até ao apoplasto ou até ao(s) vacúolo(s). O trânsito de proteínas entre os vários sub-compartimentos destes organelos e entre compartimentos subcelulares distintos ocorre via transporte vesicular (Hadlington e Denecke, 2000, Matsuoka e Bednarek, 1998). O processo de transporte de proteínas solúveis na via secretora envolve destacamento de vesículas a partir de membranas dadoras seguido do endereçamento, reconhecimento e fusão com uma membrana aceitadora.

Tal como já foi referido, o endereçamento de proteínas em plantas e restantes eucariontes é um processo que requer o reconhecimento específico de SE por moléculas receptoras. Para proteínas solúveis, o reconhecimento ocorre no lúmen da via secretora. Os receptores dos SE têm que mediar a transdução de sinal através da membrana do organelo para transmitir a informação, sobre a presença de moléculas carga, aos factores citosólicos responsáveis pela regulação da formação de vesículas de transporte (Hadlington e Denecke, 2000).

Ao longo dos vários anos de investigação nesta área, tem-se verificado que os componentes moleculares básicos, identificados em modelos animais ou em leveduras e envolvidos na formação e utilização das vesículas secretoras, também existem nas plantas (Matsuoka e Bednarek, 1998). Esta conservação de mecanismos não constituiu uma surpresa, uma vez que a organização base do sistema secretor em plantas é morfologicamente semelhante ao dos outros eucariontes. No entanto, a via secretora de plantas apresenta características únicas, nomeadamente no que respeita ao transporte a partir do complexo de Golgi para os compartimentos vacuolares, que serão discutidas em maior detalhe neste trabalho.

### 1.3.1 O Retículo Endoplasmático

O retículo endoplasmático é o primeiro organelo da via secretora e é responsável pela síntese, modificação pós-translacional e transferência de proteínas após o seu correcto enrolamento, para o complexo de Golgi.

As proteínas que seguem a via secretora geralmente entram no RE durante o processo de tradução que é efectuado pelos ribossomas localizados à superfície do RER. Na realidade, a síntese destes polipéptidos inicia-se em ribossomas localizados no citosol. As proteínas que seguem a via secretora possuem uma sequência sinal *N*-terminal, o *signal peptide* (SP), reconhecida por um complexo citosólico - a Partícula de Reconhecimento do Sinal (PRS) que, ligando-se especificamente ao SP, leva ao bloqueio da tradução e

direcciona os ribossomas citosólicos livres para a superfície do RER. Este bloqueio só é levantado quando o conjunto ribossoma-mRNA-proteína nascente-PRS encontra uma cisterna de RER, onde o PRS reage com um receptor membranar específico que induz a libertação do SRP da cadeia de aminoácidos. A tradução reinicia-se ao mesmo tempo que a proteína é transportada para o lúmen do RER. A translocação de proteínas solúveis para o RE depende da presença do SP que é removido assim que esta região do polipéptido nascente atinge o lúmen do RE. Esta remoção é realizada por acção da peptidase do sinal, uma enzima localizada na superfície interna da membrana do RE.

Durante muitos anos pensou-se que a translocação de proteínas para o RE ocorria directamente através da bicamada lipídica que constitui a sua membrana, por intermédio do SP de natureza hidrofóbica. Estudos subsequentes vieram demonstrar que a translocação de proteínas através da membrana do RE é feita via poros compostos por múltiplas proteínas - os poros de translocação. Estes poros encontram-se geralmente na conformação inactiva por ligação de uma chaperonina do RE, a BiP (*binding protein*), ao seu lado lumenal. Quando a face citosólica do poro de translocação é ocupada por ribossomas, os poros passam a uma conformação activa pela libertação da BiP, deixando desta forma a entrada livre para o polipéptido em crescimento (Vitale e Denecke, 1999). A translocação unidireccional dos polipéptidos é conseguida por ciclos de ligação/libertação da BiP, ao poro de translocação.

Pensa-se que a remoção do SP no péptido em formação seja essencial para o correcto enrolamento de uma proteína. A assistir o enrolamento das proteínas translocadas para o RE estão as chaperoninas residentes neste organelo (ex: a BiP), que se associam transitoriamente aos polipéptidos, estabilizando-os e auxiliando o processo de enrolamento *in vivo* (Vitale e Denecke, 1999). Além das chaperoninas, algumas com homólogos citosólicos, há ainda outras proteínas já identificadas, específicas do RE, que também intervêm no processo de enrolamento de proteínas neste organelo, como por exemplo a dissulfureto isomerase (PDI) (catalisa a formação de pontes dissulfureto), a calnexina e a calreticulina (Crofts e Denecke, 1998).

O subsequente tráfego de uma proteína do RE para o *cis*-Golgi depende da estrutura que a proteína assume no RE. As proteínas mal enroladas são degradadas por proteases. Para o *cis*-Golgi só seguem as proteínas com uma estrutura terciária correcta e que passaram o controlo de qualidade (QC) do RE.

### 1.3.2 *N*-glicosilação

A modificação mais importante sofrida pelas proteínas no RE é a *N*-glicosilação. A *N*-glicosilação é geralmente uma modificação co-translacional (co-tradução), sendo a adição

dos hidratos de carbono feita aos polipéptidos em formação, mas pode também ocorrer após o processo de tradução (pós-tradução).

A *N*-glicosilação em plantas começa no RE pela transferência de um oligossacarídeo precursor (Glc3Man9GlcNAc2), de um transportador lipídico - o dolicol, para resíduos de Asn do polipéptido nascente embebidos em sequências tripeptídicas compostas por Asn-X-Ser/Thr, sendo que X pode ser qualquer aminoácido à excepção da prolina (Rayon, *et al.*, 1998). A oligossacariltransferase é a enzima responsável pela transferência do oligossacarídeo precursor do lípido para o polipéptido e está activa na região lumenal dos poros de translocação do RE (Vitale e Denecke, 1999). O oligossacarídeo precursor será subsequentemente modificado durante o processo de transporte da glicoproteína, por glucosidases e glucosiltransferases presentes no RE, no complexo de Golgi e no vacúolo.

Para a *N*-glicosilação ocorrer, além de terem que estar presentes na proteína tripéptidos com a composição Asn-X-Ser/Thr, também a região onde estes se localizam deve estar exposta de forma a que as glucosidases e glucosiltransferases consigam actuar. A representação esquemática dos passos de processamento sofridos pelos *N*-glicanos no RE e complexo de Golgi de plantas pode ser observada na Figura II-2.

Os *N*-glicanos presentes nas glicoproteínas vegetais podem ser de diferentes tipos (Figura II-3), nomeadamente (Lerouge, *et al.*, 1998):

i) *N*-glicanos do tipo simples - ricos em resíduos de manose;

ii) *N*-glicanos do tipo complexo - caracterizados pela presença de resíduos de α(1,3)-fucose e/ou β(1,2)-xilose ligados à *N*-acetilglucosamina proximal e ao resíduo central de β-manose, respectivamente, e de β(1,2)-*N*-acetilglucosamina ligada às unidades de α-manose. Este tipo de *N*-glicanos é tipicamente encontrado em glicoproteínas extracelulares. Recentemente foi ainda identificado um tipo adicional de *N*-glicano complexo, designado por *Lewis a antigens* ($Le_a$), e que contém resíduos extra de α(1,4)-fucose e β(1,3)-galactose ligados às unidades terminais de *N*-acetilglucosamina;

iii) *N*-glicanos do tipo híbrido – resultam do processamento apenas do ramo α(1,3) de manose levando ao surgimento de oligossacarídeos com α(1,3)-fucose e/ou β(1,2)-xilose ligados a GlcNAcMan5GlcNAc2;

iv) *N*-glicanos do tipo paucimanosídico (*paucimannosidic-type*) – caracterizados por possuírem apenas resíduos de um grupo de α(1,3)-fucose e/ou β(1,2)-xilose ligados, respectivamente à N-acetilglucosamina proximal e ao resíduo de β-manose, num núcleo constituído por Man3GlcNAc2. Este tipo de *N*-glicano é aquele vulgarmente encontrado em glicoproteínas vacuolares e resulta da eliminação no vacúolo dos resíduos terminais presentes em *N*-glicanos do tipo complexo.

Para o estudo do tráfego intracelular é importante notar que a estrutura dos *N*-glicanos presentes à superfície das glicoproteínas pode fornecer pistas importantes sobre o trajecto

intracelular seguido por uma proteína específica. A endoglucosidade-H (endoH) é uma enzima capaz de selectivamente remover de uma glicoproteína *N*-glicanos ricos em resíduos de manose. *N*-glicanos do tipo complexo são insensíveis à acção desta enzima. Os *N*-glicanos passam de sensíveis a resistentes à endoH, depois da actuação da α-manosidase II no Golgi (médio ou *trans*). Logo, proteínas que no seu trajecto biossintético não passem pelo complexo de Golgi possuirão apenas *N*-glicanos do tipo simples à sua superfície. Este facto constitui uma ferramenta útil no estudo do tráfego intracelular, uma vez que o uso de inibidores do trânsito membranar que actuem a montante do compartimento do Golgi no qual se encontra a α-manosidase II, levará a que proteínas glicosiladas, marcadoras ou em estudo, se mantenham numa forma sensível à acção da endoH. A sensibilidade dos açúcares de um polipéptido à digestão pela endoH é facilmente detectável em gel de SDS-PAGE, uma vez que a remoção de uma molécula de açúcar leva a uma diminuição aparente da massa molecular de uma glicoproteína de cerca de 2 kDa.

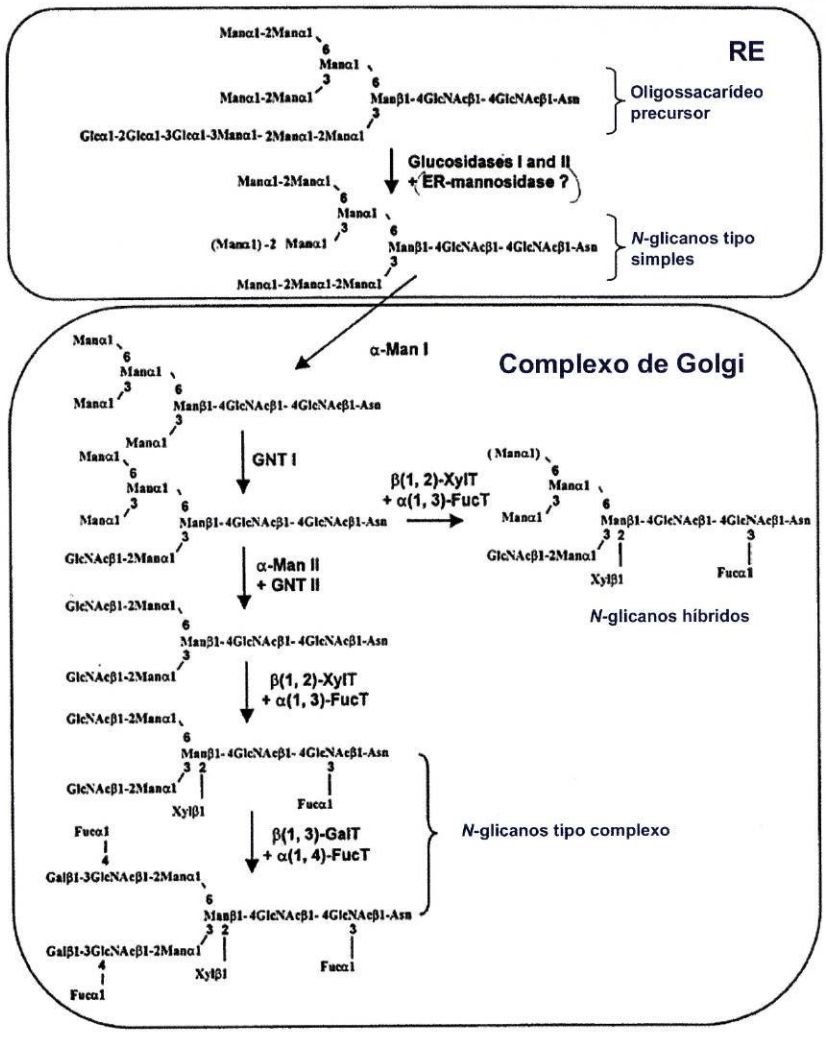



**Figura II-2– Representação esquemática do processamento sofrido pelos *N*-glicanos no RE e no complexo de Golgi de plantas.** α-Man I – α-manosidase I; α-Man II – α-manosidase II; GNT-I – N-acetilglucosaminiltransferase I; GNT-II – N-acetilglucosaminiltransferase II; β(1,2)-XylT – β(1,2)-xilosiltransferase; α(1,3)-FucT – α(1,3)-fucosiltransferase; β(1,3)-GalT – β(1,3)-galactosiltransferase; α(1,4)-FucT – α(1,4)-fucosiltransferase. Adaptado de Lerouge *et al.* (Lerouge, *et al.*, 1998).

Em eucariontes, os *N*-glicanos desempenham diversos papéis como a prevenção da degradação proteolítica de glicoproteínas ou a indução do enrolamento e actividade biológica correctos. Os *N*-glicanos podem ainda conter informação para o endereçamento de uma proteína para um determinado compartimento subcelular ou ainda estar envolvidos em reconhecimento de outros polipéptidos e em fenómenos de adesão celular (Lerouge, *et al.*, 1998, Rayon, *et al.*, 1998).

Em plantas, o estudo da(s) função(ões) dos *N*-glicanos tem sido feito recorrendo a diferentes abordagens, que resultam na completa supressão da *N*-glicosilação ou na interferência com o processamento de maturação dos *N*-glicanos, envolvendo a passagem de *N*-glicanos do tipo simples a *N*-glicanos do tipo complexo. Diversos estudos mostraram que em plantas os *N*-glicanos exercem uma forte influência sobre a conformação das glicoproteínas, sobre a sua estabilidade e sobre a sua actividade biológica (Lerouge, *et al.*, 1998, Rayon, *et al.*, 1998). Nos passos iniciais da síntese proteica, quando o polipéptido nascente atinge o interior do RE e sofre a acção da oligossacariltransferase, a presença dos *N*-glicanos afecta o enrolamento co- ou pós-tradução da proteína. Os *N*-glicanos parecem também proteger as proteínas vegetais da degradação proteolítica indesejada (Lerouge, *et al.*, 1998, Rayon, *et al.*, 1998).

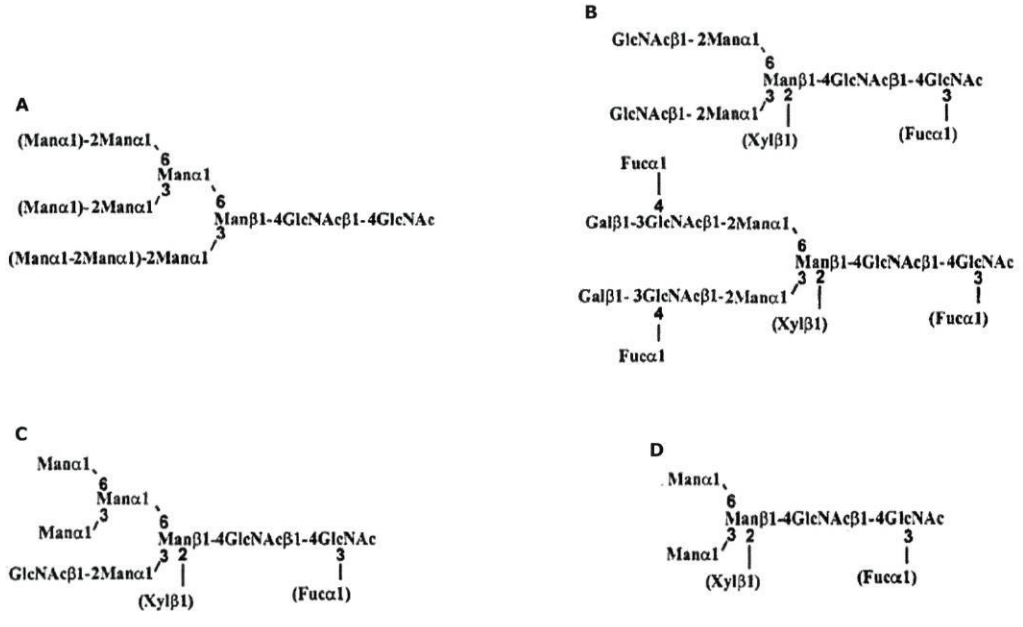



**Figura II-3 – Estrutura dos diferentes tipos de *N*-glicanos presentes em plantas.** A) *N*-glicanos do tipo simples (Man5GlcNAc2 a Man9 GlcNAc2); B) *N*-glicanos do tipo complexo, sendo o de baixo um *Le$_a$ antigen*; C) *N*-glicanos do tipo híbrido [GlcNAcMan5(Xyl)(Fuc)GlcNAc2); D) *N*-glicanos do tipo paucimanosídico [Man3(Xyl)(Fuc)GlcNAc2]. Adaptado de Lerouge *et al.* (Lerouge, *et al.*, 1998).

Em células animais, as cadeias laterais de oligossacarídeos podem funcionar como o SE das glicoproteínas do lisossoma. A fosforilação dos *N*-glicanos do tipo simples presentes nas hidrolases lisossomais ao nível do *cis*-Golgi resulta em glicoproteínas contendo moléculas de manose-6-fosfato (M-6-P) que, por sua vez, são reconhecidas por receptores

membranares específicos presentes na face lumenal do *trans*-Golgi e que determinam o subsequente transporte destas proteínas para o lisossoma.

A função dos *N*-glicanos no direccionamento de proteínas para o vacúolo das plantas tem sido extensivamente estudada. No entanto, não só os *N*-glicanos das glicoproteínas vegetais não sofrem fosforilação no Golgi, como até à data, não foram ainda identificados receptores para a M-6-P nestes organismos. Verificou-se ainda, para todas as hidrolases vacuolares estudadas, que o direccionamento de glicoproteínas para o vacúolo não é afectado pela presença de inibidores da *N*-glicosilação como a tunicamicina (Rayon, *et al.*, 1998). Estes resultados parecem indicar portanto que os *N*-glicanos presentes nas proteínas de origem vegetal não desempenham um papel significativo no correcto endereçamento destas para o vacúolo (Rayon, *et al.*, 1998); no entanto, este assunto continua a ser alvo de debate na comunidade científica, visto haver dados aparentemente contraditórios (Mitsuhashi, *et al.*, 2001, Sparvoli, *et al.*, 2000).

Também tem sido estudada a possível função das cadeias laterais de oligossacarídeos na secreção de glicoproteínas vegetais para o apoplasto. Na presença do supressor da *N*-glicosilação, tunicamicina, a maioria das proteínas extracelulares *N*-glicosiladas deixa de ser secretada. No entanto, o processamento de *N*-glicanos do tipo simples para *N*-glicanos do tipo complexo não parece ser um factor necessário para a ocorrência do transporte e secreção de glicoproteínas extracelulares em plantas (Rayon, *et al.*, 1998). Este conjunto de resultados serviu para demonstrar que a maturação de *N*-glicanos no Golgi, não é essencial para que ocorra a eficiente secreção de glicoproteínas de origem vegetal. É possível que a inibição de secreção dependente da aplicação de tunicamicina se deva a uma correlação entre a falta de cadeias oligossacarídicas no polipéptido e um deficiente enrolamento das proteínas em causa o que leva a uma retenção destas no RE pelo controlo de qualidade. Outras explicações possíveis para a não secreção de proteínas extracelulares quando na presença de inibidores da *N*-glicosilação, prendem-se com o facto de uma glicoproteína não glicosilada ser um alvo desprotegido à acção de proteases durante o seu transporte ou no seu destino final pela acção de proteases do apoplasto. Não é possível ainda descartar a hipótese das proteínas não serem secretadas simplesmente por falta de um SE (não identificado) para o apoplasto e que pode ser o próprio *N*-glicano (Lerouge, *et al.*, 1998, Rayon, *et al.*, 1998).

### 1.3.3 O Complexo de Golgi

O termo complexo de Golgi refere-se ao conjunto de unidades constituídas por pilhas de cisternas (ou sáculos) achatadas, vesículas de secreção que se encontram à periferia destas cisternas e rede *trans* do Golgi (TGN) de cada célula (Staehelin e Moore, 1995). Cada conjunto de cisternas empilhadas contém uma panóplia completa de enzimas do Golgi

e, em conjunto com a sua TGN associada, corresponde a uma unidade funcional independente, do complexo de Golgi (Staehelin e Moore, 1995). O número de cisternas golgianas e a sua distribuição intracelular varia grandemente, dependendo da espécie de planta, tipo e estado de desenvolvimento da célula, e especificidade e quantidade de moléculas produzidas num determinado momento pelo sistema endomembranar (Dupree e Sherrier, 1998).

Estruturalmente, o complexo de Golgi das plantas, tal como o das células animais, é composto por numerosas cisternas empilhadas, que exibem uma organização polar típica *cis-trans*. Esta polaridade reflecte a organização vectorial subjacente das cisternas que recebem produtos de natureza proteica, a partir do RE, na sua face *cis-* e os exportam, após processamento, desde a sua face *trans-*(Staehelin e Moore, 1995). Tanto nas células animais como vegetais, o complexo de Golgi desempenha um papel fundamental na biossíntese e processamento de polissacarídeos complexos bem como na maturação dos *N*-glicanos das glicoproteínas que ocorre segundo a direcção *cis-trans*.

O processo de divisão celular faz sobressair uma grande diferença entre os complexos de Golgi animal e vegetal. Nas células animais, para se assegurar a partição correcta das membranas durante a citocinese, a secreção pára e o complexo de Golgi fragmenta-se em vesículas, voltando a formar-se após a mitose. Pelo contrário, nas células vegetais o complexo de Golgi tem de se manter intacto e funcional para que ocorra a citocinese. É ainda de notar que o complexo de Golgi está implicado na biossíntese de grande parte da parede celular que rodeia cada célula vegetal, nomeadamente no que respeita à biossíntese de polissacarídeos complexos (Dupree e Sherrier, 1998).

Contrastando com os conjuntos de cisternas de Golgi das células animais, que geralmente se encontram aglomerados em determinados pontos do citoplasma, nas células vegetais, as unidades funcionais do complexo de Golgi encontram-se dispersas uma a uma, ou associadas em pequenos agrupamentos distribuídos pelo citoplasma (Staehelin e Moore, 1995). Esta organização aparentemente aleatória do complexo de Golgi em células vegetais contrapõe-se fortemente ao complexo de Golgi observado nas células animais e que é altamente organizado. Presumivelmente, estas diferentes formas de organização espacial reflectem diferentes mecanismos de controlo do posicionamento das membranas golgianas e, de uma forma similar, a distinta distribuição do Golgi entre estes dois tipos de organismos possivelmente impõe diferentes requisitos para o transporte de vesículas de e para o Golgi (Staehelin e Moore, 1995).

A característica mais marcante do complexo de Golgi vegetal é, sem dúvida, a sua grande mobilidade. É sabido que nas células animais, a posição justanuclear do complexo de Golgi depende da presença de um citoesqueleto de tubulina intacto. Nestas células, a manutenção da posição central das membranas de Golgi, agrupadas à volta do

centrossoma e na proximidade do núcleo, deve-se à ancoragem da suas cisternas *cis*- à extremidade negativa dos microtúbulos (Infante, *et al.*, 1999). Também o transporte vesicular entre o RE e o complexo de Golgi com uma localização central, bem como o transporte pós-Golgi para a periferia da célula ocorre de uma forma organizada, ao longo de uma rede de microtúbulos. Num contraste evidente com o modelo acima descrito, nas Angiospérmicas, os conjuntos de sáculos empilhados e a TGN, constituintes do complexo de Golgi vegetal, encontram-se dispersos pelo citoplasma, e não agregados numa região específica da célula. Este tipo de distribuição difusa, reduz consideravelmente a distância a percorrer pelas vesículas de transporte, tanto do RE para o Golgi, como deste para o apoplasto ou vacúolo (Nebenfuhr, *et al.*, 1999).

Ao estudar o movimento de uma proteína de fusão direccionada para o Golgi (ST-GFP; sinal *N*-terminal de retenção no Golgi da *syalil transferase* fundido com a GFP) em epiderme de *Nicotiana tabacum*, Boevink e colaboradores (1998) mostraram que as cisternas fluorescentes de Golgi eram transportadas ao longo de filamentos de actina aos quais o RE também se encontrava associado, filamentos estes localizados nas regiões corticais da célula, nomeadamente nos cordões citoplasmáticos (Boevink, *et al.*, 1998). Estes resultados, em que as cisternas de Golgi surgiam associadas a túbulos de RE, revelaram a existência, nas células vegetais, de uma relação espacial estreita entre RE e Golgi. Os mesmos autores foram ainda responsáveis pelas primeiras descrições dos tipos de movimento apresentado pelo Golgi neste sistema, mais propriamente, o movimento do Golgi na mesma direcção e no encalço do RE cortical com "saltos" ocasionais para zonas móveis de RE (previamente observadas em *Nicotiana tabacum* por Boevink *et al.* em 1996 (Boevink, *et al.*, 1996)) e a alternância entre fases de motilidade e fases estacionárias do Golgi (*stop/start*). Estas observações levaram à apresentação de um modelo explicativo do transporte de proteínas do RE para o Golgi que assume que o movimento rápido do Golgi nas plantas permite a recolha contínua por este, de vesículas que se formam no RE – o modelo *vacuum cleaner*. Este modelo postula que toda a superfície do RE é capaz de realizar exportação de proteínas através de transporte vesicular, e que o complexo de Golgi tem que estar continuamente em movimento para recolher as vesículas que despontam no RE.

O movimento apresentado pelo complexo de Golgi vegetal foi posteriormente estudado por Nebenführ e colaboradores (1999), recorrendo a uma proteína de fusão fluorescente direccionada para o Golgi (GmManI::GFP ou *Glycine max* α(1,2)-manosidase fundida com GFP) e expressa em células BY2 (*Bright Yellow* 2) (Nebenfuhr, *et al.*, 1999). Demonstraram que nestas células, as cisternas golgianas realizam movimentos *Stop-and-Go*, oscilando rapidamente entre um tipo de movimento direccionado e um balancear aparentemente aleatório. O movimento direccionado do Golgi está directamente relacionado com a ocorrência de correntes citoplasmáticas e segue uma trajectória linear. Este tipo de

movimento está dependente da existência de um citoesqueleto intacto de actina e filamentos motores de miosina, uma vez que tratamentos com citocalasina D/latrunculina A (induzem a despolimerização do citoesqueleto de actina) têm como efeito a paragem dos movimentos orientados do complexo de Golgi. O movimento aleatório não é afectado pelo uso destes inibidores. O tipo de movimento direccionado não parece estar associado a microtúbulos, visto que drogas que interferem com a integridade do citoesqueleto de tubulina (ex: colquicina) não têm qualquer efeito inibitório sobre o movimento das cisternas de Golgi. As cisternas de Golgi que num determinado momento não participam num movimento direccionado, exibem um tipo de vibração ou agitação (*wiggle*). As cisternas de Golgi que participam nos movimentos de corrente citoplasmática apresentam uma motilidade saltatriz, alternando entre episódios de movimentação linear rápida e períodos de relativa inactividade em que se observa a oscilação aleatória dos sáculos. Nebenführ e colaboradores (1999) apresentaram uma hipótese explicativa para o tipo de motilidade saltatriz exibida pelo complexo de Golgi das plantas, associada à emergência de um novo modelo para o transporte de proteínas do RE para o Golgi. Segundo o modelo destes autores, os locais de exportação (*export sites*) do RE, com uma localização determinada e estática à sua superfície, produzem sinais localizados (*STOP signals*) que levam à separação das cisternas golgianas dos filamentos de actina, e à sua disposição espacial perto do local de exportação do RE, o que aumentaria a eficiência do transporte entre RE e Golgi e vice-versa. Os autores sugerem que é, possivelmente, durante estas pausas de movimento do Golgi que ocorre o movimento de matéria entre o RE e o *cis*-Golgi, uma vez que é altamente improvável que vesículas de transporte se formem, desloquem, e fundam com a membrana alvo em apenas um segundo. Após o término da transferência de material entre estes dois compartimentos subcelulares, o sinal de paragem do RE seria desactivado, permitindo o retomar do movimento pelo Golgi. Um sinal semelhante seria produzido por zonas celulares onde produtos sintetizados pelo complexo de Golgi seriam requeridos, como áreas de expansão da parede celular, o que por sua vez explicaria a secreção direccionada, a partir do Golgi, para determinadas regiões da parede celular em detrimento de outras.

O modelo *Stop-and-Go* é suportado pela observação resultante do trabalho de Brandizzi e colaboradores (2002), em que descrevem que o movimento do Golgi com base em filamentos de actina não é necessário para que ocorra transporte de proteínas entre o RE e o complexo de Golgi (Brandizzi, *et al.*, 2002). No entanto, estes autores avançaram com um terceiro modelo explicativo para o transporte de proteínas entre RE e Golgi, menos estacionário no que respeita à superfície do RE, e que propõe que a exportação de proteínas a partir deste é restrita a determinados *export sites*. Estes *export sites* podem deslocar-se na superfície do RE ou a sua mobilidade está dependente do movimento da totalidade da superfície do RE. Desta forma, as cisternas de Golgi e os *export sites* do RE

mover-se-iam juntos, sobre o citoesqueleto de actina, formando pequenas unidades de secreção independentes. Os diferentes modelos de transporte para o complexo de Golgi encontram-se sumariamente representados na Figura II-4.

A organização do sistema endomembranar das plantas difere significativamente daquele descrito para as células animais, no qual as estruturas golgianas se associam com microtúbulos em vez de actina. Apesar de animais e plantas possuírem idêntico citoesqueleto de actina e tubulina, a sua utilização por células de origens distintas é fundamentalmente diferente.

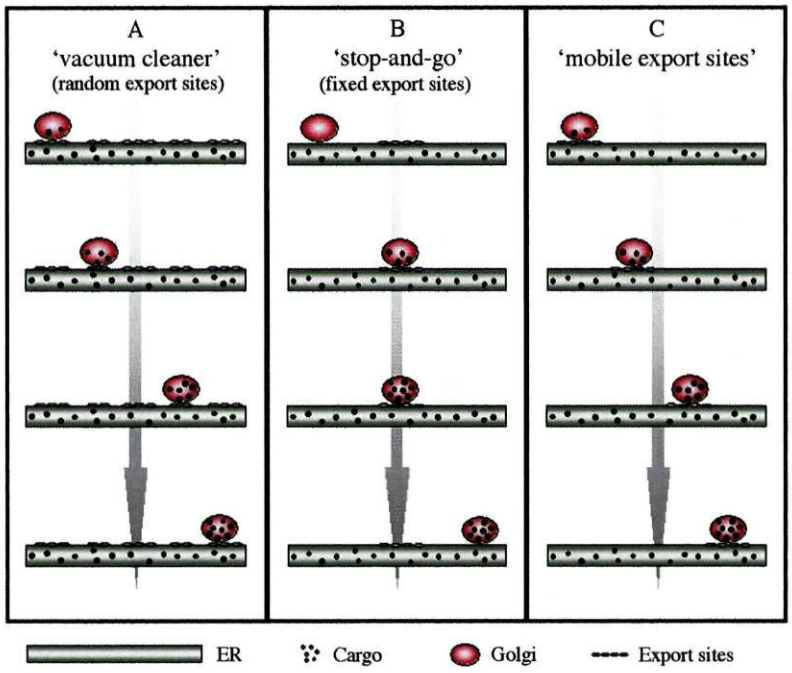



**Figura II-4 - Modelos de transporte de proteínas do RE para o complexo de Golgi.** A) o modelo *vacuum cleaner* - as cisternas de Golgi movem-se sobre o RE estando constantemente a recolher carga. De acordo com este modelo, toda a superfície do RE é capaz de formar export sites, o que resulta na distribuição aleatória destes. B) o modelo *Stop-and-Go* - as cisternas de Golgi param em export sites fixos no RE para recolherem a sua carga, antes de se deslocarem até à próxima paragem. C) o modelo *mobile export sites* – as cisternas de Golgi e os export sites do RE movem-se em conjunto como unidades de secreção permitindo o transporte da carga do RE para o Golgi a qualquer altura durante o movimento. In Neumann *et al.* (Neumann, *et al.*, 2003).

Sumariando, nas células animais os microtúbulos constituem o suporte básico para o transporte de organelos incluindo o complexo de Golgi, o RE, lisossomas e vesículas secretoras, enquanto nas células vegetais é o citoesqueleto com actina o responsável pela manutenção da organização espacial dos componentes do sistema endomembranar. A implicação do envolvimento dos microtúbulos em outros processos dinâmicos nas plantas, como o posicionamento do núcleo e transporte de vesículas durante a citocinese sugere que, apesar do papel destes não se encontrar totalmente definido, os microtúbulos parecem estar na base de movimentos independentes daqueles realizados sobre filamentos de actina. Os microtúbulos podem ainda ser os responsáveis pela translocação de organelos entre filamentos de actina. Estudos levados a cabo com células animais e leveduras parecem apontar para a existência de uma cooperação entre sistemas de transporte com

suporte em microtúbulos e filamentos de actina. Desta forma, é possível que a actividade coordenada entre mobilidades dependentes de microtúbulos ou de actina constitua um princípio geral de transporte de organelos em células eucarióticas.

### 1.3.4 Transporte vesicular entre RE e complexo de Golgi

Tal como já foi referido, o transporte de proteínas e membranas entre compartimentos subcelulares da via secretora é mediado por pequenas estruturas transportadoras, as vesículas de transporte.

O processo de formação de vesículas começa com o recrutamento de proteínas de revestimento no local onde a vesícula começa a despontar e onde ocorre também a selecção da carga a transportar por aquele tipo específico de vesícula de transporte (Ueda e Nakano, 2002). Este processo complexo envolve duas famílias distintas de GTPases: as GTPases Sar1/Arf e Rab/Ypt (Ueda e Nakano, 2002).

No início da formação da vesícula, a GTPase Sar1 ou Arf, depois de activada, desencadeia o recrutamento do respectivo complexo de revestimento proteico (*coat protein complex* – COP) na membrana dadora. As proteínas constituintes do revestimento das vesículas desempenham dois papéis de extrema importância, uma vez que são as responsáveis pela deformação da membrana para formar uma protuberância que evoluirá para uma vesícula, e participam na selecção das moléculas que constituirão a carga de transporte (Nebenfuhr, 2002). Completada a formação de uma vesícula num compartimento subcelular dador, esta é libertada, transportada, ancorada e finalmente acaba por se fundir com a membrana de um compartimento subcelular aceitador. A determinar a especificidade da fusão de vesículas com a sua membrana alvo estão um conjunto de proteínas associadas à membrana, as GTPases Rab/Ypt e as SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor adaptor protein receptors*).

Foi levantada a hipótese de, nas células vegetais, o tráfego vesicular ser operado por uma maquinaria molecular semelhante à encontrada nos restantes organismos eucariontes. Na realidade, muitas GTPases, SNAREs e suas proteínas associadas, já identificadas em animais e leveduras, parecem ser também codificadas pelo genoma de plantas (Sanderfoot, *et al.*, 2000, Ueda e Nakano, 2002). No entanto, apesar da homologia a nível molecular, existem diferenças consideráveis entre o trânsito vesicular em plantas e outros eucariontes que têm que ser consideradas. As plantas parece terem desenvolvido sistemas de transporte únicos, destinados a executar fenómenos específicos deste filo, usando maquinaria conservada com as apropriadas modificações (Ueda e Nakano, 2002).

Vesículas COPII

O transporte de proteínas ao longo da via secretora começa pela entrada destas no RE e sua subsequente exportação para o complexo de Golgi. A exportação de moléculas proteicas a partir do RE é realizada em vesículas de transporte que possuem um tipo de revestimento característico, o revestimento COPII. As vesículas COPII surgem em regiões específicas do RE denominadas *export* ou *exit sites,* já referidos na secção 1.3.3.

A formação das vesículas COPII começa com o recrutamento dos componentes do seu revestimento, do citoplasma para a superfície do RE, por acção da GTPase Sar1 (Figura II-5) (Barlowe, 2003, Kirchhausen, 2000). A Sar1, cuja forma citosólica ligada à guanina difosfato (GDP) é inactiva, sofre activação por acção de um *guanine-nucleotide-exchange factor* (GEF), mais propriamente o Sec12p, localizado na membrana do RE. Depois de activada, a Sar1 ligada à guanina trisfosfato (GTP) passa de solúvel a membranar por intermédio da sua cauda lipídica, e é sob esta forma que será responsável pelo recrutamento dos constituintes do revestimento COPII (Alberts, *et al.*, 2002, Barlowe, 2002). Interferências na actividade da GTPase Sar1 levam a um bloqueio do transporte vesicular anterógrado entre RE e complexo de Golgi, quer em plantas quer em animais (Andreeva, *et al.*, 2000, Takeuchi, *et al.*, 2000).

Nos eucariontes, as proteínas do revestimento COPII associadas à Sar1, são as responsáveis pela mediação na exportação de moléculas desde o RE até ao Golgi (Aridor, *et al.*, 1998, Barlowe, 2002, Barlowe, *et al.*, 1993, Kuehn, *et al.*, 1998). Originalmente pensou-se que a carga das vesículas de transporte seria constituída por todas as proteínas que não possuíam informação para retenção no RE – o sinal K/HDEL *C*-terminal, e que, por defeito, seriam incluídas nas vesículas para posterior exportação, o chamado *bulk flow*. Actualmente sabe-se que o acondicionamento de polipéptidos nas vesículas de transporte é um processo parcialmente selectivo, e que certas proteínas são activamente recrutadas para o lúmen das vesículas para serem exportadas (Aridor, *et al.*, 1998, Miller, *et al.*, 2003). É possível que o transporte de proteínas em vesículas COPII seja determinado pela presença, à superfície da molécula, de sinais de exportação reconhecidos por polipéptidos receptores complementares, aprisionados na vesícula em formação por interacção com os componentes do revestimento (Alberts, *et al.*, 2002). Foram identificados alguns sinais possivelmente implicados na determinação do transporte por vesículas COPII, no entanto, a diversidade da carga proteica incluída nestas vesículas é enorme, e muitas proteínas que são exportadas via COPII não apresentam quaisquer sinais de exportação identificáveis (Barlowe, 2003). Foi ainda demonstrado que proteínas sem sinais de exportação reconhecidos podem também ser incluídas nestas vesículas de transporte, bem como proteínas residentes no RE que por vezes são transportadas, ainda que a um ritmo muito lento, em vesículas COPII. Também, proteínas cujo destino seria a secreção, quando

sintetizadas em elevadas concentrações, deixam o RE via vesículas COPII sem a colaboração de receptores específicos para o seu transporte (Crofts, *et al.*, 1999).

A existência de sinais de exportação que determinam o transporte de proteínas via vesículas COPII é, ainda hoje, objecto de debate. A complexidade da selectividade da maquinaria de exportação do RE é aumentada pela existência de um controlo de qualidade, e subsequente reconhecimento apenas de proteínas enroladas correctamente, em oposição à retenção de polipéptidos mal enrolados.

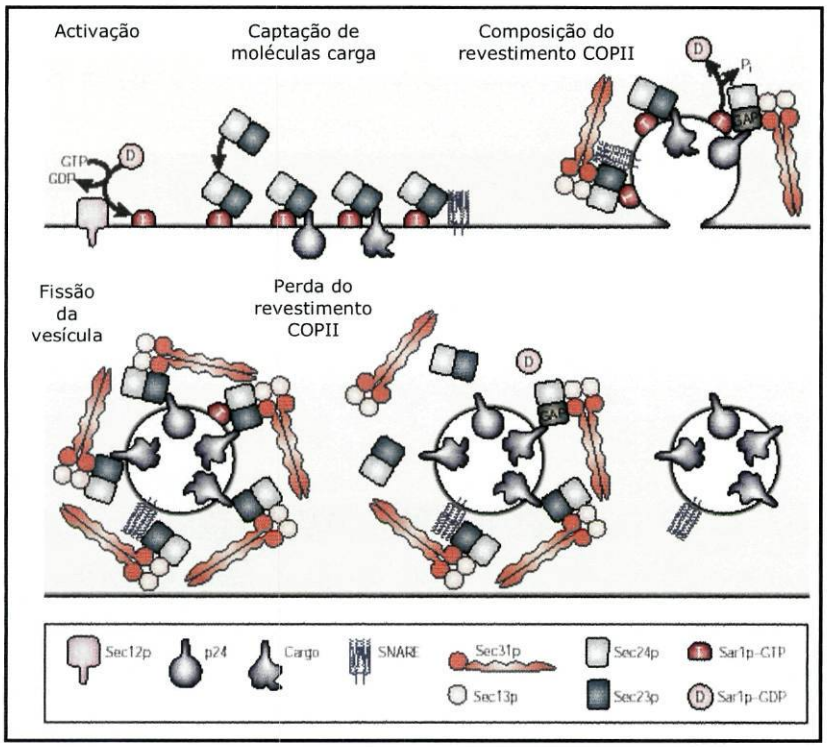



**Figura II-5 – Representação esquemática da formação de uma vesícula COP II.** O processo de composição do revestimento COPII é activado pela Sar1-GTP na membrana dadora. Isto vai permitir a ligação do complexo Sec23-Sec24 e consequente captação de moléculas carga. O complexo Sec13p-Sec31p é o próximo a ligar-se levando à deformação da membrana. Completada a composição do revestimento, há o destacamento da vesícula. A actividade de GTPase da Sar1p é estimulada pela Sec23p, que funciona como um cronómetro, levando à inactivação da Sar1p e consequente perda do revestimento da vesícula, essencial para a fusão com a membrana aceitadora. Adaptado de Kirchhausen T (Kirchhausen, 2000).

Vesículas COPI

Na via secretora, o transporte anterógrado de proteínas correctamente enroladas, é equilibrado por uma via de transporte vesicular retrógrado, dependente da formação de um segundo tipo de revestimento, o revestimento COPI (Barlowe, 2003). As vesículas COPI ocorrem em vários contextos intracelulares e a versatilidade das suas funções parece indicar uma maior complexidade bioquímica do que a apresentada pelas vesículas COPII (Kirchhausen, 2000, Wieland e Harter, 1999). A formação das vesículas COPI depende do recrutamento dos componentes do seu revestimento, já acoplados, do citoplasma para a superfície do Golgi, por acção da GTPase Arf1 após activação pelo(s) seu(s) respectivo(s) GEF (Figura II-6) (Kirchhausen, 2000, Wieland e Harter, 1999). Em plantas, tanto o revestimento COPI como a Arf1 foram localizados, por imunocitoquímica, na periferia do

Golgi (Pimpl, *et al.*, 2000). Nas vesículas COPI, e de uma forma análoga ao verificado para as COPII, a selecção de carga incluída nas vesículas de transporte, parece ser mediada ou reconhecida pelos componentes do seu revestimento (Kirchhausen, 2000).

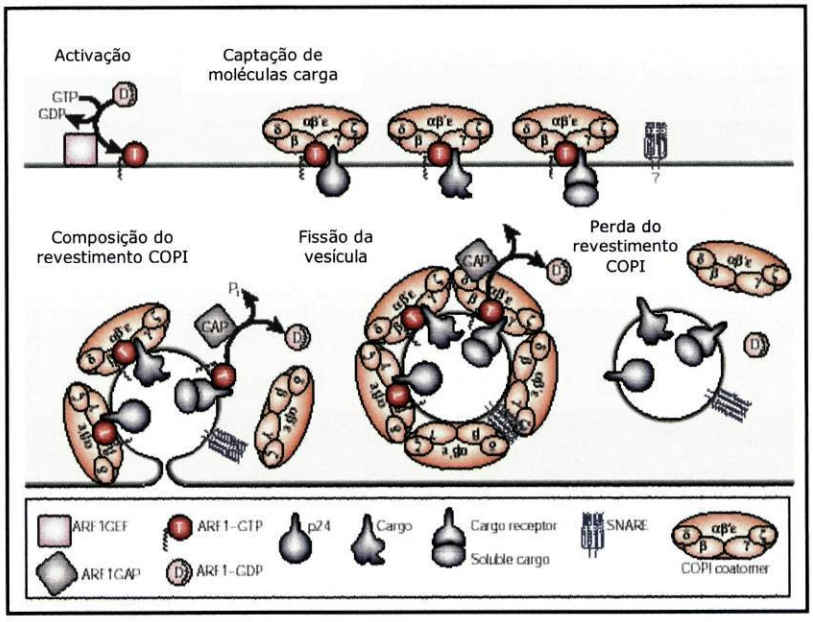



**Figura II-6 – Representação esquemática da formação de uma vesícula COPI.** O processo de composição do revestimento COPI é activado pelo recrutamento da Arf1-GTP na membrana dadora. Isto vai permitir a ligação dos componentes do revestimento COPI e consequente captação de moléculas carga. A deformação da membrana ocorre ao mesmo tempo que o recrutamento dos componentes do revestimento. Assim que o revestimento da vesícula fica completo, segue-se o seu destacamento da membrana dadora. A actividade de GTPase da Arf1 é estimulada pela Arf1-GAP (Arf1-GTPase *activating protein*), que funciona como um cronómetro, levando à inactivação da Arf1 e consequente perda do revestimento da vesícula, essencial para a fusão com a membrana aceitadora. Arf1 - ADP-*ribosylation factor 1*. Adaptado de Kirchhausen T (Kirchhausen, 2000).

Embora o tráfego regulado pelas vesículas COPII seja inquestionavelmente unidireccional, a direcção do transporte mediado pelas vesículas COPI ainda é fonte de controvérsia. As vesículas COPI são as responsáveis pelo transporte retrógrado do Golgi para o RE e entre cisternas golgianas. Este tipo de transporte serve para reciclar componentes necessários à formação de vesículas no RE e para recuperar proteínas residentes no RE que possam ter sido incorporadas em vesículas COPII, escapando desta forma deste organelo.

O modelo de transporte vesicular do Golgi admite que a manutenção da compartimentação funcional deste complexo é mantida via transporte vesicular, presumivelmente realizado em ambas as direcções por vesículas COPI. A demonstração do envolvimento das vesículas COPI no transporte anterógrado entre cisternas do Golgi, provaria o envolvimento deste tipo de vesículas no transporte bidireccional de proteínas (Kirchhausen, 2000). O modelo alternativo de maturação do Golgi, o modelo de maturação de cisternas, admite que os próprios sáculos se movem ao longo do complexo de Golgi do qual fazem parte e que a manutenção da população enzimática que assegura a compartimentação e polaridade das cisternas de Golgi seria assegurada pelo transporte retrógrado, através de vesículas COPI.

As vias de transporte mediadas pelas vesículas COPII e COPI controlam o trânsito de proteínas entre o RE e o complexo de Golgi e são interdependentes devido à necessidade de reciclagem da maquinaria de transporte vesicular. A inibição de uma destas vias de transporte pode levar ao colapso da sua correspondente via retrógrada, ou vice-versa.

Fusão de vesículas

A finalização da formação de uma vesícula é seguida da sua libertação a partir de um compartimento subcelular dador, com o objectivo último de fusão com a membrana de um compartimento subcelular alvo, e consequente libertação do conteúdo vesicular. A fusão entre membranas pode ser homotípica, se a fusão ocorre entre membranas originárias do mesmo compartimento subcelular, ou heterotípica, se ocorre entre membranas de origens subcelulares distintas.

O processo de fusão entre uma vesícula e a sua membrana aceitadora é precedido pela perda do revestimento da primeira. A perda do revestimento das vesículas COPII e COPI é despoletada pela acção de *GTPase activating proteins* (GAPs) específicas para a Sar1 e Arf1, respectivamente, e que promovem a hidrólise do GTP associado a estas GTPases. A perda de revestimento de uma vesícula é essencial para que haja a exposição eficiente das proteínas associadas à sua membrana, que medeiam a ancoragem e determinam a especificidade de fusão com a membrana alvo.

As proteínas responsáveis pela determinação da especificidade e subsequente fusão entre uma vesícula de transporte e sua membrana alvo correspondente são, entre outras, as Rab GTPases e as SNAREs. Tanto as Rab como as SNAREs possuem uma distribuição característica no sistema endomembranar das células eucarióticas que determina a especificidade de reconhecimento entre vesículas de transporte e membranas alvo. Em relação às Rab GTPases por exemplo, cada organelo apresenta pelo menos um tipo destas proteínas na sua face citosólica. Na Figura II-7 encontra-se representada a distribuição e passos de transporte intracelular em que estão envolvidas diferentes Rab identificadas em eucariontes.

A ancoragem de uma vesícula de transporte à membrana do compartimento a que se destina é regulada pelas Rab em animais e plantas, e homólogas Ypt em leveduras. A determinação da especificidade de fusão entre membranas de uma vesícula de transporte e de um compartimento aceitador está dependente do emparelhamento entre uma SNARE presente na vesícula de transporte (v-SNARE) com a SNARE correspondente, localizada na membrana aceitadora (t-SNAREs). As Rab, sob a forma *GTP-bound* e associadas à face citosólica da membrana da vesícula de transporte, são reconhecidas por um GEF específico presente na membrana do compartimento alvo, resultando na ancoragem da vesícula à membrana aceitadora. O emparelhamento entre as v- e t-SNAREs vai permitir a

aproximação física entre as duas membranas, necessária para que ocorra a fusão entre estas, com a subsequente libertação do conteúdo da vesícula no lúmen do organelo alvo.

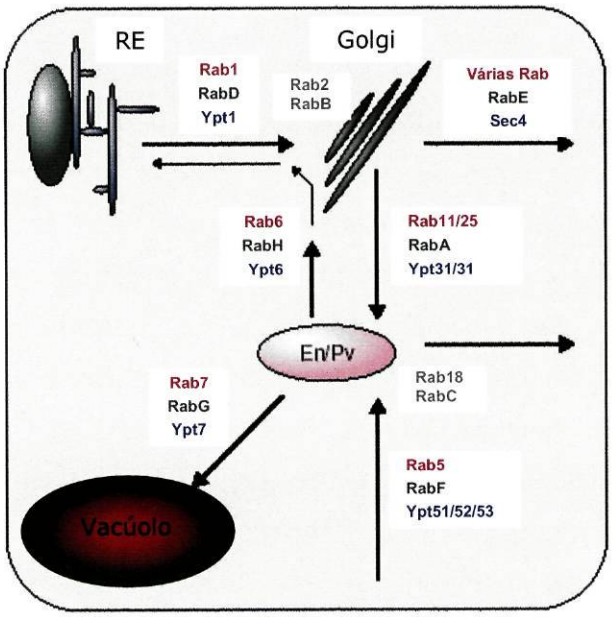



**Figura II-7 – Representação esquemática da distribuição e passos de transporte intracelular em que estão envolvidas distintas Rab GTPases.** As Rabs isoladas a partir de mamíferos encontram-se assinaladas a vermelho, a partir de plantas, a verde e a partir de leveduras a azul. A cinzento, encontram-se representadas as classes de Rabs sem homólogos conhecidos em leveduras. (En/Pv) endossoma/pré-vacúolo. Adaptado de Rutherford and Moore (Rutherford e Moore, 2002).

Os componentes envolvidos na fusão de vesículas ao nível de RE e Golgi em mamíferos e leveduras parecem actuar de uma forma semelhante nas plantas. Apesar das SNAREs envolvidas nesta parte do sistema endomembranar ainda não estarem caracterizadas em detalhe, foi já demonstrado o envolvimento da *At*RabD2a (*At*Rab1b), *At*RabD2a (*At*Rab1h) e *Nt*Rab2 no transporte entre RE e Golgi, recorrendo a mutantes destas proteínas (Batoko, *et al.*, 2000, Cheung, *et al.*, 2002). Com base nestes e outros estudos parece claro que a maquinaria básica para a produção de vesículas na interface RE-Golgi é a mesma em plantas e outros eucariontes.

### 1.3.5 Efeito da Brefeldina A (BFA) sobre o transporte entre RE e Golgi

A Brefeldina A (BFA) é um metabolito de origem fúngica conhecido pelo seu efeito inibitório sobre a secreção observado numa grande variedade de células eucarióticas. A BFA inibe a activação da Arf1 pelos respectivos GEFs, bloqueando assim a formação de vesículas do tipo COPI, consequentemente inibindo o transporte retrógrado entre o Golgi e RE, e entre cisternas constituintes do complexo de Golgi. Tanto em células animais como em células vegetais, o tratamento prolongado com BFA induz a fusão entre Golgi e RE, resultando na formação de um compartimento subcelular aberrante híbrido. É de salientar que embora os efeitos primários da BFA em animais e plantas sejam idênticos, nas plantas estes são seguidos por efeitos secundários que apenas imitam as respostas das células de

mamífero (Ritzenthaler, *et al.*, 2002). Nas células animais, a inibição da secreção induzida pela BFA leva a uma perda rápida da integridade estrutural de todo o sistema secretor, mais notória no complexo de Golgi, que desenvolve estruturas tubulares que se estendem da sua posição perinuclear para a periferia da célula, acabando por se fundir com o RE (Ritzenthaler, *et al.*, 2002). De uma forma contrastante, as células vegetais não perdem a integridade estrutural do seu complexo de Golgi logo após tratamento com BFA. As respostas observadas em células de plantas em presença da BFA vão desde a aparente perda das cisternas do *cis*-Golgi, acompanhada de um aumento concomitante das cisternas na posição *trans*-, a uma acumulação das membranas golgianas em agregados resultantes da acção da BFA, denominados compartimentos BFA e, em alguns casos, à completa fusão entre Golgi e RE (Ritzenthaler, *et al.*, 2002). Apesar de nos dois tipos de organismos o efeito resultante da acção da BFA ser semelhante (fusão entre Golgi e RE), nas células de origem vegetal a fusão entre estes organelos ocorre de uma forma mais gradual do que nos restantes eucariontes e não depende de elementos do citoesqueleto de tubulina ou actina (Saint-Jore, *et al.*, 2002). Mais importante ainda, a estrutura do Golgi das plantas parece manter-se até que ocorre a fusão entre este e o RE, já que a BFA não parece afectar o trânsito anterógrado de vesículas a partir do RE. É possível que a maior resistência estrutural do complexo de Golgi vegetal à acção da BFA quando comparado com o Golgi de origem animal, resulte de uma adaptação deste organelo ao tipo de movimentação *Stop-and-Go* sobre filamentos de actina observado nas plantas, que exigiria uma elevada estabilidade estrutural do organelo em causa.

Um outro efeito da BFA, extensivamente documentado para as células de mamífero e também observado em plantas, é a completa redistribuição das enzimas do Golgi no RE (Boevink, *et al.*, 1998, Ritzenthaler, *et al.*, 2002, Saint-Jore, *et al.*, 2002). Esta observação parece contraditória, uma vez que a brefeldina A inibe a formação de vesículas COPI, responsáveis pelo transporte retrógrado. Nebenführ e colaboradores (2002) avançaram com uma explicação para este facto, baseada na interacção entre factores de ancoragem (como as Rab GTPases), e as v- e t-SNAREs. Sabe-se que a fusão entre duas membranas está dependente da interacção entre um complexo v-SNARE na vesícula com o seu correspondente t-SNARE da membrana alvo, e estudos *in vitro* e *in vivo* provaram a ocorrência da concentração de SNAREs nas vesículas COPI aquando da sua formação. Logo, se a formação destas vesículas é inibida pela BFA, a população de v-SNAREs nas membranas do Golgi presumivelmente irá subir, aumentando assim temporariamente as hipóteses de fusão directa e descontrolada entre membranas adjacentes de Golgi e RE, com o resultado final da destruição da separação física entre RE e Golgi mesmo na ausência da formação de vesículas (Nebenfuhr, *et al.*, 2002).

A indução da fusão entre organelos pela BFA é um evento patológico que ocorre apenas após a dissociação do revestimento COPI pelo Golgi e culmina na continuidade física e mistura entre RE e Golgi. É interessante constatar que os eventos subjacentes aos efeitos induzidos pela BFA são muitos diferentes entre animais e plantas, o que provavelmente reflecte uma diferente organização entre os complexos de Golgi destes dois tipos de organismos (Nebenfuhr, *et al.*, 2002).

## 1.4 A via secretora tardia em plantas – transporte de proteínas a partir da TGN

### 1.4.1 Secreção *vs.* Transporte para vacúolos

Em plantas, a via clássica de transporte de proteínas solúveis através da via secretora envolve a passagem destas pelo RE e complexo de Golgi até à região *trans*- do Golgi, onde as vias de secreção e transporte para os vacúolos divergem (Bassham e Raikhel, 2000, Hadlington e Denecke, 2000). Depois de abandonar o RE, uma proteína que não possua informação específica para retenção ou direccionamento para um compartimento subcelular da via secretora, passará através do complexo de Golgi e será incorporada em vesículas que se fundirão com a membrana citoplasmática, libertando o seu conteúdo para o exterior da célula numa rota que constitui a via por defeito ou *default pathway* (Neuhaus e Rogers, 1998). É ao nível da região *trans*- do Golgi que os polipéptidos podem ser transportados para a superfície da célula para secreção, ou então divergir desta rota por acção de mecanismos de direccionamento de proteínas para os vacúolos (Bassham e Raikhel, 2000). Neste trabalho, e porque o nosso objecto de estudo é uma proteinase aspártica vacuolar, focaremos a atenção no direccionamento de proteínas solúveis para os vacúolos.

### 1.4.2 Tipos de vacúolos das células vegetais

Os vacúolos das plantas partilham algumas características básicas com aqueles presentes em algas e leveduras e com os lisossomas das células animais. Nas plantas, os vacúolos desempenham as mais variadas funções: são compartimentos líticos, funcionam como reservatórios de iões e metabolitos, e desempenham um papel crucial em processos celulares de desintoxicação e homeostasia (Marty, 1999). Os vacúolos vegetais estão ainda envolvidos em respostas ao *stress* provocadas por factores ambientais ou bióticos (Marty, 1999). Muitos dos compostos acumulados nos vacúolos têm um papel importante na interacção animal/planta, nomeadamente na atracção de polinizadores e defesa contra herbívoros (Pais e Barroso, 1999). Nos órgãos vegetativos das plantas, os vacúolos funcionam predominantemente como uma estrutura de hidratação da célula com a

consequente ocupação de espaço e turgidez, e manutenção da forma celular (Pais e Barroso, 1999).

Nas sementes e tecidos especializados em armazenamento, os vacúolos funcionam como depósitos de proteínas de armazenamento e hidratos de carbono solúveis que são mobilizados durante a germinação ou quando necessários (Marty, 1999). Apesar de mais comuns em sementes, as proteínas vacuolares de armazenamento podem ser também encontradas em diferentes tecidos vegetativos (Neuhaus e Rogers, 1998).

Em suma, os vacúolos desempenham funções físicas e metabólicas que são essenciais para a manutenção da vida vegetal (Marty, 1999).

A contradição aparente levantada pelo facto de um único organelo ser simultaneamente lítico e de armazenamento foi dissipada pela identificação, nas células vegetais, de dois tipos de compartimentos vacuolares, estrutural e funcionalmente distintos (Paris, *et al.*, 1996). Hipóteses levantadas antes da descoberta de diferentes tipos de vacúolos, justificavam a existência de vacúolos de armazenamento como porções de um vacúolo central, que se subdividia à medida que a acumulação de proteínas de armazenamento aumentava (Neuhaus e Rogers, 1998). Os dois tipos de vacúolos identificados em plantas - vacúolos líticos (*lytic vacuoles*; LV) e vacúolos de armazenamento de proteínas (*protein storage vacuoles*; PSV), podem ser distinguidos pela presença de diferentes aquaporinas nas suas membranas limítrofes, as *tonoplast intrinsic proteins* ou TIPs, bem como pelo seu conteúdo (Di Sansebastiano, *et al.*, 1998, Di Sansebastiano, *et al.*, 2001, Jauh, *et al.*, 1998, Jauh, *et al.*, 1999, Paris, *et al.*, 1996). Foram observados dois tipos de compartimentos vacuolares, definidos pela presença de diferentes isoformas de TIPs, α-TIP e γ-TIP, em células do ápice radicular de cevada, plântulas de ervilheira e plantas de *Nicotiana tabacum* maduras (Paris, *et al.*, 1996). No ápice radicular de cevada, a lectina (proteína de armazenamento) pode ser encontrada em vacúolos marcados positivamente para a α-TIP, enquanto a proteinase cisteínica de cevada estava especificamente contida em vacúolos positivos para a γ-TIP (Paris, *et al.*, 1996). A presença de α-TIP no tonoplasto define um vacúolo de armazenamento de proteínas, no qual se acumulam polipéptidos de reserva protegidos da acção de enzimas hidrolíticas; a γ-TIP define um tipo de vacúolo lítico ou vegetativo, mais acídico e rico em hidrolases. À medida que a célula se desenvolve, os dois tipos de compartimentos vacuolares acabam por fundir-se para formar um vacúolo central único de grandes dimensões, o que é ilustrado pela co-localização dos antigénios marcadores, α- e γ-TIP, no mesmo tonoplasto, em células diferenciadas (Paris, *et al.*, 1996). Estudos de imunocitoquímica utilizando anticorpos contra variadas TIPs demonstraram que diferentes combinações destas, funcionam como marcadores para

vacúolos com conteúdos distintos e, portanto, presumivelmente com diferentes funções (Jauh, *et al.*, 1999).

Actualmente é indiscutível que vacúolos contendo proteases activas a pH baixo, os chamados vacúolos líticos ou vegetativos, e vacúolos de armazenamento de proteínas, são organelos distintos tanto funcional como estruturalmente (Hoh, *et al.*, 1995, Jauh, *et al.*, 1998, Jauh, *et al.*, 1999, Paris, *et al.*, 1996). No entanto, se por um lado a separação de funções entre dois compartimentos vacuolares diferenciados, simplifica a bioquímica e fisiologia subjacente ao armazenamento de proteínas, por outro, a biologia celular associada à biogénese e manutenção de vacúolos bem como ao endereçamento de proteínas, assume um grau de complexidade muito maior (Neuhaus e Rogers, 1998). Contrastando com o que acontece nas células de levedura que apenas possuem vacúolos do tipo lítico, as células vegetais têm que gerar vários tipos de tonoplasto, bioquímica e estruturalmente distintos, que têm que ser mantidos separadamente como entidades individuais (Neuhaus e Rogers, 1998). As plantas têm ainda que possuir vias de transporte vesicular distintas e separadas que direccionem moléculas para vacúolos de armazenamento e para vacúolos líticos, e apresentar mecanismos que enderecem proteínas de armazenamento para uma via e enzimas hidrolíticas para a outra (Neuhaus e Rogers, 1998).

### 1.4.3 Sinais de endereçamento para os vacúolos

Na via secretora, o direccionamento de uma proteína solúvel para um compartimento vacuolar, está dependente da presença de sinais de endereçamento (SE) contidos na estrutura primária do polipéptido. A presença de SE vai definir o reconhecimento de certos polipéptidos por receptores específicos presentes no lúmen da via secretora, e determinar o transporte selectivo destes para o vacúolo.

Até ao momento, estão identificados três tipos de sinais de endereçamento, ou *vacuolar sorting determinants* (VSD), responsáveis pelo direccionamento de proteínas solúveis para os compartimentos vacuolares (Chrispeels e Raikhel, 1992)}(Neuhaus e Rogers, 1998, Vitale e Raikhel, 1999). Cada um dos três tipos de VSD apresenta características físicas e funcionais específicas que o definem (Neuhaus e Rogers, 1998). O primeiro, encontrado nos pro-péptidos *N-terminais* da pro-esporamina da batata-doce e da pro-aleuraína de cevada, foi denominado *sequence specific* VSD (ssVSD) e requer a presença de uma sequência conservada de aminoácidos – Asn-Pro-Ile-Arg (NPIR), funcionando como um determinante de endereçamento mesmo quando deslocado da região *N*-terminal da proteína (Holwerda, *et al.*, 1992, Matsuoka e Nakamura, 1991, Neuhaus e Rogers, 1998). O segundo tipo de VSD, descrito para a lectina de cevada e quitinase de *Nicotiana tabacum*, foi denominado *C*-terminal VSD (ct-VSD) (Dombrowski, *et al.*, 1993, Melchers, *et al.*, 1993, Neuhaus e Rogers, 1998). Os sinais de endereçamento incluídos neste grupo não dependem da presença de

uma sequência conservada de aminoácidos mas, para determinarem o direccionamento de uma proteína para o vacúolo, têm de forçosamente estar posicionados na região *C*-terminal desta (Neuhaus e Rogers, 1998). O terceiro tipo, descrito para algumas proteínas de armazenamento, que tem sido o mais complicado de estudar, localiza-se na região interna da proteína, e não foi ainda possível definir uma sequência conservada de aminoácidos associada à sua função de endereçamento (Chrispeels e Raikhel, 1992, Nakamura e Matsuoka, 1993). É provável que em muitos caso seja a própria estrutura tridimensional da proteína, a desempenhar um papel determinante na definição da via de transporte que será seguida por esta. A este tipo de sinal de endereçamento foi atribuída a denominação *physical structure* VSD (psVSD) (Neuhaus e Rogers, 1998).

Estes três tipos de *vacuolar sorting determinants*, depois de reconhecidos por receptores específicos da via secretora, guiam as proteínas para duas vias de transporte diferentes, mediadas por vesículas com características distintas e tendo como destino final os vacúolos líticos ou os de armazenamento de proteínas.

### 1.4.4 Transporte de proteínas solúveis para os vacúolos

Nas células animais, a rede *trans* do Golgi é definida como o ponto onde ocorre a selecção de proteínas para secreção, ou diversão da rota destas para outro destino final, o lisossoma. As proteínas lisossomais são desviadas a nível da TGN através da sua interacção com o receptor para a manose-6-fosfato (M-6-P), sendo incorporadas em vesículas com revestimento de clatrina, ou *clathrin coated vesicles* (CCV), responsáveis pelo seu transporte até ao endossoma tardio.

Nas plantas, os mecanismos subjacentes ao direccionamento de proteínas para vacúolos são bastante mais complexos, visto existirem dois tipos de destinos vacuolares que podem coexistir na mesma célula (Paris, *et al.*, 1996). Este assunto torna-se ainda mais intrincado, se tivermos em conta que o transporte de proteínas solúveis para os vacúolos, pode também ocorrer directamente desde o RE. Todavia, e de uma maneira geral, pensa-se que o endereçamento para os vacúolos é despoletado pela interacção entre uma proteína vacuolar e o seu receptor, o que desencadeia a formação de vesículas de transporte que despontam da TGN, sendo que o tipo de vesículas difere de acordo com a rota vacuolar seguida por um determinado polipéptido.

Transporte directo de proteínas solúveis do RE para o PSV

Levanony e colaboradores foram pioneiros na identificação de uma via de transporte para vacúolos de armazenamento, independente do complexo de Golgi, e observada para proteínas vacuolares em trigo (Levanony, *et al.*, 1992). Sobre o transporte directo de proteínas do RE para os PSVs, foram ainda publicados relatos da observação de vesículas

derivadas do RE que contêm agregados polipeptídicos, as *precursor accumulating vesicles* (PAC), e que se fundem directamente com os vacúolos de armazenamento (Hara-Nishimura, *et al.*, 1998). Adicionalmente, foram ainda identificadas, apenas em plantas, vesículas especializadas com origem no RE e destinadas aos PSVs, contendo agregados de precursores de proteinases com o sinal de retenção KDEL. Estas vesículas foram denominadas KV-*vesicles* e provavelmente estão associadas a fenómenos de mobilização de proteínas em tecidos em desenvolvimento (Toyooka, *et al.*, 2000).

É importante realçar que a agregação de proteínas parece desempenhar um papel importante no direccionamento destas para o PSV, e que a localização na via secretora onde a agregação ocorre, parece determinar se o trajecto para o PSV irá ou não incluir uma passagem pelo complexo de Golgi (Vitale e Raikhel, 1999). Surgiu ainda a hipótese da agregação precoce de proteínas estar intimamente ligada à ausência de *N*-glicanos à superfície dos polipéptidos. Assim sendo, proteínas não glicosiladas agregar-se-iam no RE e este facto implicaria o seu transporte em PACs (ex: proteínas de armazenamento de abóbora (Hara-Nishimura, *et al.*, 1998)). Pelo contrário, a presença de cadeias glicosiladas à superfície dos polipéptidos, devido à sua natureza hidrofílica, determinaria a agregação das proteínas num ponto tardio da via secretora, maioritariamente à saída do Golgi, definindo uma via de transporte vacuolar a partir deste ponto. O transporte vesicular entre TGN e diferentes compartimentos vacuolares, será discutido na próxima secção.

Transporte vesicular entre TGN e compartimentos vacuolares distintos

As duas vias de endereçamento vacuolar seguidas por proteínas vegetais a partir da região *trans*.- do Golgi encontram-se bem caracterizadas.

A primeira via direcciona proteínas contendo ssVSD para o vacúolo lítico em vesículas com revestimento de clatrina que possuem na sua membrana receptores específicos da família BP-80 (*binding protein* com 80 kDa) (Jiang e Rogers, 1999, Kirsch, *et al.*, 1994, Paris e Neuhaus, 2002). O receptor BP-80, característico das CCVs, foi originalmente isolado de ervilheira e está associado ao direccionamento de proteínas solúveis como a aleuraína para os vacúolos líticos ou vegetativos (Humair, *et al.*, 2001). As vesículas de clatrina (Figura II-8) são compostas por uma camada de complexos adaptadores, aprisionados por sua vez por um revestimento de clatrina (Kirchhausen, 2000, Robinson, *et al.*, 1998). A formação destas vesículas depende do recrutamento dos componentes do seu revestimento, já acoplados, a partir do citoplasma para a superfície do Golgi por acção da GTPase Arf1, após activação pelo(s) seu(s) respectivo(s) GEF (Figura II-8) (Kirchhausen, 2000). O mecanismo envolvido no recrutamento do revestimento de clatrina para a membrana citoplasmática permanece desconhecido. Nas vesículas de clatrina, bem como nas COPII e COPI, a selecção de carga

incluída nas vesículas de transporte, parece ser mediada ou reconhecida pelos componentes do seu revestimento (Kirchhausen, 2000).

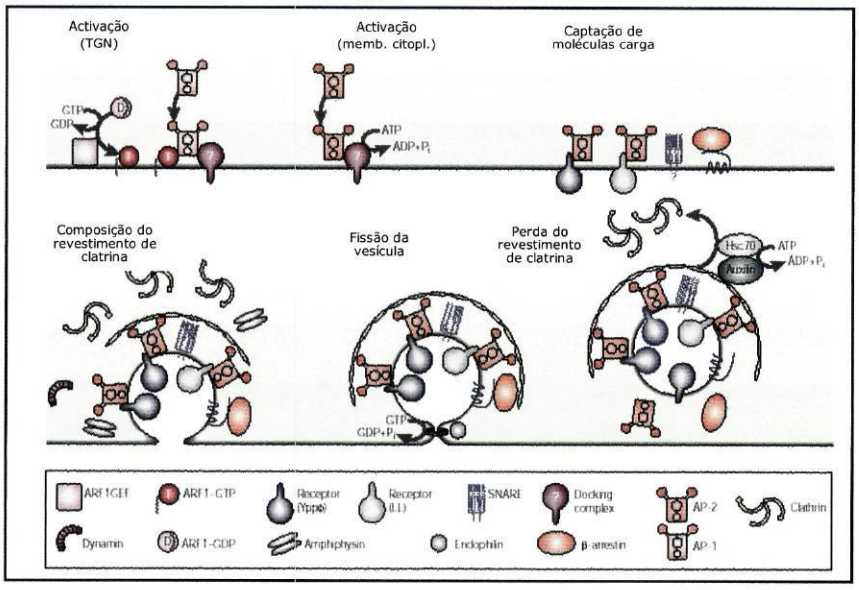



**Figura II-8- Representação esquemática da formação de uma vesícula com revestimento de clatrina.** Na TGN, o processo de composição do revestimento é activado pelo recrutamento da Arf1-GTP para a membrana. Não é claro o processo subjacente à activação do revestimento a nível da membrana citoplasmática. Uma das extremidades das proteínas adaptadoras liga-se às moléculas carga, enquanto a extremidade oposta se liga a outros componentes do revestimento, incluindo a clatrina. Os tri-esqueletos de clatrina polimerizam, formando uma rede de malha hexagonal e pentagonal, que desencadeiam a deformação da membrana. Quando a formação do revestimento se completa, a vesícula destaca-se da membrana da TGN, por acção da dinamina. (AP) *adaptor protein*. Adaptado de Kirchhausen T (Kirchhausen, 2000).

A segunda via de endereçamento vacuolar envolve o transporte de proteínas com ctVSD para vacúolos de armazenamento, através de vesículas de conteúdo electrono-denso (*dense vesicles*; DV). Apesar de ainda não haver quaisquer receptores identificados como indiscutivelmente envolvidos nesta via, foi demonstrado que as DVs não interagem com receptores da família dos BP-80. Robinson e colaboradores (1998) verificaram que proteínas de armazenamento de ervilheira eram encontradas em corpos multivesiculados de grandes dimensões (*multivesicular bodies*; MVB)(Robinson, *et al.*, 1998). Estes autores sugeriram que estas estruturas são uma "estação" intermediária entre as DVs e os PSVs, análogas aos compartimentos pré-vacuolares (*pre-vacuolar compartments*; PVC) descritos para os vacúolos líticos (Robinson, *et al.*, 1998).

É de realçar que, enquanto a via para o vacúolo lítico começa ao nível da TGN, as vesículas de conteúdo electrono-denso têm uma origem mais precoce na via secretora, nomeadamente a nível das cisternas do *cis*- Golgi, sugerindo que a via de transporte para PSVs possa ter início a montante da TGN (Hillmer, *et al.*, 2001). Actualmente, é incontestável que as DVs são formadas num compartimento mais prematuro que a região *trans* do Golgi, mas a possibilidade destas vesículas emergirem de um compartimento ainda mais precoce, imune à acção da BFA e que escapou a detecção microscópica, não pode ser excluída (Hadlington e Denecke, 2000). O compartimento intermediário entre RE e Golgi,

descrito para células animais, parece não ter um equivalente nas plantas. No entanto, a ser descoberto, este compartimento intermédio poderia constituir a origem das DVs mas, até ao momento, esta afirmação não passa de pura especulação (Hadlington e Denecke, 2000).

A associação entre um determinado tipo de sinal de endereçamento (ssVSD ou ctVSD), a uma das vias de transporte para o vacúolo (CCVs ou DVs) tem sido bastante questionada, e recentemente foram publicados dados que levantam a possibilidade de alguns ctVSDs direccionarem proteínas através de ambas as vias (Jiang e Rogers, 1999, Matsuoka, 2000, Miller e Anderson, 1999).

Contrariamente ao que acontece em células animas, a hipótese de que, em plantas, a segregação entre proteínas destinadas à secreção e proteínas vacuolares ocorre a nível da TGN carece de fundamentos práticos. Na realidade, até à data, a única evidência funcional acerca da existência de uma via de selecção e saída a nível da TGN, advém de observações obtidas com a família de receptores BP-80. Na verdade, há descrições que contrariam a sugestão de que, tal como acontece nos animais para o lisossoma, nas plantas, o Golgi seria a *sorting station* por excelência para o vacúolo. De facto, Tormakangas e colaboradores (2001) demonstraram que a delecção do determinante vacuolar putativo da fitepsina de cevada, uma proteinase aspártica localizada nos vacúolos, parece determinar o desvio de rota na via de transporte desta enzima logo ao nível do RE, que passa a ser secretada de uma forma independente de vesículas COPII (Tormakangas, *et al.*, 2001).

Diferente sensibilidade das vias de transporte vacuolar à wortmanina

O reconhecimento da existência de diferentes vias de transporte para os vacúolos emergiu da observação que o transporte vacuolar de uma proteína solúvel (fitohemaglutinina) era inibido pela BFA, enquanto o direccionamento de uma proteína do tonoplasto (α-TIP) não era afectado por esta droga (Gomez e Chrispeels, 1993). O efeito da BFA como inibidor de secreção foi abordado na secção 1.3.5. A identificação de diferentes vias de endereçamento vacuolar para duas proteínas solúveis, foi igualmente conseguida recorrendo à utilização de uma droga com efeito inibitório sobre o transporte intracelular, a wortmanina. Em células BY2 de *Nicotiana tabacum*, esta droga impede o direccionamento vacuolar da lectina mas não tem qualquer efeito sobre o endereçamento da proteína vacuolar de armazenamento, esporamina (Matsuoka, *et al.*, 1995).

O facto das diferentes vias de endereçamento vacuolar apresentarem distintas sensibilidades à presença da wortmanina constitui um dado importante nesta temática e revelou a existência de mais uma ferramenta de trabalho útil para o estudo do direccionamento das proteínas vacuolares.

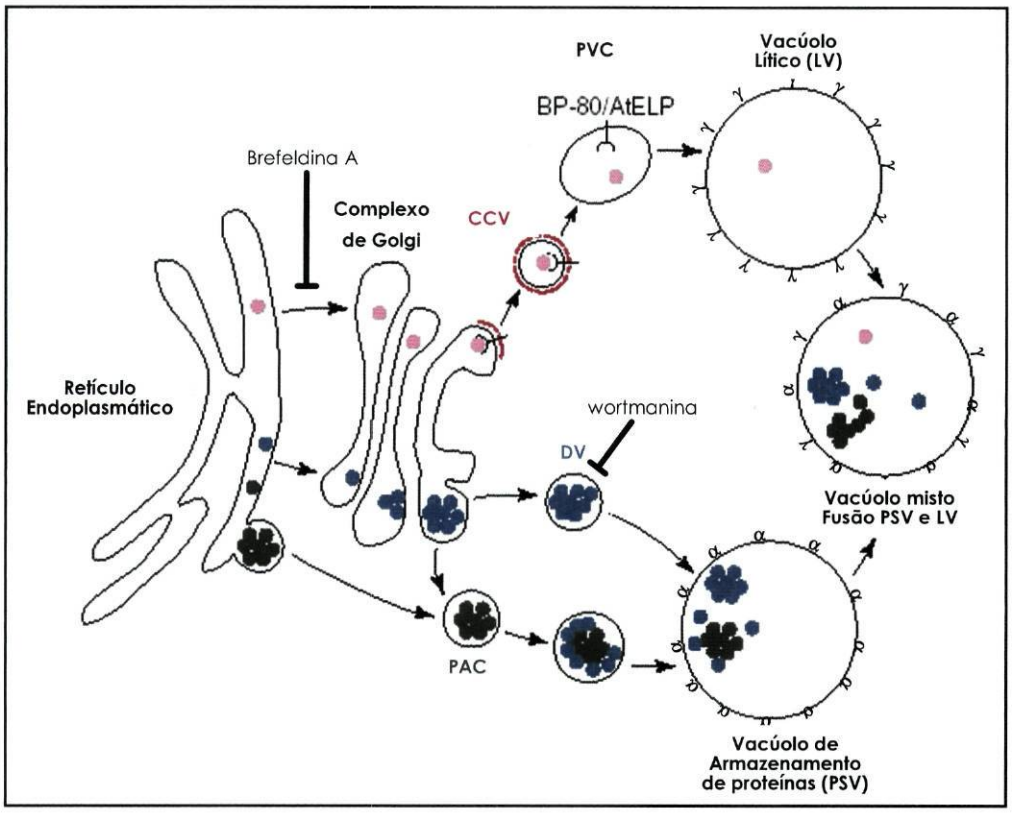



**Figura II-9 - Representação esquemática das diferentes vias seguidas por proteínas solúveis para os distintos compartimentos vacuolares.** Os pontos a rosa representam uma proteína direccionada para um vacúolo do tipo lítico (LV). Os pontos a azul e a verde indicam dois polipéptidos diferentes, ambos direccionados para vacúolos de armazenamento de proteínas (PSV). Estas proteínas seguem duas vias distintas de transporte: a primeira é independente (verde), e a segunda dependente (azul), do complexo de Golgi. O modo de transporte destas duas proteínas depende do facto da sua agregação ocorrer (verde), ou não (azul), no RE. As duas vias de transporte vacuolar desde a TGN, em CCVs (clathrin-coated vesicles) ou DVs (dense vesicles), apresentam diferentes sensibilidades à wortmanina, sendo que apenas a segunda é inibida por esta droga. O vacúolo misto representa a situação mais comum encontrada em células maduras, onde os LVs e os PSVs acabam por fundir-se num compartimento vacuolar único, capaz de receber proteínas direccionadas para ambos. (PAC) *precursor-accumulating vesicles*; (α) α-TIP em PSVs; (γ) γ-TIP em LVs. Adaptado de Vitale A e Raikhel NV (Vitale e Raikhel, 1999)0}.

Sumariando, em comparação com o observado em animais e leveduras, o transporte vesicular para os vacúolos em plantas, apresenta numerosas características originais, possivelmente únicas para os organismos vegetais. Dentro destas podemos citar os diferentes mecanismos de transporte para os dois tipos de vacúolos, os diversos tipos de sinais de endereçamento identificados, o receptor para vacúolos líticos, e finalmente o processo de exportação directa de proteínas desde o RE para os PSVs. Na Figura II-9 encontra-se graficamente representada a informação existente relativa às diferentes vias de transporte vacuolar reconhecidas em plantas.

## 1.5 Processamento e trajecto biossintético da cardosina A, uma proteinase aspártica de cardo com localização vacuolar

A cardosina A é sintetizada como um precursor imaturo, a pre-pro-cardosina A, sujeito a várias clivagens proteolíticas até a forma madura da enzima ser atingida (Ramalho-Santos, *et al.*, 1998). A estrutura do precursor da cardosina A, os seus locais de clivagem, bem como o modelo de processamento proteolítico proposto por Ramalho-Santos e

colaboradores (1998) para a maturação da cardosina A, encontram-se representados na Figura II-10.

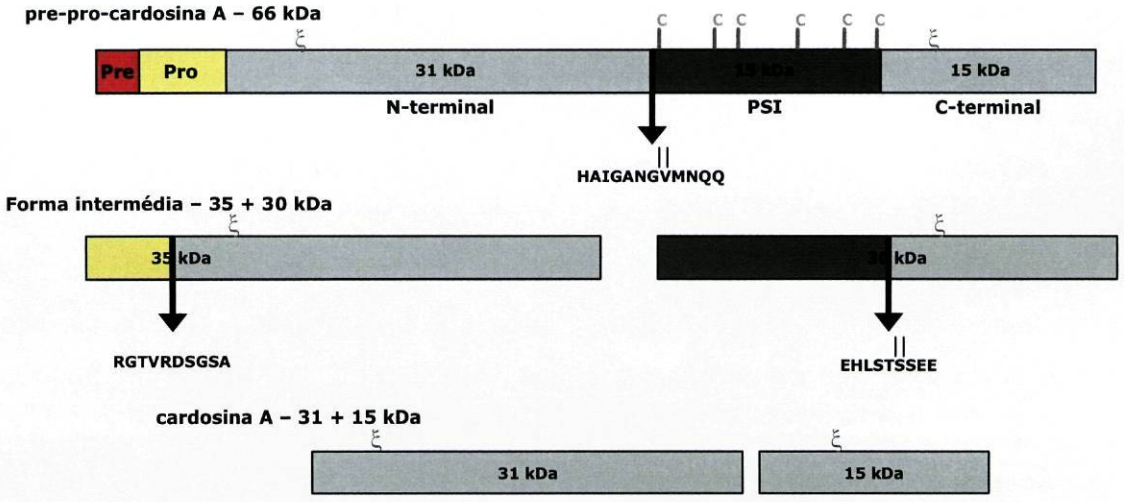



**Figura II-10 – Modelo proposto para o processamento do precursor da cardosina A.** Os locais de clivagem entre pro-segmento (Pro) e cadeia de 31 kDa, fragmento com 31 kDa e PSI, PSI e cadeia de 15 kDa, encontram-se assinalados por setas. As linhas verticais indicam locais de clivagem secundários. A remoção do PSI parece ocorrer na sequência indicada na figura. Os locais de glicosilação encontram-se assinalados com (ξ). (C) cisteínas conservadas na região do PSI. Adaptado de Ramalho-Santos M. *et al.* (Ramalho-Santos, *et al.*, 1998).

Estes autores deduziram a sucessão putativa dos passos de processamento proteolítico associados ao processo de maturação da cardosina A com base em observações obtidas com anticorpos contra diferentes regiões da proteína (Ramalho-Santos, *et al.*, 1998). No entanto, este modelo de processamento foi baseado em dados obtidos em um sistema estático, com as amostras proteicas utilizadas a resultarem apenas de colheitas em dois pontos de uma extensa janela de tempo correspondente ao período de desenvolvimento floral em cardo. Por conseguinte e apesar dos autores terem providenciado dados que lhes permitiram avançar com uma hipótese de ordem para os eventos de processamento da cardosina A, era necessária a obtenção da confirmação destes resultados seguindo a evolução, ao longo do tempo, de moléculas de cardosina A sintetizadas *de novo*. É de salientar que tanto a localização subcelular dos diferentes passos de processamento sofridos pela cardosina A, como a localização dos seus intermediários de processamento dentro das células, permaneciam desconhecidas até à realização deste trabalho.

A análise da sequência de aminoácidos da cardosina A revelou a presença de um SP no precursor desta proteinase aspártica, o que indica que esta enzima segue a via secretora, sendo por isso sintetizada pelos ribossomas localizados à superfície do RE e translocada para o lúmen deste compartimento subcelular durante o processo de tradução (Faro, *et al.*, 1999). Em cardo, foi ainda demonstrado que a forma madura da cardosina A se localiza nos vacúolos das papilas estigmáticas onde se acumula (Ramalho-Santos, *et al.*, 1997).

É reconhecido que o endereçamento vacuolar de proteínas nas plantas depende de uma variedade considerável de motivos proteicos (Hadlington e Denecke, 2000, Neuhaus e Rogers, 1998, Vitale e Raikhel, 1999). De uma maneira geral, este direccionamento envolve

o transporte de moléculas do RE, para e através do complexo de Golgi e daqui para os vacúolos, no entanto há relatos que descrevem a existência de vias de transporte directas entre o RE e vacúolos de armazenamento de proteínas (Hara-Nishimura, *et al.*, 1998, Toyooka, *et al.*, 2000). A via de endereçamento vacuolar seguida pela cardosina A permanece uma incógnita. Resultados de microscopia electrónica de transmissão obtidos no nosso laboratório, revelaram a presença de cisternas dilatadas de RER nas papilas estigmáticas, cujo conteúdo electrono-denso aparentava ser semelhante ao observado nos vacúolos que acumulam cardosina A (Resultados e Discussão Capítulo I). Esta observação levou à formulação de uma hipótese que admitia que a cardosina A poderia alcançar os vacúolos através de uma via de transporte independente do Golgi, apesar da presença de *N*-glicanos complexos à superfície da proteína indicar o contrário.

Com o presente trabalho pretendeu-se contribuir com novos conhecimentos para o estudo multidisciplinar da cardosina A. Constituíram objectivos a caracterização do trajecto biossintético seguido por esta enzima e a confirmação da ordem de processamento proteolítico da cardosina A durante o seu processo de maturação num sistema dinâmico. Para tal, recorreu-se à expressão da cardosina A em dois sistemas heterólogos: *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana*. A localização subcelular dos eventos de processamento e das correspondentes formas de maturação da proteína, bem como a natureza dos vacúolos em que ocorre a acumulação da cardosina A, foram também investigadas. Para averiguar se a via de endereçamento vacuolar seguida pela cardosina A implicava ou não a exportação directa da proteína do RE para o vacúolo desviando-se do complexo de Golgi, recorreu-se à utilização de abordagens técnicas mais clássicas, como *pulse-chase* e tratamentos com BFA, e outras mais inovadoras, como experiências de co-expressão com mutantes dominante-negativos de GTPases envolvidas no transporte intracelular e, ainda, utilização de linhas transgénicas de *Arabidopsis* com expressão indutiva dos transgenes. Foi também avaliada a secreção para a parede celular como destino final ou alternativo para a cardosina A, uma vez que a secreção parcial é um fenómeno descrito para muitas proteínas vacuolares.

# 2 OBJECTIVOS

No Capítulo I foram abordadas questões directamente relacionadas com a expressão da cardosina A em cardo ao longo de diversos estados de ontogénese floral. Por sua vez, o presente capítulo teve como objectivo geral o estudo do transporte e do processamento da cardosina A, recorrendo à expressão desta em sistemas heterólogos, nomeadamente em *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana*.

Numa primeira fase, o trabalho prendeu-se com o desenvolvimento de sistemas de expressão heterólogos que permitissem a eficiente detecção da cardosina A. Só depois destes sistemas estabelecidos e assegurada a eficiente expressão, bem como o correcto endereçamento vacuolar desta enzima, se poderia passar à verdadeira experimentação e aos reais objectivos.

O facto da cardosina A ser sintetizada sob a forma de um precursor que é extensivamente processado até a enzima atingir a forma madura era de antemão conhecido. Os passos de processamento sofridos por esta proteinase aspártica foram previamente deduzidos por Ramalho-Santos e colaboradores, a partir de dados obtidos com anticorpos produzidos contra diferentes regiões da proteína e testados usando extractos proteicos de cardos recolhidos em diferentes estados de desenvolvimento (Ramalho-Santos, *et al.*, 1998). Nesta fase do trabalho, um dos objectivos a alcançar foi a confirmação da sucessão dos eventos de processamento sofridos pela cardosina A, bem como a investigação da localização subcelular destes.

Adicionalmente, a abordagem de outras questões relacionadas com o estudo da via biossintética seguida pela cardosina A foram focadas, nomeadamente a clarificação do trajecto intracelular seguido no seu direccionamento para o vacúolo e a secreção para a parede celular como destino final, adicional ou alternativo, desta proteinase aspártica. A clarificação acerca da natureza dos vacúolos onde a cardosina A se acumula também constituiu um dos desafios deste projecto.

A via mais comum seguida por proteínas direccionadas para o vacúolo envolve a passagem destas pelo complexo de Golgi. Há no entanto descrições de proteínas vacuolares transportadas directamente do RE não passando no seu trajecto pelo complexo de Golgi (Figura II-11). Com base neste conhecimento quisemos averiguar se a cardosina A segue uma via directa do RE até ao vacúolo ou se segue a via de transporte clássica passando pelo complexo de Golgi. A caracterização dos mecanismos moleculares associados ao transporte da cardosina A foi uma das metas definidas nesta parte do trabalho experimental.

Com este trabalho, esperamos contribuir com informação relevante para o estudo do transporte e maturação de proteinases aspárticas de origem vegetal num sentido mais restrito e, numa perspectiva mais lata, para o estudo dos mecanismos associados ao transporte de proteinases vacuolares em plantas.

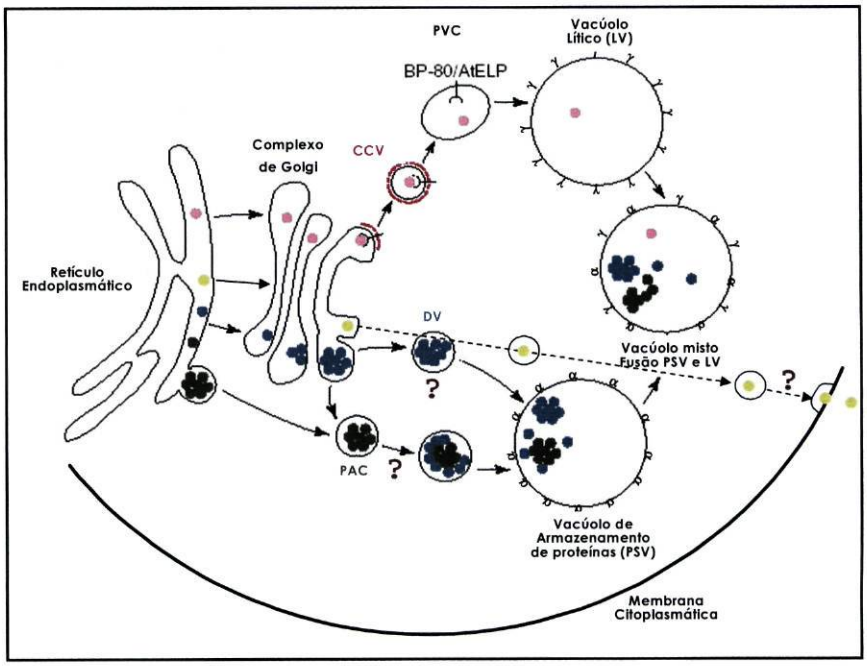



**Figura II-11 – Representação esquemática das diferentes vias seguidas por proteínas solúveis para distintos compartimentos vacuolares e para o apoplasto.** Os pontos verdes, azuis e rosa assinalam diferentes vias de transporte para os vacúolos. Os pontos a amarelos assinalam o transporte para o apoplasto. Os pontos de interrogação representam as questões que foram investigadas neste trabalho referentes ao trajecto biossintético da cardosina A. (PAC) *precursor-accumulating vesicles*; (DV) *dense vesicles*; (CCV) *clathrin-coated vesicles*; (α) α-TIP em PSVs; (γ) γ-TIP em LVs. Adaptado de Vitale A e Raikhel NV (Vitale e Raikhel, 1999).

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1 Obtenção dos constructos para expressão da cardosina A em sistemas heterólogos

### 3.1.1 Estirpes bacterianas: condições de crescimento, transformação e selecção

Neste trabalho foram utilizadas as estirpes bacterianas *Escherichia coli* DH5α e *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101::pMP90 (Koncz e Schell, 1986).

Células de *E. coli* foram cultivadas a 37ºC em meio LB [para 1 L de meio Luria Bertrani: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levedura, 10 g de NaCl; para meio sólido acrescentou-se 1,5% (m/v) de MicroAgar (Duchefa)]. Células quimicamente competentes foram transformadas por choque térmico com diferentes plasmídeos e seleccionadas em meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina ou 25 µg/mL de kanamicina, de acordo com o plasmídeo utilizado.

Células de *A. tumefaciens* foram cultivadas a 28ºC em meio LB e a selecção de células transformadas com diferentes plasmídeos foi realizada suplementando o meio com 25 µg/mL de kanamicina. A transformação de células competentes de *A. tumefaciens* foi realizada por electroporação segundo o método descrito por Shen e Forde (Shen e Forde, 1989). Para tal, misturaram-se 50 µL de suspensão de células electro-competentes de *Agrobacterium* com 200-500 ng de DNA plasmídico e incubou-se em gelo. A mistura foi transferida para uma cuvette de electroporação (0,2 cm), e electroporada com um complexo *Gene Pulser* e *Pulse Controller* (25 µF, 2,5 kV and 200 Ω; Bio-Rad). Imediatamente após a electroporação, adicionou-se 1 mL de meio LB à cuvette e a mistura foi novamente transferida para tubos de microcentrífuga. Após um período de recuperação de 4 h a 28ºC, a suspensão bacteriana foi espalhada sobre placas contendo meio selectivo. As placas foram incubadas a 28ºC durante 24 h ou até se observarem colónias evidentes.

### 3.1.2 Métodos de manipulação e análise de DNA

#### 3.1.2.1 Isolamento de DNA plasmídico

O isolamento de DNA plasmídico para utilização nos processos de sub-clonagem deste trabalho foi realizado segundo o método de extracção por lise alcalina, descrito por Birnboim e Doly (Birnboim e Doly, 1979).

A obtenção de DNA plasmídico para verificação de clones por análise de restrição foi efectuada segundo o método de fervura, descrito por Holmes e Quigley (Holmes e Quigley, 1981).

A extracção de DNA plasmídico a ser utilizado em subsequentes reacções de sequenciação de DNA foi realizada com o "QIAGEN Plasmid Mini Kit" (QIAGEN), segundo instruções do fabricante.

#### 3.1.2.2 Electroforese em gel de agarose

As corridas electroforéticas de DNA foram realizadas em geles de agarose [0,8-1,2% (m/v)] em tampão TBE 0,5x (para 1 L de TBE 10x: 108 g de Tris-base, 55 g de ácido bórico, 9,3 g de EDTA) contendo 0,5 µg/mL brometo de etídeo (BrEt). O DNA foi visualizado por fluorescência do BrEt contra radiação UV (302-365 nm). Como marcadores moleculares utilizaram-se o "1 kb Ladder" e o "100 bp Ladder" (New England Biolabs).

#### 3.1.2.3 Recuperação de DNA de geles de agarose

As bandas com fluorescência contendo o DNA de interesse foram visualizadas contra radiação UV de elevado comprimento de onda (365 nm) na tentativa de minimizar o dano sobre as moléculas de DNA. As bandas foram rapidamente excisadas do gel e procedeu-se à recuperação do DNA no gel de agarose recorrendo ao "Hybaid Recovery™ Purification Kit II" (Thermo Hybaid), segundo as instruções do fabricante.

#### 3.1.2.4 Digestão de DNA com enzimas de restrição

A digestão de DNA com enzimas de restrição foi realizada de acordo com as instruções dos fabricantes. Em geral as reacções de restrição decorreram por 2 h a 37ºC e foram inactivadas pelo calor, às temperaturas adequadas a cada caso, durante 15 min. Os fragmentos foram purificados por precipitação etanólica ou após electroforese em gel de agarose seguida de recuperação como descrito em 3.1.2.3.

#### 3.1.2.5 Desfosforilação de extremidades 5' dos vectores de clonagem/expressão

De modo a prevenir a recircularização dos vectores durante as reacções de ligação com os fragmentos de DNA a sub-clonar, desfosforilaram-se as extremidades 5' dos primeiros com "Calf Intestinal Alkaline Phosphatase" (CIP; New England Biolabs) durante 1 h a 37ºC, em simultâneo com as digestões por enzimas de restrição. Após inactivação da enzima a 75ºC durante 10 min procedeu-se à purificação das moléculas dos vectores por extracção com fenol/clorofórmio seguida de precipitação etanólica.

#### 3.1.2.6 Ligação de fragmentos de DNA

Nas reacções de ligação entre fragmentos de DNA e vectores linearizados foi utilizada a "T4 DNA ligase" (New England Biolabs), segundo instruções do fabricante. Em todos os casos as reacções de ligação decorreram durante 16 h a 16ºC. Como controlos utilizaram-se reacções de ligação em que houve omissão de ligase ou do fragmento de inserção.

### 3.1.2.7 Modificação do cDNA da cardosina A por PCR

O isolamento do mRNA das cardosinas A e B, bem como a geração e clonagem dos seus respectivos cDNAs foram realizados como descrito em Faro *et al.* (1999) e Vieira *et al.* (2001) (Faro, *et al.*, 1999, Vieira, *et al.*, 2001).

Neste trabalho procedeu-se à modificação do cDNA da cardosina A por PCR para inclusão da sequência consenso para iniciação ribossómica em eucariontes ou sequência Kozak (Kozak, 1984), numa tentativa de aumentar a eficiência do processo de tradução e consequentemente facilitar a detecção da expressão da cardosina A em *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*.

O cDNA da cardosina B sofreu o mesmo processo de modificação e sub-clonagens (descritas à frente) da cardosina A. Este trabalho foi realizado na expectativa dos constructos gerados para a cardosina B poderem vir a ser úteis em trabalhos futuros tendo as cardosinas como modelo.

Os *primers* utilizados na modificação dos cDNAs das cardosinas encontram-se descritos na Tabela II-1. Na Tabela II-2 encontra-se descrita a composição das reacções de PCR para modificação do cDNA da cardosina A.

**Tabela II-1 – Lista de primers utilizados na modificação das sequências de cDNA das cardosinas A ([a]) e B ([b]).**

| Primer | Sequência | Locais de Restrição | Referência |
|---|---|---|---|
| CdA1Fwd[a] | 5'-AAAACTCGAGCCACCATGGGCACCTCAATCAAAGCAAACG-3' | *Xho* I e *Nco* I | Este estudo |
| R1022[a] | 5'-CGGGTTGTATCTTAGATCGG-3' | n.a. | (Faro, *et al.*, 1999) |
| CdB1Fwd[b] | 5'-AAAACTCGAGCCACCATGGGAACCCCAATCAAAGCAAGCC-3' | *Xho* I e *Nco* I | Este estudo |
| M13rev[b] | 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3' | n.a. | Comercial |

A sequência Kozak encontra-se assinalada a sublinhado; o negrito assinala uma mutação que induz a perda de um local de restrição para a *Kpn* I; n.a. não aplicável.

**Tabela II-2 – Composição da reacção de PCR para modificação/amplificação do cDNA da cardosina A.**

| Reagente | Volume (µL) |
|---|---|
| Água esterilizada | 76.5 |
| *Pfx* amplification buffer 10x[a] | 10.0 |
| Mistura de Nucleótidos 10 mM (New England Biolabs) | 2.0 |
| $MgSO_4$ 50 mM (Invitrogen) | 3.0 |
| *CdA1Fwd* (10 µM) | 4.0 |
| *R1022* (20 µM) | 2.0 |
| DNA-molde (pCR®2.1-CdA linearizado; 0.1-10 ng/µL) | 2.0 |
| Platinum® *Pfx* DNA Polymerase (2.5U/µL; Invitrogen) | 0.5 |

[a] tampão fornecido com a Platinum® Pfx ; Volume final da reacção=100 µL

No processo de modificação/amplificação do cDNA da cardosina A por PCR foi utilizada a enzima *proofreading* "Platinum® *Pfx* DNA Polymerase" (Invitrogen) para minimizar a incorporação de erros na sequência.

As reacções de PCR, realizadas num termociclador modelo Omn-E (Hybaid), iniciaram-se após *hot-start* a 94ºC por 3 min e nas seguintes condições: desnaturação a 94ºC durante 45 seg, emparelhamento dos *primers* a 58ºC em 45 seg e extensão a 68ºC por períodos de 2 min. No final dos 35 ciclos houve um período final de extensão durante 7 min. Os produtos de PCR foram recuperados como descrito em 3.1.2.3.

Os fragmentos de cDNA modificados gerados por PCR foram sequenciados para confirmar que não havia sido introduzida nenhuma mutação adicional na sequência. Para tal foi utilizado o "Big Dye Terminator Kit" e um sequenciador "ABI Prism® 310 Genetic Analyser" (Applied Biosystems).

### 3.1.3 Estratégias de clonagem do cDNA modificado da cardosina A

A clonagem da cardosina A nos vectores de expressão a serem utilizados neste trabalho foi iniciada a partir de um constructo original com o cDNA da cardosina A clonado entre os locais *Eco*R I do plasmídeo pCR®2.1 (Invitrogen). Os passos de sub-clonagem subsequentes para a obtenção dos constructos a empregar nos distintos sistemas de expressão heterólogos estão referidos nas secções seguintes.

#### 3.1.3.1 (Re)Inserção do cDNA modificado da cardosina A em pCR®2.1

Da amplificação por PCR do cDNA da cardosina A com os *primers* descritos na Tabela II-1 resultou um fragmento com cerca de 1,0 kilobase (kb). Estas moléculas foram sujeitas a digestão com a enzima de restrição *Ava* I originando fragmentos de interesse com cerca de 200 pares de bases (bp). Depois de purificados, os fragmentos foram (re)inseridos no constructo original após digestão deste com a enzima de restrição *Ava* I. Os constructos resultantes foram designados por pCR®2.1-CdA.

Distintos clones positivos, seleccionados para a inserção do fragmento modificado e não apresentando mutações adicionais na sua sequência, foram posteriormente utilizados em processos de sub-clonagem do cDNA da cardosina A em distintos vectores de expressão, adequados a cada sistema de expressão heterólogo para posterior estudo do endereçamento e do processamento da cardosina A.

Para a cardosina B seguiu-se uma metodologia muito semelhante. Os produtos resultantes do PCR (1,5 kb) foram digeridos com *Bsi*W I (55ºC) e com *Xho* I originando fragmentos com cerca de 200 bp. Estes fragmentos foram (re)inseridos nos constructos originais previamente digeridos com as mesmas enzimas. Os constructos resultantes foram designados por pCR®2.1-CdB.

### 3.1.3.2 Clonagem do cDNA modificado da cardosina A em pKI102 para expressão transitória em protoplastos de *Arabidopsis thaliana* var. Landsberg erecta

Para a expressão transitória da cardosina A em protoplastos de *Arabidopsis thaliana* var. Landsberg erecta foi necessário sub-clonar o seu cDNA no vector de expressão pKI102 (Moore, *et al.*, 1998).

O pKI102 foi desenvolvido a partir do vector de expressão pRT 101 (Topfer, *et al.*, 1987) que por sua vez é um vector baseado no pUC. Contém o promotor 35S e o sinal de poliadenilação do vírus do mosaico da couve flor, estirpe Cabb B-D (CaMV). O pKI102 apresenta, no entanto, algumas diferenças em relação ao seu congénere original. No pKI102, o gene da β-lactamase originalmente presente no pRT 101, foi substituído pelo gene marcador de resistência ao antibiótico kanamicina. Além disto, no pKI102, o local *Eco*R I do vector original foi preenchido de forma a criar locais de clonagem para as enzimas de restrição *Xma* I e *Ase* I.

No processo de sub-clonagem do cDNA da cardosina A em pKI102 começou-se pela digestão do clone pCR®2.1-CdA com as enzimas de restrição *Sac* I e *Xho* I, originando fragmentos de inserção com um peso molecular aproximado de 1,5 kb, correspondente ao cDNA completo da cardosina A flanqueado por curtas sequências de vector. O vector pKI102 usado neste processo foi digerido com as mesmas enzimas que o fragmento de inserção. Distintos clones de pKI102-CdA foram mantidos em alíquotas a -80ºC para posterior utilização na transformação de protoplastos de *Arabidopsis*.

O processo de sub-clonagem do cDNA da cardosina B em pKI102 processou-se de uma forma semelhante à descrita para a cardosina A, mas no caso da cardosina B, o seu cDNA foi clonado entre os locais *Bam*H I e *Xho* I.

### 3.1.3.3 Clonagem do cDNA modificado da cardosina A em pHTOP para expressão estável em plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD (linhas pOp/LhGR)

Para a expressão estável da cardosina A em plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD, linhas pOp/LhGR foi necessário sub-clonar o seu cDNA no vector de expressão binário pHTOP (Craft *et al.*, aceite para publicação).

O pHTOP é um vector de expressão binário, desenvolvido a partir do muito popular pGreen (Hellens, *et al.*, 2000) mas cujo DNA de transferência (T-DNA) apresenta diferenças substanciais em relação ao do vector original. O T-DNA do pHTOP é constituído por: i) um gene marcador, sob o controlo do promotor e com o sinal de poliadenilação da nopalina sintetase (*nos*), que confere às plantas a resistência à higromicina; ii) seis operões indutivos *lac* e dois promotores mínimos (TATA-*boxes* do promotor 35S), que permitem transcrição bidireccional do gene repórter e do transgene); iii) duas regiões Ω do vírus do mosaico do tabaco (TMV), a montante de cada promotor, para aumentar a eficiência do processo de

tradução; iv) um gene repórter (GUS) e v) um local de clonagem múltipla (MCS). Tanto o gene repórter como o transgene, possuem a montante, a sequência de poliadenilação da octopina sintetase (ocs).

O processo de sub-clonagem do cDNA da cardosina A em pHTOP, começou pela digestão de clones de pCR®2.1-CdA, com as enzimas de restrição *Ecl* 136II e *Xho* I, para obtenção de um fragmento de inserção com um peso molecular aproximado de 1,5 kb. Os clones de vector de expressão binário pHTOP utilizados nas reacções de ligação, foram sujeitos a digestão com as enzimas *Sma* I e *Xho* I. Distintos clones de pHTOP-CdA foram utilizados na transformação de *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101::pMP90 (consultar secção 3.1.1) para posterior transformação de plantas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD (linhas pOp/LhGR).

O processo de sub-clonagem do cDNA da cardosina B processou-se de uma forma semelhante à descrita acima para a cardosina A, mas no caso da cardosina B, o seu cDNA foi clonado entre os locais *Bam*H I e *Xho* I do vector binário pHTOP.

#### 3.1.3.4 Clonagem do cDNA modificado da cardosina A em pVKH18EN6 para expressão transitória em epiderme foliar de plantas de *Nicotiana tabacum* SR1 var. Petit Havana

Para a expressão transitória da cardosina A em epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* SR1 cv. Petit Havana foi necessário sub-clonar o seu cDNA no vector de expressão binário pVKH18EN6 (Batoko, *et al.*, 2000).

O pVKH18EN6 teve por base o vector de expressão binário pVKH18, desenvolvido por Moore *et al.* (resultados não publicados). No pVKH18EN6, o transgene está sob o controlo de diversos promotores/sequências reguladoras derivados do vector pE6113GUS (Mitsuhara, *et al.*, 1996): i) o promotor 35S do CaMV, melhorado com a inclusão da sequência 5' a montante do promotor (-940 a -390) e seis repetições da sequência entre a posição -390- a -90; ii) a sequência Ω do TMV estirpe SPS, para aumentar a eficiência do processo de tradução; iii) o sinal de poliadenilação *nos*. O pVKH18EN6-GUS foi gerado por inserção da cassete de expressão do pE6113GUS, com extremidades *Pvu* II e *Hind* III, nos locais *Ecl* 136II e *Hind* III do MCS do pVKH18, um derivado do pVK18 (Moore, *et al.*, 1998), mas que em vez de um marcador selectivo para o metotrexato, possui um marcador de resistência à higromicina (Moore *et al.*, resultados não publicados).

O processo de sub-clonagem do cDNA da cardosina A em pVKH18EN6 começou pela digestão parcial de clones de pCR®2.1-CdA com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Xho* I, para obtenção do fragmento de inserção com um peso molecular aproximado de 1,5 kb. O vector de expressão binário pVKH18EN6 utilizado nas reacções de ligação foi previamente sujeito a digestão com *Bam*H I e *Sal* I. Distintos clones de pVKH18EN6-CdA foram utilizados

para transformação de *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101::pMP90 (consultar secção 3.1.1) para posterior infiltração de folhas de *Nicotiana tabacum*.

O processo de sub-clonagem do cDNA da cardosina B processou-se de uma forma semelhante à descrita acima para a cardosina A, mas no caso da cardosina B, o fragmento de inserção foi obtido após restrição com as enzimas *Bam*H I e *Xho* I e foi clonado entre os locais *Bam*H I e *Sal* I do vector binário pVKH18EN6.

## 3.2 Estudo do transporte e processamento da cardosina A em *Arabidopsis thaliana*

No estudo do transporte e processamento da cardosina A em *Arabidopsis thaliana* foram utilizadas duas estratégias distintas: expressão transitória da cardosina A em protoplastos obtidos a partir de culturas de células em suspensão (*Arabidopsis thaliana* var. Lansdberg erecta) e a expressão indutiva e estável desta PA em plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD, linhas pOp/LhGR. As metodologias associadas a cada abordagem serão descritas isoladamente.

### 3.2.1 Expressão transitória da cardosina A em protoplastos de *Arabidopsis thaliana* var. Lansdberg erecta

#### 3.2.1.1 Manutenção das culturas de células em suspensão de *Arabidopsis thaliana* var. Landsberg erecta

As culturas de células em suspensão de *Arabidopsis thaliana* usadas neste estudo foram mantidas a 20ºC, com 16 h de luz e 8 h de obscuridade e numa agitação orbital de 125 r.p.m. As culturas foram repicadas semanalmente, por diluições 1/10 das culturas mãe em meio de cultura. O meio de cultura de células de *Arabidopsis*, composto por uma mistura basal de sais do meio de cultura de plantas Murashige e Skoog suplementada com vitaminas (MS, Sigma), 3% (m/v) de sacarose, 0,5 mg/L de ácido naftaleno acético (NAA) e 0,05 mg/L de cinetina, foi esterilizado no autoclave e armazenado a 4ºC.

As culturas de células de *Arabidopsis* usadas para o isolamento e transformação de protoplastos, foram sub-cultivadas a partir de culturas mãe com 7 dias de crescimento. Para tal, as culturas originais eram diluídas 1/20 em meio de cultura e mantidas nas mesmas condições de crescimento que as restantes durante 6 dias, após os quais se prosseguia para o isolamento de protoplastos.

### 3.2.1.2 Isolamento de protoplastos a partir de culturas de células em suspensão de *Arabidopsis thaliana* var. Landsberg erecta

Todo o procedimento foi realizado em condições assépticas numa câmara de fluxo laminar. A centrífuga foi regulada para as velocidades de aceleração e desaceleração mínimas, de modo a minimizar os efeitos de acelerações/desacelerações bruscas sobre a viabilidade das células.

Cuidadosamente, transferiram-se 25 mL de uma cultura de células em suspensão com 6 dias para um tubo falcon de 50 mL e centrifugou-se durante 10 min, a 500 r.p.m. e à temperatura 20ºC (centrífuga modelo Allegra 21R, Beckman Coulter,). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi cuidadosamente ressuspendido em 30 mL de solução de plasmólise [0,4 M de D-manitol, 3% (m/v) de sacarose e 8 mM de $CaCl_2$; pH 5,6-5,8 ajustado com KOH; esterilizado no autoclave]. A suspensão celular foi então incubada à temperatura ambiente (20-25ºC) por um período de 30 min, mantendo os tubos falcon numa posição horizontal. Findado o tempo de incubação, os tubos foram centrifugados a 500 r.p.m. durante 10 min a 20ºC e o sobrenadante foi novamente descartado. Ressuspendeu-se o sedimento em 40 mL de solução enzimática [1% (m/v) de celulase Onozuka R10 e 0,25% (m/v) de macerozima Onozuka R10 (ambas da Yakult Honsha Company) dissolvidas em solução de plasmólise, na obscuridade a 4ºC, e esterilizada por filtração] e este volume foi dividido em dois tubos, cada um com 20 mL. A suspensão celular foi incubada de seguida, sempre na obscuridade, primeiro durante 1 h sem agitação, depois por um período de 30 min com uma agitação suave, e finalmente, durante 1 h sem agitação.

Após o final do tempo de digestão, adicionaram-se 30 mL de Manitol/W5 a cada tubo e, cuidadosamente, misturaram-se as duas soluções, invertendo os tubos várias vezes. A solução de W5 é constituída por 5 mM de glicose, 154 mM de NaCl, 125 mM de $CaCl_2$, 5 mM de KCl e 1,5 mM de ácido 2-(N-morfolino) etano sulfónico (MES). O pH foi ajustado para 5,6-5,8 com KOH ao que se seguiu uma esterilização em autoclave. A solução de Manitol/W5 é composta por uma diluição de 1:5 de W5 em manitol 0,4 M. Seguiu-se uma centrifugação a 400 r.p.m. durante 10 min a 20ºC, após a qual o sobrenadante foi descartado. De seguida, ressuspenderam-se os sedimentos em 15 mL de Manitol/Mg e combinaram-se as suspensões num único tubo de 50 mL, que foi centrifugado como no passo anterior. A solução de Manitol/Mg é composta por 0m4 M de D-manitol, 0,1% de MES e 15 mM de $MgCl_2$. O pH (5,6-5,8) foi ajustado com KOH e o meio foi esterilizado no autoclave.

Após descartar o sobrenadante, o sedimento foi ressuspendido em 30 mL de Manitol/Mg e repetiu-se a centrifugação anterior. Finalmente, o sedimento composto por protoplastos foi ressuspendido em 5 mL de Manitol/Mg (suficiente para cerca de 15 transformações) e deixou-se repousar durante 30-60 min em gelo, antes do processo de transformação.

### 3.2.1.3 Transformação de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* por transferência directa de DNA

Todo o procedimento experimental associado à transformação de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* por transferência directa de DNA foi realizado em condições de assepsia.

O constructo experimental contendo o cDNA da cardosina A (pKI102-CdA; consultar secção 3.1.3.2) e o constructo repórter (pRT103-GUS; (Topfer, *et al.*, 1987)), ambos usados nas diferentes transformações, foram purificados com o "QIAGEN Plasmid Midi kit" (QIAGEN) segundo instruções do fabricante, e sujeitos a uma extracção por fenol/clorofórmio e duas precipitações etanólicas. Como *carrier* utilizou-se o DNA de esperma de arenque, sonicado até uma média de tamanho de fragmentos de cerca de 1 kb, extraído por fenol/clorofórmio e sujeito a duas precipitações etanólicas.

Para cada transformação, foi preparada uma mistura de DNA experimental (20-40 µg) e DNA repórter (cerca de 5-10 µg), com 250 µg de DNA de esperma de arenque, num volume total de 50 µL. O controlo positivo consistiu numa transformação com uma mistura de DNA repórter e DNA *carrier*, enquanto que o controlo negativo correspondeu a uma transformação apenas com DNA *carrier*. As misturas de DNA foram esterilizadas, adicionando a cada uma 25 µL de clorofórmio e agitando no vortex durante 1 min. A fase de clorofórmio foi separada por uma centrifugação em microcentrífuga, à velocidade máxima durante 30 seg, e a mistura ficou em repouso até o DNA ser usado na transformação.

O DNA esterilizado foi distribuído na placa de Petri em pequenas gotas dispostas em anel e, numa região adjacente, aplicaram-se 350 µL de uma solução de PEG-CMS [0,4 M D-manitol, 100 mM $Ca_2NO_4$, 40% (m/v) de polietilenoglicol 4000 (PEG 4000; BDH Chemicals), esterilizada por filtração] (Figura II-12A).

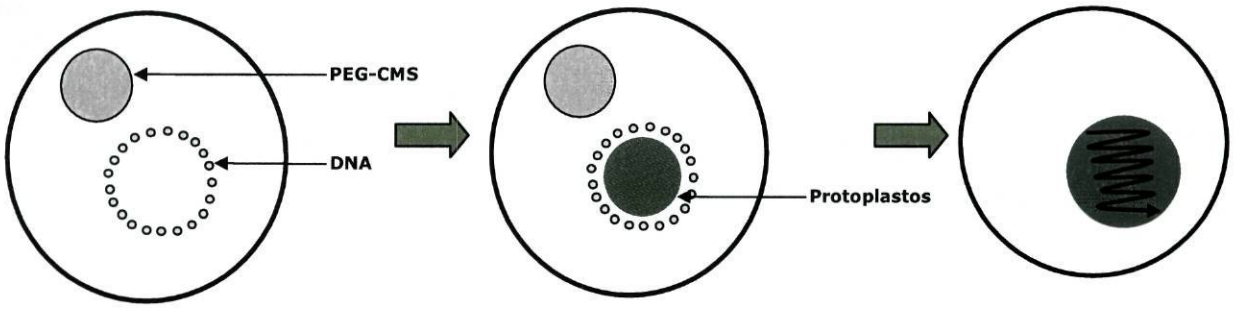



**Figura II-12 – Transformação de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* var. Landsberg erecta por transferência directa de DNA.** A) Esquema ilustrativo da disposição das gotas de DNA e da solução de PEG-CMS na placa de Petri onde foi realizada a transformação de protoplastos. B) Esquema ilustrativo da disposição da suspensão de protoplastos em relação ao DNA e PEG-CMS, na placa de Petri onde foi realizada a transformação; C) Esquema ilustrativo do movimento utilizado durante a mistura do DNA com os protoplastos a transformar, e destes com o PEG-CMS.

De seguida, e cuidadosamente, adicionou-se um volume de 300 µL da suspensão de protoplastos, que se posicionou no meio do anel de gotas de DNA. (Figura II-12B). Com movimentos suaves, misturou-se o DNA com a suspensão de protoplastos durante 20 seg e,

1 min depois, juntou-se a gota de PEG-CMS, misturando-se com muito cuidado e seguindo um padrão de movimento semelhante ao ilustrado na Figura II-12C.

Neste passo do procedimento, movimentos excessivos são prejudiciais à viabilidade das células, uma vez que o PEG induz a fusão de membranas entre protoplastos. É portanto conveniente parar o movimento assim que a mistura apresente um aspecto homogéneo.

30 minutos após a adição dos protoplastos ao DNA procedeu-se à primeira lavagem com Manitol/W5 (600 µL), colocado com cuidado, em gotas e à periferia da mistura. Passados 15 min, adicionou-se 1 mL de Manitol/W5, da forma descrita acima. 15 min depois a mistura foi lavada com um volume de 2 mL de Manitol/W5, também distribuído em gotas, e tentando arrastar a mistura para os limites da placa de Petri. Após 15 minutos, juntou-se o último volume de Manitol/W5 (4 mL) e inclinou-se ligeiramente a placa para recolher os protoplastos para tubos falcon de 15 mL.

Todas as suspensões/transformações foram deixadas repousar, no respectivo tubo falcon na vertical, em gelo e durante 30 min, para permitir a sedimentação dos protoplastos. O sobrenadante foi então cuidadosamente removido (sem perturbar o sedimento) e procedeu-se à sua substituição por 2 mL de meio de cultura de células de *Arabidopsis*. Após a adição do meio, os protoplastos viáveis flutuaram livremente (devido à presença de sacarose), não sendo portanto necessária a sua ressuspensão ou centrifugação.

Após transformação e incubação em meio de cultura durante 48 h na obscuridade a 20ºC, parte dos protoplastos foram recolhidos para ensaios de actividade de GUS, e os restantes foram testados para a imunodetecção da cardosina A.

#### 3.2.1.4 Análise quantitativa da transformação de protoplastos – ensaio fluorimétrico para cálculo de actividade da β-glucuronidase (GUS)

A análise quantitativa da transformação de protoplastos foi realizada recorrendo a um ensaio fluorimétrico para cálculo de actividade de GUS (Jefferson, 1987).

Procedeu-se à extracção de proteínas dos protoplastos transformados de *Arabidopsis thaliana* para ensaios de actividade da proteína codificada pelo gene repórter – a β-glucuronidase (GUS). A cada tubo falcon com protoplastos foram adicionados 5 mL de Manitol/W5 misturando bem, invertendo os tubos várias vezes. Este passo tem como objectivo diluir a sacarose presente no meio de cultura, o que vai permitir que os protoplastos sedimentem após centrifugação.

Os tubos foram centrifugados a 4800 r.p.m durante 10 min a 20ºC (velocidades de aceleração e desaceleração máximas), e os sobrenadantes foram desprezados. Por sua vez, os sedimentos foram ressuspendidos em 200 µL de tampão de extracção para GUS (50 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,0; 10 mM β–mercaptoetanol, 10 mM EDTA, 0,1% (v/v) Sarcosyl, 0,1% (v/v) Triton X-100), e, de seguida, foram transferidos para um tubo de microcentrífuga e sonicados durante 10 seg. Os restos celulares foram sedimentados por

centrifugação a 13000 r.p.m. durante 30 seg a 4ºC. Os extractos proteicos assim obtidos foram mantidos em gelo, ou rapidamente congelados em azoto líquido e guardados a -80ºC.

A concentração dos extractos proteicos foi determinada espectrofotometricamente com o "BioRad Bradford assay" (Bio-Rad) e, como padrão, usou-se uma série de concentrações crescentes de albumina bovina sérica (BSA).

Os ensaios de actividade de GUS foram efectuados com 50 µg de extracto de proteínas, a 37ºC e tendo como substrato para a β-glucuronidase, 1 mM de 4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido (MUG) (Melford Laboratories) dissolvido em tampão de extracção de GUS. A reacção foi realizada num volume total de 280 µL em placas de microtitulação de 96 poços. A intervalos de tempo regulares, entre os 10 e os 50 min após o início da reacção, foram retirados 40 µL de cada ensaio que foram misturados com 200 µL de 0,2 M de $Na_2CO_3$, numa segunda placa de microtitulação mantida na obscuridade. A fluorescência do produto de reacção, a metilumbeliferona (MU), foi medida usando um leitor de placas de microtitulação (FluoStar spectrofluorimeter, BMG LabTechnologies Ltd) com excitação a 365 nm e emissão a 455 nm. As leituras foram comparadas com os padrões de MU (100 a 400 pmol de MU) e a actividade de GUS foi calculada e expressa em pmol MU/µg de proteína/min.

#### 3.2.1.5 Imunodetecção da cardosina A expressa em protoplastos de *Arabidopsis* transformados com pKI102-CdA

Os protoplastos a serem utilizados para a imunodetecção da cardosina A foram sedimentados por adição de Manitol/W5, ao que se seguiu uma ressuspensão do sedimento em tampão de amostra de proteínas 2x [Tampão de amostra 5x: 0.3345 M de Tris-base, 50% (v/v) de glicerol, pH 6,8, 5% (m/v) de SDS, 0,2% (m/v) de azul de bromofenol], com 0,1% (v/v) de β-mercaptoetanol e um volume adequado de um "cocktail" inibidor de proteases (Sigma). Após fervura das amostras durante 5 min e centrifugação à velocidade máxima a 4ºC durante 5 min, os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -80ºC (extractos de proteínas solúveis).

Volumes de extracto contendo cerca de 25 µg de proteínas foram carregados em geles de poliacrilamida a 12% (v/v) e submetidos a *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), de acordo com o método de Laemmli (1970) (Laemmli, 1970). A electroforese foi realizada numa unidade Mini-Protean 3 (Bio-Rad) a 25-30 mA (100-150 V) nos geles concentrador e separador, respectivamente. Após a electroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com a unidade de transferência Mini-Protean 3 (Bio-Rad), durante 1 h e 30 min a 100 mA, de acordo com o método descrito por Burnette (1981) (Burnette, 1981).

Terminada a transferência, as membranas foram lavadas durante 5 min em TBS (para 1 L de TBS 20x juntaram-se 60,57 g de Tris e 116,88 g de NaCl; o pH foi ajustado para 7,6

com HCl) suplementado com 0,1% (v/v) de Tween-20 (TBS-T), ao que se seguiu uma incubação em solução de bloqueio [5% (m/v) de leite em pó magro, 1% (m/v) de BSA (Fraction V; Roche Biochemicals) e 0,1% (v/v) de soro não imune de cabra (Sigma) em TBS-T], durante 1 h à temperatura ambiente e com agitação.

Após incubação das membranas com o anticorpo primário anti-A recombinante (anti-rec A; (Faro, *et al.*, 1999)), numa diluição de 1:600 em solução de bloqueio, por 1 h à temperatura ambiente e com agitação, procedeu-se à lavagem com TBS-T durante 10 min, repetindo mais duas vezes durante 5 min. Passou-se então à incubação das membranas na solução contendo o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho produzido em cabra e conjugado com fosfatase alcalina (Sigma), numa diluição 1:5000 em TBS-T, durante 30 min à temperatura ambiente. Após lavagem das membranas com TBS-T e uma breve passagem por água, procedeu-se à revelação do sinal resultante da imunodetecção da cardosina A recorrendo ao substrato cromogénico "SIGMA*FAST*™ BCIP/NBT" (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/azul nitrotetrazólio), usado segundo instruções do fabricante.

### 3.2.2 Geração de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD (linhas pOp/LhGR) com expressão indutiva da cardosina A

Para o estudo do transporte e processamento da cardosina A em transformantes estáveis de *Arabidopsis thaliana* var. RLD foram geradas plantas transgénicas com uma base genética pOp/LhGR (Moore *et al.*, resultados não publicados).

#### 3.2.2.1 Germinação e manutenção de plantas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD, linhas pOp/LhGR

Sementes de *Arabidopsis thaliana* var. RLD, pertencentes às linhas pOp/LhGR, foram esterilizadas em 1 mL de etanol a 70% (v/v), durante 5 min e com agitação. Removeram-se 800 µL de etanol e as sementes foram pipetadas no restante volume para papel Whatman esterilizado, na câmara de fluxo laminar, onde foram deixadas a secar. Transferiram-se as sementes secas para meio de crescimento de plantas solidificado (em placas de Petri) e foram a vernalizar durante 3-4 dias a 4ºC e na obscuridade.

Sementes recolhidas directamente de plantas transformadas com *Agrobacterium tumefaciens* requerem especiais cuidados de esterilização, e cultivo em meio de cultura reforçado com agentes antibióticos e antifúngicos (consultar secção 3.2.2.3), como descrito de seguida. Sementes recolhidas de plantas transformadas por *Agrobacterium* foram colocadas em tubos falcon de 15 mL, cobertas com 10 mL de etanol a 70% (v/v) e agitadas durante 5 min. O etanol foi substituído por 10 mL de uma solução de hipoclorito de sódio a 10% (v/v) com SDS a 0,25 % (v/v), e os tubos foram agitados durante 10 min. Seguiu-se lavagem com água esterilizada e plaqueamento das sementes como descrito acima.

O meio utilizado para a germinação de sementes e crescimento das plântulas foi o MS, a meia força (Sigma) (pH 5,6-5,8 ajustado com NaOH), solidificado com 0,7% (m/v) de BD Bacto™ Agar (Difco). Terminada a vernalização, as sementes foram postas a germinar a 20ºC e 16 h de fotoperíodo durante cerca de 10 dias, após os quais foram transferidas para uma mistura de 3:1 de turfa (Astro Universal compost; E.A Goundrey and Son Ltd) e vermiculite (Vermiperl vermiculite; William Sinclair Horticultural Ltd.) e mantidas nas mesmas condições.

#### 3.2.2.2 Transformação de plantas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD, linhas activadoras pOp/LhGR, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Na geração de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* com a capacidade de sintetizar a cardosina A foi seguida a metodologia descrita por Clough e Bent (Clough e Bent, 1998). Colónias isoladas de *Agrobacterium tumefaciens* transformado com o constructo pHTOP-CdA foram usadas para inocular 5 mL de meio LB com kanamicina ao que se seguiu uma incubação a 28ºC com agitação durante a noite. No dia seguinte, retiraram-se 2,5 mL da suspensão inicial para inocular 250 mL de LB com kanamicina (diluição de inóculo de 1:100) e voltou a incubar-se a 28ºC com agitação forte durante aproximadamente 24 h [densidade óptica a 600 nm ($DO_{600}$)=1,4-1,6]. A cultura foi centrifugada durante 15 min a 5000 r.p.m. e desprezou-se o sobrenadante por decantação. As células foram ressuspendidas em 250 mL de meio de infiltração [5% (m/v) de sacarose e 0,05% de silwet L-77], e seguidamente decantou-se a suspensão celular para um recipiente adequado.

Na transformação de *Arabidopsis* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foram utilizadas plantas com 4-6 semanas de crescimento apresentando inflorescências num estado de desenvolvimento adequado à transformação. Os vasos contendo as plantas a transformar foram invertidos sobre a suspensão bacteriana tendo o cuidado de mergulhar todas as partes aéreas da planta neste processo. O passo de submersão das plantas foi repetido várias vezes, após as quais os vasos foram deitados de lado em tabuleiros contendo toalhas de papel humedecidas e cobertos com papel aderente. As plantas ficaram a recuperar em condições de elevada humidade até ao dia seguinte, passando de seguida para a estufa.

Depois da transformação, deixaram-se crescer as plantas até apresentarem síliquas maduras. Atingido este ponto, as plantas deixaram de ser regadas e as suas sementes só foram recolhidas depois das síliquas se apresentarem completamente secas.

#### 3.2.2.3 Selecção de plantas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD, linhas pOp/LhGR transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* com o constructo repórter pHTOP-CdA

Sementes de *Arabidopsis* obtidas das plantas transformadas com pHTOP-CdA via *Agrobacterium* foram esterilizadas e transferidas para meio MS suplementado com os antibióticos: higromicina B (30 µg/mL) - para selecção de plantas com o T-DNA de pHTOP integrado no seu genoma; carbenicilina (200 µg/mL) e timentina (2 mg/L) – para eliminação de células de *Agrobacterium* eventualmente presentes e que constituiriam uma fonte de contaminação das sementes. Ao meio de cultura, foram ainda acrescentados os antifúngicos, anfotericina (5 µg/mL) e nistatina (40 µg/mL).

As plântulas resistentes à higromicina (putativamente transgénicas) foram transferidas para meio MS sem antibióticos assim que apresentaram cotilédones, e para solo depois de desenvolverem o primeiro par de folhas verdadeiras. Uma vez em solo, os vasos foram inicialmente cobertos com película aderente (para manter um nível elevado de humidade), que foi removida 7 dias após transplantação.

#### 3.2.2.4 Métodos de indução da expressão do transgene pelo glucocorticoide (GR) dexametasona (Dex)

A activação da transcrição dos transgenes clonados no MCS do vector binário pHTOP requer a adição do glucocorticoide dexametasona (Dex, Sigma). Aquando da adição de Dex, este glucocorticoide liga-se ao produto do constructo activador, constitutivamente expresso nas linhas pOp/LhGR de *Arabidopsis*, activando-o. Na conformação activa, o complexo activador:GR, liga-se aos operões *lac* do constructo repórter e a transcrição é promovida em direcções opostas. Neste caso específico, para um lado ocorre a activação da transcrição do gene repórter (GUS), para o oposto começa a transcrição do cDNA da cardosina A. Este sistema encontra-se detalhadamente descrito em Resultados e Discussão secção 4.2.2.1.

A solução stock de dexametasona foi preparada na concentração de 20 mM dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) e foi armazenada a -20ºC ao abrigo da luz. Os métodos usados na aplicação de dexametasona para indução da expressão dos transgenes, repórter GUS e cDNA da cardosina A), encontram-se descritos no texto abaixo. Se o objectivo era a detecção da expressão do gene repórter os períodos de indução variavam entre 36-48 h. Quando o objectivo era a detecção da cardosina A, e após ensaios com diversos períodos de indução, os intervalos de tempo de incubação em Dex eram mais longos e variavam entre 4 a 7 dias.

↳ Indução em meio líquido

A indução dos transformantes primários para expressão de GUS foi realizada em meio líquido, em placas de cultura de células com 24 poços ("BD Falcon™ Multiwell Cell Culture Plates") com água esterilizada suplementada com 10 µM de Dex e um agente surfactante

em baixa concentração (ex: silwet 0,005%). A indução decorreu durante 36-48 h na câmara de crescimento a 20ºC com um fotoperíodo de 16 h.

Para a indução simultânea de um elevado número de plântulas de gerações subsequentes e para expressão da cardosina A, a matrazes contendo 25-50 mL de meio MS a meia força (esterilizado e arrefecido) adicionou-se dexametasona para uma concentração final de 20 µM. Plântulas com 11 dias, incubadas em condições assépticas e em meio, foram transferidas para os matrazes na câmara de fluxo laminar e a indução ocorreu por períodos de 4 a 7 dias, na câmara de crescimento a 20ºC, com um fotoperíodo de 16 h e com agitação.

↳ Indução em meio sólido

Plântulas com cerca de 11 dias, incubadas em condições assépticas e seleccionadas em meio com higromicina, foram transferidas para placas de Petri ou caixas tipo Magenta, contendo meio MS com 20 µM de dexametasona para indução da expressão e consequente imunodetecção da cardosina A. O período de indução variou entre 4 a 7 dias e decorreu a 20ºC com um fotoperíodo de 16 h .

#### 3.2.2.5 Coloração histoquímica para detecção de actividade do produto do gene repórter GUS

Folhas isoladas ou plântulas completas de *Arabidopsis* foram incubadas a 37ºC durante 4-12 h (16 h para transformantes primários) em tampão de coloração de GUS [75 mM de tampão fosfato pH 7,0, 10 mM EDTA e 0,5 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido (X-Gluc, inicialmente dissolvido em dimetilformamida – DMF; Melford Laboratories)], o qual foi infiltrado nos tecidos por vácuo. O tempo de incubação no tampão de GUS dependeu do nível de actividade esperado para a β-glucuronidase.

Seguidamente procedeu-se à extracção das clorofilas presentes nas amostras com etanol a 70% (v/v). A actividade de GUS foi revelada pela formação de um precipitado de cor azul, resultante da metabolização do substrato X-Gluc.

#### 3.2.2.6 Isolamento de protoplastos a partir de plântulas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD, linhas pOp/LhGR

O isolamento de protoplastos a partir de plântulas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD linhas pOp/LhGR para imunodetecção da cardosina A foi realizado segundo o método descrito por Zheng *et al.* (Zheng, *et al.*, 1997) com algumas modificações. Utilizaram-se plântulas inteiras seleccionadas em higromicina e induzidas em meio MS líquido com 20 µM de dexametasona durante 7 dias (consultar secção 3.2.2.4). Findado o período de indução, as plântulas foram injuriadas com uma lâmina de bisturi esterilizada e colocadas numa solução enzimática composta por 1% (m/v) de celulase (Onozuka R10) e 0,25% (m/v) de macerozima (Onozuka R10; ambas da Yakult Honsha Company) em tampão MM (0.4 M manitol e 20 mM MES; o pH foi ajustado para 5,6-5,8 com KOH). As plântulas foram sujeitas

à infiltração por vácuo da solução enzimática e a reacção de digestão das paredes celulares decorreu durante 3 h na obscuridade, à temperatura ambiente e sem agitação.

Após o período de digestão, os protoplastos foram cuidadosamente libertados das folhas com a ajuda de uma pipeta de 10 mL esterilizada. A solução contendo os protoplastos foi suavemente aspirada com a ajuda de uma pipeta de 10 mL esterilizada, e filtrada através de um filtro de nylon com poro de 100 µm, posicionado sobre uma nova placa de Petri. Adicionaram-se 2 mL de meio MM à placa original, para libertar mais protoplastos, e voltou a filtrar-se. A suspensão filtrada contendo protoplastos foi cuidadosamente aspirada com uma pipeta de 10 mL e transferida para tubos falcon de 15 mL. Os tubos foram centrifugados a 65x*g*, 5 min a 20ºC, após o qual os protoplastos sedimentaram. A centrífuga foi regulada para as velocidades de aceleração e desaceleração mínimas, de modo a minimizar os efeitos de acelerações/desacelerações bruscas, sobre a viabilidade dos protoplastos. Descartou-se o sobrenadante e os protoplastos foram cuidadosamente ressuspendidos em 5 mL de meio MM. Os passos de centrifugação/ressuspensão foram repetidos mais duas vezes. Finalmente, descartou-se o sobrenadante e a fracção de protoplastos foi ressuspendida num volume apropriado de meio MM de forma a ficar na concentração celular adequada para as experiências subsequentes.

#### 3.2.2.7 Isolamento de vacúolos a partir de protoplastos de plântulas de *Arabidopsis thaliana*

O isolamento de vacúolos, a partir de protoplastos de plântulas de *Arabidopsis thaliana* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Di Sansebastiano *et al.* (Di Sansebastiano, *et al.*, 1998). Para o isolamento de vacúolos foi necessário proceder-se primeiro ao isolamento de protoplastos (como descrito no ponto 3.2.2.6) sendo conveniente começar com um número mínimo de protoplastos de cerca de $10^6$. 1/10 do número total de protoplastos foi recolhido como amostra da fracção celular e o restante foi utilizado no processo de isolamento de vacúolos.

O sedimento de protoplastos reservado para o isolamento dos vacúolos foi mantido em gelo. Ressuspenderam-se as células em 3 mL de meio de lise pré-aquecido a 42ºC. Adicionaram-se mais 2 mL de tampão de lise aquecido, misturou-se cuidadosamente e de seguida incubou-se durante 5-10 min à temperatura ambiente, tempo no qual ocorreu a lise dos protoplastos. O meio de lise foi composto por: 0,2 M de manitol, 10% (v/v) de Ficoll 400, 20 mM de EDTA e 5 mM de HEPES pH 8,0. O meio com esta composição foi mantido a -20ºC e antes de ser usado foram-lhe adicionados 2 mM de DTT e 150 µg/mL de BSA.

Findado o tempo de lise cobriu-se cuidadosamente a mistura nos tubos, primeiro com 3 mL de tampão de Ficoll a 5% (uma proporção de 1:1 de meio de lise:tampão para vacúolos com manitol), depois com 1 mL de tampão para vacúolos com manitol. O tampão para

vacúolos com manitol (0,6 M de manitol e 10 mM de HEPES, pH 7,5) foi mantido a -20ºC e antes de ser usado foi-lhe adicionada BSA para a concentração de 150 µg/mL.

Os tubos, apresentando três fases bem distintas, foram centrifugados durante 10 min a 200x*g* a 15ºC. Após a centrifugação recolheu-se a camada superior correspondente à camada com vacúolos isolados. Esta fracção foi congelada em azoto líquido e conservada a -80ºC até precipitação com TCA para imunodetecção da cardosina A.

#### 3.2.2.8 Preparação dos extractos proteicos de transgénicas de *Arabidopsis* para imunodetecção da cardosina A

Para a imunodetecção da cardosina A em transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, plântulas completas foram sujeitas a períodos de indução entre 4 a 7 dias (como descrito no ponto 3.2.2.4), após os quais de procedeu à extracção de proteínas solúveis presentes nas amostras.

Os extractos proteicos foram preparados a partir de 50 – 300 mg de tecido fresco que foi congelado em azoto líquido. O material vegetal foi homogeneizado em tubo de microcentrífuga com a ajuda de um homogeneizador de plástico, e na presença de dois volumes do seguinte tampão de extracção de proteínas: 50 mM de citrato de sódio pH 5,5, 5% (m/v) de SDS, 0,01% (m/v) de BSA (Fraction V; Roche Biochemicals), 150 mM de NaCl e 2% (v/v) de β-mercaptoetanol. Foram ainda adicionados 10 µL de uma solução 100x concentrada de "cocktail" inibidor de proteases (Sigma), por cada 300 mg de tecido fresco. Depois do material homogeneizado, o conteúdo dos tubos foi misturado no vortex por breves instantes e, durante as restantes extracções, os tubos foram mantidos em gelo. Após uma fervura de 10 min, as amostras foram centrifugadas a 13000 r.p.m. a 4ºC e os sobrenadantes foram recolhidos para novos tubos de microcentrífuga, congelados em azoto líquido e armazenados a -80ºC. Para a imunodetecção da cardosina A procedeu-se como descrito na secção 3.2.1.5.

#### 3.2.2.9 Ensaios de resistência à Endoglucosidase-H (endoH)

Os extractos proteicos preparados como descrito em 3.2.2.8 foram também utilizados em ensaios de resistência de glicoproteínas à acção da endoglucosidase-H (endoH).

Os ensaios de resistência dos *N*-glicanos da cardosina A à digestão pela endoH foram realizaram-se segundo o método descrito por Batoko *et al.* (Batoko, *et al.*, 2000). Em tubos de microcentrífuga adicionaram-se volumes iguais de extracto proteico (10-20 µL) e tampão G5 1x (New England Biolabs). Esta mistura resulta na diluição do SDS presente no extracto proteico para concentrações não inibitórias para a acção da glucosidase. As misturas extracto/tampão G5 foram incubadas durante 1 h a 37ºC na presença de 1 µL de endo$H_f$ (70 kDa, 1000 U), ou 1 µL de endoH (29 kDa, 500 U), ambas da New England Biolabs. As reacções controlo consistiram na omissão da adição da glucosidase. A reacção foi inactivada pela adição de tampão de amostra de proteínas.

## 3.3 Estudo do transporte e processamento da cardosina A em *Nicotiana tabacum* SR1 cv. Petit Havana – expressão transitória mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

O estudo do transporte e processamento da cardosina A em *Nicotiana tabacum* foi realizado recorrendo a um sistema de expressão transitória em epiderme foliar via *Agrobacterium* e descrito por Batoko *et al.* (Batoko, *et al.*, 2000).

### 3.3.1 Germinação e manutenção de plantas de *Nicotiana tabacum* SR1 cv. Petit Havana

Sementes de *Nicotiana tabacum* SR1 cv. Petit Havana foram espalhadas em vasos com turfa (Astro Universal compost; E.A Goundrey and Son Ltd) e postas a germinar em câmaras de crescimento com um fotoperíodo de 16 h e a 20ºC. Após 3 semanas de crescimento, as plântulas foram transplantadas para vasos individuais e foram mantidas nas mesmas condições de incubação.

### 3.3.2 Expressão transitória da cardosina A em epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Em cada ensaio de expressão transitória da cardosina A em folhas de *Nicotiana tabacum* (Batoko, *et al.*, 2000) utilizou-se uma colónia isolada de *Agrobacterium* transformado com pVKH18EN6-CdA para inocular 3 mL de meio LB com kanamicina e IPTG (0,4 mM) e a suspensão bacteriana foi incubada a 28ºC com agitação até atingir a fase estacionária de crescimento.

Centrifugou-se 1 mL da suspensão de *Agrobacterium* durante 1 min a 13000 r.p.m., desprezou-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se o sedimento em 1 mL de tampão de infiltração [50 mM de MES, 2 mM de $Na_3PO_4.12H_2O$, 0,5% (m/v) de glicose; o pH foi ajustado para 5,6 com NaOH]. Seguiu-se uma segunda lavagem com o mesmo tampão, agora suplementado com 100 µM de acetosiringona (3', 5'-dimetoxi-4'-hidroxiacetofona a 97%, Sigma-Aldrich). A solução stock de acetosiringona, um composto fenólico que contribui para o aumento da virulência da estirpe de *Agrobacterium*, foi preparada na concentração de 10 mM em DMSO, dividida em alíquotas de 10 µL e armazenada, ao abrigo da luz, a -20ºC.

Após as lavagens, o sedimento foi ressuspendido em 1 mL de tampão de infiltração com acetosiringona e a suspensão bacteriana foi diluída de forma a ajustar a concentração do inóculo à densidade óptica a 600 nM requerida (para a cardosina A $DO_{600}$=0.3). A suspensão bacteriana foi usada para infiltrar a epiderme abaxial de folhas de plantas de *Nicotiana tabacum* com 5-6 semanas, utilizando para tal seringas de 1 mL esterilizadas e

sem agulha, aplicando uma suave pressão, o que induz a infiltração do inóculo através dos estomas.

Em experiências envolvendo a co-expressão de diferentes constructos, os clones bacterianos contendo os diversos constructos de interesse foram misturados antes da infiltração, à $DO_{600}$ adequada a cada caso.

As áreas foliares infectadas foram delimitadas com caneta indelével e as plantas foram incubadas nas mesmas condições usadas durante o seu crescimento (20ºC, fotoperíodo 16 h).

A informação sobre dos diferentes constructos usados nas experiências de expressão transitória mediada por *Agrobacterium* encontra-se sumariada na Tabela II-3.

**Tabela II-3 – Tabela com a descrição dos constructos utilizados em experiências de expressão transitória.**

| Constructos* | Descrição | Referência |
|---|---|---|
| *At*RabD1 (N121I)[a] | Forma mutante da GTPase RabD1 de *Arabidopsis thaliana*; Inibe a fusão de vesículas derivadas do RE com a membrana do *cis*-Golgi | Betts *et al.*; resultados não publicados |
| *At*RabD2a (N121I)[a] | Forma mutante da GTPase RabD2a de *Arabidopsis thaliana*; Inibe a fusão de vesículas derivadas do RE com a membrana do *cis*-Golgi | (Batoko, *et al.*, 2000) |
| *Nt*Sar1 *wt*[a] | Forma nativa (*wild type- wt*) da GTPase Sar1 de *Nicotiana tabacum*; Responsável pelo recrutamento do revestimento COPII requerido para formação e destacamento de vesículas a partir do RE se fundem com a membrana do *cis*-Golgi | (Andreeva, *et al.*, 2000) |
| *Nt*Sar1 (H74L)[a] | Forma mutante da GTPase Sar1 de *Nicotiana tabacum*; Inibe a perda do revestimento COPII das vesículas com a mesma designação, impedindo desta forma o transporte anterógrado entre RE e Golgi | (Andreeva, *et al.*, 2000) |
| secGFP[a] | Forma secretada da GFP (*green fluorescent protein*) - marcador do apoplasto | (Batoko, *et al.*, 2000) |
| Aleu-GFP[a] | GFP fundida a um sinal de direccionamento *N*-terminal para vacúolos vegetativos da aleuraína de cevada | (Di Sansebastiano, *et al.*, 2001) |
| TIP-GFP[a] | GFP fundida a jusante de uma γ-TIP de *Brassica oleracea* – marcador para o tonoplasto de vacúolos vegetativos | (Reisen, *et al.*, 2003) |
| YFP-HDEL[b] | YFP (*yellow fluorescent protein*) fundida com o sinal *C*-terminal para retenção no RE (HDEL) – marcador para o RE | (Irons, *et al.*, 2003) |
| *ST*-CFP[b] | CFP (*cyan fluorescent protein*) fundida a um sinal *N*-terminal de ancoragem no Golgi (*syaliltransferase signal anchor sequence*) – marcador para o Golgi | (Brandizzi, *et al.*, 2002) |

*A nomenclatura aqui utilizada pode não corresponder à usada pelos autores citados nas referências originais. [a] constructos usados em ensaios de co-expressão com a cardosina A; [b] constructos utilizados no estudo do efeito do inibidor da via secretora Brefeldina A (BFA) in vivo. Todos os constructos estavam clonados em pVKH18EN6 (Batoko, *et al.*, 2000). As formas *wt* e mutante da NtSar1 foram gentilmente cedidas no vector pBlueScript (Stratagene) pelo grupo do Professor Chris Hawes da Oxford Brookes University e depois clonadas em pVKH18EN6.

### 3.3.3 Preparação dos extractos proteicos de folhas de *Nicotiana tabacum* infiltradas com *Agrobacterium*: imunodetecção da cardosina A e ensaios de resistência à endoH

Extractos proteicos de folhas infiltradas de *Nicotiana tabacum*, preparados segundo o procedimento descrito em 3.2.2.8, foram utilizados para a imunodetecção da cardosina A (consultar secção 3.2.2.8) e em ensaios de resistência à digestão pela endoH (consultar secção 3.2.2.9).

### 3.3.4 Isolamento de protoplastos a partir de folhas de *Nicotiana tabacum* infiltradas com pVKH18EN6-CdA

O isolamento de protoplastos a partir de folhas infiltradas de *Nicotiana tabacum* foi realizado segundo o método descrito por Denecke e Vitale (Denecke e Vitale, 1995), ao qual foram introduzidas algumas modificações.

No isolamento de protoplastos foram utilizadas folhas de *Nicotiana tabacum* infiltradas como descrito na secção 3.3.2. 24 h após infiltração, a epiderme abaxial das regiões foliares infiltradas (entre nervuras secundárias) foi cortada com uma lâmina de bisturi e as paredes celulares foram digeridas com uma mistura de 0,4% (m/v) de celulase (Onozuka R10) e 0,2% (m/v) de macerozima (Onozuka R10; ambas da Yakult Honsha Company), dissolvidas em meio TEX suplementado com carbenicilina (200 µg/mL) e timentina (2 µg/mL) para inibir o crescimento excedentário de *Agrobacterium*.

Para a preparação de 1 L de meio TEX dissolveram-se em água esterilizada: 3,2 g de meio B5 de Gamborg (Sigma), 250 mg de $NH_4NO_3$, 750 mg de $CaCl_2.2H_2O$, 500 mg de MES e 136,92 g de sacarose (0,4M). A esterilização do meio fez-se por filtração, após a qual se adicionam os antibióticos. A mistura de digestão foi sempre preparada fresca antes de cada experiência. Os isolamentos de protoplastos foram realizados quer com tempos de digestão das paredes celulares longos (12-15 h), quer curtos (4-5 h). No caso de tempos de digestão curtos, as folhas foram sujeitas a infiltração da solução enzimática por vácuo, para optimizar a difusão da solução digestiva.

Depois de cortadas, incubaram-se as secções de folhas em placas de Petri contendo 9 mL de solução enzimática, durante cerca de 15 h, na obscuridade e à temperatura ambiente (≈22ºC), com a epiderme abaxial voltada para cima e sem sobreposição dos pedaços de folhas. A partir deste ponto, o procedimento foi realizado numa câmara de fluxo laminar.

Após o período de digestão, os protoplastos foram cuidadosamente libertados das folhas com a ajuda de uma pipeta de 10 mL esterilizada. A solução contendo os protoplastos foi suavemente aspirada com a ajuda de uma pipeta de 10 mL esterilizada, e filtrada através de um filtro de nylon com poro de 100 µm, posicionado sobre uma nova placa de Petri. Após

filtrada a suspensão, adicionaram-se 2 mL de meio TEX com antibióticos à placa original, para libertar mais protoplastos, aumentando assim o rendimento do procedimento. Este volume foi também filtrado, e os passos de adição de meio/filtração foram repetidos até o meio aparecer sem coloração verde, indicando que a recuperação de protoplastos a partir das folhas digeridas já não estava a ocorrer.

A suspensão filtrada contendo protoplastos foi de seguida cuidadosamente aspirada com uma pipeta de 10 mL e dividida por tubos falcon de 15 mL. Tal como descrito no protocolo original, a fracção de protoplastos vivos (flutuantes) foi purificada após duas centrifugações/lavagens com meio TEX suplementado com carbenicilina e timentina, a 100x*g* 10 min a 20°C (Figura II-13, ❶-❹).

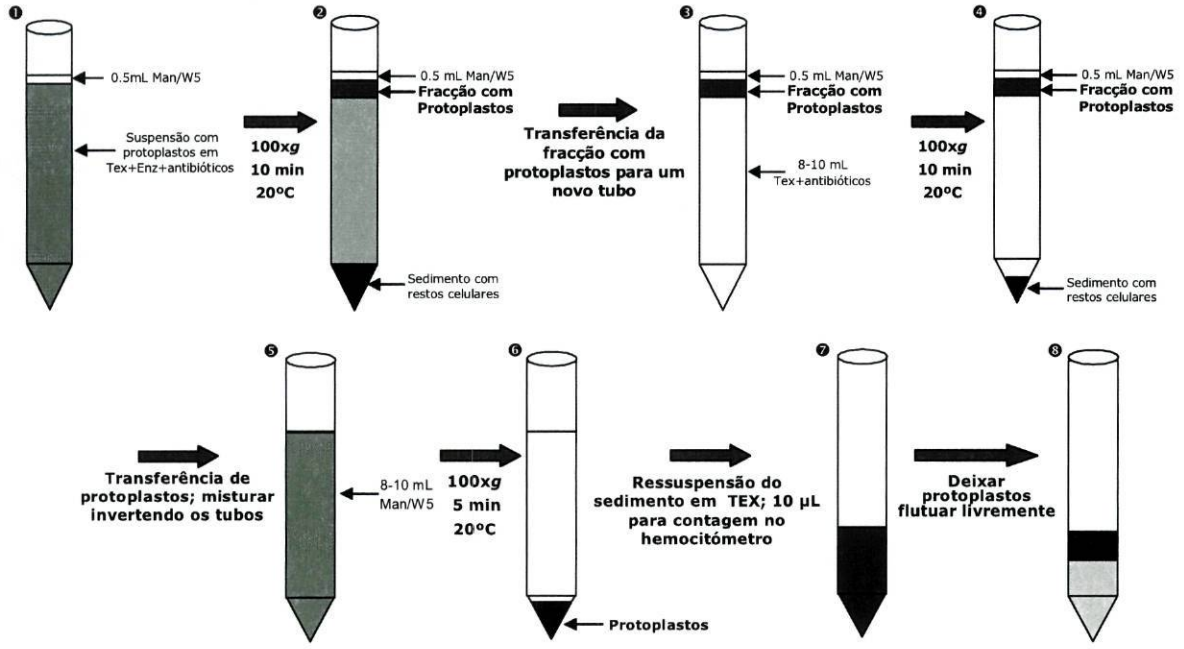



**Figura II-13 – Esquema representativo do procedimento usado para o isolamento de protoplastos a partir de folhas de *Nicotiana tabacum*.** A adição de 0,5 mL de Manitol/W5 aos tubos falcon fez-se porque é mais fácil aspirar a camada de protoplastos a partir de uma interface do que da camada superior. A recolha dos protoplastos foi sempre feita com pontas cortadas para danificar as células o mínimo possível. No passo ❺, o volume adicionado de Manitol/W5 deve ser pelo menos 3 vezes maior do que o volume resultante do passo anterior para permitir a obtenção de um sedimento compacto no passo ❻. O último passo de centrifugação foi substituído por um compasso de espera em que se deixam os protoplastos flutuar naturalmente em meio TEX.

A fracção isolada de protoplastos foi depois transferida para um novo tubo falcon contendo um excesso de Manitol/W5 (pelo menos 3 vezes o volume da fracção com protoplastos) e misturaram-se cuidadosamente as duas fases (Figura II-13, ❺). Os tubos foram depois centrifugados durante 5 min a 100x*g* a 20°C, após o qual os protoplastos sedimentaram (Figura II-13, ❻). Findada a última centrifugação, removeu-se cuidadosamente o sobrenadante e adicionou-se meio TEX para um volume final de 4-5mL. Os protoplastos foram ressuspendidos neste volume e retiraram-se 10 µL de suspensão celular para contagem de células com um hemocitómetro ao microscópio óptico. A fracção de protoplastos viáveis foi deixada a flutuar livremente em TEX e o meio excedentário por

baixo da linha correspondente aos protoplastos foi retirado Figura II-13, ❽). A fracção de protoplastos foi depois ressuspendida num volume apropriado de meio TEX de forma a ficar na concentração celular adequada para as experiências subsequentes.

### 3.3.5 Experiências de *Pulse-Chase* com protoplastos de *Nicotiana tabacum* a expressarem cardosina A

Para as experiências de *pulse-chase* realizadas neste trabalho seguiu-se a metodologia descrita por Denecke e Vitale (1995)(Denecke e Vitale, 1995), introduzindo algumas modificações.

A marcação radioactiva, ou *pulse*, das proteínas sintetizadas *de novo* pelos protoplastos, foi efectuada com o "Trans$^{35}$S-Label *No-Thaw* Metabolic Labelling Reagent" (ICN Biochemicals), durante 3 h e utilizando um mínimo de $10^6$ protoplastos em cada reacção de marcação. Nas primeiras experiências testaram-se períodos de marcação de 1 e 3 h. Verificou-se que com 3 h de marcação, o sinal aparecia mais forte sem haver no entanto a conversão da forma precursora da cardosina A em forma intermédia. Por esta razão, adoptou-se o período de 3 h de marcação em experiências subsequentes.

Para a marcação de 300 µL de suspensão celular (o equivalente a aproximadamente $1.2x10^6$ protoplastos), utilizaram-se 20 µL da mistura de marcação (10 µCi/µL) diluídos em 280 µL de meio TEX com antibióticos. O *pulse* foi realizado em tubos de microcentrífuga, mantidos na vertical, sem agitação e na obscuridade. Após o passo de marcação, os protoplastos foram deixados a flutuar livremente, e o meio abaixo da camada celular foi recolhido e substituído por aproximadamente o mesmo volume de meio de *chase*, ou seja, meio TEX suplementado com metionina (10 mM; Sigma) e cisteína (5 mM; Sigma) não marcadas.

Nas experiências em que o efeito do inibidor BFA estava a ser testado, após o período de marcação, o meio de *pulse* (com aminoácidos radioactivos) foi imediatamente substituído por meio de *chase* suplementado com a solução de BFA (10 µg/mL; Sigma).

No período de *chase*, e nos *time-points* apropriados para amostragem, ressuspenderam-se os protoplastos e retiraram-se 100 µL de suspensão celular. Os protoplastos presentes nas amostras recolhidas foram deixados flutuar livremente e o meio por baixo da camada celular foi cuidadosamente removido. Seguidamente, adicionou-se 1 mL de NaCl a 250 mM, para após uma centrifugação durante 2 min a 4000 r.p.m. e a 4ºC, se obter um sedimento celular compacto. O sedimento resultante foi congelado em azoto líquido e mantido a -80ºC até homogeneização.

Posteriormente, procedeu-se à homogeneização dos protoplastos presentes nos sedimentos, com a ressuspensão e lise destes em 4 volumes de tampão de homogeneização preparado fresco e suplementado com um volume apropriado de "cocktail"

inibidor de proteases 100x concentrado (Sigma). O tampão de homogeneização é composto por 200 mM Tris HCl pH 8.0, 300 mM de NaCl, 1% (v/v) de Triton X-100 e 1 mM de EDTA.

Após ressuspensão, os sedimentos foram submetidos a dois passos de congelação/descongelação para ajudar à fragmentação das células. Seguiu-se uma centrifugação durante 5 min a 13000 r.p.m. a 4ºC, após a qual se recolheram os sobrenadantes. Estes foram congelados em azoto líquido, e mantidos a -80ºC até imunoprecipitação.

### 3.3.6 Imunoprecipitação da cardosina A

O protocolo seguido para a imunoprecipitação foi o descrito por Denecke e Vitale em 1995 (Denecke e Vitale, 1995).

No procedimento para a imunoprecipitação da cardosina A todas as manipulações foram efectuadas em gelo ou a 4ºC, usando tampões arrefecidos. A uma fracção do homogeneizado obtido a partir do sedimento de protoplastos, no máximo de 300 µL, juntou-se tampão NET-gel de modo a perfazer 1 mL. O tampão NET é composto por: 50 mM de Tris HCL pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 0,1% (v/v) de Nonidet P-40 e 0,02% (v/v) de azida de sódio. O tampão NET-gel é constituído por tampão NET, ao qual se adiciona gelatina para uma concentração final de 0,025% (v/v). A inclusão da gelatina no tampão NET é essencial para reduzir a co-precipitação de antigénios não específicos.

Após a adição do tampão NET-gel à fracção do homogeneizado, centrifugou-se a mistura durante 4 min a 13000 r.p.m. a 4ºC e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga. Repetiu-se a centrifugação e o sobrenadante resultante foi incubado com a diluição apropriada de anticorpo primário durante 2 h em gelo. No caso do anti-rec A, a diluição usada foi de 1:200. Findado o passo de incubação com o anticorpo primário, adicionaram-se 150 µL de uma suspensão a 10% (v/v) de Protein A-Sepharose hidratada (Sigma) em tampão NET e incubou-se durante 2 h em gelo, com uma agitação suave. De seguida, as microesferas foram sedimentadas por centrifugação e o sobrenadante foi desprezado. Ao sedimento, adicionaram-se 20 a 30 µL de tampão de amostra de proteínas, e a suspensão foi fervida durante 5 min e centrifugada a 13000 r.p.m à temperatura ambiente durante 2 min. Recolheram-se os sobrenadantes e, aos sedimentos, foram adicionados mais 10 µL de tampão de amostra de proteínas 2x. Ressuspendeu-se e centrifugou-se como acima. Os segundos sobrenadantes combinaram-se com os primeiros, e ambos foram congelados em azoto líquido e mantidos a -80ºC até electroforese.

Para a corrida electroforética, as amostras foram carregadas em geles com 12% de poliacrilamida com 1,0 mm de espessura, para evitar o aparecimento de fissuras durante o processo de secagem.

À electroforese seguiu-se um processo de fixação das proteínas com uma mistura de isopropanol:$H_2O$:ácido acético (25:65:1) durante 30 min, com agitação e ao abrigo da luz. Findado este tempo de incubação, descartou-se a solução de fixação e substituiu-se por "Amplify™ Fluorographic Reagent" (Amersham Biosciences). A incubação do gel em Amplify durante 30 min foi feita com agitação e ao abrigo da luz e serviu para intensificar o sinal de $^{35}S$ presente nas amostras. Após lavagem do gel com água esterilizada durante 10 min, procedeu-se à secagem deste. O gel foi colocado sobre papel Whatman e a secagem ocorreu durante a noite, a quente e em vácuo. O gel seco foi coberto com papel aderente e posicionado numa cassete de autoradiografia contendo o "Kodak BioMax TranScreen LE" (Amersham Biosciences). Foi colocado um filme de elevada sensibilidade ("Hyperfilm™ MP"; Amersham Biosciences) dentro do écran de dupla folha, e após 2-3 semanas de exposição, procedeu-se à revelação do filme utilizando para o efeito um revelador automático X-Omat M43 Processor (Kodak).

### 3.3.7 Isolamento de vacúolos a partir de protoplastos de folhas de *Nicotiana tabacum* SR1 infiltradas por *Agrobacterium* contendo o constructo pVKH18EN6-CdA

O isolamento de vacúolos a partir de protoplastos de folhas de *Nicotiana tabacum* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Hadlington e Denecke (Hadlington e Denecke, 2001). Tal como já foi referido para *Arabidopsis*, também com *Nicotiana tabacum* é conveniente começar com um número mínimo de protoplastos de cerca de $10^6$. 1/10 do número total de protoplastos foi recolhido como amostra da fracção celular, e o restante foi utilizado no processo de isolamento de vacúolos.

O sedimento de protoplastos reservado para o isolamento dos vacúolos foi mantido em gelo, e adicionaram-se-lhe 5 mL de meio de lise pré-aquecido a 42ºC. Misturou-se bem e de seguida colocaram-se os tubos num banho-maria a 42ºC durante 20 seg. A suspensão foi pipetada para cima e para baixo com uma pipeta de 10 mL para ajudar a rebentar as células que ainda não tinham sido rebentadas por acção do choque osmótico ou do choque térmico.

A composição do meio de lise utilizado foi a seguinte: 0,2 M de manitol, 10% (v/v) de Ficoll 400, 20 mM de EDTA e 5 mM de HEPES pH 8,0. O meio foi mantido a -20ºC e antes de ser usado adicionaram-se 2 mM de DTT, 150 µg/mL de BSA e 10 µg/mL de vermelho neutro.

Findada a incubação a 42ºC, cobriu-se cuidadosamente a mistura nos tubos, primeiro com 3 mL de tampão de Ficoll a 5% (uma proporção de 1:1 de meio de lise:tampão para vacúolos com betaína), depois com 1 mL de tampão para vacúolos com betaína. A composição do tampão para vacúolos com betaína utilizado foi a seguinte: 0,6 M de betaína

e 10 mM de HEPES pH 7,5. O tampão foi mantido a -20ºC e antes de ser usado foi adicionada BSA para uma concentração de 150 µg/mL.

Os tubos, apresentando três fases bem distintas, foram centrifugados durante 10 min a 3000x*g* a 4ºC, após os quais se removeu, com extremo cuidado, a camada marcada pelo vermelho neutro, correspondente à camada com vacúolos isolados e posicionada na interface abaixo do tampão com betaína. A recolha da camada com vacúolos foi realizada com a pipeta mesmo acima da primeira, de modo a assegurar que a única solução aspirada, para além da suspensão com vacúolos, foi o tampão com betaína, já que o manitol presente no tampão de Ficoll a 5% inibe a reacção enzimática subsequente (secção 3.3.8). Foi importante recolher a interface vacuolar num volume mínimo de tampão com betaína (aproximadamente 200 µL).

Depois de recolhida a camada composta pelos vacúolos intactos libertados pelos protoplastos e calculado o seu volume, procedeu-se à ressuspensão do sedimento celular separado no início do procedimento e que foi mantido em gelo durante o processo de isolamento dos vacúolos. Este sedimento foi ressuspendido no mesmo volume de tampão com betaína, que aquele ocupado pelos vacúolos após purificação. As amostras correspondentes às fracções celular e vacuolar foram sonicadas durante 5 seg (amplitude de 5 µm), ao que se seguiu uma centrifugação a 14000 r.p.m. durante 10 min a 4ºC. Metade do volume dos sobrenadantes de cada amostra foi transferida para novos tubos de microcentrífuga, que foram congelados em azoto líquido e armazenados a -80ºC, até utilização em electroforese em gel de poliacrilamida seguida da imunodetecção da cardosina A (consultar secção 3.2.2.8). O restante volume dos sobrenadantes das amostras vacuolar e celular foram transferidos para novos tubos de microcentrífuga, para serem de seguida, usados na quantificação da recuperação de vacúolos através de ensaios de actividade do marcador vacuolar α-manosidase.

### 3.3.8 Quantificação da recuperação de vacúolos isolados – ensaios de actividade da α-manosidase

A quantificação da recuperação de vacúolos, isolados a partir de protoplastos, com base em ensaios de actividade do marcador vacuolar α-manosidase, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Hadlington e Denecke (2001) (Hadlington e Denecke, 2001).

Começou-se por preparar a solução do substrato para a α-manosidase. Para tal, a 1 mL de tampão de extracção (250 mM de acetato de sódio, pH 4,6) adicionou-se 1 µL de ρ-nitrofenil α-D manopiranósido (Sigma) para a concentração final de 6 mM. Os homogeneizados a utilizar nos ensaios de actividade da α-manosidase foram sempre preparados de fresco.

Para a quantificação de recuperação de vacúolos, adicionaram-se, a 20 µL de homogeneizado vacuolar, 430 µL de tampão de extracção. A reacção teve início após adição de 50 µL de solução contendo o substrato para a α-manosidase. Os tubos foram incubados durante 1 h, ou mais, a 30ºC. As reacções foram paradas pela adição de 800 µL de 1 M $Na_2CO_3$, que resultou no aparecimento de uma cor amarela, e mediram-se as absorvâncias das amostras a 405 nm num espectrofotómetro. O volume de extracto e/ou tempos de reacção deve ser ajustado de modo a obter leituras numa gama linear de valores (entre 0,1 e 1,0).

### 3.3.9 Precipitação das proteínas presentes nos homogeneizados vacuolares e celulares pelo ácido tricloroacético (TCA)

As proteínas presentes nos homogeneizados das fracções celular e vacuolar (consultar secção 3.3.7) foram sujeitas a precipitação pelo ácido tricloroacético (TCA) como descrito abaixo, e utilizadas para a imunodetecção da cardosina A (ver secção 3.2.2.8).

Para a precipitação das proteínas presentes nos extractos vacuolares e celulares pelo TCA começou por adicionar-se 1 volume de uma solução a 20% (m/v) de TCA aos extractos descongelados. O conteúdo dos tubos foi brevemente misturado no vortex e incubado em gelo 15 min, ao que se seguiu uma centrifugação a 13000 r.p.m. a 4ºC durante 15 min. Os sedimentos foram lavados com 500 µL de acetona a -20ºC e centrifugados como acima. O sobrenadante foi novamente descartado e repetiu-se o passo de lavagem. O sedimento foi deixado secar ao ar e procedeu-se à sua ressuspensão em tampão de amostra de proteínas 1x. As amostras foram fervidas durante 5 min e depois de brevemente centrifugadas para recolher o conteúdo do tubo no fundo, os sobrenadantes foram recolhidos, congelados em azoto líquido e mantidos a -80ºC até se proceder à electroforese.

Antes de serem carregados em gel, os volumes dos extractos correspondentes às fracções celulares e vacuolares foram ajustados para valores iguais de actividade da α-manosidase. Posteriormente, volumes iguais de diferentes extractos foram sujeitos a electroforeses em gel de poliacrilamida seguida da imunodetecção da cardosina A (consultar secção 3.2.2.8).

### 3.3.10 Ensaios de secreção da cardosina A por protoplastos e folhas de *Nicotiana tabacum* SR1 infiltradas por *Agrobacterium*

Protoplastos isolados como descrito no ponto 3.3.4 foram colhidos para análise do conteúdo proteico da fracção celular como descrito em 3.2.2.8. Para ensaiar a secreção da cardosina A, o meio em que os protoplastos foram incubados também foi recolhido e sujeito à precipitação de proteínas pelo ácido tricloroacético (TCA). Os sobrenadantes resultantes

do procedimento experimental foram recolhidos, congelados em azoto líquido e mantidos a -80ºC até electroforese e imunodetecção da cardosina A (consultar secção 3.2.2.8).

Foram ainda realizados ensaios de secreção com folhas infiltradas, segundo a metodologia descrita por Monroe *et al.* (1999) (Monroe, *et al.*, 1999), com algumas modificações. Cerca de 60 h após infiltração com *Agrobacterium tumefaciens* transformado com o constructo pVKH18EN6-CdA, as folhas infectadas foram cortadas com uma lâmina de bisturi e incubadas em tampão de extracção 10 x concentrado (volume de tampão em µL/peso amostra em mg) [40 mM de HEPES pH 7,0, 1 M NaCl, 5 mM de DTT, 2 mM EDTA] durante 6 h à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e num agitador orbital regulado para 120 r.p.m. Após esta incubação, o meio foi recolhido, filtrado e distribuído por tubos de microcentrífuga. Estes tubos foram depois centrifugados a 13000 rpm durante 15 min a 4ºC para sedimentar os detritos. Os sobrenadantes foram recolhidos e utilizados para precipitação das proteínas no meio pelo TCA (consultar secção 3.3.9).

### 3.3.11 Microscopia de varrimento confocal

Decorridas 48-72 h após infiltração de folhas de *Nicotiana tabacum* SR1 com *Agrobacterium tumefaciens* transformado com os diferentes constructos de marcadores fluorescentes direccionados para distintos compartimentos subcelulares (ver Tabela 1), pedaços de folha com aproximadamente 1 $cm^2$ foram excisados de regiões infectadas montados em água esterilizada, e as células da epiderme abaxial foram observadas ao microscópio laser confocal (CLSM). Imagens isoladas e projecções de células expressando os marcadores fluorescentes foram adquiridas utilizando um microscópio confocal modelo LSM 510 CLSM (Zeiss) com um laser de árgon a 25 mW.

Na recolha de imagens com mGFP5 ($\lambda_{max.exc.}$= 395 e 473 nm; $\lambda_{max.emis.}$= 507 nm), foi usado o comprimento de onda de excitação de 458 nm e a luz emitida foi detectada com um filtro BP 475-525. Na recolha de imagens com YFP ($\lambda_{max.exc.}$= 515 nm; $\lambda_{max.emis.}$= 528 nm), foi usado o comprimento de onda de excitação de 514 nm e a luz emitida foi detectada com um filtro BP 535-590. O processamento e análise das imagens adquiridas ao microscópio confocal foi efectuado utilizando o Zeiss LSM Image Browser 3.1.0.99.

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1 Selecção do anticorpo primário para detecção da cardosina A expressa nos sistemas heterólogos

Em estigmas de cardo, as cardosinas A e B constituem aproximadamente 60% do total de proteínas solúveis (Ramalho-Santos, *et al.*, 1997) o que facilita a detecção destas PAs nestas estruturas.

Para avaliar qual dos anticorpos primários contra a cardosina A seria o mais indicado para a sua detecção nos sistemas de expressão heterólogos, fizeram-se ensaios com extractos proteicos de estigmas de cardo utilizando diferentes quantidades de proteínas e distintos anticorpos primários dirigidos contra a cardosina A. Os resultados encontram-se apresentados na Figura II-14.

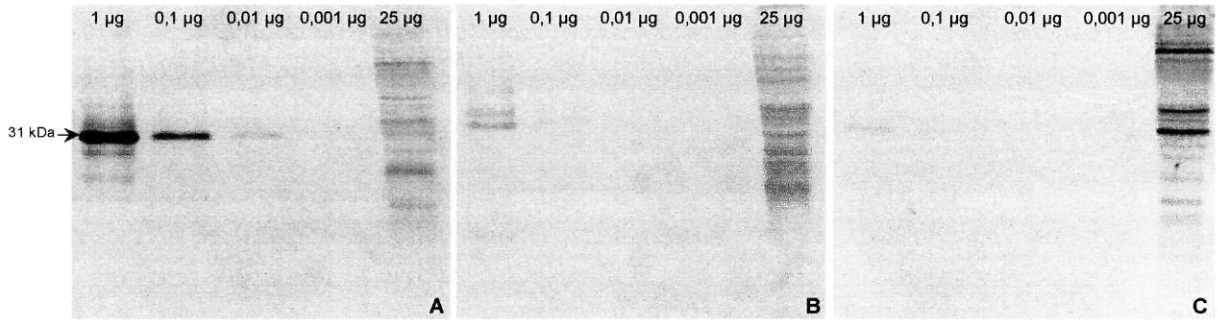



**Figura II-14 – Imunodetecção da cardosina A em diferentes quantidades de proteínas de estigmas de cardo com distintos anticorpos primários.** Foram utilizados 0,001-1 µg de proteínas solúveis de estigmas de cardo (primeiras quatro pistas da esquerda) e 25 µg de proteínas solúveis de protoplastos de *Arabidopsis* (última pista). A aplicação de extractos de *Arabidopsis* serviu para testar a possível reacção cruzada dos anticorpos contra a cardosina A com proteínas endógenas desta espécie. A) Anticorpo primário contra a pro-cardosina A recombinante (anti-rec A; 1:500) (Faro, *et al.*, 1999). B) Anticorpo primário contra a cadeia de 31 kDa da cardosina A (anti-A; 1:400) (Veríssimo, *et al.*, 1996). C) Anticorpo primário contra um péptido da cadeia de 31 kDa da cardosina A (anti-pepA; 1:100) (Faro *et al*, não publicado). A seta à esquerda aponta a cadeia pesada da cardosina A, preferencialmente reconhecida por todos os anticorpos testados.

Todos os anticorpos testados revelaram reagir inespecificamente com proteínas endógenas de *Arabidopsis*, o que à partida dificultaria a detecção da cardosina A neste sistema de expressão (Figura II-14A-C, última pista). Dos anticorpos primários disponíveis, o que se mostrou mais eficiente no reconhecimento da cardosina A foi o anti-rec A (Figura II-14A), um anticorpo produzido contra a versão recombinante desta proteína (Faro, *et al.*, 1999). Por esta razão o anti-rec A foi o seleccionado para a imunodetecção da cardosina A nos ensaios de expressão em *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*.

## 4.2 Estudo do transporte e do processamento da cardosina A em *Arabidopsis thaliana*

A expressão da cardosina A em *Arabidopsis thaliana* foi efectuada seguindo duas abordagens distintas: expressão transitória da cardosina A em protoplastos de *Arabidopsis*

*thaliana* var. Lansdberg erecta e geração de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD (linhas pOp/LhGR) com expressão indutiva e estável da cardosina A.

### 4.2.1 Expressão transitória da cardosina A em protoplastos de *Arabidopsis thaliana* var. Lansdberg erecta

A expressão transitória da cardosina A em protoplastos de *Arabidopsis thaliana* var. Landsberg erecta foi realizada utilizando um método de transferência directa de DNA. O constructo utilizado na transformação de protoplastos preparados a partir de culturas de células em suspensão foi o pKI102-CdA, conforme referido em 3.1.3.2.

Recapitulando o essencial do procedimento, para melhor compreensão, nas transformações de protoplastos utilizaram-se como controlo positivo um constructo 35S::GUS no vector pRT103 [β-glucoronidase (GUS) sob o controlo do promotor 35S; pRT103-GUS] e como controlo negativo apenas DNA *carrier* (DNA de esperma de arenque). As transformações de protoplastos com o constructo pKI102-CdA foram realizadas com 20 µg de plasmídeo e foram sempre acompanhadas pela co-transformação com pRT103-GUS, de forma a ser possível avaliar a eficiência do processo de transformação por ensaios de actividade de GUS. Cerca de 48 h após transformação dos protoplastos procedeu-se à colheita das fracções celulares e do meio de cultura. As fracções celulares foram ainda divididas para utilização em ensaios de actividade de GUS e para a imunodetecção da cardosina A.

Os resultados obtidos nos ensaios de actividade da β-glucoronidase revelaram que a transformação de protoplastos estava a ser bem sucedida, o que se conclui pela detecção da actividade de GUS (Figura II-15A). No entanto, a detecção da cardosina A neste sistema revelou-se uma tarefa difícil (Figura II-15B).

Os valores de actividade de GUS registados nas experiências de transformação de protoplastos geralmente rondavam os 0,5 $pmol.min^{-1}.\mu g\ prot^{-1}$ (Figura II-15A), verificando-se um aumento da actividade da β-glucoronidase com o tempo após transformação (Figura II-15A; 3, 4 e 5). Apesar do processo de transformação estar claramente a funcionar, numa experiência tipo, não foi possível imunodetectar eficientemente a cardosina A (Figura II-15B) nas amostras representadas na Figura II-15A.

Como já foi referido, as cardosinas são as proteínas solúveis mais abundantes dos estigmas de cardo, sendo a cardosina A predominante sobre a cardosina B (Ramalho-Santos, *et al.*, 1997). *Western blottings* com extractos de estigmas de cardo incubados com anti-rec A mostraram este anticorpo é capaz de eficazmente detectar a cardosina A mesmo em quantidades muito reduzidas de proteínas solúveis (Figura II-14A; 0,01 µg). Apesar do anti-rec A ter revelado ser o mais eficiente na detecção da cardosina A, este anticorpo mostrou também reagir inespecificamente com proteínas endógenas de *Arabidopsis* o que

dificultaria a imunodetecção da cardosina A neste sistema (Figura II-14A; 25 µg). Isto implica que, para uma imunodetecção eficaz da cardosina A em protoplastos de *Arabidopsis* pelo anti-rec A, esta PA teria de estar presente em quantidades consideráveis. Para tal seria necessário atingirem-se níveis de sobre-expressão, algo complicado de conseguir com este tipo de metodologia de transformação cuja eficiência é tipicamente baixa. Para testar esta hipótese fizeram-se transformações de protoplastos utilizando cerca de 40 µg de pKI102-CdA com o objectivo de sobre-expressar a cardosina A. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura II-16.

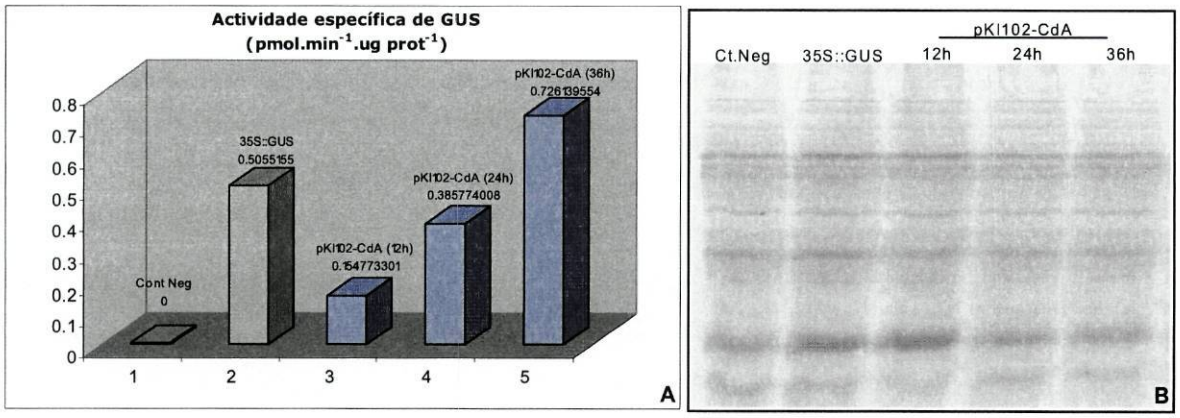



**Figura II-15 – Resultados de uma experiência tipo de transformação de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* var. Landsberg erecta com pRT103-GUS e pKI102-CdA.** A) Ensaios de actividade da β-glucuronidase com amostras de protoplastos transformados. Todos os ensaios foram realizados com 50 µg de proteínas. A barra 1 corresponde ao valor de actividade de GUS obtido para o controlo negativo 36h após transformação. A barra 2 corresponde ao valor de actividade de GUS obtido com o controlo positivo 36h após transformação. As barras 3, 4 e 5 correspondem a valores de actividade de GUS obtidos 12, 24 e 36h após transformação com pRT103-GUS e pKI102-CdA. B) Imunodetecção da cardosina A nas amostras representadas em A. A membrana foi incubada com anti-rec A (1:500) e em cada pista carregaram-se 25 µg de proteínas. A detecção da cardosina A não foi possível mas surgiram inúmeras bandas resultantes de reacções não específicas do anticorpo com proteínas endógenas de *Arabidopsis* .

Nestas experiências registaram-se valores de actividade de GUS muito elevados (Figura II-16A), na ordem das 6-20 vezes superiores aos valores tipo. Pode-se concluir que a utilização de cerca de 40 µg de pKI102-CdA por transformação teve como efeito a sobre-expressão da cardosina A, a ponto de o aumento do rácio sinal/ruído se traduzir na eficiente detecção da cardosina A pelo anti-rec A neste sistema (Figura II-16B). Esta experiência foi repetida diversas vezes, nem sempre com bons resultados, o que reflecte a baixa reprodutibilidade deste método de transformação/expressão. Por esta razão e outras apresentadas de seguida, esta abordagem foi descontinuada já que este sistema se revelou pouco eficiente na expressão e consequente detecção da cardosina A. A expressão transitória da cardosina A em protoplastos de *Arabidopsis* requeria a manutenção de numerosas culturas de células para isolamento de protoplastos. Por cada isolamento de protoplastos conseguiam realizar-se apenas 15 transformações, incluindo controlos. Adicionalmente, e porque em cada transformação para expressão da cardosina A se utilizavam cerca de 40 µg de pKI102-CdA, era necessário estar constantemente a crescer

culturas de *E. coli* e proceder-se a demoradas extracções de DNA. Uma vez que o DNA utilizado na transformação de protoplastos tem de ter um elevado grau de pureza e estar muito concentrado, para a sua purificação era necessária a utilização de kits comerciais adequados. Em conjunto com a detecção errática da cardosina A neste sistema, estes factos tornaram esta metodologia não só muito dispendiosa como morosa, pelo que foi abandonada.

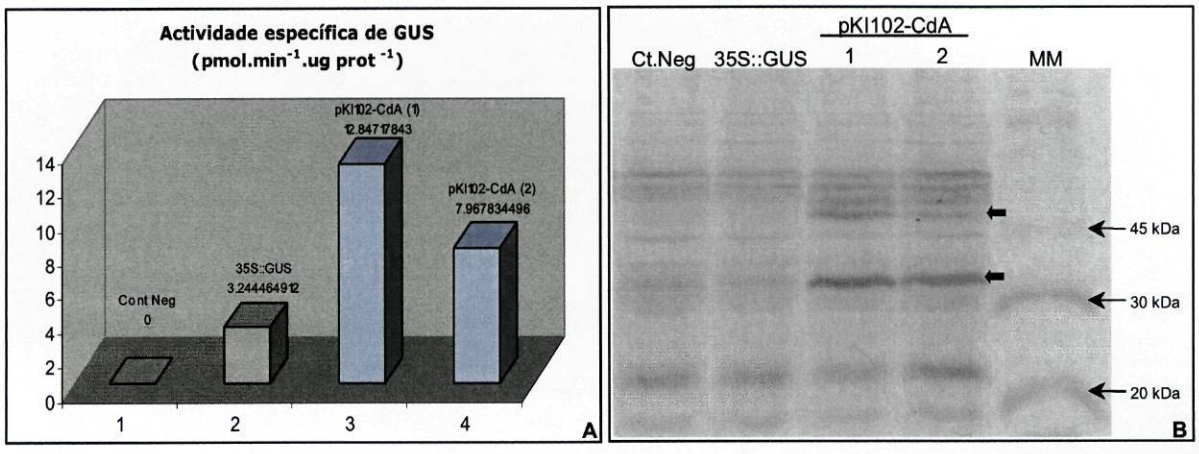



**Figura II-16 – Transformação de protoplastos de *Arabidopsis* para sobre-expressão da cardosina A.** A) Ensaios de actividade de GUS. As amostras foram colhidas 36h após transformação e os ensaios foram realizados com 5 µg de proteínas. A barra 1 corresponde ao valor de actividade de GUS obtido para o controlo negativo e a barra 2 ao valor de actividade de GUS obtido com o controlo positivo (35S::GUS). As barras 3 e 4 correspondem a valores de actividade de GUS obtidos após co-transformação com pRT103-GUS e pKI102-CdA. B) Imunodetecção da cardosina A nas amostras representadas em A. A membrana foi incubada com anti-rec A (1:500) e em cada pista aplicou-se 25 µg de proteínas. Nas amostras transformadas com 40 µg de pKI102-CdA foi possível detectar as formas imatura (seta a verde) e intermédia da cardosina A (seta a azul), cujos pesos moleculares são de cerca de 66 e 35 kDa, respectivamente. Surgiram ainda diversas bandas resultantes de reacções não específicas do anticorpo com proteínas endógenas de *Arabidopsis* . (MM) marcador de pesos moleculares "High-Range Rainbow™ Molecular Weight Markers" (Amersham Biosciences).

Como alternativa passou-se então à geração de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* linhas pOp/LhGR para a expressão indutiva e estável da cardosina A. Em paralelo recorreu-se a um outro sistema de expressão, nomeadamente, a expressão transitória da cardosina A em epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium*.

### 4.2.2 Expressão da cardosina A em plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD (linhas pOp/LhGR)

A citotoxicidade é um dos problemas que pode surgir quando se expressam determinadas proteínas em sistemas heterólogos. A dificuldade previamente sentida na geração de plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* com a capacidade de expressar a cardosina A, levou-nos a considerar a ocorrência de um problema deste género no nosso trabalho.

Em sistemas de expressão transitória, o efeito de citotoxicidade é facilmente ultrapassado, visto não chegar a ser atingido um nível estável de expressão de um transgene. No entanto, o mesmo já não acontece quando o sistema de expressão envolve a

geração de plantas transgénicas já que são atingidos níveis estáveis de expressão de um transgene que pode eventualmente revelar-se deletério.

Como não podia ser posta de parte a ocorrência de um problema de citotoxicidade no trabalho aqui apresentado, optou-se por seguir uma estratégia em que a expressão de um transgene, neste caso o cDNA para a cardosina A, sofria um controlo temporal e espacial e só se iniciava mediante a aplicação de um indutor químico. Por outras palavras, utilizou-se um sistema de expressão indutiva (Craft *et al.*, em fase de impressão). Neste sistema, as plantas desenvolvem-se normalmente em meio de cultura e/ou solo, e a ocorrência de um fenótipo associado à expressão de um transgene pode ser facilmente reconhecido uma vez que só surge mediante indução.

#### 4.2.2.1 O Sistema Indutivo LhGR - expressão de um transgene regulada pela aplicação de um indutor químico

O sistema indutivo utilizado neste trabalho (LhGR) foi desenvolvido a partir de outro, o sistema LhG4 (Figura II-17), descrito por Moore *et al.* (Moore, *et al.*, 1998) e baseado em activadores de transcrição e promotores quiméricos. Resumidamente, no sistema LhG4 são geradas plantas transgénicas repórter, que possuem o gene de interesse clonado a jusante de um promotor mínimo (pOp) composto apenas por uma TATA-box e por locais de ligação (operadores *lac*) para um factor activador de transcrição específico (LhG4), ausente nas plantas (Figura II-17, constructo repórter). Desta forma, à partida o transgene de interesse introduzido em células de plantas *wild-type*, não é expresso. Isto permite a geração e propagação de linhas transgénicas fenotipicamente normais, sem interferência de um transgene possivelmente deletério.

No sistema LhG4, a expressão do transgene é conseguida por cruzamento de plantas repórter com plantas activadoras. Estas últimas expressam o factor activador de transcrição quimérico LhG4 (uma fusão entre o domínio de activação de transcrição II do Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae* e um repressor *lac* mutante que se liga ao seu operador com elevada afinidade), que reconhece especificamente os locais de ligação do promotor do constructo repórter. Assim, o transgene de interesse é especificamente expresso nas plantas (ou células) da descendência em que o factor activador de transcrição quimérico está presente. Por sua vez, tal depende do promotor específico seleccionado para regular a expressão do factor activador de transcrição. Assim sendo, os efeitos da expressão do transgene de interesse podem ser estudados nos descendentes dos cruzamentos entre linhas activadoras e linhas repórter.

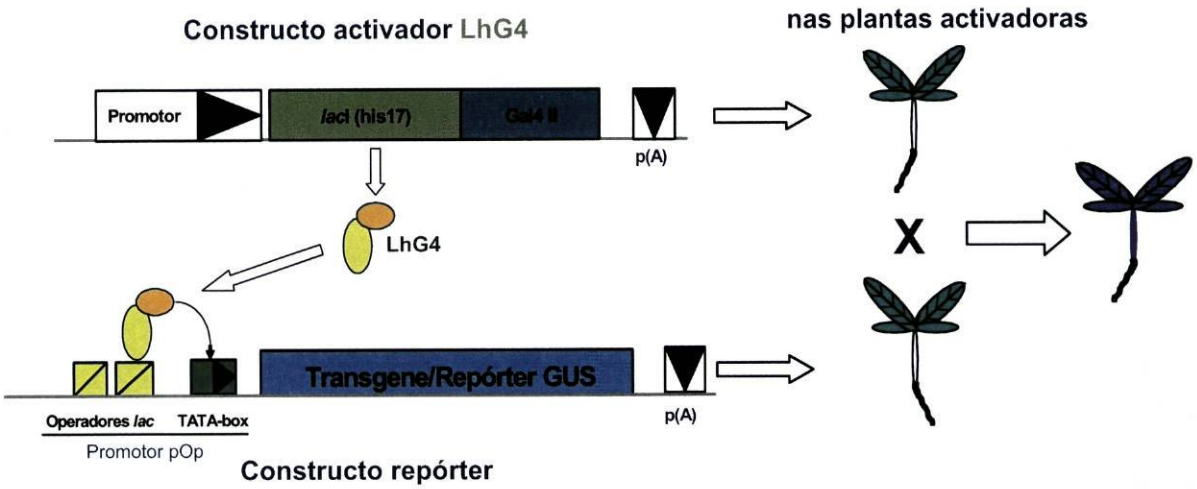



**Figura II-17 – Representação esquemática do sistema de activação de transcrição LhG4.** A expressão do transgene ocorre na descendência resultante do cruzamento entre plantas activadoras e plantas repórter. Adaptado de Moore *et al.* (Moore, *et al.*, 1998).

A partir do sistema LhG4 surgiu o sistema LhGR (Figura II-18), que foi o utilizado neste trabalho. O sistema LhGR não requer o cruzamento entre plantas activadoras e plantas repórter para que a transcrição do transgene ocorra.

O constructo activador LhGR também codifica um factor de activação de transcrição quimérico e foi gerado com base no constructo LhG4, ao qual foi adicionada uma sequência correspondente a um domínio de ligação para um glucocorticoide. No sistema LhGR partimos de linhas de plantas activadoras, que possuem integrado no seu genoma o constructo activador LhGR, e que são depois transformadas com um constructo repórter que inclui, no mesmo T-DNA, o gene repórter e o transgene de interesse (Figura II-18).

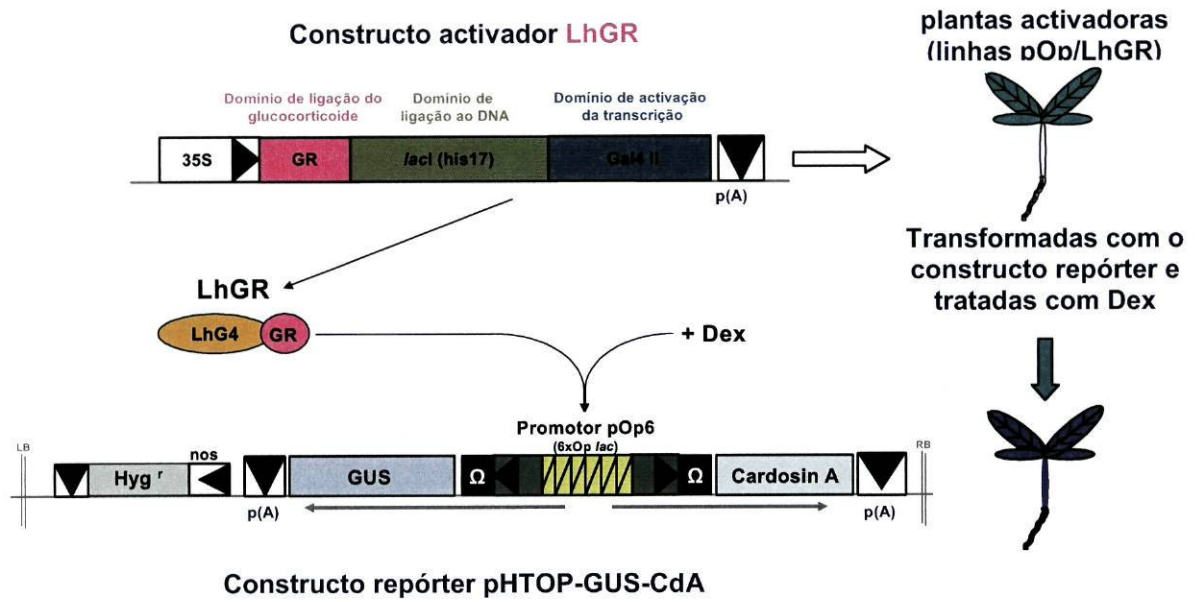



**Figura II-18 – Representação esquemática do sistema de activação de transcrição LhGR, quimicamente indutivo.** O constructo activador está incorporado no genoma das plantas pertencentes às linhas activadoras. O constructo repórter representado foi clonado no vector pHTOP e foi utilizado neste trabalho para gerar plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* capazes de expressar a cardosina A. Neste caso a activação da transcrição do transgene está dependente da aplicação exógena do glucocorticoide dexametasona (Dex). (LB) *left border*; (RB) *right border*.

Nas plantas activadoras, antes ou depois da transformação com o constructo repórter, numa situação de ausência do glucocorticoide indutor dexametasona (Dex), o factor activador de transcrição quimérico resultante da expressão do constructo activador forma um complexo inactivo com uma chaperonina expressa constitutivamente, a *Heat shock protein 90* (Hsp90). Quando a dexametasona (que não existe naturalmente nas plantas) é aplicada exogenamente, esta compete eficazmente com a Hsp90 na associação ao factor activador de transcrição quimérico pelo seu domínio de ligação do glucocorticoide.

O complexo glucocorticoide:activador de transcrição assume assim uma forma activa, ligando-se ao constructo repórter pelo domínio de ligação do DNA e permitindo o início da transcrição. Tal como no sistema LhG4, também aqui as sequências inseridas no constructo repórter estão sob o controlo de expressão de promotores mínimos (TATA-boxes), sendo a transcrição do transgene de interesse activada somente após ligação do complexo activador na sua forma activa. O constructo repórter permite a transcrição em duas direcções, para um lado do gene repórter (GUS), para o outro do transgene ou cDNA de interesse inserido no *Multiple Cloning Site* (MCS), neste caso o cDNA para a cardosina A (Figura II-18, constructo repórter). A selecção de transformantes estáveis é feita utilizando a higromicina cujo marcador de resistência está presente no constructo repórter (Figura II-18, constructo repórter).

#### 4.2.2.2 Transformação e selecção de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD (linhas pOp/LhGR) para a integração do constructo repórter pHTOP-CdA

O constructo repórter gerado neste trabalho, utilizado para a expressão indutiva e estável da cardosina A em transgénicas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD (linhas pOp/LhGR) foi designado por pHTOP-CdA e encontra-se representado na Figura II-18.

Para a obtenção de transformantes estáveis, plantas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD, linhas pOp/LhGR S5 e S7, foram transformadas com o constructo pHTOP-CdA via *Agrobacterium tumefaciens*, segundo o método descrito por Clough e Bent (Clough e Bent, 1998). Quatro a cinco semanas após transformação procedeu-se à recolha das sementes geradas pelas plantas transformadas, para selecção dos transformantes primários com expressão detectável do gene repórter.

O antibiótico utilizado na selecção dos transformantes primários foi a higromicina. Começou por usar-se uma concentração de 30 µg/mL mas verificou-se que a selecção se mantinha usando metade da concentração (15 µg/mL). Desta forma, a pressão selectiva era mantida e o desenvolvimento normal das plântulas não era afectado, ao contrário do que acontecia com a concentração superior em que o desenvolvimento das plântulas era atrasado e o seu crescimento era reduzido. A taxa de transformação de plantas obtida com o constructo pHTOP-CdA em *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101::pMP90 foi

bastante baixa (cerca de 0,05%). Para a selecção de apenas 40 plântulas resistentes à higromicina foi necessário plaquear cerca de 80.000 sementes recolhidas de plantas transformadas por *Agrobacterium*.

Com o objectivo de identificar os transformantes primários positivos para a expressão do gene repórter, colheu-se uma folha de cada plântula putativamente transgénica para indução com dexametasona e posterior coloração histoquímica da β-glucuronidase (ou GUS *staining*). A indução da activação da transcrição do gene repórter decorreu durante 36-48 h em Dex, após as quais as folhas foram sujeitas a GUS *staining*, para detecção da presença do produto do gene repórter. Nos casos em que a β-glucuronidase está presente há a formação de um precipitado de cor azul, resultante da metabolização do substrato X-Gluc.

De entre as cerca de 40 plântulas resistentes à higromicina, apenas 11 se revelaram positivas para a presença da β-glucuronidase após aplicação do indutor químico (Figura II-19). Como controlo negativo utilizaram-se amostras de plantas pertencentes às linhas activadoras pOp/LhGR S5 e S7, usadas na transformação com o constructo repórter. Nestas linhas, e como era de esperar, a indução com Dex não desencadeou o aparecimento da coloração azul. As plantas A3 e A15 revelaram a presença de GUS independentemente da aplicação do agente indutor (*leaky expression*) e, por esta razão, foram rejeitadas.

As plantas A4, A5, A6, A7, A8, A9, A19, A32 e A33 apresentaram os melhores resultados a nível de expressão do gene repórter na primeira geração (T1), cujo produto só foi detectado nas situações em que a Dex foi aplicada. Foram colhidas sementes de todas estas plantas e após selecção em higromicina as plântulas resultantes, pertencentes à geração T2, foram induzidas e testadas para a presença de GUS. Os resultados encontram-se apresentados na Figura II-20.

Nem todas as linhas positivas para indução da transcrição do gene repórter na T1 mantiveram essa característica na segunda geração. Adicionalmente, diferentes linhas identificadas como GUS-positivas na T2 apresentaram variados níveis de expressão do gene repórter (Figura II-20).

As linhas da T2 que desenvolveram após GUS *staining* uma coloração azul mais intensa, reflexo de elevados níveis de expressão do gene repórter, foram as seguintes: A4, A5, A6, A7, A19, A32 e A33. De entre estas, seleccionaram-se aquelas em que, na ausência do indutor químico, a expressão do gene repórter não era detectável (A4, A5, A6 e A7).

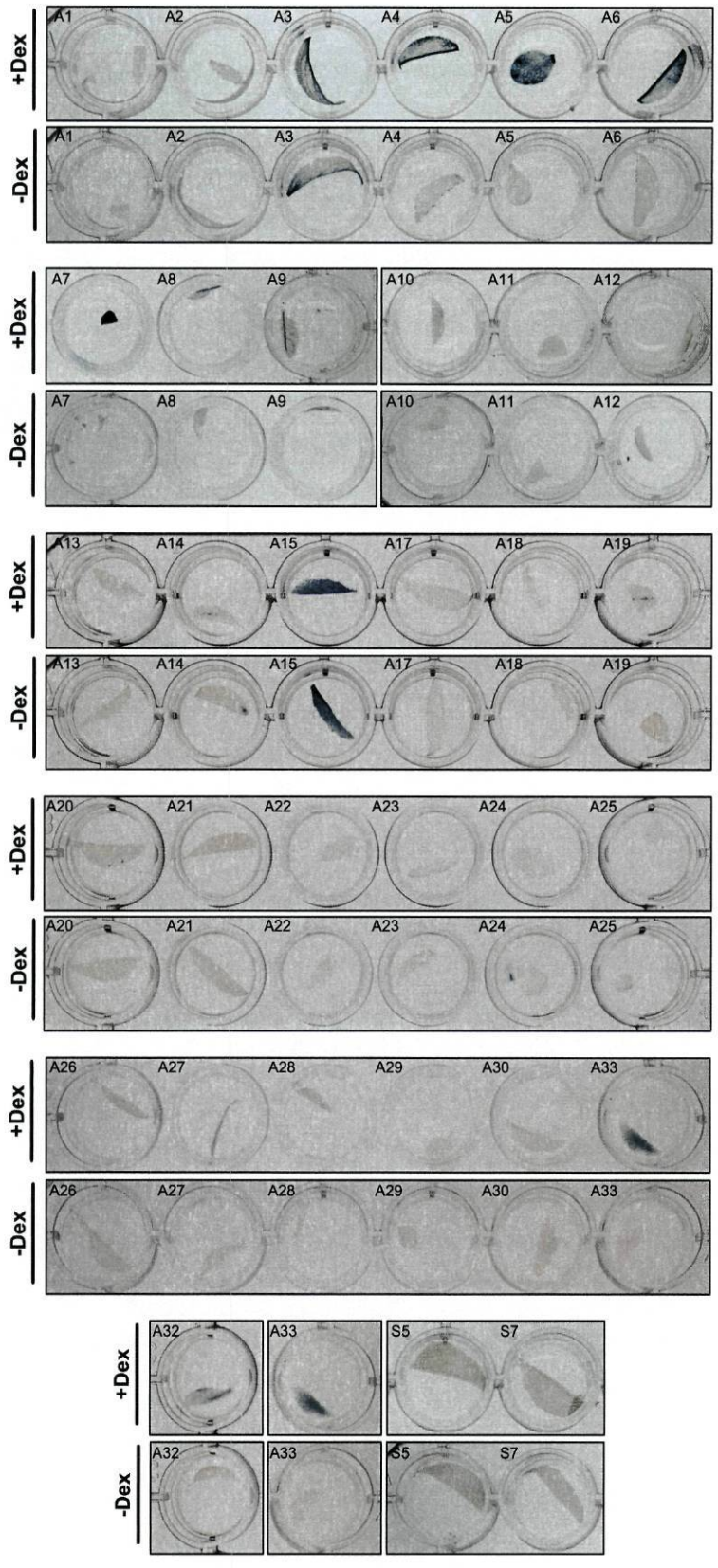



**Figura II-19 – Coloração histoquímica de GUS com folhas de plantas da T1 (transformantes primários).** As plantas foram seleccionadas em meio com higromicina (15 µg/mL) e incubadas com 10 µM de dexametasona (+Dex) para indução da activação da transcrição do constructo repórter. As plantas A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A15, A19, A32 e A33 apareceram positivas para a expressão do gene repórter. Para cada amostra foi realizado um controlo negativo que consistiu numa situação de ausência do indutor químico (-Dex). Como controlo negativo adicional procedeu-se à indução de amostras de plantas pertencentes às linhas usadas na transformação pelo constructo repórter (S5 e S7). A reacção de metabolização do X-Gluc pela β-glucuronidase decorreu durante cerca de 16 h.

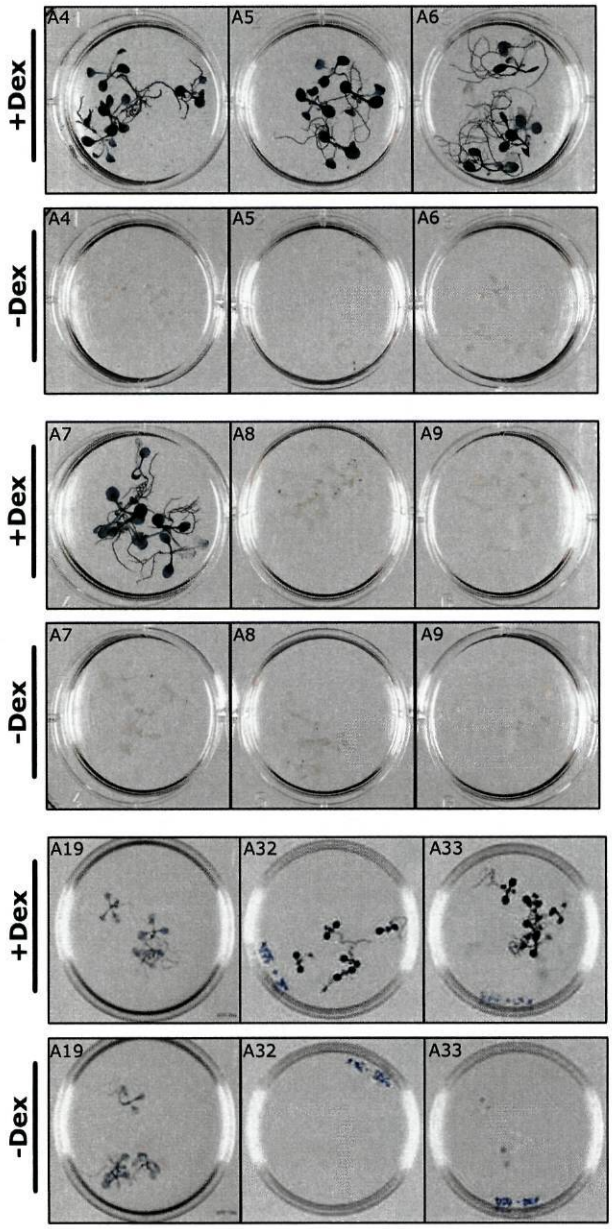



**Figura II-20 – Coloração histoquímica de GUS com plântulas da T2.** As plântulas foram seleccionadas em meio com higromicina (15 µg/mL) e incubadas com 10 µM de dexametasona (+Dex) durante 48 h para indução da activação da transcrição do constructo repórter. As plântulas das linhas A4, A5, A6, A7, A19, A32 e A33 apareceram positivas para a expressão do gene repórter. As linhas A8 e A9, positivas na T1, revelaram-se negativas na T2 e foram usadas como controlos negativos em experiências subsequentes. As imagens mostram que a expressão do gene repórter depende de uma incubação prévia com o indutor químico (+Dex). Para cada amostra foi realizado um controlo negativo que consistiu numa situação de ausência do indutor químico (-Dex). A reacção de metabolização do X-Gluc pela β-glucuronidase decorreu durante 4 h.

As linhas A8 e A9, GUS-positivas na T1, perderam essa característica na T2, pelo que em experiências subsequentes funcionaram como controlos negativos.

As linhas seleccionadas na T2 não foram testadas para integrações simples do transgene (um único T-DNA) no genoma. Em todas as gerações testadas para resistência à higromicina surgiram sempre indivíduos sensíveis ao antibiótico, ou seja houve sempre segregação, o que indica que nenhuma das linhas seleccionadas é homozigótica para o transgene.

### 4.2.2.3 Expressão, transporte e processamento da cardosina A em plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* var. RLD (linhas pOp/LhGR)

Seleccionadas as linhas de plantas resistentes à higromicina e positivas para a coloração histoquímica de GUS, era ainda necessário verificar se nestas havia uma correlação directa entre a expressão do gene repórter e a expressão da cardosina A. Com este objectivo foram colocadas a germinar sementes de linhas da T2, duas GUS-positivas (A4 e A6) e uma GUS-negativa (A8), para indução da activação da transcrição do cDNA da cardosina A e consequente imunodetecção da proteína com o anticorpo anti-rec A (Figura II-21).

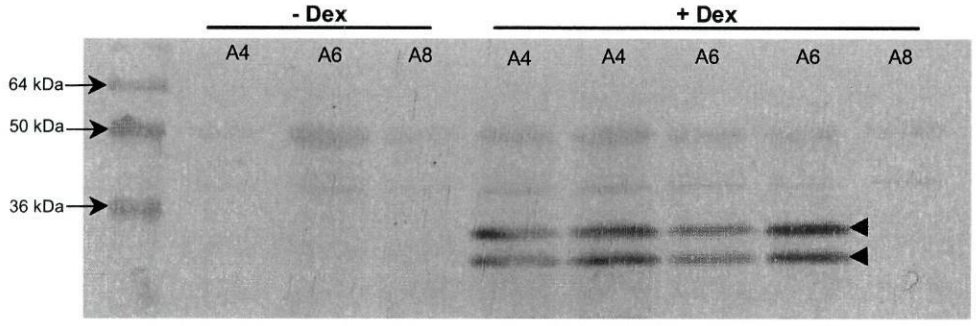



**Figura II-21 – Imunodetecção da cardosina A em linhas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* (T2).** Plântulas de duas linhas GUS-positivas (A4 e A6) e uma linha GUS-negativa (A8) T2 foram seleccionadas em meio com higromicina e a activação da transcrição do constructo repórter foi induzida durante 7 dias em caixas Magenta com meio MS suplementado com 20 μM de dexametasona (+Dex). Para cada amostra foi realizado um controlo negativo que consistiu numa situação de ausência do indutor químico (-Dex). A imunodetecção da cardosina A foi realizada com o anticorpo anti-rec A numa diluição de 1:600. Todas as experiências de imunodetecção da cardosina A foram realizadas com este anticorpo primário na mesma diluição. Nas linhas A4 e A6 (GUS-positivas) foi possível detectar eficazmente a cardosina A nas formas de processamento intermédia (ponteiro azul) e madura (ponteiro preto). A linha A8 (GUS-negativa) foi usada como controlo negativo e nesta, a presença da cardosina A não é evidente.

O resultado obtido por *Western blotting* revelou existir uma correlação directa entre a expressão do gene repórter (Figura II-20) e a expressão do cDNA da cardosina A nas linhas seleccionadas (Figura II-21). A análise da Figura II-21 torna evidente que a expressão da cardosina A está dependente da aplicação do indutor químico dexametasona, já que só na sua presença ocorre a activação da transcrição do gene de interesse e consequente detecção do seu produto - a cardosina A. A presença da cardosina A foi detectada especificamente nos casos em que houve uma incubação prévia com o glucocorticoide (Figura 8; +Dex) e somente nas linhas GUS-positivas (A4 e A6). Nos controlos não induzidos e na linha GUS-negativa a cardosina A estava ausente. De realçar que a detecção da cardosina A se traduziu pelo aparecimento de duas bandas, uma de peso molecular de cerca de 35-40 kDa (Figura II-21, ponteiro azul) e outra de peso molecular inferior (30-35 kDa; Figura II-21, ponteiro preto). Este resultado parece indicar que a cardosina A expressa em *Arabidopsis* é eficientemente processada até à forma madura e que as duas bandas detectadas por *Western blotting* correspondem a moléculas de cardosina A na forma de processamento intermédia (35 kDa) e final (31 kDa).

A linha designada por A6 na T2 foi seleccionada para uso nas gerações e procedimentos experimentais subsequentes. As plântulas pertencentes a esta linha cresciam sem

problemas, apresentando raízes bem desenvolvidas e longas, e até à geração T4 (última testada) exibiram sempre bons níveis de expressão de GUS e da cardosina A, não ocorrendo o silenciamento dos transgenes ao longo das gerações (Figura II-22). As restantes linhas positivas na T2 também exibiram bons resultados na T3; no entanto, apresentavam um crescimento mais lento e, especificamente para a A4, raízes curtas, o que dificultaria uma transplantação segura das plântulas de placas para solo.

Confirmada a correlação entre a expressão da cardosina A e da β-glucoronidase nas linhas GUS-positivas seleccionadas (Figura II-21) foram testados diferentes períodos de indução de modo a registar a partir de quanto tempo de incubação em dexametasona era possível detectar a cardosina A e que formas de processamento surgiam ao longo dos diferentes períodos ensaiados. Desta forma seria possível saber qual o período de indução mais adequado nos casos em que o objectivo era a imunodetecção da cardosina A. Foram testados períodos de indução de 48, 72 e 96 h, após os quais se procedeu à imunodetecção da cardosina A (Figura II-23).

Os resultados obtidos revelaram que 48 h após o início da indução com dexametasona era já possível detectar cardosina A nos extractos de *Arabidopsis* (Figura II-23B). A análise das imagens representadas na Figura II-23A-B indica uma acumulação estável da cardosina A ao longo do tempo, sendo que o sinal mais forte para a sua presença foi observado no tempo de indução mais prolongado (96 h). Estas observações sugerem que as moléculas de cardosina A sintetizadas em *Arabidopsis* são estáveis e que não parecem ser alvo de degradação por proteases endógenas.

A imunodetecção da cardosina A nestes extractos traduziu-se no aparecimento de três bandas - uma com cerca de 60-70 kDa (Figura II-23A-B, ponteiro verde) e outras duas com peso molecular inferior (Figura II-23A-B, ponteiros azul e preto) - que possivelmente correspondem às diferentes formas de processamento da cardosina A. Estes resultados sugerem que a cardosina A expressa em *Arabidopsis* sofre um processo de maturação semelhante àquele previamente deduzido para o sistema homólogo por Ramalho-Santos *et al.* (Ramalho-Santos, *et al.*, 1998). Assim sendo, a banda de peso molecular de 60-70 kDa identificada em *Arabidopsis* (Figura II-23A-B, ponteiro verde) corresponderá à forma precursora ou imatura da cardosina A (66 kDa) que passa à forma intermédia (Figura II-23A-B, ponteiro azul) depois de clivada entre o PSI e a região *N*-terminal (35 kDa), e finalmente à forma madura (Figura II-23A-B, ponteiro preto) após clivagem do pro-segmento *N*-terminal (31 kDa).

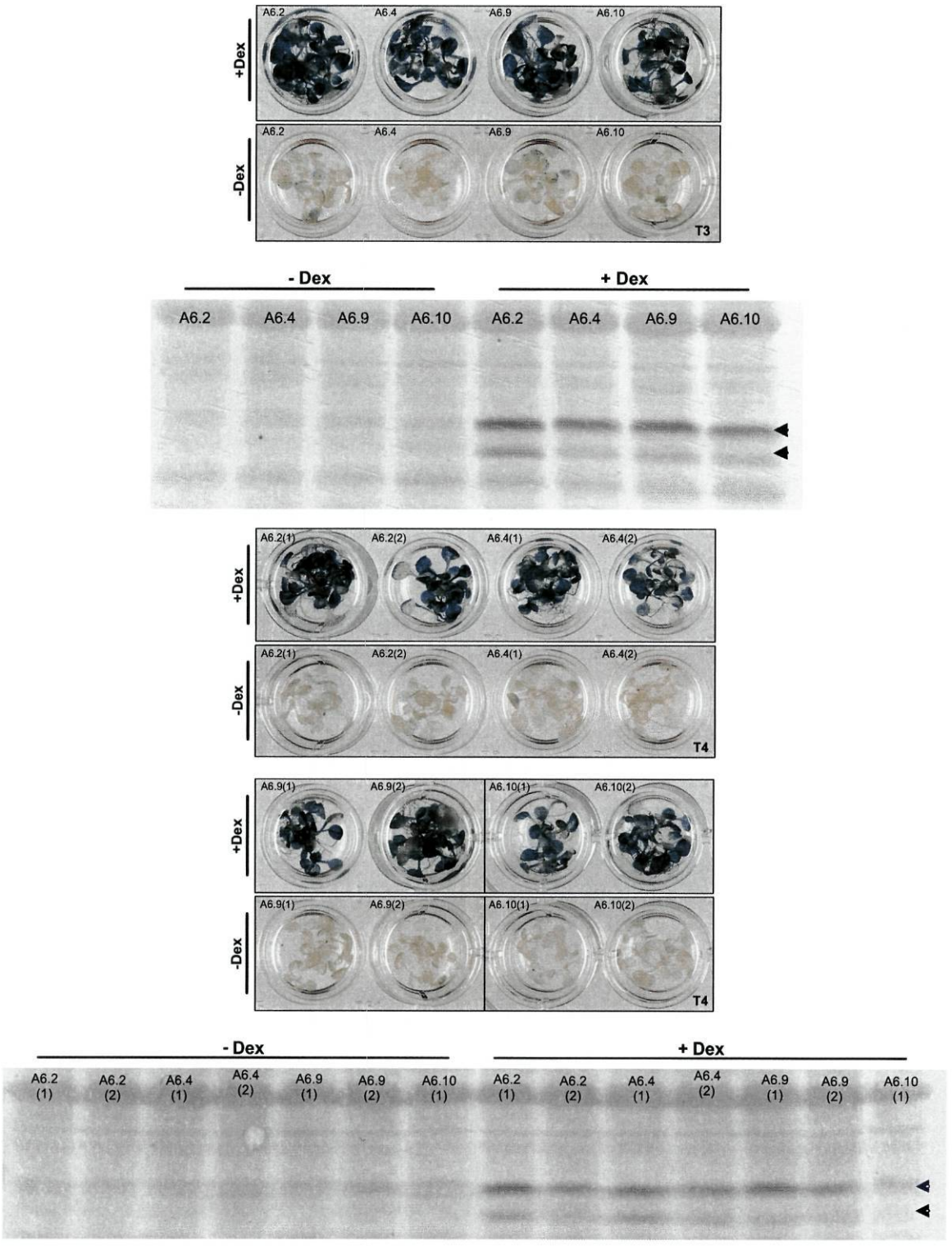



**Figura II-22 – Coloração histoquímica para GUS e imunodetecção da cardosina A em descendentes da linha A6 (T3 e T4).** A) Coloração histoquímica de GUS. As plântulas foram seleccionadas em meio com higromicina e incubadas com 20 μM de dexametasona (+Dex) para indução da activação da transcrição do constructo repórter. Os controlos negativos correspondem a situações de ausência do indutor químico (-Dex). A reacção de metabolização do X-Gluc pela β-glucoronidase decorreu durante cerca de 4 h. B) Imunodetecção da cardosina A nas amostras representadas em A). Para cada linha foi realizado um controlo negativo correspondente à situação de ausência do glucocorticoide dexametasona (-Dex). Todas as linhas usadas eram GUS-positivas e em todas foi possível detectar eficazmente a cardosina A nas formas de processamento intermédia (ponteiro azul) e madura (ponteiro preto). As imagens mostram que não há silenciamento dos genes presentes no constructo repórter ao longo das gerações.

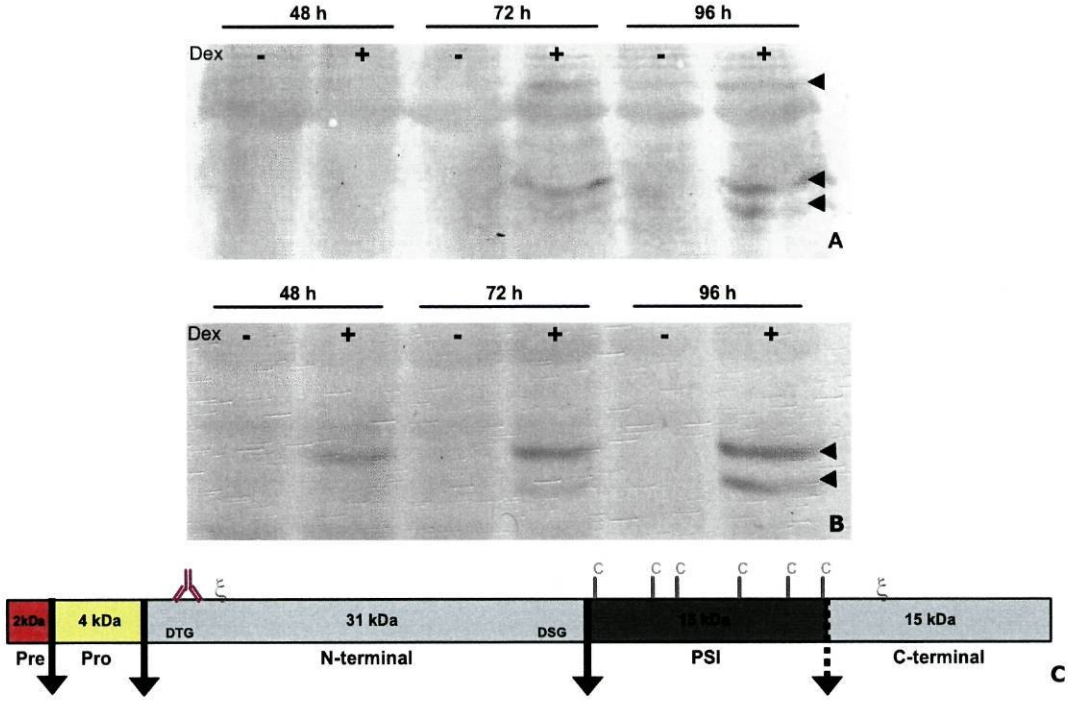



**Figura II-23 – Imunodetecção da cardosina A em linhas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.** Plântulas da linha GUS-positiva A6 (T2) foram seleccionadas em meio com higromicina e a activação da transcrição do constructo repórter foi induzida durante diferentes períodos de tempo – 48, 72 e 96 h – em meio MS líquido suplementado com 20 μM de dexametasona (+Dex). Para todos os tempos foram feitos controlos negativos que consistiram na omissão do indutor químico (-Dex). A) e B) correspondem a duas experiências independentes realizadas nas mesmas condições. Em A) 72 h após o início da indução foi possível detectar a cardosina A nas três formas de processamento reconhecidas pelo anticorpo anti-rec A que tem uma maior afinidade para a cadeia pesada da proteína. (ponteiro verde) - forma imatura (66 kDa); (ponteiro azul) - forma intermédia (35 kDa); (ponteiro preto) - forma madura (31 kDa). Em B) 48 h após o início da indução foi já possível detectar a cardosina A na forma intermédia e após períodos mais longos a forma madura também era visível. (ponteiro azul) - forma intermédia (35 kDa); (ponteiro preto) - forma madura (31 kDa). Em A) e B) o sinal para a presença da cardosina A fica mais forte para períodos de indução mais longos. C) Esquema de processamento da cardosina A deduzido a partir de extractos de cardo com anticorpos dirigidos contra distintas regiões da proteína (Ramalho-Santos, *et al.*, 1998). O anti-rec A encontra-se representado ligado à cadeia pesada para a qual tem maior afinidade (Faro, *et al.*, 1999). (Pre) péptido sinal; (Pro) pro-segmento de activação *N*-terminal; (PSI) *Plant Specific Insert*. Os *N*-glicanos estão representados por (ξ). As seis cisteínas presentes em posições conservadas no PSI de PAs vegetais e nas saposinas encontram-se representadas por (C).

O facto das formas intermédia (35 kDa) e madura (31 kDa) da cardosina A serem mais facilmente detectadas do que a forma imatura (66 kDa) (Figura II-21, Figura II-22B e Figura II-23A-B) sugere que a conversão da forma precursora a intermédia ocorre mais rapidamente do que a passagem da forma intermédia à madura. Uma outra explicação para esta observação pode estar relacionada com uma maior estabilidade das duas últimas formas de processamento, o que explicaria a sua detecção mais eficiente.

Resultados de ultra-estrutura e experiências de imunocitoquímica com estigmas de cardo (Capítulo I, Resultados e Discussão) levaram à formulação da hipótese da cardosina A poder ser direccionada para os vacúolos das papilas estigmáticas, directamente a partir do retículo endoplasmático, não passando pelo complexo de Golgi no seu trajecto biossintético. Com base nestas observações e com o objectivo de averiguar qual o trajecto biossintético seguido por esta PA em *Arabidopsis*, recorreu-se à caracterização dos *N*-glicanos associados à cardosina A expressa neste sistema. É importante referir que a estrutura dos *N*-glicanos presentes à superfície das glicoproteínas fornece pistas importantes sobre o trajecto intracelular seguido por uma proteína específica. A endoglucosidade-H (endoH) é

uma enzima capaz de remover selectivamente de uma glicoproteína, *N*-glicanos ricos em resíduos de manose, enquanto *N*-glicanos do tipo complexo (com resíduos de fucose e/ou xilose) são insensíveis à acção desta enzima. Os *N*-glicanos passam de sensíveis a resistentes à endoH depois da actuação da α-manosidase II no Golgi. Logo, proteínas que no seu trajecto biossintético não passem pelo complexo de Golgi possuirão à sua superfície apenas *N*-glicanos do tipo simples. A sensibilidade dos *N*-glicanos de um polipéptido à digestão pela endoH é facilmente detectável em SDS-PAGE, já que a remoção de uma molécula de açúcar leva a uma diminuição aparente do peso molecular de uma glicoproteína de cerca de 2 kDa.

A cardosina A possui dois locais de *N*-glicosilação (Asn 70 e Asn 363; Figura II-23C) ambos ocupados por oligossacarídeos predominantemente de natureza complexa (Costa, *et al.*, 1997), o que constitui um sinal indicativo de processamento ao nível do Golgi. Neste trabalho investigou-se se a cardosina A expressa em *Arabidopsis* era glicosilada, como em cardo, e analisou-se a natureza dos *N*-glicanos associados à sua cadeia polipeptídica. Com este objectivo, extractos proteicos de plântulas transgénicas de *Arabidopsis* tratadas com dexametasona foram incubados com a enzima endo$H_f$ (forma recombinante de endoH) para caracterização dos *N*-glicanos à superfície da cardosina A (Figura II-24).

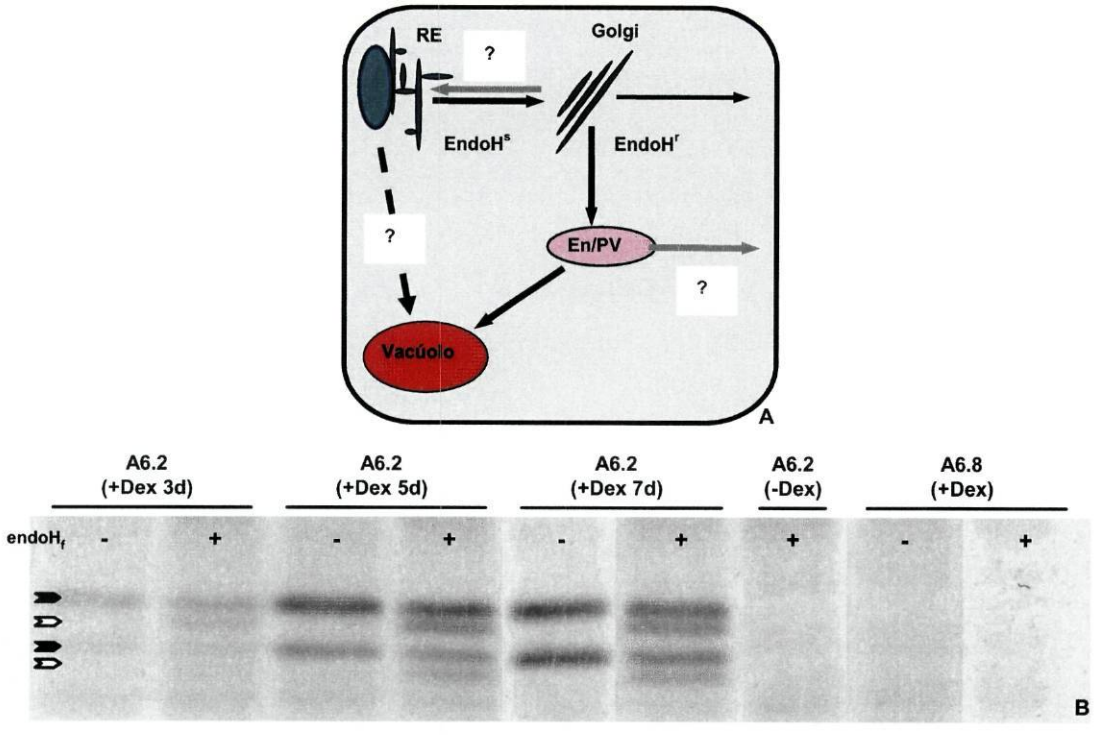



**Figura II-24 – Imunodetecção da cardosina A em extractos proteicos de plântulas de *Arabidopsis* tratados com endoHf.** A) Esquema simplificado representativo de uma célula vegetal. Os *N*-glicanos transferidos para as cadeias polipeptídicas das glicoproteínas no retículo endoplasmático (RE), passam de sensíveis (EndoHs) a resistentes (EndoHr) à digestão pela endoH após modificação por enzimas do complexo de Golgi. As setas assinalam os possíveis trajectos da cardosina A dentro da célula. (En/PV) endossoma/compartimento pré-vacuolar. B) Os extractos proteicos de plântulas induzidas (+Dex) por diferentes períodos (3-7 dias) ou não induzidas (-Dex), foram incubados em misturas de reacção com (+) ou sem (-) endoHf. As formas intermédia (35 kDa) e madura (31 kDa) da cardosina A resistentes à digestão pela endoHf encontram-se assinaladas pelas setas a cheio (azul e preto) respectivamente. As formas intermédia (33 kDa) e madura (29 kDa) da cardosina A sensíveis à digestão pela endoHf encontram-se assinaladas pelas setas delineadas (azul e preto) respectivamente.

A análise da Figura II-24B revela que as moléculas de cardosina A presentes nos diversos extractos testados se encontravam tanto na fase intermédia de processamento (seta a cheio azul) como na fase madura (seta a cheio a preto). Estes dois tipos de moléculas apresentaram-se parcialmente sensíveis à digestão pela endo$H_f$, o que se traduziu pela perda aparente de peso molecular exibida pelas duas formas de maturação (setas delineadas a azul e preto) resultante da excisão de *N*-glicanos do tipo simples da sua cadeia polipeptídica.

O facto da digestão dos extractos de *Arabidopsis* pela endo$H_f$ se ter revelado parcial pode ser explicado de diferentes formas. Excluindo uma pouco provável falha no procedimento técnico, o resultado observado pode justificar-se pela possível presença de duas distintas populações de moléculas de cardosina A quanto à *N*-glicosilação. No entanto, não podemos excluir a hipótese do processo de modificação de *N*-glicanos da cardosina A ser menos eficiente em *Arabidopsis* do que em cardo. É ainda de considerar a possibilidade dos níveis de expressão da cardosina A atingidos em transgénicas de *Arabidopsis* levarem a uma saturação do sistema de transporte e maturação da enzima (se mediado por receptores específicos), permitindo desta forma que algumas moléculas de cardosina escapem ao processo de modificação dos *N*-glicanos no Golgi durante o seu trajecto biossintético.

Sumariando, estes resultados permitem-nos afirmar que a cardosina A expressa em *Arabidopsis* é glicosilada em grande parte com *N*-glicanos do tipo complexo, o que indica passagem da proteína pelo complexo de Golgi. Neste sistema de expressão, a cardosina A é transportada do RE, onde sofre *N*-glicosilação, para o Golgi, organelo em que os seus *N*-glicanos são modificados e passam de simples a complexos, surgindo resistentes à acção da endo$H_f$. O facto da forma intermédia da cardosina A ser parcialmente resistente à acção da endo$H_f$ sugere que a sua localização subcelular é o Golgi ou o pós-Golgi.

Os resultados obtidos até este ponto suportam a hipótese do processamento da cardosina A em *Arabidopsis* ser igual ao ocorrido em cardo. Faltava ainda provar que neste sistema de expressão heterólogo a proteína era direccionada para o mesmo compartimento subcelular final que no sistema homólogo, ou seja, o vacúolo. Com este objectivo procedeu-se ao isolamento de protoplastos e seguidamente de vacúolos, obtidos a partir de plântulas sujeitas a um período de indução de 7 dias em 20 μM de Dex, para imunodetecção da cardosina A nas fracções de protoplastos (celular) e vacuolar. Uma vez que a eficiência do processo de recuperação de vacúolos a partir de protoplastos é de cerca de 30%, aplicou-se 3 vezes mais extracto da amostra da fracção vacuolar do que extracto da fracção celular. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura II-25.

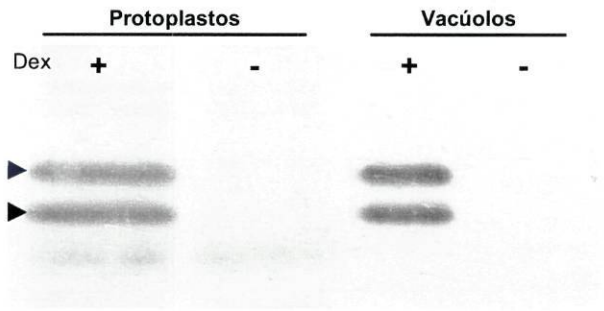



**Figura II-25 – Imunodetecção da cardosina A em extractos proteicos de protoplastos e vacúolos obtidos de plântulas transgénicas de *Arabidopsis*.** Utilizaram-se plântulas da linha A6.2 (T3) após indução em meio MS líquido durante 7 dias com 20 μM de Dex (+Dex). O controlo negativo é composto por extractos de plântulas incubadas numa situação de ausência do glucocorticoide indutor (-Dex). Em ambas as fracções foi possível observar as formas intermédia (ponteiro azul) e madura (ponteiro preto) da cardosina A.

Estes resultados revelaram a presença das formas de processamento intermédia (35 kDa; Figura II-25, ponteiro azul) e madura (31 kDa; Figura II-25, ponteiro preto) da cardosina A, tanto nos protoplastos como na fracção vacuolar purificada a partir destes. Pode-se portanto afirmar que a cardosina A sintetizada em *Arabidopsis* é eficientemente reconhecida pelos mecanismos de direccionamento e transporte de proteínas desta espécie, sendo correctamente endereçada para o compartimento vacuolar. Adicionalmente, porque a intensidade de sinal para a presença da cardosina A é semelhante nos dois tipos de extractos - de protoplastos e vacuolar, podemos afirmar que praticamente toda a cardosina A presente nas células se localiza nos vacúolos.

A presença simultânea das formas de processamento intermédia e madura da cardosina A nos vacúolos sugere que é neste organelo que ocorre o último passo de processamento da PA. De acordo com estes resultados, é no vacúolo que surge a forma madura da cardosina A, por clivagem do fragmento de activação *N*-terminal (Figura II-23C, Pro), o que se traduz pela diminuição de peso molecular de cerca de 4 kDa da forma intermédia (35 kDa) passando assim à forma madura (31 kDa).

De forma a comprovar que o extracto vacuolar havia sido obtido de uma fracção realmente enriquecida nestes organelos, usaram-se os mesmos extractos apresentados na Figura II-25 numa nova corrida electroforética e consequente *Western blotting* com um anticorpo primário contra uma isoforma de uma proteína intrínseca do tonoplasto (*tonoplast intrinsic protein*), a α-TIP de ervilheira (Johnson, *et al.*, 1989). As TIP são aquaporinas com aproximadamente 29 kDa e que se localizam no tonoplasto. Um resultado positivo composto por bandas com intensidade semelhante em todas as pistas indicou que a fracção purificada a partir dos protoplastos isolados correspondia de facto a uma fracção enriquecida em vacúolos (Figura II-26).

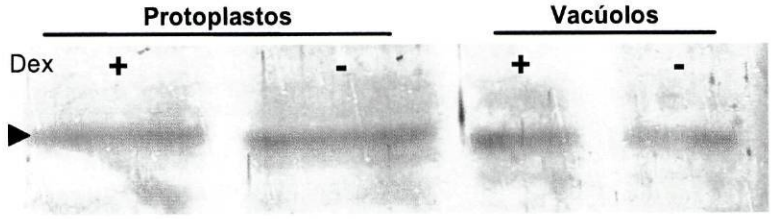



**Figura II-26 – Imunodetecção de α-TIP em extractos proteicos de protoplastos e vacúolos obtidos de plântulas transgénicas de *Arabidopsis* .** Os extractos são os mesmos apresentados na Figura 12. Foi utilizado um anticorpo primário produzido contra α-TIP de ervilheira numa diluição de 1:200. A proteína intrínseca do tonoplasto, com cerca de 29 kDa, foi eficientemente detectada em todas as pistas (ponteiro preto).

Sumariando, os resultados obtidos com a expressão da cardosina A em *Arabidopsis* permitem-nos afirmar que neste sistema a cardosina A é eficientemente processada até à forma madura, num processo semelhante àquele descrito para o sistema homólogo. Os pesos moleculares das várias formas de processamento da cardosina A observadas em *Arabidopsis* são consistentes com a hipótese da proteinase passar da forma precursora (66 kDa) à forma intermédia depois de clivada entre o PSI e a região *N*-terminal (35 kDa), e finalmente à forma madura após clivagem do pro-segmento *N*-terminal (31 kDa). Foi ainda possível demonstrar que a cardosina A sintetizada em *Arabidopsis* é direccionada para o compartimento subcelular correcto, onde parece ser bastante estável, já que a maior parte da cardosina A presente intracelularmente se localiza no vacúolo.

Adicionalmente, os nossos resultados indicaram que a cardosina A expressa em *Arabidopsis* segue a via clássica de transporte para o vacúolo, passando através do Golgi no seu trajecto, hipótese sugerida pela presença de *N*-glicanos do tipo complexo associados à proteína. O facto da forma de 35 kDa já apresentar *N*-glicanos do tipo complexo sugere que o primeiro passo de processamento da cardosina A acontece possivelmente após a passagem da proteína pelo RE, se bem que nesta fase não é possível inferir em que compartimento subcelular ocorre esta clivagem. A observação de que há uma porção de moléculas cujos *N*-glicanos permanecem sensíveis à acção da endoH não nos permite afirmar com toda a certeza que toda a cardosina A produzida neste sistema segue a via por defeito (*default pathway*) de transporte através do Golgi, até ao vacúolo. A hipótese de parte das moléculas de cardosina A sintetizadas em *Arabidopsis* ser directamente transportada do RE para o vacúolo não pode ser posta de parte, mesmo admitindo que este tipo de transporte resulte de uma saturação do sistema.

Finalmente, a observação de que as formas de processamento intermédia e madura da cardosina A se localizam no vacúolo sugere que o último passo de processamento, correspondente à excisão do seu pro-segmento *N*-terminal, ocorre neste "organelo".

Apesar deste sistema de expressão, indutivo e estável, em transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se ter revelado válido como modelo para o estudo do transporte e processamento da cardosina A tornou-se necessário recorrer a um tipo de sistema de expressão heterólogo

que permitisse uma maior variedade de abordagens à problemática em estudo, produzindo mais resultados em períodos de tempo mais curtos. Por esta razão, em paralelo com os estudos com transgénicas de *Arabidopsis* recorreu-se à expressão transitória da cardosina A em epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

De uma perspectiva mais aplicada, e porque em *Arabidopsis* a cardosina A é correctamente direccionada para o compartimento vacuolar, onde se acumula e é eficientemente detectada, é de salientar a possibilidade desta proteína poder vir a tornar-se uma útil ferramenta de trabalho em estudos dos mecanismos associados ao transporte e direccionamento intracelular de proteínas para o vacúolo, funcionando como um marcador vacuolar válido neste sistema, bem como possivelmente em outros modelos.

## 4.3 Estudo do transporte e do processamento da cardosina A em *Nicotiana tabacum* var. SR1 – expressão transitória em epiderme foliar mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A expressão transitória da cardosina A em epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* var. SR1 foi realizada utilizando um método de transfecção via *Agrobacterium tumefaciens* (Batoko, *et al.*, 2000) com o constructo pVKH18EN6-CdA (Figura II-27).

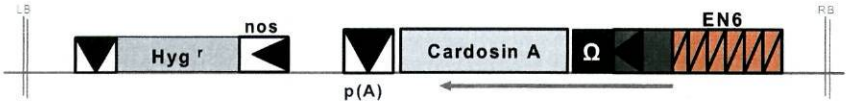



**Figura II-27 – Representação esquemática do constructo pVKH18EN6-CdA, usado para a expressão transitória da cardosina A em epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*.** (LB) *left border*; (RB) *right border*.

Para testar a expressão da cardosina A neste sistema procedeu-se à infiltração de suspensões com *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com clones independentes de pVKH18EN6-CdA em áreas de epiderme abaxial de folhas jovens em diferentes plantas de *Nicotiana tabacum*. Foram testadas duas concentrações de inóculo para cada suspensão, correspondentes a valores de densidade óptica a 600nm ($DO_{600}$) de 0,03 e 0,3. Passadas 48 h sobre a infiltração colheram-se amostras das regiões foliares infiltradas e procedeu-se à imunodetecção da cardosina A por *Western blotting* (Figura II-28).

Os resultados obtidos com extractos proteicos de regiões foliares infiltradas revelaram que a cardosina A era eficientemente expressa e detectada nas duas concentrações de inóculo testadas e com qualquer dos clones utilizados (Figura II-28). Tal como era esperado, o sinal da presença da cardosina A surgiu muito mais intenso nos extractos obtidos a partir de regiões infiltradas com suspensões bacterianas mais concentradas (Figura II-28, $DO_{600}$=0,3) e, por esta razão, a $DO_{600}$=0,3 foi seleccionada para utilização nas experiências subsequentes.

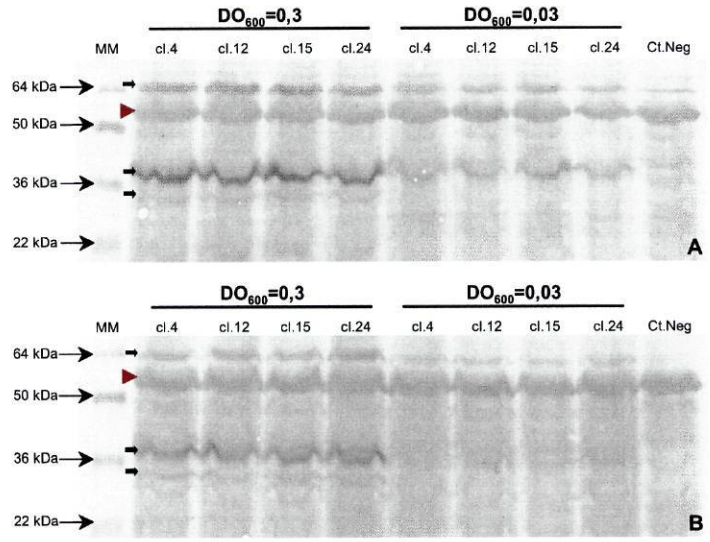



**Figura II-28 – Imunodetecção da cardosina A em extractos de regiões foliares de plantas de *Nicotiana tabacum* infiltradas com *Agrobacterium tumefaciens*.** A) e B) correspondem a resultados obtidos com duas plantas diferentes infiltradas com 4 clones independentes de pVKH18EN6-CdA – cl.4, cl.12, cl.15 e cl. 24. As amostras foram colhidas 48 h após infiltração. O controlo negativo (Ct.Neg) corresponde a uma região de folha não infiltrada. As setas a verde, azul e preto assinalam, respectivamente, as formas de processamento imatura (66 kDa), intermédia (35 kDa) e madura (31 kDa) da cardosina A. O ponteiro a vermelho assinala uma banda com cerca de 55 kDa presente em todas as amostras e correspondente à subunidade maior da RuBISCO que reage com o anticorpo primário contra a cardosina A recombinante. Esta banda aparecerá em todos os *Western blottings* apresentados daqui para a frente e não voltará a ser referida ao longo deste trabalho. (MM) marcador de pesos moleculares "SeeBlue® Plus2" (Invitrogen).

48 h após a infiltração era já evidente a presença das formas imatura (66 kDa) e intermédia (35 kDa) da cardosina A (Figura II-28, setas a verde e a azul). Foi também possível observar uma banda fracamente marcada, com cerca de 31 kDa, correspondente à forma madura da cardosina A ainda pouco abundante neste ponto (Figura II-28, seta a preto).

O sistema de expressão transitória via *Agrobacterium* em folhas de *Nicotiana tabacum* permite o aumento rápido e sincronizado da expressão de um transgene, que se inicia aproximadamente 30 h após a infiltração do tecido foliar com a suspensão bacteriana (Zheng *et al.*, manuscrito submetido para publicação). Com base neste conhecimento e de forma a acompanhar o processamento de uma única isoforma da cardosina A ao longo do tempo, fizeram-se extracções de proteínas de áreas foliares transfectadas com suspensões de *Agrobacterium* entre 48 e 106 h após infiltração ao que seguiu a imunodetecção da cardosina A por *Western blotting*. Os resultados encontram-se representados na Figura II-29.

Tal como ilustrado na Figura II-29B, 48 h após infiltração o anti-rec A detecta predominantemente a forma de processamento intermédia da cardosina A (seta a azul; 35 kDa) mas a forma imatura ou precursora (seta a verde; 66 kDa) também está presente. A forma de 66 kDa desaparece nas 12 h seguintes, seguida da forma de 35 kDa, enquanto a forma de 31 kDa (madura) se acumula e parece ser estável até 5 dias após infiltração (106 h). Estas observações são consistentes com uma ordem de eventos de processamento da cardosina A em *Nicotiana tabacum* semelhante à previamente inferida por Ramalho-Santos

*et al.* (Ramalho-Santos, *et al.*, 1998) para o sistema homólogo, sugerindo a remoção do péptido sinal (Pre) seguida de clivagem na porção *N*-terminal do PSI e subsequente excisão do pro-segmento (Pro), gerando a forma madura da proteína com 31 kDa (Figura II-29A).

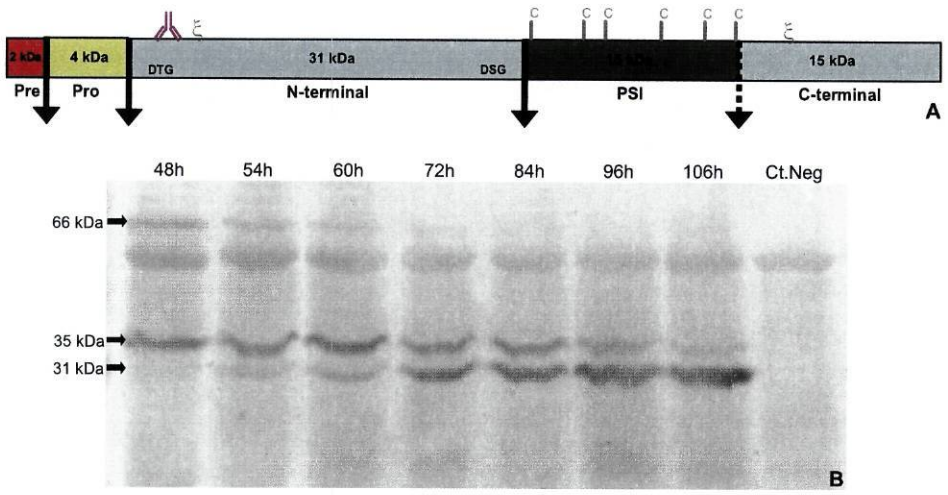



**Figura II-29 – Imunodetecção da cardosina A em extractos de regiões foliares de *Nicotiana tabacum* ao longo do tempo após infiltração com *Agrobacterium tumefaciens*.** A) Esquema de processamento da cardosina A deduzido com base em extractos de cardo (Ramalho-Santos, *et al.*, 1998). O anti-rec A encontra-se representado ligado à cadeia pesada, para a qual revelou maior afinidade (Faro, *et al.*, 1999). (Pre) péptido sinal; (Pro) pro-segmento de activação *N*-terminal; (PSI) *Plant Specific Insert*. Os *N*-glicanos estão representados por (ξ).(C) representam as seis cisteínas presentes em posições conservadas no PSI de PAs vegetais e nas saposinas. B) Imunodetecção da cardosina A nos extractos de regiões foliares infiltradas com *Agrobacterium tumefaciens*. As amostras começaram a ser colhidas 48 h após infiltração e em todos os tempos assinalados na figura. As setas a verde, azul e preto assinalam, respectivamente, as formas de processamento imatura, intermédia e madura da cardosina A. O controlo negativo (Ct.Neg) corresponde a uma região de folha não infiltrada.

A clivagem na porção *N*-terminal do PSI da cardosina A precede ou rapidamente sucede, a clivagem a nível do seu *C*-terminal, uma vez que a forma de 50 kDa prevista no processamento deduzido por Ramalho-Santos *et al.* (Ramalho-Santos, *et al.*, 1998) por hidrólise da região entre o PSI e a cadeia de 15 kDa (Figura II-29A, seta a tracejado), raramente foi observada. Não foi possível acompanhar a sucessão de clivagens ocorridas ao nível da região *C*-terminal da cardosina A devido a uma maior afinidade do anti-rec A para a cadeia pesada (*N*-terminal) da proteína, apesar de ter sido produzido contra a proteína recombinante completa (Faro, *et al.*, 1999).

Kervinen *et al.* propuseram a existência de um mecanismo de inactivação das PAs de plantas baseado na estrutura tridimensional do precursor da fitepsina e que é semelhante àquele aceite para as PAs de mamífero em que o pro-segmento bloqueia o local activo da enzima (Kervinen, *et al.*, 1999). A maioria das PAs de origem vegetal possui resíduos de Lys/Tyr (responsáveis pela "ancoragem" do pro-segmento ao centro activo) numa posição equivalente à encontrada na pro-fitepsina sugerindo a existência de um mecanismo de inactivação semelhante; no entanto, esta sequência não está presente na cardosina A (Simoes e Faro, 2004). Estudos bioquímicos com precursores recombinantes das cardosinas revelaram que, ao contrário do que acontece com outros zimogénios, as pro-cardosinas são activas (Vieira e Faro, resultados não publicados). Estas observações

sugeriram que os precursores da cardosina A provavelmente não partilham o mecanismo de inactivação descrito acima. No entanto, e provado que o pro-segmento não está envolvido na actividade enzimática da pro-cardosina A, neste trabalho demonstramos que este fragmento *N*-terminal é a última porção da proteína a ser removida antes de terminada a sua maturação. É portanto possível que na cardosina A a presença do pro-segmento seja importante, não como um mecanismo de prevenção da proteólise indesejada antes da chegada ao vacúolo, mas talvez para a estabilidade conformacional da enzima. A manutenção de uma conformação específica da cardosina A induzida pelo pro-segmento pode ser determinante para a exposição de sinais putativos de endereçamento para os vacúolos, permitindo que desta forma a proteína atinja o destino subcelular correcto.

Um dos objectivos a atingir nesta parte do trabalho era a caracterização do trajecto biossintético seguido pela cardosina A expressa em *Nicotiana*, nomeadamente no que concerne à passagem (ou não) da proteína pelo Golgi. Para tal recorreu-se a três estratégias distintas: caracterização dos *N*-glicanos associados à cadeia polipeptídica da cardosina A, co-expressão da cardosina A com formas selvagens e mutantes de GTPases envolvidas no transporte vesicular entre RE e Golgi, e experiências de *pulse-chase* na presença de um inibidor do transporte entre RE e Golgi, a brefeldina A. Cada uma destas estratégias será discutida isolada e pormenorizadamente de seguida.

### 4.3.1 Ensaios de resistência à endoH

Analogamente ao que foi ensaiado com a cardosina A expressa em *Arabidopsis*, começou-se por investigar se a cardosina A expressa em *Nicotiana tabacum* sofria *N*-glicosilação e qual a natureza dos *N*-glicanos associados à PA. Como já foi referido, a estrutura dos *N*-glicanos presentes à superfície das glicoproteínas pode ser testada com reacções de digestão pela endoH e fornece pistas importantes acerca do trajecto intracelular seguido por uma proteína específica.

Extractos proteicos de amostras de tecido foliar transfectado colhidas em vários tempos pós-infiltração foram sujeitos ensaios de resistência à digestão pela endoH. Os resultados encontram-se representados na Figura II-30.

Os resultados obtidos revelaram que a cardosina A expressa em plantas de *Nicotiana tabacum* é *N*-glicosilada e, tal como em *Arabidopsis*, a digestão dos extractos pela endoH revelou-se parcial. Nos extractos correspondentes a 48 h pós-infiltração, o tratamento com a endoH converteu a pro-cardosina A (Figura II-30A; 66 kDa) em duas espécies de aproximadamente 64 e 62 kDa (Figura II-30A), algo consistente com a remoção, respectivamente, de um ou dois N-glicanos destas moléculas. Ainda neste ponto, verificou-se que o único *N*-glicano presente nas moléculas com 35 kDa (Figura II-29A) apresentava uma resistência de cerca de 50% à acção da endoH (Figura II-30, A). De salientar que a

proporção de moléculas de cardosina A resistentes à endoH aumentou com o tempo (Figura II-30, A-C), o que se traduziu pela diminuição da intensidade das bandas de 33 e 29 kDa, resultantes da digestão das moléculas endoHs de 35 e 31 kDa respectivamente. No último tempo pós-infiltração testado, a proporção de moléculas endoHr das formas de 35 e 31 kDa era muito semelhante (cerca de 90%; Figura II-30, C).

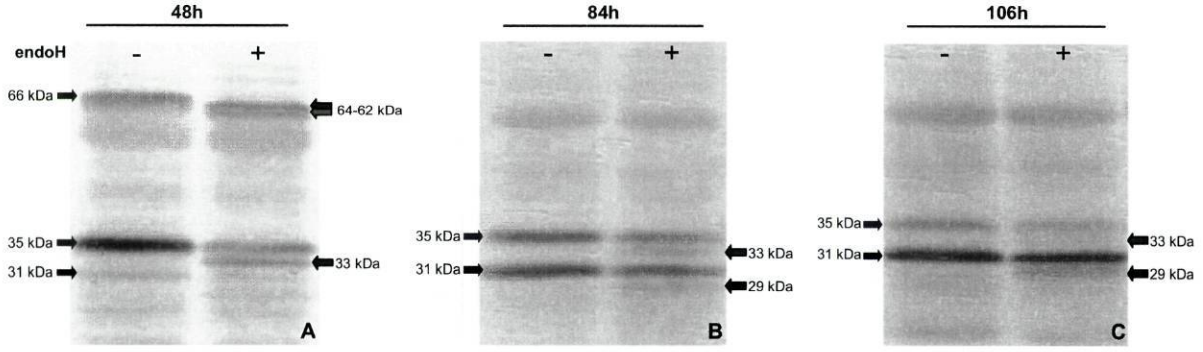



**Figura II-30 – Imunodetecção da cardosina A em extractos proteicos tratados com endoH.** Os extractos foram obtidos de amostras colhidas 48 (A), 84 (B) e 106 h (C) após infiltração. As diferentes formas de processamento da cardosina A encontram-se assinaladas pelas setas a verde (forma precursora; 66 kDa), a azul (forma intermédia; 35 kDa) e a preto (forma madura; 31 kDa). Os produtos resultantes da digestão das moléculas sensíveis da proteína à endoH encontram-se assinalados por setas delineadas a negro e com as cores das respectivas formas de processamento.

A completa sensibilidade das moléculas precursoras da cardosina A à digestão pela endoH (Figura II-30A) indica que em plantas de *Nicotiana tabacum* esta forma de maturação da PA se localiza no RE.

A observação da existência de dois tipos de moléculas de 35 kDa no que respeita à modificação dos *N*-glicanos, endoHs (Figura II-30A-B; 33 kDa) ou endoHr (Figura II-30A-B; 35 kDa), pode ser explicada de duas formas. A primeira considera que estes dois tipos de moléculas surgem pela ocorrência do primeiro passo de clivagem da cardosina A em localizações distintas, nomeadamente no RE ou no Golgi. Assim sendo, a população de 35 kDa sensível à endoH (Figura II-30A-B; 33 kDa) emergiria pela clivagem, no RE, de precursores da cardosina A com *N*-glicanos simples à sua superfície; por sua vez, a população de 35 kDa resistente à endoH (Figura II-30A-B; 35 kDa) emergiria no Golgi pela clivagem de moléculas de pro-cardosina A cujos *N*-glicanos já haviam sofrido o processo de modificação. A segunda hipótese explicativa para a existência de moléculas de 35 kDa endoHs e 35 kDa endoHr considera que estes dois tipos de populações surgem por saturação do sistema de modificação dos oligossacarídeos, causada por elevadas taxas de síntese da cardosina A o que justificaria a presença de *N*-glicanos não modificados em moléculas localizadas no Golgi. Esta última razão pode também ser invocada para a observação da presença de mais moléculas endoHs do que endoHr em plântulas de *Arabidopsis*, já que a taxa de síntese da cardosina A pode já estar no seu máximo entre 3 e 5 dias após o início da indução.

A observação de que, em ambos os sistemas heterólogos, nem todos os *N*-glicanos associados às moléculas de cardosina A adquirem resistência à endoH está de acordo com o que havia sido previamente descrito para o sistema homólogo, onde uma percentagem da cardosina A (≈6%) permanece com *N*-glicanos do tipo simples (Costa, *et al.*, 1997). No entanto, a hipótese dos resultados observados estar relacionada com uma menor eficiência do processo de modificação dos *N*-glicanos da cardosina A expressa em *Nicotiana* ou *Arabidopsis* do que em cardo, não pode ser excluída.

Resumidamente, os resultados obtidos com os ensaios de resistência à endoH permitem-nos afirmar que a cardosina A expressa em qualquer dos sistemas heterólogos testados neste trabalho é eficientemente glicosilada, com *N*-glicanos do tipo complexo; tal indica a passagem inequívoca de pelo menos parte do total de proteína sintetizada, pelo complexo de Golgi, no seu trajecto biossintético.

### 4.3.2 Co-expressão da cardosina A com formas nativas e mutantes de GTPases envolvidas no transporte entre RE e Golgi

Para investigar os mecanismos moleculares subjacentes ao transporte da cardosina A dentro da célula, tentou-se determinar se este transporte estaria dependente da acção de três GTPases comprovadamente requeridas em células da epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* para o trânsito vesicular normal entre RE e Golgi (Betts *et al.*, resultados não publicados) (Andreeva, *et al.*, 2000, Batoko, *et al.*, 2000, Saint-Jore, *et al.*, 2002).

As formas mutantes de efeito dominante negativo das GTPases *At*RabD1 (*At*Rab1h), *At*RabD2a (*At*Rab1b) e *Nt*Sar1 inibem a função normal das GTPases nativas respectivas bem como o transporte entre RE e Golgi de marcadores do apoplasto, do Golgi e dos vacúolos (Andreeva, *et al.*, 2000, Batoko, *et al.*, 2000)(Betts *et al.*, resultados não publicados; Zheng *et al.*, em preparação). Tal como referido na Introdução deste capítulo (secção 1.3), pensa-se que a *Nt*Sar1 é requerida para a formação de vesículas do tipo COPII no RE, enquanto as *At*RabD1 e *At*RabD2a parecem ser importantes na determinação da especificidade para a fusão entre vesículas derivadas do RE e respectiva membrana alvo, participando no reconhecimento da última (Figura II-31).

A premissa que justificava a realização deste conjunto de experiências era a seguinte: se o transporte/processamento da cardosina A envolve uma passagem pelo Golgi então, a co-expressão desta PA com formas mutantes das *At*RabD1/*At*RabD2a e *Nt*Sar1 levaria à acumulação da forma precursora da cardosina A que seria retida no RE e, consequentemente, sensível à acção da endoH (Figura II-31).

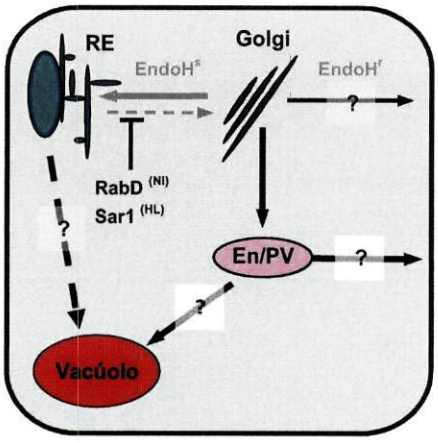



**Figura II-31 – Esquema representativo e simplificado de uma célula vegetal indicando o domínio de acção das GTPases AtRabD1/D2a e NtSar1.** As GTPases AtRabD e NtSar1 estão envolvidas no transporte vesicular entre retículo endoplasmático (RE) e Golgi. O domínio de acção destas GTPases nas células encontra-se representado na figura pela seta cinzenta a tracejado. A acumulação da cardosina A no RE por acção das GTPases mutantes levaria a uma acumulação da forma precursora da PA no RE. As setas a preto assinalam os possíveis trajectos da cardosina A dentro da célula. (En/PV) endossoma/compartimento pré-vacuolar.

Os constructos mutantes das GTPases usados neste estudo diferem em relação à proteína nativa (*wild type*) num par de bases (*point mutation*). As proteínas mutantes *At*RabD1[NI]/*At*RabD2a[NI] possuem uma mutação de asparagina para isoleucina (N-I) na posição 121 (Batoko, *et al.*, 2000)(Betts *et al.*, resultados não publicados). Por sua vez, a proteína mutante *Nt*Sar1[HL] possui uma mutação de histidina para leucina (H-L) na posição 74 (Andreeva, *et al.*, 2000). O efeito inibitório destas Rab GTPases mutantes sobre o transporte de um marcador, que em condições normais seria secretado (sec-GFP; *secreted Green Fluorescent Protein*), foi confirmado por microscopia confocal (Figura II-32). O efeito inibitório do mutante da *Nt*Sar1 também foi verificado por confocal com o marcador sec-YFP (*secreted Yellow Fluorescent Protein*) mas os resultados obtidos não se encontram representados.

Passadas 48 h após infiltração, as células simultaneamente transformadas com qualquer dos constructos mutantes das GTPases *At*RabD1/D2a e o marcador sec-GFP apresentavam uma fluorescência intensa causada pela acumulação da proteína marcadora dentro da célula, numa distribuição tipicamente observada em casos de retenção no RE (Figura II-32B-C). Pelo contrário, as células transformadas apenas com o marcador sec-GFP, numa situação em que o transporte entre RE e Golgi não é inibido, apresentavam uma baixa fluorescência ao confocal, consistente com a secreção da proteína marcadora para o apoplasto (Figura II-32).

A expressão das formas mutantes das *At*RabD1 e *Nt*Sar1 em epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* mostrou-se altamente deletéria e apenas 48 h após infiltração ($DO_{600}$=0,03) era já possível observar ao microscópio sinais típicos de morte celular. Duas semanas após infiltração este efeito era macroscopicamente evidente e específico para as regiões foliares de *Nicotiana tabacum* infiltradas com as formas mutantes das *At*RabD1 (Figura II-33) e *Nt*Sar1 (resultados não apresentados).

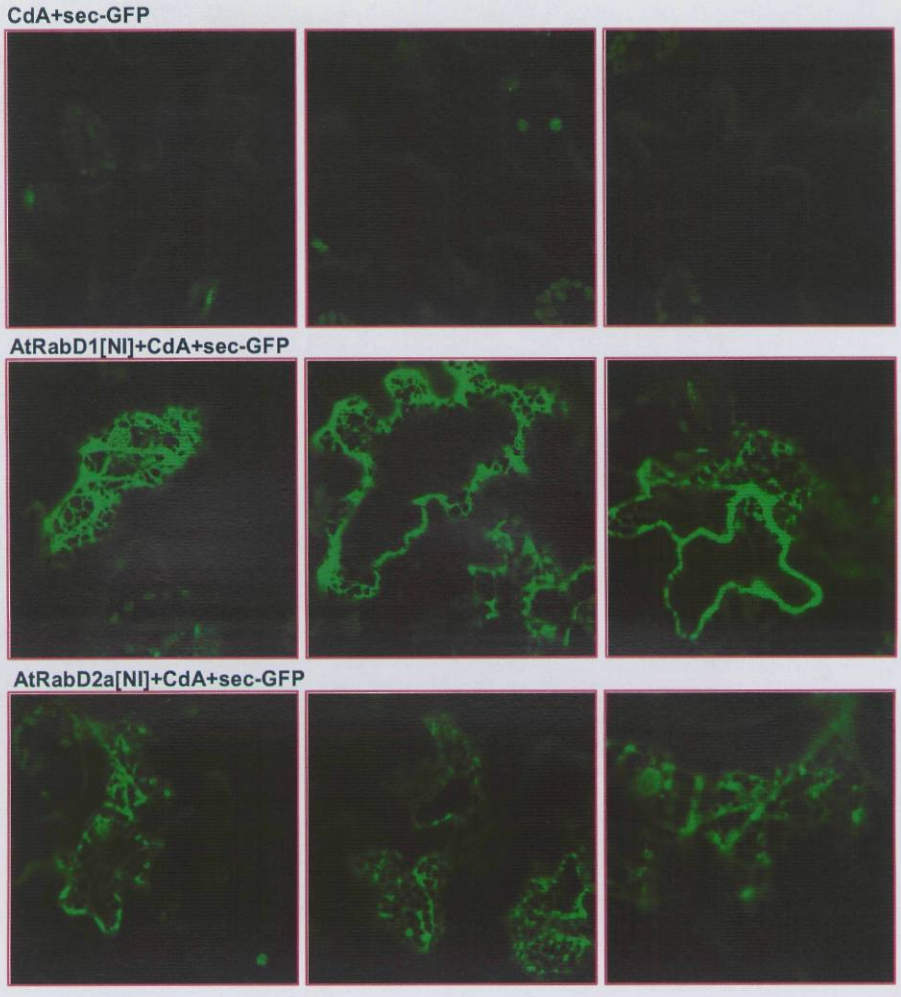



**Figura II-32 – Imagens de microscopia confocal de células de epiderme foliar de folhas de *Nicotiana tabacum* transfectadas com o constructo marcador sec-GFP, isoladamente e em conjunto com formas mutantes de AtRabD.** As imagens foram obtidas 48 h após infiltração das folhas com as combinações de constructos assinaladas na figura. Observou-se a fluorescência intensa das células transfectadas com as Rab mutantes (AtRabD1[NI]+Cd A+sec GFP e AtRabD2a[NI]+Cd A+sec GFP) num padrão reticulado, típico da acumulação do marcador sec-GFP no RE.

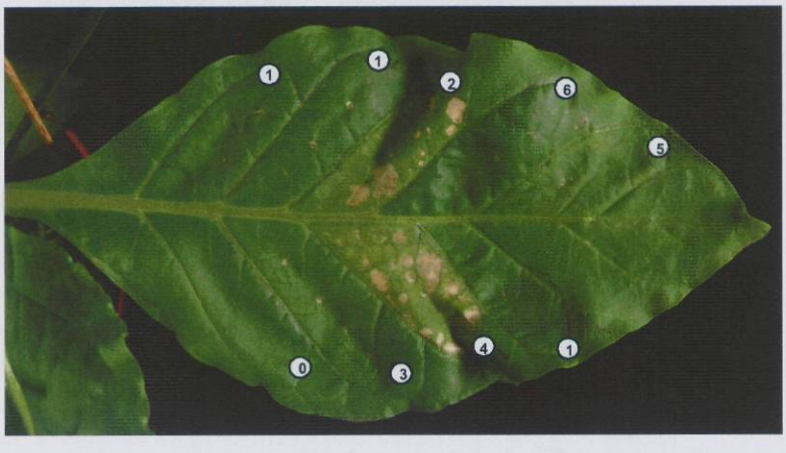



**Figura II-33 – Folha de *Nicotiana tabacum* 20 dias após infiltração com diferentes constructos.** As zonas assinaladas correspondem a regiões foliares infiltradas com os seguintes constructos: 1) cardosina A; 2) cardosina A+AtRabD1[NI]+secGFP; 3) cardosina A+AtRabD2a[NI]+secGFP; 4) AtRabD1[NI]+secGFP; 5) AtRabD2a[NI]+secGFP; 6) secGFP. A região assinalada com "0" corresponde a uma região não infiltrada.

Depois de confirmado o efeito inibitório da expressão dos mutantes AtRabD1[NI]/AtRabD2a[NI] e NtSar1[HL] sobre o transporte vesicular entre RE e Golgi, procedeu-se à co-expressão da cardosina A com as formas nativas e os mutantes de efeito dominante negativo das GTPases RabD e Sar1 em epiderme foliar de *Nicotiana tabacum*. Foram colhidas amostras em vários tempos pós-infiltração e procedeu-se à imunodetecção da cardosina A nestes extractos. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura II-34.

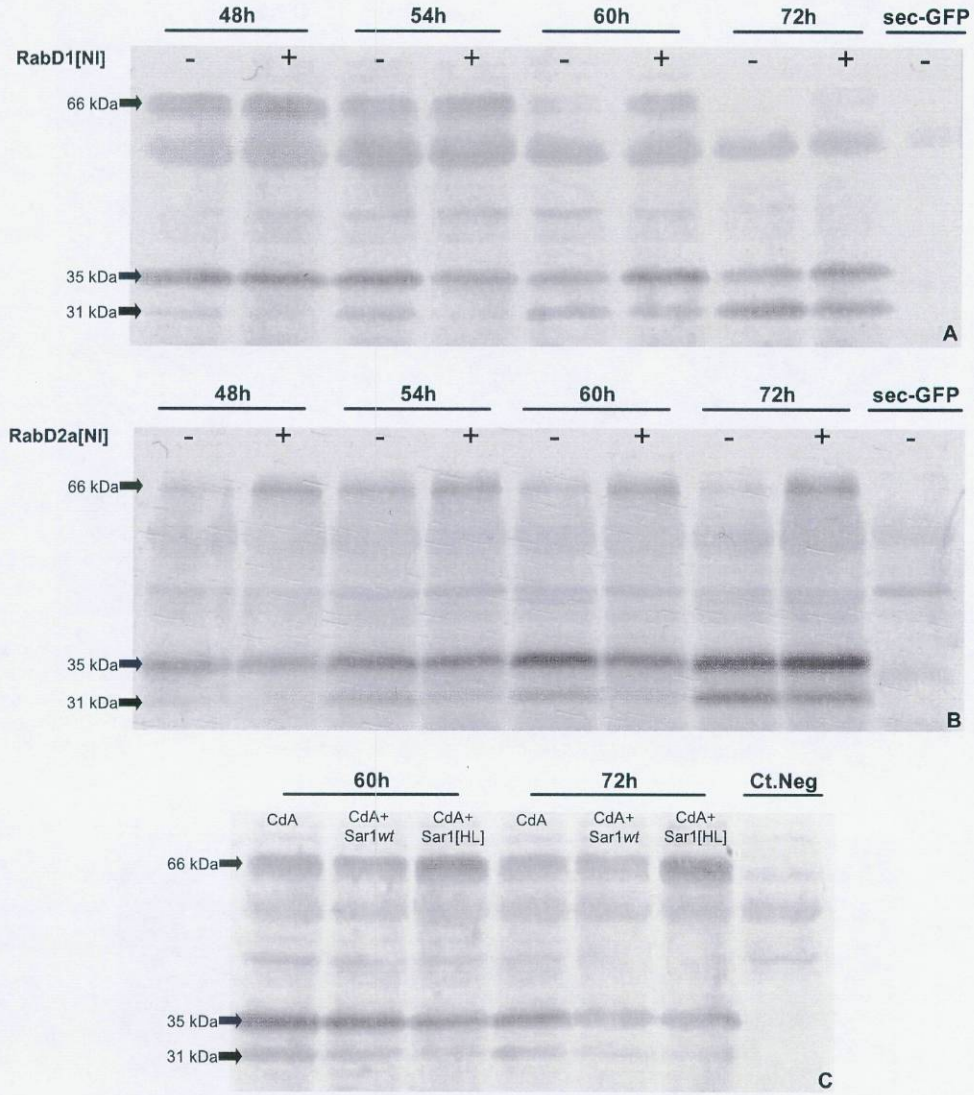



**Figura II-34 – Imunodetecção da cardosina A em folhas de *Nicotiana tabacum* co-expressando esta PA e diferentes mutantes de efeito dominante negativo de GTPases envolvidas no transporte vesicular entre RE e Golgi.** A) Co-expressão da cardosina A e sec-GFP(-) e destas com AtRabD1[NI](+). O controlo negativo (sec-GFP) consistiu na expressão isolada do constructo sec-GFP. B) Co-expressão da cardosina A e sec-GFP(-) e destas com AtRabD2a[NI](+). A pista assinalada com sec-GFP corresponde ao controlo negativo. Em A) e B) as amostras foram colhidas 48, 54, 60 e 72 h após infiltração. Nos casos em que houve co-expressão com as formas AtRbD mutantes é visível a acumulação da forma precursora da cardosina A (seta a verde; 66 kDa) e o processamento da cardosina A parece ser atrasado em relação à situação em que a AtRabD mutante está ausente. C) Co-expressão da cardosina A com as formas *wt* (CdA+Sar1wt) e mutante (CdA+Sar1[HL]) da NtSar1, e da cardosina A isoladamente (Cd A). O controlo negativo (Ct.Neg) corresponde a uma região de folha não infiltrada. Nas situações de co-expressão com o mutante NtSar1[HL] é visível a acumulação da forma precursora da cardosina A (seta a verde; 66 kDa). Neste caso as amostras representadas correspondem a tempos após infiltração de 60 e 72 h. As setas a azul e a preto assinalam, respectivamente, as formas intermédia e madura da cardosina A.

60 h após infiltração era claramente visível a acumulação da forma precursora da cardosina A (Figura II-34A, seta a verde) apenas nas amostras correspondentes a situações de co-expressão desta PA com a forma mutante da *At*RabD1 (Figura II-34A,+). Nestes ensaios foi ainda possível registar um retardamento do processo de transporte/maturação da cardosina A, evidenciado pelo atraso no surgimento da forma madura (Figura II-34A, seta a preto) nas situações de co-expressão com *At*RabD1[NI] (Figura II-34A,+; 48-60h) em relação às situações controlo (Figura II-34A,-; 48-60h).

Os mesmos resultados foram observados nas experiências de co-expressão da cardosina A com o mutante *At*RabD2a[NI] tendo sido registado um claro atraso no processamento da forma precursora da PA (Figura II-34B, seta a azul) que 72 h após infiltração ainda estava presente (Figura II-34B,+). Na situação controlo (Figura II-34B,-), 48 h depois da infiltração, a pro-cardosina A já estava praticamente ausente. O aparecimento da forma madura também sofreu um atraso nos casos em que o mutante estava presente, o que se tornou bastante evidente 54 h pós-infiltração pela maior intensidade da banda de 31 kDa na situação em que a cardosina A estava a ser expressa isoladamente (Figura II-34B,-; 54h) comparativamente à situação de co-expressão (Figura II-34B,+; 54h).

Nos ensaios de co-expressão da cardosina A com o mutante de efeito dominante negativo da Sar1 (Figura II-34C, CdA+Sar1[HL]) foi também observado um efeito retardador sobre o transporte e processamento da cardosina A até às 72 h após infiltração, evidenciado pela acumulação da forma precursora da cardosina A (Figura II-34C; seta a verde). De salientar que a expressão da forma *wt* da *Nt*Sar1 não teve qualquer efeito inibidor sobre o transporte e processamento da cardosina A (Figura II-34C, CdA+Sar1*wt*), que nesta situação foi comparável ao observado na expressão isolada da PA (Figura II-34C, CdA).

Resumindo, a co-expressão da cardosina A com os mutantes de efeito dominante negativo *At*RabD1[NI], *At*RabD2a[NI] e *Nt*Sar1[HL] induziu a acumulação da forma precursora da cardosina A e inibiu o transporte e processamento normais da proteína. Estes resultados revelaram que o transporte e processamento normais da cardosina A estão dependentes da actividade das GTPases RabD1 e RabD2a. O facto da interferência com a actividade normal da Sar1 induzir uma acumulação da forma precursora da proteína é consistente com um exporte da cardosina A, do RE para o Golgi, em vesículas com revestimento COPII. Esta hipótese está de acordo ao que foi observado para a fitepsina que é transportada do RE para o Golgi em vesículas COPII (Tormakangas, *et al.*, 2001). Adicionalmente, estas observações indicaram que o primeiro evento de processamento da cardosina A ocorre após ser exportado do RE, uma vez que a retenção forçada da proteína neste compartimento inibe a conversão da sua forma precursora (66 kDa) à forma intermédia (35 kDa). Não se pode, no entanto, excluir a possibilidade destas observações

resultarem de uma perturbação da normal actividade de processamento do RE pela presença das GTPases mutantes.

Em nenhuma das experiências de co-expressão da cardosina A com as formas mutantes das GTPases se observou uma completa inibição da conversão da forma precursora da cardosina A nas subsequentes formas de maturação. Várias explicações podem ser apontadas para justificar este resultado. A primeira prende-se com o uso de diferentes concentrações de inóculo para as suspensões com os constructos da cardosina A ($DO_{600}$=0,3) e das GTPases mutantes ($DO_{600}$=0,03). Para o constructo da cardosina A, a $DO_{600}$ de 0,3 tinha-se mostrado a mais adequada para uma detecção eficiente da cardosina A expressa em *Nicotiana tabacum* (Figura II-27). Para a expressão das GTPases mutantes, a densidade de inóculo de 0,03 assegurava um efeito inibitório sobre o transporte vesicular sem induzir a necrose das células que expressassem as proteínas mutantes.

De forma a observar um efeito inibitório dos mutantes de efeito dominante negativo sobre o transporte e processamento da cardosina A, ambos os constructos têm que ser expressos nas mesmas células. A utilização de diferentes diluições de inóculo para distintos constructos reduz a probabilidade disto acontecer já que, à partida, numa região foliar infiltrada teremos mais células transfectadas com o constructo correspondente ao inóculo mais concentrado. Este facto, em conjunto com a ocorrência de um padrão de expressão irregular (típico deste método de transformação), aumenta a dificuldade de ter dois constructos distintos a serem expressos na mesma célula, tornando a interacção entre os produtos de dois transgenes incompleta ou menos evidente, o que explicaria a inibição parcial do processamento da cardosina A nestes ensaios. Há ainda que considerar a hipótese desta inibição incompleta do processamento da cardosina A se dever à existência de um transporte da pro-proteína numa via independente da actividade normal da RabD1/D2a e Sar1; ou então, à ocorrência do processamento da forma precursora da cardosina A ao nível do RE.

### 4.3.3 Experiências de *pulse-chase* com protoplastos de *Nicotiana tabacum* na presença de brefeldina A

Os ensaios de resistência à endoH e o uso de mutantes que interferem com o trânsito vesicular confirmaram que, em *Nicotiana tabacum*, a cardosina A é transportada através do Golgi no seu trajecto até ao vacúolo. Porém, nenhuma experiência excluiu a possibilidade de pelo menos uma porção do total da proteína sintetizada, seguir uma via de transporte alternativa independente do Golgi.

Com o objectivo de avaliar o nível de envolvimento do Golgi no transporte e processamento da cardosina A investigou-se o efeito do metabolito de origem fúngica brefeldina A (BFA), sobre o transporte e processamento desta cardosina. Em epiderme foliar

de *Nicotiana tabacum*, esta droga induz a fusão entre RE e Golgi, inibindo o transporte anterógrado de marcadores vacuolares e apoplásticos, a partir deste ponto do sistema endomembranar (secção 1.3.5) (Boevink, *et al.*, 1998, Brandizzi, *et al.*, 2002, Matsuoka, *et al.*, 1995) (Figura II-35). O efeito inibitório da BFA sobre o transporte vesicular na via secretora é evidente nas imagens apresentadas na Figura II-36.

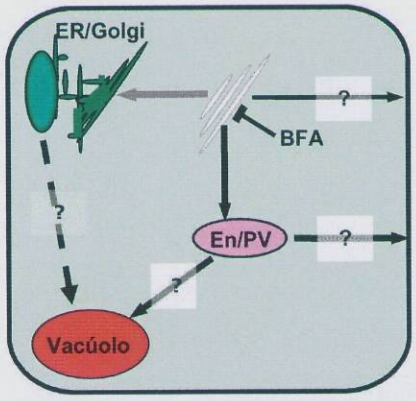



**Figura II-35 – Esquema representativo de uma célula vegetal sob a acção do inibidor da via secretora brefeldina A (BFA).** A BFA inibe especificamente o transporte anterógrado de vesículas não interferindo no trânsito vesicular retrógrado (seta a preto). As setas a preto assinalam os possíveis trajectos da cardosina A dentro da célula. (RE/Golgi) compartimento misto resultante da fusão entre vesículas de Golgi e RE; (En/PV) endossoma/compartimento pré-vacuolar.

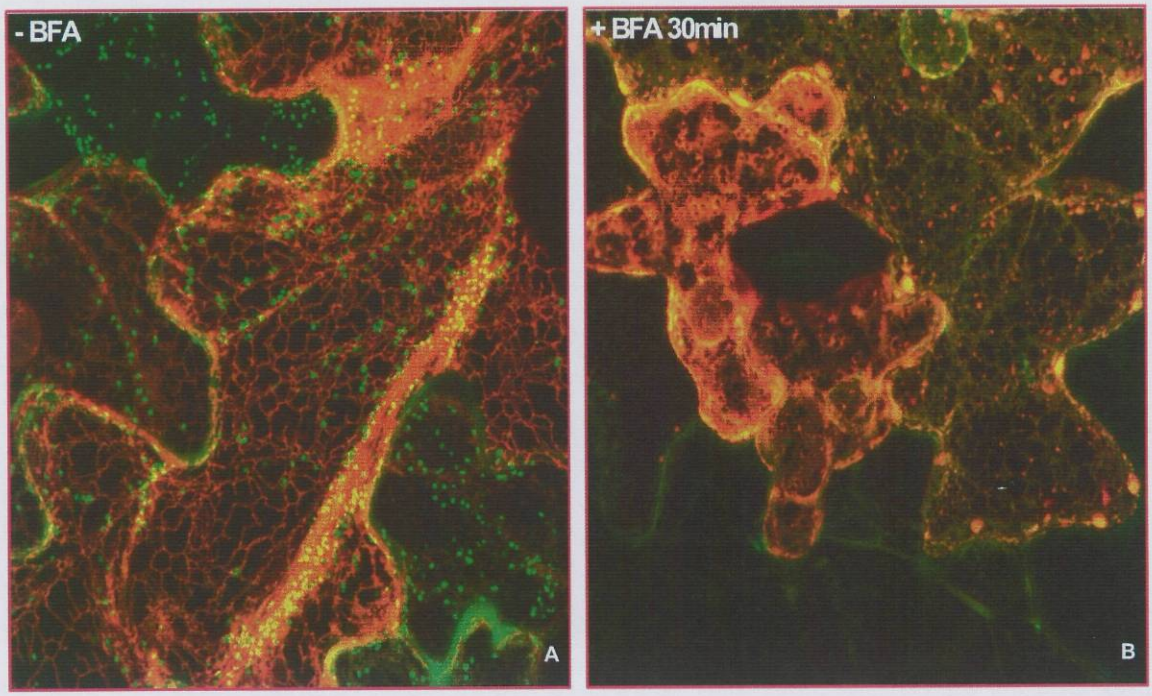



**Figura II-36 – Imagens de confocal de células de epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* ilustrando o efeito inibidor da BFA sobre o transporte vesicular.** Folhas de *Nicotiana tabacum* foram infiltradas via *Agrobacterium* para expressão de um marcador direccionado para o RE, YFP-HDEL (*yellow fluorescent protein* com o sinal *C*-terminal HDEL para retenção no RE) e outro direccionado para o Golgi, ST-CFP (*cyan fluorescent protein* com um sinal *N*-terminal, *syaliltransferase signal anchor sequence*, para retenção no Golgi). A) O controlo (-BFA) revela o RE marcado com YFP-HDEL (a vermelho) com o seu típico aspecto reticulado e estruturas pontuadas discretas (Golgi) marcadas com ST-CFP (a verde). B) Após 30 min de tratamento das folhas com 10 µg/mL de BFA, o RE e o Golgi já se tinham fundido num compartimento misto aberrante em que se acumulavam ambos os marcadores.

As experiências de *pulse-chase* na presença de BFA constituem uma abordagem clássica quando se investiga o trajecto intracelular seguido por uma proteína na via secretora, nomeadamente se o objectivo é testar a passagem de uma determinada proteína através do complexo de Golgi. A técnica de *pulse-chase* seguida neste trabalho foi a descrita por Denecke e Vitale (Denecke e Vitale, 1995) à qual foram feitas algumas modificações registadas em Material e Métodos. Resumidamente, o *pulse-chase* é uma técnica que permite acompanhar o transporte/processamento intracelular de proteínas sintetizadas *de novo* (secção 3.3.5). Basicamente, o procedimento técnico consiste em fornecer a células em suspensão que expressam a proteína de interesse, uma mistura de aminoácidos marcados radioactivamente, geralmente 35S-Met e 35S-Cys, por um determinado período de tempo. Este período normalmente varia entre 30 min a 6 h e corresponde à fase de pulse. Ao fim deste tempo, o meio contendo os aminoácidos radioactivos é substituído por meio fresco com a mesma composição mas em que os aminoácidos constituintes não estão marcados. Todas as proteínas sintetizadas durante o período de marcação, ou pulse, incorporam nas suas cadeias polipeptídicas os aminoácidos marcados (Figura II-37A).

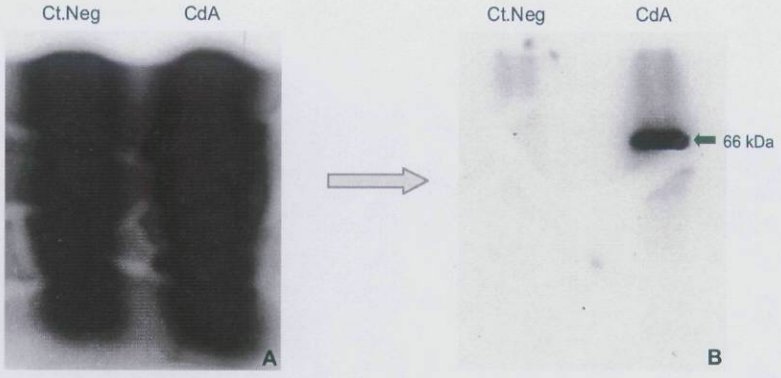



**Figura II-37 – Imagens de autoradiografia com extractos proteicos de protoplastos de folha de *Nicotiana tabacum* colhidos logo após o pulse.** A) Autoradiografia de extractos totais de protoplastos após 3h de marcação com o "Trans35S-Label No-Thaw Metabolic Labelling Reagent" (ICN Biochemicals). B) Autoradiografia de extractos proteicos de protoplastos colhidos no fim do período de *pulse* (3h) e imunoprecipitados com o anticorpo contra a cardosina A recombinante (1:200), que revelou precipitar especificamente a cardosina A. Ao fim das 3 h de *pulse* todas as moléculas desta PA se encontravam na forma precursora (seta a verde). O controlo negativo (Ct.Neg) corresponde a extractos obtidos de protoplastos isolados de regiões foliares não infiltradas. As pistas marcadas com "CdA" correspondem a extractos obtidos de protoplastos isolados a partir de regiões foliares infiltradas com pVKH18EN6-CdA.

Passado o período de *pulse* são colhidas amostras de células a diferentes intervalos de tempo para posterior extracção de proteínas e subsequente imunoprecipitação com um anticorpo primário específico para a proteína que se quer detectar. À fase em que o processamento das moléculas marcadas é acompanhado designa-se por *chase*. Os produtos resultantes da imunoprecipitação (Figura II-37B) são sujeitos a SDS-PAGE e a detecção da proteína imunoprecipitada é realizada por autoradiografia.

Sabendo que a BFA pode ser aplicada homogeneamente a uma população de protoplastos, procedeu-se ao estudo do efeito deste inibidor de transporte vesicular sobre o processamento da cardosina A por *pulse-chase*, com protoplastos isolados de folhas

infiltradas com pVKH18EN6-CdA. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura II-38.

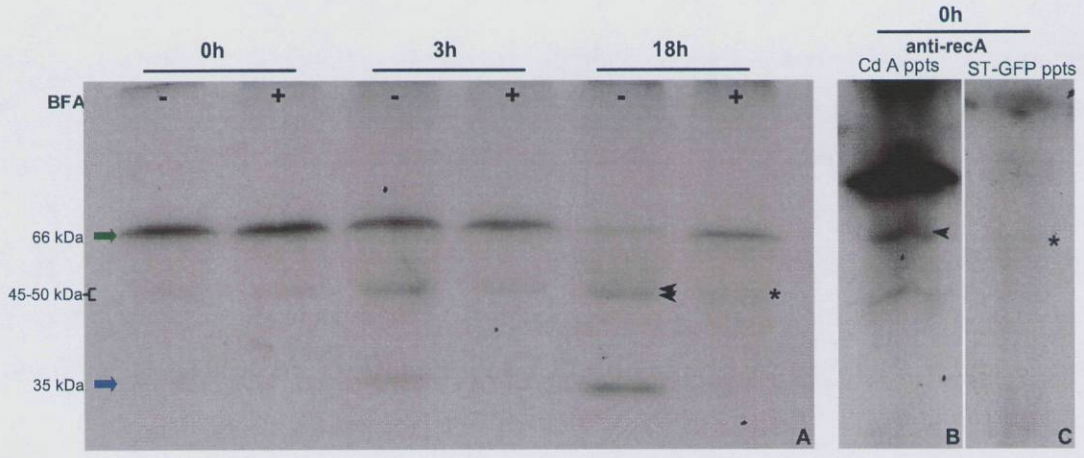



**Figura II-38 – Autoradiografia de experiências de *pulse-chase* com protoplastos de folha de *Nicotiana tabacum* para testar o efeito da BFA sobre o processamento da cardosina A.** A) 1.2x106 protoplastos foram marcados com 200 µCi de "Trans35S-Label No-Thaw Metabolic Labelling Reagent" (ICN Biochemicals) durante 3 h e a cardosina A sintetizada nestas células foi imunoprecipitada com anti-rec A (1:200) a partir de amostras colhidas nos intervalos de tempo referidos na figura (0, 3 e 18 h de *chase*). 18 h após o início do *chase* e na presença da BFA, toda a cardosina A permaneceu sob a forma precursora (seta a verde; 66 kDa). Nos casos em que a BFA estava ausente registou-se o aparecimento de duas bandas (ponteiros a preto) na região dos pesos moleculares entre 45-50 kDa. Uma destas bandas foi também detectada na presença do inibidor e possivelmente corresponde a uma proteína endógena não relacionada com a cardosina A que reagiu com o anti-rec A (*). A segunda banda, melhor definida, surgiu apenas na ausência da BFA e parece corresponder a um intermediário de processamento da cardosina A que não é detectado em extractos de folhas. B) Experiências de *pulse-chase* com protoplastos transformados para sintetizarem cardosina A. Nesta experiência, a banda com cerca de 45 kDa (possível intermediário de processamento da PA) também estava presente (ponteiro a preto). C) Experiência de *pulse-chase* com protoplastos transformados para sintetizarem a ST-GFP. Nestas amostras foi possível detectar a banda endógena com cerca de 50 kDa (*), não relacionada com a cardosina A.

Tal como ilustrado na Figura II-38A (0 h), ao fim do período de marcação de 3 h, ou pulse, praticamente todas as moléculas de cardosina A se encontravam na forma precursora (66 kDa). Nos protoplastos controlo, isto é na ausência de BFA, a forma de processamento intermédia (35 kDa) da cardosina A foi detectada 3 h após o início do *chase* e era predominante ao fim de 18 h. Em contraste, nas amostras tratadas com BFA e ao fim de 18 h de *chase*, não havia ainda ocorrido a conversão detectável da forma com 66 kDa à forma de 35 kDa (Figura II-38A; 18 h). O mesmo resultado foi observado após 24 h de *chase* (resultados não apresentados).

A análise dos resultados obtidos nas experiências de *pulse-chase* revelou que nos casos em que a BFA estava ausente podiam ser observadas duas bandas na região dos pesos moleculares entre 45-50 kDa (Figura II-38A; ponteiros a preto). Uma destas bandas foi também detectada nos casos em que o inibidor estava presente sugerindo corresponder a um produto da reacção não específica do anti-rec A com uma proteína endógena de *Nicotiana tabacum*, e portanto não relacionada com a cardosina A (Figura II-38A,*). Extractos de protoplastos transformados para sintetizarem um marcador do Golgi (ST-GFP) e imunoprecipitados com anti-rec A revelaram a presença da banda assinalada por um asterisco (Figura II-38C) o que suporta a hipótese avançada desta corresponder a uma proteína endógena de *Nicotiana tabacum*.

A segunda banda detectada, melhor definida, surgiu somente nas amostras em que a BFA estava ausente parecendo corresponder a um intermediário de processamento da cardosina A que escapa a detecção em extractos de folhas. A hipótese desta banda estar relacionada com a cardosina A foi reforçada por resultados obtidos com outras experiências de *pulse-chase* realizadas com protoplastos a sintetizarem cardosina A tal como representado na Figura II-38B (ponteiro a preto). Esta forma de maturação da cardosina A com cerca de 50 kDa pode não ocorrer em situações de trânsito vesicular normal e surgir de um tipo de processamento alternativo ocorrido no compartimento subcelular anómalo resultante da fusão entre Golgi e RE por acção da BFA. Alternativamente, esta banda pode corresponder a uma forma de processamento da cardosina A resultante da clivagem na região *C*-terminal do PSI (Figura II-39), não detectada nos *Western blottings* com extractos de folha mas reconhecida pelo anti-rec A na imunoprecipitação da cardosina A em protoplastos após *pulse-chase*.

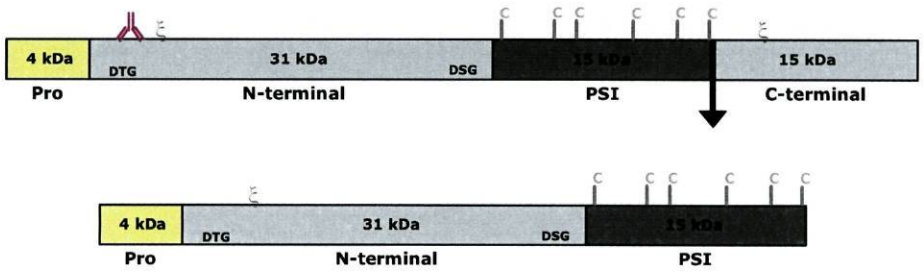



**Figura II-39 – Representação esquemática do processamento a nível da região *C*-terminal do PSI da cardosina A.**

Resumindo, as experiências de *pulse-chase* na presença e ausência da BFA revelaram que na presença desta droga o processamento da pro-cardosina A era inibido. Os resultados obtidos sugerem uma localização da forma precursora da cardosina A no RE, apontam para que a primeira clivagem sofrida pela proteína ocorra após o RE e permitem afirmar inequivocamente que a maior parte da cardosina A sintetizada neste sistema heterólogo passa pelo Golgi no seu trajecto biossintético.

Inequivocamente provado o envolvimento do complexo de Golgi no transporte e processamento da cardosina A, faltava ainda demonstrar que em *Nicotiana tabacum* a cardosina A era direccionada para o compartimento subcelular correcto, como já havia sido demonstrado para *Arabidopsis* . Para responder a esta questão isolaram-se protoplastos e vacúolos a partir de folhas infiltradas com o constructo para expressão da cardosina A e analisaram-se os extractos obtidos a partir das fracções celular e enriquecida em vacúolos por *Western blotting* para imunodetecção da cardosina A (Figura II-40).

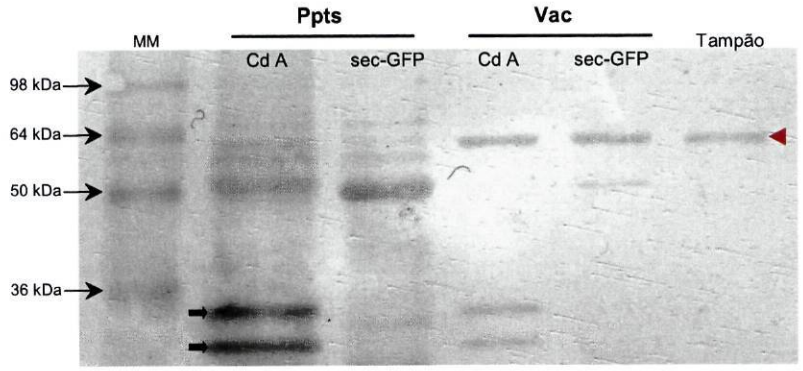



**Figura II-40 – Imunodetecção da cardosina A em extractos proteicos de protoplastos (Ppts) e vacúolos (Vac) de folhas de *Nicotiana tabacum*.** Os resultados foram obtidos 4 dias após infiltração da epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* com o constructo da cardosina A (Cd A) ou da GFP apoplástica (sec-GFP) via *Agrobacterium*. Na pista designada por "Tampão" apenas foi aplicado tampão utilizado para a purificação de vacúolos. O ponteiro a vermelho assinala uma banda contaminante de alto peso molecular presente em todas as experiências deste tipo e que corresponde à BSA adicionada ao tampão de isolamento de vacúolos que reage inespecificamente com o anti-rec A. Esta banda não voltará a ser referida ao longo deste trabalho. Tanto no extracto celular como vacuolar foram detectadas as formas de processamento intermédia (seta a azul; 35 kDa) e madura (seta a preto; 31 kDa) da cardosina A. (MM) marcador de pesos moleculares "SeeBlue® Plus2" (Invitrogen).

Os resultados obtidos após imunodetecção da cardosina A em protoplastos e vacúolos isolados a partir de folhas de *Nicotiana tabacum* transfectadas com o constructo para a cardosina A revelaram a presença das formas de processamento intermédia (seta a azul na figura acima; 35 kDa) e madura (seta a preto na figura acima; 31 kDa) da cardosina, tanto na fracção celular como na fracção vacuolar (Figura II-40). A presença simultânea das formas de processamento intermédia e madura da cardosina A nos vacúolos de células de *Nicotiana tabacum* (Figura II-40) e de *Arabidopsis* sugere que o último evento de processamento desta PA (excisão do pro-segmento) ocorre no vacúolo, local onde emerge a forma madura da enzima.

Ramalho-Santos *et al.* sugeriram que o sinal de endereçamento da cardosina A para o vacúolo residisse na sequência VGFAEAA presente na região *C*-terminal da proteína (Ramalho-Santos, *et al.*, 1998), já que esta sequência é bastante semelhante ao ct-VSD (VFAEAIA) identificado na lectina de cevada (uma proteína de armazenamento com localização vacuolar) (Bednarek, *et al.*, 1990, Dombrowski, *et al.*, 1993). No entanto, a presença de uma sequência muito similar na região *C*-terminal da cardosina B (VGFAEAV) (Vieira, *et al.*, 2001), localizada extracelularmente, contraria esta hipótese. Apesar de não serem conhecidas as sequências da cardosina A que determinam o seu transporte para o vacúolo é possível que esta informação esteja contida no PSI, algo comprovado para a PA vacuolar fitepsina de cevada (Tormakangas, *et al.*, 2001), sob a forma de uma sequência polipeptídica interna ou como um sinal de direccionamento estrutural (*physical structure* VSD (psVSD) (Neuhaus e Rogers, 1998)). Demonstrada para já está a capacidade do PSI da cardosina A, mesmo enquanto parte constituinte do precursor da PA, interagir com membranas de microssomas e de induzir a libertação do seu conteúdo preferencialmente a pH baixo (Egas, *et al.*, 2000). É provável que a informação para o endereçamento da cardosina A para o vacúolo resida no PSI e que este domínio hidrofóbico seja responsável

pela associação da cardosina A com as membranas das vesículas durante o seu transporte (Egas, *et al.*, 2000).

Um estudo prévio realizado neste trabalho com extractos proteicos de folhas *Nicotiana tabacum* revelou que anticorpos primários contra distintas isoformas de TIPs de ervilheira e de rábano não reconheciam as suas homólogas em *Nicotiana tabacum* (resultados não apresentados). Por esta razão, para comprovar que os extractos vacuolares representados na figura anterior provinham de uma fracção enriquecida nestas estruturas, foi necessário recorrer a uma estratégia diferente da utilizada com *Arabidopsis*. Para tal recorreu-se à expressão (isolada ou com a cardosina A) de diferentes marcadores vacuolares constituídos por fusões entre GFP e distintos sinais identificados como responsáveis pelo endereçamento de proteínas para o compartimento vacuolar. Um dos constructos marcadores utilizados correspondia à sequência da GFP fundida ao sinal de endereçamento *N*-terminal da aleuraína de cevada (Aleu-GFP) para o lúmen de vacúolos vegetativos (Di Sansebastiano, *et al.*, 2001). O segundo constructo utilizado como marcador vacuolar correspondia a uma fusão de GFP a jusante da sequência de uma γ-TIP originalmente isolada de *Brassica oleracea* (*Bob*TIP-GFP), e que seria direccionado para o tonoplasto (Reisen, *et al.*, 2003). Idealmente, estas estratégias permitir-nos-iam detectar a GFP nas fracções isoladas como vacuolares, validando os resultados obtidos na imunodetecção da cardosina A neste tipo de compartimento subcelular. Nas figuras seguintes (Figura II-41 e Figura II-42) encontram-se representados os resultados obtidos na imunodetecção da GFP em vacúolos isolados de protoplastos de folhas transfectadas com os constructos para as fusões vacuolares.

Nestas experiências as amostras foram colhidas 7 dias após a infiltração das folhas de modo a garantir que neste ponto os marcadores vacuolares já tivessem atingido o compartimento subcelular alvo (vacúolo) diminuindo perdas de sinal por haver moléculas de GFP ainda em trânsito no RE ou no Golgi. Nos ensaios de detecção dos marcadores e da cardosina A foi possível registar um aumento da intensidade do sinal para a presença da cardosina A em relação àquele observado com 4 dias de infiltração (Figura II-40). Este sinal mais intenso surgiu nos dois tipos de extractos – de protoplastos e vacuolar – sugerindo que a cardosina A, depois de atingir os vacúolos de *Nicotiana tabacum*, aí se acumula estavelmente (Figura II-41A e Figura II-42A). Esta observação levou a que nas experiências subsequentes as amostras fossem sempre colhidas após uma semana sobre a transfecção das folhas.

Apesar do sucesso na detecção da cardosina A nos extractos de protoplastos e vacúolos de *Nicotiana tabacum*, os resultados obtidos na imunodetecção da GFP nas amostras de Aleu-GFP não foram conclusivos, não garantindo que a fracção vacuolar surgia de facto enriquecida nestes "organelos" (Figura II-41B).

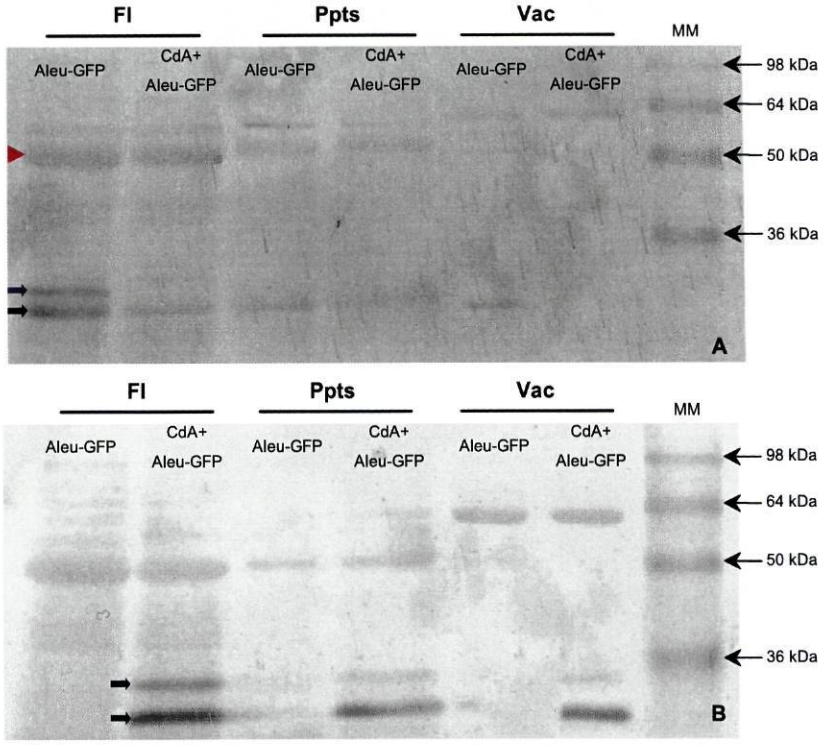



**Figura II-41 – Imunodetecção da cardosina A e da GFP em extractos de folha (Fl), protoplastos (Ppts) e vacúolos (Vac) obtidos de folhas de *Nicotiana tabacum* transfectadas via *Agrobacterium*.** Os resultados foram obtidos 7 dias após infiltração, isoladamente com o constructo marcador Aleu-GFP (Aleu-GFP), ou com este e com o constructo da cardosina A (Cd A+Aleu-GFP). A) Imunodetecção da cardosina A. Tal como observado após 4 dias de infiltração, 7 dias passados sobre a transfecção foram observadas as formas de processamento intermédia (seta a azul; 35 kDa) e madura (seta a preto; 31 kDa) da cardosina A em todos os tipos de extractos. B) Imunodetecção da GFP nos extractos representados em A). O anticorpo primário contra a GFP (ab6556 da Abcam) foi utilizado na diluição 1:1000. O ponteiro a vermelho assinala uma banda com cerca de 55 kDa presente nas amostras de folha e protoplastos e que corresponde à subunidade maior da RuBISCO que reage com o anti-GFP. As setas a cinzento e a preto assinalam, respectivamente, Aleu-GFP antes e depois da excisão do sinal de endereçamento para o vacúolo com localização *N*-terminal. (MM) marcador "SeeBlue® Plus2" (Invitrogen).

Os resultados pouco esclarecedores obtidos com os ensaios de expressão do marcador Aleu-GFP foram atribuídos, entre outras, a uma possível falta de estabilidade da GFP nos vacúolos de *Nicotiana tabacum*. Atingido o compartimento vacuolar esta proteína seria alvo de degradação pelas proteases endógenas o que justificaria o facto do sinal para a sua presença ser muito fraco ou quase nulo para protoplastos e vacúolos isolados de folhas transfectadas com Aleu-GFP isoladamente (sinal mais forte), ou em conjunto com a cardosina A (sinal ausente).

Nos casos em que houve co-expressão da cardosina A e da Aleu-GFP, mas em que a última não foi detectada nos vacúolos pode dever-se a uma competição entre estas duas proteínas para a ligação a receptores de transporte específicos das vias de direccionamento para os vacúolos, que favoreceria o transporte da proteína com mais altos níveis de expressão, ou seja, a cardosina A. A ser verdadeira esta hipótese, a sobre-expressão da cardosina A levaria a que esta fosse correcta e eficazmente direccionada para o vacúolo, enquanto o transporte da Aleu-GFP para este compartimento subcelular seria atrasado ou divergiria para o apoplasto. Não pode ainda ser excluída a hipótese da cardosina A ser a responsável pela degradação da GFP, uma vez no vacúolo ou ainda em trânsito.

Para tentar ultrapassar a dificuldade de detecção da GFP nos extractos vacuolares recorreu-se à utilização de um segundo marcador, BobTIP-GFP, direccionado para o tonoplasto e que por esta razão seria menos propenso a degradação por proteases do vacúolo. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura II-42B.

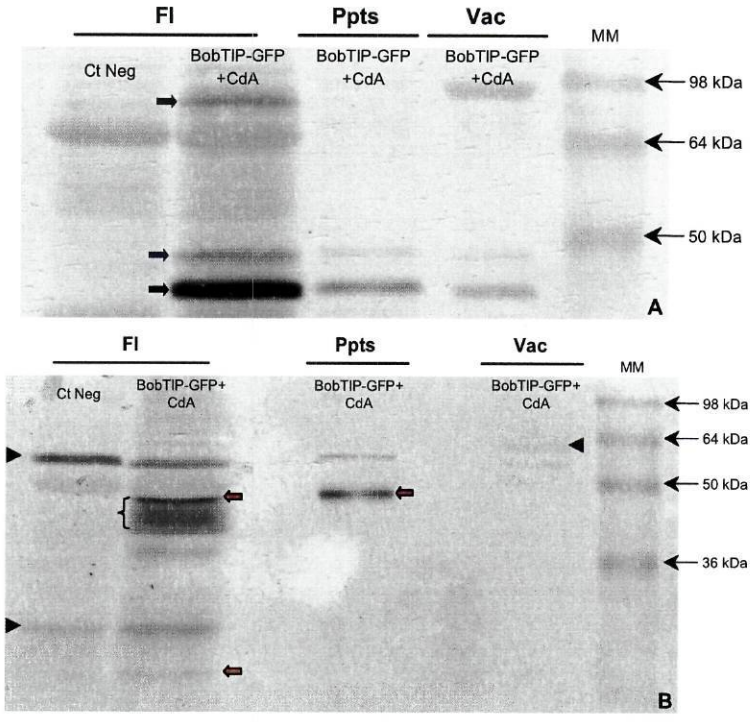



**Figura II-42 – Imunodetecção da cardosina A e da GFP em extractos de folha (Fl), protoplastos (Ppts) e vacúolos (Vac) obtidos de folhas de *Nicotiana tabacum* transfectadas via *Agrobacterium*.** Os resultados foram obtidos 7 dias após infiltração uma mistura dos constructos da cardosina A e da BobTIP-GFP. A) Imunodetecção da cardosina A. Foi possível detectar as formas de processamento intermédia (seta a azul; 35 kDa) e madura (seta a preto; 31 kDa) da cardosina A em todos os tipos de extractos. A banda assinalada pela seta verde possivelmente corresponde à forma imatura da cardosina A. B) Imunodetecção da GFP nos extractos representados em A). O ponteiro a preto assinala a subunidade maior da RuBISCO. Os ponteiros a castanho e a lilás assinalam, respectivamente, uma proteína endógena de *Nicotiana tabacum* não relacionada com a cardosina A e a BSA presente no tampão de isolamento de vacúolos. Todas são produtos de ligações inespecíficas do anti-GFP. As bandas assinaladas pela chaveta possivelmente correspondem a produtos de degradação da BobTIP-GFP. As setas a laranja forte e laranja claro assinalam, respectivamente, BobTIP-GFP e GFP, depois da clivagem da TIP. O controlo negativo corresponde a uma situação de folha não infiltrada. (MM) marcador molecular "SeeBlue® Plus2" (Invitrogen).

As regiões foliares infiltradas com o constructo BobTIP-GFP foram observadas ao microscópio confocal e confirmou-se a marcação do tonoplasto e ausência de fluorescência no citoplasma e apoplasto (resultados não apresentados).

A fusão BobTIP-GFP tem um peso molecular de aproximadamente 56 kDa (29 kDa da BobTIP e cerca de 27 kDa da GFP). Esta banda foi efectivamente detectada em extractos de folhas e de protoplastos (Figura II-42B, seta a vermelho) porém, e tal como com a Aleu-GFP, a BobTIP-GFP estava ausente na fracção vacuolar.

Nos extractos de folhas registou-se o aparecimento de uma mancha de arrastamento assinalada pela chaveta na Figura II-42B e que possivelmente corresponde a produtos de degradação da BobTIP-GFP. Este arrasto não foi observado nos extractos de protoplastos sugerindo que estas moléculas truncadas não surgem no ambiente intracelular. É possível que uma porção das moléculas de BobTIP-GFP tenha sido direccionada para a membrana citoplasmática e que os produtos de degradação observados resultem da hidrólise da GFP

(porção solúvel da BobTIP-GFP) por proteases do apoplasto, ausentes nas preparações de protoplastos. Esta hipótese é suportada pela ausência de fluorescência do apoplasto registada no microscópio confocal.

O facto da BobTIP-GFP estar associada ao tonoplasto e o processo de precipitação de proteínas da fracção vacuolar favorecer a precipitação de polipéptidos solúveis pode constituir parte do problema na detecção desta proteína em extractos vacuolares.

Para avaliar a eficiência de recuperação de vacúolos a partir de protoplastos de folhas optou-se então por uma abordagem mais clássica, recorrendo a um ensaio para a quantificação da actividade de uma enzima residente do vacúolo – a α-manosidase (Hadlington e Denecke, 2000), como descrito detalhadamente em Material e Métodos (secção 3.3.8).

Para o mesmo volume de extracto, registaram-se valores de actividade da α-manosidase aproximadamente três vezes superiores nas amostras de protoplastos comparativamente às amostras de vacúolos, traduzidos por valores de absorvância a 405 nm superiores para as primeiras (Figura II-43).

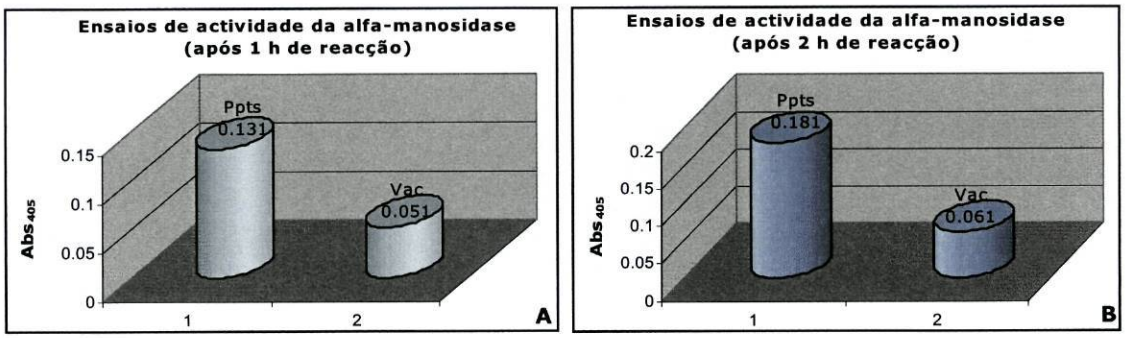



**Figura II-43 – Ensaios de actividade da α-manosidase com extractos das fracções celular (Ppts) e vacuolar (Vac).** A) Valores de absorvâncias a 405 nm (Abs405) após 1 h de reacção. B) Valores de Abs405 após 2 h de reacção. 2 h passadas sobre o início da reacção o valor obtido com o extracto celular é cerca de três vezes superior àquele obtido com o extractos da fracção vacuolar (B).

Os diferentes extractos foram igualizados com base na actividade da α-manosidase para de seguida se proceder à imunodetecção da cardosina A. O aparecimento de bandas com intensidade semelhante nas pistas com extractos celulares e vacuolares indicaria não só que a fracção purificada a partir dos protoplastos correspondia realmente a uma fracção enriquecida em vacúolos, mas também que a (quase) totalidade da proteína presente intracelularmente se localizava neste compartimento subcelular. Os resultados obtidos estão representados na Figura II-44.

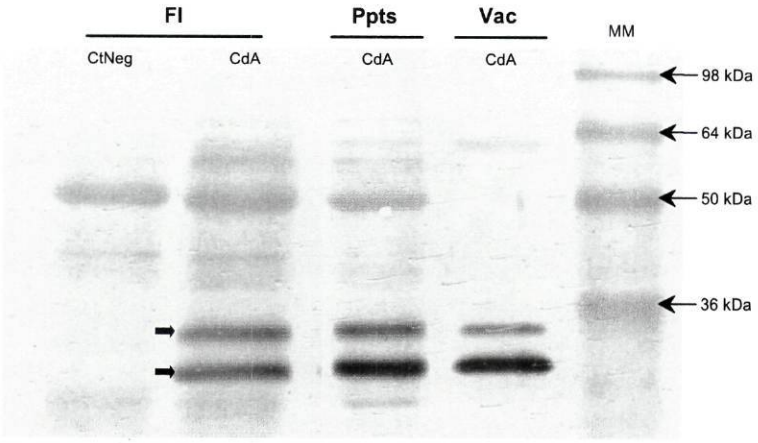



**Figura II-44 – Imunodetecção da cardosina A em extractos proteicos de protoplastos (Ppts) e vacúolos (Vac) igualizados para valores de α-manosidase.** Resultados obtidos 7 dias após infiltração. Neste gel foram também aplicados extractos de folha (Fl) para os quais não foram calculados valores de actividade da α-manosidase. O controlo negativo (Ct.Neg) corresponde a uma região de folha não infiltrada. As formas de processamento intermédia (seta a azul; 35 kDa) e madura (seta a preto; 31 kDa) da cardosina A foram detectadas em todos os tipos de extractos. (MM) marcador de pesos moleculares "SeeBlue® Plus2" (Invitrogen).

A forma intermédia de processamento da cardosina A (35 kDa) foi detectada nos extractos celular e vacuolar (Figura II-44, seta a azul) suportando a ideia já referida de que é no vacúolo que as cadeias de 35 kDa sofrem clivagem gerando a forma madura. Verificou-se que nas pistas com os extractos de protoplastos e de vacúolos, a intensidade da banda com 31 kDa (correspondente à forma madura da cardosina A) era muito semelhante (Figura II-44, seta a preto), o que indica que a maior parte da proteína madura presente no meio intracelular se localiza no vacúolo. O rácio entre as formas de 35 e 31 kDa (Figura II-44, setas a azul e preto), maior nos protoplastos do que nos vacúolos, é consistente com esta hipótese. É interessante notar que este mesmo rácio se revelou bastante superior nos extractos de folhas, observação que sugere que uma porção das moléculas na forma de 35 kDa presente nestas amostras se localiza na parede celular.

A acumulação da forma madura da cardosina A nos vacúolos dos protoplastos de *Nicotiana tabacum* e de *Arabidopsis* indica que nestes sistemas a proteína não só é correctamente direccionada como também é estável. Este resultado contraria os dados obtidos para outra PA vacuolar de origem vegetal, a fitepsina, que quando sintetizada em plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* se apresenta muito mais estável no apoplasto do que nos vacúolos desta espécie, onde muito dificilmente é detectada (Tormakangas, *et al.*, 2001). Não é por isso demais reforçar, como aliás já foi referido, a possibilidade da cardosina A poder vir a tornar-se uma útil ferramenta de trabalho em estudos dos mecanismos associados ao transporte e direccionamento intracelular de proteínas para o vacúolo, funcionando como um marcador vacuolar válido nestes sistemas (*Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*) como possivelmente em outros modelos.

A hipótese de uma porção da quantidade total de cardosina A ser direccionada para o apoplasto surgiu com observações em ensaios de imunocitoquímica com secções ultra-finas de estigmas de cardo, em que a marcação para a presença da cardosina A surgia não só

nos vacúolos mas também na superfície das papilas epidérmicas. Adicionalmente, os resultados obtidos com a cardosina A expressa em folhas *Nicotiana tabacum* revelaram a ocorrência de um rácio superior da forma de processamento com 35 kDa sobre a de 31 kDa (Figura II-44, setas a azul e preto) em extractos de folha, comparativamente com os de protoplastos e vacúolos, o que suportava a hipótese de secreção parcial desta PA.

Para averiguar se neste sistema de expressão heterólogo (*Nicotiana tabacum*), toda a cardosina A detectada em extractos de folha se localizava dentro das células ou se uma porção desta era secretada, procedeu-se ao isolamento de protoplastos a partir de folhas infiltradas e, com início 48 h após infiltração, foram-se colhendo as fracções celulares e de meio de cultura ao longo de um período de 29 h (Figura II-45).

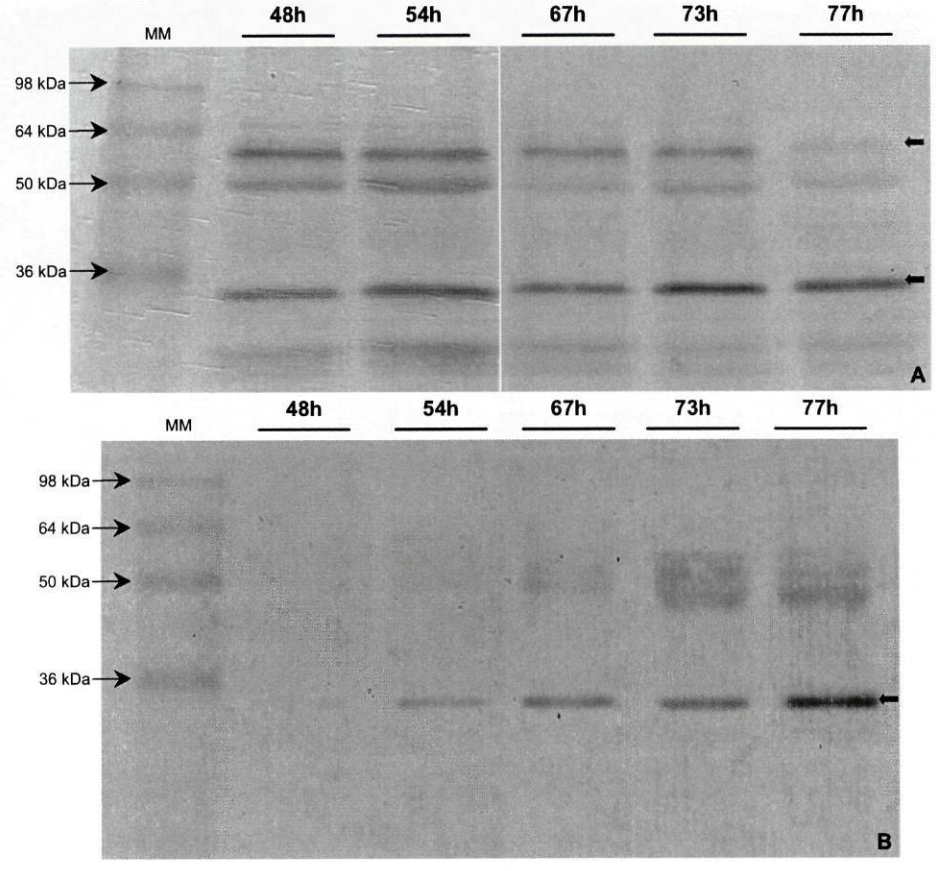



**Figura II-45 – Imunodetecção da cardosina A em protoplastos de folhas de *Nicotiana tabacum* e no seu meio de incubação.** As amostras foram colhidas nos tempos pós-infiltração assinalados na figura. A) Imunodetecção da cardosina A em protoplastos de *Nicotiana tabacum*. As formas precursora (seta a verde; 66 kDa) e intermédia (seta a azul; 35 kDa) da cardosina A foram detectadas em todos os tempo testados. B) Imunodetecção da cardosina A no meio de incubação dos protoplastos. É claramente visível a acumulação da forma intermédia da cardosina A (seta a azul; 35 kDa) no meio de cultura indicando que parte das moléculas de cardosina A sintetizadas neste sistema são efectivamente secretadas. (MM) marcador de pesos moleculares "SeeBlue® Plus2" (Invitrogen).

A análise da Figura II-45 revelou que 54 h após infiltração, a cardosina A surgia nas células (Figura II-45A) e no meio extracelular (Figura II-45B), indicando que uma porção do total da proteína sintetizada era de facto secretada. A observação 54 h pós-infiltração, de que a intensidade da banda de 35 kDa era muito superior na fracção celular do que no meio indica que a cardosina A detectada nesta fracção não tinha resultado da ruptura de protoplastos mas era realmente um produto de secreção.

A presença da forma de 35 kDa no meio indica que provavelmente é sob esta forma de processamento que a cardosina A é transportada para o apoplasto e que a secreção ocorre antes da sua conversão na forma madura. Esta observação é consistente com a hipótese do último evento de processamento da cardosina A acontecer num compartimento pós-Golgi ou seja, no vacúolo (Figura II-40, Figura II-41, Figura II-42 e Figura II-44, extractos vacuolares). Não pode também ser excluída a hipótese deste último passo de maturação ocorrer, pelo menos parcialmente, num compartimento pré-vacuolar.

Foi interessante constatar que, para iguais intervalos de tempo pós-infiltração, em extractos de folha (Figura II-46, 54-72h) era já possível observar a forma madura da cardosina A (Figura II-46, seta a preto), enquanto que em protoplastos esta ainda não estava presente. Esta observação levou-nos a considerar a possibilidade do transporte/processamento da cardosina A serem afectados pelo processo de isolamento de protoplastos.

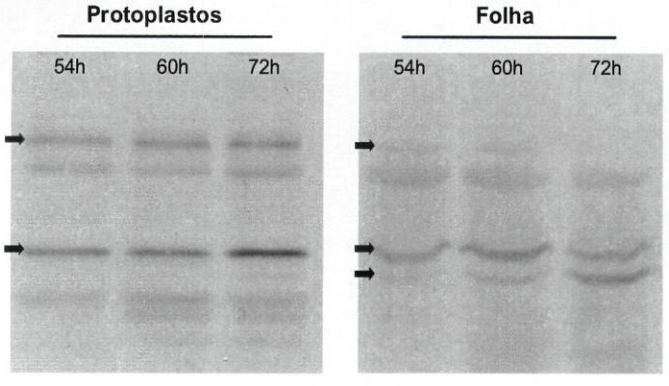



**Figura II-46 – Imunodetecção da cardosina A em extractos de protoplastos e de folhas de *Nicotiana tabacum* infiltradas com o constructo pVKH18EN6-CdA via *Agrobacterium*.** As amostras foram obtidas nos tempos pós-infiltração assinalados na figura. As setas a verde, azul e preto assinalam respectivamente as formas precursora (66 kDa), intermédia (35 kDa) e madura (31 kDa) da cardosina A.

Para testar esta hipótese, metade do tecido de folhas infiltradas foi sujeito a um método rápido de isolamento de protoplastos num ponto em que a forma de 66 kDa já deveria ter sido completamente convertida à forma intermédia ou madura (Figura II-29, 72h). Os extractos proteicos obtidos com os protoplastos isolados por este método foram comparados com extractos de tecido foliar infiltrado.

Os resultados obtidos (representados na Figura II-47) revelaram a presença das formas de 35 e 31 kDa no material foliar, enquanto no extracto obtido de protoplastos isolados por um método com tempos de digestão encurtados a forma madura da proteína era predominante. A alteração no procedimento de isolamento de protoplastos de folhas, passando de um tempo longo de digestão das paredes celulares (15–16h) para digestões curtas (4–5h) após infiltração da solução enzimática por vácuo), permitiu a formação/observação da forma madura nos protoplastos. Este resultado confirmou que o processo de isolamento de protoplastos não resulta na perda da forma madura da cardosina A, mas sugere que esta metodologia induz um retardamento do transporte e processamento

desta PA neste sistema. A utilização de longos períodos de digestão no processo de isolamento de protoplastos tem como efeito um retardamento dos processos metabólicos em geral, uma vez que os protoplastos direccionam muito do seu esforço energético para a produção de componentes da parede celular. Os nossos resultados sugerem que a expressão em protoplastos pode não ser o modelo mais adequado se o objectivo é estudar a velocidade/taxa de transporte/processamento de uma proteína em tempo real, visto que foi evidente que a cardosina A foi mais rápida e eficazmente processada *in planta* do que em protoplastos isolados.

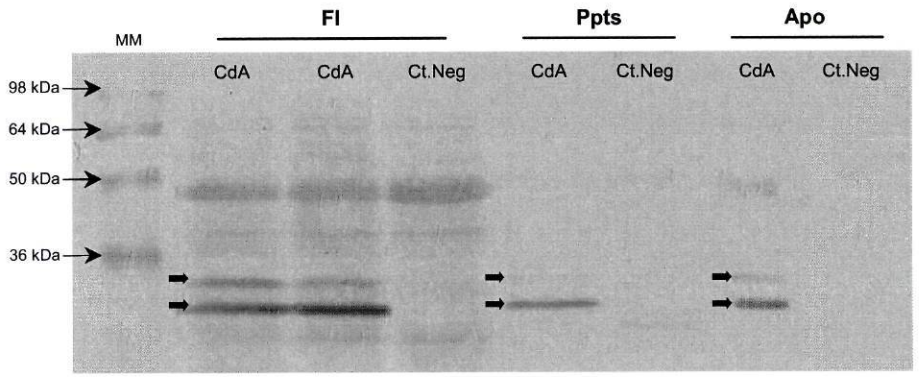



**Figura II-47 – Imunodetecção da cardosina A em extractos proteicos obtidos de folhas de *Nicotiana tabacum* transfectadas com pVKH18EN6-CdA (FI), em protoplastos (Ppts) e na fracção do apoplasto (Apo).** Resultados obtidos cerca de 68-70 h após infiltração. Foi possível detectar as formas de processamento intermédia (seta a azul; 35 kDa) e madura (seta a preto; 31 kDa) da cardosina A em todos os extractos testados. (MM) marcador de pesos moleculares "SeeBlue® Plus2" (Invitrogen).

Nesta experiências foi também analisada a fracção apoplástica das amostras e verificou-se que, também aqui, a forma madura da cardosina A estava presente (Figura II-47). Deste conjunto de observações foi possível concluir que grande parte da forma de 35 kDa detectada nas amostras de folhas cerca de 70 h após infiltração, tem na realidade uma localização apoplástica, tal como observado na Figura II-45B.

Não foi determinado sob que forma de processamento a cardosina A é secretada. De facto, tanto as formas de 35 como de 31 kDa estavam presentes na fracção do apoplasto sugerindo que o último evento de processamento da cardosina A tem lugar não só no vacúolo como no ambiente apoplástico (Figura II-47). As nossas observações indicam que muito provavelmente a cardosina A é secretada sob a forma de 35 kDa, hipótese suportada pela Figura II-45B, que depois sofre processamento pelas proteinases do apoplasto originando a forma madura. Esta última possibilidade pode também servir para justificar a ausência da forma de 31 kDa no sistema de protoplastos de *Nicotiana tabacum*, onde o último passo de maturação não teria lugar uma vez que o método de remoção das paredes celulares também elimina as proteinases normalmente presentes no apoplasto alegadamente responsáveis pela maturação final da cardosina A.

As principais conclusões retiradas do estudo do transporte e processamento da cardosina A em sistemas heterólogos são sumariadas em "Conclusões e Perspectivas".

# CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A integração dos dados anatómicos, ultra-estruturais, imunohistoquímicos e imunocitoquímicos obtidos neste trabalho, conjugada com a informação já disponível acerca das cardosinas, revelou que a cardosina A e a cardosina B estão diferentemente distribuídas nos órgãos do pistilo de cardo e que a expressão da cardosina A é regulada ao longo do desenvolvimento floral.

O estudo da expressão da cardosina A em cardo revelou que a transcrição activa do gene da cardosina A ocorre em estados imaturos do desenvolvimento floral, nomeadamente em pistilos jovens diferenciados. Nestes, a presença do mRNA da cardosina A está relacionada qualitativa e quantitativamente, com o tipo específico de órgão, sendo muito mais abundante nos estigmas do que nos estiletes e estando ausente do ovário. Em flores maduras, o mRNA da cardosina A não foi detectado em qualquer estrutura do pistilo.

Por sua vez, os resultados obtidos na imunodetecção da cardosina A, revelaram que esta não surge nos ápices florais e que é acumulada nos pistilos das flores, desde a fase de inflorescência fechada mais jovem até à fase de inflorescência madura. A cardosina A surge apenas em flores diferenciadas e em níveis mais elevados nas inflorescências abertas. A ausência do mRNA da cardosina A nas amostras de inflorescências maduras, indica a existência de um espaçamento temporal entre o pico de expressão do mRNA para a cardosina A e o pico de concentração do seu produto de tradução.

Relativamente à imunolocalização da cardosina A em flores de cardo, esta revelou que a proteína é maioritariamente acumulada nos vacúolos das papilas dos estigmas, enquanto no estilete e ovário predomina a cardosina B. Esta distribuição diferencial das cardosinas na flor de cardo sugere papéis fisiológicos distintos para estas enzimas.

Por um lado, a presença da cardosina A principalmente em inflorescências maduras aponta para a possível participação desta proteinase aspártica em distintos processos fisiológicos tais como fenómenos de reconhecimento/resposta moleculares relacionados com a fertilização, nomeadamente interacções pólen-pistilo (Faro, *et al.*, 1999), fenómenos de defesa contra patogénios/insectos (Faro, *et al.*, 1998) ou ainda a possível participação desta proteína em processos de senescência ou morte celular programada (Faro, *et al.*, 1998) - papéis previamente documentados para outras PAs de origem vegetal (Chen e Foolad, 1997, Runeberg-Roos e Saarma, 1998).

Por outro lado, os resultados obtidos neste trabalho revelaram a presença contínua da cardosina B ao longo do tecido de transmissão do estilete de cardo, passando pela região ventral da parede do ovário, pelo micrópilo e também na zona do nucelo do óvulo. Estas observações são muito interessantes e consistentes com a hipótese da cardosina B estar associada a interacções pólen-pistilo, a um nível do pistilo distinto do registado para a cardosina A, e que a actividade de cardosina B possa estar relacionada com a nutrição, atracção e orientação do tubo polínico até ao óvulo com o objectivo da fertilização.

Os resultados apresentados contribuíram com informação relevante para a elucidação do papel biológico da cardosina A em cardo em particular, e das proteinases aspárticas vegetais em geral.

Na segunda parte deste trabalho demonstrou-se que a cardosina A é correctamente direccionada para os vacúolos quando expressa em dois sistemas heterólogos: em plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* recorrendo a um sistema de expressão indutivo pela aplicação de um indutor químico, e na epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* recorrendo a um sistema de expressão transitória mediado por *Agrobacterium tumefaciens*.

Verificou-se que a cardosina A expressa nestes sistemas é eficientemente reconhecida, glicosilada e processada até à forma madura em ambos os sistemas testados.

Em transformantes estáveis de *Arabidopsis thaliana,* linhas pOp/LhGR, foi comprovada a expressão indutiva da cardosina A pela dexametasona. Neste sistema foi também demonstrada a existência de uma correlação entre a expressão do gene repórter GUS e da cardosina A, ambos presentes no constructo repórter. Ainda que a indução da transcrição bidireccional dos genes de GUS e da luciferase, clonados em direcções opostas no constructo repórter, tivesse já sido demonstrada neste sistema de expressão (Craft *et al.*, aceite para publicação no *Plant Journal*), as experiências com a cardosina A foram as primeiras a demonstrar a presença de um produto da expressão de um transgene de origem vegetal no sistema pOp/LhGR.

Numa perspectiva aplicada, porque em *Arabidopsis thaliana* a cardosina A é correctamente processada e direccionada para o vacúolo onde se acumula e é facilmente detectada, é de realçar a possibilidade desta proteína poder vir a tornar-se um válido marcador vacuolar neste sistema de expressão específico. No sentido de testar esta possibilidade foram já realizados cruzamentos entre plantas de linhas de *Arabidopsis* pOp/LhGR positivas para a expressão da cardosina A, já referidas neste trabalho, e plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* também do sistema indutivo pOp/LhGR, com capacidade de expressão de formas nativas e mutantes de Rab GTPases envolvidas em diferentes passos da via secretora. O objectivo será testar o efeito da presença de determinadas formas mutantes de Rab GTPases sobre o transporte/processamento da cardosina A.

Neste trabalho seguiu-se o processamento de uma isoforma única da cardosina A nos dois sistemas de expressão utilizados e os resultados obtidos revelaram a remoção do péptido sinal seguida por uma clivagem na região *N*-terminal do PSI e subsequente remoção do pro-segmento, gerando a forma madura da proteína com 31 kDa. Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram inequivocamente a sucessão de eventos de processamento para a cardosina A previamente inferida por Ramalho-Santos *et al.* com base em extractos de cardo (Ramalho-Santos, *et al.*, 1998).

O tratamento com endoH das amostras de proteínas de folhas de *Nicotiana tabacum* e de plântulas de *Arabidopsis* transformadas para sintetizarem cardosina A indicou que, de um modo semelhante ao que acontece no sistema homólogo, nestes sistemas de expressão a cardosina A é glicosilada com oligossacarídeos de natureza complexa. Estes resultados confirmam a passagem da cardosina A através do Golgi no seu trajecto biossintético.

No sistema de expressão transitória em *Nicotiana tabacum*, as experiências com os mutantes de efeito dominante negativo de distintas GTPases envolvidas no transporte entre RE e Golgi comprovaram que a interferência com a actividade normal destas proteínas induz a acumulação da forma precursora da cardosina A, sensível à acção da endoH e localizada no RE.

Um tipo de transporte/processamento da cardosina A dependente da actividade normal das RabD1, RabD2a e Sar1 sugere uma exportação da cardosina A a nível do RE em vesículas com revestimento COPII, seguido da fusão destas vesículas com o *cis*-Golgi e um posterior transporte da cardosina A através dos compartimentos do Golgi.

Também em *Nicotiana tabacum*, as experiências de *pulse-chase* na presença de BFA excluíram a possibilidade de uma porção da totalidade da cardosina A expressa neste sistema ser directamente transportada do RE para o vacúolo, comprovando que a inibição do transporte entre RE e Golgi impede a conversão/processamento da pro-cardosina A até à forma intermédia.

Em *Nicotiana tabacum*, a análise das proteínas presentes nas fracções apolástica, protoplasmática e vacuolar de folhas infiltradas via *Agrobacterium* com o constructo para a expressão transitória da cardosina A, revelou que a maior parte da cardosina A presente no meio intracelular se localiza nos vacúolos onde se acumula estavelmente.

Adicionalmente, o isolamento de vacúolos de células de plântulas transgénicas de *Arabidopsis* e de folhas de *Nicotiana tabacum*, ambas com capacidade de expressão, indutiva ou transitória, da cardosina A, evidenciaram a presença das formas de processamento intermédia e madura da cardosina A no vacúolo indicando que o último passo de maturação da enzima ocorre neste compartimento subcelular.

A presença da cardosina A na fracção apoplástica de folhas de *Nicotiana tabacum* confirmou que uma porção da cardosina A sintetizada neste sistema é secretada. Não foi testada a possível secreção desta enzima sintetizada em *Arabidopsis*.

A detecção das formas de processamento intermédia e madura da cardosina A no apoplasto de folhas infiltradas de *Nicotiana tabacum* sugere que a maturação desta proteinase aspártica é também completada no ambiente extracelular, possivelmente por acção das proteinases aí presentes.

Ainda em *Nicotiana tabacum*, a ausência da pro-cardosina A nos extractos de apoplasto indica que não é sob esta forma de processamento que a cardosina A é secretada. Pelo

contrário, a presença da forma intermédia de processamento da cardosina A tanto no meio de incubação dos protoplastos de *Nicotiana tabacum* como na fracção apoplástica das folhas sugere que é na forma de 35 kDa que a cardosina A é secretada, provavelmente depois da passagem desta pelo Golgi.

Neste trabalho ficou ainda demonstrada a existência de uma limitação no uso do sistema de expressão baseado na transformação de protoplastos para o estudo do transporte e processamento de proteínas em tempo real. Os nossos resultados revelaram que a expressão em protoplastos parece não constituir o modelo mais adequado se o objectivo é estudar a velocidade/taxa de transporte/processamento de uma proteína em tempo real, visto que foi evidente que a cardosina A é mais rápida e eficazmente processada em folhas não destacadas das plantas de tabaco do que em protoplastos isolados.

Este trabalho serviu para a elucidação da sucessão de eventos de processamento sofridos pela cardosina A expressa em sistemas heterólogos, contribuindo com novos dados para o entendimento dos processos de maturação associados à conversão de zimogénios de PAs em enzimas proteoliticamente activas. Adicionalmente, os resultados obtidos com a expressão da cardosina A em *Nicotiana* e *Arabidopsis* revelaram parte do trajecto intracelular seguido por esta PA até ao vacúolo, trazendo novos dados à problemática relacionada com a caracterização dos mecanismos de direccionamento de proteínas para os vacúolos em plantas. De salientar que as cardosinas A e B podem vir a constituir óptimos modelos para o estudo da via secretora e dos sinais de endereçamento para os vacúolos em plantas, já que estas PAs, apesar de apresentarem um elevado grau de homologia na sua sequência, possuem localizações subcelulares completamente distintas.

Por fim, sobressai a possibilidade da cardosina A, que mostrou ser bastante estável nos vacúolos de *Arabidopsis* e de *Nicotiana*, poder vir a tornar-se uma ferramenta útil de trabalho para estudos dos mecanismos associados ao transporte e direccionamento intracelular de proteínas para o vacúolo, ou da via secretora em geral, funcionando como um marcador vacuolar válido nos sistemas heterólogos testados e possivelmente em outros modelos.

Em termos de perspectivas futuras para este trabalho surgem diversas linhas para a continuação do projecto aqui iniciado.

Em relação à primeira parte do trabalho seria interessante averiguar se as cardosinas, A e B, são expressas em fases mais iniciais do desenvolvimento da planta, nomeadamente durante a germinação da semente. Foi já documentada a presença de diversas PAs isoladas de outras espécies vegetais em sementes em fase de germinação, sugerindo um papel activo destas enzimas na hidrólise de proteínas de armazenamento para mobilização

de nutrientes para o embrião em crescimento (Belozersky, *et al.*, 1989, Doi, *et al.*, 1980, Laloi, *et al.*, 2002, Runeberg-Roos, *et al.*, 1994).

Seria também do maior interesse proceder a experiências de expressão da cardosina A em protoplastos de cardo para confirmar os resultados obtidos com a expressão desta PA nos sistemas heterólogos testados neste trabalho.

Relativamente à segunda parte desta investigação, seria interessante utilizar em ensaios de imunocitoquímica secções de folhas de plântulas de linhas de *Arabidopsis thaliana* pOp/LhGR positivas para a expressão da cardosina A, de modo a proceder à imunolocalização da cardosina A nestes órgãos e tentar assim caracterizar o tipo de vacúolos onde a cardosina A se localiza, recorrendo a anticorpos contra diferentes isoformas de TIPs: α-TIP para vacúolos de armazenamento e γ-TIP para vacúolos do tipo vegetativo (Jauh, *et al.*, 1999, Park, *et al.*, 2004).

Muito importante e interessante seria a caracterização da via de transporte pós-Golgi seguida pela cardosina A até ao vacúolo.

Nas plantas há três tipos de sinais de endereçamento para os vacúolos ou *vacuolar sorting determinants* (VSD) responsáveis pelo direccionamento de proteínas solúveis para os compartimentos vacuolares: *sequence specific* VSD (ssVSD) (Holwerda, *et al.*, 1992, Matsuoka e Nakamura, 1991, Neuhaus e Rogers, 1998), *C*-terminal VSD (ct-VSD) (Dombrowski, *et al.*, 1993, Melchers, *et al.*, 1993, Neuhaus e Rogers, 1998) e um terceiro tipo *physical structure* VSD (psVSD), o mais complicado de caracterizar, que se localiza na região interna da proteína e que em muitos casos é provável que corresponda à própria estrutura tridimensional da proteína (Chrispeels e Raikhel, 1992, Nakamura e Matsuoka, 1993, Neuhaus e Rogers, 1998). Estes três tipos de VSDs direccionam as proteínas para duas vias de transporte do Golgi até ao vacúolo. Uma das vias é mediada por vesículas com revestimento de clatrina que possuem receptores da família BP-80 e que direccionam proteínas com ssVSD para os vacúolos do tipo lítico. A outra envolve o transporte de proteínas com ct-VSD em vesículas densas para os vacúolos de armazenamento de proteínas e para a qual até à data não existem receptores identificados.

Destas duas vias possíveis de transporte para os vacúolos desde o Golgi, apenas a que envolve o transporte em vesículas densas é inibido pela droga wortmanina. Para a cardosina A, como foi já discutido, é provável que o sinal de endereçamento que determina o seu transporte para o vacúolo esteja contido no PSI à semelhança do que acontece com a PA de cevada, fitepsina (Tormakangas, *et al.*, 2001). Seria portanto do maior interesse averiguar se a wortmanina teria um efeito inibitório sobre o transporte, e possivelmente sobre o último evento de processamento da cardosina A.

Relativamente ao transporte por vesículas contendo receptor BP-80, Pimpl *et al.* provaram o envolvimento da GTPase Arf1 na via de transporte para o vacúolo mediada por

receptores tipo BP-80 utilizando uma Arf1 mutante [Q71L] e recorrendo à PA fitepsina como marcador vacuolar (Pimpl, *et al.*, 2003). Neste contexto seria interessante realizar experiências de co-expressão da Arf1[QL] e da cardosina A, por exemplo no sistema de expressão transitória em epiderme foliar de *Nicotiana tabacum*, e verificar o efeito desta sobre o transporte e maturação da cardosina A.

A importância dos *N*-glicanos para o correcto endereçamento de proteínas vacuolares em plantas é fonte de debate. Desta perspectiva seria interessante averiguar se os *N*-glicanos presentes à superfície da cardosina A têm alguma relevância para o direccionamento desta PA para o compartimento subcelular correcto. Tecnicamente, esta abordagem recorreria ao uso do inibidor de *N*-glicosilação tunicamicina, seguida da investigação do destino subcelular da versão não glicosilada da cardosina A.

Por fim, à semelhança do que está publicado para a fitepsina, seria interessante gerar uma versão truncada da cardosina A, Δ-PSI, e verificar se esta forma da proteína seria correctamente direccionada para o vacúolo ou não. A geração de fusões das regiões *N*- e *C*-terminal da cardosina A com o PSI da cardosina B, e vice-versa, poderia também fornecer informação relevante acerca da localização do sinal de endereçamento da cardosina A. Alternativa e adicionalmente, poderiam ser geradas fusões de diferentes regiões da cardosina A, como o PSI ou a sequência *C*-terminal semelhante ao ct-VSD da lectina, com marcadores como a RFP (*Red fluorescent protein*) por forma a verificar qual o seu destino subcelular recorrendo por exemplo a microscopia confocal.

# BIBLIOGRAFIA


Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Walter, P. (2002) Molecular Biology of the Cell, Garland Science Publishing, New York.

An, C., Fukusaki, E. e Kobayashi, A. (2002) *Planta* **214,** 661-667.

An, C., Takekawa, S., Okazawa, A., Fukusaki, E. e Kobayashi, A. (2002) *Planta* **215,** 472-477.

Andreeva, A., Zheng, H., Saint-Jore, C., Kutuzov, M., Evans, D. e Hawes, C. (2000) *Biochemical Society Transactions* **28,** 505-512.

Aridor, M., Weissman, J., Bannykh, S., Nuoffer, C. e Balch, W. (1998) *Journal of Cell Biology* **141,** 61-70.

Asakura, T., Matsumoto, I., Funaki, J., Arai, S. e Abe, K. (2000) *European Journal of Biochemistry* **267,** 5115-5122.

Barlowe, C. (2002) *Current Opinion in Cell Biology* **14,** 417-422.

Barlowe, C. (2003) *Trends in Cell Biology* **13,** 295-300.

Barlowe, C., d'Enfert, C. e Schekman, R. (1993) *The Journal of Biological Chemistry* **268,** 873-879.

Barros, R. e Malcata, F. (2002) *Journal of Agricultural Food and Chemistry* **50 4347-56,** 4347-4356.

Bassham, D. e Raikhel, N. (2000) *Current Opinion in Cell Biology* **12,** 491 - 495.

Batoko, H., Zheng, H., Hawes, C. e Moore, I. (2000) *The Plant Cell* **12,** 2201 - 2218.

Bednarek, S., Wilkins, T., Dombrowski, J. e Raikhel, N. (1990) *The Plant Cell* **2,** 1145-1155.

Belozersky, M.A., Sarbakanova, S.T. e Dunaevsky, Y.E. (1989) *Planta* **177,** 321-326.

Birnboim, H.C. e Doly, J. (1979) *Nucleic Acids Research* **7,** 1513-1523.

Boevink, P., Oparka, K., Cruz, S.S., Martin, B., Beterridge, M. e Hawes, C. (1998) *The Plant Journal* **15,** 441-447.

Boevink, P., SantaCruz, S., Hawes, C., Harris, N. e Oparka, K. (1996) *The Plant Journal* **10,** 935-941.

Bradford, M. (1976) *Annalytical Biochemistry* **72,** 248-254.

Brandizzi, F., Snapp, E., Roberts, A., Lippincott-Schwartz, J. e Hawes, C. (2002) *The Plant Cell* **14,** 1293-1309.

Burnette, W. (1981) **112,** 195-203.

Bursavich, M. e Rich, D. (2002) *Journal of Medicinal Chemistry* **45,** 541-558.

Cataldo, A. e Nixon, R. (1990) *Proceedings of National Academy of Sciences* **87,** 3861-3865.

Cavailles, V., Augereau, P. e Rochefort, H. (1993) *Proceedings of National Academy of Sciences* **90,** 203-207.

Chen, F. e Foolad, M. (1997) *Plant Molecular Biology* **35,** 821-831.

Cheung, A., Chen, C., Glaven, R., de Graaf, B., Vidali, L., Hepler, P. e Wu, H. (2002) *The Plant Cell* **14,** 945-962.

Chrispeels, M. e Raikhel, N. (1992) *Cell* **68,** 613 - 616.

Clough, S. e Bent, A. (1998) *The Plant Journal* **16,** 735-743.

Costa, J., Ashford, D., Nimtz, M., Bento, I., Frazão, C., Esteves, C., Faro, C., Kervinen, J., Pires, E., Veríssimo, P., Wlodawer, A. e Carrondo, M. (1997) *European Journal of Biochemistry* **243,** 695-700.

Coutinho, A. (1913) A Flora de Portugal., Aillaud, Alves & Companhia, Lisboa.

Crofts, A. e Denecke, J. (1998) *Trends in Plant Science* **3,** 396 - 399.

Crofts, A., Leborgne-Castel, N., Hillmer, S., Robinson, D., Phillipson, B., Carlsson, L., Ashford, D. e J, D. (1999) *The Plant Cell* **11,** 2233-2247.

Denecke, J. e Vitale, A. (1995) *in* Methods in Cell Biology, Vol 50, Vol. 50, pp. 335-348.

D'Hondt, K., Bosch, D., Van Damme, J., Goethals, M., Vandekerckhove, J. e Krebbers, E. (1993) *Journal of Biological Chemistry* **268,** 20884-20891.

Di Sansebastiano, G., Paris, N., Marc-martin, S. e Neuhaus, J. (1998) *The Plant Journal* **15,** 449-457.

Di Sansebastiano, G., Paris, N., Marc-Martin, S. e Neuhaus, J. (2001) *Plant Physiology* **126,** 78-86.

Doi, E., Shibata, D., Matoba, T. e Yonezawa, D. (1980) *Agricultural and Biological Chemistry* **44,** 741-747.

Dombrowski, J., Schroeder, M., Bednarek, S. e Raikhel, N. (1993) *The Plant Cell* **5,** 587-59.

Dunn, B. (2002) *Chemical Reviews* **102,** 4431-4458.

Dupree, P. e Sherrier, D. (1998) *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1404,** 259-270.

Egas, C., Lavoura, N., Resende, R., Brito, R., Pires, E., Lima, M. e Faro, C. (2000) *The Journal of Biological Chemistry* **275,** 38190 - 38196.

Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad del Zulia [Web], Z., Venezuela., cited 2004: Fundamentos para la elaboración de quesos. [Available online from http://members.tripod.com.ve/tecnologia/queso.htm.]

Faculty of Agricultural Sciences - University of British Columbia [Web], V., Canada., cited 2004: *Cynara cardunculus*. [Available online from http://www.ubcbotanicalgarden.org/education/cynara.php.]

Faro, C., Moir, A. e Pires, E. (1992) *Biotechnology Letters* **14,** 841-847.

Faro, C., Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Pissarra, J., Frazão, C., Costa, J., Lin, X., Tang, J. e Pires, E. (1998) *Aspartic Proteinases*.

Faro, C., Ramalho-Santos, M., Vieira, M., Mendes, A., Simões, I., Andrade, R., Veríssimo, P., Lin, X., Tang, J. e Pires, E. (1999) *The Journal of Biological Chemistry* **274,** 28724-28729.

Franco, J. (1984) Nova Flora de Portugal (Continente e Açores), Soc. Astória, Lda., Lisboa.

Frazão, C., Bento, I., Costa, J., Soares, C., Veríssimo, P., Faro, F., Pires, E., Cooper, J. e Carrondo, M. (1999) *The Journal of Biological Chemistry* **274,** 27694 - 27701.

Freire, A. (1997) *in* Bioquímica (Halpern, M., Ed.), pp. 233-240, Lidel, Edições Técnicas, Lisboa.

Frohman, M., Dush, M. e Martin, G. (1988) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85,** 8998-9002.

Fruton, J. (2002) *Quarterly Review of Biology* **77,** 127-147.

Glathe, S., Kervinen, J., Nimtz, M., Li, G., Tobin, G., Copeland, T., Ashford, D., Wlodawer, A. e Costa, J. (1998) *The Journal of Biological Chemistry* **273,** 31230-31236.

Gomez, L. e Chrispeels, M. (1993) *Plant Cell* **5,** 1113-1124.

Hadlington, J. e Denecke, J. (2000) *Current Opinion in Plant Biology* **3,** 461 - 468.

Hadlington, J. e Denecke, J. (2001) *in* Plant Cell Biology: A Practical Approach (Hawes, C. e Satiat-Jeunemaitre, B., Eds.), pp. 107–126, Oxford University Press, Oxford.

Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Hatano, K., Takeuchi, Y. e Nishimura, M. (1998) *The Plant Cell* **10,** 825 - 836.

Hellens, R., Edwards, E., Leyland, N., Bean, S. e Mullineaux, P. (2000) *Plant Molecular Biology* **42,** 819-832.

Hillmer, S., Movafeghi, A., Robinson, D. e Hinz, G. (2001) *Journal of Cell Biology* **152,** 41-50.

Hoh, B., Hinz, G., Jeong, B. e Robinson, D. (1995) *Journal of Cell Science* **108,** 299-310.

Holmes, D.S. e Quigley, M. (1981) *Analytical Biochemistry* **114,** 193-197.

Holwerda, B., Padgett, H. e Rogers, J. (1992) *The Plant Cell* **4,** 307-318.

Humair, D., Felipe, D., Neuhaus, J. e Paris, N. (2001) *Plant Cell* **13,** 781-792.

Infante, C., Ramos-Morales, F., Fedriani, C., Bornens, M. e Rios, R. (1999) *Journal of Cell Biology* **145,** 83–98.

Interactive European Network for Industrial Crops and their Applications [Web] cited 2004: Cardoon. [Available online from http://www.ienica.net/crops/cardoon.htm.]

Irons, S., Evans, D. e Brandizzi, F. (2003) *Journal of Experimental Botany* **54,** 943-50.

IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature [Web] cited 2004: Biochemical Nomenclature Committees. [Available online from http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/jcbn/.]

Jauh, G., Fischer, A., Grimes, H., Ryan, C. e Rogers, J. (1998) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95,** 12995-12999.

Jauh, G., Phillips, T. e Rogers, J. (1999) *The Plant Cell* **11,** 1867 - 1882.

Jefferson, R. (1987) *Plant Molecular Biology Reporter* **5,** 387-405.

Jiang, L. e Rogers, J. (1999) *The Plant Cell* **11,** 2069-2071.

Johnson, K.D., Herman, E.M. e Chrispeels, M.J. (1989) *Plant Physiology* **91,** 1006-1013.

Kervinen, J., Tobin, G., Costa, J., Waugh, D., Wlodawer, A. e Zdanov, A. (1999) *The EMBO Journal* **18,** 3947-3955.

Khan, A. e James, M. (1998) *Protein Science* **7,** 815-836.

Kim, W., Hatsuzawa, K., Ishizuka, Y., Hashiba, K., Murakami, K. e Nakayama, K. (1990) *Journal of Biological Chemistry* **265,** 5930-5933.

Kirchhausen, T. (2000) *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1,** 187-198.

Kirsch, T., Paris, N., Butler, J., Beevers, L. e Rogers, J. (1994) *Proceedings of National Academy of Sciences* **91,** 3403-3407.

Koelsch, G., Mares, M., Metcalf, P. e Fusek, M. (1994) *FEBS Letters* **343,** 6-10.

Koncz, C. e Schell, J. (1986) *Molecular and General Genetics* **204,** 383-396.

Kozak, M. (1984) *Nucleic Acids Research* **12,** 857-872.

Krausslich, H. e Wimmer, E. (1988) *Annual Review of Biochemistry* **57,** 701-754.

Kuehn, M., Herrmann, J. e Schekman, R. (1998) *Nature* **391,** 187-90.

Laemmli, U. (1970) *Nature* **277,** 680-685.

Laloi, M., McCarthy, J., Morandi, O., Gysler, C. e Bucheli, P. (2002) *Planta* **215,** 754-762.

Lazure, C. (2002) *Current Pharmaceutical Design* **8,** 511-531.

Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Laine, A., Gomord, V. e Faye, L. (1998) *Plant Molecular Biology* **38,** 31-48.

Levanony, H., Rubin, R., Altschuler, Y. e Galili, G. (1992) *The Journal of Cell Biology* **119,** 1117-1128.

Marty, F. (1999) *The Plant Cell* **11,** 587 - 599.

Matsuoka, K. (2000) *The Plant Cell* **12,** 181-182.

Matsuoka, K., Bassham, D., Raikhel, N. e Nakamura, K. (1995) *Journal of Cell Biology* **130,** 1307-1318.

Matsuoka, K. e Bednarek, S. (1998) *Current Opinion in Plant Biology* **1,** 463-469.

Matsuoka, K. e Nakamura, K. (1991) *Proceedings of National Academy of Sciences* **88,** 834-838.

Matsuoka, K., Watanabe, N. e Nakamura, K. (1995) *The Plant Journal* **8,** 877-889.

McKeever, B., Navia, M., Fitzgerald, P., Springer, J., Leu, C., Heimbach, J., Herbert, W., Sigal, I. e Darke, P. (1989) *Journal of Biological Chemistry* **264,** 1919-1921.

Melchers, L., Sela-Buurlage, M., Vloemans, S., Woloshuk, C., Van Roekel, J., Pen, J., van den Elzen, P. e Cornelissen, B. (1993) *Plant Molecular Biology* **21,** 583-593.

Michael Silveus [Web] cited 2004: Cynara cardunculus. [Available online from http://www.michaelsilveus.com/Herbs/CynaraCardunculus.html.]

Miller, E. e Anderson, M. (1999) *The Plant Cell* **11,** 2071-2073.

Miller, E., Beilharz, T., Malkus, P., Lee, M., Hamamoto, S., Orci, L. e Schekman, R. (2003) *Cell* **114,** 497-509.

Mitsuhara, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose, Y., Nakamura, S., Honkura, R., Nishimiya, S., Ueno, K., Mochizuki, A., Tanimoto, H., Tsugawa, H., Otsuki, Y. e Ohashi, Y. (1996) *Plant and Cell Physiology* **37,** 49-59.

Mitsuhashi, N., Hayashi, Y., Koumoto, Y., Shimada, T., Fukasawa-Akada, T., Nishimura, M. e Hara-Nishimura, I. (2001) *Plant Cell* **13,** 2361-2372.

Monroe, J., Gough, C., Chandler, L., Loch, C., Ferrante, J. e Wright, P. (1999) *Plant Physiology* **119,** 385-397.

Moore, I., Galweiler, L., Grosskopf, D., Schell, J. e Palme, K. (1998) *Proceedings of National Academy of Sciences* **95,** 376-381.

Mutlu, A. e Gal, S. (1999) *Physiologia Plantarum* **105,** 569-576.

Mutlu, A., Pfeil, J. e Gal, S. (1998) *Phytochemistry* **47,** 1453-1459.

Nakamura, K. e Matsuoka, K. (1993) *Plant Physiology* **101,** 1-5.

Nebenfuhr, A. (2002) *Current Opinion in Plant Biology* **5,** 507-512.

Nebenfuhr, A., Gallagher, L., Dunahay, T., Frohlick, J., Mazurkiewicz, A., Meehl, J. e Staehelin, L. (1999) *Plant Physiology* **121,** 1127 - 1142.

Nebenfuhr, A., Ritzenthaler, C. e Robinson, D. (2002) *Plant Physiology* **130,** 1102-1108.

Neuhaus, J. e Rogers, J. (1998) *Plant Molecular Biology* **38,** 127 - 144.

Neumann, U., Brandizzi, F. e Hawes, C. (2003) *Annals of Botany* **92,** 167-180.

Pais, M.S. e Barroso, J.M. (1999) *in* Biologia Celular e Molecular (Azevedo, C., Ed.), pp. 445-459, Lidel - Edições Técnicas, Lisboa.

Paris, N. e Neuhaus, J. (2002) *Plant Molecular Biology* **50,** 903-914.

Paris, N., Stanley, C., Jones, R. e Rogers, J. (1996) *Cell* **85,** 563 - 572.

Park, M., Kim, S., Vitale, A. e Hwang, I. (2004) *Plant Physiology* **134,** 625-639.

Payie, K., Tanaka, T., Gal, S. e Yada, R. (2003) *Biochemical Journal* **372,** 671-678.

Pimpl, P., Hanton, S., Taylor, J., Pinto-da Silva, L. e Denecke, J. (2003) *The Plant Cell* **15,** 1242-1256.

Pimpl, P., Movafeghi, A., Coughlan, S., Denecke, J., Hillmer, S. e Robinson, D. (2000) *Plant Cell* **12,** 2219-2235.

Ponting, C. e Russell, R. (1995) *Trends in Biochemical Sciences* **20,** 179-180.

Ramalho-Santos, M., Pissarra, J., Pires, E. e Faro, C. (1998) *Advances in Experimental Medical Biology* **436,** 253-258.

Ramalho-Santos, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Pereira, S., Salema, R., Pires, E. e Faro, C. (1997) *Planta* **203,** 204-212.

Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Cortes, L., Samyn, B., Van Beeumen, J. e Pires, E. (1998) *European Journal of Biochemistry / FEBS* **255,** 133-138.

Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Faro, C. e Pires, E. (1996) *Biochimica et Biophysica Acta* **1297,** 83-89.

Rawlings ND Tolle DP Barrett AJ [Web] cited 2004: MEROPS - the Peptidase Database. [Available online from http://merops.sanger.ac.uk/.]

Rayon, C., Lerouge, P. e Faye, L. (1998) *Journal of Experimental Botany* **49,** 1463-1472.

Reisen, D., Loborgne-Castel, N., Ozalp, C., Chaumont, F. e Marty, F. (2003) *Plant Molecular Biology* **52,** 387-400.

Ritzenthaler, C., Nebenführ, A., Movafeghi, A., Stussi-Garaud, C., Behnia, L., Pimpl, P., Staehelin, L. e Robinson, D. (2002) *The Plant Cell* **14,** 237-261.

Robinson, D., Baumer, M., Hinz, G. e Hohl, I. (1998) *Journal of Plant Physiology* **152,** 659-667.

Robinson, D., Hinz, G. e Holstein, S. (1998) *Plant Molecular Biology* **38,** 49 - 76.

Rodrigo, I., Vera, P. e Conejero, V. (1989) *European Journal of Biochemistry* **184,** 663-669.

Roseiro, L., Barbosa, M., Ames, J. e Wilbey, R. (2003) *International Journal of Dairy Technology* **56,** 76-85.

Roseiro, L., Barbosa, M., Ames, J. e Wilbey, R. (2003) *International Journal of Dairy Technology* **56,** 76-85.

Rottenberg, A. e Zohary, D. (1996) *Genetic Resources and Crop Evolution* **43,** 53-58.

Runeberg-Roos, P., Kervinen, J., Kovaleva, V., Raikhel, N. e Gal, S. (1994) *Plant Physiology* **105,** 321-329.

Runeberg-Roos, P. e Saarma, M. (1998) *The Plant Journal* **15,** 139-145.

Rutherford, S. e Moore, I. (2002) *Current Opinion in Plant Biology* **5,** 518-528.

Saint-Jore, C., Evins, J., Batoko, H., Brandizzi, F., Moore, I. e Hawes, C. (2002) *The Plant Journal* **29,** 661-678.

Salema, R. e Brandão, I. (1973) *Journal of Submicroscopic Cytology* **5,** 79-96.

Sambrook, J., Fritsch, E. e Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York.

Sanderfoot, A., Assaad, F. e Raikhel, N. (2000) *Plant Physiology* **124,** 1558-1569.

Shen, W. e Forde, B. (1989) *Nucleic Acids Research* **17,** 8385.

Shibata, M., Masato, K., Satoshi, W., Zhang, G., Koga, T. e Uchiyama, Y. (2002) *FEBS Letters* **517,** 281-284.

Simoes, I. e Faro, C. (2004) *European Journal of Biochemistry* **271,** 2067-2075.

Sparvoli, F., Faoro, F., Daminati, M., Ceriotti, A. e Bollini, R. (2000) *The Plant Journal* **24,** 825 - 836.

Staehelin, L. e Moore, I. (1995) *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46,** 261-288.

Takeuchi, M., Ueda, T., Sato, K., Abe, H., Nagata, H. e Nakano, A. (2000) *The Plant Journal* **23,** 517 - 525.

Tang, J., James, M., Hsu, I., Jenkins, J. e Blundell, T. (1978) *Nature* **271,** 618-621.

Topfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J. e Steinbiss, H. (1987) *Nucleic Acids Research* **15,** 5890.

Tormakangas, K., Hadlington, J., Pimpl, P., Hillmer, S., Brandizzi, F., Teeri, T. e Denecke, J. (2001) *The Plant Cell* **13,** 2021-2032.

Toyooka, K., Okamoto, T. e Minamikawa, T. (2000) *Journal of Cell Biology* **148,** 453-463.

Tutin, T., Heywood, V., Burges, N., Moore, D., Valentine, D., Walters, S. e Weeb, D. (1976) Flora Europaea, Cambridge University Press, Cambridge.

Ueda, T. e Nakano, A. (2002) *Current Opinion in Plant Biology* **5,** 513-517.

Veríssimo, P., Faro, C., Moir, A., Lin, Y., Tang, J. e Pires, E. (1996) *European Journal of Biochemistry / FEBS* **235,** 762-768.

Veríssimo, P., Ramalho-Santos, M., Faro, C. e Pires, E. (1998) *Advances in Experimental Medical Biology* **436,** 459-463.

Vesta Pharmaceuticals, I.W., cited 2004: Cynarin - the next important nutriceutical for research and industry. [Available online from http://www.vestapharm.com/cynarin.html.]

Vieira, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Castanheira, P., Costa, Y., Pires, E. e Faro, C. (2001) *Plant Molecular Biology* **45,** 529 - 539.

Vitale, A. e Denecke, J. (1999) *The Plant Cell* **11,** 615 - 628.

Vitale, A. e Raikhel, N. (1999) *Trends in Plant Science* **4,** 149 - 155.

White, P., Cordeiro, M., Arnold, D., Brodelius, P. e Kay, J. (1999) *The Journal of Biological Chemistry* **274,** 16685-16693.

Wieland, F. e Harter, C. (1999) *Current Opinion in Cell Biology* **11,** 440-446.

Wyatt, D. e Berry, C. (2002) *FEBS Letters* **513,** 159-162.

Yamada, K., Shimada, T., Kondo, M., Nishimura, M. e Hara-Nishimura, I. (1999) *Journal of Biological Chemistry* **274,** 2563-2570.

Zheng, H.Q., Wang, G.L. e Zhang, L. (1997) *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10,** 1010-1014.