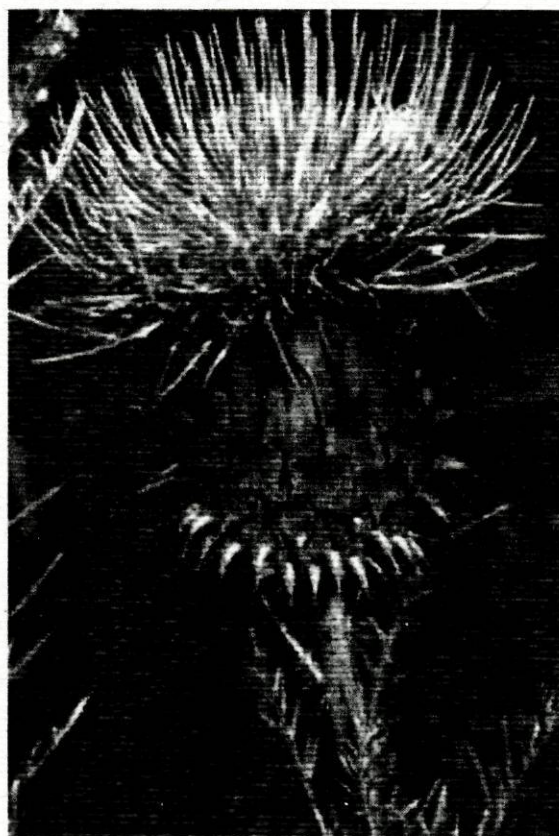


PROTEINASES ASPÁRTICAS EM FLORES DE *CYNARA HUMILIS*:

ESTUDOS DE EXPRESSÃO DURANTE O DESENVOLVIMENTO FLORAL



FC Faculdade de Ciências da Universidade do Porto,
Departamento de Botânica

2002

Américo José da Silva Martins Sousa

PROTEINASES ASPÁRTICAS EM FLORES DE *CYNARA HUMILIS*:
ESTUDOS DE EXPRESSÃO DURANTE O DESENVOLVIMENTO FLORAL

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências da Universidade do Porto para
obtenção do grau de Mestre em Biologia do
Desenvolvimento e Reprodução Vegetal

2002

"No matter. Try again. Fail again. Fail better."

Samuel Beckett

escritor irlandés (1906-1989)

ÍNDICE

Agradecimentos.....	v
Lista de abreviaturas.....	vi
Abreviaturas dos aminoácidos.....	viii
Lista de imagens.....	ix
Lista de tabelas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	1
1.1 Descrição da espécie.....	1
1.2 Classificação e diversidade das peptidases.....	3
1.3 Proteinases aspárticas.....	5
1.3.1 Proteinases vegetais.....	8
1.3.2 As cardosinas.....	13
1.3.3 A proteinase aspártica de <i>Cynara humilis</i>	16
2. Objectivo do estudo.....	18
3. Material e métodos.....	19
3.1 Material biológico.....	19
3.2 Estudos estruturais em microscopia.....	19
3.3 Estudos de imunolocalização.....	20

3.4 Análise RT-PCR	22
3.5 Extração de proteínas.....	22
3.6 Coloração por “Silver staining”	23
3.7 Análise por “Western blotting”	24
4. Resultados e discussão.....	25
4.1 Morfologia geral do pistilo de <i>C. humilis</i>	25
4.2 Imunolocalização da ChAP no pistilo.....	34
4.3 Expressão do mRNA da ChAP durante o desenvolvimento floral.....	45
4.4 Acumulação da ChAP ao longo do desenvolvimento floral	47
5. Conclusão e perspectivas futuras.....	49
6. Bibliografia.....	53

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor José Pissarra, meu orientador, pelo acolhimento no seu grupo de trabalho e por me ter proporcionado as condições necessárias para o desenvolvimento do projecto. Agradeço-lhe também, o acompanhamento sistemático, o encorajamento e a amizade demonstrada.

À Professora Doutora Susana Pereira pela disponibilidade e pela atenção que dedicou na resolução de alguns problemas que foram surgindo, nomeadamente nas áreas da Biologia molecular e Bioquímica.

À Patrícia Duarte, minha guia científica e minha colega no estudo dos cardos, o meu agradecimento pelo modo como me apoiou, principalmente, na fase inicial deste projecto.

Ao Jorge Teixeira, ou devo dizer, Doutor Jorge Teixeira, meu colega de curso, pela sua presença e disponibilidade para ajudar um “aprendiz” de investigador com novas pistas e explicações.

À Natália Correia pela solidariedade nos fins-de-semana à volta dos westem. Foram muitos e às vezes os resultados recusavam-se a aparecer, mas “o trabalho científico tem 99% de transpiração e só 1% de inspiração”.

À Liliana Osório por ter contribuído para o desenvolvimento deste projecto, com a sua dedicação e sentido de responsabilidade.

À D. Andrea e à D. Isabel pelos ensinamentos na “Ciência básica”.

À Anabela e ao Dioguito, pelo carinho e pela compreensão durante estes dois anos. Algumas histórias ficaram por contar, mas o futuro é nosso e longos anos nos esperam. Neste momento só te posso narrar a história do cardinho nas mãos do papá. E aos meus pais um grande beijo e obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido
Abs ₂₆₀	Absorvância a 260 nm
AMV	Vírus mieloblastose das aves
APS	Persulfato de amônio
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
bp	par de bases
BSA	Albumina sérica de bovino
CaMV	Vírus do mosaico da couve-flor
cDNA	Ácido dexossiribonucleico complementar
ChAP	Proteinase Aspártica de <i>C. humilis</i>
Da	Dalton
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido dexossiribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
kDa	kiloDalton
min	minuto
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NC-IUBMB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
PA	Proteinase aspártica
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PCR	Reacção de polimerase em cadeia
PSI	Inserção específica das plantas
PSS	Sequência específica das plantas
RNA	Ácido ribonucleico

RNase	Ribonucleases
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	Reacção de transcriptase reversa seguida de uma reacção de polimerase em cadeia
SDS	Duodecil sulfato de sódio
TAE	Tampão Tris acetato com EDTA
Taq	<i>Thermophylus aquaticus</i> (enzima)
TBS	Tampão Tris salino
TEMED	N, N, N', N' – tetrametilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TBST	Tampão Tris salino contendo Tween 20
VIH	Vírus da imunodeficiência humana

ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Sistema de três letras	Sistema de uma letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Glu	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

LISTA DE IMAGENS

Figura 1.1	Inflorescências de <i>Cynara humilis</i> em diferentes fases de desenvolvimento 1
Figura 1.2	Representação esquemática dos domínios de uma proteinase vegetal..... 9
Figura 1.3	Representação esquemática da relação existente entre as saposinas e as swaposinas..... 10
Figura 1.4	Alinhamento das sequências aminoacídicas das formas precursoras da cardosina A e da cardosina B e representação esquemática dos seus domínios..... 15
Figura 4.1	Inflorescências fechadas de <i>Cynara humilis</i> em diferentes estádios de desenvolvimento..... 25
Figura 4.2	Inflorescência aberta de <i>Cynara humilis</i> 26
Figura 4.3	Anatomia do estigma de <i>Cynara humilis</i> 27
Figura 4.4	Aspectos ultraestruturais de papila epidérmica 28
Figura 4.5	Anatomia do estilete de <i>Cynara humilis</i> 29
Figura 4.6	Aspectos ultraestruturais de célula subepidérmica..... 30
Figura 4.7	Anatomia do óvulo de <i>Cynara humilis</i> 31
Figura 4.8	Fotografia do óvulo evidenciando a região micropilar..... 32
Figura 4.9	Aspectos estruturais do saco embrionário..... 33
Figura 4.10	Alinhamento das sequências aminoacídicas da forma precursora da ChAP e da cardosina A..... 35
Figura 4.11	Imunolocalização da ChAP no estigma, por microscopia óptica 36

Figura 4.12	Imunolocalização da ChAP no estilete, por microscopia óptica37
Figura 4.13	Imunolocalização da ChAP no ovário, por microscopia óptica 39
Figura 4.14	Imunolocalização da ChAP na papila epidérmica, por microscopia electrónica42
Figura 4.15	Imunolocalização da ChAP no tecido de transmissão, por microscopia electrónica.....44
Figura 4.16	Electroforese em gel de agarose, do produto resultante da amplificação por RT-PCR do mRNA parcial da ChAP. O mRNA é proveniente dos diferentes órgãos florais femininos e em diferentes estados de desenvolvimento..... 46
Figura 4.17	Película radiográfica da membrana submetida a Western blotting, usando o anticorpo anti-A1..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Classes de enzimas e a respectiva função	3
Tabela 1.2	Chave dicotómica para a classificação de enzimas proteolíticas	4

RESUMO

As proteinases aspárticas (EC 3.4.23) são uma sub-subclasse de enzimas que se encontram amplamente distribuídas na natureza. Os estudos realizados descrevem-nas em animais, plantas, bactérias, fungos, retrovírus e vírus; onde desempenham diversas funções, desde a digestão de proteínas no sistema digestivo dos vertebrados até à clivagem de poliproteínas virais essenciais para a sua multiplicação. Estas enzimas têm sido objecto de intensa investigação dado o seu envolvimento em diversas patologias, como a malária, a SIDA, o cancro e a doença de Alzheimer, mas também pela sua importância na indústria dos lacticínios.

As flores de *Cynara cardunculus* e *Cynara humilis*, vulgarmente designadas por cardo, têm sido utilizadas ao longo de várias décadas no fabrico artesanal dos queijos de ovelha da Serra da Estrela, de Azeitão e de Serpa. A actividade coagulante dos extractos das flores é devida à presença de proteinases aspárticas. Actualmente, nas flores de *C. humilis*, apenas uma enzima foi identificada, caracterizada e denominada por ChAP (*Cynara humilis* Aspartic Proteinase). Esta enzima apresenta uma elevada homologia com a cardosina A.

No presente trabalho, faz-se em primeiro lugar uma caracterização sucinta dos órgãos florais femininos; seguidamente, com base em técnicas de imunohistoquímica, descreve-se a localização da proteinase no gineceu e por fim analisa-se a expressão da proteína e do respectivo mRNA no pistilo ao longo do seu desenvolvimento, utilizando as técnicas de Western blotting e RT-PCR, respectivamente.

Os dados de imunolocalização revelaram que a ChAP se acumula principalmente nos volumosos vacúolos das papilas estigmáticas e também, embora de um modo menos abundante, nos vacúolos das células de parênquima subepidérmico do estigma e da epiderme do estilete. Estes resultados mostram que a ChAP é, predominantemente, uma proteína vacuolar.

A análise do Western blotting evidencia que a acumulação do zimogénio da proteinase, ao longo do desenvolvimento floral, se expressa desde os estádios iniciais, no entanto, a sua maturação parece ocorrer apenas no estádio de inflorescência aberta. Os resultados de RT-PCR

mostram que o mRNA, surge, somente, nos estádios de inflorescência fechada. A ausência de mRNA no estágio de inflorescência aberta, parece indicar que a expressão da ChAP é regulada durante o desenvolvimento.

Com o intuito de ampliar os resultados obtidos sugere-se a realização de estudos de imunolocalização e expressão no estágio de inflorescência aberta em senescência. No que se refere à localização e quantificação da população de mRNA, a utilização das técnicas de hibridação *in situ* e Northern blot permitiriam um estudo complementar ao realizado. O isolamento e caracterização do gene da ChAP e a identificação de possíveis receptores de sequências de adesão, nomeadamente do motivo RGD, no pólen são duas vias de investigação relevantes, uma vez que podem contribuir para a clarificação da função da ChAP.

ABSTRACT

Aspartic proteinases (EC 3.4.23) belong to a sub-subclass of enzymes that are widely distributed in nature. The studies carried out describe them in animals, plants, bacteria, fungus, retrovirus and virus; where they play different roles, namely the protein digestion in the digestive system of the vertebrates and the cleavage of viral poliproteins essential for their multiplication. These enzymes have been subject of intense research due to their involvement in several diseases such as malaria, AIDS, cancer and Alzheimer's disease, but also for their importance in dairy industry.

The flowers of *Cynara humilis* and *Cynara cardunculus*, commonly known as thistle, have been used for some decades in the artisan production of ewe cheese from Serra da Estrela, Azeitão and Serpa. The Clotting activity of the flowers` extract comes from the presence of aspartic proteinases. At present, only one enzyme was identified and characterized in the flowers of *C. humilis*, and it was called ChAP (*Cynara humilis* Aspartic Proteinase). This enzyme presents high homology with the cardosin A from *Cynara cardunculus*.

In the present work, the anatomy of the female floral organs is characterized; then, based on imunohistochemistry techniques, the localization of the proteinase in the gynoecium is described and finally the expression of the protein and the corresponding mRNA in the pistil along its development is analysed, using techniques of Western blotting and RT-PCR, respectively.

Imunolocalization data revealed that the ChAP accumulates mainly in the voluminous vacuoles of the stigmatic papillae and also, although in a less abundant way, in the subepidemic parenchyma cells of the stigma and in the epidemic cells of the stile. These results show that the ChAP is, mainly, a vacuolar protein.

The analysis of Western blotting evidences that the accumulation of the zymogene, during the floral development, expresses itself right from the initial phase, however, its maturation seems to occur only in the open inflorescence stage. RT-PCR results demonstrate that the mRNA, appears, only, in the closed inflorescence stage. The absence of mRNA in the

open inflorescence stage seems to indicate that the expression of the ChAP is regulated during development.

With the purpose of deepening the results obtained it is suggested the making of further imunolocalization and expression studies in the stage of senescence flowers. In what concerns the localization and quantification of the mRNA population, the use of in situ hybridisation and Northern blot techniques, would allow a complementary study. The isolation and characterization of the ChAP gene and the identification of possible receptors of RGD sequences in the pollen are two excellent ways of research, since they can contribute to the ChAP's function clarification.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Descrição da espécie

Cynara humilis (figura 1.1) é uma das espécies mais abundantes do género *Cynara* em Portugal, encontra-se distribuída pelo centro e sul do país, particularmente em solos áridos de natureza calcária e basáltica. Taxonomicamente está incluída na família das Asteraceae caracterizando-se por apresentar folhas lanceoladas, glabras e verde-lustrosas na página superior, e branco-tomentosas na inferior; as basilares até 40 x 15 cm, bi-unipenatipartidas, com os segmentos estreitos, linear-assovelados ou linear-triangulares, enroladas na margem e terminadas em espinha picante; involúcro com 30-60 x 20-45 mm de brácteas purpurescentes tomando-se acastanhadas; corolas violáceo-azuladas, por vezes brancas; cipselas com 6-8 x 4-6 mm, baças, acastanhadas, de papilho com 20-35 mm; aquénios com ângulos alados e capítulos com involúcro ovóide. É um hemicriptófito subarrossetado de caules com 15-18 cm, geralmente branco-tomentosos. A sua constituição cromossómica é $2n=34$. Floresce e frutifica de Junho a Agosto (Coutinho, 1913; Franco, 1984; Tutin & Heywood, 1976).

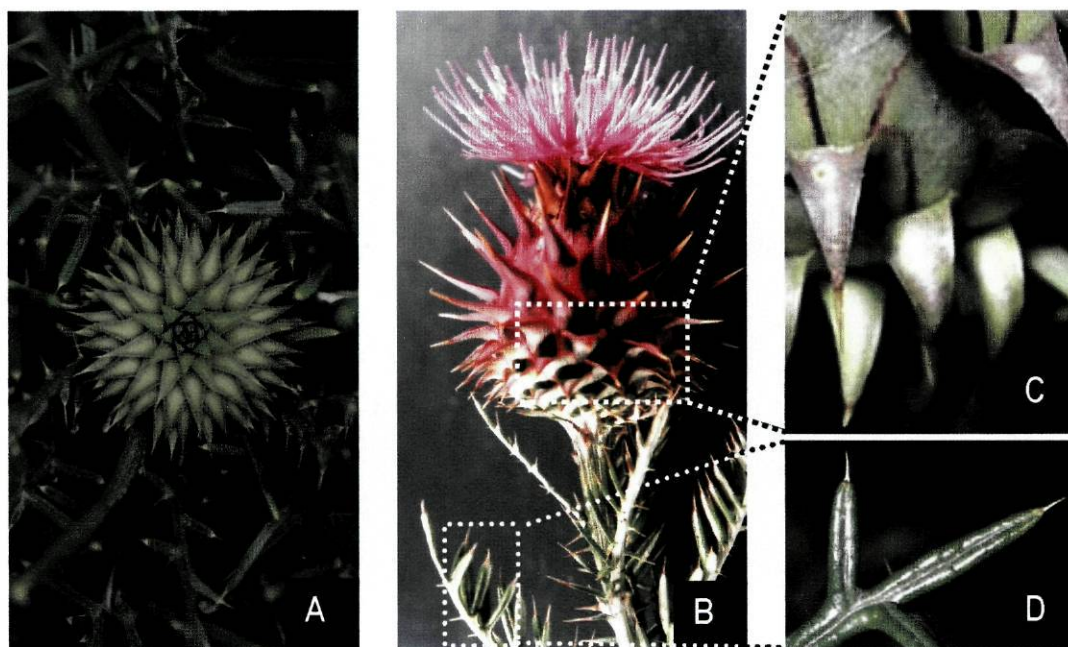


Figura 1.1 – Inflorescência de *Cynara humilis*. A-Inflorescência fechada muito precoce; B-Inflorescência aberta; C-ampliação das brácteas; D-ampliação dos folíolos.

Muitas das espécies do género *Cynara* têm sido utilizadas, desde há muitos anos, como medicamentos populares. Assim, por exemplo, as partes comestíveis de alcachofra – *Cynara scolymus* - são um excelente alimento para diabéticos porque contêm inulina em vez de fécula. Além disso actuam sobre o fígado, favorecendo a secreção da bília; possuindo, ainda, uma actividade anti-reumática e diurética.

Os extractos obtidos a partir das flores de *C. cardunculus* são usados, desde há vários séculos, como coagulante do leite de ovelha no fabrico artesanal do queijo da Serra da Estrela, de Serpa e de Azeitão. A espécie *Cynara humilis* é também utilizada no fabrico de queijo de ovelha como substituto ou misturado com *Cynara cardunculus* quando este é insuficiente (Fernandez-Salguero & Sanjuán, 1999). A actividade coagulante dos extractos das flores é devida à presença de proteinases aspárticas.

A utilização das proteinases vegetais como coagulantes do leite tem despertado interesse, uma vez que são enzimas naturais que podem substituir o coalho de origem bovina e a quimosina recombinante (Gomez *et al.*, 2001). Neste momento, a utilização destes dois últimos produtos está a ser questionada pelas entidades reguladoras da indústria dos lacticínios de diversos países.

Estudos realizados por Pires e colaboradores (1994) demonstraram que o conteúdo enzimático presente nestas duas espécies é diferente. *Cynara cardunculus* apresenta duas proteinases aspárticas designadas cardosina A e cardosina B e *C. humilis* contém apenas uma proteinase aspártica. Em termos de especificidade e parâmetros cinéticos a cardosina A e a proteinase aspártica de *C. humilis* (ChAP) são semelhantes à quimosina enquanto a cardosina B é semelhante à pepsina.

As pesquisas realizadas, até este momento, têm incidido, principalmente, em *Cynara cardunculus*. O conhecimento relativo ao *Cynara humilis* é parco, nomeadamente, no que concerne à localização histológica e celular.

1.2 Classificação e diversidade das peptidases

As enzimas constituem entre as proteínas, o grupo mais numeroso e o mais especializado. Actualmente as enzimas estão agrupadas em seis classes, de acordo com o tipo de reacção que catalisam (tabela 1.1).

Código	Classe	Funções
EC 1	Oxidoreductases	Catalisam reacções de oxireduções
EC 2	Transferases	Realizam reacções de transferência de grupos, (por exemplo o grupo metil, o grupo glicosil ...) de um composto para outro.
EC 3	Hidrolases	Catalisam a hidrólise de várias ligações (péptidica, éster ...)
EC 4	Líases	Realizam a clivagem de ligações por outros mecanismos que não a hidrólise ou a oxidação.
EC 5	Isomerases	Catalisam mutações intramoleculares.
EC 6	Lígases	Catalisam a ligação entre duas moléculas

Tabela 1.1 –Classes de enzimas e respectiva função

As hidrolases peptídicas (EC 3.4) são uma subclasse das hidrolases, dado que são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas. Segundo as recomendações da NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) os termos “protease” e “peptidase” podem ser, hoje, utilizados como sinónimos de “hidrolase peptídica” para qualquer enzima que hidrolise ligações peptídicas.

Presentemente, as peptidases estão subdivididas em “exopeptidases” (EC 3.4.11-19)– enzimas que actuam apenas nas regiões terminais das cadeias polipeptídicas e as “endopeptidases” ou proteinases (EC 3.4.21-99) que actuam no interior das cadeias polipeptídicas.

As endopeptidases são divididas em sub-subclasses com base no mecanismo catalítico; e a especificidade é utilizada, apenas, para identificar as enzimas na mesma classe (tabela 1.2). Quando as enzimas não podem ser inseridas em nenhuma das sub-subclasses (EC 3.4.21-25) são colocadas na sub-subclasse EC 3.4.99.

Peptidase ou protease – enzimas que actuam nas ligações peptídicas

- I. quebram ligações peptídicas internas..... A
- II. quebram ligações peptídicas nas regiões terminais..... B

A – Endopeptidases

- 1. Centro activo de serina ou histidina está envolvido na catálise, pH óptimo 7-9..... endopeptidase serínica (EC 3.4.21)
- 2. Centro activo de cisteína está envolvido na catálise, pH óptimo 4-7..... endopeptidase cisteínica (EC 3.4.22)
- 3. Centro activo com dois ácidos aspártico e uma tirosina estão envolvidos na catálise, pH óptimo <5. endopeptidase aspártica (EC 3.4.23)
- 4. Centro activo com um ião metálico envolvido na catálise, pH óptimo 7-9..... metaloendopeptidase (EC 3.4.24)

B – Exopeptidase

- 1. Hidrólise de um único aminoácido a partir da região terminal – NH₂ da cadeia peptídica..... aminopeptidases (EC 3.4.11)
- 2. Hidrólise de um dipeptídeo a partir da região terminal – NH₂ da cadeia peptídica..... dipeptidil peptidases (EC 3.4.14)
- 3. Hidrólise de um único aminoácido a partir da região terminal – COOH da cadeia peptídica..... carboxipeptidases (EC 3.4.16-18)
- 4. Hidrólise de um dipeptídeo a partir da região terminal -COOH da cadeia peptídica..... peptidil dipeptidases (EC 3.4.15)
- 5. Quebra de dipeptídeos em aminoácidos..... dipeptidases (EC 3.4.13)
- 6. quebra de tripeptídeos a partir da região terminal C ou N..... tripeptidases
- 7. Remoção de resíduos terminais que são substituídos, ciclizados ou ligados por ligações isopeptídicas..... omega peptidases (EC 3.4.19)

Tabela 1.2 – Chave dicotómica para a classificação de enzimas proteolíticas - adaptado de (Storey & Wagner, 1986)

Todavia, à medida que se desenvolvem os estudos, estas enzimas podem ser reclassificadas e colocadas numa sub-subclasse já existente ou criar uma nova sub-subclasse. O suplemento 6 (1999) da NC-IUBMB transfere a enzima EC 3.4.99.46 para EC 3.4.25.1 criando portanto a sub-subclasse EC 3.4.25 – endopeptidase treonínica.

As exopeptidases são classificadas com base na reacção catalisada. Os vários tipos de exopeptidases são distinguidos pelo tamanho da molécula do substrato, pela identificação da região terminal clivada e pelo tamanho da molécula libertada (Domingos, 1997)(tabela 2).

1.3 Proteinases aspárticas

As proteinases aspárticas (PAs) (E.C.3.4.23) representam uma sub-subclasse de enzimas amplamente distribuída na natureza. As PAs foram encontradas nos vertebrados, fungos, plantas e mais recentemente em retrovírus (Davies, 1990).

Na sua maioria estas enzimas caracterizam-se por apresentarem actividade proteolítica máxima a pH ácido, utilizarem as cadeias laterais dos dois ácidos aspárticos no mecanismo catalítico (Fruton, 1971; Fruton, 1976) e clivarem preferencialmente ligações entre resíduos aminoácidos hidrofóbicos, tais como a Phe, Ile, Leu ou Val (Barret & McDonald, 1986). As PAs são inibidas pelo diazoacetilnorleucina (DAN), pelo 1, 2-epoxi 3-(p-nitrofenoxipropano) (EPNP) e pela pepstatina, um hexapeptídeo de *Streptomyces*. A pepstatina inibe quase todos os membros da família das proteases aspárticas apoiando a hipótese de que estas enzimas têm mecanismos de acção semelhante.

Recentemente foram descritas algumas enzimas estrutural e enzimaticamente relacionadas com as PAs, tais como as enzimas de *Aspergillus niger*, (Takahashi *et al.*, 1991) de *Pseudomonas* (Oda & Murao, 1991) e de *Bacillus novosp* (Murao *et al.*, 1993) que são insensíveis à pepstatina.

Uma vez que as PAs têm sido alvo de intensos estudos devido ao seu envolvimento em situações patológicas como a SIDA, a malária, o cancro e a doença de Alzheimer (Vieira *et al.*, 2001), várias sequências aminoácidas têm sido determinadas. Na sua

maioria as PAs de mamíferos, plantas e fungos são enzimas de cadeia única com um peso molecular aproximadamente de 35 kDa (Davies, 1990).

As PAs têm regiões características bastante conservadas, como as sequências próximas dos locais dos dois resíduos aspartil: D₃₂-T/S-G-S no domínio N-Terminal e D₂₁₅-T/S-G-S/T no domínio C-Terminal (os números indicam a posição dos aa na pepsina). A presença destas regiões nas proteínas é geralmente aceite como uma evidência de pertencer à sub-subclasse das PAs, contudo esta ideia não é correcta dado que existem regiões semelhantes em muitas proteínas não pertencentes às PAs.

Outra característica das PAs é serem sintetizadas na forma de zimogénios. Os zimogénios, precursores inactivos das enzimas, possuem uma propeptídeo, com aproximadamente 50 aa na região N-Terminal que impede a actividade da enzima (Davies, 1990). James & Sielecki (1986) sugerem que a inibição da actividade ocorre provavelmente porque o propeptídeo bloqueia o acesso aos aspartatos catalíticos existentes no centro activo da enzima. Quando a proenzima se encontra num meio com pH ácido ocorre um processo autocatalítico que liberta o propeptídeo, activando a enzima (Davies, 1990). Todavia outros processos de maturação têm sido descritos no qual o prosegmento intervêm de outra forma, como é caso da maturação da fitepsina.

A produção de zimogénios protege os próprios tecidos ou células da degradação não desejada durante o transporte intracelular e secreção (Khan & James, 1998), podendo ainda desempenhar outros papéis importantes relacionados com o enrolamento correcto e a estabilidade dos zimogénios (Kervinen *et al.*, 1999).

A estrutura tridimensional de várias PAs tem vindo a ser determinada por raios X. A comparação dos dados obtidos demonstra que das três famílias de PAs apenas duas estão estritamente relacionadas: a família A1 (pepsina) e a família A2 (retropepsina). A família A3 (vírus do mosaico da couve-flor) apresenta alguns indícios de afinidade com a retropepsina e provisoriamente foi incluída nesta sub-subclasse (Rawlings & Barret, 1995). Os estudos cristalográficos demonstraram, ainda, que a estrutura secundária das enzimas pertencentes à família A1 consiste, quase inteiramente, numa folha pregueada com poucas e pequenas hélices α . A molécula é bilobada com uma fenda a separar os dois domínios, onde se localiza o centro activo. A ligação entre os dois lobos é formada por um

hexapeptídeo e cada lobo contribui com um resíduo de ácido aspártico responsável pela actividade catalítica (Rawlings & Barret, 1995).

Apesar da pequena similaridade das sequências aminoacídicas, a existência de dois lobos muito semelhantes vem sugerir que a enzima ancestral evoluiu por duplicação génica seguida de fusão (Rawlings & Barret, 1995). A hipótese colocada por Tang (1978) para a evolução da família A1 (pepsina) implica a existência num determinado tempo de uma pequena molécula análoga a um lobo da pepsina, que seria activa como homodimérica.

A confirmação surgiu, primeiramente, do estudo cristalográfico da retropepsina do VIH (vírus da imunodeficiência humana) e mais tarde do VSR (vírus do sarcoma de Rous) e o VAM (vírus da mieloblastose avícola), que demonstraram que as retropepsinas são semelhantes a um lobo da pepsina. As retropepsinas são sintetizadas como poliproteínas sofrendo durante o processo de maturação uma dimerização. Contrariamente às pepsinas que são enzimas monoméricas com dois domínios estruturais muito semelhantes; as retropepsinas são enzimas homodiméricas com duas subunidades relacionadas e podem ser consideradas, portanto, as precursoras das pepsinas (Davies, 1990).

Apesar das características comuns presentes, os membros desta sub-subclasse desempenham uma variedade de funções.

As pepsinas, a gastricsina e as quimosinas participam na degradação das proteínas durante a digestão. A quimosina, enzima que se encontra no estômago de ruminantes muito jovens tem actividade proteolítica baixa. Segundo Foltman (1992) a actividade proteolítica baixa da quimosina estará relacionada com a necessidade da preservação das imunoglobulinas presentes no leite materno.

A catepsina D, uma enzima lisossomal, intervém na degradação intracelular das proteínas. Supõe-se que a catepsina D esteja, ainda, envolvida em inúmeros processos fisiológicos e patológicos; como o processamento de enzimas lisossomais, (Gottschalk *et al.*, 1989) na distrofia muscular, (Gopalan *et al.*, 1987) na doença de Alzheimer (Cataldo & Nixon, 1990) e na progressão do cancro da mama (Cavaillès *et al.*, 1993).

A renina cliva uma proteína que origina o precursor da angiotensina II, que é o factor principal no controlo da pressão sanguínea bem como da regulação dos níveis de água e sódio no organismo.

Nos fungos, as PAs desempenham diversas funções desde a digestão extracelular (Ichishima *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1997) à participação na esporulação (Davies, 1990; Hofmann *et al.*, 1984).

Nos retrovírus, como o VIH, a proteinase é responsável pela clivagem das poliproteínas virais e proteínas não virais necessárias para a produção de viriões viáveis (McKeever *et al.*, 1989).

1.3.1 Proteinases aspárticas vegetais

Um grande número de PAs vegetais tem sido detectado e/ou purificado a partir de Gimnospérmicas (*Pinus* sp), Monocotiledóneas (milho, arroz, trigo e cevada) e Dicotiledóneas (*Arabidopsis*, *Brassica*, *Cynara*, *Centaurea*, *Nicotiana*, cacauzeiro e *Lycopersicum*). Estas enzimas têm sido encontradas principalmente em sementes em dormência, ou em diferentes partes de sementes em germinação, mas também em folhas e flores.

A maioria das PAs vegetais apresenta características típicas da sua sub-subclasse, nomeadamente o pH ótimo ácido, a inibição pela pepstatina e a preferência por ligações entre aminoácidos hidrofóbicos com resíduos laterais volumosos. São enzimas monoméricas, como as que estão presentes em sementes de arroz, de trigo, de *Brassica* e folhas de *Nicotiana* e *Lycopersicum* ou heterodiméricas como as que estão presentes nas flores de *Cynara* sp, sendo os dois péptidos derivados do processamento de uma única proproteína. Apesar desta diversidade estrutural, existe uma similaridade entre as regiões terminais da proteína monomérica de *Brassica* e as cadeias maiores das enzimas heterodiméricas (D'Hondt *et al.*, 1997). Estes dados sugerem que a diversidade estrutural é devida, provavelmente, a um processamento diferencial da enzima precursora.

A sequência geral das PAs vegetais pode dividir-se em cinco partes: uma sequência sinal (pre), uma região do propeptídeo (pro), uma região N-terminal, uma região específica (PSI) e uma região C-terminal (figura 1.2).



Figura 1.2 – Representação esquemática dos domínios de uma proteinase aspártica vegetal.

Os domínios N e C-terminal das PAs vegetais apresentam elevada similaridade com os domínios de PAs de outros seres vivos. Na maioria das PAs os resíduos catalíticos estão inseridos num motivo bastante conservado (DTG) em ambos os lobos da enzima, no entanto nas PAs vegetais um dos locais em vez de conter o motivo DTG contém o motivo DSG. O padrão evolutivo e a importância biológica desta variação nas PAs das plantas ainda não estão clarificados (Mutlu & Gal, 1999).

O PSS (Plant Specific Sequence) ou PSI (Plant Specific Insert) é constituído aproximadamente por 100 aa, que surgem exclusivamente na maioria das PAs das plantas. A comparação das sequências de PSI com origem em diferentes PAs permitiu detectar a existência de regiões semelhantes nomeadamente os seis resíduos de cisteína e o local de glicosilação (Mutlu & Gal, 1999). Quando comparada com outras sequências proteicas foi possível verificar uma homologia com o precursor das saposinas relativamente aos seis resíduos de cisteína e do potencial local de glicosilação.

As saposinas são proteínas activadoras dos esfingolípídeos, que parecem ser necessárias para a hidrólise dos esfingolípídeos por hidrolases lisossomais específicas. Existem quatro saposinas (A, B, C e D), as quais são derivadas de um mesmo precursor – a prosaposina. Contudo, o PSI não é constituído por um único domínio de saposina mas parece corresponder a uma ligação entre uma porção C-terminal de uma saposina com uma porção N-terminal de uma segunda saposina. Com base nesta característica o PSI é descrito como uma swaposina (White *et al.*, 1999). Domingos (1997) citando Pointing & Russel (1995) afirma que as saposinas não parecem ter surgido da mudança de posição das regiões C e N-terminal do gene, mas derivarem de uma região de um gene ancestral semelhante à prosaposina, que era constituído por repetições de uma das metades da saposina, uma região “linker” e por repetições de uma metade terminal da saposina seguinte (figura 1.3).

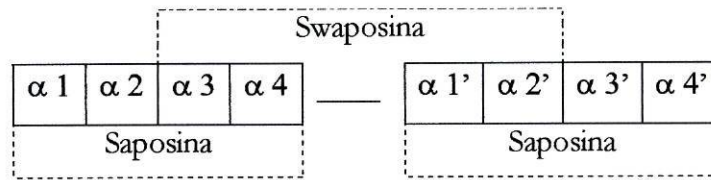


Figura 1.3 – Representação esquemática da relação existente entre as saposinas e as swaposinas (extraído de Domingos, 1997)

Dada a similaridade existente entre o PSI e as saposinas é provável que a função desempenhada pelo PSI seja semelhante à função das saposinas.

A associação das saposinas e das proteínas semelhantes às saposinas com os lípidos das membranas e com as proteínas ligadas à membrana está claramente demonstrado (Wilkening *et al.*, 1998) e neste sentido o PSI pode ter uma função no transporte para o vacúolo. A forte ligação das saposinas com determinados glicolípidos indica também uma possível função para as interações proteínas-lípidos no encaminhamento das proteínas para os vacúolos das células vegetais (Kervinen *et al.*, 1999).

Um estudo levado a cabo com protoplastos de tabaco demonstrou que a deleção da região do PSI levou à secreção da fitepsina, contudo uma mutação no propeptídeo ou uma deleção do local de N-glicosilação não afectam o transporte para os vacúolos (Tormakangas (1997) in Kervinen, 1999). Estudos mais recentes verificaram que a fitepsina com o PSI delectado, além de ser secretada para o meio de cultura, o processo de exportação da enzima do retículo endoplasmático também é diferente. Com base nestes resultados, Tormakangas (2001) sugere que o PSI, provavelmente possuirá dois sinais: uma para a saída do retículo e outro para o endereçamento vacuolar.

Todavia, mais investigações são necessárias para clarificar o mecanismo de transporte vacuolar, uma vez que as células vegetais possuem pelo menos dois tipos de vacúolos que apresentam proteínas intrínsecas do tonoplasto diferentes: α-TIP e TIP-Ma27 (Paris *et al.*, 1996) e existem proteinases que estão presentes em ambos. Embora o PSI pareça representar um sinal de direccionamento para um dos vacúolos, outros sinais terão de existir para direccionar a fitepsina para o outro vacúolo ou as outras PAs para os vários tipos de vacúolos (Kervinen *et al.*, 1999).

Os estudos de identificação e caracterização de PAs têm sido realizados em diferentes espécies vegetais e em diferentes estruturas, como foi, já, referido anteriormente. Apesar de as PAs serem identificadas e caracterizadas quer em diferentes espécies, quer em diferentes estruturas, tal como tem vindo a ser mencionadas, os dados existentes relativamente à sua função são provenientes essencialmente de estudos de actividade *in vitro*. De um modo geral, tem sido sugerido que as PAs vegetais estão envolvidas na regulação da concentração (Belozersky *et al.*, 1989; Rodrigo *et al.*, 1989; Rodrigo *et al.*, 1991) ou no processamento proteolítico específico de outras proteínas (D'Hondt *et al.*, 1993; Runeberg-Roos *et al.*, 1994).

Os estudos existentes sugerem que as PAs expressas em sementes desempenham uma função nos processos de hidrólise de proteínas de reserva, necessários ao desenvolvimento do embrião. Os dados experimentais incluem, por um lado, a detecção de PAs em corpos proteicos, que são vacúolos especializados contendo proteínas de reserva, presentes em sementes de diferentes espécies (Elpidina *et al.*, 1990) e incluem, por outro lado, a demonstração que as PAs de sementes de *Triticum aestivum*, *Brassica napus* e *Theobroma cacao* são capazes de processar proteínas de reserva *in vitro* (Belozersky *et al.*, 1989; D'Hondt *et al.*, 1993).

A presença da PA de *Hordeum vulgare* ao longo da maturação e germinação das sementes foi estudada em pormenor (Tomakangas *et al.*, 1994). A enzima está presente, fundamentalmente, no embrião e na camada de aleurona, mas não no restante volumoso endosperma, carregado de amido e outras substâncias de reserva. Estes factos sugerem que a enzima poderá participar na hidrólise de proteínas de reserva acumuladas no embrião e na camada de aleurona ou ainda no processamento de percursores de outras enzimas hidrolíticas que são secretadas pela camada de aleurona e pelo escutelo para o endosperma amiláceo. Quanto à localização sub-celular, esta PA é uma enzima vacuolar, o que significa que entra na via secretora mas é retida intracelularmente para ser dirigida para o vacúolo (Runeberg-Roos *et al.*, 1994). Assim, a fitepsina tem uma localização análoga à da protease A (PA vacuolar, em leveduras) e também à da catepsina D (PA lisossomal, em animais), uma vez que o vacúolo é o equivalente nas células de plantas e fungos ao lisossoma nas células animais. Neste mesmo estudo, verificou-se ainda que a enzima é capaz de processar correctamente *in vitro* o propeptideo C-terminal da lectina, também presente em *H. vulgare* e que ambas as proteínas se co-localizam em vacúolos, o que permite propor um envolvimento desta PA neste

processamento (Runeberg-Roos *et al.*, 1994). A expressão da fitepsina detectada em outras estruturas, como em raízes, caules, folhas e flores, permite supor um envolvimento da enzima em diversas funções da planta (Tomakangas *et al.*, 1994).

A expressão da fitepsina em células dos feixes vasculares em desenvolvimento e da coifa constituiu a primeira evidência experimental de que uma PA vacuolar, em analogia com a catepsina D, pode desempenhar um papel importante na autólise activa de células de plantas, ou seja, na morte celular programada (Runeberg-Roos & Saarma, 1998).

Nas folhas de *Lycopersicon esculentum* e *Nicotiana tabacum* identificou-se uma PA extracelular capaz de degradar proteínas relacionadas com a patogénese, denominadas proteínas de resistência (PR) (Rodrigo *et al.*, 1989; Rodrigo *et al.*, 1991). Estas proteínas são secretadas em situações de stress e julga-se que sejam parte de um sistema de defesa contra a infecção bacteriana (Bowles, 1990); em função destes resultados, sugeriu-se que estas PAs participam na regulação da concentração de proteínas PR. Estudos posteriores indicam que a expressão de uma outra PA é regulada de modo semelhante ao de proteínas de resposta sistémica a ferimentos, as quais são parte de um sistema de defesa contra ataque por herbívoros (Bergey *et al.*, 1996).

Nas plantas carnívoras, os órgãos adaptados à captura e digestão de pequenos invertebrados secretam um fluido rico em enzimas hidrolíticas, entre as quais as PAs (Juniper *et al.*, 1989). Uma vez que esse fluido é ácido, um meio adequado à actividade de PAs, pensa-se que nestas plantas estas enzimas estejam envolvidas na digestão dos animais capturados, nomeadamente na degradação das suas proteínas (Tokés *et al.*, 1974). Com base na descoberta de uma PA no fluido ácido de *Nepenthes alata*; An, (2002) sugere que as plantas carnívoras utilizam as proteínas dos insectos como fonte de azoto.

A determinação da função da cenprosin, a PA recentemente identificada nas flores de *Centaurea calcitrapa*, carece de estudos posteriores, apesar de existirem já algumas evidências da participação da enzima no processo de senescência das flores (Domingos, 1997; Domingos *et al.*, 2000).

Vários estudos têm sido realizados tendo como objectivo esclarecer a função quer das ciprosinas quer das cardosinas, as PAs presentes nas flores de *C. cardunculus*. Dada a importância das cardosinas, sobretudo da cardosina A, no desenvolvimento deste estudo, dar-se-á ênfase a uma descrição mais detalhada destas enzimas.

1.3.2 As cardosinas

As cardosinas são proteinases aspárticas presentes nas flores de *Cynara cardunculus* L. Estas enzimas, que foram designadas por cardosina A e cardosina B, têm sido estudadas ao nível molecular e bioquímico. Esses estudos vieram revelar que as cardosinas são o produto de dois genes diferentes, mas relacionados (Veríssimo *et al.*, 1996). A cardosina A é a mais abundante e juntamente com a cardosina B constituem a maioria das proteínas solúveis presentes no gineceu maduro. São enzimas heterodiméricas que possuem duas subunidades com uma massa molecular aparente (m.m.a.) de 31 kDa / 15 kDa e 34 kDa / 14 kDa, respectivamente. Além disso apresentam diferenças ao nível da sequência aminoacídica, ao nível da localização histocitológica e ao nível da especificidade enzimática.

Relativamente à especificidade a cardosina A é mais específica do que a cardosina B. Ao nível da localização, os estudos imunológicos revelaram que a cardosina A se acumula nos vacúolos de armazenamento proteico das papilas estigmáticas e em menor quantidade nas células de parênquima subepidérmico do estigma e nos vacúolo central das células da epiderme do estilete ao contrário a cardosina B é uma PA extracelular que se localiza especificamente na matriz extracelular do tecido de transmissão.

Segundo Faro e colaboradores (1998), apesar das diferenças, as cardosinas possuem um elevado grau de homologia e por essa razão foi sugerido que podem ter aparecido por duplicação genica.

O cDNA da cardosina A contém um "open reading frame" que codifica uma sequência de 504 aminoácidos (figura 1.4). A análise da sequência revelou que a proteína é sintetizada sob a forma de preproenzima, com uma sequência sinal de 24 aa., responsável pelo endereçamento para o lúmen do retículo; por um prosegmento com 42 aa e uma sequência de 438 aa. No interior da sequência maior existe uma região de 102 aa, designada por PSI que é comum às PAs vegetais. Esta sequência separa a cadeia de 31 kDa da cadeia de 15 kDa. Os resíduos catalíticos estão localizados na cadeia de 31 kDa na posição D₃₅-T-G e D₂₁₈-S-G. A cardosina A tem também dois locais de N-glicosilação nas sequências N₇₁-G-T e N₃₆₄-V-S, localizados em cada uma das cadeias. A estrutura dos glicanos foi determinada e os resultados demonstraram que os locais de glicosilação estão,

de facto, glicosilados com glicanos complexos (Costa *et al.*, 1997). O facto de os locais de glicosilação estarem situados fora dos centros activos sugere que os hidratos de carbono não são fundamentais para a actividade e especificidade da enzima. Contudo podem desempenhar um papel importante no enrolamento e na manutenção da estabilidade da enzima (Faro *et al.*, 1998). Os estudos realizados indicam, também a existência de uma sequência de adesão de proteínas – RGD, que é característica de ligandos de integrinas como a fibronectina ou a vitronectina. Todavia outros motivos de adesão poderão existir.

A)

	Pré	Pro	
PPcardosinA	MGTS IKANV LALFL FYLLS PTVFS	WSDDGLIRIG L KKRKVDRID QLRGR RALMEGNARKD	60
PPcardosinB	MGTP IKASL LALFL FFLS PTAFS VSNGLLRVG LKKRKVDRID QLRAGVHMLGNARKD		60
		35 KDa	
PPcardosinA	FGFRGTVRD	SGSAVVALTNRDTS YFGEI GIGTP PQKFTVI FDTGSSVLWVPS SKCINSK	120
PPcardosinB	FGFRRTLSD	SGSGIVALTNRDRTAYGEI GIGTP PQNFAVIFDTGSSDLWVPS TKCDTSL	120
	*		
PPcardosinA	ACRAHSMYE SSSSTYKENGTFGALIIYGTGSITGFFSQD SVTIGDLVVKEQDF IEATDEA		180
PPcardosinB	ACVIHPRYD SSGSSTYKGN GTTAS IQYGTGAIVG FYSQD SVEVGD LVVEHQDF IETTEED		180
	*		
PPcardosinA	DNVFLHRLFDGILGLSFQITIS---	VPVWYNMLNQGLVKERRFS FwLNRRNVDEEEGGE LV	236
PPcardosinB	DTVFLKSEFDGILGLGFQE ISAGKAVPVWYNMWNQGLVEEAVFS FwLNRRNVDEEEGGE LV		240
PPcardosinA	FGGLDPNHFRGDHTYVPVYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCAAFADSGTSLLSGPT		296
PPcardosinB	FGGVDPNHFRGNHTYVPVTRKGYWQFEMGDVLIGDKSSGFCAGGCAAIADSGTSFFAGPT		300
	*		
		PSI	
PPcardosinA	AIVTQINHAIGAN	GVMNQQCKTVV SRYGRDIIEMLRSKI QPDKI CSHMKLCTFDGARD VS	356
PPcardosinB	AIITQINQAIGAKGVLNQQCKTLV	QYQGNMIQMLTSEV QPDKI CSHMKLCTFDGAHD VR	360
PPcardosinA	SIIE SVVD KNNDKS SGGIHD MCTFCEMAVVWMQNEIKQ SETEDNI INYANEL CEHLS	TS	416
PPcardosinB	SMIE SVVD KNNDKS SGG---	EICTFCEMALVRMQNEIKRMETEDNI INHVNEVCDQLP TS	417
	*	14KDa	
PPcardosinA	SEELQVDCNTLSSMPNVSFTIGGKKFGLTPEQYI LKVGKGEATQCISGFTAMDAT-LLGP		475
PPcardosinB	SAESI VDCNGISSMPNIAFTTIGSKLFEVTPEQYIYKVGEGEAATCISGFTALDIMS PQGP		477
PPcardosinA	LWILGDVFMRPYHTVFDYGNLLVGF AEA A		504
PPcardosinB	IWILGDMFMGPYHTVFDYGKLRVGF AEA V		506

B)

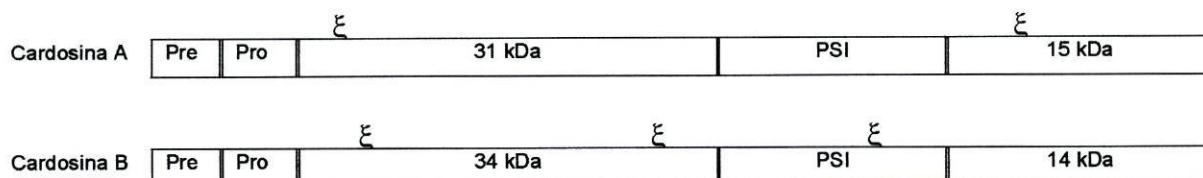


Figura 1.4- A- Alinhamento das seqüências aminoacídicas das formas precursoras da cardosina A e da cardosina B. As seqüências pré e pró da cardosina A estão inseridas num rectângulo verde e cor de laranja, respectivamente. Os locais activos estão assinalados a vermelho, a seqüência RGD está a amarelo e os locais de N-glicosilação estão assinalados com um asterisco (*). O PSI está inserido num rectângulo azul.

B- Representação esquemática dos domínios da cardosina A e da cardosina B. Os locais de N-glicosilação estão assinalados com o símbolo (ξ). É de salientar que, contrariamente, ao que se verifica na cardosina B, a cardosina A não possui um local de glicosilação no PSI. (extraído de Vieira, 2001)

A estrutura tridimensional foi determinada por cristalografia de raios X, com base num método de substituição molecular usando a catepsina D como modelo. Apesar de ser necessário realizar alguns reajustamentos, algumas características podem ser descritas. O diagrama da cardosina A apresenta dois domínios sensivelmente simétricos e com grande quantidade de folhas β , separados por uma longa fenda. Nesta estrutura foram identificadas, ainda, três pontes dissulfídicas, duas na primeira cadeia peptídica e uma na segunda cadeia peptídica. Das três, nenhuma estabelece uma ligação entre as duas cadeias peptídicas, portanto estas duas cadeias serão mantidas juntas apenas por interacções hidrofóbicas e pontes de hidrogénio, ou seja, por interacções de natureza não covalente.

O cDNA da cardosina B contém um "open reading frame" com 1521 pb. A seqüência aminoacídica (figura 1.4) derivada do cDNA contém uma seqüência sinal, um prosegmento com 44 aa e uma seqüência polipeptídica que inclui as duas cadeias da enzima madura. Os resíduos aspárticos dos locais activos estão, ambos, localizados na cadeia de 34 kDa. Ao contrário da cardosina A, a cardosina B só possui locais de N-glicosilação na cadeia maior e no PSI. Um desses locais resultou de uma mutação ocorrida no aminoácido D (ácido aspártico), na seqüência de adesão de proteínas RGD, por um aminoácido N (asparagina). A mutação provocou, assim, o aparecimento de uma seqüência consenso para a N-glicosilação – NHT (Vieira *et al.*, 2001).

As cardosinas são sintetizadas em cadeias simples e sofrem, posteriormente, um processamento que origina uma enzima madura constituída por duas cadeias. Apesar de até este momento existirem poucos estudos sobre o processamento da cardosina B, a comparação das sequências proteica da forma madura e da forma precursora revelaram que além da sequência sinal, o prosegmento e o PSI são removidos durante a maturação da proteína.

Relativamente à cardosina A, Santos (1997) sugere que a enzima entra numa via secretora sofre glicosilação no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi e é transportada para o vacúolo. No vacúolo ocorre o processamento proteolítico da enzima. O processo, anteriormente, referido é um processo sequencial. A primeira clivagem ocorre entre a sequência de 31 kDa / PSI, seguidamente, acontece a separação entre a sequência pró / 31 kDa e PSI / 15 kDa. Pela análise dos locais de clivagem concluiu-se que ocorre um auto-processamento parcial, ou seja, a cardosina A intervêm no seu próprio processamento, mas é auxiliada por outras peptidases.

A comparação da sequência proteica da cardosina A com as pequenas sequências de endereçamento vacuolar descritas para outras espécies permitiu determinar que a sequência VGFAEAA da região C-terminal apresenta uma elevada homologia com a região C-terminal da lectina da cevada (VFAEAlA). O facto desta sequência estar ausente na cardosina B, apoia a hipótese dessa sequência poder ser um sinal de endereçamento vacuolar.

1.3.3 A proteinase aspártica de *C. humilis* - ChAP

Em relação à PA presente nas flores de *C. humilis*, os dados são ainda escassos.

Os primeiros estudos sobre a ocorrência de PAs nos pistilos de *C. humilis* conduziu ao isolamento de uma enzima que apresenta aspectos estruturais semelhantes à cardosina A, apesar de possuir propriedades cinéticas únicas (Veríssimo *et al.*, 1998). Esta enzima, designada por ChAP (*Cynara humilis* *A*spartic *P*rotease), é uma proteína heterodimérica, cujas subunidades possuem massas moleculares aparentes de 31 e 15 kDa.

O cDNA desta PA foi posteriormente clonado, analisado e a sua sequência aminoacídica foi determinada. A sequenciação deste cDNA permitiu concluir que possui 1503 bp, codificando 501 aminoácidos. A análise desta sequência revelou que a ChAP é, tal como esperado, sintetizada como uma preproenzima, aparentemente constituída por uma sequência sinal-pré de 24 aminoácidos, um prosegmento que inclui os 39 aminoácidos seguintes e uma sequência polipeptídica constituída por 438 aminoácidos (Mendes, 1997). Como as restantes PAs de origem vegetal, a *ChAP* apresenta uma inserção de 102 aminoácidos denominada PSI, que separa as suas duas cadeias; a homologia geral já descrita entre o PSI e as saposinas também se observa, com excepção do local de N-glicosilação, que não está presente nesta enzima. Ambos os resíduos catalíticos de aspartato se encontram na cadeia de 31 kDa e os outros dois locais putativos de N-glicosilação (NGT e NVS) estão também presentes, um em cada cadeia. O motivo RGD também se encontra nesta enzima.

A comparação da sequência aminoacídica da ChAP com a de outras PAs permitiu verificar que o grau de homologia desta enzima com as restantes PAs de origem vegetal é elevado. Em relação à cardosina A, a homologia é de cerca de 94% e a maior diferença entre estas duas enzimas é a perda de três aminoácidos na sequência pró da ChAP. Outras pequenas diferenças se encontram junto ao local activo desta PA, que podem ser responsáveis pelas distintas propriedades cinéticas e coagulantes apresentadas por estas duas enzimas (Mendes, 1997; Veríssimo *et al.*, 1998).

2. OBJECTIVO DO ESTUDO

A primeira fase no estudo da biologia celular de novas proteínas consiste na investigação da sua distribuição no organismo e da sua localização histoquímica e citológica. Numa segunda fase é importante caracterizar a estrutura do órgão onde estão presentes.

Deste modo, são objectivos deste trabalho a imunolocalização das proteinases no gineceu das flores de *Cynara humilis* L. e posterior caracterização dos órgãos onde estas se encontram. Além disso e com a intenção de obter um conhecimento mais alargado da enzima realizaram-se estudos de expressão durante o desenvolvimento floral.

Pretende-se com os dados obtidos contribuir, juntamente com outros dados já existentes e outros que se espera vir a obter no futuro, para a clarificação da função ou funções da enzima na planta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Inflorescências de *Cynara humilis*, em diferentes estádios de desenvolvimento, foram colhidos periodicamente a intervalos de um mês, na região de Rabaçal, centro de Portugal, entre Abril e Junho.

Uma parte do material colhido foi moída em azoto líquido e guardado a -80°C para análises bioquímicas e moleculares posteriores; o restante material foi tratado de modo a poder ser usado em estudos de microscopia.

3.2 Estudos estruturais em microscopia

Para os estudos estruturais em microscopia, utilizaram-se somente inflorescências cujo o estágio de desenvolvimento permitia a separação dos diferentes órgãos florais – estigma, estilete e ovário. Esses órgãos foram seccionados em pequenas peças e fixados numa solução contendo 2,5% (v/v) glutaraldeído e 1,25% (v/v) NaPIPES, pH 7,2, durante 1 h à temperatura ambiente. Lavagem em 2,5% NaPIPES, pH 7,2, 3 vezes, 10 minutos cada. Pós - fixação em 2% (v/v) ósmio e 1,25% (v/v) NaPIPES, pH 7,2, durante 2 h à temperatura ambiente (Salema & Brandão, 1973). Desidratação em séries de álcool com concentrações crescentes. Impregnação em epon (48% TAAB 812 Resin, 52% (MNA) "methyl nadic anhydride" e 2% 2,4,6-tri (dimetilaminometil) fenol (DMP-30)) através de óxido de propileno. Finalmente, as peças foram incluídas em epon, em moldes orientados e colocadas na estufa durante 12 horas a 60°C . As secções semifinas foram coladas em lâminas de vidro e coradas numa solução (1:1, v/v) com 1% (m/v) Azure II em H_2O e 1% (m/v) Azul de metileno em 1% (m/v) borato de sódio. Os cortes foram montados com Bálsamo de Canadá, para se prolongar a sua duração, observados e fotografados com um foto-microscópio Leica DMLB (Alemanha).

As secções ultrafinas 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, Oberkochen, Alemanha) operando a 60 KV.

3.3 Estudos de imunolocalização

Nos estudos de imunolocalização, utilizaram-se somente inflorescências cujo estágio de desenvolvimento permitia a separação dos diferentes órgãos florais – estigma, estilete e ovário. Esses órgãos foram cortados em pequenas peças e fixados numa solução contendo: 4% (v/v) paraformaldeído, 0,5% (v/v) glutaraldeído, 2% (m/v) sacarose, 0,05% (m/v) cloreto de cálcio e uma gota de Tween 20 em 1,25% (v/v) NaPIPES, pH 7,2, durante 2 h à temperatura ambiente. Seguidamente as peças foram lavadas, primeiro em 2,5% NaPIPES, pH 7,2, durante 10 minutos, depois em 2,5% NaPIPES, pH 7,2, com 1mM glicilglicina durante 10 minutos e novamente em 2,5% NaPIPES, pH 7,2, durante 10 minutos.

A desidratação das peças realizou-se em séries de álcool de concentração crescente. As impregnações foram realizadas aplicando séries crescentes de LRWhite (London Resin Co., Basingstoki, UK) / etanol. Na inclusão as peças foram colocadas em cápsulas de gelatina com LRWhite e ficaram na estufa a 55°C durante a noite.

Os cortes semifinos foram recolhidos em lâminas de vidro previamente revestidas com 0,1% poli-L-lisina e deixadas a 37°C durante 12 h. Posteriormente, as secções foram tratadas com uma solução saturada de metaperiodato de sódio durante 10 minutos, seguindo-se o tratamento com uma solução 0.1 M de ácido clorídrico durante 10 minutos. Após o "etching", procedeu-se à imunolocalização utilizando o Histostain-Plus Kit (Zymed), seguindo as instruções do fabricante, mas com as seguintes modificações: as lavagens foram feitas com TBST 500 (TBS 500 com 0,2% (v/v) Tween 20) e o substrato cromogénico "Fast Red" foi substituído pelo substrato Sigma *Fast* BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3- indolífosfato/ azul nitro tetrazolio), específico para a fosfatase alcalina, diluído em 10% (m/v) polivinil-álcool (PVA) de massa molecular de 40-70 kDa (Sigma).

Na incubação com o anticorpo primário utilizaram-se os anticorpos dirigidos contra a

cardosina A recombinante (anti-A rec)^a e contra a cardosina A (anti-A1^b e anti-A2^c) diluídos na proporção de 1:60 ou 1:40 em 10% (v/v) de soro de cabra (Sigma, G-9023) e TBST 500 (0,01M Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl) contendo 0,2% (v/v) de Tween 20, durante 12 h em câmara húmida a 4°C. Os cortes de controlo foram preparados, tal como os cortes experimentais, excepto no passo de incubação com o anticorpo primário, em que este não foi adicionado. As secções foram montadas em glicerol, observadas e fotografadas.

Os cortes ultrafinos foram recolhidos em grelhas de níquel não revestidas e, posteriormente, incubados numa solução de bloqueio constituída por TBST 500 contendo 0,8% NaCl, 0,2% Tween 20 e 5% soro de cabra (Sigma, G-9023), durante 30 min. Após o bloqueio, as secções foram incubadas com os anticorpos dirigidos contra a cardosina A (anti-A) diluído 1:400 na solução de bloqueio durante 4 h. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo anti-IgG de coelho, feito em cabra e conjugado com partículas de ouro de 15 nm de diâmetro, diluído 1:50 na solução de bloqueio, durante 1 h. As secções controlo foram preparadas tal como as secções experimentais, excepto no passo de incubação com o anticorpo primário, em que este foi substituído pela solução de bloqueio ou por soro não-imune diluído 1:500 na solução de bloqueio. 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, Oberkochen, Alemanha) operando a 60 KV.

^a Reconhece quase a totalidade da sequência da cardosina. (ver figura 4.10).

^b Reconhece a sequência TSSEELQVDCNT presente na cadeia menor da proteína (ver figura 4.10).

^c Reconhece a sequência CRAHSMYESSD presente na cadeia maior da proteína (ver figura 4.10).

3.4 Análise RT-PCR

O material e as soluções usadas foram previamente tratados com uma solução 0,1% de dietil pirocarbonato (DEPC) em água, antes de ser autoclavado. Os reagentes usados eram já livres de contaminação por ribonucleases (Rnase-free).

O RNA total das diferentes amostras (inflorescência fechada sem diferenciação colorimétrica dos órgãos florais; estigma, estilete e ovário de inflorescência fechada; estigma, estilete e ovário de inflorescência aberta) foram isolados a partir de 100 mg de tecido, usando o Invisorb® Spin Plant - RNA Mini Kit (Invitex) ou o TRIzol (GibcoBRL), segundo as instruções dos fabricantes. Para a análise da expressão do mRNA da PA, a qualidade do RNA total extraído foi testada realizando uma electroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo; a sua quantidade relativa e grau de pureza foram estimados usando os métodos espectrofotométrico.

O RT-PCR foi realizado usando o Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham pharmacia biotech), segundo as instruções do fabricante e partindo de quantidades similares de RNA total; os primers usados foram o Primer F626 (CTCGGCCTTTCACTTCAAACG) e Primer R1022 (CGGGTTGTATCTTAGATCGG). Os produtos do RT-PCR foram visualizados em geles de agarose 1% contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo.

3.5 Extracção de proteínas

As amostras do material para a análise de RT-PCR foram utilizadas, ainda, para a extracção de proteínas. O material biológico foi homogeneizado em tampão de extracção constituído por 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 1 mM ditioneitol (DTT), 10% glicerol e 5% polivinil polipirrolidona (PVP) insolúvel; por cada grama de tecido usou-se 1 mL de tampão de extracção. Após centrifugação a 13000 rpm, durante 10 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram recolhidos e submetidos a uma nova centrifugação a 13000 rpm, durante 30 minutos e a 4°C; os sobrenadantes foram recolhidos e colocados em gelo.

Também se utilizou o TRIzol (GibcoBRL), seguindo as instruções do fabricante.

A quantidade total de proteína presente em cada extracto foi determinada pelo método

de Bradford, usando a albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A 1 mL de reagente de Bradford adicionou-se 100 μ L de uma solução de extracto diluído 1:100 ou 1:25 em água; após 15 minutos, a absorvância foi lida a 595 nm e determinada a concentração de proteína, usando a recta padrão previamente estabelecida para a BSA. Para preparar um volume de 100 mL de reagente de Bradford, dissolveu-se 10 mg de azul brilhante de Coomassie G-250 em 5 mL de 95% (v/v) de etanol; depois, adicionou-se 10 mL de 85% (v/v) de H_2PO_4 e completou-se o volume com água.

Após a determinação da concentração total de proteína nos extractos, estes foram adicionados a um tampão de amostra pH 6,8 constituído por 0,3345 M Tris-HCl, 50% (v/v) glicerol, 5% (m/v) de duodecil sulfato de sódio (SDS), 0,2% (m/v) azul de bromofenol e 5% (v/v) β -mercaptoetanol. Os extractos foram depois guardados a $-20^\circ C$.

3.6 Coloração por “Silver Staining”

Os extractos de proteína preparados como indicados, anteriormente, foram fervidos a $100^\circ C$, durante 2 minutos e centrifugados a uma velocidade de 14000 rpm durante 5 mins. Um volume de cada amostra contendo 10 μ g de proteína foi carregado em gel de poliácridamida 12,5%, que foi submetido a SDS-PAGE, de acordo com o método de Laemmli (1970). A electroforese foi realizada numa unidade Hoefer MiniVe.

Após a electroforese, o gel era incubado numa solução fixadora constituída por 30% (v/v) etanol e 10% (v/v) ácido acético, durante 3 períodos de 30 minutos. Após a fixação, o gel era submetido a uma lavagem com uma solução de 20% (v/v) etanol, seguida de uma lavagem em H_2O , ambas com duração de 10 minutos. Depois de ter sido incubado na solução de sensibilização - 0,02% (m/v) tiosulfato de sódio - durante 1 minuto, o gel era lavado com H_2O , durante 2 períodos de 20 segundos e mergulhado numa solução 0,2% de nitrato de prata ($AgNO_3$) durante 30 minutos. Após 3 lavagens de 15 segundos em H_2O , o gel era incubado na solução de revelação (37% (v/v) formaldeído, 3% (v/v) carbonato de sódio e 0,001% (m/v) tiosulfato de sódio) até ao aparecimento das bandas.

A revelação do gel era interrompida incubando-o numa solução contendo 5% (m/v) Trizma Base e 2,5% (v/v) ácido acético durante 1 minuto. Todos estes passos foram sempre realizados na obscuridade e com agitação.

3.7 Análise por “Western Blotting”

Após o SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, usando a unidade de transferência Hoefer MiniVe, durante duas horas, a 25V e a 300mA.

As membranas eram incubadas numa solução de bloqueio constituída por PBS-T (PBS + 0.1% v/v Tween20) e 5% (m/v) leite em pó magro, durante 1 h à temperatura ambiente e com agitação. Lavagem em PBS-T, a primeira durante 15 min e as duas seguintes 5 min cada. Após as lavagens, as membranas eram incubadas com o anticorpo anti-A1 diluído 1:400 na solução de bloqueio, durante 4h à temperatura ambiente. Terminada a incubação, as membranas eram, novamente, lavadas em PBS-T a primeira durante 15 min e as duas seguintes 5 min cada. Em seguida, incubaram-se numa solução com anticorpo secundário, anti-IgG de coelho feito em cabra e conjugado com peroxidase (Vector, UK) diluído 1:1000 em PBS-T contendo 0,5% (m/v) de leite em pó magro, durante 1 h à temperatura ambiente. Lavagem em PBS-T, a primeira durante 15 min e as quatro seguintes 5 min cada. Para a revelação, utilizara-se o reagente de detecção ECL (amersham pharmacia biotech) segundo as instruções do fabricante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Morfologia geral do pistilo de *Cynara humilis*

Nos estudos de localização e expressão da ChAP (*Cynara humilis* Aspartic Proteinase) no gineceu de *C. humilis* utilizaram-se flores em diferentes estádios de desenvolvimento. Os estádios correspondentes às diferentes colheitas, realizadas entre Abril e Junho de 2001, estão representados na figura 4.1 e 4.2.

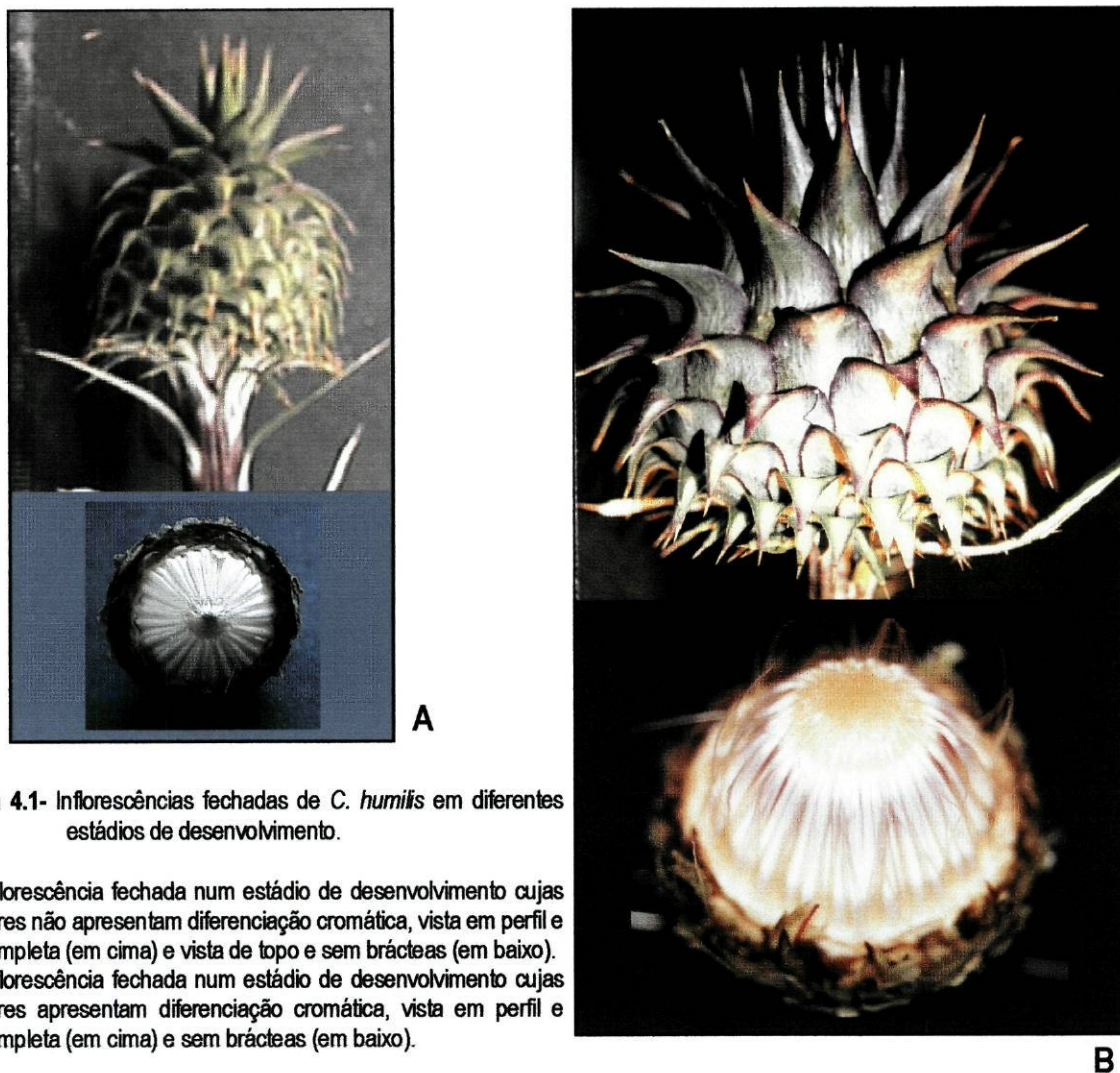


Figura 4.1- Inflorescências fechadas de *C. humilis* em diferentes estádios de desenvolvimento.

- A - Inflorescência fechada num estágio de desenvolvimento cujas flores não apresentam diferenciação cromática, vista em perfil e completa (em cima) e vista de topo e sem brácteas (em baixo).
- B - Inflorescência fechada num estágio de desenvolvimento cujas flores apresentam diferenciação cromática, vista em perfil e completa (em cima) e sem brácteas (em baixo).

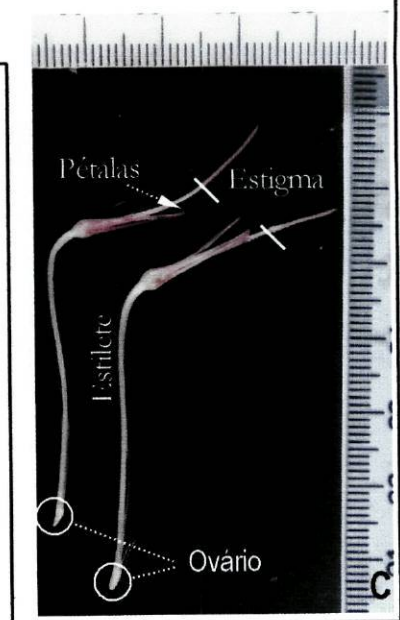


Figura 4.2- Inflorescência aberta de *C. humilis*.

A-Inflorescência completa

B-Inflorescência após a extração das brácteas. A inflorescência apresenta dois tipos de flores: as externas e as internas. As flores externas são maiores apresentando um tamanho médio de 6 cm.

C-Aspecto da flor isolada.



Para o estudo da localização utilizaram-se flores de inflorescência fechada com diferenciação de coloração nas flores (figura 4.1B) e flores de inflorescência aberta (figura 4.2). No estudo da expressão usaram-se flores dos três estádios de desenvolvimento.

O ESTIGMA

O estigma das flores de *C. humilis* é longo (figura 4.2), maciço e do tipo papilar, apresentando duas chanfraduras longitudinais. As papilas estão localizadas externamente a um conjunto de células de parênquima que circundam tecidos como o esclerênquima e os feixes vasculares. Na região central da estrutura, situa-se o tecido de transmissão (figura 4.3).

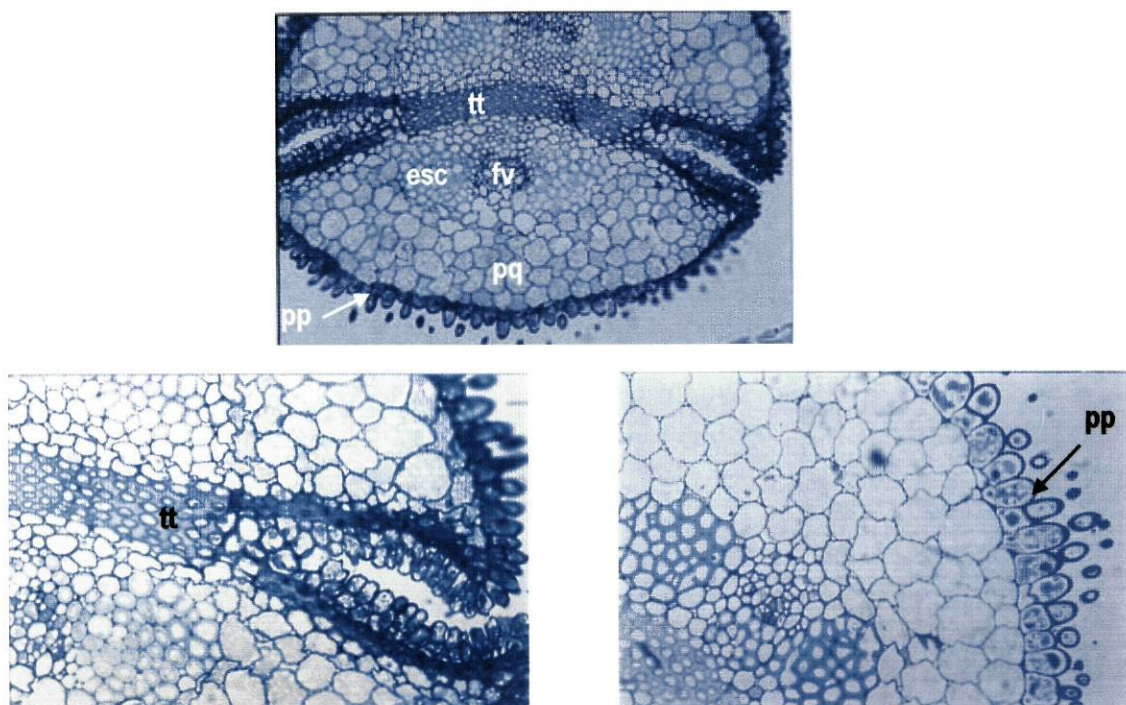


Figura 4.3 – Anatomia do estigma de *C. humilis*.

- A - secção transversal do estigma, mostrando as duas chanfraduras estigmáticas e a epiderme do tipo papilar (128x);
 B – ampliação da região da chanfradura (260x);
 C – ampliação da região da papila (tt) (260x).
 esc-esclerênquima, pp-papila, pq-parênquima, fv-feixe vascular

Em microscopia electrónica de transmissão (M.E.T.) verifica-se que as papilas epidérmicas (figura 4.4) são unicelulares e lisas, sendo a sua parede coberta por uma cutícula; estas células possuem um citoplasma rico em ribossomas, mitocôndrias e vacúolos de armazenamento de proteínas que ocupam a maior parte do volume da célula.

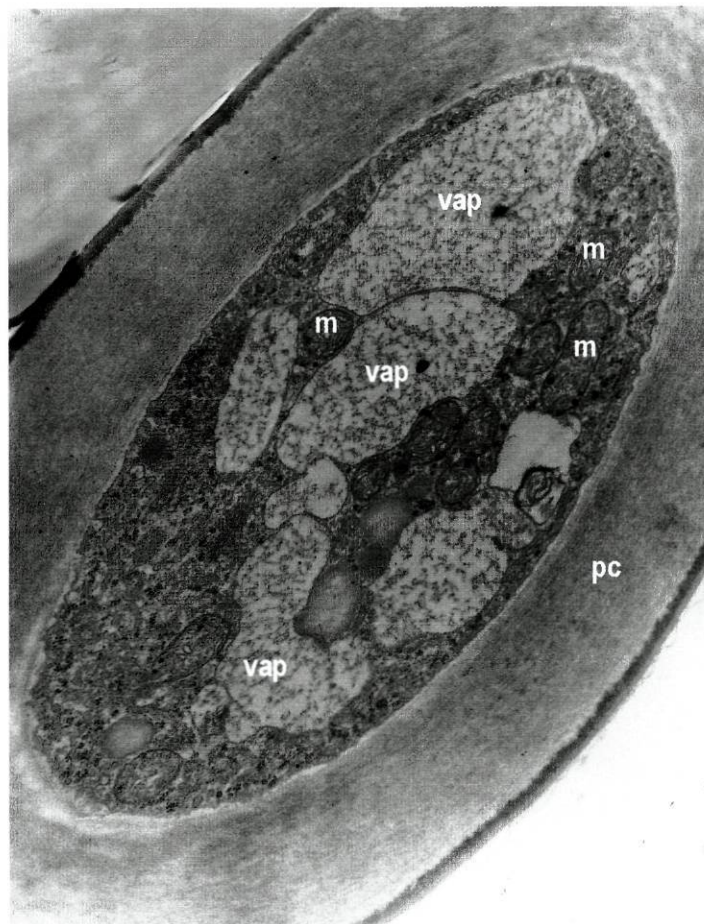


Figura 4.4 – Aspectos ultraestruturais de papila epidérmica, evidenciando os vacúolos de armazenamento de proteínas (vap), as mitocôndrias (m) e a parede celular (pc) (15000x).

O ESTILETE

O estilete (figura 4.5) é do tipo sólido, isto é o tecido de transmissão ocupa a região central e as células secretoras estão alinhadas e separadas por espaços intercelulares preenchidos com secreções. Segundo Vennigerholz (1992) o estilete sólido é característico da maioria das dicotiledóneas. Apresenta, ainda, uma epiderme revestida por uma cutícula espessa e constituída por uma única camada de células (figura 4.6); internamente, situam-se várias camadas de células de parênquima vacuolizadas; a ladear o tecido de transmissão encontram-se os dois feixes vasculares e o tecido de suporte (esclerênquima).

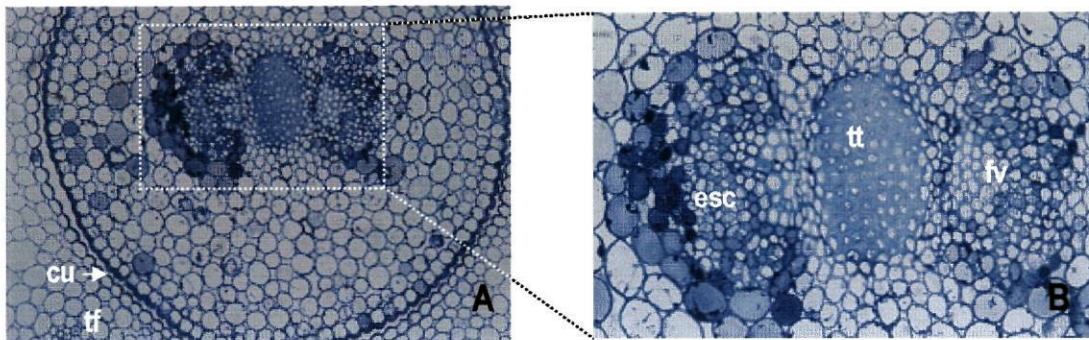


Figura 4.5 – Anatomia do estilete de *C. humilis*.

- A - secção transversal de estilete, revestido por uma epiderme coberta por uma cutícula (cu) espessa; externamente, encontra-se o tubo floral (tf) (128x);
 B - região central da estrutura, ocupada por tecido de transmissão (tt) rodeado por feixes vasculares (fv) e esclerênquima (esc) (260x);

Em secção transversal, as células corticais surgem com uma forma arredondada e têm um volume maior que as outras células do estilete. Apresentam uma estreita faixa de citoplasma devido ao grande vacúolo que ocupa quase a totalidade da célula. As células do tecido de transmissão são células secretoras que segregam substâncias para os espaços intercelulares, importantes para o desenvolvimento do tubo polínico; como por exemplo as pectinas (Vennigerholz, 1992).

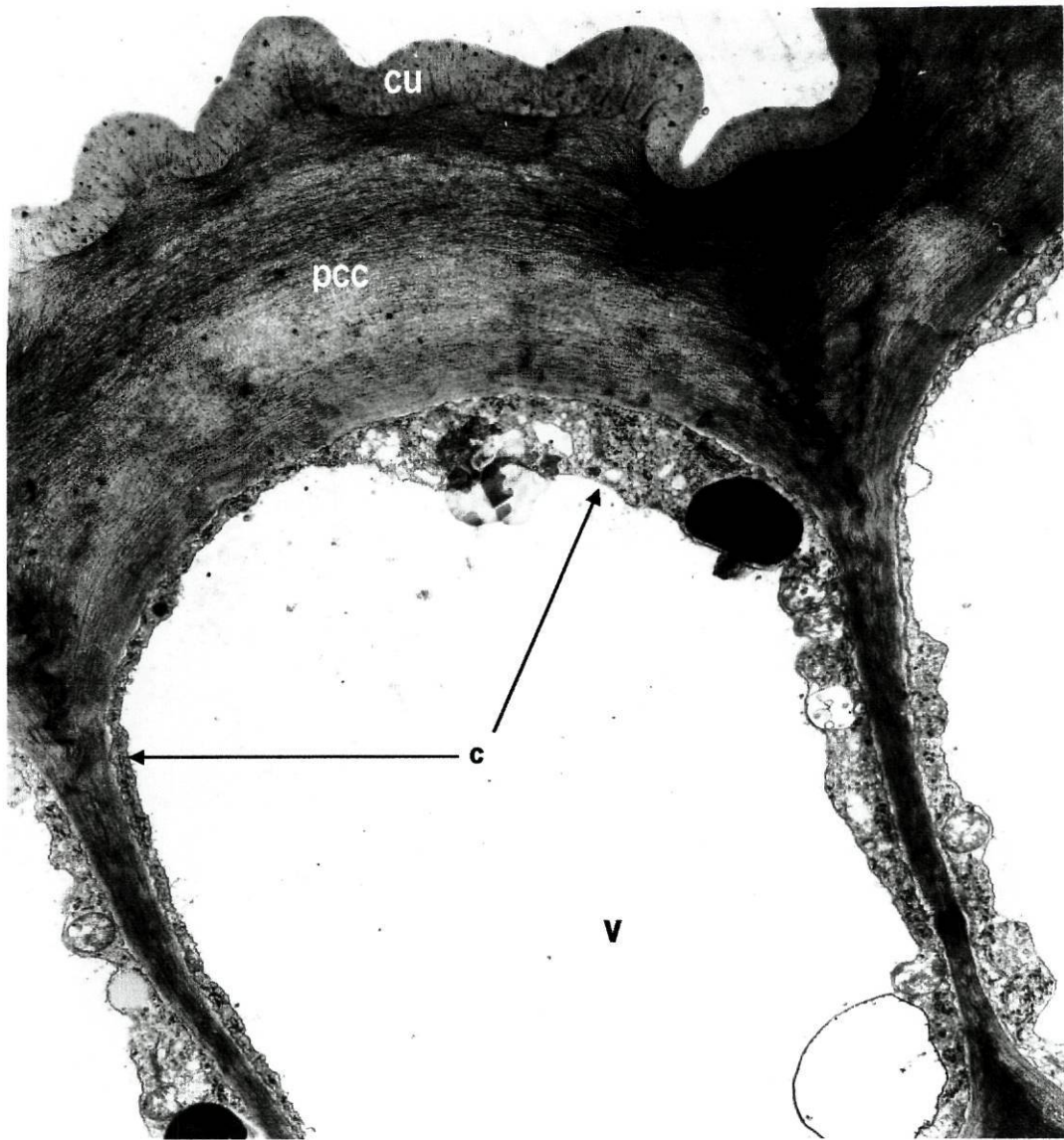


Figura 4.6 - Aspectos ultraestruturais de célula epidérmica, maioritariamente ocupada por um volumoso vacúolo (v) (9000x).
cu-cutícula, pcc-parede celular cutinizada, c-citoplasma

O OVÁRIO

O ovário de *C. humilis* é constituído por um único óvulo com placentação basal. O óvulo, do tipo anátropo (figura 4.7), é formado pelo nucelo, no interior do qual se desenvolve o megasporócito e subsequentemente o saco embrionário (figura 4.8 e 4.9), a rodeá-lo surge um único tegumento.



Figura 4.7 - A – Anatomia do óvulo de *C. humilis* (90x). O óvulo, ligado à placenta pelo funículo, está completamente invertido – anátropo.

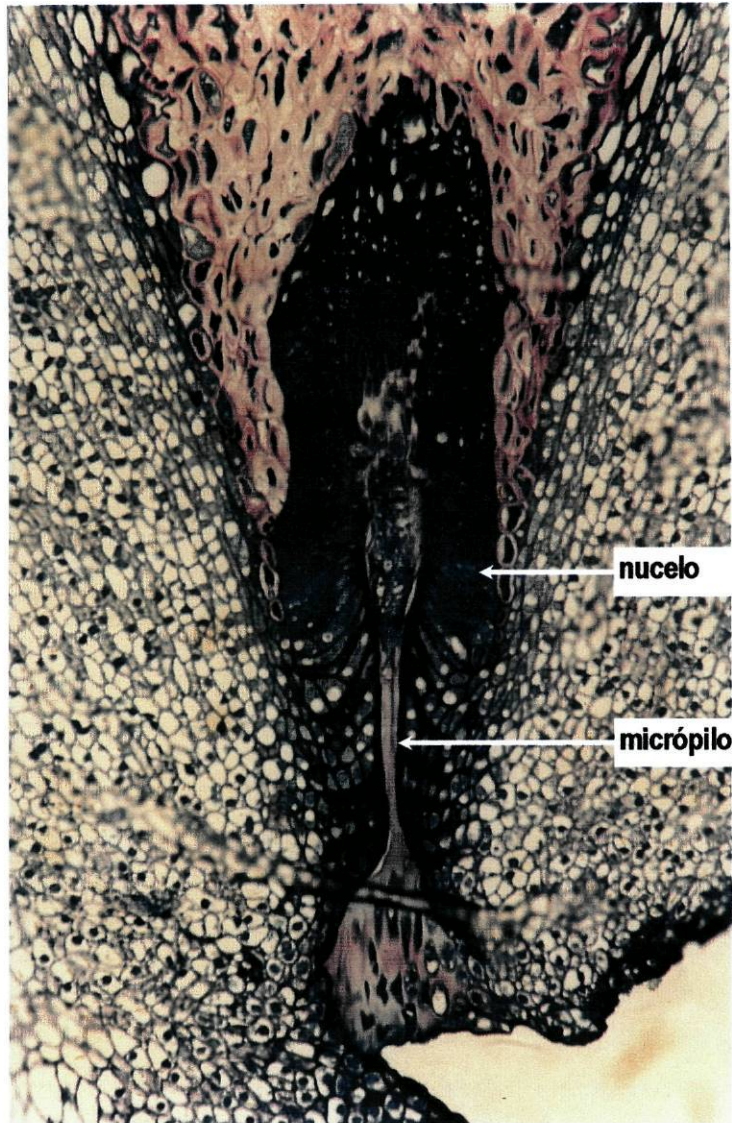


Figura 4.8 - A – Fotografia do óvulo evidenciando a região micropilar (225x).

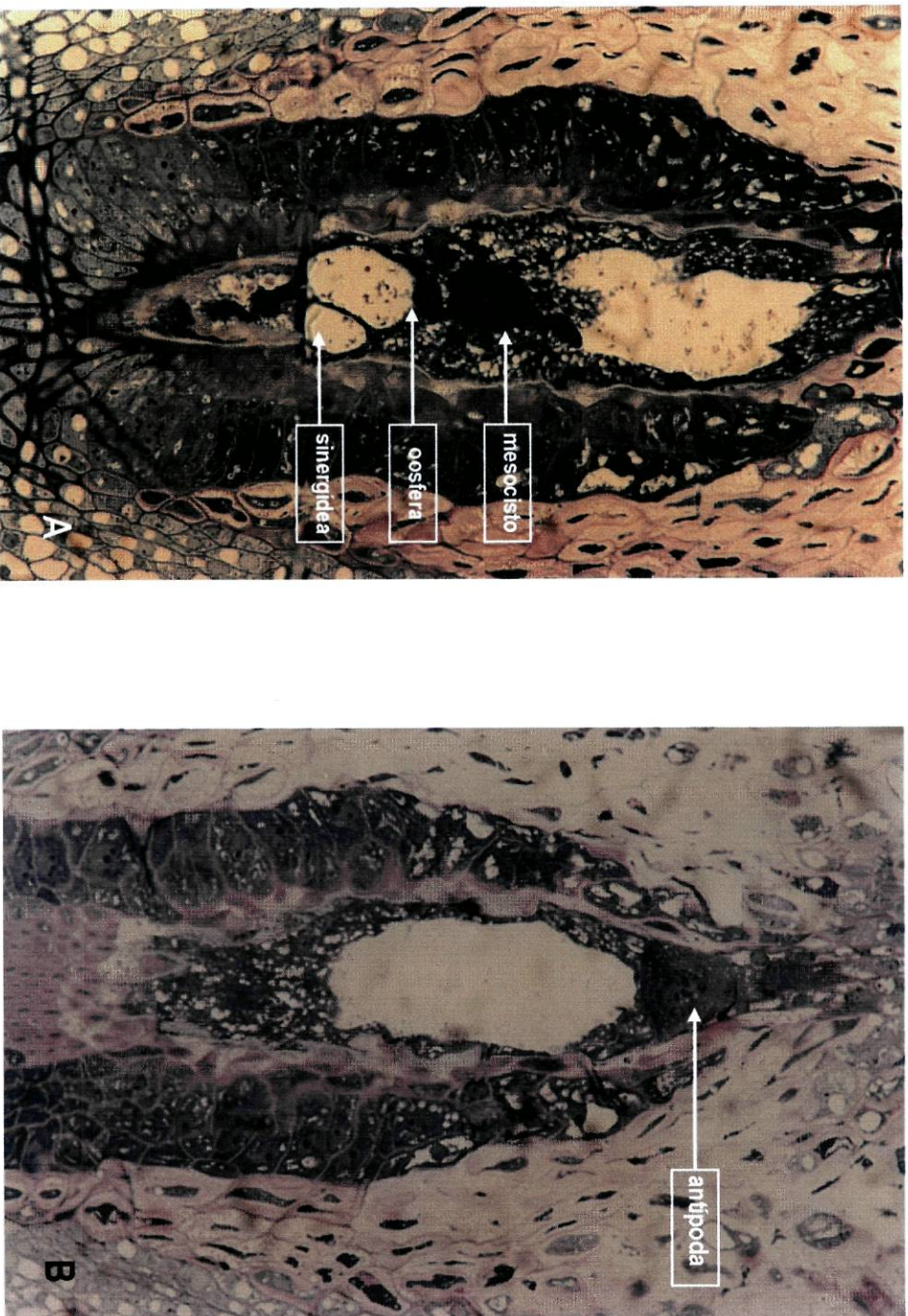


Figura 4.9 - A - Aspectos estruturais do saco embrionário. As fotografias representam seções do mesmo óvulo em diferentes posições, sendo por isso possível observar diversas estruturas. **A-** observação do mesocisto, oosfera e sinergídea (200x), **B-** observação de uma antípoda com o núcleo em degradação. (200x)

4.2 Imunolocalização da ChAP no pistilo

Para determinar a distribuição da ChAP nos diferentes órgãos que constituem o pistilo, ao longo do seu desenvolvimento, foram realizadas análises de imunohistoquímica e de imunocitoquímica. Estas técnicas de imunolocalização são particularmente importantes quando associadas a estudos bioquímicos e fisiológicos, uma vez que ilustram as vias de acumulação de proteínas específicas, durante a diferenciação celular e desenvolvimento tecidual.

A imunolocalização da ChAP no estigma, estilete e ovário de *C. humilis* foi realizada usando anticorpos que reconhecem a quase totalidade da sequência da cardosina A - Anti-recombinante A - ou que reconhecem sequências específicas - Anti-A1 e Anti-A2 (figura 4.10). O alinhamento das sequências aminoacídicas da ChAP e da cardosina A (figura 4.10) revela que estas enzimas possuem um elevado grau de homologia, apresentando cerca de 94% de similaridade o que permite considerar que os anticorpos usados nestes estudos de imunolocalização, apesar de serem dirigidos especificamente contra a cardosina A, reconhecem a ChAP.

A principal diferença entre as duas sequências reside no facto de a ChAP ter perdido três aminoácidos no seu prosegmento e as outras diferenças são encontradas junto ao local activo da enzima (Mendes, 1997). O prosegmento encontra-se geralmente associado à activação e processamento de enzimas maduras (Fukuda *et al.*, 1993) e a sua remoção é supostamente efectuada através de um mecanismo intramolecular (Lin *et al.*, 1989); assim sendo, é possível que as variações observadas na sequência pró das duas enzimas se manifestem em diferenças no enrolamento da proteína. As variações observadas no local activo de ambas as cadeias de 15 e 31 kDa podem contribuir para as diferenças das propriedades cinéticas apresentadas por estas PAs (Mendes, 1997; Veríssimo *et al.*, 1998).

PPChAP	MGTS IKANVLALFL FYLLS PTVFS VSDDGLIRIGLKKRKVD---QLGRRALMEGNARKD	57
PPcardosinA	MGTS IKANVLALFL FYLLS PTVFS <u>VSDDGLIRIGL</u> , <u>KKRKYDRIDOLRGR</u> <u>RALMEGNARKD</u>	60
PPChAP	FGFRGTVRD SGSAYVALTMDRGTS YFGEI GIGTP POKFTVIFDTGSSVLWMPSSKCINSK	117
PPcardosinA	<u>FGFRGTVRD</u> <u>SGSAYVALTMDRDT</u> S YFGEI GIGTP POKFTVIFDTGSSVLWMPSSKCINSK	120
	*	
PPChAP	VCRAHSMYE SSD SSTYKENGTFGAILYGTGSITGFFSQDVTVTIGDLVVKEQDFIEATDET	177
PPcardosinA	<u>ACRAHSMYE</u> <u>SSD</u> <u>SSTYKENGTFGAILYGTGSITG</u> <u>FFSOD</u> <u>SVTIGDLVVKEODFIEATDEA</u>	180
PPChAP	DNVFLHRLFDGILGLSFQTI SVPPVWYNMLHQGLVKERRFSFWLNRNVDEEEGGELY	233
PPcardosinA	<u>DNVFLHRLFDGILGLSFQTI</u> <u>SVPPVWYNML</u> <u>NOGLVKERRFSFWLNRNVDEEEGGELY</u>	236
PPChAP	FGGVDPNHFRGDHTYVPVTYQYYWQFAIGDVLIGDKSTGFCAPGCOAYADSGT SVLAGPT	293
PPcardosinA	<u>FGGLDPNHFRGDHTYVPVTYQYYW</u> <u>QFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCOAFA</u> <u>ADSGT</u> <u>SVLLSGPT</u>	296
PPChAP	AIVTQINHA IGANGVMNQCKTVV SRYGRDIIEMLRSKI QPDKI CSHMKLCTFDGARDVS	353
PPcardosinA	<u>AIVTQINHA IGANGVMNQCKTVV</u> <u>SRYGRDIIEMLRSKI</u> <u>QPDKI CSHMKLCTFDGARDVS</u>	356
PPChAP	SNIE SVVDKNNDKS SGGIHDE MCTFCEMA VVWQNEIKRSETEDNIINYANELCAHLS TS	413
PPcardosinA	<u>SIIE SVVDKNNDKS SGGIHDE</u> <u>MCTFCEMA VVWQNEIKR</u> <u>SETEDNIINYANEL</u> <u>CEHLS</u> <u>TS</u>	416
	*	
PPChAP	SEELQVDCNTLSSMPNVSFTIGGKKFGLTPEQYI LKVGKGEATQCISGFTAMDAT-LLGP	472
PPcardosinA	<u>SEELQVDCNTLSSMPNVSFTIGGKKFGLT</u> <u>PEQYI LKVGKGEATQCISGFTAMDAT-LLGP</u>	475
PPChAP	LWILGDVFMRPYHTVFDYGNLLVGF AFAA	501
PPcardosinA	<u>LWILGDVFMRPYHTVFDYGNLLVGF</u> <u>AFAA</u>	504

Figura 4.10 - Alinhamento das seqüências aminoácidas das formas precursoras da ChAP e da cardosina A.

As seqüências pré e pró estão a verde e a cor de laranja, respectivamente. Os locais activos estão assinalados dentro do rectângulo preto enquanto que os locais de N-glicosilação estão assinalados com um asterisco (*). O PSI está indicado a azul e a seqüência RGD a vermelho.

As seqüências delimitadas pelo rectângulo verde e pelo rectângulo azul representam as zonas reconhecidas pelos anticorpos Anti-A1 e Anti-A2, respectivamente. A seqüência sublinhada é a zona reconhecida pelo anticorpo Anti-recombinante A.

As secções de estigma provenientes de flores de inflorescência fechada e aberta incubadas com o anticorpo anti-recombinante A (Anti-rec. A) e Anti-A1 revelaram uma reacção de cor nas papilas e nas células de parênquima sub-epidérmico denotando uma coloração mais intensa nos cortes de inflorescência aberta. As secções controlo das mesmas estruturas não evidenciam qualquer marcação (figura 4.11).

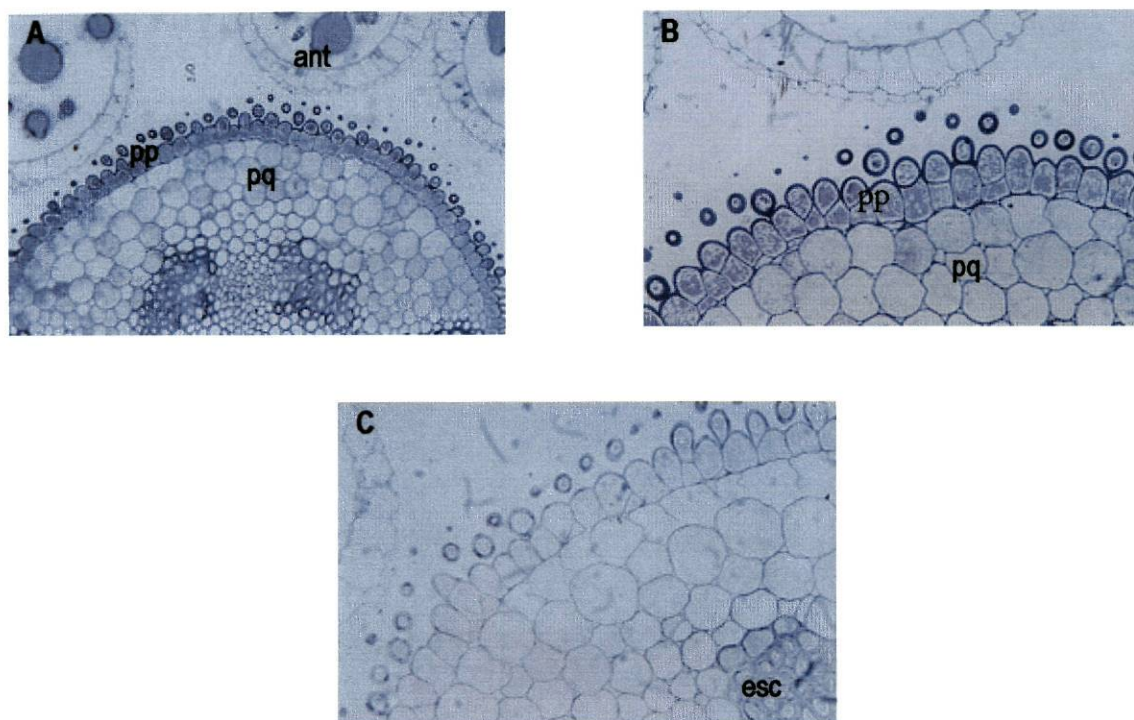


Figura 4.11 - Imunolocalização da ChAP, por microscopia óptica, do estigma de flores de inflorescência aberta de *C. humilis*, utilizando o anticorpo Anti-RecA.

A - Secção transversal de estigma, rodeado pelas anteras (ant), evidenciando marcação nas papilas epidérmicas (pp) e nas células do parênquima subepidérmico (pq). (64x);

B - pomenor das papilas epidérmicas (pp) marcadas com o anticorpo anti-A rec (260x);

C - controlo (260x), as células constituintes do estigma não denotam marcação
esc-esclerênquima

Secções de estilete provenientes de flores de inflorescência fechada e aberta incubadas com o anticorpo anti-recombinante A e Anti-A1 revelaram uma reacção de cor na epiderme. Secções controlo das mesmas estruturas não evidenciam qualquer marcação (figura 4.12).

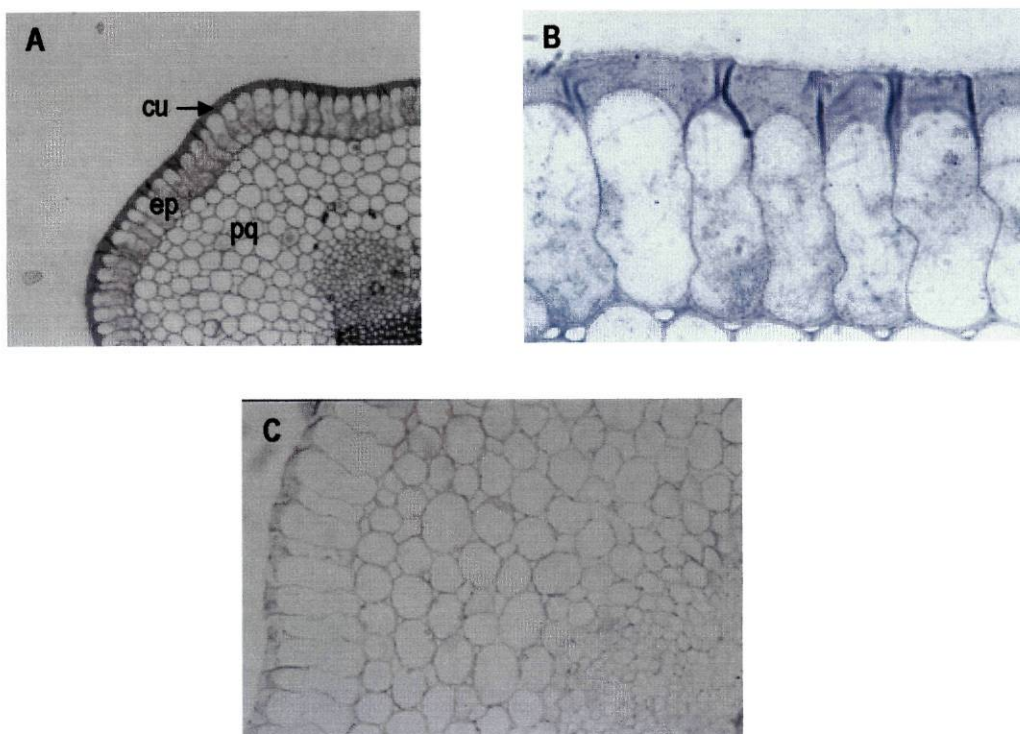


Figura 4.12 - Imunolocalização da ChAP, por microscopia óptica, no estilete de *C. humilis* utilizando o anticorpo anti-RecA.

A - secção transversal de estilete revelando marcação na epiderme (ep), (cu) cutícula, (pq) parênquima (128x);

B – ampliação da epiderme (640x), onde se observa uma marcação difusa do conteúdo celular;

C - controlo (128x), as células do estilete não denotam marcação.

Secções de ovário provenientes de flores de inflorescência aberta incubadas com o anticorpo Anti-A2 não revelaram reacção de cor (figura 4.13).



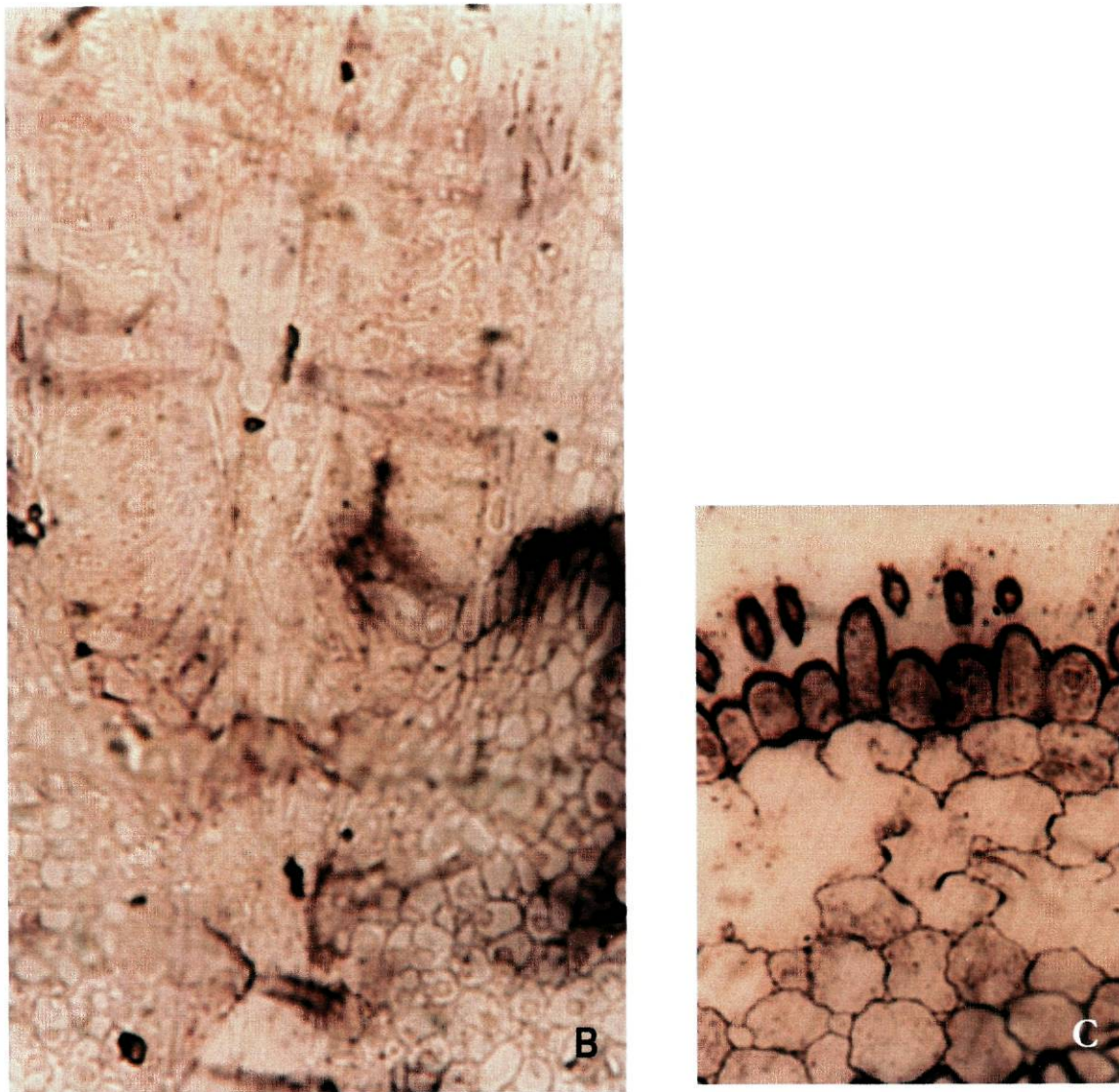


Figura 4.13 - Imunolocalização da ChAP, por microscopia óptica, no ovário de *C. humilis*.

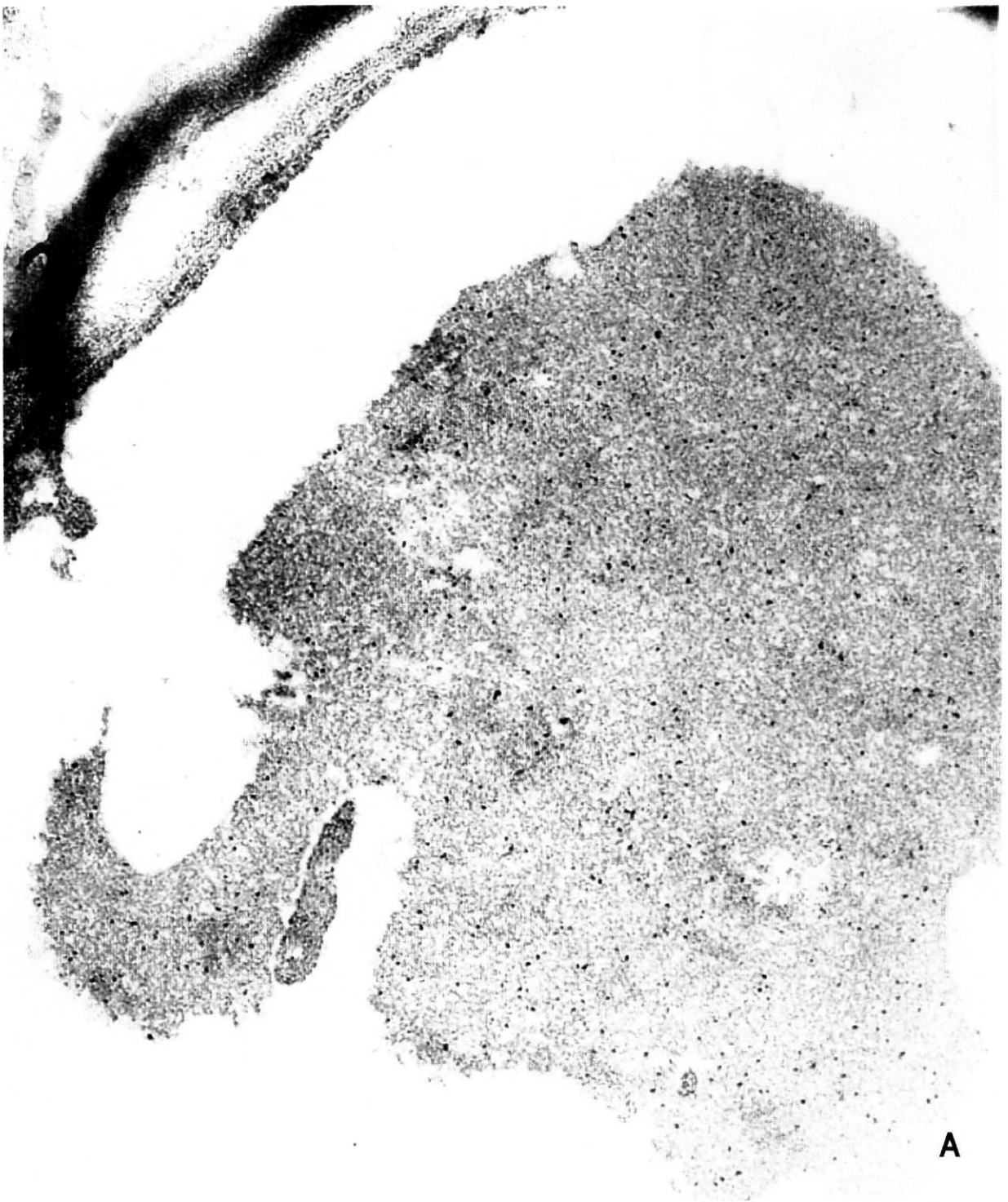
A-Ovário incubado com o anticorpo Anti-A2, não se visualizando qualquer marcação (114x).

B-Controlo (450x)

C-Controlo positivo (450x). Para mostrar que a reacção ocorreria se a proteína estivesse presente, utilizou-se cortes de estigma.

A nível de M.E.T., a incubação com o anticorpo anti-A1 revela uma marcação essencialmente confinada aos enormes vacúolos de armazenamento de proteínas presentes nas papilas epidérmicas (figura 4.14A). A presença de alguns grãos de ouro no tecido de transmissão, quer de estigma quer de estilete (figura 4.15A), não é significativa. A incubação das secções controlo quer com a solução de bloqueio (figura 4.14B e 4.15B) quer com o soro não-imune, em substituição do anticorpo primário, não conduziu a nenhuma marcação apreciável.

As análises de imunohistoquímica e de imunocitoquímica em estigma, estilete e ovário mostraram que a ChAP se acumula principalmente nos volumosos vacúolos de armazenamento de proteínas localizados nas papilas estigmáticas e também, embora de um modo menos abundante, no parênquima subepidérmico do estigma e na epiderme do estilete. A ChAP, tal como a cardosina A é uma proteína predominantemente vacuolar.



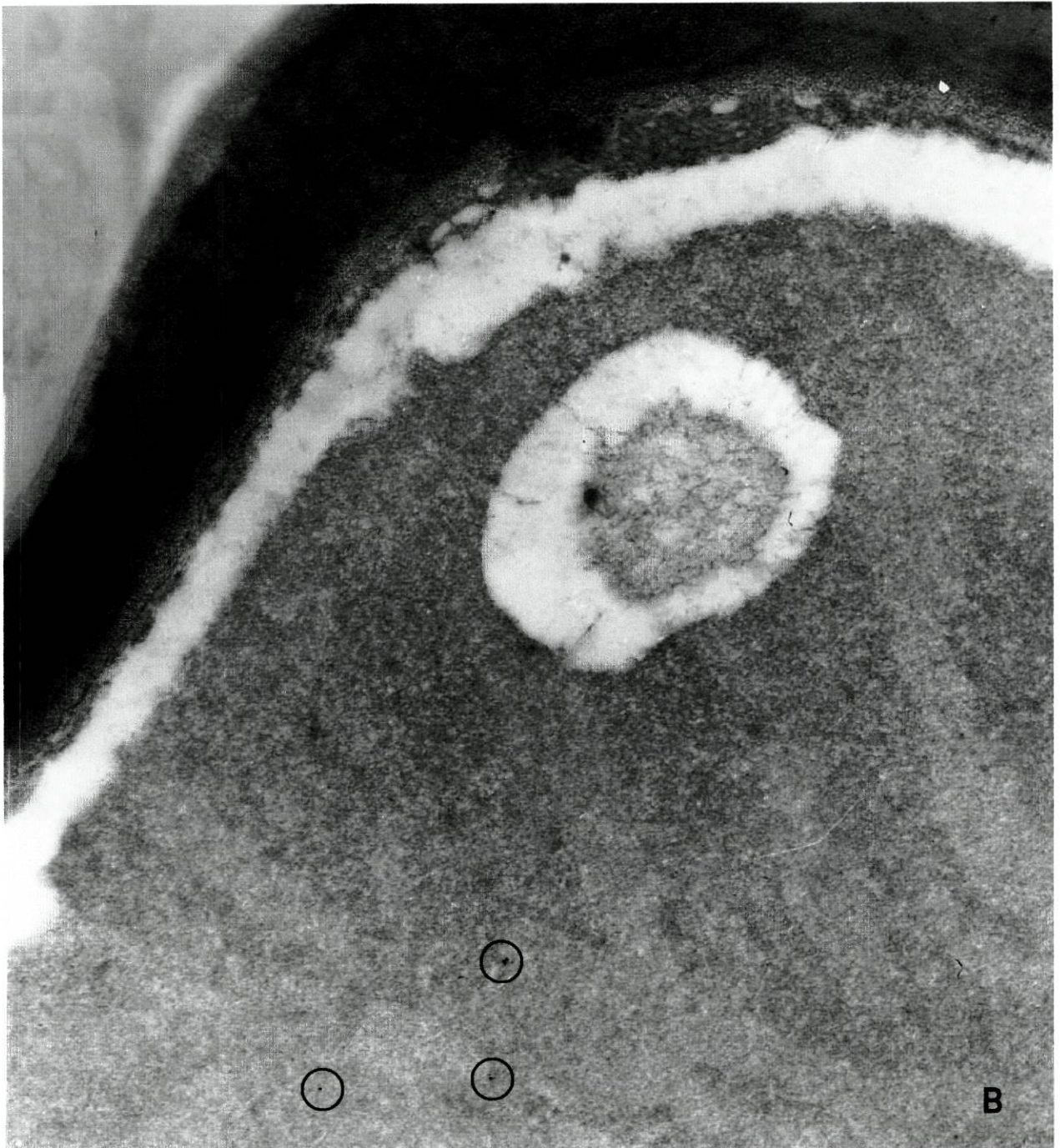


Figura 4.14 - Imunolocalização da ChAP, por microscopia electrónica, na papila epidérmica.

A – papila epidérmica revelando marcação intensa no interior do vacúolo (28500x).
B – Controlo (27000x)

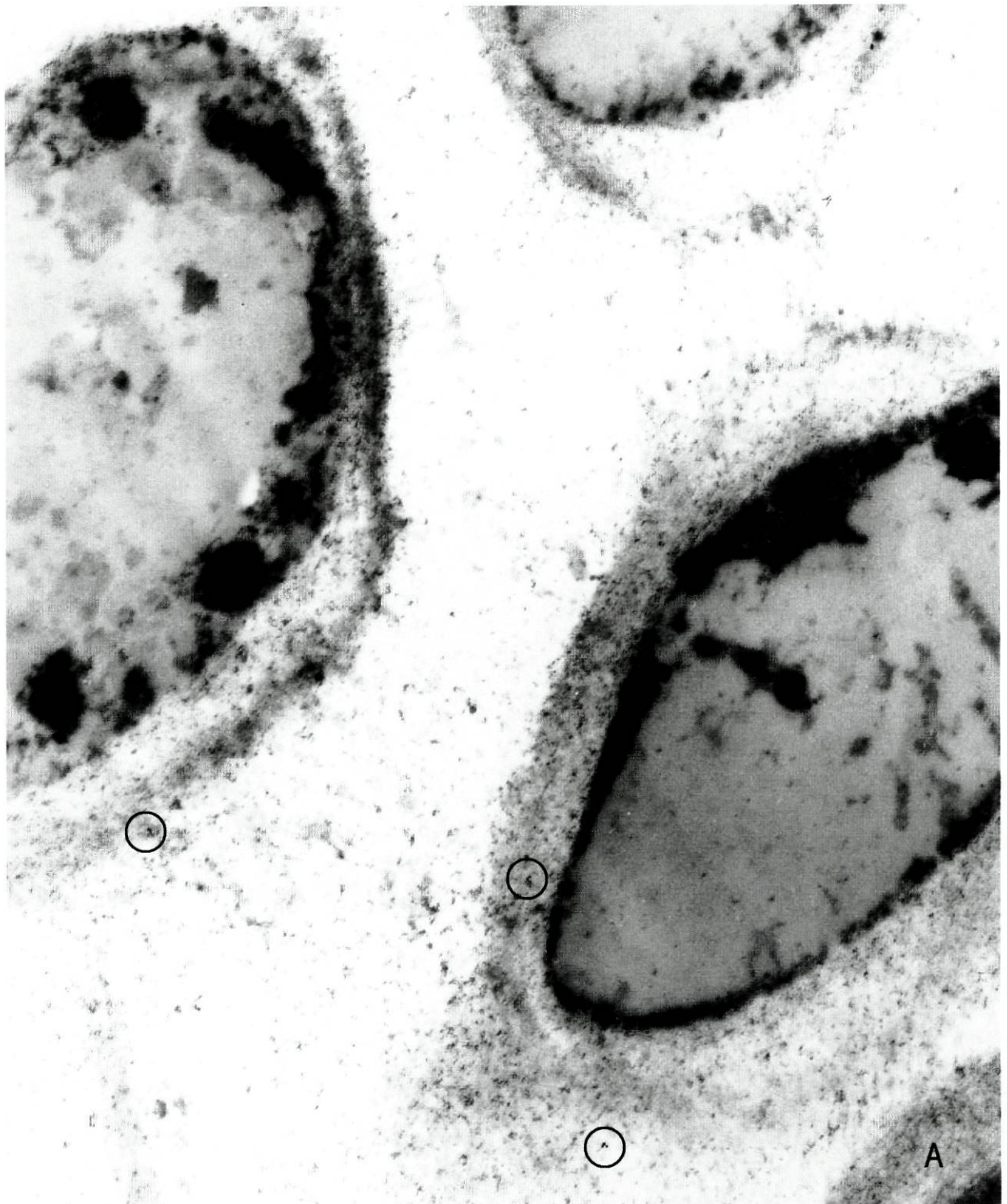




Figura 4.15 - Imunolocalização da ChAP, por microscopia electrónica, no tecido de transmissão.

A – tecido de transmissão, não evidenciando marcação relevante (27000x)
B – controlo (21600x).

4.3 Expressão do mRNA da ChAP durante o desenvolvimento floral

Uma vez que esta PA é abundante nas flores, a expressão do seu mRNA foi avaliada quer em inflorescências em diferentes estádios de desenvolvimento quer em diferentes órgãos do gineceu. Assim, o estudo da expressão do mRNA da ChAP foi efectuado em: **1)** flores indiferenciadas de inflorescência fechada (figura 4.1A), **2)** no estigma, estilete e ovário de flores de inflorescência fechada (figura 4.1B) e **3)** no estigma, estilete e ovário de flores de inflorescência aberta (figura 4.2)

A avaliação da expressão da ChAP foi analisada por RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction). Esta técnica baseia-se na utilização da enzima transcriptase reversa, que sintetiza a primeira cadeia de cDNA usando uma cadeia de mRNA como molde, combinada com uma subsequente amplificação por PCR, permitindo a detecção de mRNA pouco abundantes. O sucesso e a especificidade desta amplificação dependem da escolha do conjunto de primers apropriados. Neste estudo, os primers utilizados, embora específicos para a cardosina A, apresentam uma elevada homologia para a sequência do cDNA da ChAP. Usando este conjunto de primers na reacção RT-PCR e assumindo que a amplificação é efectuada com sucesso, espera-se obter um fragmento de cDNA da ChAP de tamanho de 429 bp.

Os resultados indicam a presença de mRNA em todos os órgãos do pistilo no estágio de inflorescência fechada (figura 4.16) e ausência de mRNA nos órgãos do pistilo no estágio de inflorescência aberta. Os dados obtidos são semelhantes aos encontrados para *C. cardunculus*. Estes resultados sugerem que há uma expressão diferencial do mRNA desta PA ao longo do pistilo de *C. humilis* e que esta expressão parece ser regulada durante o desenvolvimento.

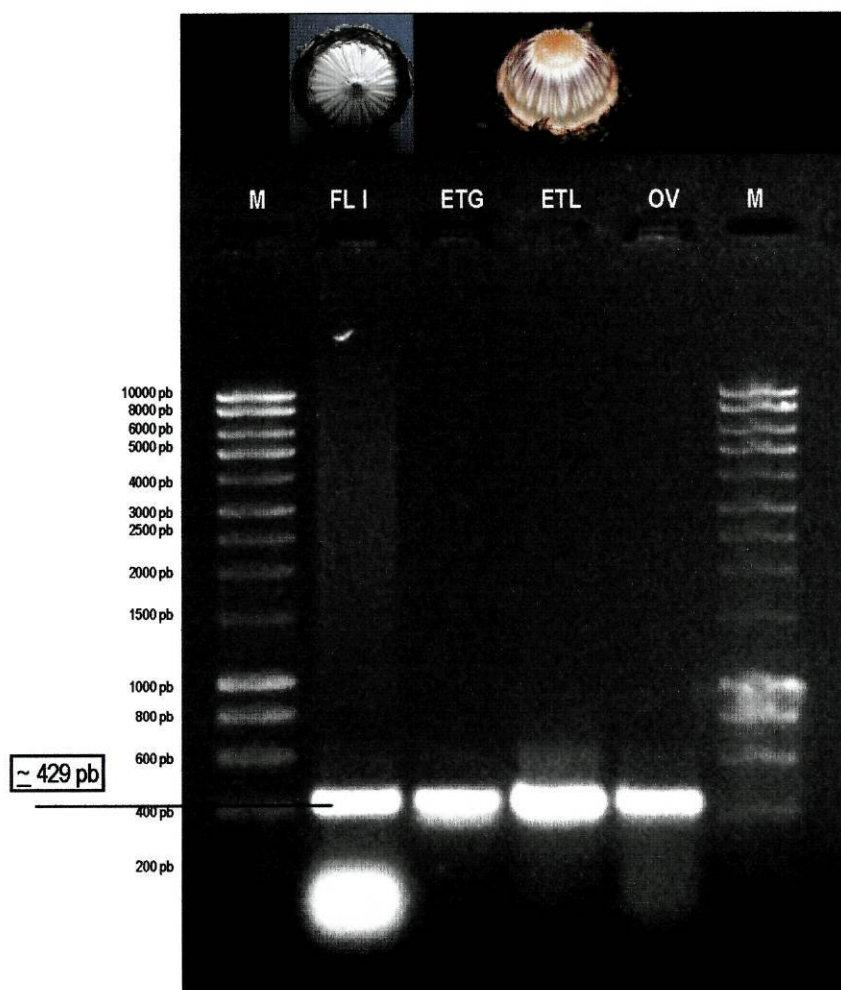


Figura 4.16 - Electroforese em gel de agarose 0.8% do produto resultante da amplificação por RT-PCR do mRNA parcial da ChAP.

M – Marcador (M) HyperLadder I (Bioline, HYPL1200);
 FL I - Flores indiferenciadas de inflorescência fechada;
 ETG - Estigma de flores de inflorescência fechada;
 ETL -Estilete de flores de inflorescência fechada;
 OV - Ovário de flores de inflorescência fechada;
 M - Marcador (M) HyperLadder I (Bioline, HYPL1200)

4.4 Acumulação da ChAP ao longo do desenvolvimento floral

Para analisar a acumulação da ChAP ao longo do desenvolvimento floral, foram realizadas análises de Western blotting usando o anticorpo anti-A1 e Anti-A2. O "western blotting" é uma técnica extremamente útil que permite a identificação e quantificação de proteínas específicas em misturas complexas de proteínas não marcadas radioativamente; uma das suas principais vantagens consiste em eliminar problemas relacionados com a solubilização, agregação e co-precipitação da proteína de interesse com outras proteínas.

O estudo da acumulação da proteína foi efectuado quer em inflorescências em diferentes estádios de desenvolvimento quer em diferentes órgãos, tal como na avaliação da expressão do mRNA da enzima.

A análise de imunotransferência permitiu detectar a sequência proteica de 60 kDa quer nas diferentes estruturas do pistilo quer em todos os estádios de desenvolvimento floral estudados (figura 4.17). Dado o tamanho estimado, esta sequência corresponderá à forma imatura - proenzima.

Foi, ainda detectada uma banda mais ténue no estigma de flores de inflorescência aberta, com um tamanho aproximado de 30 kDa. Esta banda deve corresponder à sequência constituída pelo PSI e pela cadeia menor da enzima, uma vez que o peptídeo reconhecido pelo anticorpo A1 está inserido na cadeia menor da enzima que tem um tamanho de 15 kDa.

Esta proteína parece, então, expressar-se desde os estádios de desenvolvimento floral iniciais; atendendo que se detectou a forma imatura da enzima em todos os estádios de desenvolvimento. Todavia o processamento proteolítico desta enzima parece ocorrer em estádios de desenvolvimento floral mais avançados – inflorescência aberta - porque só nesse estágio é que se observou a forma intermediária da enzima.

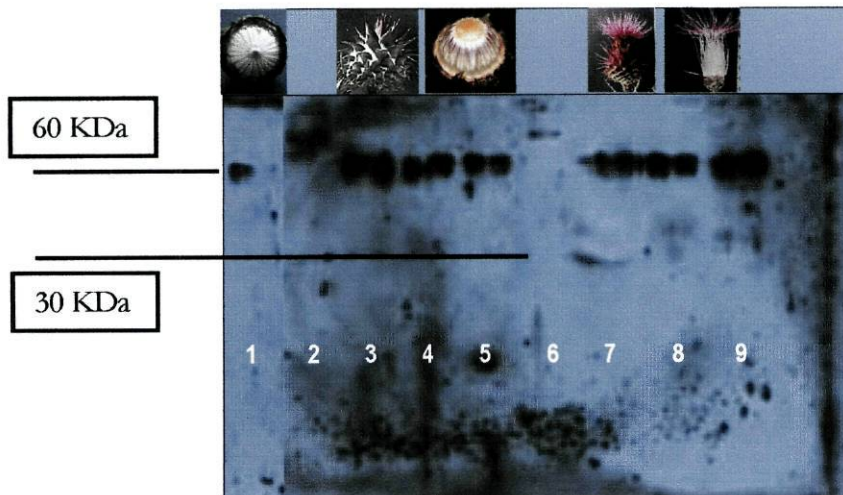


Figura 4.17 – Autoradiografia da membrana submetida a western blotting usando o anticorpo Anti-A1. Observação de uma banda ao nível dos 60 kDa em todas as pistas de amostras e de uma banda de 30 kDa na pista 7.

- pista 1 – flores indiferenciadas de inflorescência fechada
- pista 2 – Marcador, SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (BIO-RAD, 161-0304).
- pista 3 - estigma de flores de inflorescência fechada
- pista 4 - estilete de flores de inflorescência fechada
- pista 5 - ovário de flores de inflorescência fechada
- pista 6 - Marcador, SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (BIO-RAD, 161-0304).
- pista 7 - estigma de flores de inflorescência aberta
- pista 8 - estilete de flores de inflorescência aberta
- pista 9 - ovário de flores de inflorescência aberta

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O conhecimento da anatomia do órgão, onde uma nova proteína de função desconhecida se acumula, é fundamental quando se pretende determinar a localização histológica e citológica dessa proteína. Nesse sentido, procedeu-se à caracterização estrutural do estigma, estilete e ovário das flores de *C. humilis*.

O estudo da anatomia do estigma de *C. humilis* mostrou que este é longo, maciço e do tipo papilar, apresentando duas chanfraduras longitudinais. As papilas estigmáticas revestem um conjunto de células de parênquima que circundam tecidos como o esclerênquima e os feixes vasculares; na região central, localiza-se o tecido de transmissão. As papilas epidérmicas são unicelulares, lisas e possuem uma parede coberta por uma cutícula e a maior parte do seu volume celular é ocupado por volumosos vacúolos de armazenamento de proteínas (VAP).

O estilete, do tipo sólido, possui uma epiderme constituída por uma única camada de células revestidas por uma cutícula espessa; internamente, localizam-se várias camadas de células de parênquima vacuolizadas e, na região central, encontra-se o tecido de transmissão rodeado em ambos os lados por dois feixes vasculares e tecido de suporte. As células corticais, de forma arredondada, apresentam uma fina camada de citoplasma adjacente à parede celular, devido à presença de um enorme vacúolo. O tecido de transmissão que surge no centro da estrutura é constituído por células de forma circular que possuem uma parede fibrilar espessa, laxamente organizada.

O ovário de *C. humilis* é constituído por um único óvulo com placentação basal. O óvulo, do tipo anátropo, é formado pelo nucelo, no interior do qual se desenvolve o megasporócito e subsequentemente o saco embrionário; a rodeá-lo surge um único tegumento.

As análises de imunohistoquímica e de imunocitoquímica demonstraram que a ChAP se acumula principalmente nos volumosos vacúolos das papilas estigmáticas e também, embora de um modo muito menos abundante, nas células de parênquima subepidérmico do estigma e

na epiderme do estilete. A ChAP parece ser, assim, uma proteína predominantemente vacuolar.

As técnicas de imunolocalização são particularmente importantes quando associadas a estudos bioquímicos e fisiológicos, uma vez que ilustram as vias de acumulação de proteínas específicas, durante a diferenciação celular e o desenvolvimento tecidual. Neste sentido estudou-se a expressão do mRNA e a acumulação da proteína ao longo do desenvolvimento floral, utilizando as técnicas de RT-PCR e Western blotting, respectivamente.

A análise de inflorescências em diferentes estádios de desenvolvimento assim como de diferentes órgãos, possibilitou comparar a expressão do mRNA da ChAP. Estes resultados sugerem que há uma expressão diferencial do mRNA desta PA ao longo do pistilo de *C. humilis* sugerindo ser regulada durante o desenvolvimento.

O estudo da acumulação da proteína nas mesmas amostras permitiu identificar a forma imatura da ChAP em todos os estádios de desenvolvimento e em todos os órgãos analisados. O processamento proteolítico desta enzima ocorre, possivelmente, no estágio de desenvolvimento floral mais avançado, inflorescência aberta, pois foi só nesse estágio que se visualizou a banda correspondente à cadeia menor da proteína.

Os dados obtidos por Western blotting revelaram uma banda de 60 kDa no ovário de inflorescência fechada e aberta, todavia a proteína não foi localizada por técnicas de imunohistoquímica no óvulo. Possivelmente, a proteína expressar-se-á nas células da parede do ovário. Estudos subsequentes são necessários para o esclarecimento deste problema.

Com base nos resultados obtidos é possível levantar algumas hipóteses sobre a função ou as funções da enzima. A ChAP poderá participar: 1) em mecanismos de defesa e 2) em mecanismos de reconhecimento necessários à polinização e fecundação.

PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO

Uma vez que os estudos envolvendo as PAs presentes em *C. humilis* são ainda escassos, várias perspectivas de trabalho futuro podem ser tomadas de modo a ampliar-se o conhecimento.

Continuando o trabalho já desenvolvido em relação à ChAP, a única PA identificada até ao momento em *C. humilis*, seria importante continuar o estudo da sua localização e expressão em flores senescentes, utilizando técnicas similares de imunohistoquímica e de imunocitoquímica.

Tendo como objectivo clarificar as eventuais funções da enzima na interacção pólen-pistilo, seria também relevante tentar identificar um receptor, localizado no pólen, para os motivos de adesão, entre os quais a sequência RGD, presente na ChAP e investigar se estes receptores são, eventualmente, reconhecidos por anticorpos anti-integrinas, de modo a avaliar a similaridade do possível mecanismo de adesão. Uma outra perspectiva seria a de testar a capacidade da ChAP clivar *in vitro* proteínas da matriz extracelular de plantas, em especial do tecido de transmissão.

Particularmente importante seria o isolamento do gene da ChAP, o que não só permitiria o estudo da sua estrutura e a sua comparação com a de outros genes de PAs, vegetais ou não, como também possibilitaria a identificação da região reguladora, em particular do promotor.

A continuação do estudo da expressão do mRNA desta PA presente em *C. humilis* não só seria muito interessante como extremamente pertinente. Uma vez que o cDNA correspondente a esta enzima, foi isolado (Mendes, 1997), é possível construir sondas marcadas com, por exemplo, dioxigenina utilizando a reacção PCR. A aplicação da técnica de hibridação *in situ* permitiria determinar a distribuição espacial precisa do mRNA. Esta técnica, em conjunto com análises de imunolocalização usando anticorpos dirigidos contra os diferentes segmentos da enzima, possibilitaria determinar as vias de regulação da expressão génica e, assim, seria uma contribuição valiosa para se compreender como é que esta

regulação ocorre; por outro lado, a combinação destas duas técnicas também permitiria conhecer os passos envolvidos no processamento e transporte intracelular da proteína.

Uma vez que apenas uma PA foi identificada nas flores de *C. humilis*, seria importante investigar a existência de outras enzimas pertencentes a esta classe, o que seria possível através de técnicas de RT-PCR utilizando iniciadores desenhados a partir de sequências conservadas de outras PAs; os cDNAs assim isolados poderiam ser usados como sondas na detecção, por Northern blotting, destas enzimas durante o desenvolvimento das flores.

6. BIBLIOGRAFIA

- An, C. I., Fukusaki, E. & Kobayashi, A. (2002). Aspartic proteinases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta* **214**(5), 661-667.
- Asakura, T., Matsumoto, I., Funaki, J., Arai, S. & Abe, K. (2000). The plant aspartic proteinase-specific polypeptide insert is not directly related to the activity of oryzasin 1. *European Journal Biochemistry* **267**, 5115-5122.
- Barret, A. J. & McDonald, J. K. (1986). Nomenclature: Proteases, proteinase and peptidase. *Biochemical Journal* **237**, 935.
- Barret, A. J. (1994). Classification of peptidases. In *Methods in enzymology* (Barret, A. J., ed.), Vol. 244, pp. 1-15. Academic Press, Inc., London.
- Bell, A. A. (1981). Biochemical mechanism of disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**, 21-81.
- Belozersky, M. A., SarbaKanova, S. T. & Dunaevsky, Y. E. (1989). Aspartic proteinase from wheat seeds: isolation properties and action on gliadin. *Planta* **177**, 321-326.
- Bergey, D. R., Howe, G. A. & Ryan, C. A. (1996). Polypeptide signalling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signalling in animals. *Proc. Natl. Sci. USA* **93**, 12053-12058.
- Bernstein, N. K. & James, M. N. G. (1999). Novel ways to prevent proteolysis - prophytepsin and proplasmepsin II. *Current opinion in structural biology* **9**, 684-689.
- Bowles, D. J. (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 873-907.

- Cataldo, A. M. & Nixon, R. A. (1990). Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 3861-3865.
- Cavaillès, V., Augereau, P. & Rochefort, H. (1993). Cathepsin D gene is controlled by a mixed promoter, and estrogens stimulate only TATA-dependent transcription in breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 203-207.
- Chen, F. & Foolad, M. R. (1997). Molecular organization of a gene in barley which encodes a protein similar to aspartic protease and its specific expression in nucellar cells during degeneration. *Plant Molecular Biology* **35**, 821-831.
- Cheung, A., Wang, H. & Wu, H. (1995). A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* **82**, 383-393.
- Cheung, A. (1996). Pollen-pistil interactions in compatible pollination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 3077-3080.
- Cordeiro, M. C. A. (1993). Milk clotting enzymes from *Cynara cardunculus* spp. *flavescens* cv. *cardo*. Tese de doutoramento, Universidade de Lisboa.
- Cordeiro, M. C., Pais, M. S. & Brodelius, P. E. (1994). Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiologia Plantarum* **92**, 645-653.
- Costa, J., Ashford, D. A., Bento, I., Frazão, C., Esteves, C. L., Faro, C., Kervinen, J., Pires, E., Veríssimo, P., Wlodawer, A. & Carrondo, M. A. (1997). The glycosylation of the aspartic proteinases from barley (*Hordeum vulgare* L.) and cardoon (*Cynara cardunculus* L.). *European Journal Biochemistry* **243**, 695-700.
- Coutinho, A. X. P. (1913). *A Flora de Portugal*, Ailland, Alves & C^a, Paris.

- D'Hondt, K., Bosh, D., Van Damme, J., Goethals, M., Vandekerckhove, J. & Krebbers, E. (1993). An aspartic proteinase present in seeds cleaves Arabidopsis 2S albumin precursors in vitro. *The Journal of Biological Chemical* **268**, 20884-20891.
- D'Hondt, K., Stack, S., Gutteridge, S., Vandekerckhove, J., Krebbers, E. & Gal, S. (1997). Aspartic proteinase genes in the Brassicaceae *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **33**, 187-192.
- Davies, D. R. (1990). The Structure and function of the aspartic proteinases. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **19**, 189-215.
- Domingos, A. I. A. G. (1997). An aspartic proteinase from flowers of *Centaurea calcitrapa*: purification, molecular cloning and modelling of its three-dimensional structure. Tese de doutoramento, Universidade de Lisboa.
- Domingos, A. I. A. G., Cardoso, P. C., Xue, Z.-t., Clemente, A., Brodelius, P. E. & Pais, M. S. (2000). Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *European Journal Biochemistry* **267**, 6824-6831.
- Egas, C., Lavoura, N., resende, R., Brito, R. M. M., Pires, E., Lima, M. C. P. & Faro, C. (2000). The saposin-like domain of the plant aspartic proteinase precursor is a potent inducer of vesicle leakage. *The Journal of Biological Chemical* **275**(49), 38190-38196.
- Elpidina, E. N., Dunaevsky, Y. E. & Belozersky, M. A. (1990). Protein bodies from buckwheat seed cotyledons: isolation and characterization. *J. Exp. Bot.* **41**, 969-977.
- Faro, C., Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Pissarra, J., Ashford, D. A., Ashford, D. A., Frazão, C., Costa, J., Lin, X.-L., Tang, J. & Pires, E. (1998). Strutural and functional aspects of cardosins. In *Aspartic Proteinases* (James, ed.), pp. 423-433. Plenum Press, New York.

- Faro, C., Ramalho-Santos, M., Vieira, M., Mendes, A., Simões, J., Andrade, R., Veríssimo, P., Lin, Y., Tang, J. & Pires, E. (1999). Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, RGD-containing plant aspartic proteinase. *The Journal of Biological Chemical* **274**(40), 28724-28729.
- Fernandez-Salguero, J. & Sanjuán, E. (1999). Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. *Food chemistry* **1**, 177-183.
- Ficker, M., Wemmer, T. & Thompson, R. D. (1997). A promoter directing high-level expression in pistils of transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **35**, 425-431.
- Foltman, B. (1992). Chymosin: a short revue on foetal and neonatal gastric proteases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **52 (suppl. 210)**, 65-79.
- Franco, J. A. (1984). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*, II, Lisboa.
- Frazão, C., Bento, I., Costa, J., Soares, C. M., Veríssimo, P., Faro, C., Pires, E., Cooper, J. & Carrondo, M. A. (1999). Crystal structure of cardosin A, a glycosylated and Arg-Gly-Asp containing aspartic proteinase from the flowers of *Cynara cardunculus* L. *The Journal of Biological Chemical* **274**(39), 27694-27701.
- Fruton, J. S. (1971). The specificity and mechanism of pepsin action. *Adv. Enzymol.* **33**, 401-443.
- Fruton, J. S. (1976). The mechanism of the catalytic action of pepsin and related acid proteinases. *Adv. Enzymol.* **44**, 1-36.
- Fukuda, R., Horiuchi, H., Ohta, A. & Takagi, M. (1993). The prosequence of *Rhizopus niveus* aspartic proteinase -I supports correct folding and secretion of its mature part in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 9556-9561.
- Glathe, S., Kervinen, J., Nimtz, M., Li, G. H., Tobin, G. J., Copeland, T. D., Ashford, D. A., Wlodawer, A. & Costa, J. (1998). Transport and activation of the vacuolar aspartic

- proteinase phytepsin in barley (*Hordeum vulgare* L.). *The Journal of Biological Chemical* **273**(47), 31230-31236.
- Gomez, R., Sanchez, M. V., Ferreira, J., Tejada, L. & Fernandez-Salguero, J. (2001). Microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured using aqueous extracts of flowers from various species of cardoon *Cynara* L. *Milchwissenschaft* **56**(1), 16-19.
- Gopalan, P., Dufresne, M. J. & Warner, A. H. (1987). Thiol protease and Cathepsin D activities in selected tissues and cultured cells from normal and dystrophic mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**, 124-129.
- Gottschalk, S., Waheed, A., Schimdt, B., Laidler, P. & von Figura, K. (1989). Sequential processing of lysosomal aspartyl proteinase. *EMBO Journal* **8**, 3215-3219.
- Guevara, M. G., Oliva, C. R., Machinandiarena, M. & Daleo, G. R. (1999). Purification and properties of an aspartic protease from potato tuber that is inhibited by a basic chitinase. *Physiologia Plantarum* **106**, 164-169.
- Guevara, M. G., Daleo, G. R. & Oliva, C. R. (2001). Purification and characterization of an aspartic protease from potato leaves. *Physiologia Plantarum* **112**, 321-326.
- Hofmann, T., Hodges, R. S. & James, M. N. G. (1984). Effect of pH on the activities of penicillopepsin and *Rhizopus* pepsin and a proposal mechanism for the productive substrate binding mode in penicillopepsin. *Biochemistry* **23**, 635-643.
- Ichishima, E., Emi, M., Majima, E., Mayumi, Y., Kumagai, H., Hayashi, K. & Tomoda, K. (1992). Initial sites of insulin cleavage and stereoscopy of carboxyl proteinases from *Aspergillus sojae* and *Pycnoporus coccineus*. *Biochimica et Biophysica Acta* **700**, 247-253.
- Juniper, B. E., Robins, R. J. & Joel, D. M. (1989). *The carnivorous plants*, Academic Press, London.

- Kervinen, J., Tobin, G. J., Costa, J., Waugh, D. S., Wlodawer, A. & Zdanov, A. (1999). Crystal structure of plant aspartic proteinase prophytepsin: inactivation and vacuolar targeting. *EMBO Journal* **18**(14), 3947-3955.
- Khan, A. R. & James, M. N. G. (1998). Molecular mechanism for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Science* **7**, 799-803.
- Kumar, S. (1995). ICE-like proteinases in apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 198-202.
- Lin, X.-L., Wong, R. N. S. & Tang, J. (1989). Synthesis, purification and active site mutation of recombinant porcine pepsinogen. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 4482-4489.
- Lin, X.-L., Lin, Y.-z., Koelsch, G., Gustchina, A., Wlodawer, A. & Tang, J. (1992). Enzymic activities of two-chain pepsinogen, two-chain pepsin and the amino-terminal lobe of pepsinogen. *The Journal of Biological Chemical* **267**(24), 17257-17263.
- Marttila, S., Jones, B. L. & Mikkonen, A. (1995). Differential localization of two acid proteinases in germinating barley (*Hordeum vulgare*) seed. *Physiologia Plantarum* **93**, 317-327.
- McKeever, B. M., Navia, M. A., Fitzgerald, P. M. D., Springer, J. P., Leu, C.-T., Heimbach, J. C., Herber, W. K., Sigal, I. S. & Darke, P. L. (1989). Crystallization of the aspartyl protease from Human Immunodeficiency Virus, HIV-1. *The Journal of Biological Chemical* **264**, 1919-1921.
- Mendes, A. (1997). Cloning and heterologous expression of the milk-clotting enzyme from the flowers of *Cynara humilis* L. Tese de mestrado, Universidade de Coimbra.
- Murao, S., Ohkuni, K., Nagao, M., Hirayama, K., Fukuhara, K., Oda, K., Oyama, H. & Shin, T. (1993). Purification and characterization of kumamolysin, a novel thermostable pepstatine-insensitive carboxyl protease from *Bacillus novosp.* MN-32. *The Journal of Biological Chemical* **268**, 349-355.

- Mutlu, A. & Gal, S. (1999). Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiologia Plantarum* **105**, 569-576.
- Nasrallah, J., Nishio, T. & Nasrallah, M. (1991). The Self-Incompatibility Genes Of Brassica: Expression And Use In Genetic Ablation Of Floral Tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **42**(1), 393-422.
- Nasrallah, J. B., Stein, J. C., Kandasamy, M. K. & Nasrallah, M. E. (1994). Signaling the arrest of pollen tube development in self-incompatible plants. *Science* **266**, 1505-1508.
- Oda, K. & Murao, S. (1991). Pepstatin-insensitive carboxyl proteinases. *Adv Exp Med Biol* **306**, 185-201.
- Paris, N., Stanley, C. M., Jones, R. L. & Rogers, J. C. (1996). Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* **85**, 563-572.
- Pereira, A. S. S. (1999). Especificidade proteolítica e actividade coagulante da protease aspártica das flores de *Cynara humilis* L. : efeito da secagem tradicional. Mestrado, Universidade de Coimbra.
- Pires, E., Faro, C., Macedo, I., Esteves, C. L., Morgado, J., Veríssimo, P., Pereira, D. & Gomes, D. (1994). Flor do cardo versus quimosina no fabrico de queijos artesanais. *Quimica* **54**, 66-68.
- Radlowski, M., Kalinowski, A., Adamczyk, J., Królikowski, Z. & Bartkowiak, S. (1996). Proteolytic activity in the maize pollen wall. *Physiologia Plantarum* **98**, 172-178.
- Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Faro, C. & Pires, E. (1996). Action on bovine α_{s1} -casein of cardosins A and B, aspartic proteinases from the flowers of the cardoon *Cynara cardunculus* L. *Biochimica et Biophysica Acta*, 83-89.
- Ramalho-Santos, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Pereira, S., Salema, R., Pires, E. & Faro, C. (1997). Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein

- storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta* **203**, 204-212.
- Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Cortes, L., Samyn, B., Van Beeumen, J., Pires, E. & Faro, C. (1998). Identification and proteolytic processing of procardosin A. *European Journal Biochemistry* **255**, 133-138.
- Ramalho-Santos, M., Pissarra, J., Pires, E. & Faro, C. (1998). Cardosinogen A. In *Aspartic Proteinases* (James, ed.), pp. 253-258. Plenum Press, New York.
- Rawlings, N. D. & Barret, A. J. (1995). Proteolytic enzymes: aspartic and metallo peptidases. In *Methods in enzymology* (Barret, A. J., ed.), Vol. 248, pp. 105-120. Academic Press, California.
- Reis, L. V. (1991). Isolamento e Identificação estrutural dos constituintes químicos de *Cynara humilis*, L. Tese de Mestrado em Química orgânica, Universidade Nova de Lisboa.
- Rodrigo, I., Vera, P. & Conejero, V. (1989). Degradation of tomato pathogenesis-related proteins by an endogenous 37 kDa aspartyl endopeptidase. *European Journal Biochemistry* **184**, 663-669.
- Rodrigo, I., Vera, P., Van loon, L. C. & Conejero, V. (1991). Degradation of tobacco pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology* **95**, 616-622.
- Runeberg-Roos, P., Kervinen, J., Kovaleva, V., Raikhel, N. V. & Gal, S. (1994). The aspartic proteinase of barley is a vacuolar enzyme that processes probarley lectin in vitro. *Plant Physiology* **105**, 321-329.
- Runeberg-Roos, P. & Saarma, M. (1998). Phytpepsin, a barley vacuolar aspartic proteinase, is highly expressed during autolysis of developing tracheary elements and sieve cells. *The Plant Journal* **15**(1), 139-145.

- Ryan, C. A. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**, 425-449.
- Salema, R. & Brandão, I. (1973). The use of PIPES buffer in the fixation of plant cells for electron microscopy. *J. Submicr. Cytol.* **5**, 79-96.
- Santos, M. R. S. (1997). Localização e processamento da cardosina A. Mestrado, Universidade de Coimbra.
- Sarker, R. H., Elleman, C. J. & Dickinson, H. G. (1988). Control of pollen hydration in Brassica requires continued protein synthesis and glycosylation is necessary for intraspecific incompatibility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 4340-4344.
- Storey, R. D. & Wagner, F. W. (1986). Plant proteases: a need for uniformity. *Phytochemistry* **25**(12), 2701-2709.
- Takahashi, K., Tanokura, M., Inoue, H., Kojima, M., Muto, Y., Yamasaki, M., Makabe, O., Kimura, T., Takizawa, T., Hamaya, T., Susuki, E. & Miyano, H. (1991). Structure and function of a pepstatin-insensitive acid proteinase from *Aspergillus niger* var. Macrosporus. In *Structure and function of aspartic proteinases*, Vol. 306, pp. 203-211. Plenum Press, New York.
- Tokés, Z. A., Woon, W. C. & Chambers, S. M. (1974). Digestive enzymes secreted by the carnivorous plant *Nepenthes macfarlanei* L. *Planta* **119**, 39-46.
- Tormakangas, K., Kervinen, J., Ostman, A. & Teeri, T. (1994). Tissue-specific localization of aspartic proteinase in developing and germinating barley grains. *Planta* **1995**, 116-125.
- Tormakangas, K., Hadlington, J. L., Pimpl, P., Hillmer, S., Brandizzi, F., Teeri, T. H. & Denecke, J. (2001). A vacuolar sorting domain may also influence the way which proteins leave the endoplasmatic reticulum. *The plant cell* **13**, 2021-2032.

- Tutin, T. G. & Heywood, V. H., Eds. (1976). *Flora Europaea*. Vol. 4. Cambridge: Cambridge University Press.
- Vennigerholz, F. (1992). The transmitting tissue in *Brugmansia suaveolens*: immunocytochemical localization of pectin in the style. *Protoplasma* **171**, 117-122.
- Veríssimo, P., Faro, C., Moir, A. J. G., Lin, Y., Tang, J. & Pires, E. (1996). Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh folwers of *Cynara cardunculus* L. *European Journal Biochemistry* **235**, 762-768.
- Veríssimo, P., Ramalho-Santos, M., Pires, E. & Faro, C. (1998). A comparative study on the aspartic proteinases from different species of *Cynara*. In *Aspartic Proteinases* (James, ed.), pp. 459-463. Plenum Press, New York.
- Vieira, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Castanheira, P., Costa, Y., Pires, E. & Carlos, F. (2001). Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. *Plant Molecular Biology* **45**, 529-539.
- Wemmer, T., Kaufmann, H., Kirch, H. H., Schneider, K., Lottspeich, F. & Thompson, R. D. (1994). The most abundant soluble basic protein of the stylar transmitting tract in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Planta* **194**, 264-273.
- White, P. C., Cordeiro, M. C., Arnold, D., Brodelius, P. E. & Kay, J. (1999). Processing, activity and inhibition of recombinant cyprosin, an aspartic proteinase from cardoon (*Cynara cardunculus*). *Journal of Biological Chemistry* **274**(24), 16685-16693.
- Wilhelmi, L. & Preuss, D. (1997). Blazing new trails - pollen tube guidance in flowering plants. *Plant Physiology* **113**, 307-312.
- Wilkening, G., Linke, T. & Sandhoff, K. (1998). Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. *The Journal of Biological Chemical* **273**, 30271-30278.

- Wu, H., Wang, H. E. & Cheung, A. (1995). A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell* **82**, 395-403.
- Yang, J., Telyakov, A. & Quail, J. W. (1997). Crystal structure of the aspartic proteinase of *Rhizomucor miehei* at 2.15 Å resolution. *Journal Molecular Biology* **268**, 449-459.