

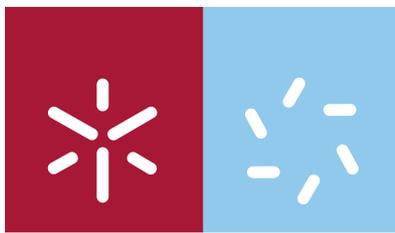
**Universidade do Minho**

Escola de Ciências



Susana Rodrigues de Abreu

**Obtenção e caracterização de linhas celulares de BY-2 a expressar cardosinas**



**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências



Susana Rodrigues de Abreu

## **Obtenção e caracterização de linhas celulares de BY-2 a expressar cardosinas**

Dissertação de Mestrado em Fisiologia Molecular de Plantas

Trabalho efectuado sob a orientação da  
**Professora Doutora Maria Susana Jorge Pereira**  
(Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências da  
Universidade do Porto)  
e da  
**Doutora Diana Pereira Soares da Costa**  
(Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências da  
Universidade do Porto)

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **Agradecimentos**

À Professora Susana Pereira, gostaria de agradecer pela introdução ao mundo das cardosinas, pelo entusiasmo, pelas novas ideias com que nos surpreende todos os dias e pela paciência para a revisão e discussão desta dissertação. Ao Professor José Pissarra gostaria de agradecer a oportunidade de trabalhar no seu grupo de investigação e queria agradecer a ambos pelas discussões, nos encontros de grupo, sobre cada um dos trabalhos desenvolvidos, porque são e continuarão a ser muito enriquecedores e importantes.

À Doutora Diana Soares da Costa e à Dr<sup>a</sup>. Cláudia Pereira, que foram desde o início as minhas orientadoras de laboratório, quero muito agradecer todo o apoio durante a realização desta investigação! Obrigada por todos os ensinamentos, pelo entusiasmo transmitido, obrigada pela revisão e discussão desta dissertação e obrigada pela paciência e constante apoio quando as coisas não corriam tão bem.

A todos os meus colegas de laboratório gostaria de agradecer pela boa disposição e bom humor, pelo convívio, pelo apoio e pela aprendizagem a cada dia ;). Obrigada Ana, Cláudia, Diana e Nuno!

Aos caríssimos vizinhos, obrigada pela boa disposição, convívio e constante interajuda.

Aos meus amigos, obrigada pelo apoio constante e pela compreensão do tempo em que estive mais ausente.

Aos meus pais, o meu especial agradecimento, por me darem oportunidades únicas. Obrigada pelo vosso apoio constante, compreensão, e pelo vosso amor!

Ao João, quero agradecer pela compreensão, pelo apoio diário, pela boa disposição, que me ajudaram sem dúvida a enfrentar as dificuldades que foram surgindo ao longo deste ano.

## Resumo

A cardosina A e a cardosina B são proteinases aspárticas isoladas a partir de flores de *Cynara cardunculus*. Apesar da sua grande identidade, apresentam uma localização diferencial em flores de cardo, sendo a cardosina A acumulada no vacúolo e a cardosina B secretada. Por este mesmo motivo, estas proteinases foram consideradas um bom modelo para o estudo do trânsito intracelular de APs em plantas. A expressão heteróloga destas proteínas em *Nicotiana tabacum* conduz ao endereçamento de ambas as cardosinas para o vacúolo, tornando-se o tabaco um modelo biológico de interesse para responder a diferentes questões sobre o trânsito intracelular destas proteínas para o vacúolo. Até à data, estudos realizados em tabaco não conseguiram esclarecer acerca da via, ou vias de trânsito, envolvidas no endereçamento das cardosinas para o vacúolo. As células Bright Yellow-2 (BY-2) constituem uma linha celular de tabaco apresentando diversas vantagens em relação às células da planta de tabaco. Neste trabalho foram utilizadas células BY-2 de modo a introduzir um novo modelo biológico de estudo do trânsito das cardosinas até o vacúolo, permitindo, ao mesmo tempo, a comparação do seu trânsito entre o sistema planta e células em cultura. Foi obtida uma construção viável de cardosina A com a proteína fluorescente mCherry, separadas por um *linker*, construção que poderá ser utilizada em estudos em epiderme foliar de tabaco e que foi utilizada, neste trabalho, para transformar células BY-2. Foi demonstrada a importância da presença do *linker* no correcto endereçamento e processamento da cardosina A em células de tabaco e foram transformadas células BY-2 com as cardosinas A e B em fusão com proteínas fluorescentes. Por análise das linhas celulares transformadas verificou-se que a cardosina A em associação com GFP foi expressa em células BY-2, tendo a cardosina A sido detectada na sua forma madura, por imunodeteção, e identificada no retículo endoplasmático e em estruturas pontuadas, por microscopia confocal. Estas estruturas pontuadas apresentaram um comportamento típico de Golgi na presença de Brefeldina A. Neste trabalho, são discutidas as possíveis situações que levam à acumulação de GFP no Golgi e à ausência de fluorescência no vacúolo. Para além disso, são também discutidas novas abordagens para a transformação de células BY-2. Estudos futuros deverão centrar-se no trânsito das cardosinas A e B em associação com mCherry em células BY-2.

## Abstract

Cardosin A and cardosin B are aspartic proteases isolated from the flowers of *Cynara cardunculus*. Despite their high identity, these proteins have a different location in cardoon flowers, cardosin A accumulates in vacuoles and cardosin B is secreted. Hence, these proteins are considered a good model for the study of intracellular trafficking of plant APs. The heterologous expression of these proteins in *Nicotiana tabacum* leads to the accumulation of both cardosins in the vacuole, which makes tobacco an interesting biological model to answer different questions about intracellular trafficking of cardosins to the vacuole. So far, studies using tobacco did not clarify the trafficking pathway(s) involved in cardosins vacuolar targeting. Bright Yellow-2 cells (BY-2) constitute a tobacco cell line that shows several advantages in relation to tobacco plant. In the present work, BY-2 cells were used to introduce a new biological model in the study of cardosins trafficking to vacuole, allowing, at the same time, a comparison of their trafficking in the plant system and in cell culture model. A viable construct was obtained with cardosin A fused with the fluorescent protein mCherry, separated by a linker, which can be used for studies in tobacco leaf epidermal cells and was also used to transform BY-2 cells in the present work. The results here presented demonstrated the importance of the presence of the linker for cardosin A correct targeting and processing in tobacco cells. Expression analysis of the BY-2 transformed lines showed that cardosin A fused with GFP was expressed in BY-2 cells and that the cardosin was detected in its mature form, by immunoblotting and was identified in the endoplasmic reticulum and in dot-shaped structures, by confocal microscopy. These dot-shaped structures showed a Golgi typical behavior in the presence of Brefeldin A. The implications which of GFP accumulation in the Golgi apparatus and the absence of fluorescence in the vacuole are herein discussed. Moreover, new approaches to the BY-2 cells transformation are discussed in the present work. Future studies should be focused on cardosins A and B trafficking in association with mCherry in BY-2 cells.

# Índice

Agradecimentos .....	III
Resumo .....	IV
Abstract .....	V
Índice .....	VI
Índice de Figuras .....	IX
Índice de Tabelas .....	XII
Lista de Abreviaturas.....	XIII
1. Introdução .....	1
1.1. Sistema Endomembranar .....	2
1.1.1. Endereçamento de proteínas para a parede celular.....	5
1.1.2. Endereçamento de proteínas para o sistema vacuolar.....	7
1.1.3. Drogas inibidoras do trânsito vesicular em plantas .....	9
1.2. Proteinases aspárticas.....	10
1.2.1. Proteinases aspárticas de plantas.....	12
1.2.2. Cardosinas.....	15
1.3. Células BY-2 como modelo biológico de estudo .....	22
1.4. Objectivos.....	23
2. Material e Métodos .....	24
2.1. Estirpes bacterianas e condições de crescimento .....	25
2.1.1. Crescimento de bactérias de <i>Escherichia coli</i> e de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	25
2.1.2. Preparação de células <i>E. coli</i> competentes .....	25
2.1.3. Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico .....	26
2.1.4. Preparação de células <i>A. tumefaciens</i> electrocompetentes.....	26
2.1.5. Transformação de <i>A. tumefaciens</i> por electroporação .....	26
2.2. Modelos biológicos .....	27

2.2.1. Cultura e manutenção de células BY-2 em suspensão.....	27
2.2.2. Manutenção das plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	28
2.3. Manipulação e análise de DNA.....	29
2.3.1. Amplificação de DNA por Reacção em cadeia da polimerase (PCR) .....	29
2.3.2. Electroforese em gel de agarose .....	31
2.3.3. Digestão de DNA plasmídico com enzimas de restrição.....	31
2.3.4. Extracção de DNA a partir de gel de agarose.....	32
2.3.5. Ligação de DNA no vector pCR-Blunt e no vector pVKH18En6 .....	32
2.3.6. Minipreparação de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .....	34
2.3.7. Minipreparação de DNA plasmídico de <i>A. tumefaciens</i> por lise alcalina .....	34
2.3.8. Preparação de amostras de DNA para sequenciação .....	35
2.3.9. Transformação transitória de folhas de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	35
2.3.10. Transformação estável de células BY-2 com <i>A. tumefaciens</i> .....	36
2.3.11. Estabelecimento de culturas em suspensão de células BY-2 transformadas.....	38
2.4. Estudos de expressão e processamento proteolítico .....	39
2.4.1. Análise por microscopia de varrimento confocal a laser (CLSM) .....	39
2.4.2. Análise por <i>Western Blotting</i> .....	40
2.4.3. Análise da expressão por RT-PCR.....	43
3. Resultados.....	45
3.1. Elaboração da construção cardosina A::linker-mCherry no vector binário pVKH18En6... 47	
3.2. Expressão de cardosina A fundida com mCherry em epiderme foliar de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	51
3.2.1. Localização de cardosina A fundida com mCherry por microscopia confocal de varrimento a laser (CLSM) .....	51
3.2.2. Processamento proteolítico da cardosina A fundida com mCherry .....	54
3.3. Expressão estável das proteínas cardosina A e B fundidas com mCherry em células BY-2 em suspensão .....	56

4. Discussão .....	63
4.1. Expressão da construção cardosina A::linker-mCherry em <i>Nicotiana tabacum</i> .....	65
4.2. Expressão de cardosina A fundida com GFP em células BY-2 .....	66
4.3. Transformação das células BY-2 .....	69
5. Conclusão .....	70
6. Bibliografia .....	73
7. Anexos .....	84

## Índice de Figuras

Figura 1.1 - Representação esquemática dos modelos de transporte de proteínas entre o retículo endoplasmático (ER) nos locais de exportação (ERES) e as cisternas do Golgi.....	4
Figura 1.2 – Representação da via endossomal em plantas. ....	5
Figura 1.3 - Modelo da localização e trânsito intracelular de SCAMP2 em células BY-2.....	6
Figura 1.4 – Representação do transporte de proteínas do retículo endoplasmático para a membrana plasmática. ....	7
Figura 1.5 – Representação do modelo de direccionamento das proteínas solúveis para os diferentes vacúolos em plantas.. ....	8
Figura 1.6 - Representação das estruturas cristalinas de cardosina A e de profitepsina.....	14
Figura 1.7- Inflorescência de <i>Cynara cardunculus</i> (cardo).. ....	15
Figura 1.8 - Localização da cardosina B por microscopia electrónica com marcação com partículas de ouro no tecido de transmissão de cardo.....	17
Figura 1.9 - Localização de cardosina A por microscopia electrónica com marcação com partículas de ouro em cotilédones de cardo.....	18
Figura 1.10 - Representação dos precursores da cardosina A e da cardosina B.....	19
Figura 1.11 - Modelo proposto para o processamento proteolítico da cardosina A.....	20
Figura 1.12 - Célula de <i>Nicotiana tabacum</i> var. Bright Yellow-2 (BY-2).....	22
Figura 2.1 - Cultura de células Bright-Yellow-2 (BY-2) em suspensão com 7 dias....	28
Figura 2.2 – Esquema representativo do emparelhamento dos <i>primers</i> nas reações de PCR para amplificação dos fragmentos de DNA de cardosina A e de linker-mCherry.....	30
Figura 2.3 - Infiltração de folha de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	36
Figura 3.1 – Representação esquemática da construção cardosina A::linker-mCherry. ....	46
Figura 3.2 – Análise por electroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) dos produtos amplificados por reacção de PCR. ....	47
Figura 3.3 - Representação da ligação do fragmento de cardosina A no vector de clonagem pCR-Blunt. ....	48
Figura 3.4 - Representação da ligação do fragmento de linker-mCherry no vector de clonagem pCR-Blunt. ....	48
Figura 3.5 - Análise por electroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) dos produtos de restrição do DNA plasmídico dos clones de <i>E. coli</i> transformados com o fragmento de linker-mCherry inserido no vector pCR-Blunt. ....	49

Figura 3.6 - Representação do T-DNA do vector binário de expressão pVKH18En6 com a construção cardosina A::linker-mCherry inserida no seu local de clonagem múltiplo (MCS). ....	49
Figura 3.7 - Análise por electroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) dos produtos de restrição do DNA plasmídico dos clones de <i>E. coli</i> transformados com a construção cardosina A::linker-mCherry inserida no vector pVKH18En6.....	50
Figura 3.8 - Análise por electroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) dos produtos de restrição do DNA plasmídico dos clones de <i>A. tumefaciens</i> com a construção cardosina A::linker-mCherry inserida no vector pVKH18En6.....	51
Figura 3.9 - Imagens de microscopia confocal de células da epiderme de folhas de <i>Nicotiana tabacum</i> transformadas com o marcador do retículo endoplasmático GFP::HDEL... ..	52
Figura 3.10 - Imagens de microscopia confocal de células da epiderme de folhas de <i>Nicotiana tabacum</i> transformadas com a construção cardosina A::linker-mCherry inserida no vector binário pVKH18En6.....	53
Figura 3.11 - Imagens de microscopia confocal de células da epiderme de folhas de <i>Nicotiana tabacum</i> transformadas com a construção cardosina A::linker-mCherry inserida no vector binário pVKH18En6.....	54
Figura 3.12 - Análise do processamento proteolítico da cardosina A ao longo do tempo, por <i>Western blotting</i> em folhas de tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) infiltradas com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com a construção cardosina A::linker-mCherry inserida no vector binário pVKH18En6.....	55
Figura 3.13 - Tecido caloso de células BY-2 transformadas com a construção cardosina A::GFP. ....	56
Figura 3.14 - Imagens de microscopia confocal de células BY-2 transformadas com a construção cardosina A::GFP. ....	57
Figura 3.15 – Imagens de microscopia confocal de células BY-2 transformadas com a construção cardosina A::GFP tratadas com brefeldina A (BFA). ....	59
Figura 3.16 - Análise do processamento proteolítico da cardosina A por <i>Western blotting</i> em células BY-2 transformadas com cardosina A::GFP e cardosina A::linker-mCherry no vector binário pVKH18En6.. ..	60
Figura 3.17 - Análise por electroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) de RNA extraído de células BY-2. ....	61

Figura 3.18 - Análise por electroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) dos produtos de RT-PCR para detecção de transcritos de cardisina A e B em células BY-2. .... 61

## Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – <i>Primers</i> utilizados na amplificação dos frgamentos de DNA de cardosina A e linker-mCherry por PCR.....	29
Figura 2.2 - Composição das reacções de PCR para amplificação dos fragmentos de DNA de cardosina A e de linker-mCherry.....	30
Figura 2.3 - Condições de PCR utilizadas na amplificação dos fragmentos de DNA de cardosina A e de linker-mCherry.....	31
Tabela 2.4 – Conjunto de enzimas de restrição utilizadas na clonagem e sub-clonagem dos fragmentos de DNA de cardosina A e linker-mCherry. ....	33
Figura 2.5 - Composição da reacção de ligação da construção cardosinaA::linker-mCherry no vector binário pVKH18En6. ....	33
Figura 2.6 - <i>Primers</i> utilizados na reacção de RT-PCR. ....	44

## Lista de Abreviaturas

- AP** – Proteinase aspártica (do inglês: *Aspartic Proteinase*)
- BFA** – Brefeldina A (do inglês: *Brefeldin A*)
- bp** – Pares de bases (do inglês: *base pairs*)
- BSA** – Albumina bovina sérica (do inglês: *Bovine Serum Albumin*)
- BY-2** – Bright Yellow-2
- CaMV** – Vírus do mosaico da couve flor (do inglês: *Cauliflower Mosaic Virus*)
- CCV** – Vesículas revestidas de clatrina (do inglês: *Clathrin Coated Vesicles*)
- cDNA** – DNA complementar (do inglês: *complementary DNA*)
- CLSM** – Microscópio confocal de varrimento a laser (do inglês: *Confocal Laser Scanning Microscopy*)
- COP** – complexo de proteínas de revestimento (do inglês: *Coat Protein Complex*)
- ctVSS** – do inglês: *C-terminal Vacular Sorting Signal*
- DIC** – Contraste de interferência diferencial (do inglês: *Differential Interference Contrast*)
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico (do inglês: *Desoxiribonucleic Acid*)
- DO** – Densidade óptica
- dNTPs** – Desoxirribonucleótidos trifosfato
- DSG** – Motivo catalítico Asp-Ser-Gly
- DTG** – Motivo catalítico Asp-Thr-Gly
- DV** – Vesículas densas (do inglês: *Dense Vesicles*)
- EC** – Do inglês: *Enzyme Classification Number*
- EDTA** – Tetra-acetato de etilendiamina dissódico (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- EE** – Endossoma precoce (do inglês: *Early Endosome*)
- ER** – Retículo endoplasmático (do inglês: *Endoplasmic Reticulum*)
- ERES** – Locais de exportação do retículo endoplasmático (do inglês: *Endoplasmic Reticulum Export Sites*)
- EtBr** – Brometo de etídeo (do inglês: *Ethidium Bromide*)
- FP** – Proteína fluorescente (do inglês: *Fluorescent Protein*)
- GFP** – Proteína verde fluorescente (do inglês: *Green Fluorescent Protein*)
- HDEL** – Sequência His-Asp-Glu-Leu

**Kb** – Quilobase

**kDa** – Kilodaltons

**LE** – Endossoma tardio (do inglês: *Late Endosome*)

**LV** – Vacúolo lítico (do inglês: *Lytic Vacuole*)

**mRNA** – RNA mensageiro (do inglês: *messenger RNA*)

**MSB** – do inglês: *Microtubule-stabilizing buffer*

**MVB** – Corpo multivesicular (do inglês: *Multivesicular Body*)

**PAC** – Vesículas acumuladoras de precursores (do inglês: *Precursor-Accumulating Vesicles*)

**PAGE** – Do inglês: *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

**PBS** – Tampão fosfato salino (do inglês: *Phosphate Buffered Saline*)

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*)

**PCV** – Volume empacotado de células (do inglês: *Packed Cell Volume*)

**PSI** – Do inglês: *Plant Specific Insert*

**PSV** – Vacúolo de armazenamento proteico (do inglês: *Protein Storage Vacuoles*)

**psVSS** – Do inglês: *physical structure Vacular Sorting Signal*

**PVC** – Compartimento pré-vacuolar ou pré-vacúolo (do inglês: *Prevacuolar Compartment*)

**RGD** – Sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp

**RE** – Endossoma de reciclagem (do inglês: *Recycling Endosome*)

**RNA** – Ácido ribonucleico (do inglês: *Ribonucleic Acid*)

**rpm** – rotações por minuto

**rRNA** – RNA ribossômico (do inglês: *ribosomal RNA*)

**RT-PCR** – Do inglês: *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

**SAPLIP** – Do inglês: *Saposin-like Protein*

**SDS** – Dodecil sulfato de sódio (do inglês: *Sodium dodecil sulfato*)

**SP** – Péptido sinal (do inglês: *Signal Peptide*)

**ssVSS** – Do inglês: *sequence specific Vacular Sorting Signal*

**ST** – Do inglês: *Syalil transferase*

**SVC** – Cluster de vesículas secretoras (do inglês: *Secretory Vesicles Cluster*)

**TAE** – Tampão Tris acetato de EDTA

**TCA** – Ácido Tricloroacético (do inglês: *Trichloroacetic acid*)

**TBS** – Tampão Tris Salino

**T-DNA** – DNA de transferência (do inglês: *Transferred DNA*)

**TE** – Tampão de extração

**TEMED** – N, N, N, N', N' – Tetramethylethylenediamide

**TGN** - Rede *trans* do Golgi (do inglês: *Trans - Golgi Network*)

**VSS/VSD** – Do inglês: *Vacuolar Sorting Signal/ Vacuolar Sorting Determinant*

**VSR** – Do inglês: *Vacuolar sorting receptor*

**Wt** – Do inglês: *Wild type*

### Abreviaturas dos nucleótidos

**A** – Adenina

**C** – Citosina

**G** – Guanina

**T** – Timina

### Abreviaturas dos aminoácidos

<b>Aminoácido</b>	<b>Abreviatura 3 letras</b>	<b>Abreviatura 1 letra</b>
Ácido aspártico/ Aspartato	Asp	D
Ácido glutâmico/ Glutamato	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	N
Asparagina	Asn	R
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

## **1. Introdução**

As células eucarióticas apresentam um sistema de membranas internas denominado de sistema endomembranar, que compreende vários compartimentos: o retículo endoplasmático (ER), o complexo de Golgi, a rede trans-Golgi (TGN), o compartimento pré-vacuolar/corpo multivesicular (PVC/MVB), o vacúolo, a parede celular, a membrana plasmática e o endossoma (Surpin e Raikhel, 2004).

Após a tradução, muitas proteínas são transportadas até ao seu destino final, num processo que é denominado de trânsito intracelular (Lee *et al.*, 2002). O transporte das proteínas entre os compartimentos do sistema endomembranar é mediado pela translocação, a evaginação e a fusão de vesículas e dá origem às duas principais vias de transporte membranar, a via secretora e a via endocítica (Surpin e Raikhel, 2004; Bassham *et al.*, 2008). A existência destas duas vias permite à célula controlar o trânsito intracelular das proteínas biossintetizadas e de origem externa, ao longo de diferentes compartimentos do sistema endomembranar até o seu destino final (Bassham *et al.*, 2008; Foresti e Denecke, 2008).

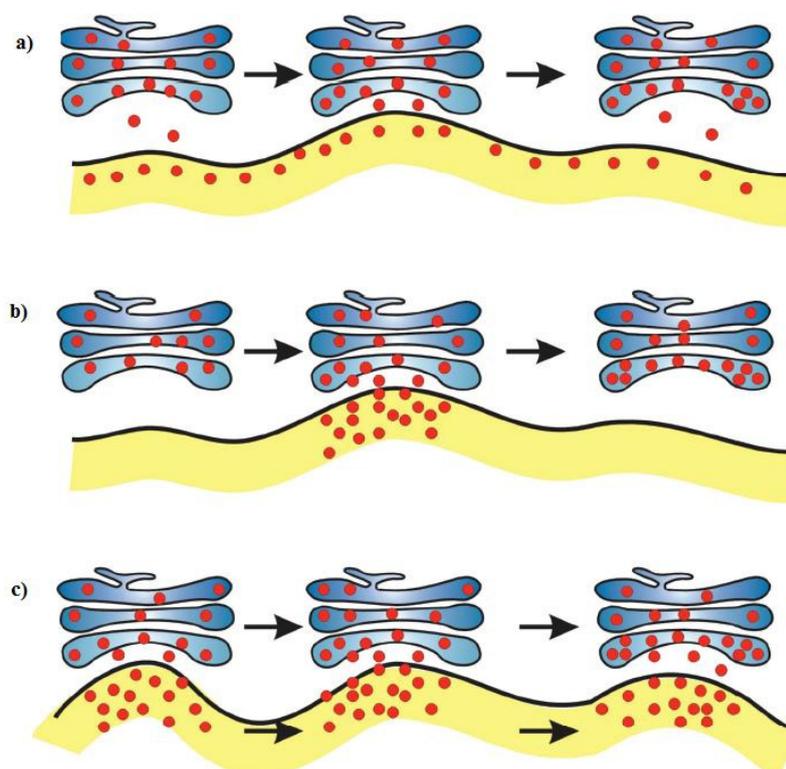
### **1.1. Sistema Endomembranar**

As vias e mecanismos gerais envolvidos no processo de trânsito intracelular têm sido alvo de intensos estudos em eucariotas parecendo haver uma conservação dos mesmos entre os diversos organismos. No entanto, nas células vegetais, têm-se verificado a existência de algumas especificidades nos processos e organelos envolvidos no trânsito intracelular das proteínas. Foi reconhecida a presença de pelo menos dois diferentes tipos de vacúolos morfológica e funcionalmente distintos, os vacúolos líticos (LVs), e os vacúolos de armazenamento proteico (PSVs) (Paris *et al.*, 1996; Jolliffe *et al.*, 2005). Enquanto os vacúolos líticos são compartimentos ácidos, ricos em hidrolases, os vacúolos de armazenamento proteico, encontram-se essencialmente em sementes e outros órgãos de reserva, e armazenam grandes quantidades de proteínas no seu interior. As proteínas armazenadas podem ser utilizadas como fontes de azoto durante a germinação das sementes e no crescimento da planta (Jolliffe *et al.*, 2005; Vitale e Hinz, 2005). Foi descrito que ambos os vacúolos podem coexistir na mesma célula vegetal (Paris *et al.*, 1997; Hanton *et al.*, 2007), no entanto, continua por esclarecer se múltiplos vacúolos estão presentes em todas as células vegetais, ou se aparecem apenas em tecidos especializados como o tecido embrionário (Frigerio *et al.*, 2008; Zouhar e Rojo, 2009).

Aproximadamente um terço das proteínas celulares, durante a tradução, são translocadas para o lúmen do ER, onde a modificação, o enrolamento e a oligomerização das mesmas ocorre. A entrada no retículo endoplasmático é possibilitada pela presença de um péptido sinal de endereçamento na região N-terminal destas proteínas (Vitale e Hinz, 2005). Após o seu correcto enrolamento e montagem, algumas proteínas secretoras ficam retidas no retículo endoplasmático, enquanto outras são transportadas para diferentes compartimentos como os corpos proteicos, os vacúolos e a membrana plasmática.

A maioria das proteínas que saem do retículo endoplasmático são transportadas para as cisternas *cis* do complexo de Golgi, sendo a interface entre estes dois organelos um ponto de ligação crucial para o movimento destas proteínas. No caso particular das plantas, o complexo de Golgi é constituído por inúmeras cisternas móveis distribuídas pelo citoplasma e que se encontram intimamente associadas com o ER (Boevink *et al.*, 1998; Hawes *et al.*, 2008).

Foram sugeridos três diferentes modelos para explicar a exportação das proteínas do ER para o Golgi (Fig. 1.1). Segundo o modelo “vacuum cleaner” as cisternas do Golgi movem-se sobre o retículo endoplasmático recolhendo da superfície do mesmo as moléculas como se fosse um “aspirador”, o que implica que toda a superfície do ER apresenta capacidade de exportar proteínas (Boevink *et al.*, 1998; Neumann *et al.*, 2003) (Fig. 1.1 - a). O modelo “stop-and-go”, sugere, no entanto, que as cisternas do Golgi recebem moléculas do ER apenas em determinados locais de exportação, bem definidos, denominados locais de exportação do ER (ERES) (Nebenführ *et al.*, 1999) (Fig. 1.1 - b). Um terceiro modelo, proposto por Brandizzi e colaboradores (2002), sugere que os locais de exportação (ERES) podem ou mover-se ao longo da membrana do ER ou devido à mobilidade da superfície do ER, formando, assim unidades secretoras, que permitem o transporte em qualquer momento do movimento dos dois organelos (Neumann *et al.*, 2003) (Fig. 1.1 - c). Este modelo foi confirmado por daSilva e colaboradores (2004), que ao estudar o movimento dos ERES *in vivo*, demonstraram que estes formam unidades secretoras móveis ao longo da superfície do ER, em conjunto com as cisternas do Golgi. Recentemente, Sparkes e colaboradores (2009), recorrendo a uma técnica de *laser trap* e manipulando o Golgi, conseguiram verificar que este está fisicamente associado a túbulos de ER e que pode formar, facilmente, novos pontos de ligação com outros túbulos de ER. No entanto, a natureza desta ligação continua por esclarecer.



**Figura 1.1 - Representação esquemática dos modelos de transporte de proteínas entre o retículo endoplasmático (ER) nos locais de exportação (ERES) e as cisternas do Golgi.** a) Modelo “vacuum cleaner”, em que o Golgi se move ao longo da superfície do ER apanhando as proteínas em qualquer local do ER. b) Modelo “stop-and-go”, em que o Golgi se move ao longo da superfície do ER e o transporte de proteínas ocorre em ERES fixos. c) Modelo dos ERES móveis, em que a superfície do ER e o complexo de Golgi se movem em conjunto permitindo o transporte de proteínas contínuo entre os dois organelos (em Hanton *et al.*, 2005).

Para além do papel essencial do complexo de Golgi na modificação das proteínas, é também ao nível deste compartimento que ocorrem processos cruciais de segregação das proteínas para o seu correcto endereçamento. Especificamente em plantas, os processos de segregação das proteínas iniciam-se logo nas cisternas *cis* do Golgi. As proteínas que passam ao longo do complexo de Golgi até a face *trans* são direccionadas ou para a membrana plasmática ou para o sistema vacuolar (Neumann *et al.*, 2003; Hwang, 2008).

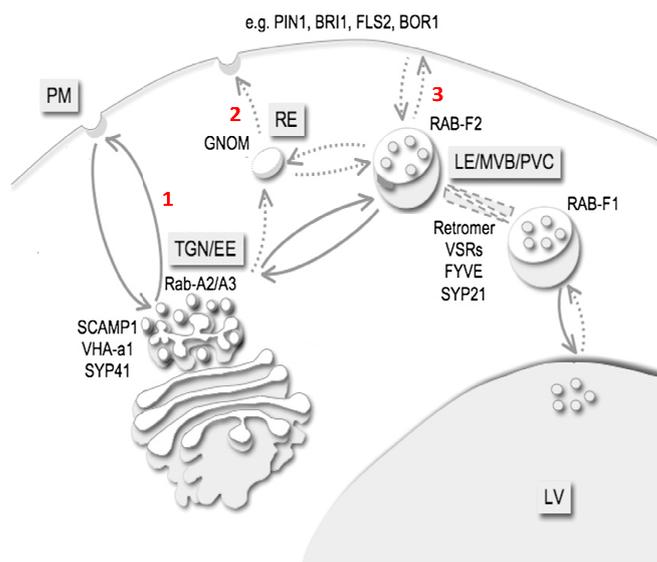
Ao contrário da via secretora, a via endocítica consiste no importe de moléculas do meio extracelular através da formação de vesículas a partir da membrana plasmática (endocitose). O transporte destas moléculas é mediado, inicialmente, por endossomas precoces e mais tarde por endossomas tardios que endereçam as moléculas para os vacúolos (Šamaj *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2008a). No sistema endomembranar, as vias secretora e endocítica convergem entre si, encontrando-se os endossomas não só envolvidos na endocitose em si, mas também na reciclagem e na secreção de moléculas para o exterior da célula (Lam *et al.*, 2007).

Ao longo das vias de trânsito, o movimento anterógrado é balanceado com um trânsito de vesículas no sentido inverso, o trânsito retrógrado, que permite a reciclagem de várias proteínas envolvidas no endereçamento a vários níveis do sistema endomembranar devolvendo-as aos compartimentos em que são residentes para poderem ser reutilizadas (Hwang, 2008).

### 1.1.1. Endereçamento de proteínas para a parede celular

As proteínas solúveis que não apresentam qualquer sinal de endereçamento, para além do péptido sinal (SP) na sua sequência, são transportadas ao longo do complexo de Golgi e são, posteriormente, secretadas em vesículas que se fundem directamente com a membrana plasmática, libertando as proteínas para o exterior da célula (Fig. 1.2 – via 1) (Denecke *et al.*, 1990; Neumann *et al.*, 2003). Para além desta via, designada por via *default*, foram descritas, recentemente, outras vias de endereçamento para a membrana plasmática em plantas.

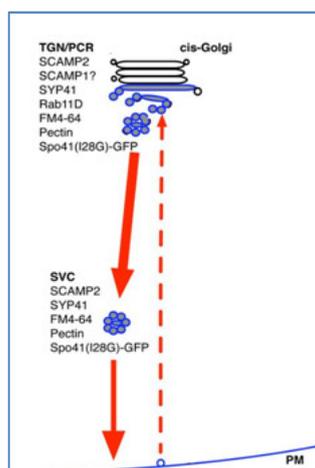
A partir da rede *trans* do Golgi (TGN), também descrito como apresentando funções de endossoma precoce (EE), as proteínas podem ser endereçadas para a membrana plasmática por duas vias alternativas à via *default*. Uma primeira via mediada por endossomas de reciclagem (REs) (Fig. 1.2 – via 2), e, uma segunda via mediada pelo pré-vacúolo (PVC), identificados também como endossoma tardio (LE) e corpo multivesicular (MVB) (Fig. 1.2 - via 3). Ambas as vias dependem de compartimentos envolvidos não só na via secretora de proteínas, mas também na via endocítica (Šamaj *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2008a).



**Figura 1.2 - Representação da via endossomal em plantas.** No esquema estão representados compartimentos (a vermelho) e marcadores (indicados junto dos compartimentos). As setas representam

as vias de trânsito descritas e as setas a tracejado indicam hipotéticas vias de trânsito. As setas acompanhadas de numeros representam as vias de trânsito das proteínas para a membrana plasmática (PM) a partir da rede trans do Golgi/endossoma precoce (TGN/EE): 1: Via *default*; 2: Via endossoma de reciclagem (RE); 3: Via endossoma tardio/corpo multivesicular/ pré-vacúolo (LE/MVB/PVC) (adaptado de Robinson *et al.*, 2008a).

Recentemente, um estudo do marcador de vesículas secretoras, SCAMP2 (Secretory carrier membrane protein 2), permitiu identificar uma quarta via de endereçamento de proteínas para a membrana plasmática, via esta envolvida no trânsito de proteínas em massa para o exterior da célula (Toyooka *et al.*, 2009). O transporte é mediado por um cluster de vesículas secretoras (SVC), que se forma a partir da rede trans do Golgi (TGN) e se desloca até a membrana plasmática, com a qual se funde libertando o seu conteúdo (Fig 1.3). Foi também demonstrado que esta via promove o transporte de componentes da parede celular (Toyooka *et al.*, 2009).

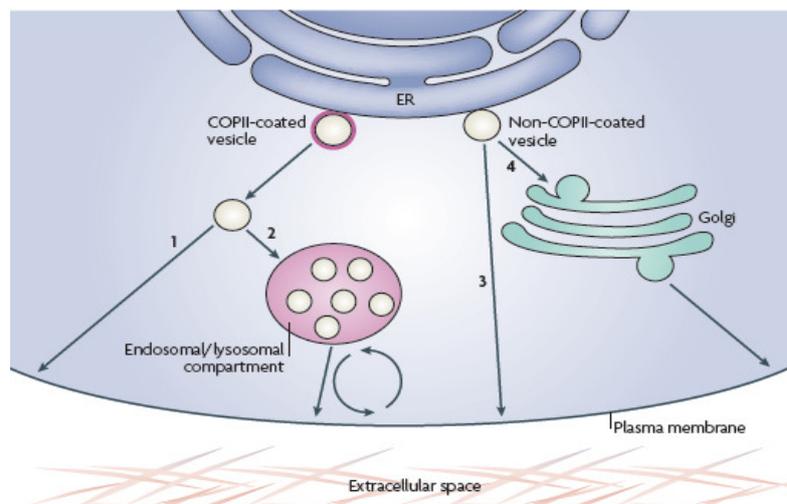


**Figura 1.3 - Modelo da localização e trânsito intracelular de SCAMP2 em células BY-2.** SCAMP2 (a azul) encontra-se localizado no *trans* Golgi, na rede *trans* do Golgi (TGN), na membrana plasmática (PM) e no cluster de vesículas secretoras (SVC). O SVC separa-se da rede *trans* Golgi e migra para a PM com a qual se funde (adaptado de Toyooka *et al.*, 2009).

Noutros organismos eucariotas foram descritas outras vias de endereçamento das proteínas secretoras para o espaço extracelular. As proteínas deixam o ER em vesículas transportadoras revestidas ou não pelo complexo de proteínas de revestimento II (COPII) e estas vesículas, por sua vez, fundem-se directamente com a membrana plasmática (Fig. 1.4 – vias 1 e 3). As vesículas não revestidas podem também fundir-se em primeiro lugar com o TGN/endossoma precoce e só depois alcançar a superfície celular (Fig. 1.4 – via 4), enquanto as vesículas revestidas podem, igualmente, fundir-se com o lisossoma e só depois com a membrana plasmática (Fig. 1.4 – via 2) (Nikel e Rabouille, 2009). Uma vez que estas vias de

direcionamento para a membrana plasmática ocorrem em outros organismos poderão ocorrer também em células vegetais, pelo que a possibilidade da sua existência deverá ser investigada em plantas.

Para ocorrer o direcionamento para outros compartimentos, as proteínas solúveis necessitam de sinais específicos na sua sequência aminoacídica (Jürgens *et al.*, 2004; Vitale e Hinz, 2005).



**Figura 1.4 - Representação do transporte de proteínas do retículo endoplasmático para a membrana plasmática.** ER: retículo endoplasmático (em Nikel e Rabouille, 2009).

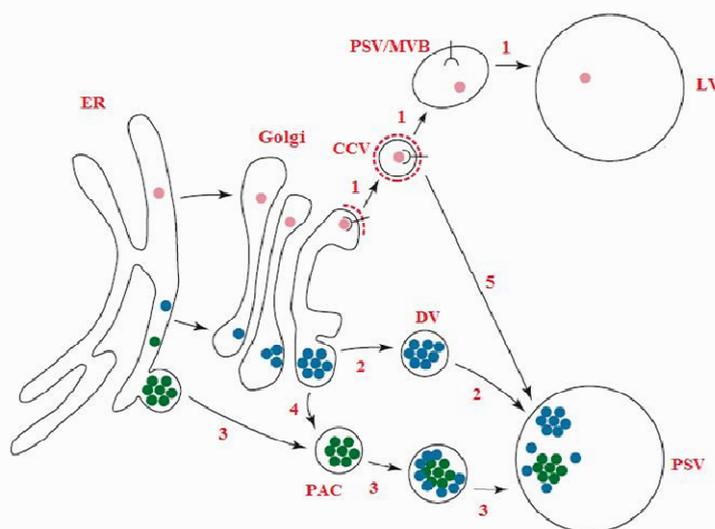
### 1.1.2. Endereçamento de proteínas para o sistema vacuolar

As proteínas solúveis destinadas ao sistema vacuolar devem possuir um sinal ou determinante de endereçamento vacuolar (VSS ou VSD) na sua sequência aminoacídica (Vitale e Hinz, 2005). Em plantas, foram até à data identificados vários sinais de endereçamento vacuolar, sendo reconhecidas três diferentes classes: os *sequence-specific* (ssVSS) reconhecidos pelos receptores de sinais vacuolares (VSRs), os sinais C-terminal (ctVSS) e os sinais mediados pela estrutura física da proteína (psVSS) (Matsuoka e Neuhaus *et al.*, 1999).

Dependendo dos sinais de endereçamento das proteínas estas podem seguir duas possíveis vias: uma que transporta as proteínas até os LVs e outra que as direciona para os PSVs. Para que ocorra esse direcionamento, existem, nas cisternas *trans* do Golgi, receptores específicos que reconhecem estes sinais (receptores dos sinais de endereçamento ou VSRs), permitindo assim a segregação das proteínas para o sistema vacuolar. Nesta fase, os sinais de endereçamento ssVSS, das proteínas destinadas aos vacúolos líticos, interagem com VSRs BP-80. Por sua vez, o complexo ligando-receptor é recrutado para vesículas revestidas de clatrina

(CCVs), que se irão fundir com os PVCs/MVBs onde libertam o seu conteúdo (Fig. 1.5 – via 1). Estas estruturas multivesiculares funcionam como compartimentos intermédios pós-Golgi entre a rede *trans* do Golgi e os LVs (Vitale e Hinz, 2005; Lam *et al.*, 2007; Hwang, 2008).

Por outro lado, na sua maioria, as proteínas de reserva portadoras de sinais de endereçamento ctVSS sofrem uma agregação contínua desde o *cis*-Golgi até à rede *trans* do Golgi. Os agregados são, posteriormente, sequestrados em vesículas densas (DVs) que, depois de destacados do Golgi por evaginação, se fundem e libertam o seu conteúdo nos PSVs (Fig. 1.5 – via 2) (Vitale e Hinz, 2005; Jolliffe *et al.*, 2005). Porém, foi descrito que outras proteínas de reserva, nomeadamente as proteínas de reserva da abóbora, podem seguir uma via alternativa de endereçamento para os PSVs, em que as proteínas vão sendo sequestradas para vesículas acumuladoras de precursores (PACs) no ER (Hara-Nishimura *et al.*, 1998; Vitale e Hinz, 2005). Estas vesículas são muito maiores que as DVs e depois de se separarem do ER fundem-se, também, directamente com os PSVs, à semelhança do que se passa com as DVs (Fig. 1.5 – via 3). Para além disso, estas vesículas podem ainda receber e transportar para o PSV proteínas glicosiladas do Golgi (Fig. 1.5 – via 4) (Jolliffe *et al.*, 2005). Nesta via de trânsito não há envolvimento do complexo de Golgi. Para além destas duas vias, as proteínas de reserva podem ainda ser reconhecidas pelo receptor BP-80 e serem transportadas via PVCs/MVBs para os PSVs (Fig. 1.5 – via 5) (Vitale e Hinz, 2005; Jolliffe *et al.*, 2005).



**Figura 1.5 – Representação do modelo de direccionamento das proteínas solúveis para os diferentes vacúolos em plantas.** Os pontos cor-de-rosa indicam proteínas destinadas para o vacúolo lítico (LV) e os pontos verdes e azuis representam proteínas destinadas para o vacúolo de armazenamento proteico (PSV). Algumas proteínas seguem uma via independente do Golgi (a verde). A linha a tracejado vermelha representa o revestimento de clatrina das vesículas. CCV: vesículas revestidas de clatrina; DV: vesículas densas; ER: retículo endoplasmático; PAC: vesículas acumuladoras de

precursores; PVC/MVB: compartimento pré-vacuolar/corpo multivesicular (adaptado de Vitale e Raikhel, 1999).

O tipo de direccionamento de proteínas para os vacúolos de armazenamento, parece ser influenciado pelo estágio de desenvolvimento da planta ou da semente (Vitale e Hinz, 2005). Vitale e Hinz (2005) propõem que as proteínas destinadas a ambos os vacúolos alcancem os PVCs pela mesma via, e apenas quando atingem estes compartimentos sofrem subsequente endereçamento, dependendo do seu destino final. Deste modo, com a formação das sementes na evolução das plantas, a formação dos PSVs poderia ter sido originada a partir de vias pré-existentes utilizadas no endereçamento de proteínas para o vacúolo lítico da célula. Mais recentemente, Miao e colaboradores (2008) demonstraram que a aleurina e a 2S albumina, proteínas lítica e de reserva, respectivamente, são transportadas pelas mesmas populações de PVCs/MVBs para os respectivos vacúolos.

Para além das funções de enrolamento, processamento e montagem das proteínas, o retículo endoplasmático é também um organelo onde se acumulam determinadas proteínas (Neumann *et al.*, 2003). Por exemplo, as prolaminas, que representam proteínas de reserva de cereais, podem formar agregados heteromultiméricos no interior do lúmen do ER. Foi proposto que esta retenção no ER se dê por ligação das prolaminas a proteínas de ligação a chaperonas residentes do ER, o que, por sua vez, promove o enrolamento e a montagem de agregados insolúveis no interior do ER (Drakakaki *et al.*, 2006). Estes agregados de proteínas podem manter-se no interior ou destacar-se do ER, formando compartimentos individualizados denominados de corpos proteicos (PB). A formação destes compartimentos parece ser regulada pelo desenvolvimento, que induz a síntese de proteínas de reserva em células especializadas, normalmente em tecidos de reserva (Herman e Larkins, 1999). Os PBs podem manter-se no citoplasma ou podem ser sequestrados por autofagia pelos PSVs (Herman e Larkins, 1999).

Apesar das vias de endereçamento descritas para as proteínas de reserva, muito continua por se esclarecer acerca das mesmas e do número de diferentes vias existentes.

### **1.1.3. Drogas inibidoras do trânsito vesicular em plantas**

O estudo do trânsito intracelular de proteínas tem vindo a ser facilitado essencialmente pela utilização crescente de marcadores fluorescentes compartimentares e pelo melhoramento

da microscopia confocal e de fluorescência, que permitem hoje a observação directa de proteínas fluorescentes em células vegetais vivas. Para além disso, a aplicação de drogas inibidoras do trânsito vesicular têm-se mostrado importantes no estudo da localização intracelular e vias de trânsito de proteínas. Entre estas drogas, a brefeldina A (BFA) e a wortmanina são as mais populares neste tipo de estudos.

A brefeldina A é uma lactona macrocíclica de origem fúngica, inicialmente, usada como inibidor da formação de vesículas de transporte retrógrado ao nível do Golgi (Robinson *et al.*, 2008b). No entanto, com o aumento da utilização da droga, demonstrou-se que os seus efeitos parecem ser dependentes do tecido e da espécie vegetal em que é aplicada (Robinson *et al.*, 2008b).

A wortmanina é um inibidor específico da fosfatidilinositol 3-cinase, um lípido característico de membranas endossomais. Foi descrito, que esta droga funciona como inibidor do trânsito intracelular para o vacúolo em plantas (daSilva *et al.*, 2005). Tse e colaboradores (2004), demonstraram que a droga é também um agente dilatador dos PVCs, sem qualquer efeito no Golgi, tendo a sua aplicação permitido aos autores definir as estruturas PVC como MVBs.

Os efeitos da BFA e da wortmanina têm vindo a ser bem estudados nas células Bright Yellow-2 de tabaco (BY-2). Tse e colaboradores (2009) relacionaram o efeito da dosagem aplicada destas drogas com os seus efeitos a nível morfológico nas células BY-2. Neste trabalho, verificou-se que baixas concentrações de BFA levam à agregação das cisternas do Golgi, sem efeitos na morfologia dos PVCs, no entanto, maiores concentrações promovem a agregação dos PVCs com o Golgi formando os chamados compartimentos BFA (Tse *et al.*, 2009). A wortmanina, por sua vez, induz a formação de estruturas em forma de anel nos PVCs marcados com GFP nas células BY-2, que através da análise por microscopia electrónica corresponde a um alargamento destes organelos e à perda de vesículas internas (Tse *et al.*, 2009). Esta dilatação dos PVCs ocorre por uma fusão homotípica dos PVCs/MVBs, havendo também ocorrência fusão entre os PVCs e a TGN, bem como das pequenas vesículas internas com a membrana do PVC, parecendo este padrão de fusão, produzido pela wortmanina, ser exclusiva de plantas (Wang *et al.*, 2009).

## **1.2. Proteinases aspárticas**

As proteinases aspárticas (APs; EC 3.4.23) foram descritas num vasto grupo de organismos entre animais, plantas, bactérias, fungos e retrovírus (Davies, 1990). De modo a

permitir uma classificação de todas as proteinases identificadas, Rawlings e Barret iniciaram, em 1996, uma base de dados de proteinases, denominada de MEROPS (Rawlings *et al.*, 2008). Até à data foram identificadas 14 famílias diferentes de APs, de acordo com o grau de homologia das suas sequências aminoácidas, e foram identificados 6 clãs, que incluem APs que se acredita partilharem um ancestral comum (Simões e Faro, 2004; Rawlings *et al.*, 2008).

Em comum, uma grande parte das APs, exibem uma actividade óptima a pH ácido, são, especificamente, inibidas pela pepstatina (um hexopéptido produzido por *Streptomyces*) e apresentam dois resíduos de aspartato no seu local activo (Faro *et al.*, 1999; Mutlu e Gal, 1999). As APs eucarióticas exibem uma estrutura bilobada com o local activo situado numa grande fenda catalítica. Em cada lóbulo da enzima, localiza-se um dos resíduos catalíticos de aspartato inserido em motivos Asp-Thr-Gly (DTG) (Aspartato-Treonina-Glicina), sendo um dos motivos substituído por Asp-Ser-Gly (DSG) (Aspartato-Serina-Glicina) nas APs de plantas (Mutlu e Gal, 1999; Simões e Faro, 2004).

As APs são sintetizadas como precursores inactivos também designados de zimogénios, caracterizados por possuírem uma sequência sinal N-terminal hidrofóbica (Pre), responsável pela translocação da proteína para o retículo endoplasmático (ER). Esta sequência é seguida de um prosegmento de 40 aminoácidos, que parece estar envolvido na inactivação, correcto enrolamento, estabilidade e endereçamento intracelular de vários zimogénios (Koelsh *et al.*, 1994; Kervinen *et al.*, 1999; Simões e Faro, 2004).

Apesar das características comuns mencionadas entre as APs, estas exibem diferentes propriedades catalíticas e diferentes localizações ao nível das células e tecidos, o que, provavelmente, estará relacionado com os seus diferentes papéis fisiológicos (Davies, 1990; Koelsh *et al.*, 1994).

Actualmente, o conhecimento acerca das funções das APs provém, essencialmente, de estudos em animais, microrganismos e vírus, tendo sido, até à data, atribuídos muitos e variados papéis fisiológicos a diferentes APs. Estas enzimas estão envolvidas no processamento de proteínas precursoras (ex: renina e catepsina D), na degradação de proteínas (ex: proteínas gástricas como a pepsina), e no processamento de poliproteínas (AP do vírus da imunodeficiência humana) (Davies, 1990; Mutlu e Gal, 1999; Simões e Faro, 2004). Para além disso, estão também envolvidas em processos fisiológicos como a regulação da pressão sanguínea (renina) e a digestão (ex: pepsina e quimosina) e estão associadas a condições patológicas importantes, como a SIDA (AP do vírus da imunodeficiência humana), a malária

(plasmepsinas), o cancro (catepsina D e catepsina E) e a doença de Alzheimer (proteína precursora  $\beta$ -amilóide e memapsina 2), sendo este um dos principais motivos pelo qual as APs têm vindo a ser alvo de grande investigação (James, 1998; Lin *et al.*, 2000; Simões e Faro, 2004). No entanto, o papel das APs em plantas, na sua maioria, continua ainda por caracterizar (Simões e Faro, 2004).

### 1.2.1. Proteinases aspárticas de plantas

Foram, até à data, detectadas ou purificadas APs num vasto grupo de espécies vegetais, nomeadamente em espécies de gimnospérmicas (pinheiro), em monocotiledóneas (cevada, arroz, trigo e milho) e em dicotiledóneas (*Arabidopsis*, *Brassica*, pepino, cardo, tabaco, tomate e plantas carnívoras *Nepenthes*). No entanto, em comparação com APs de outras origens, a informação acerca das APs de plantas é ainda muito limitada, tendo sido apenas completamente caracterizadas algumas delas (Simões e Faro, 2004), conhecendo-se o papel biológico de apenas duas APs vegetais, a CDR1 (*Constitutive disease resistance 1*) e a PCS1 (*Promotion of cell survival*) (van der Hoorn, 2008).

Apesar de, na sua grande parte, as APs terem sido isoladas a partir de sementes (pinheiro, cevada, *Arabidopsis*, arroz, trigo), outras foram também purificadas a partir de folhas (tabaco, tomate e espinafres), de flores (cardo), de pólen (milho) e das glândulas digestivas da planta carnívora *Nepenthes alata* (Mutlu e Gal, 1999).

As APs em células de mamíferos são, essencialmente, acumuladas em lisossomas ácidos (ex: catepsina D), ou são secretadas (ex: pepsina, renina) (Mutlu e Gal, 1999). Estudos de localização subcelular, em plantas, determinaram que a maioria das APs é armazenada em vacúolos de armazenamento proteico (PSVs) e em corpos proteicos (PBs), (ex: fitepsina, cardosina A) ou é secretada para o espaço extracelular (ex: cardosina B) (Mutlu e Gal, 1999; Simões e Faro, 2004).

Entre as APs de plantas, apenas duas estruturas cristalográficas foram, até à data determinadas, a da cardosina A madura (PDB code: 1B5F) e a da profitepsina, a forma precursora da AP de cevada (PDB code: 1QDM) (Fig. 1.6). Verificou-se que na sua forma madura, estas proteínas formam cadeias polipeptídicas duplas e partilham grande similaridade de enrolamento com outras APs (Frazão *et al.*, 1999; Kervinen *et al.*, 1999; Simões e Faro, 2004).

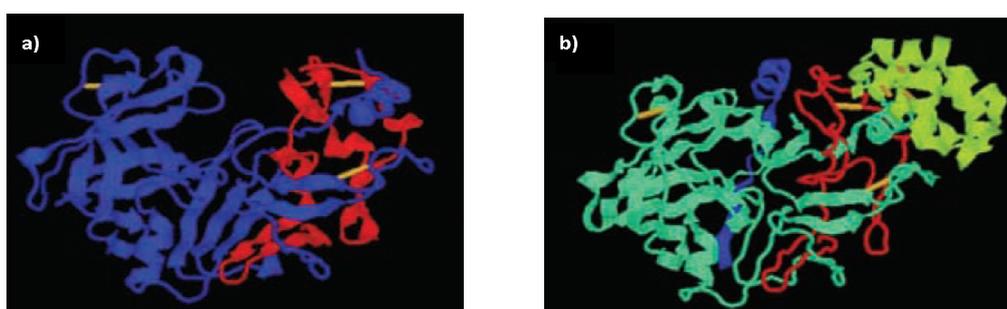
Apesar de apresentarem características em comum com as APs de outros organismos, as APs presentes em plantas, exibem aspectos funcionais e estruturais que as tornam únicas. Podem apresentar na sua estrutura um domínio extra de cerca de 100 aminoácidos, denominado de *plant specific insert* (PSI), inserido entre os domínios N - e C - terminal. Este segmento, presente apenas na forma precursora das APs, é, normalmente, removido de modo total ou parcial durante a maturação proteolítica das proteinases aspárticas (Egas *et al.*, 2000; Simões e Faro, 2004). A sequência do PSI não apresenta homologia com a sequência de qualquer outra AP de outros organismos, no entanto, esta exhibe alta homologia com as saposinas, proteínas activadoras de esfingolípido lisossomais de origem animal, e com as *saposin-like proteins* (SAPLIPs). Consequentemente, o PSI é considerado um domínio *saposin-like* das APs. Esta família de proteínas contém um grupo de seis cisteínas conservadas, apresentando homologia no padrão de resíduos hidrofóbicos e num local de glicosilação conservado (Simões e Faro, 2004). No entanto, as porções N- e C- terminal no PSI, estão trocadas em relação à posição das mesmas nas SAPLIPs, portanto, o PSI não é considerado uma verdadeira saposina, mas sim uma *swaposin* (Simões e Faro, 2004). Apesar da função do PSI continuar ainda por esclarecer, foi descrito o seu envolvimento no endereçamento dos precursores da fitepsina da cevada para o vacúolo, em semelhança ao papel da saposina C nos mamíferos, que parece ser responsável pelo endereçamento independente de manose-6-fosfato, da catepsina D para os lisossomas (Törmäkangas *et al.*, 2001; Simões e Faro, 2004). Apesar dos resultados obtidos para a fitepsina, outros estudos contrapõem o papel do PSI no endereçamento vacuolar das APs. Terauchi e colaboradores (2006) verificaram que em duas APs vacuolares da soja a remoção do PSI apenas impediu o endereçamento de uma delas para o vacúolo. Por outro lado, a mutação do PSI da cardosina A, vacuolar em tabaco, não impediu o seu direccionamento para o vacúolo (Pereira, 2008). Para além disso, outras APs com o PSI inserido na sua sequência não sofrem um endereçamento vacuolar (Terauchi *et al.*, 2006). Em resumo, os resultados discrepantes, não permitem confirmar a função desta sequência no direccionamento, pelo contrário tornam-na menos esclarecedora.

Egas e colaboradores (2000) demonstraram um papel do PSI da cardosina A como indutor de ruptura de vesículas e da libertação do seu conteúdo, propondo, consequentemente, um papel bifuncional para as moléculas precursoras das APs, defendendo que estas contêm um domínio estabilizador das membranas e outro domínio com actividade proteolítica. Os mesmos

autores, sugerem que o PSI pode contribuir para a defesa da planta e/ou para autólise tardia das células (Egas *et al.*, 2000).

Faro e Gal (2005), recorrendo a uma análise bioinformática do genoma de *Arabidopsis*, identificaram cinquenta proteínas *AP-like*, tendo-as classificado em 3 principais categorias: típicas, *nucellin-like* e atípicas. Em comum, as APs atípicas e *nucellin-like* das plantas não apresentam o segmento PSI na sua sequência, mas apresentam um número pouco usual de cisteínas, o mesmo tipo de aminoácidos que precedem cada tríade catalítica e apresentam também localizações inesperadas, aspectos que, em conjunto, as diferenciam bem das APs típicas (Faro e Gal, 2005). Apesar da classificação atribuída às APs vegetais, o grupo de APs atípicas constitui o grupo mais abundante de APs tanto em *Arabidopsis* como em arroz (Faro e Gal, 2005; Chen *et al.*, 2009), sendo, ao mesmo tempo, as APs atípicas e *nucellin-like*, que tem vindo a ser menos estudadas. Devido à abundância relativa dos três grupos de APs, a atribuição do nome típicas, parece um pouco desapropriado, uma vez que, este grupo parece representar as APs menos abundante em plantas.

As APs vegetais são processadas ao longo do seu trajecto intracelular, sendo o processamento dos seus precursores iniciado com a remoção da sequência sinal (Pre) após a sua translocação para o ER, seguindo-se a clivagem do prosegmento (Pro) e a total ou parcial remoção do PSI. No entanto, ocorrem variações na ordem das clivagens entre diferentes APs (Simões e Faro, 2004). O processamento completo das APs vegetais, culmina na formação das enzimas activas de cadeia simples ou dupla, geralmente sem o PSI e sem o prosegmento (Simões e Faro, 2004). O processamento proteolítico que leva à activação das APs pode ocorrer por três possíveis mecanismos: auto-processamento completo, auto-processamento parcialmente assistido por uma outra proteinase ou processamento completamente assistido por uma outra proteinase (Koelsh *et al.*, 1994).



**Figura 1.6 - Representação das estruturas cristalinas de cardosina A e de profitepsina.** Em a) a estrutura da cardosina A madura de *C. cardunculus* L.. A azul está representada a cadeia pesada e a

vermelho a cadeia leve e as pontes dissulfeto a amarelo. Em b) a estrutura da profitepsina de *H. vulgare* L.. Apresenta o propéptido a azul, a proteína madura a ciano (cadeia pesada) e a vermelho (cadeia leve), o *plant-specific insert* (PSI) a verde e as pontes dissulfeto a amarelo (em Simões e Faro, 2004).

Ao contrário do que sucede com as APs de outros organismos, nos quais se conhece uma diversidade de funções como processamento e degradação de proteínas ou processamento de poliproteínas virais, as funções biológicas destas proteases em plantas são ainda pouco claras. Contudo, estas moléculas têm vindo a ser associadas a funções de processamento e degradação de proteínas, senescência, respostas ao stress, morte celular programada e reprodução nas células vegetais (Simões e Faro, 2004).

### 1.2.2. Cardosinas

O cardo (*Cynara cardunculus* L.) é uma herbácea perene com um caule erecto e folhas espinhosas pertencente à família Asteraceae. Esta planta pode ser encontrada no sul e oeste da região mediterrânica, sul de Portugal, Madeira e Ilhas Canárias. A sua floração ocorre no segundo ano do ciclo de vida da planta com formação de inflorescências organizadas em capítulos, com numerosas flores hermafroditas individuais rodeadas por brácteas (Fig. 1.7) (Pissarra *et al.*, 2007). As flores maduras apresentam pétalas lilás e um cálice modificado, importante para a dispersão das sementes (Fig. 1.7) (Duarte *et al.*, 2006).



**Figura 1.7 - Inflorescência de *Cynara cardunculus* (cardo).**

Desde os tempos Romanos, extractos aquosos da flor de cardo vêm sendo aplicados como coagulante do leite para a produção de queijo tradicional de ovelha em Portugal e em

Espanha (Silva e Malcata, 1999). Esta actividade coagulante deve-se à abundante presença de proteases aspárticas nas flores da planta (Heimgartner *et al.*, 1990).

A partir das flores de cardo, foram inicialmente isoladas e extensivamente caracterizadas, duas APs, a cardosina A e a cardosina B, as quais são expressas a partir de dois genes diferentes mas relacionados, que se pensa terem surgido por um fenómeno de duplicação genética (Ramalho-Santos *et al.*, 1997). Estas cardosinas são as que mais contribuem para o conteúdo em proteínas solúveis totais nos estigmas maduros de cardo, sendo estas expressas em quantidades pouco usuais, em relação às restantes APs de plantas (Ramalho-Santos *et al.*, 1997; Duarte *et al.*, 2008). A cardosina B, apesar de menos abundante na flor do cardo, apresenta uma maior actividade catalítica e menor especificidade em relação à cardosina A (Ramalho-Santos *et al.*, 1997).

A elevada identidade entre as sequências nucleotídica e aminoacídica de ambas as proteínas, em conjunto com a sua localização diferencial, torna estas moléculas um excelente modelo de estudo das vias secretoras e dos sinais de endereçamento em plantas (Pereira *et al.*, 2008).

### **1.2.2.1. Expressão das cardosinas A e B em cardo**

Tendo em conta a localização de ambas as cardosinas, A e B, em cardo, parece bastante provável que estas desempenhem diferentes e importantes funções biológicas relacionadas com a reprodução e germinação de *Cynara cardunculus*. No entanto, tal como sucede com outras APs de plantas, as funções biológicas que lhes foram atribuídas necessitam de outros estudos que as confirmem.

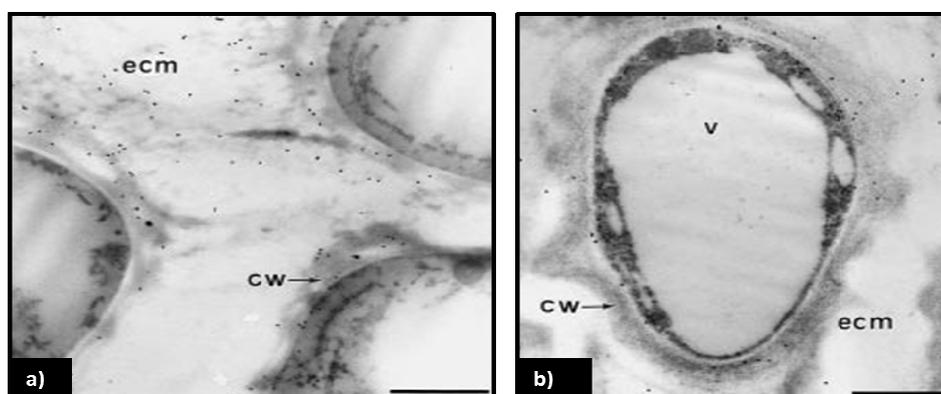
Em flores de cardo, a expressão da cardosina A restringe-se ao pistilo da flor, acumulando-se, essencialmente, em vacúolos de armazenamento proteico das papilas estigmáticas, e em menor quantidade nos vacúolos das células epidérmicas do estilete. Deste modo, foi proposto que a sua distribuição poderia estar relacionada com um possível envolvimento da cardosina A na interacção polén-pistilo (Ramalho-Santos *et al.*, 1997).

A clonagem do cDNA de cardosina A revelou a presença de um motivo RGD, conhecido como uma sequência de ligação à integrina em tecidos de mamíferos (Fig. 1.10). A estrutura cristalográfica da cardosina A permitiu verificar que este motivo se encontra projectado para a superfície da proteína. Para além disso, foi também isolado a partir de extractos de pólen um

possível receptor de 100 kDa que pode interagir com a cardosina A via RGD, o que veio reforçar o possível envolvimento da cardosina A nas interações pólen-pistilo, nomeadamente, no reconhecimento do pólen (Faro *et al.*, 1999; Pissarra *et al.*, 2007).

A acumulação de cardosina A em flores maduras é sugestiva de um papel da proteína na senescência destes órgãos. Outras APs de plantas foram, igualmente, associadas a processos de morte celular programada (PCD) como foi sugerido para a ciprosina, também presente em flores do cardo (Ramalho-Santos *et al.*, 1997; Simões e Faro, 2004; Pissarra *et al.*, 2007).

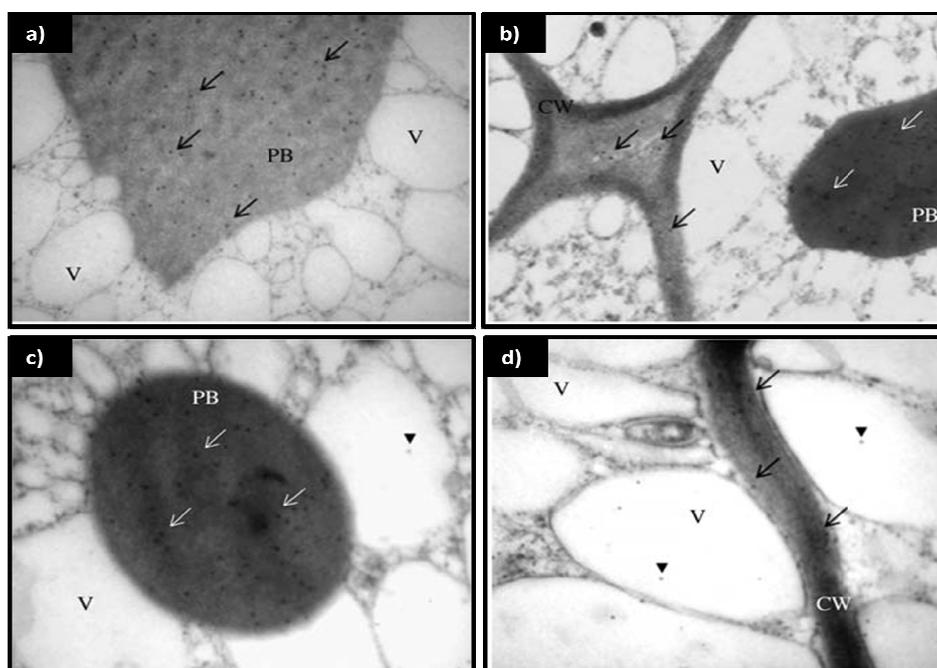
Apesar da elevada identidade com a sequência de cardosina A, a cardosina B exibe uma diferente distribuição na flor do cardo. Ao contrário da cardosina A que é maioritariamente endereçada para o vacúolo, a cardosina B é secretada para a matriz extracelular e paredes celulares do tecido de transmissão do estilete durante a maturação da flor (Fig. 1.8 - A) (Vieira *et al.*, 2001). Existe um gradiente de cardosina B da parte superior do estigma para a base do estilete, detectando-se a sua presença também na face ventral da parede do ovário e no nucelo. Em conjunto, estes dados sugerem o envolvimento desta AP no processo de afrouxamento (remodelando ou degradando a matriz extracelular) do tecido de transmissão durante o crescimento/progressão do tubo polínico. A cardosina B parece, assim, permitir o estabelecimento de uma via interna a partir do estigma até o saco embrionário, guiando o tubo polínico até à oosfera e às sinérgidas. Foi também proposto que a cardosina B poderia ter um papel de sinalização necessária para o direccionamento e alongação do tubo polínico. Por outro lado, a sua localização no saco embrionário completamente maduro relaciona a cardosina B com acontecimentos de PCD no nucelo de *C. cardunculus*, apontando para um possível envolvimento no desenvolvimento do óvulo e do saco embrionário (Figueiredo *et al.*, 2006).



**Figura 1.8 - Localização da cardosina B por microscopia electrónica com marcação com partículas de ouro no tecido de transmissão de cardo.** A cardosina B localiza-se essencialmente na matriz extracelular das células tecido de transmissão (presença de muitas partículas douradas) (A).

Observa-se também alguma marcação no citoplasma e nenhuma nos vacúolos (B). ecm: matriz extracelular; cw: parede celular; v: vacúolo. Barras: 1  $\mu$ m (em Vieira *et al.*, 2001).

Recentemente, Pereira e colaboradores (2008) detectaram a expressão de ambas as cardosinas em sementes de cardo. Enquanto em flores do cardo a cardosina A é expressa em PSVs, nas sementes esta é detectada essencialmente em PBs (Fig. 1.9 – a, b e c), mas também na parede celular (Fig. 1.9 – b e d) (Pereira *et al.*, 2008). Foi sugerido pelos autores que a presença da procardosina A em corpos proteicos das células cotiledonares poderá estar envolvida no catabolismo e processamento das reservas da semente, tal como outras APs localizadas em sementes. A presença da forma precursora da cardosina A nos corpos proteicos e da forma madura da cardosina A nos vacúolos, pode significar diferentes funções biológicas de cada uma das formas durante a germinação da semente de cardo (Pereira *et al.*, 2008). Este fenómeno sugere uma especialização das vias de trânsito de acordo com as necessidades do tecido. Isto significa que por um processo ainda desconhecido as mesmas proteínas são transportadas do ER para diferentes destinos finais e por diferentes vias em diferentes tecidos no cardo.

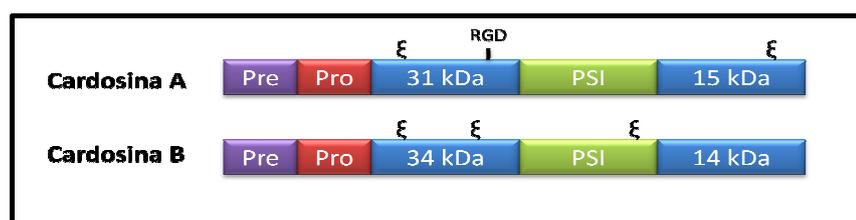


**Figura 1.9 - Localização de cardosina A por microscopia electrónica com marcação com partículas de ouro em cotilédones de cardo.** Observação de secções de cotilédones na fase de emergência da radícula, com imunomarcação com partículas de ouro utilizando anticorpo contra a cadeia maior da cardosina A (a e b) e anticorpo contra a região PSI (c e d). As setas indicam os pontos dourados nos corpos proteicos (PB), na parede celular (CW) e nos espaços intercelulares. As setas preenchidas indicam os pontos dourados nos vacúolos (V) (em Pereira *et al.*, 2008).

Os mesmos autores detectaram a presença da cadeia de 34 kDa da forma madura da cardosina B em sementes de cardo, desde a embebição até à emergência da radícula. Neste estudo, dados apontam para uma activação da enzima com a re-hidratação da semente, tendo sido proposto um papel da proteína no afrouxamento do invólucro da semente de modo a promover a emergência da radícula durante a germinação (Pereira *et al.*, 2008). Recentemente, a cardosina B foi localizada em sementes de cardo nas células da protoderme, diminuindo a sua expressão em direcção ao meristema fundamental da semente. Após a emergência da radícula, a marcação foi observada, essencialmente, ao nível dos corpos proteicos junto à protoderme, sugerindo, uma função da cardosina B na mobilização das reservas de proteínas da semente que ocorre na fase inicial da germinação (Oliveira, 2009).

As cardosinas são sintetizadas na forma de precursores que são processados originando a sua forma madura. Esta forma é composta por duas subunidades, uma cadeia maior com peso molecular aparente de 31/34 kDa, e uma cadeia menor de 15/14 kDa (respectivamente para a cardosina A e B) (Fig. 1.10) (Ramalho-Santos *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2001).

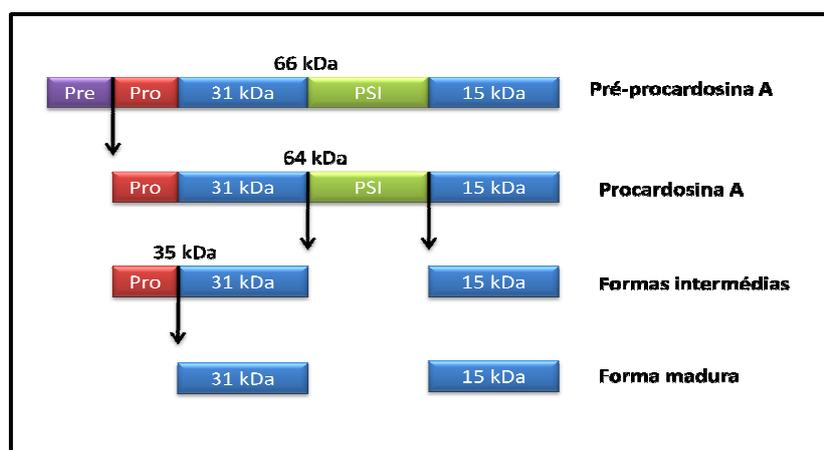
Ramalho-Santos e colaboradores (1998) propuseram um modelo para o processamento proteolítico da cardosina A, segundo o qual a proteína precursora ou preprocardosina A (66 kDa) é sintetizada e translocada para o ER, onde sofre processamento proteolítico do péptido sinal (Pre), originando a molécula de procardosina A (64 kDa). Depois de uma segunda clivagem entre a cadeia maior e o PSI, que origina as formas intermédias de 35 e de 30 kDa, ocorre uma segunda clivagem entre o PSI e a cadeia de 15 kDa. O processamento da proteína termina aquando da remoção do prosegmento (Pro), resultando na formação da cadeia maior e na cadeia menor da proteína, ou seja, gera a forma madura activa da cardosina A (Fig. 1.11). Apesar de ainda não se ter procedido a um estudo desta natureza para a cardosina B, considera-se que o seu processamento proteolítico será semelhante, dado se tratarem de proteínas homólogas.



**Figura 1.10 - Representação dos precursores da cardosina A e da cardosina B.** Ambas apresentam um péptido sinal (Pre) na região N-terminal, seguido de um prosegmento (Pro). As cadeias

maior e menor, a azul, à esquerda e à direita respectivamente, constituem a forma madura de ambas as proteínas e estão separadas pelo domínio PSI. Na figura encontra-se representado o padrão de *N*-glicosilação de ambas as proteínas ( $\xi$ ), e o motivo RGD inserido na sequência de cardosina A.

Em cardo, a cardosina A parece sofrer processamento ao longo da maturação da flor da planta, e ambas as cardosinas são supostamente processadas ao longo do desenvolvimento pós-embrionário da semente (Ramalho-Santos *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2008). Ramalho-Santos e colaboradores (1998) propuseram a conversão da procardosina A na sua forma madura (activação) no interior dos vacúolos, local onde esta proteína se acumula nas flores de cardo.



**Figura 1.11 - Modelo proposto para o processamento proteolítico da cardosina A.** As setas indicam os locais de clivagem sequenciais da forma precursora da cardosina A (pré-procardosina A). PSI: *Plant specific insert*; Pre: péptido sinal; Pro: prosegmento.

### 1.2.2.2. Expressão das cardosinas em sistemas heterólogos

O endereçamento das proteínas pode, em alguns casos, ser específica de determinados tecidos ou organismos, sofrendo alterações mediante o tecido e/ou organismo em que estiverem a ser expressas (Robinson *et al.*, 2005). Apesar disso, para o estudo do trânsito de determinadas proteínas, por vezes é necessário recorrer a outros sistemas que não o sistema nativo, onde a proteína é naturalmente expressa, de modo a facilitar e tornar esse estudo mais rápido e enriquecedor, permitindo também diferentes abordagens.

As cardosinas A e B, como referido anteriormente, são expressas naturalmente em cardo, acumulando-se, maioritariamente, nos estigmas e estiletos da flor. Uma vez que o estudo do trânsito destas proteínas é dificultado na planta nativa devido ao seu longo ciclo de vida, à presença de outras cardosinas, e à pobre caracterização do sistema, o recurso a sistemas heterólogos bem caracterizados é essencial para esse mesmo fim. A utilização de plantas

modelo como *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* tem permitido obter novas informações acerca do direccionamento das cardosinas e das suas vias de trânsito.

Quando expressa em epiderme foliar de tabaco e em plântulas de *Arabidopsis*, a cardosina A, é endereçada para os vacúolos, tal como ocorre no sistema nativo. Consequentemente, estes dois sistemas heterólogos parecem ser adequados para o estudo das vias de trânsito da cardosina A (Duarte *et al.*, 2008; Pereira, 2008).

Para além do correcto endereçamento para o vacúolo, a cardosina A sofre nos sistemas heterólogos, um processamento idêntico ao descrito para o sistema nativo, o que demonstra a existência de mecanismos de processamento e endereçamento conservados (Duarte *et al.*, 2008; Pereira, 2008). Em *Arabidopsis* e em tabaco, a cardosina A parece sofrer o último passo do seu processamento no interior do vacúolo (Duarte *et al.*, 2008; Pereira, 2008).

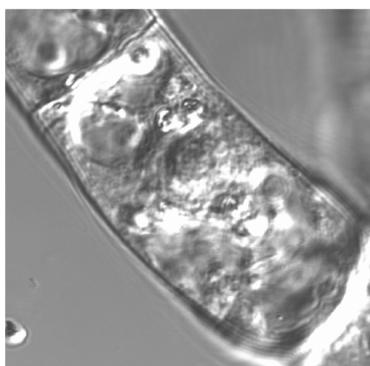
Ao contrário do que acontece em cardo, a cardosina B não é endereçada para a parede celular da epiderme foliar de tabaco, localizando-se nos vacúolos. No entanto, verificou-se que a cardosina B em protoplastos de tabaco é secretada, tal como ocorre no sistema nativo, apontando para um possível papel da parede celular no direccionamento da cardosina B para o vacúolo (Soares da Costa, 2009). Não obstante, a localização da cardosina B no vacúolo, neste sistema heterólogo, pode ajudar a clarificar as vias e mecanismos envolvidos neste trajecto e igualmente no trânsito da cardosina A para o vacúolo.

Em sementes de *Arabidopsis*, sob acção do promotor constitutivo 35S recorrendo a um sistema de expressão indutivo, a cardosina B foi localizada desde o local de síntese até o seu local de acumulação. Foi possível identificar a cardosina B em estruturas pontuadas no citoplasma, que, pelo seu tamanho, parecem constituir um compartimento intermédio do sistema endomembranar, mais recentemente identificado como compartimento pré-vacuolar (PVC) (Oliveira, 2009; Oliveira, dados não publicados). Dos cinco aos sete dias após a indução, observou-se a acumulação crescente de cardosina B na parede celular, o que parece indicar que em sementes de *Arabidopsis* a cardosina B segue uma via de trânsito para a parede celular via PVC. Considerando a localização da cardosina B em sementes de *Arabidopsis* este sistema torna-se interessante para o estudo mais detalhado das vias de trânsito e mecanismos envolvidos no endereçamento da cardosina B para a parede celular (Oliveira, 2009).

### 1.3. Células BY-2 como modelo biológico de estudo

O estabelecimento de linhas celulares a partir de tecidos de plantas é relativamente fácil, tendo sido, até hoje, obtidas diferentes linhas celulares a partir de diferentes tecidos e espécies de plantas superiores (David e Perrot-Rechenmann, 2001).

As culturas de células de *Arabidopsis* e de *Nicotiana tabacum* var. Bright Yellow-2 (BY-2), têm sido frequentemente utilizadas em estudos de trânsito intracelular. Apesar de *Arabidopsis* ser considerado um sistema modelo para múltiplos estudos, a cultura de células desta espécie apresenta algumas limitações para o seu uso, como por exemplo a dificuldade de sincronização do seu ciclo celular e o reduzido tamanho das suas células, o que dificulta a observação detalhada da organização intracelular e do seu conteúdo (Geelen e Inzé, 2001).



**Figura 1.12 – Célula de *Nicotiana tabacum* var. Bright Yellow-2 (BY-2).** Imagem de contraste de interferência diferencial (DIC) de uma célula BY-2 obtida por microscopia confocal de varrimento a laser (CLSM).

Por outro lado, a linha celular obtida a partir de células de tabaco (células BY-2) tem mostrado ser mais vantajosa em vários aspectos em relação à cultura de células de *Arabidopsis* (Geelen e Inzé, 2001). Trata-se de uma linha bem caracterizada, altamente homogênea e que apresenta uma taxa de crescimento bastante acentuada, com um aumento de 80 a 100 vezes em apenas uma semana, sendo estas células reconhecidas como as células “HeLa” das plantas (David e Perrot-Rechenmann, 2001; Miyazawa e Sakai, 2006). Estas células crescem, normalmente, em filamentos uniformes com células de grande tamanho (cerca do dobro das células de *Arabidopsis*), e apresentam uma autofluorescência relativamente baixa, o que as tornam num modelo bastante interessante e útil para análise microscópica (Fig. 1.12). Para além das vantagens mencionadas, as células BY-2 apresentam uma outra vantagem bastante importante, são células facilmente transformáveis após formação de protoplastos ou mesmo directamente através de electroporação e bombardeamento de partículas ou por co-cultivo com

*Agrobacterium tumefaciens* (Geelen e Inzé, 2001; Miyazawa e Sakai, 2006). Consequentemente, têm-se vindo a tornar cada vez mais populares em estudos de localização subcelular de proteínas, dinâmica de organelos e estudo do ciclo celular através da marcação com proteínas fluorescentes (FPs) ou por imunofluorescência indirecta (Geelen e Inzé, 2001; Lo e Jiang, 2006).

O estudo do trânsito intracelular em células BY-2 é ainda potenciado por outros dois principais factores: a crescente disponibilização de linhas celulares transgênicas com expressão de diferentes marcadores de compartimentos do sistema endomembranar e a possibilidade de aplicar drogas inibidoras do trânsito intracelular, como a brefeldina A (BFA) e a wortmanina, as quais inibem o trânsito vesicular entre diferentes compartimentos do sistema endomembranar.

#### **1.4. Objectivos**

A cardosina A e a cardosina B são proteinases aspárticas isoladas a partir de flores de *Cynara cardunculus*. Estas proteínas partilham uma identidade de 73 %, tanto a nível da sua sequência nucleotídica como aminoacídica, no entanto, acumulam-se em compartimentos celulares distintos em flores de cardo. Por este motivo, parecem constituir um bom modelo para o estudo das vias e mecanismos moleculares envolvidos no endereçamento de APs de plantas.

A expressão destas cardosinas em *Nicotiana tabacum* conduz ao endereçamento de ambas para o vacúolo sendo, por esta razão, o tabaco um interessante modelo biológico para o estudo da via seguida pelas cardosinas para este compartimento. No entanto, estudos em tabaco até à data não permitiram esclarecer acerca das vias envolvidas neste processo pelo que, a escolha de um modelo mais simples e com possibilidades de novas abordagens se tornou uma alternativa necessária. Tendo em consideração que as células BY-2 constituem uma linha celular de tabaco que apresenta diversas vantagens em relação à planta de tabaco. Este estudo vem introduzir um novo modelo para o estudo das vias de trânsito das cardosinas A e B para o vacúolo. Com este trabalho pretendia-se elaborar uma construção de cardosina A fundida com a proteína fluorescente mCherry e com um *linker* entre as sequências, de modo a avaliar o seu endereçamento e processamento em células da epiderme foliar de tabaco e analisar a importância do *linker* no processamento e endereçamento da cardosina A para o vacúolo. Pretendia-se utilizar esta construção em conjunto com as construções cardosina B::linker-mCherry e cardosina A::GFP (já disponíveis e anteriormente testadas em tabaco) para transformar células BY-2, e estudar, pela primeira vez, o endereçamento e processamento das cardosinas neste sistema de expressão.

## **2. Material e Métodos**

## 2.1. Estirpes bacterianas e condições de crescimento

Durante este trabalho foram utilizadas duas estirpes bacterianas, a estirpe DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* e a estirpe GV3101::pMP90 de *Agrobacterium tumefaciens* (Koncz e Schell, 1986).

### 2.1.1. Crescimento de bactérias de *Escherichia coli* e de *Agrobacterium tumefaciens*

O crescimento das duas estirpes bacterianas foi promovido em meio Luria-Bertani (LB) [10 g de Triptona, 5 g de extracto de levedura, 10 g de NaCl, para 1 litro de cultura; com agar 1,5 % (p/v) para meio sólido] ou em meio LB sólido [com agar 1,5 % (p/v)], sendo as culturas de *E. coli* incubadas a 37 °C e as de *A. tumefaciens* a 28 °C. As culturas líquidas foram crescidas com agitação orbital de 150 rpm (GFL 3031). E ambas as estirpes, após transformação foram armazenadas, em alíquotas de 500  $\mu$ l em glicerol 10 a 15 % (v/v), a -80 °C, até serem utilizadas em futuras inoculações.

Durante o estudo, as células de *E. coli* e de *A. tumefaciens* transformadas com os diferentes clones foram seleccionadas em meio LB suplementado com canamicina (25  $\mu$ g/mL).

### 2.1.2. Preparação de células *E. coli* competentes

Procedeu-se à inoculação de 100  $\mu$ l de uma colónia de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  em 25 mL de meio LB e incubou-se 16 horas a 37 °C, sob agitação orbital de 150 rpm (GFL 3031). Esta cultura foi acrescentada a 225 mL de meio LB suplementados com MgCl<sub>2</sub> 0,4 M e MgSO<sub>4</sub> 0,4 M, sendo de novo incubada, sob as mesmas condições. Após atingir uma densidade óptica a 600 nm de aproximadamente 0,7, a cultura foi incubada, durante 10 minutos, em gelo. A cultura foi centrifugada a 3000 rpm, durante 5 minutos, (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf) e após eliminação do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensionado em 100 mL de RF1 [RbCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 30 mM, glicerol 15 % (v/v); pH = 5,8 suplementado com MnCl<sub>2</sub> 500 mM e KAc 30 mM] e incubado em gelo, durante 15 minutos. As células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições e o sobrenadante removido. Depois de ressuspensionadas em 16 mL de RF2 [RbCl 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 223 mM, MOPS 10 mM e glicerol 15 % (v/v); pH = 8], as células foram guardadas em alíquotas a -80 °C.

### 2.1.3. Transformação de *E. coli* por choque térmico

As células de *E. coli* foram transformadas pelo método do choque térmico. Para tal, acrescentaram-se 2 µl do DNA recombinante a 100 µl de células *E. coli* DH5α competentes, e incubou-se 15 minutos, em gelo. As células foram incubadas a 42 °C (Hb-130, Unitek), durante 90 segundos e, recolocadas, imediatamente a seguir, em gelo durante 2 minutos. Adicionaram-se 300 µl de meio LB e incubou-se sob agitação, a 37 °C, durante 30 minutos (GFL 3031). As células foram centrifugadas a 3500 rpm (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf), durante 2 minutos e ressuspensas em 100 µl de LB. Plaqueou-se em meio LB-agar selectivo e incubou-se a 37 °C, durante cerca de 16 horas.

### 2.1.4. Preparação de células *A. tumefaciens* electrocompetentes

Foram inculados 100 µl de uma colónia de células de *A. tumefaciens* GV3101::pMP90 competentes em 10 mL de meio LB. A cultura cresceu a 28 °C durante 16 horas, sob agitação orbital de 150 rpm (GFL 3031). A cultura foi acrescentada a 200 mL de meio LB, sendo de novo incubada, sob as mesmas condições. Após atingir uma densidade óptica a 600 nm de aproximadamente 0,5 a 0,6, a cultura foi incubada, durante 30 minutos, em gelo. A cultura foi, centrifugada a 4500 rpm, durante 10 minutos, (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf). Depois da eliminação do sobrenadante, o sedimento foi ressuscitado em 25 mL de tampão HEPES 1 mM, arrefecido em gelo. A suspensão foi centrifugada e o sedimento, de novo, ressuscitado no mesmo volume de tampão HEPES 1 mM. Realizaram-se duas novas centrifugações, tendo sido realizada a primeira ressuspensão em 20 mL de tampão HEPES 1 mM com glicerol 10% (v/v) e a segunda em 0,5 mL de tampão HEPES 1 mM com glicerol 10% (v/v). A partir da cultura final foram preparadas e conservadas alíquotas a -80 °C.

### 2.1.5. Transformação de *A. tumefaciens* por electroporação

Antes de proceder à electroporação foi necessário preparar a cuvette de electroporação que foi lavada inicialmente com SDS 1 % (p/v) durante 5 minutos, e depois de remover o detergente com água esterilizada, foi lavada com etanol 70 % (v/v), durante 5 minutos. Adicionou-se a 50 µl de células de *Agrobacterium tumefaciens* electrocompetentes 10 µl de miniprep puro e a mistura foi, transferida, cuidadosamente, para a cuvette seca e pré-arrefecida em gelo. Procedeu-se à electroporação das células no electroporador “Bio-Rad Gene pulser Electroporation System” (Bio-Rad), (25 µF, 2,5 kV, e 200 Ω). Imediatamente a seguir, adicionou-

se à cuvete 1 mL de meio LB e a suspensão foi transferida, cuidadosamente, para um tubo onde foi incubada durante 4 horas, sem agitação a 28 °C. Depois de recuperadas, as bactérias foram depositadas por centrifugação da cultura, durante 4 minutos, a 4000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf). Descartaram-se 900 µl de sobrenadante e as células foram ressuspensas em 100 µl e plaqueadas em meio LB selectivo, e incubadas a 28 °C, durante 48 h.

## 2.2. Modelos biológicos

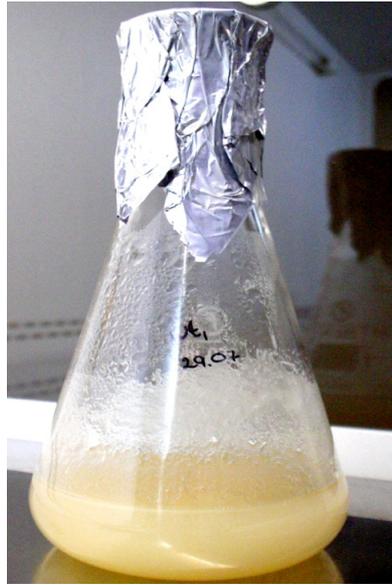
Durante este trabalho foram utilizadas plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) para testar a expressão e endereçamento da construção elaborada e foram usadas células Bright Yellow-2 (BY-2) para estudar o endereçamento e de processamento proteolítico das construções cardosina A::linker-mCherry, cardosina B::linker-mCherry e cardosina A::GFP.

### 2.2.1. Cultura e manutenção de células BY-2 em suspensão

As células Bright Yellow-2 (BY-2) (já existentes no laboratório), utilizadas neste estudo, foram mantidas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) modificado – meio BY-2 [Murashige-Skoog (MS) 0,4 % (p/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,02 % (p/v), mio-inositol 0,01 % (p/v), sacarose 3 % (p/v), MES 0,2 % (p/v); pH = 5,6, autoclavado a 110 °C, durante 25 minutos] suplementado com Tiamina (1 µg/mL) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (0,2 µg/mL) – na obscuridade a 27 °C, com agitação orbital de 130 rpm (Shacking incubator, Shelab). As culturas de células em suspensão foram mantidas por subcultura para meio BY-2 fresco (1:16), semanalmente (Fig. 2.1). De modo a garantir a estabilidade das células BY-2 estas foram sub-cultivadas por um período mínimo de 3 semanas antes de serem transformadas.

A partir das culturas líquidas de células BY-2, produziu-se, sempre que necessário, tecido caloso, plaqueando-se 1 mL de cultura para meio BY-2 sólido [com agar 0,7 % (p/v)], incubando-se as placas a 27 °C, na obscuridade e sem agitação (Shacking incubator, Shelab). Para reiniciar novas culturas de células em suspensão foi transferida uma pequena porção de tecido caloso individualizado para 80 mL de meio BY-2.

Uma vez que a cultura de células BY-2 exige um grande nível de assépsia, todos os procedimentos de manipulação das mesmas foram realizados em câmara de fluxo laminar (Steril Gard Class II, Laminaire).



**Figura 2.1 - Cultura de células Bright-Yellow-2 (BY-2) em suspensão com 7 dias.**

#### **2.2.1.1. Tratamento das células BY-2 com BFA**

De modo a estudar em maior pormenor a localização e o trânsito das cardosinas em células BY-2, as células foram tratadas com uma droga inibidora da secreção, a brefeldina (BFA). A BFA foi aplicada directamente na cultura de células em suspensão a partir de uma solução *stock* em DMSO (10 mg/mL) para obtenção das concentrações finais de 10  $\mu\text{g/mL}$  (36  $\mu\text{M}$ ) e 100  $\mu\text{g/mL}$  (360  $\mu\text{M}$ ). Depois de incubadas durante 2 horas com BFA, as células foram observadas por microscopia confocal de varrimento a laser, sendo observadas também células da mesma linha sem BFA, incubadas nas mesmas condições que as células tratadas.

#### **2.2.2. Manutenção das plantas de *Nicotiana tabacum***

Sementes de *Nicotiana tabacum* cv. SR1 (Petit Havana) germinaram em caixas de Petri esterilizadas, sobre papel absorvente saturado com água bidestilada. Após, cerca de 7 dias, algumas das plântulas foram transplantadas para substrato vegetal (Compusana, Compo) e colocadas a 21 °C, com ciclos de 16 horas de luz, a 80% de humidade, em câmara de cultura vertical (Growth Cabinet, Sanyo).

## 2.3. Manipulação e análise de DNA

### 2.3.1. Amplificação de DNA por Reacção em cadeia da polimerase (PCR)

De modo a obter a construção de cardosina A::linker-mCherry, foi necessário amplificar, por PCR, as sequências de cardosina A e linker-mCherry a partir dos vectores em que se encontravam inseridas.

#### 2.3.1.1. Desenho de *primers*

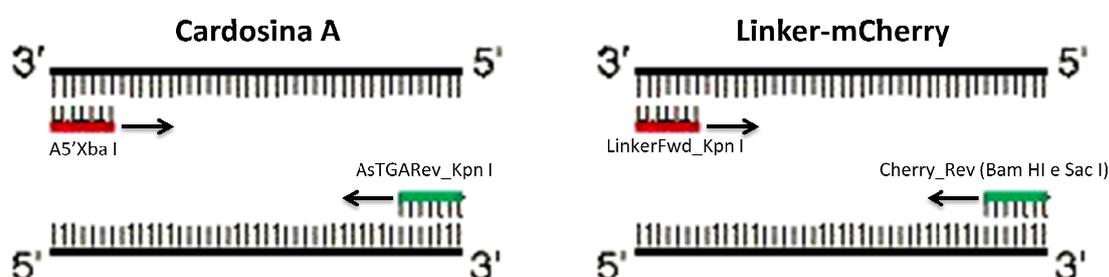
Foram desenhados *primers* para amplificação de linker-mCherry e de cardosina A, os quais se encontram descritos na Tabela 2.1, juntamente com as suas especificações. Em ambos os *primers* desenhados (AsTGARev\_Kpn I e LinkerFwd\_Kpn I) foi incorporado um adaptador com uma sequência de reconhecimento para a enzima de restrição *Kpn* I (5'-GGTACC-3'), a qual permitiu que a cardosina A entrasse na grelha de leitura de mCherry após a sub-clonagem no vector de expressão pVKH18En6 (Batoko *et al.*, 2000), razão pela qual também o *primer reverse* para o cardosina A foi desenhado excluindo o codão STOP (TGA) (Tabela 2.1). Os *primers* desenhados foram produzidos pela empresa MWG Operon (Eurofins, Alemanha).

**Tabela 2.1 - *Primers* utilizados na amplificação dos fragmentos de DNA de cardosina A e linker-mCherry por PCR.**

<i>Primer</i>	Sequência nucleotídica (5' → 3')	Especificações
<b>A5'Xba I</b>	TCTAGAGCCGCCACCATG GGTACCTCAATCAAA	Introduz um adaptador para a enzima de restrição <i>Xba</i> I
<b>AsTGARev_Kpn I</b>	AAAGGTACAGCTGCTTCTGCAAATCC	Introduz um adaptador para a enzima de restrição <i>Kpn</i> I, e exclui o codão stop da cardosina A
<b>LinkerFwd_Kpn I</b>	AAAGGTACCTCCTGCAGCCCGGGGAT	Introduz um adaptador para a enzima de restrição <i>Kpn</i> I
<b>Cherry_Rev (Bam HI e Sac I)</b>	CTGAGCTCGGATCC TTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	Introduz adaptadores para as enzimas de restrição <i>Sac</i> I e <i>Bam</i> HI

### 2.3.1.2. Reacção em cadeia da polimerase (PCR)

Os fragmentos de DNA de cardosina A e de linker-mCherry foram amplificados por PCR: a partir do clone pSKAK1 e pVKBch#100.3.1, respectivamente, utilizando os *primers* adequados representados na Tabela 2.1 (Figura 2.2).



**Figura 2.2 - Esquema representativo do emparelhamento dos *primers* nas reações de PCR para amplificação dos fragmentos de DNA de cardosina A e de linker-mCherry.** A vermelho estão representados o *primers forward* e a verde os *primers reverse* utilizados.

Para a realização das duas reacções de PCR foram utilizados os reagentes apresentados na Tabela 2.2, nas proporções indicadas. A DNA polimerase utilizada (*Pfu* DNA polimerase (Fermentas)), apresenta actividade *proofreading*, o que a torna mais adequada para reacções de PCR com o menor erro de incorporação de nucleótidos (Sambrook e Russell, 2001).

**Tabela 2.2 - Composição das reacções de PCR para amplificação dos fragmentos de DNA de cardosina A e de linker-mCherry.**

Reagentes	Concentração final	Volume
<b>DNA molde</b>	20 ng	5 µl
<b>Água bidestilada e estéril</b>	-	14 µl
<b>Tampão <i>Pfu</i> com MgSO4 (10 x)</b>	1 x	2,5 µl
<b><i>Primer forward</i> (20 µM)</b>	0,3 µM	0,375 µl
<b><i>Primer reverse</i> (20 µM)</b>	0,3 µM	0,375 µl
<b>dNTPs (2 mM)</b>	0,2 mM	2,5 µl
<b><i>Pfu</i> DNA polymerase recombinante (Fermentas)</b>	0,6 U	0,25 µl

As reacções de PCR, foram realizadas de acordo com o programa indicado na Tabela 2.3 (Mastercycler gradient, Eppendorf).

Os produtos de PCR foram, posteriormente, analisados em gel de agarose. Depois de garantida a amplificação dos correctos fragmentos de DNA, as respectivas bandas foram extraídas do gel de agarose, quantificadas e clonadas no vector pCR-Blunt.

**Tabela 2.3 - Condições de PCR utilizadas na amplificação dos fragmentos de DNA de cardosina A e de linker-mCherry.**

Passo de PCR	Temperatura	Duração	Número de ciclos
<b>Desnaturação inicial</b>	94 °C	5 minutos	1
<b>Desnaturação</b>	94 °C	30 segundos	35
<b>Emparelhamento</b>	54 °C (cardosina A) 56 °C (linker-mCherry)	30 segundos	
<b>Extensão</b>	72 °C	3 minutos	
<b>Extensão Final</b>	72 °C	7 minutos	1

### 2.3.2. Electroforese em gel de agarose

Em vários passos de manipulação de DNA, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8 % (p/v) preparado em tampão TAE 1 x [Trizma base 40 mM, Ácido acético glacial 10 % (v/v) e EDTA 10 mM] com brometo de etídeo (EtBr) (0,5 µg/mL).

A cada amostra foi adicionado tampão de amostra de DNA 10 x (concentração final de 1 x) e, posteriormente, todas as amostras foram separadas por electroforese a 200 V em tampão TAE 0,25 x. A visualização das banda de DNA no gel foi possível através da fluorescência do Brometo de etídeo sob radiação ultravioleta (302-365 nm) num transiluminador (Viber Lourmat), tendo as imagens sido registadas com o auxílio de uma câmara digital (Kodak EDAS 290, Kodak) e, posteriormente analisadas e processadas através do software “Kodak 1D, versão 3. 4. 5” (Kodak). Como marcador de pesos moleculares de DNA foi utilizado o “Gene Ruler DNA Ladder mix” (Fermentas).

### 2.3.3. Digestão de DNA plasmídico com enzimas de restrição

O rastreio dos clones de *E. coli* obtidos clonados quer no vector pCR-Blunt, quer em vector binário de expressão pVKH18En6 (Batoko *et al.*, 2000), foi realizada por análise de restrição. A digestão foi realizada de acordo com as instruções do fabricante de cada uma das

enzimas, tendo todas sido realizadas a 37 °C, durante cerca de 1h e 30 minutos. O resultado das reacções de restrição foi analisado por electroforese em gel de agarose. As bandas de restrição para sub-clonagem foram, posteriormente, recuperadas do gel e purificadas.

#### 2.3.4. Extracção de DNA a partir de gel de agarose

Para recuperar bandas de DNA dos produtos de PCR e dos produtos de restrição para sub-clonagem a partir do gel de agarose, utilizou-se o kit “GenElute Gel Extraction” (Sigma-Aldrich), procedendo-se de acordo com as instruções do fornecedor.

#### 2.3.5. Ligação de DNA no vector pCR-Blunt e no vector pVKH18En6

Os produtos de amplificação obtidos por PCR (cardosina A e linker-mCherry) apresentavam extremidades rombas, resultantes da actividade da *Pfu* DNA polimerase, tendo sido, por isso, seleccionado um vector de clonagem que apresentasse extremidades da mesma natureza. As sequências de DNA foram clonadas no vector pCR-Blunt, recorrendo ao kit “Zero Blunt PCR Cloning kit” (Invitrogen), seguindo-se as instruções do fornecedor. As reacções de ligação das sequências no vector foram produzidas de acordo com quantidade de fragmento de inserção calculada através da fórmula abaixo mencionada:

$$\text{ng de fragmento de inserção} = \frac{\text{ng de vector} \times \text{bp do fragmento de inserção}}{\text{bp do vector}} \times 5$$

Tamanho do fragmento de cardosina A: 1580 bp

Tamanho do fragmento de linker-mCherry: 780 bp

Tamanho do vector pCR-Blunt: 3512 bp

Os vectores recombinantes foram introduzidos em bactérias de *E. coli*. Depois de recuperar o DNA plasmídico de alguns dos clones, analisou-se o mesmo por restrição e a partir de um dos clones com o padrão de restrição correcto, preparou-se uma amostra de DNA plasmídico puro, quantificou-se o mesmo e enviou-se para sequenciação.

De modo a proceder-se à ligação da construção cardosina A::linker-mCherry, no vector binário de expressão pVKH18En6, os fragmentos de DNA de cardosina A e de linker-mCherry e o vector foram previamente clivados utilizando enzimas de restrição adequadas, descritas na

Tabela 2.4. Os fragmentos de DNA excisados, depois de quantificados, foram ligados ao vector, numa reacção especificada na Tabela 2.5, durante cerca de 16 horas à temperatura ambiente.

**Tabela 2.4 - Conjunto de enzimas de restrição utilizadas na clonagem e sub-clonagem dos fragmentos de DNA de cardosina A e linker-mCherry.**

Enzimas de restrição	Especificações
<b><i>Xba</i> I e <i>Kpn</i> I</b>	Excisão da cardosina A do vector pCR-Blunt e ligação posterior no vector de expressão pVKH18En6 e à sequência linker-mCherry
<b><i>Kpn</i> I e <i>Sac</i> I</b>	Excisão de linker-mCherry do vector pCR-Blunt e ligação posterior no vector de expressão pVKH18En6 e à sequência cardosina A
<b><i>Xba</i> I e <i>Sac</i> I</b>	Permitir a inserção da construção cardosina A::linker-mCherry no vector de expressão pVKH18En6

Como o objectivo destas construções era transformar células vegetais de tabaco e células BY-2, estas foram multiplicadas em *E. coli* para rastreio dos clones positivos e, posteriormente, utilizadas para transformar *Agrobacterium tumefaciens*. Uma vez que a quantidade e a pureza do DNA isolado a partir de *A. tumefaciens* são muito menores do que as obtidas com o DNA de *E. coli*, o DNA isolado a partir dos clones de *A. tumefaciens* (5 µl) foi utilizado para transformar *E. coli*, de modo a realizar o rastreio nos clones de *E. coli*. Os clones positivos de *A. tumefaciens* foram utilizados para infiltrar folhas de *Nicotiana tabacum*, de modo a analisar a expressão, localização e o processamento proteolítico da proteína recombinante fluorescente gerada pela construção cardosina A::linker-mCherry.

**Tabela 2.5 - Composição da reacção de ligação da construção cardosinaA::linker-mCherry no vector binário pVKH18En6.**

Reagentes	Quantidades
<b>pVKH18En6</b>	1 µl
<b>Fragmento de inserção</b>	2,5 µl
<b>Tampão de ligação (10 x)</b>	1 x
<b>T4 DNA ligase</b>	1 U
<b>Água bidestilada e estéril</b>	13,5 µl

### **2.3.6. Minipreparação de DNA plasmídico de *E. coli***

O DNA plasmídico de bactérias de *E. coli* recombinantes foi recuperado recorrendo a minipreparações de DNA plasmídico, através da lise enzimática das células (Holmes e Quigley, 1981). Dos clones inoculados e crescidos em meio LB selectivo foram concentrados por centrifugação a 14000 rpm, 1,5 mL de cultura, durante 30 segundos, (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf). Descartando o sobrenadante, o sedimento foi ressuscitado em 200 µl de STET [Sacarose 8 % (p/v), Triton X-100 0,1 % (v/v), EDTA 50 mM, e Tris-HCl 50 mM, pH = 8], de modo a enfraquecer as células e, subsequentemente, estas foram lisadas por incubação com 5 µl de lisozima (50 mg/mL), durante 5 minutos, à temperatura ambiente. No final deste período, as amostras foram fervidas durante 45 segundos, de modo a inactivar a lisozima e as DNases e desnaturar o DNA genómico e as proteínas, e foram centrifugadas durante 5 minutos, a 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf). O sedimento com os restos de material celular e o DNA genómico foi removido com um palito esterilizado. O DNA plasmídico foi, de seguida, precipitado por adição de 200 µl de isopropanol. Após centrifugação durante 10 minutos, a 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf), o sedimento (DNA plasmídico) foi limpo de sais com 200 µl de etanol 70 % (v/v) (sem vortexar), e foi seco à temperatura ambiente. O DNA plasmídico foi ressuscitado em 20 µl de água estéril com RNase A (10 mg/mL), sendo posteriormente armazenado a -20 °C.

### **2.3.7. Minipreparação de DNA plasmídico de *A. tumefaciens* por lise alcalina**

Para a isolar o DNA plasmídico de clones de *A. tumefaciens* recombinantes, foi utilizado um protocolo de minipreparações de DNA por lise alcalina. Dos clones inoculados e crescidos em meio LB selectivo centrifugou-se 1,5 mL de cultura a 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf). O sedimento de células obtido foi ressuscitado em 200 µl de solução I [Glucose 50 mM, Tris 25 mM e EDTA 10 mM] e 2 µl de lisozima (50 mg/mL), e foi colocado no gelo, durante 10 minutos. A lise das células foi provocada por adição de 400 µl de solução de lise [NaHO 0,2 M e SDS 1 % (p/v)], cuidadosamente, e por incubação, novamente, em gelo durante 10 minutos. De modo a remover o material celular lisado, adicionou-se 300 µl de solução de neutralização [Acetato de Potássio 3 M e Ácido acético 12 % (v/v); pH = 4,8], invertendo o tubo cuidadosamente e re-incubando a mistura em gelo por 5 a 10 minutos. Centrifugou-se a 14000 rpm, a 6 °C, (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf), durante 20 minutos. Recuperou-se o sobrenadante e adicionou-se 0,7 volumes de isopropanol e,

centrifugou-se a solução a 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf), durante 30 minutos. O sedimento obtido foi lavado com etanol 70 % (v/v) e seco à temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspensionado em 20 µl de água esterilizada com RNase A (10 mg/mL), e guardado -20 °C.

### 2.3.8. Preparação de amostras de DNA para sequenciação

O DNA para sequenciação foi isolado utilizando o kit “GenElute Plasmid Miniprep kit” (Sigma), tendo-se procedido de acordo com as instruções do fornecedor. A partir do DNA puro, foram preparadas e enviadas amostras para sequenciação (MWG Operon, Eurofins). Na sequenciação do DNA inserido no vector pCR-Blunt, seleccionaram-se dois *primers* universais com locais de emparelhamento no vector: o M13 *Forward* (uni -21) [5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'] e o M13 *Reverse* (ver -29) [5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3']. Para a sequenciação do DNA da construção inserida no vector pVKH18En6, foram seleccionados *primers* com emparelhamento na própria construção: o *primer* CardA15Fwd [5'-ACTTCATCTGAAGAATTACAAG-3'] e o *primer* Cherry\_Rev (*Bam* HI e *Sac* I) (Tabela 2.2).

### 2.3.9. Transformação transitória de folhas de *Nicotiana tabacum*

As bactérias recombinantes de *Agrobacterium tumefaciens* a utilizar para infiltração de folhas de tabaco cresceram durante cerca de 16 horas. Da cultura obtida, utilizou-se 1 mL e centrifugou-se, durante 1 minuto, a 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf). Ao sedimento resultante adicionou-se 1 mL de tampão de infiltração 1 x [MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MES 100 mM; pH = 5,6] sem acetosseringona. As células foram ressuspensionadas e, em seguida, centrifugadas sob as mesmas condições, ressuspensionando, novamente, o sedimento em 1 mL de meio de infiltração mas com acetosseringona (0,1 µM) (3,5-dimethoxy-4-hydroxy Acetophenone 97 % (Sigma-aldrich)), repetindo-se a centrifugação.

A partir das culturas obtidas foram realizadas diluições de 1:5 de cada uma das amostras em tampão de infiltração. Mediante a densidade óptica a 600 nm de cada diluição, foram preparadas misturas de infiltração de 1 mL de cada amostra até atingir as seguintes densidades 0,3 e 0,03, recorrendo à seguinte fórmula:

$$\frac{DO_{600} \text{ desejada}}{DO_{600} \text{ da diluição}} \times 1000 = \text{Volume de cultura a utilizar } (\mu\text{l})$$

Para a infiltração de folhas de tabaco, foram seleccionadas em plantas com cerca de 8 semana as folhas mais adequadas para a realização do procedimento, mais especificamente, folhas jovens, pouco espessas, de modo a facilitar a infiltração e ter bons níveis de expressão. As folhas mais velhas apresentam cutícula mais espessa e impermeável e, para além disso, apresentam uma baixa expressão. As diferentes suspensões de *A. tumefaciens* preparadas anteriormente, foram infiltradas na epiderme abaxial com o auxílio de uma seringa esterilizada de 1 mL sem agulha (Fig. 2.3). Após a infiltração, as plantas foram recolocadas nas mesmas condições de crescimento, durante 2 dias.

A infiltração foi realizada não só com as amostras de *A. tumefaciens* recombinante preparadas neste estudo, mas igualmente com *A. tumefaciens* transformado com a construção GFP::HDEL (Batoko *et al.*, 2000). A expressão desta construção em folhas de tabaco foi utilizada como controlo dos níveis de expressão da folha infiltrada, bem como marcador do retículo endoplasmático das células epidérmicas da folha de tabaco.



**Figura 2.3 – Infiltração de folha de *Nicotiana tabacum*.** Esta planta, com cerca de 8 semanas, foi infiltrada com *A. tumefaciens* na zona evidenciada pela seta.

### 2.3.10. Transformação estável de células BY-2 com *A. tumefaciens*

Depois de obtidas culturas em suspensão de células BY-2 estáveis, procedeu-se à transformação destas últimas por co-cultura com *A. tumefaciens* recombinante. As células BY-2

foram transformadas com as construções de cardosina A e B fundidas com linker-mCherry e com a construção de cardosina A fundida com GFP. As células foram também transformadas com outras duas construções, um marcador de ER (GFP::HDEL) e um marcador do Golgi (ST::GFP).

Todas as construções de cardosina A e B apresentam um padrão de expressão comum em tabaco, são detectadas no vacúolo (Soares da Costa, 2009). Como se pretendia estudar o trânsito destas proteínas em células BY-2, foi essencial utilizar a construção disponível de cardosina fundida com outra proteína fluorescente (GFP), de modo a perceber a possibilidade da influência da proteína fluorescente no trânsito das cardosinas em células BY-2.

As restantes construções são usados comumente em células BY-2 como marcadores compartimentares, uma vez disponíveis eram essenciais como meio de comparação com o padrão de expressão das construções de cardosina A e B em células BY-2.

Os clones de *A. tumefaciens* a serem utilizados na transformação, foram crescidos durante cerca de 16 horas e foram utilizados com uma densidade óptica a 600 nm de aproximadamente 1.

Neste estudo, foram utilizados dois diferentes protocolos de transformação por co-cultura das células BY-2 com *A. tumefaciens*.

### **2.3.10.1. Transformação estável de células BY-2 com *A. tumefaciens* (protocolo 1)**

Foram realizadas duas réplicas de co-cultura para cada uma das transformações, uma utilizando 50 µl de cultura bacteriana e outra utilizando 100 µl. A co-cultura foi realizada em placas de Petri de 60 mm, primeiro transferiu-se 1 mL de células BY-2 *wild type* (Wt) com 3 dias para o centro da placa e, de seguida, adicionou-se às células o volume de cultura de *A. tumefaciens*. Evitando espalhar as células no interior da placa, estas foram seladas com parafilme e incubadas a 27 °C, sem agitação, durante 2 dias.

No final do tempo de co-cultura, as células BY-2 transformadas foram transferidas para tubos cónicos de 15 mL, por duas adições sequenciais de 1 mL de meio BY-2 à placa de co-cultura. De modo a eliminar as bactérias de *A. tumefaciens* as células BY-2 foram lavadas três vezes por adição de 10 mL de meio BY-2 a cada tubo cónico e por centrifugação do conteúdo, durante 5 minutos a 800 rpm (Centrifuge 5804 R, Eppendorf) (acc/dcc=0). Terminadas as lavagens, as células foram ressuspendidas, cuidadosamente, em 2 mL de meio BY-2 e

plaqueadas em meio BY-2 sólido selectivo com higromicina (20 µg/mL) - o T-DNA do vector apresenta um gene que confere resistência ao antibiótico, funcionando este como antibiótico de selecção das células transformadas - e cefotaxime (100 µg/mL) - antibiótico utilizado para eliminar as restantes bactérias de *A. tumefaciens*. Depois de seladas com parafilme, as placas foram incubadas a 27 °C, sem agitação, durante cerca de 1 mês.

### **2.3.10.2. Transformação estável de células BY-2 com *A. tumefaciens* (protocolo 2)**

Foram realizadas duas réplicas de co-cultura para cada uma das transformações, uma utilizando 25 µl de cultura bacteriana e outra utilizando 100 µl. A co-cultura foi realizada em placas de Petri de 60 mm. Depois de transferir para o centro da placa 5 mL de células BY-2 *wild type* (Wt) com 3 dias, adicionou-se a estas 1 µl de acetosseringona (20 µM) e o volume de cultura de *A. tumefaciens*, rodando gentilmente a placa entre as adições. As placas foram seladas com parafilme e incubadas a 27 °C.

Após 2 dias de co-cultura, as células BY-2 transformadas foram transferidas para tubos cónicos de 15 mL, lavando a placa com 5 a 7 mL de meio BY-2. Depois de deixar as células depositarem, o sobrenadante foi aspirado e foi adicionado ao tubo 14 a 15 mL de meio BY-2. Inverteu-se, cuidadosamente, o tubo de modo a promover a lavagem das células. O procedimento de deposição e lavagem foi realizado três vezes adicionais, sendo a última lavagem realizada com o mesmo volume de meio BY-2 com cefotaxime. Deixou-se novamente as células depositar e adicionou-se 12 mL de meio BY-2 com cefotaxime. Depois de inverter cuidadosamente o tubo, plaqueou-se 1 mL de suspensão de células para uma placa de meio BY-2 sólido selectivo com higromicina (20 µg/mL) e cefotaxime (100 µg/mL). As placas foram deixadas abertas por 10 minutos na câmara de fluxo laminar (Steril Gard Class II, Laminaire). Por cada transformação foram realizadas duas réplicas. Depois de seladas com parafilme, as placas foram incubadas a 27 °C, sem agitação, durante cerca de 1 mês.

### **2.3.11. Estabelecimento de culturas em suspensão de células BY-2 transformadas**

Após formação de tecido caloso bem individualizado de células BY-2 transformadas, seleccionaram-se alguns *calli* bem distintos, para se iniciar, a partir destes, linhas de células BY-

2 transgênicas em suspensão. Cada *calli* selecionado foi, então, transferido para um matraz de 100 mL com 40 mL de meio BY-2 suplementado com higromomicina (20 µg/mL), e as suspensões de células foram colocadas em condições de crescimento. Aquando da obtenção de uma densidade considerável das culturas estabelecidas, foi iniciada a subcultura das mesmas. Para além disso, foi iniciado o rastreio das células transgênicas, de modo a analisar a expressão das proteínas transgênicas, por microscopia e por *Western Blotting*.

## **2.4. Estudos de expressão e processamento proteolítico**

### **2.4.1. Análise por microscopia de varrimento confocal a laser (CLSM)**

Para analisar a expressão e endereçamento da proteína recombinante fluorescente elaborada – cardosina A::linker-mCherry –, em tabaco, as áreas das folhas de tabaco infiltradas foram analisadas por microscopia confocal. Para isso, foram cortadas pequenas peças de folha (cerca de 1 cm<sup>2</sup>) das regiões infiltradas, após 3 dias da infiltração, e estas foram colocadas numa lâmina com a face inferior voltada para cima.

As linhas celulares transgênicas BY-2 transformadas com as diferentes construções foram também analisadas por microscopia confocal, de modo a rastrear quais as linhas celulares que apresentavam expressão das proteínas recombinantes fluorescentes, e, posteriormente, analisar a localização das mesmas. Para essa análise, foram transferidas algumas células transgênicas com 3 dias de cultura para uma lâmina cobrindo as mesmas com uma lamela. As preparações de células BY-2 foram realizadas, imediatamente antes da observação, para evitar a desidratação e morte celulares.

As lâminas preparadas com as amostras de folhas de tabaco e de células BY-2, foram observadas no microscópio confocal “Laser Scanning Confocal Microscope Leica SP2” (Leica Microsystems, Germany), utilizando-se os comprimentos de onda de excitação de 488 e 561 nm, para observação da fluorescência emitida pelas proteínas GFP e mCherry, respectivamente. As imagens adquiridas foram, posteriormente, analisadas e manipuladas através do software “Leica Confocal Software, versão 2.61 Build 1538- LCS Lite” (Leica Microsystems, Germany).

## **2.4.2. Análise por *Western Blotting***

### **2.4.2.1. Extracção de proteínas de tecido foliar de tabaco e estudo de *time course***

A expressão e o processamento proteolítico da cardosina A foram analisados em tabaco. A partir das folhas de tabaco infiltradas com o clone que apresentava melhor expressão (seleccionado por microscopia confocal) foi recolhida uma amostra de tecido foliar a diferentes tempos após a infiltração: 24 horas, 48 horas, 3 dias, 5 dias e 7 dias, de modo a poder analisar a expressão e o processamento da cardosina A ao longo do tempo (*time course*) por *Western blotting*.

Para a extracção das proteínas do tecido foliar, as amostras foram homogeneizadas com auxílio de uma vareta de vidro e areia de quartzo, e com adição de 2 volumes de tampão de extracção de proteínas (TE) [Citrato de Sódio 50 mM, pH = 5,5, SDS 5 % (p/v), BSA 0,01 % (p/v), Cloreto de Sódio 150 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 % (v/v) e 10  $\mu$ l de "Protease Inhibitor Cocktail" (Sigma) por cada 300 mg de tecido]. Depois de vortexada, a mistura foi fervida durante 10 minutos.

Para recuperar as proteínas totais, a amostra foi centrifugada a 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf) a 6 °C, durante 30 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados, por cada 200 a 300  $\mu$ l de extracto, 10  $\mu$ l de Acetato de sódio (NaAc) [3 M, pH = 5,2], de modo a precipitar as proteínas que são estáveis apenas a pHs básicos, recuperando-se, assim, as proteínas que não precipitam a pH ácido, como, as proteinases aspárticas (APs), nas quais as proteínas a analisar – cardosina A e cardosina B – se incluem. Centrifugou-se o extracto, durante 5 minutos, a 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf) e o sobrenadante foi recuperado para um novo tubo e transferido, de imediato, para gelo.

As proteínas de cada amostra foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Depois de quantificadas as proteínas foram armazenadas a -80 °C.

### **2.4.2.2. Extracção de proteínas do meio de cultura e das células BY-2 em suspensão**

A expressão e processamento proteolítico das diferentes proteínas recombinantes expressas em células BY-2 foram analisados não apenas nas células BY-2 mas também no meio de cultura, de modo a analisar a eventual secreção das proteínas recombinantes.

Para extrair as proteínas de células BY-2, transferiu-se 1 mL de cultura das mesmas na sua fase exponencial (com 3 dias) para um tubo e depois de centrifugar a suspensão a 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf), durante 5 minutos, descartou-se o sobrenadante. A partir do sedimento obtido, as proteínas foram extraídas segundo o protocolo de extracção de proteínas utilizado também em folhas de tabaco (mencionado anteriormente).

A extracção das células do meio de cultura foi iniciada com a centrifugação de 15 mL de cultura de células BY-2 em suspensão, a 2000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf), durante 5 minutos, tendo o sobrenadante (meio) sido recuperado para um novo tubo. As proteínas do meio foram precipitadas por adição de 1 volume de ácido tricloroacético (TCA) 20 % (p/v), a um volume de meio. A mistura foi vortexada, por 15 segundos, e incubada em gelo, durante 15 minutos. As proteínas totais foram recuperadas por centrifugação da mistura a 11000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf), durante 15 minutos, a 6 °C. Depois de descartar o sobrenadante, o sedimento foi limpo adicionando 1 a 2 mL de acetona pré-arrefecida ao mesmo, sem ressuspender, e centrifugou-se o conteúdo a 11000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf), durante 15 minutos, a 6 °C. Descartado o sobrenadante, repetiu-se a lavagem com acetona e deixou-se secar o sedimento. Ressuspendeu-se o sedimento em 50 a 100 µl de TE (mediante o sedimento produzido) e ferveram-se as amostras durante 5 minutos.

As proteínas de cada amostra foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e guardadas a -80 °C.

#### **2.4.2.3. Electroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A separação das proteínas extraídas foi realizada por electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

Depois da montagem do sistema de electroforese OmniPage mini (Clever Scientific, UK), foi preparado o gel separador de poliacrilamida com uma malha de 12,5 % [Acrilamida 12,5 % (p/v), Tris-HCl 0,375 M, pH = 8,8, SDS 0,1 % (p/v), APS 0,1 % (p/v) e TEMED 0,04 % (v/v)]. O gel foi aplicado entre os vidros de electroforese e foi sobreposto, cuidadosamente, com 500 µl de etanol absoluto, sendo este utilizado para promover uma polimerização mais rápida do gel e nivelando ao mesmo tempo a superfície do gel separador. Depois de polimerizado, o etanol foi removido com água bidestilada. Foi aplicado, sobre o gel separador, o gel concentrador com uma malha de 4 % [Acrilamida 4 % (p/v), Tris-HCl 0,062 M, pH = 6,8, vermelho de fenol 0,05 % (v/v), SDS 0,1 % (p/v), APS 0,1 % (p/v) e TEMED 0,25 % (v/v)], tendo-se colocado o pente no gel

logo de seguida. O pente foi removido, após polimerização do gel, e lavaram-se os poços com água bidestilada de modo a eliminar o gel não polimerizado. As amostras de proteínas que se pretendiam separar (15 ou 30 µg de proteína total, dependendo das amostras a analisar), foram previamente complexadas com tampão de amostra para SDS-PAGE [Tris 0,3345 M, Glicerol 50 % (v/v), SDS 5 % (p/v) e Azul de bromofenol 0,2 % (p/v); pH = 6,8], diluído 5 x e a mistura foi aquecida, durante 5 minutos, a 65 °C. Após adição do tampão de corrida SDS-PAGE 1 x [Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M e SDS 0,1 % (p/v), pH = 8,3], aplicaram-se as amostras de proteínas nos poços do gel concentrador. A electroforese realizou-se à voltagem máxima (300 V) alterando-se a amperagem entre 40 mA a 70 mA. A frente de corrida das amostras foi avaliada pela localização do azul de bromofenol do tampão de amostra.

#### **2.4.2.4. Western Blotting**

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose (*blotting*). Logo após a electroforese, o gel foi retirado do aparelho e colocado em tampão de transferência [Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M, Metanol 20 % (v/v)]. A membrana de nitrocelulose (BioTrace™ NT Nitrocellulose Transfer Membrane, Pall Life Sciences) foi equilibrada em tampão de transferência, durante 15 minutos. Os restantes elementos da cassette de transferência foram, igualmente, equilibrados em tampão de transferência, evitando-se, assim, a secagem da membrana. A cassette de transferência foi montada, tendo em atenção a colocação do gel sem a formação de bolhas e, de seguida, foi introduzida no aparelho de transferência OmniPage mini (Clever Scientific, UK).

Para proceder à transferência, adicionou-se tampão de transferência ao tanque e 3 mL de SDS 10 % (p/v), potenciando este a transferência das proteínas do gel para a membrana. A transferência foi realizada a 100 V e a amperagem máxima (400 mA), durante 1 hora, com agitação constante.

Terminado o *blotting* das proteínas, a presença de cardosina A e cardosina B, foi analisada utilizando anticorpos contra locais específicos das cadeias maiores destas proteínas. Para tal, a membrana foi lavada, durante 2 minutos, com TBS-Tween [Tris 0,01 M, NaCl 0,5 M, Tween-20 0,2 % (v/v), pH = 7,6] e foi incubada em solução de bloqueio [Leite em pó 5 % (p/v), BSA 1 % (p/v), Tween-20 0,5 % (v/v), pH = 7,6, em TBS-Tween], durante 30 minutos, com agitação à temperatura ambiente. Para a detecção das proteínas, as membranas, foram,

incubadas com o anticorpo primário (Anticorpo Ba 1:750; Anticorpo A recombinante 1:750) com agitação constante, durante 1 hora, à temperatura ambiente, ou *overnight*, a 4 °C.

Depois de lavada 3 vezes com TBS-Tween (10 + 5 + 5 minutos), a membrana foi incubada com o anticorpo secundário marcado com a enzima fosfatase alcalina (Alkaline Phosphatase anti rabbit IgG (H+L), Vector), numa diluição de 1:1000, em TBS-Tween, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas, novamente, em TBS-Tween, como anteriormente descrito e 2 minutos em água desionizada.

A detecção foi, finalmente efectuada por incubação da membrana, na obscuridade, com substrato NBT-BCIP (Western blue stabilized substrate for Alkaline phosphatase, Promega), adicionando-se algumas gotas sobre toda a superfície da membrana. Após a revelação a membrana foi lavada com água desionizada e incubada com algumas gotas de EDTA 20 mM, na obscuridade, durante 1 a 2 minutos, para parar a revelação. A membrana foi, de seguida, seca entre folhas de papel 3MM.

### **2.4.3. Análise da expressão por RT-PCR**

A expressão das cardosinas em células BY-2 foi analisada por *Reverse transcriptase-Polimerase chain reaction* (RT-PCR), de modo a complementar os estudos de expressão de cardosina A e cardosina B realizados por CLSM e *Western blotting*. Neste caso, pretendia-se analisar a transcrição do DNA das construções com que as células BY-2 foram transformadas.

#### **2.4.3.1. Extração de RNA total**

Foram centrifugados 10 mL de cultura de células BY-2, com 3 dias, a 5000 rpm, durante 5 minutos (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf). Eliminado o sobrenadante foram retiradas as células sedimentadas e estas foram colocadas entre papel de filtro para retirar o excesso de líquido das mesmas. Depois de pesar cerca de 200 mg de células para um tubo, procedeu-se à extracção de RNA total usando o kit “Invisorb Spin Plant-RNA mini Kit” (Invitex, Germany), seguindo o protocolo do fornecedor. A integridade do RNA extraído foi analisados por electroforese a 80 V, em gel de agarose 0,8 % (p/v), em tampão TAE 1 x. O RNA foi, posteriormente, quantificado.

### 2.4.3.2. RT-PCR

Para a realização de RT-PCR utilizaram-se “Ready-to-go RT-PCR beads” (Amersham, Germany) seguindo as instruções do fornecedor. O RNA de cadeia simples foi inicialmente transcrito reversamente em DNA complementar (cDNA) pela enzima transcriptase reversa (RT), e de seguida o DNA foi amplificado por PCR, num único passo. Na reacção de RT foi usado o *primer* poli-dT, fornecido com o kit. Para a reacção de PCR foram utilizados os *primers* indicados na Tabela 2.6, de modo a amplificar zonas específicas do cDNA de cardosina A e de cardosina B, com cerca de 400 bp e 680 bp, respectivamente. Em cada reacção de RT-PCR foi utilizado 1 µg de RNA.

**Tabela 2.6 - *Primers* utilizados na reacção de RT-PCR.** Os *primers* permitem a formação de produtos de PCR de cerca de 400 bp e 680 bp, a partir do cDNA de cardosina A e cardosina B, respectivamente,. A: cardosina A; B: cardosina B; Fwd: *primer forward*; Rev: *primer reverse*; *Primers* assinalados com \*: publicados por Faro *et al.*, 1999.

<i>Primer</i>	Sequência nucleotídica (5' → 3')
<b>*A_Fwd</b>	CTCGGCCTTTCACTTCAAACG
<b>*A_Rev</b>	CGGGGTTGTATCTTAGATCGG
<b>B_Fwd</b>	GATCTCGGCGGGAAAGCG
<b>B_Rev</b>	ATACCATTGCAGTCTACTATCG

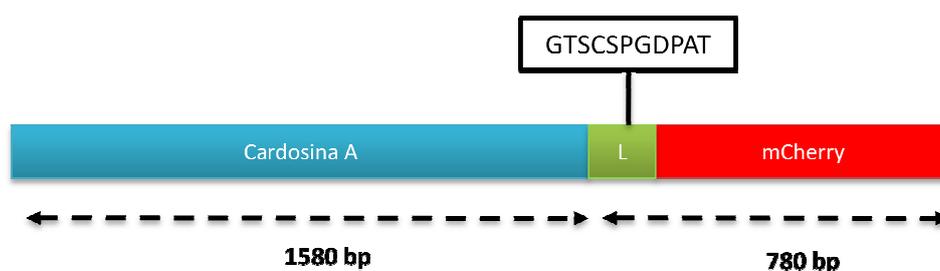
A transcrição reversa foi realizada durante 30 minutos a 42 °C e a amplificação por PCR do cDNA decorreu segundo o programa indicado na Tabela 2.4 (Mastercycler gradiente, Eppendorf), tendo o emparelhamento realizado a 62 °C para a cardosina B. Os produtos de RT-PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose.

### **3. Resultados**

Para permitir a observação *in vivo* das cardosinas em células BY-2, recorreu-se à sua fusão com uma proteína fluorescente. No laboratório tem sido utilizada, recorrentemente a proteína fluorescente mCherry (Shaner *et al*, 2004) apresentando esta grande estabilidade em células de tabaco e *Arabidopsis*. Neste estudo, esta proteína foi utilizada, porque, para além desta vantagem, funciona como termo de comparação com os resultados obtidos da expressão das cardosinas nativas em tabaco, bem como com resultados obtidos com a construção de cardosina A fundida com a proteína fluorescente GFP. A proteína mCherry permite assegurar a sua estabilidade no vacúolo, no caso de as cardosinas serem endereçadas para este compartimento, como foi já observado em epiderme de tabaco (Pereira, 2008; Soares da Costa, 2009).

A cardosina A foi, anteriormente, fundida com a proteína fluorescente mCherry, no entanto, a sua expressão em células de epiderme de folhas de tabaco conduziu à expressão da proteína em compartimentos globulares não identificados (Pereira, 2008). Por este motivo foi essencial, neste trabalho, obter uma construção de cardosina A fundida com mCherry, inserindo um *linker* a separar as duas sequências, de modo a testar a necessidade da sua presença no processamento e trânsito correctos da cardosina A (Fig. 3.1), à semelhança do que se verificou com a cardosina B. A inserção de um *linker* entre a cardosina B e mCherry permitiu a expressão da proteína em células de epiderme de folhas de tabaco, expressão que não ocorreu com a mesma construção sem o *linker* (Soares da Costa, 2009). Foi colocada a hipótese do *linker* ser essencial para a obtenção de uma construção viável, permitindo a aquisição da correcta conformação de ambas as proteínas.

O *linker* utilizado neste trabalho, foi o mesmo utilizado na construção de cardosina B::linker-mCherry e é constituído por uma sequência de nucleótidos, que por tradução produzem um conjunto de 11 aminoácidos (GTSCSPGD PAT) (Fig. 3.1), correspondendo a sua sequência nucleotídica a uma porção do *polilinker* do plasmídeo pGEM11Zf (-).

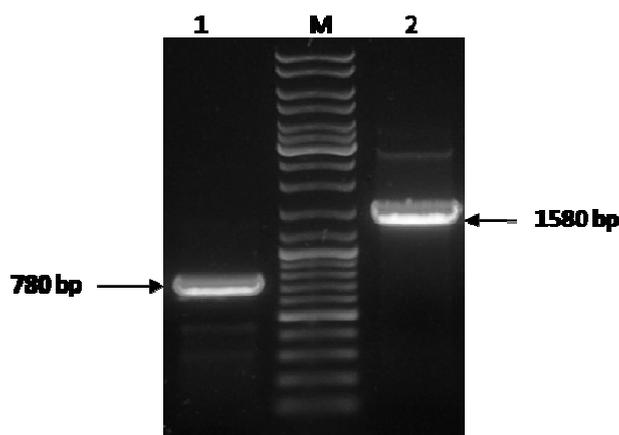


**Figura 3.1 - Representação esquemática da construção cardosina A::linker-mCherry.** A verde está representado o *linker*, cuja tradução produz uma sequência aminoacídica de 11 aminoácidos (indicada na caixa a preto). Por baixo de cada sequência está indicado o seu tamanho molecular.

### 3.1. Elaboração da construção cardosina A::linker-mCherry no vector binário pVKH18En6

Para a elaboração da construção cardosina A::linker-mCherry procedeu-se à amplificação das sequências de cardosina A e de linker-mCherry por PCR, a partir dos dois plasmídeos originais (ver Material e Métodos) onde estes fragmentos de DNA se encontravam clonados. Os *primers* utilizados na reacção permitiram a introdução de adaptadores com locais de restrição para enzimas a utilizar, posteriormente, na sub-clonagem, das sequências amplificadas, no vector de expressão pVKH18En6.

Os produtos amplificados por PCR foram separados electroforeticamente, tendo-se observado duas bandas com tamanho molecular correspondente ao esperado para os fragmentos de cardosina A (com cerca de 1580 bp) e de linker-mCherry (com aproximadamente 780 bp) (Fig. 3.2).

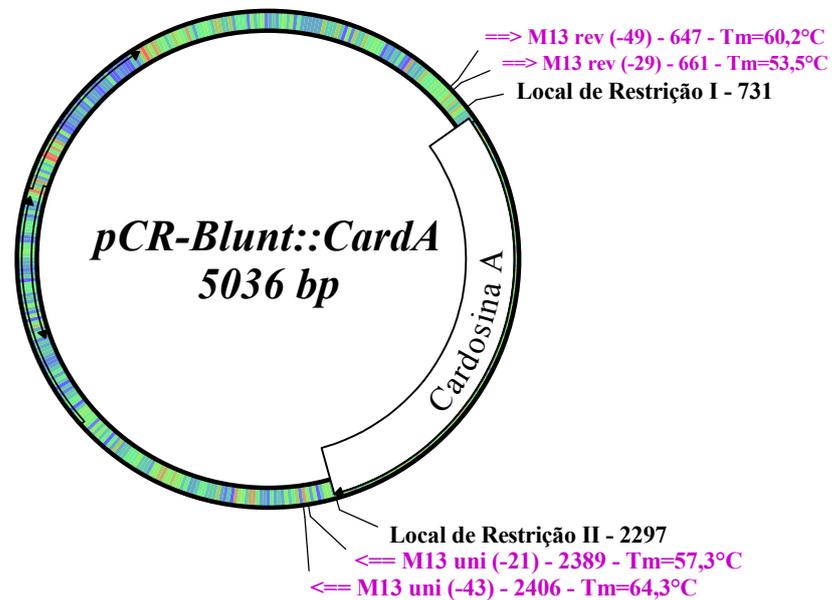


**Figura 3.2 - Análise por electroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) dos produtos amplificados por reacção de PCR.** 1: fragmento de DNA de linker-mCherry (com cerca de 780 bp); 2: Fragmento de DNA de cardosina A (cerca de 1580 bp); M: Marcador de pesos moleculares “GeneRuler DNA Ladder Mix” (Fermentas).

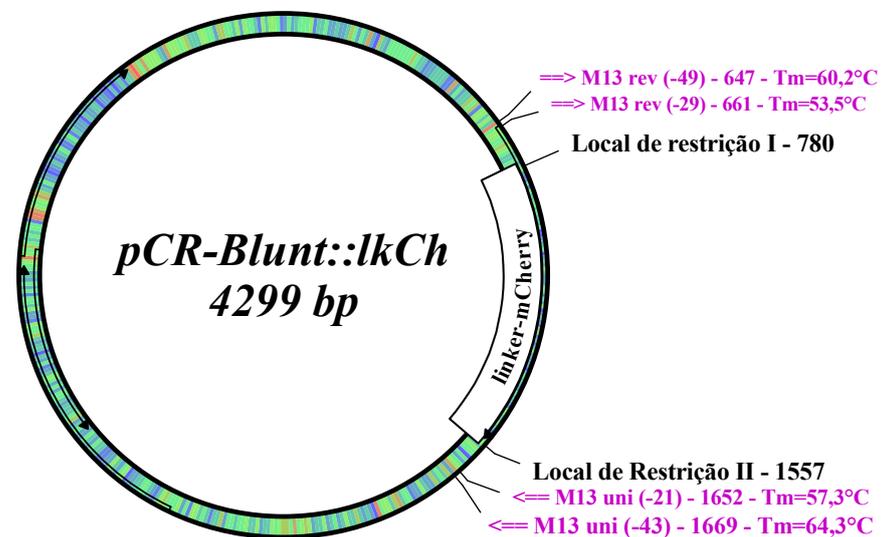
Depois de purificados a partir do gel, os produtos de PCR foram clonados no vector pCR-Blunt (Figs. 3.3 e 3.4) e utilizados para a transformação de *Escherichia coli*.

Os clones positivos foram identificados por análise de restrição do seu DNA plasmídico. Utilizou-se a enzima *Eco* RI, para testar a presença dos fragmentos no vector, uma vez que esta permite a excisão de ambos os fragmentos clonados do vector e, utilizaram-se os conjuntos de enzimas *Xba* I/*Kpn* I e *Sac* I/*Kpn* I, para testar a presença dos adaptadores nos fragmentos clonados de cardosina A e linker-mCherry, respectivamente. Os clones positivos apresentaram em gel de agarose, duas bandas de DNA, uma com de cerca de 3500 bp, correspondente ao

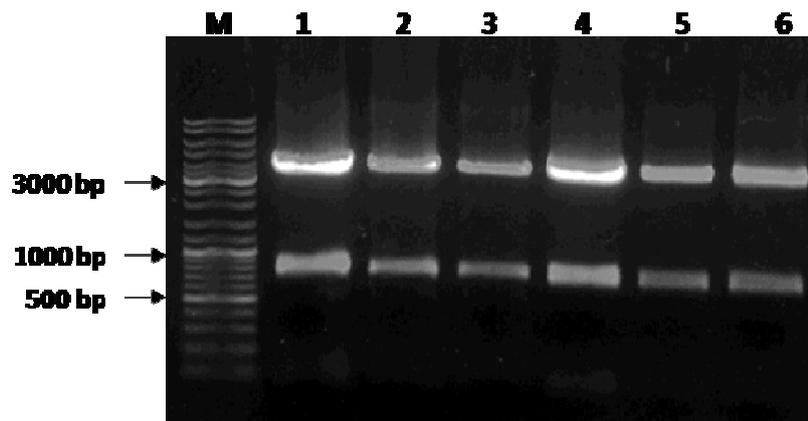
vector, e outra banda com o tamanho do fragmento de inserção - 1580 e 780 bp, para a cardosina A e linker-mCherry, respectivamente (Fig. 3.5).



**Figura 3.3 - Representação da ligação do fragmento de cardosina A no vector de clonagem pCR-Blunt.**

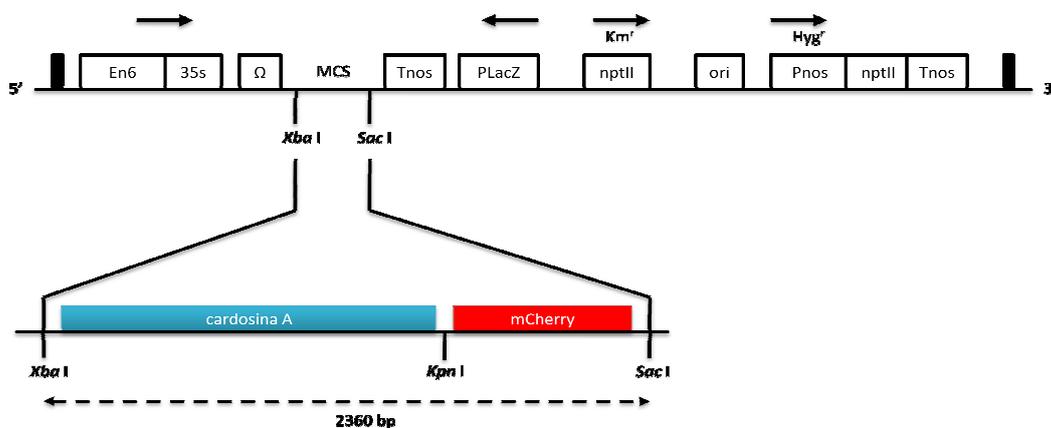


**Figura 3.4 - Representação da ligação do fragmento de linker-mCherry no vector de clonagem pCR-Blunt.**



**Figura 3.5 - Análise por electroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) dos produtos de restrição do DNA plasmídico dos clones de *E. coli* transformados com o fragmento de linker-mCherry inserido no vector pCR-Blunt.** Digestão dos clones 2, 5 e 6 com o fragmento de linker-mCherry, com *Eco* RI, para testar a presença do fragmento (poços 1, 2 e 3), e com *Sac* I e *Kpn* I para testar a presença dos adaptadores destas enzimas no fragmento (poços 4, 5 e 6). M: Marcador de pesos moleculares “GeneRuler DNA Ladder Mix” (Fermentas).

Dos clones positivos, foi seleccionado um para cada um dos fragmentos de inserção e o seu DNA foi sequenciado, para confirmar a sequência e verificar se não haviam sido introduzidos erros nas sequências nucleotídicas. Por análise comparativa das sequências obtidas e esperadas, através do alinhamento das mesmas, verificou-se que ambas as sequências estavam correctas (Anexo 1 e 2). Deste modo, as sequências foram sub-clonadas no vector binário de expressão pVKH18En6, o qual possui locais únicos de restrição no seu T-DNA, para as enzimas *Xba* I e *Sac* I (Fig. 3.6) (Batoko *et al.*, 2000).

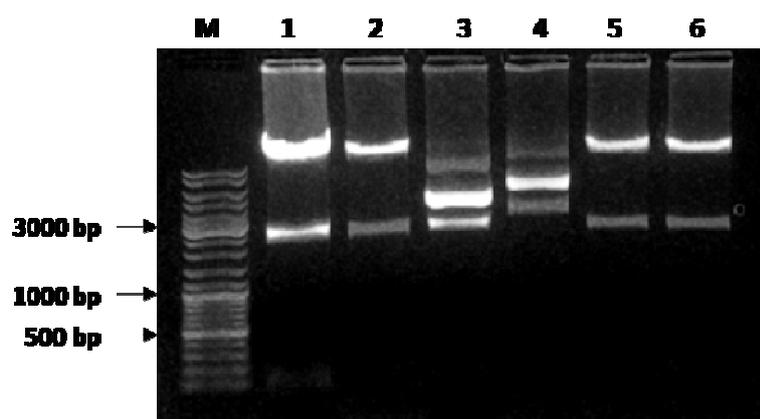


**Figura 3.6 - Representação do T-DNA do vector binário de expressão pVKH18En6 com a construção cardosina A::linker-mCherry inserida no seu local de clonagem múltiplo (MCS).** Na construção estão indicados os locais de restrição enzimática para a sub-clonagem das mesmas neste vector. O vector pVKH18En6 permite a expressão de genes em células vegetais, neste estudo recorreu-se a este vector para a expressão desta e das outras construções utilizadas em células de folhas de tabaco e

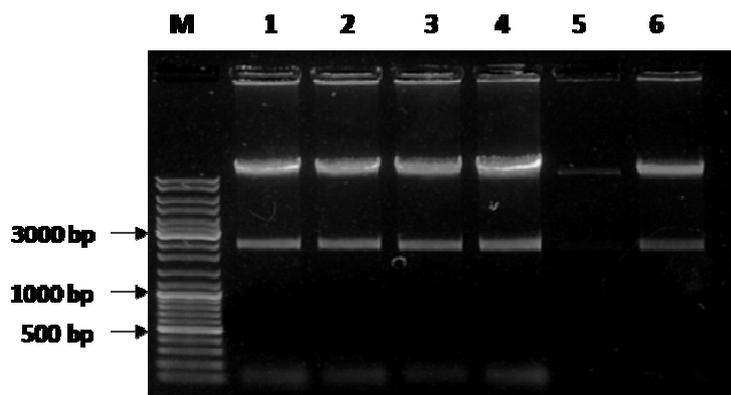
em células BY-2. RB: bordo direito; En6 35S: *enhanced* promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV);  $\Omega$ : sequência 5' líder do vírus do mosaico do tabaco (TMV); Tnos: terminador do gene da nopalina sintetase; PLacZ: promotor do gene LacZ; nptII: gene de resistência à kanamicina; Km: resistência à canamicina; ori: origem de replicação ColE1; Pnos: promotor do gene da nopalina sintetase; hptII: gene de resistência à higromicina; Hyg: resistência à higromicina; LB: bordo esquerdo. (Adaptado de Sparkles *et al.*, 2006).

Os clones de *E. coli* obtidos por transformação com o vector pVKH18En6 recombinante, foram rastreados utilizando as enzimas *Xba* I e *Sac* I, as quais promoviam a excisão da construção. Após a análise electroforética do DNA digerido, foram identificados os clones positivos (clones 1, 2, 5 e 6), os quais apresentavam as duas bandas de DNA previstas, uma correspondente ao vector com cerca de 14000 bp e outra correspondente à construção inserida no vector com aproximadamente 2600 bp (Fig. 3.7). Foi seleccionado, um dos clones positivos para sequenciação, tendo-se verificado que a sequência de linker-mCherry se encontrava na mesma grelha de leitura que a sequência de cardosina A (Anexos 3 e 4). Deste modo, utilizou-se o clone sequenciado para a transformação de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporação.

O DNA isolado a partir dos clones de *A. tumefaciens* foi utilizado para transformar *E. coli*. O rastreio foi realizado, então, nos clones de *E. coli* obtidos. Neste rastreio, foram utilizadas as mesmas enzimas de restrição que no rastreio precedente, *Xba* I e *Sac* I, dado que, o plasmídeo recombinante em análise era o mesmo. Todos os clones analisados apresentavam a construção cardosina A::linker-mCherry inserida no vector binário pVKH18En6 (Fig. 3.8).



**Figura 3.7 - Análise por electroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) dos produtos de restrição do DNA plasmídico dos clones de *E. coli* transformados com a construção cardosina A::linker-mCherry inserida no vector pVKH18En6. 1 a 6: Clones foram digeridos com as enzimas *Xba* I e *Sac* I. M: Marcador de pesos moleculares “GeneRuler DNA Ladder Mix” (Fermentas).**



**Figura 3.8 - Análise por electroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) dos produtos de restrição do DNA plasmídico dos clones de *A. tumefaciens* com a construção cardosina A::linker-mCherry inserida no vector pVKH18En6. 1 a 6: Clones foram digeridos com as enzimas *Xba*I e *Sac*I. M: Marcador de pesos moleculares “GeneRuler DNA Ladder Mix” (Fermentas).**

### **3.2. Expressão de cardosina A fundida com mCherry em epiderme foliar de *Nicotiana tabacum***

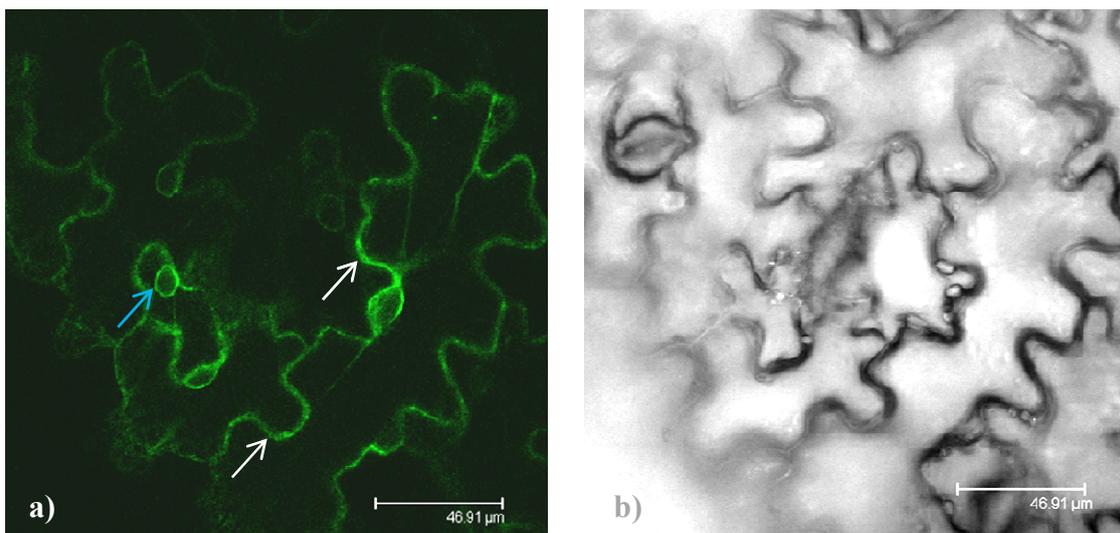
O tabaco constitui um modelo biológico de grande importância, nomeadamente para o rastreio da expressão de construções fluorescentes. As células da epiderme foliar da planta são facilmente transformáveis de modo transitório e permitem a observação directa das proteínas fluorescentes. Para além disso, este sistema possibilita o estudo do processamento de proteínas ao longo do tempo. Deste modo, este sistema permite comparar o processamento e localização da proteína nativa com a mesma proteína em fusão. Uma vez que foram já realizados estudos de endereçamento e processamento da cardosina A nativa em tabaco (Pereira, 2008), a expressão da construção de cardosina A fundida com mCherry no mesmo sistema foi essencial para testar a viabilidade da mesma para estudos em tabaco, e neste caso específico para a sua posterior utilização na transformação de células BY-2. Para isso, foram transformadas células da epiderme foliar de tabaco transitoriamente, recorrendo a *A. tumefaciens* com a construção cardosina A::linker-mCherry.

#### **3.2.1. Localização de cardosina A fundida com mCherry por microscopia confocal de varrimento a laser (CLSM)**

A expressão da construção cardosina A::linker-mCherry foi avaliada por observação das células da epiderme foliar de tabaco, 3 dias após a infiltração, por microscopia confocal. Como

controlo de expressão utilizou-se a construção GFP::HDEL. Esta construção trata-se de uma GFP fundida com o motivo HDEL de retenção no ER (Batoko *et al.*, 2000).

A expressão de GFP::HDEL nas células de tabaco originou um padrão de fluorescência típico de retículo endoplasmático, com marcação na periferia das células e no retículo perinuclear (Fig. 3.9). O marcador sofreu um correcto endereçamento para o retículo endoplasmático, apresentando bons níveis de expressão e semelhantes entre todas as células, o que indica que a folha infiltrada apresenta bons níveis de expressão.



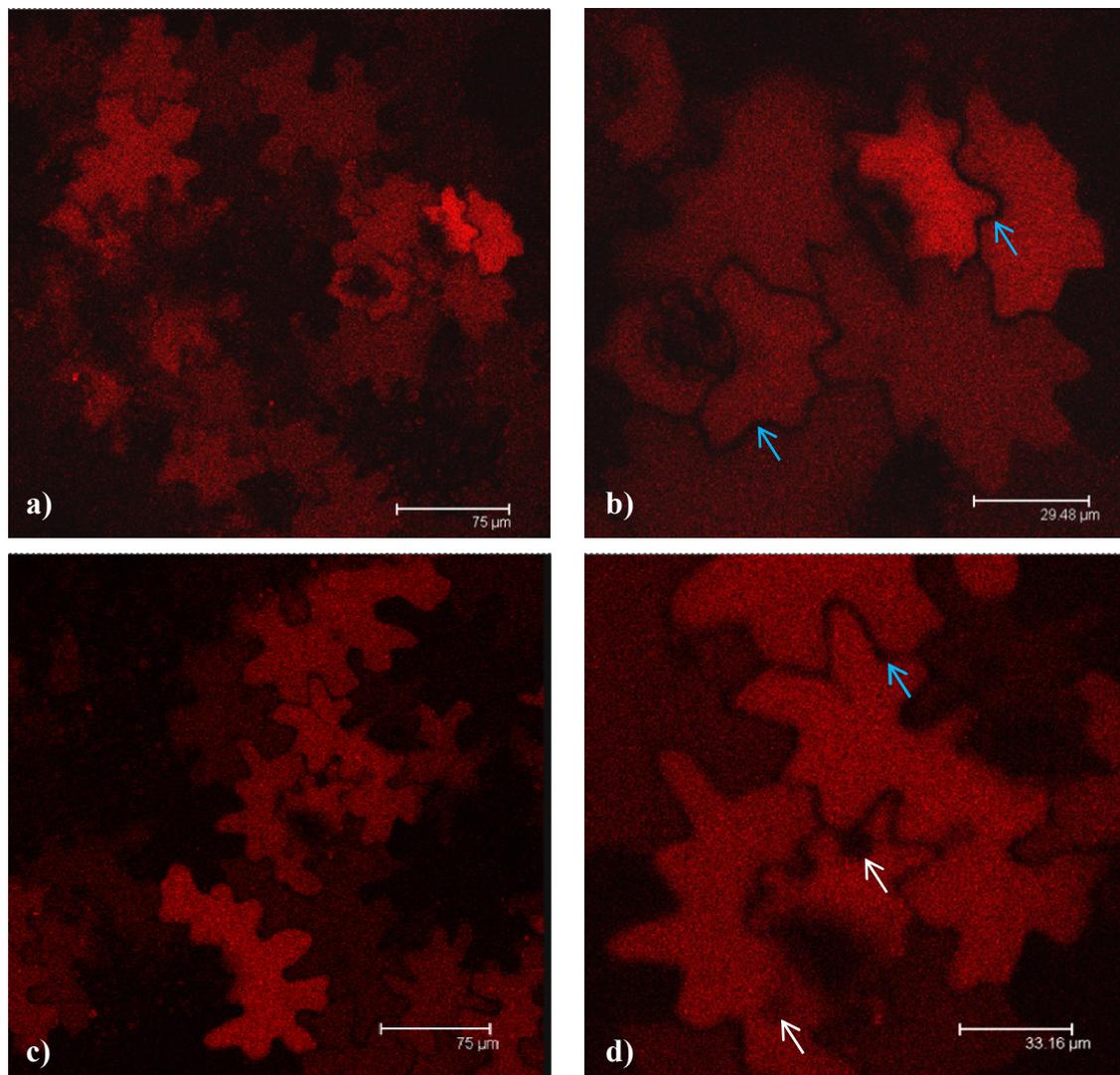
**Figura 3.9 - Imagens de microscopia confocal de células da epiderme de folhas de *Nicotiana tabacum* transformadas com o marcador do retículo endoplasmático GFP::HDEL.**

As células foram observadas após 3 dias da infiltração com uma  $DO_{600}$  de 0,03 de culturas de *Agrobacterium tumefaciens*. Consegue observar-se um padrão de marcação típico de retículo endoplasmático: junto à membrana plasmática (setas brancas) e no retículo endoplasmático perinuclear (seta azul). a) imagem de fluorescência de GFP, por excitação com o laser 488 nm; b) imagem de contraste de interferência diferencial (DIC) das mesmas células observadas em a).

Nas folhas de tabaco infiltradas com a construção cardosina A::linker-mCherry, foi detectada fluorescência de mCherry. Os diferentes clones e densidades ópticas testadas de *A. tumefaciens* resultaram em diferentes intensidades de fluorescência/expressão da construção. As células das folhas infiltradas com o clone 4 e com o clone 6 apresentaram ótimos níveis de expressão da construção, tendo, nestes dois casos, a proteína fluorescente sido identificada apenas no vacúolo (Fig. 3.10).

As células de tabaco apresentam um vacúolo que ocupa praticamente todo o espaço intracelular, confinando todos os restantes organelos e o citoplasma à periferia da célula, logo, a marcação destas células é típica de vacúolo, não apresentando expressão da proteína no

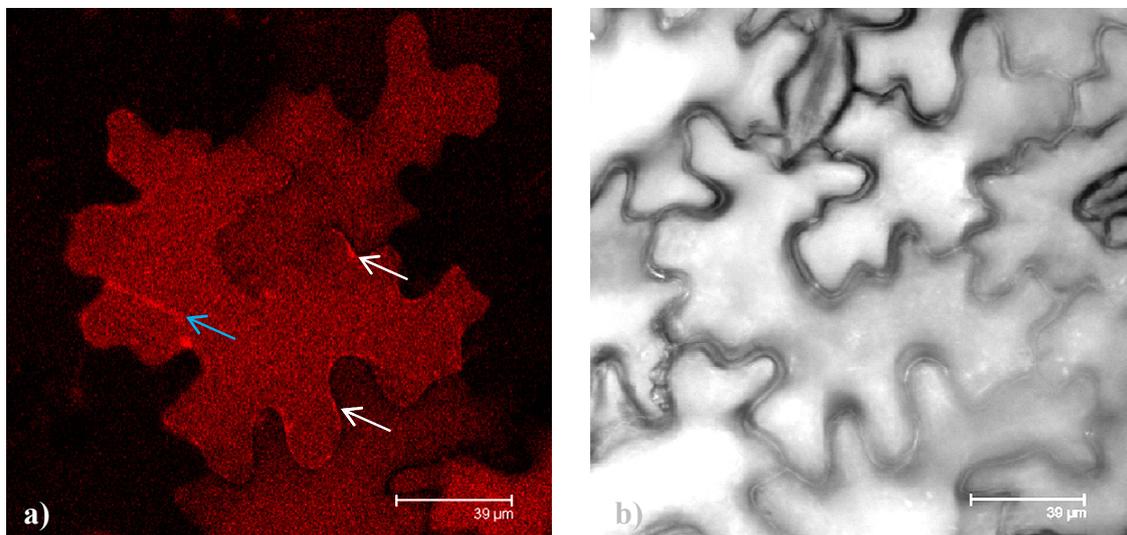
citoplasma, membrana plasmática e parede celular (Fig. 3.10 – setas azuis), nem no núcleo (Fig. 3.10 – setas brancas).



**Figura 3.10 - Imagens de microscopia confocal de células da epiderme de folhas de *Nicotiana tabacum* transformadas com a construção cardosina A::linker-mCherry inserida no vector binário pVKH18En6.** As imagens foram adquiridas após 3 dias da infiltração da cultura dos clones 4 e 6 de *Agrobacterium tumefaciens*. Todas as células apresentavam expressão da construção no vacúolo, conseguindo-se observar nitidamente zonas que não apresentavam qualquer emissão de fluorescência correspondentes ao citoplasma, membrana plasmática e parede celular (setas azuis), e ao núcleo (setas brancas), o vacúolo ocupa a maior percentagem do conteúdo vacuolar empurrando os restantes organelos para a periferia da célula. b) e d) *insets* das imagens à esquerda; a) a d) imagens de fluorescência observada por excitação de mCherry com o laser 561 nm. n: núcleo; v: vacúolo.

No entanto, com o clone 5, que apresentava menores níveis de expressão, a construção foi localizada, não só no vacúolo mas também no retículo endoplasmático, uma vez que as

células exibiam marcação mais intensa junto da membrana (Fig. 3.11 – setas brancas), e nas trabéculas de retículo (Fig. 3.11 – seta azul).



**Figura 3.11 - Imagens de microscopia confocal de células da epiderme de folhas de *Nicotiana tabacum* transformadas com a construção cardosina A::linker-mCherry inserida no vector binário pVKH18En6.** As imagens foram adquiridas após 3 dias da infiltração da cultura do clone 5 de *Agrobacterium tumefaciens*. Todas as células apresentavam expressão da construção no vacúolo, no entanto, pôde-se observar, simultaneamente, a acumulação da construção no retículo endoplasmático. As setas indicam o padrão típico de retículo, com a fluorescência acumulada na periferia da célula (setas brancas) e em trabéculas de retículo (seta azul). a) imagem de fluorescência de mCherry, por excitação com o laser 561 nm; b) imagem de contraste de interferência diferencial (DIC) das mesmas células observadas em a).

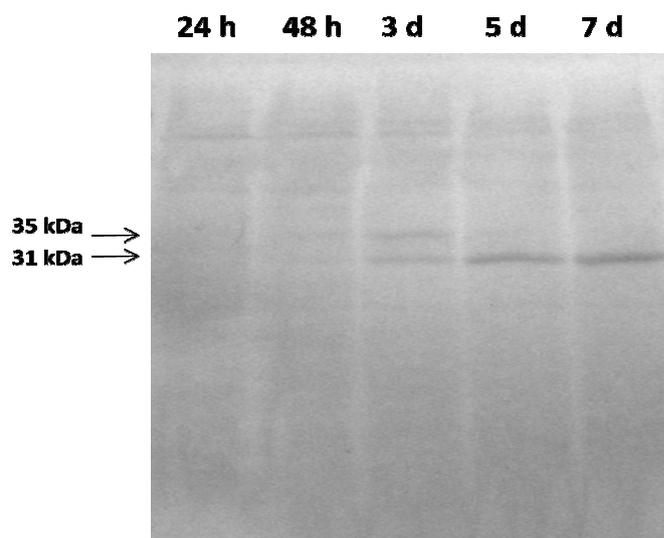
Após a análise da expressão de todos os clones, foi possível verificar que todos conduziam à acumulação de cardosina A no vacúolo das células de tabaco. Estes resultados demonstram que a cardosina A fundida com mCherry sofre o mesmo endereçamento que a proteína nativa em células da epiderme foliar de tabaco (Duarte, 2008; Pereira, 2008). A proteína fluorescente mCherry não influenciou o endereçamento da cardosina A para o vacúolo.

Este ensaio permitiu ainda seleccionar os clones mais adequados, com maiores níveis de expressão e sem sofrer atrasos no trânsito da proteína recombinante (clones 4 e 6), de modo a usá-los na transformação de células BY-2.

### 3.2.2. Processamento proteolítico da cardosina A fundida com mCherry

Para analisar o processamento sofrido pela cardosina A desde a sua síntese até a sua acumulação no vacúolo de tabaco, foi realizado um estudo de *time course*, 24 e 48 horas, 3, 5 e

7 dias após a infiltração das folhas de tabaco, com o clone 4 de *A. tumefaciens* utilizando uma  $DO_{600}$  de 0,3. Analisaram-se os extractos proteicos das diferentes amostras por *Western blotting* e verificou-se que o processamento da cardosina A ocorria de modo semelhante ao da proteína nativa no mesmo sistema (Fig. 3.12). Inicialmente, foi detectada a forma intermédia de 35 kDa da cardosina A, e à medida que esta deixou de ser detectada, observou-se a acumulação da sua forma madura (31 kDa) (Fig. 3.12). O processamento proteolítico da proteína em tabaco não apresenta qualquer alteração em relação ao processamento da proteína nativa no mesmo sistema de expressão, pelo que a fusão de cardosina com mCherry, não conduziu à alteração do processamento da cardosina. Este resultado em conjunto com o resultado obtido por microscopia confocal vem confirmar a viabilidade desta construção para futuros estudos da cardosina A *in vivo* neste sistema de expressão ou outros, nomeadamente em células BY-2. Este resultado confirma ainda que a presença deste *linker* é essencial para o endereçamento e processamento correcto desta proteína de fusão (cardosina A) em folhas de tabaco.



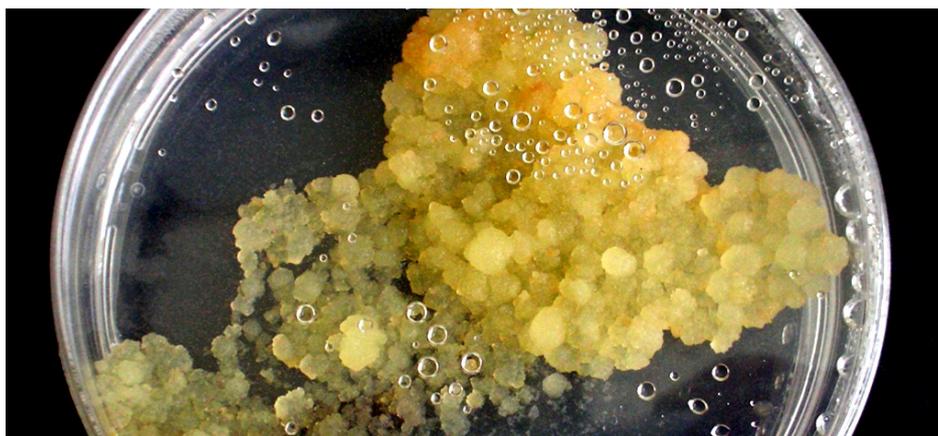
**Figura 3.12 - Análise do processamento proteolítico da cardosina A ao longo do tempo, por *Western blotting* em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) infiltradas com *Agrobacterium tumefaciens* com a construção cardosina A::linker-mCherry inserida no vector binário pVKH18En6.** O estudo foi realizado com amostras de folhas após 24 horas, 48 horas, 3 dias, 5 dias e 7 dias da infiltração das mesmas. A forma intermédia do processamento da cardosina A, de 35 kDa, surge após 48 horas da infiltração enquanto a forma madura da cardosina A (31 kDa) inicia a sua acumulação após 5 dias. À medida que a forma intermédia desaparece a forma madura vai-se acumulando nas células infiltradas. d: dias; h: horas.

### 3.3. Expressão estável das proteínas cardosina A e B fundidas com mCherry em células BY-2 em suspensão

As construções de cardosina A e B com mCherry e cardosina A com GFP (já obtida e testada no laboratório) foram utilizadas para transformar células BY-2, por co-cultura destas com os clones de *A. tumefaciens*. Em paralelo, procedeu-se à transformação das células BY-2 com um marcador de ER (GFP::HDEL) e um marcador de Golgi (ST::GFP).

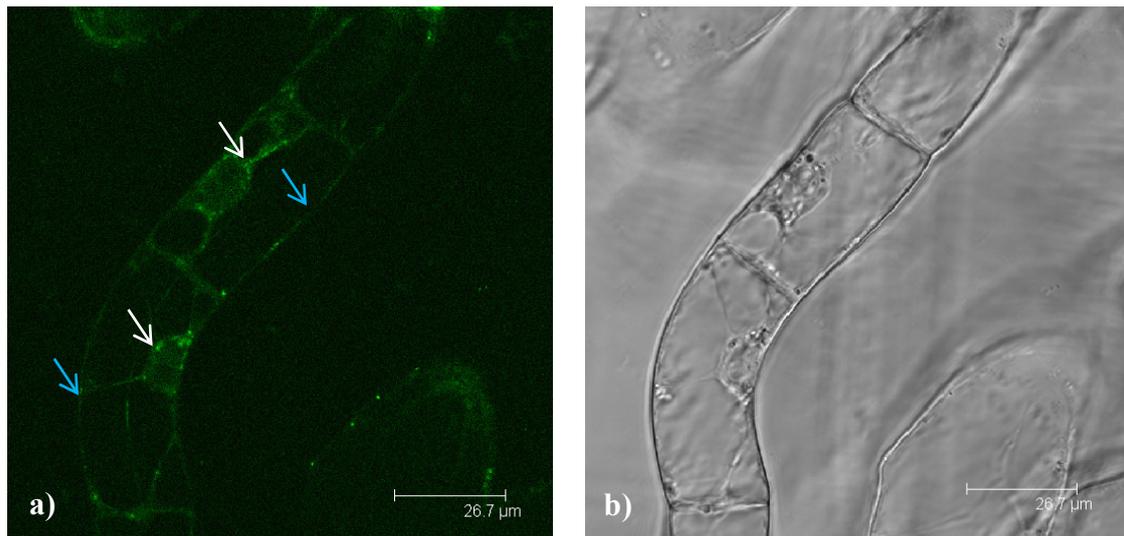
Após várias tentativas e otimizações da transformação das células BY-2 com o protocolo 1 (ver Material e Métodos), frequentemente utilizado em diferentes trabalhos experimentais, optou-se por transformar as células recorrendo a um segundo protocolo com suplementação da co-cultura com acetossiringona (protocolo 2 – ver Material e Métodos). Nesta última transformação, foram apenas utilizadas as construções de cardosina A e B, uma vez que existiam alternativas para obtenção de linhas celulares de BY-2 a expressar marcadores compartimentares.

Cerca de um mês após a transformação foi obtido com sucesso tecido caloso das células transformadas com as construções de cardosina A e B (resistentes a Higromicina). O tecido caloso bem individualizado, foi transferido para meio BY-2 líquido, até atingir uma densidade considerável, e só depois iniciada a repicagem da cultura de células em suspensão (Fig. 3.13).



**Figura 3.13 - Tecido caloso de células BY-2 transformadas com a construção cardosina A::GFP.** As células BY-2 transformadas cresceram em meio BY-2 selectivo (com higromomicina 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e obteve-se tecido caloso bem individualizado após cerca de mês após a transformação.

A expressão das células BY-2 transformadas foi, inicialmente, analisada por microscopia confocal após 3 dias de subcultura. Nas células transformadas com as fusões de cardosina A e B com a proteína mCherry não foi observada qualquer fluorescência (resultados não apresentados). Por outro lado, as células transformadas com cardosina A::GFP apresentavam um padrão de expressão típico de retículo endoplasmático (Fig. 3.14) e foi igualmente identificada fluorescência em estruturas pontuadas (Fig. 3.15 - a).



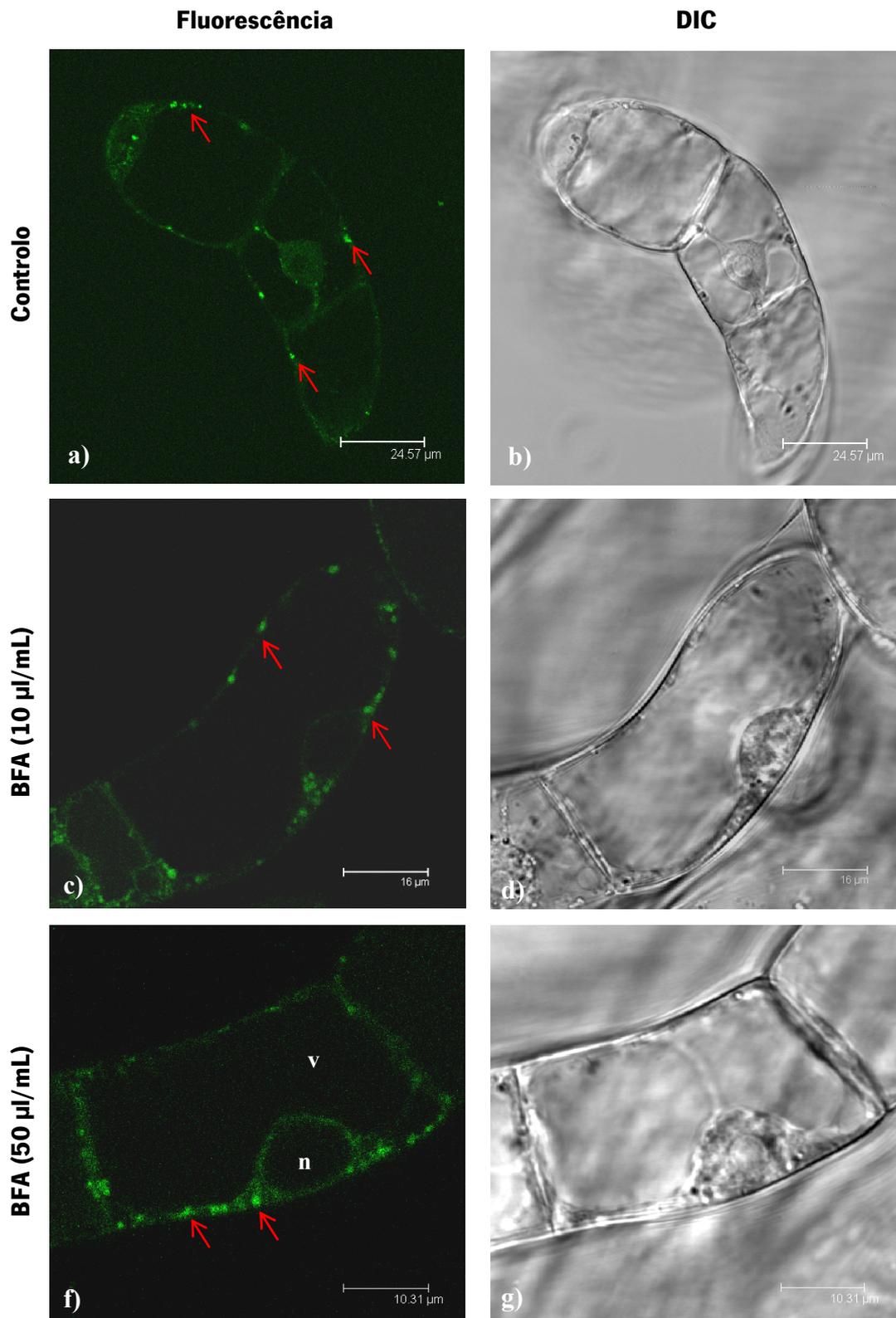
**Figura 3.14 - Imagens de microscopia confocal de células BY-2 transformadas com a construção cardosina A::GFP.** As células foram observadas após 3 dias de sub-cultura das células transformadas. Consegue observar-se um padrão de marcação típico de retículo endoplasmático: junto à membrana plasmática (setas azuis) e no retículo endoplasmático perinuclear (setas brancas). a) imagem de fluorescência de GFP, por excitação com o laser 488 nm; b) imagem de contraste de interferência diferencial (DIC) das mesmas células observadas em a).

De modo a perceber a natureza das estruturas pontuadas observadas no interior destas células, foram realizados ensaios com brefeldina A (BFA), tratando as células com duas concentrações diferentes desta droga, durante 2 horas. A localização da fluorescência de GFP no interior das células tratadas foi diferente da observada nas células não tratadas (controlo negativo) (Fig. 3.15). As células tratadas com ambas as concentrações de BFA apresentaram estruturas globulares de maiores dimensões, tendo aumentado ligeiramente de tamanho aquando do tratamento com a maior concentração de BFA (Fig. 3.15).

Para confirmar e complementar os resultados obtidos por microscopia confocal, a expressão e processamento proteolítico de cardosina A e cardosina B foram analisados por *Western blotting*.

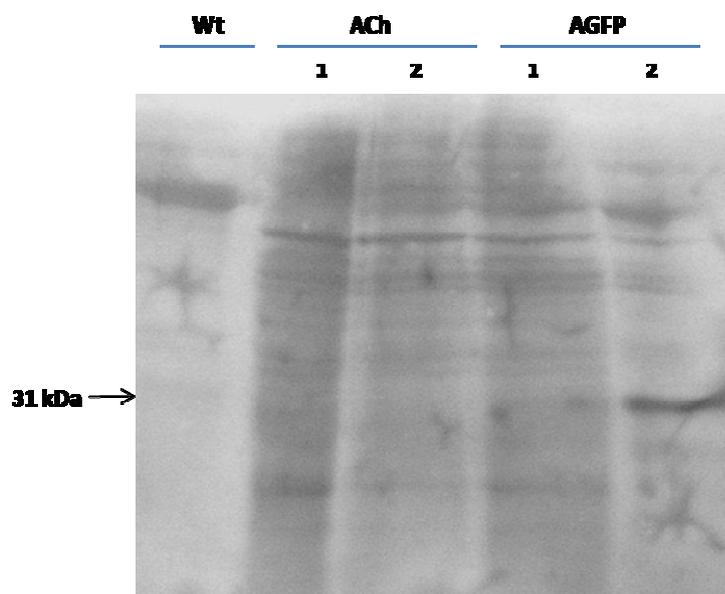
Nos extractos proteicos de uma linha celular transformada com cardosina A::GFP foi detectada a banda de 31 kDa, correspondente à forma madura/processada da proteína, não tendo sido detectada nenhuma banda nos extractos proteicos de células BY-2 transformadas com a construção de cardosina A::linker-mCherry (Fig. 3.16). As células transformadas com a cardosina B fundida com mCherry, não apresentavam qualquer banda correspondente a esta cardosina, por análise de *Western blotting* (dados não publicados). Estes dados estão em concordância com os resultados obtidos por microscopia confocal.

Nas amostras de proteínas de meio de cultura de todas as células transformadas com as construções anteriormente descritas, incluindo a construção de cardosina A fundida com a GFP, não foi observada nenhuma banda diferente das bandas obtidas nos extractos da estirpe de células não transformadas (controlo negativo) (resultados não apresentados), o que indica que nenhuma das proteínas é secretada para o meio extracelular.



**Figura 3.15 - Imagens de microscopia confocal de células BY-2 transformadas com a construção cardosina A::GFP tratadas com brefeldina A (BFA).** As imagens foram adquiridas após 3 dias de sub-cultura das células transformadas. As células transformadas foram incubadas com as concentrações indicadas de BFA, durante 2 horas. Todas as células apresentaram estruturas pontuadas,

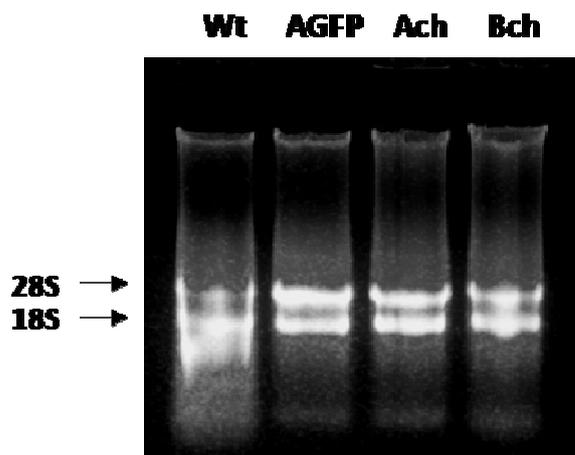
sendo estas de maiores dimensões nas células tratadas com BFA (setas vermelhas). a), c) e f) imagens de fluorescência observada por excitação de GFP com o laser 488 nm. b), d) e g) imagens de contraste de interferência diferencial (DIC) das mesmas células observadas à esquerda. n: núcleo; v: vacúolo.



**Figura 3.16 - Análise do processamento proteolítico da cardosina A por *Western blotting* em células BY-2 transformadas com cardosina A::GFP e cardosina A::linker-mCherry no vector binário pVKH18En6.** O estudo foi realizado após 3 dias de sub-cultura das células transformadas. Foi detectada a forma madura da cardosina A (31 kDa) na linha celular de BY-2 transformada com cardosina A::GFP, AGFP2. Wt: *Wild type*; ACh: cardosina A::linker-mCherry; 1 e 2: identificação das linhas celulares transformadas com cada uma das construções.

Uma vez que através das análises de expressão realizadas anteriormente, foi possível verificar a expressão da cardosina A com GFP, mas não das restantes linhas celulares, era necessário perceber a que se deviam estas diferenças de expressão. Deste modo, procedeu-se à análise de transcritos de cada uma das cardosinas por RT-PCR. Como controlo positivo usou-se o RNA das células transformadas com cardosina A::GFP (linha celular AGFP2) e como controlo negativo utilizou-se o RNA das células da estirpe selvagem.

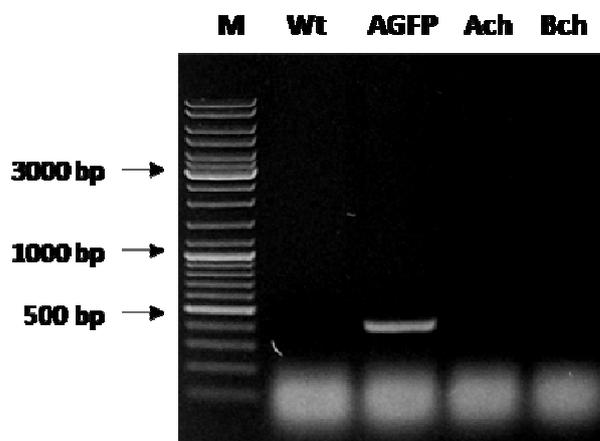
O RNA total foi extraído com sucesso de todas as amostras celulares, tendo-se observado duas bandas correspondentes ao 28S e 18S RNA ribossómico (Fig. 3.17).



**Figura 3.17 - Análise por electroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) de RNA extraído de células BY-2.** A extracção de RNA realizou-se após 3 dias de sub-cultura das células BY-2 transformadas com cardosina A::GFP (AGFP), com cardosina A::linker-mCherry (Ach) e com cardosina B::linker-mCherry (Bch). Foram identificadas no gel as bandas de rRNA 28S e 18S em todas as amostras analisadas. Wt: *Wild type*.

Após a reacção de RT-PCR, para cada amostra de RNA obtida foi identificada a presença de mRNA de cardosina A nas células BY-2 transformadas com a proteína fundida com GFP, tal como esperado, tendo sido amplificada uma banda de cerca de 400 bp com os *primers* específicos para a cardosina A (ver Material e métodos) (Fig. 3.18). Este resultado veio confirmar os resultados obtidos por microscopia confocal e por *Western blotting*.

Da transformação das células BY-2 com três diferentes construções, foi possível obter uma linha celular a expressar efectivamente cardosina A. As transformações das células BY-2 com cardosina A e cardosina B fundidas com mCherry, não resultaram em expressão das mesmas, o que foi confirmado por *Western blotting* e RT-PCR. No entanto, as células encontram-se transformadas, dado que estas conseguem crescer e manter-se em meio selectivo.



**Figura 3.18 - Análise por electroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) dos produtos de RT-PCR para detecção de transcritos de cardosina A e B em células BY-2.** A reacção de RT-PCR foi realizada a partir de 1 µg de RNA total de cada amostra. Foi identificada uma banda de DNA com cerca

de 400 bp. A banda foi amplificada a partir extracção de RNA realizou-se após 3 dias de sub-cultura das células BY-2 transformadas com cardosina A::GFP (AGFP), com cardosina A::linker-mCherry (Ach) e com cardosina B::linker-mCherry (Bch). Foram identificadas no gel as bandas de rRNA 28S e 18S em todas as amostras analisadas. Wt: *Wild type*.

## **4. Discussão**

As cardosinas A e B são duas proteínases aspárticas (APs) originalmente isoladas a partir de flores de *Cynara cardunculus*, vindo mais tarde a ser identificadas também nas sementes desta mesma planta (Ramalho-Santos *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2008; Oliveira, 2009).

Apesar da sua grande identidade a nível nucleotídico e aminoacídico, estas duas proteínas apresentam uma localização diferencial em flores de cardo: enquanto a cardosina A é endereçada para o vacúolo, a cardosina B é secretada (Ramalho-Santos *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 2001). Por este motivo, o estudo destas proteínas pode ajudar a responder a várias questões sobre o endereçamento das APs em plantas e o trânsito destas proteínas tem vindo a ser estudado essencialmente em *Arabidopsis thaliana* e em *Nicotiana tabacum*.

Em células da epiderme de tabaco ambas as cardosinas são endereçadas para o vacúolo, sendo este sistema heterólogo de grande interesse para o estudo do direccionamento das cardosinas para este organelo. Será que ambas as proteínas seguem as mesmas vias para alcançarem o mesmo compartimento? Que compartimentos medeiam o seu trânsito para o vacúolo? Onde são processadas e activadas estas proteínas ao longo do seu percurso? Para responder mais rápida e facilmente a estas questões, seleccionaram-se as células em suspensão Bright Yellow – 2, pelas diversas vantagens apresentadas e por se esperar que as cardosinas seguissem um trajecto idêntico nestas células, pelo facto de se tratarem também de células de tabaco. Este modelo permitiria também, deste modo, comparar o trânsito das cardosinas no sistema planta e em células em suspensão.

Neste trabalho foi elaborada uma construção de cardosina A fundida com a proteína fluorescente mCherry, com um *linker* a separar as duas proteínas (cardosina A::linker-mCherry). Esta construção foi clonada no vector pVKH18En6 (Batoko *et al.*, 2000) e a sua expressão e processamento foram testados em *Nicotiana tabacum* por microscopia confocal e *Western blotting*.

Depois de se obterem culturas de células BY-2 estáveis, estas foram transformadas com as construções cardosina A::linker-mCherry, cardosina B::linker-mCherry e cardosina A::GFP, de modo a permitir a observação destas proteínas *in vivo* por microscopia confocal para estudar a sua expressão e localização nestas células. A expressão e o processamento das construções foram também analisados por *Western blotting*. A confirmação da expressão foi avaliada por RT-PCR, para identificar a presença de transcritos das cardosinas A e B nas células BY-2 transformadas.

#### **4.1. Expressão da construção cardosina A::linker-mCherry em *Nicotiana tabacum***

A fusão de cardosina A com mCherry na ausência de qualquer *linker* entre as duas proteínas conduz à expressão da proteína em compartimentos globulares não identificadas ao contrário do que acontece com a proteína nativa no mesmo sistema, que é vacuolar (Duarte *et al.*, 2008; Pereira, 2008). A fusão de cardosina B com mCherry fora, anteriormente, elaborada com a introdução de um *linker* entre as duas sequências (Soares da Costa, 2009), o qual permitiu a expressão da construção em vacúolos de tabaco. Era, portanto, essencial elaborar uma a construção de cardosina A com a mesma proteína fluorescente, inserindo o mesmo *linker* entre ambas as sequências. Esta fusão permitiu testar a necessidade da presença do *linker* para o processamento e trânsito correctos da cardosina A em folhas de tabaco.

Após a expressão da construção de cardosina A em células da epiderme foliar de tabaco, verificou-se que a proteína sofre o correcto endereçamento para o vacúolo, através da observação das células por microscopia confocal. Para além disso, a análise, por *Western blotting*, das folhas infiltradas com a construção permitiu demonstrar que a proteína sofre um processamento proteolítico normal, ou seja, idêntico ao processamento da proteína nativa no mesmo sistema de expressão (sem a fusão) (Duarte *et al.*, 2008; Pereira, 2008). Tal como a cardosina A nativa, a cardosina A recombinante apresenta um processamento gradual, com o surgimento inicial da forma intermédia de 35 kDa da proteína (cadeia maior com o prosegmento) e o desaparecimento desta forma em simultâneo com o aparecimento da cadeia de 31 kDa correspondente à forma madura/processada da proteína.

O facto de a cardosina A recombinante na presença do *linker* ter apresentado diferente trajecto em relação à molécula recombinante na ausência do *linker*, confirma a hipótese levantada anteriormente, de que é necessária uma separação entre as duas proteínas para que a cardosina A adquira a sua correcta conformação e consequentemente, seja processada correctamente e direccionada para o vacúolo. O *linker* em questão, parece ter promovido um espaçamento suficiente para o enrolamento de cada proteína de modo independente e apropriado, tal como sucedeu com a cardosina B em fusão com a mesma proteína fluorescente (mCherry) (Soares da Costa, 2009). Apesar de não existir nenhum critério fiável a que se possa recorrer para o desenho de *linkers*, em experiências futuras, seria importante desenhar um *linker* com nucleótidos específicos, de modo a dar origem a uma sequência de aminoácidos com

uma determinada conformação, flexibilidade e comprimento, tendo em conta o seu possível comportamento na fusão.

Uma vez que a cardosina A fundida com mCherry sofre um processamento e endereçamento correctos em células de tabaco, a construção poderá no futuro ser utilizada para estudos de expressão e localização da cardosina A *in vivo* em células da epiderme foliar de tabaco, uma vez que vai ser representativa do comportamento da proteína nativa. A construção pode ainda ser expressa em outros sistemas de expressão heterólogos. Neste trabalho, depois de testada em células de tabaco, a construção elaborada foi utilizada, juntamente com as restantes construções de cardosina A e B (já disponíveis no laboratório e previamente testadas em tabaco) para a transformação de células BY-2 com o objectivo de analisar a sua expressão, localização e processamento neste sistema de expressão.

#### **4.2. Expressão de cardosina A fundida com GFP em células BY-2**

Entre as células BY-2 transformadas por co-cultura com as três construções de cardosina A e B, foi possível obter tecido caloso transformado a partir de todas elas e manter duas linhas celulares diferentes de cada uma das transformações em meio de cultura selectivo. A expressão de todas as construções foi analisada por microscopia confocal e por *Western blotting* tendo-se verificado que apenas as células BY-2 transformadas com cardosina A::GFP pareciam estar a expressar a proteína recombinante. Os resultados foram ainda suportados por análise de transcritos para as cardosinas A e B nas células BY-2, por RT-PCR. Foi identificada a presença de transcritos de cardosina A nas células transformadas com cardosina A::GFP, confirmando a expressão da cardosina A nesta linha celular.

A cardosina A foi detectada na sua forma madura/processada (31 kDa), após 3 dias de sub-cultura das células transformadas. E a proteína foi localizada no reticulo endoplasmático, bem como em estruturas pontuadas não identificadas, através da observação da fluorescência de GFP na célula por microscopia confocal.

A natureza das estruturas identificadas foi investigada após a incubação das células com duas concentrações de BFA (10 e 50 µg/mL). Nas células tratadas foram reconhecidas estruturas pontuadas de maiores dimensões, tendo estas estruturas aumentado ainda mais com a maior concentração de BFA. Segundo Tse e colaboradores (2009), a concentração de 10 µg/mL de BFA em células BY-2 promove o empacotamento das cisternas do complexo de Golgi,

provocando a alteração do padrão de expressão observado por microscopia confocal. O sinal de fluorescência das estruturas pontuadas correspondentes à marcação dos complexos de Golgi é amplificado com a aplicação desta concentração de BFA (Tse *et al.*, 2009). Tendo em conta que os compartimentos pré-vacuolares não são afectados por esta concentração de BFA, o local onde se detectou a cardosina A pode corresponder ao complexo de Golgi (Miao *et al.*, 2006; Tse *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos por *Western blotting*, confirmam a expressão da cardosina A, e indicam que esta, quando detectada por microscopia confocal no retículo endoplasmático, e, provavelmente, também no complexo de Golgi, encontra-se completamente processada na sua forma madura, ao contrário do que sucede em células de tabaco em que a cardosina A é endereçada para o vacúolo onde é activada (Duarte *et al.*, 2008; Pereira, 2008).

Uma vez que o anticorpo utilizado na técnica de *Western blotting* reconhece apenas a uma sequência da cadeia maior da cardosina A (cadeia de 31 kDa), seria essencial utilizar um anticorpo que reconhecesse a cadeia menor ou a proteína fluorescente GFP, para que através desta técnica se pudesse confirmar a ligação da GFP à cardosina A. Neste caso, ambos os anticorpos iriam reconhecer uma banda de cerca de 43 kDa, ou seja, a banda de 15 kDa correspondentes à cadeia menor da cardosina A ligada à banda de 28 kDa da GFP.

Se fosse confirmada a presença da proteína fundida com GFP, em células BY-2, seria importante investigar mais aprofundadamente a natureza dos compartimentos em que a proteína se localiza, através, por exemplo, da imunolocalização de uma proteína intracelular endógena, como um marcador do mesmo compartimento (ex: JIM84), ou da realização de uma co-expressão da construção com um marcador do complexo de Golgi fundido com uma proteína fluorescente diferente (ex: ST::RFP).

Mitsuhashi e colaboradores (2000) demonstraram que a GFP fundida com um sinal de endereçamento vacuolar da 2S albumina (GFP::2SC), é endereçada para o vacúolo em células BY-2, sendo apenas observada neste compartimento dos 4 dias aos 6 dias de cultura, começando a GFP a ser degradada, o que se reflecte no desaparecimento da fluorescência da mesma no vacúolo. Esta degradação pode dever-se a alterações de pH ou da intensificação da actividade proteolítica no interior do vacúolo, o que já foi descrito em *Arabidopsis* e em tabaco (Flückiger *et al.*, 2003). Esta poderá ser uma das razões pelas quais, no caso do endereçamento

da cardosina A para o vacúolo em fusão com a GFP, a sua fluorescência não seja observada neste compartimento.

Tendo como possibilidade a não localização da cardosina A no vacúolo, isto poderia implicar uma diferenciação das vias de trânsito da cardosina A em células em suspensão de tabaco, em relação às células da planta de tabaco. Esta diferenciação poderá dever-se à diferente expressão de moléculas essenciais ao processo de endereçamento destas proteínas em células BY-2. Este facto poderia implicar a não formação de alguns compartimentos intermediários da via que a cardosina A utiliza em células de tabaco, ou uma falha no endereçamento da cardosina A devido à possível não expressão de receptores vacuolares (VSRs) que reconhecem a proteína no complexo de Golgi das células, promovendo assim a sua acumulação neste compartimento. Com este endereçamento diferencial em células em suspensão de tabaco, a activação da cardosina A pode ocorrer num compartimento diferente em relação ao que sucede com a proteína quando expressa em células da planta de tabaco. A possibilidade da diferenciação das vias de trânsito da cardosina A em células BY-2 poderia ser interessante para o estudo dos seus interactores.

Por outro lado, a cardosina pode não se encontrar ligada à proteína fluorescente, o que significaria uma separação por clivagem das proteínas durante o seu processamento. Neste caso, a detecção da proteína fluorescente, não corresponderia à localização da cardosina A e a cardosina A poderia estar a ser endereçada para o vacúolo, tal como ocorre em células de tabaco. No caso de se confirmar esta separação, seria necessário localizar a cardosina A nas células BY-2, por exemplo, por imunolocalização. No entanto, um dos problemas associados a este procedimento é a reacção cruzada com proteínas endógenas, apresentada pelo anticorpo contra a cardosina A em células BY-2. Uma abordagem alternativa e muito oportuna, seria o isolamento de vacúolos de células transformadas, e a imunodeteção da cardosina A nesta fracção celular, tendo como comparação a detecção da cardosina A no *pool* total de proteínas celulares.

Em experiências futuras, uma abordagem alternativa e muito pertinente, para a análise do trajecto das cardosinas em células BY-2 ao longo do tempo, passaria pela fusão das cardosinas com uma proteína fotoconvertível como a EosFP (Wiedenmann *et al.*, 2004; Schenkel *et al.*, 2008). As proteínas fotoconvertíveis alteram as suas propriedades de fluorescência

quando sujeitas a irradiação violeta Assim, através da fotoconversão da proteína fluorescente presente na célula, seria possível a visualização e monitorização do movimento da proteína sintetizada *de novo* ao longo do seu percurso no sistema endomembrar.

### 4.3. Transformação das células BY-2

Neste trabalho, foi possível transformar células BY-2 com as construções de cardosina A e B, utilizando o protocolo em que se suplementou a co-cultura com acetosseringona (Protocolo 2), pelo que, este deverá ser eleito como protocolo de transformação para futuras utilizações.

Uma vez que, inicialmente foram realizadas várias tentativas de transformação das células BY-2 recorrendo ao protocolo 1, o sucesso da transformação poderá estar relacionado com a virulência da estirpe de *A. tumefaciens* utilizada, a qual pode ter influenciado a sua eficiência. Neste estudo utilizou-se, para transformação das células BY-2, a estirpe GV3101::pMP90, estirpe também aqui utilizada para transformação transitória de *N. tabacum* com a mesma construção inserida no mesmo vector binário de expressão. À partida, esta estirpe funcionaria com a mesma eficiência na transformação das células BY-2, tratando-se estas de células obtidas a partir de tabaco. Analisando as estirpes utilizadas por diferentes autores na transformação de células BY-2, verifica-se que a estirpe LB4404 é a estirpe maioritariamente utilizada. Para além disso, plantas de *Arabidopsis thaliana* infiltradas com esta estirpe exibem maiores níveis de expressão transiente do que as infiltradas com a estirpe GV3101 (Kim *et al.*, 2009). No entanto, estirpes específicas de *A. tumefaciens* funcionam melhor na transformação em determinadas espécies de plantas do que noutras (Wroblewski *et al.*, 2005). É de considerar, portanto, novas transformações, substituindo a estirpe utilizada pela estirpe LB4404.

Seria, no futuro, de grande interesse a utilização de um outro protocolo de transformação de células BY-2, por electroporação. Este protocolo, desenvolvido por Kościańska e Wypijewski (2001), apesar de raramente usado, apresenta vantagens em relação à agroinfecção, nomeadamente, o processo de transformação que é menos moroso, bem como a obtenção de células transformadas em menor espaço de tempo e a possibilidade de rastreio das mesmas por microscopia confocal. Trata-se de uma expressão transitória, o que torna o método adequado apenas para estudos a curto prazo. Assim sendo, este método poderia ser utilizado para testar a expressão de uma construção neste sistema e só mais tarde, recorrendo ao protocolo de infecção por *A. tumefaciens* se realizariam estudos mais detalhados da mesma construção em células BY-2.

## **5. Conclusão**

Durante este trabalho foi possível obter uma construção de cardosina A fundida com a proteína fluorescente mCherry, com um *linker* entre as sequências. Esta construção apresenta um direccionamento e um processamento proteolítico semelhante ao ocorrido com a proteína nativa no mesmo sistema de expressão, *Nicotiana tabacum*. A construção obtida reproduz o comportamento da proteína nativa em tabaco, tendo a vantagem de estar acoplada a uma proteína fluorescente que permite a observação da proteína *in vivo* por microscopia confocal ou de fluorescência.

A introdução do *linker*, permitiu, tal como ocorreu com a cardosina B, a aquisição da correcta conformação e, conseqüentemente, o correcto processamento e endereçamento da cardosina A para o vacúolo em tabaco.

Neste trabalho, foi possível transformar células BY-2 com as construções de cardosina A::linker-mCherry, cardosina B::linker-mCherry e cardosina A::GFP e entre as células transformadas apenas uma construção apresentou expressão, cardosina A::GFP. Por microscopia confocal a proteína de fusão é endereçada para o ER e parece ser também endereçada para o complexo de Golgi. A cardosina A é processada até à sua forma madura (31 kDa), não tendo sido identificada a sua forma intermédia de 35 kDa. por *Western blotting*. Para perceber se, em células BY-2, a cardosina A apresenta o mesmo endereçamento e processamento que em células de tabaco, é necessário confirmar se a fluorescência observada de GFP corresponde à fusão das duas proteínas ou apenas da proteína fluorescente. Uma vez confirmada a expressão das proteínas em fusão no interior das células BY-2, será determinante confirmar a natureza dos compartimentos celulares em que a cardosina A se localiza e investigar a possibilidade da cardosina A se encontrar no vacúolo das células.

No futuro seria pertinente a transformação por electroporação das células BY-2 com as restantes construções, das quais não se obteve expressão em células BY-2, para testar a expressão de cada uma delas e, posteriormente, dependendo do resultado obtido, proceder à transformação das células BY-2 por agroinfiltração utilizando a estirpe de *A. tumefaciens* LB4404, para o estudo mais detalhado da expressão e processamento destas construções.

Através deste trabalho foi possível verificar as potencialidades da aplicação deste modelo no estudo do trânsito da cardosina A. Embora o resultado relativo à expressão da proteína em

células BY-2 tenha sido diferente do resultado obtido em células de tabaco, este não deixa de ser interessante merecendo a atenção em estudos futuros. Este modelo poderá no futuro complementar respostas obtidas actualmente por outros modelos biológicos utilizados neste laboratório.

As sugestões mencionadas ao longo do trabalho necessitam de ser exploradas tendo em vista a aferição de todas as possibilidades de aplicação deste modelo biológico para o estudo da expressão e trânsito tanto das cardosinas como até de outras proteínas.

## **6. Bibliografia**

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7: 1513-1523

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

Batoko, H., Zheng, H., Hawes, C. and Moore, I. (2000) A Rab1 GTPase Is Required for Transport between the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus and for Normal Golgi Movement in Plants. *The Plant Cell* 12: 2201 - 2218.

Bassham, D. C., Brandizzi, F., Otegui, M. S., Sanderfoot, A. A. (2008). The Secretory System of Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists. 1- 29.

Boevink, P., Oparka, K., Cruz, S. S., Martin, B., Betteridge, A., Hawes, C. (1998). Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *The Plant Journal*. 15: 441-447.

Brandizzi, F., Frangne, N., Marc-Martin, S., Hawes, C., Neuhaus, J., Paris, N. (2002). The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *The Plant Cell*. 14: 1077–1092.

Chen, J., Ouyang, Y., Wang, L., Xie, W., Zhang, Q. (2009). Aspartic proteases gene family in rice: Gene structure and expression, predicted protein features and phylogenetic relation. *Gene*. 442: 108–118.

daSilva, L. L. P., Taylor, J. P., Hadlington, J. L., Hanton, S. L., Snowden, C. J., Fox, S. J., Foresti, O., Brandizzi, F., Denecke, J. (2005). Receptor Salvage from the Prevacuolar Compartment Is Essential for Efficient Vacuolar Protein Targeting. *The Plant Cell*. 17: 132–148.

daSilva LL, Snapp EL, Denecke J, Lippincott-Schwartz J, Hawes C, Brandizzi F. (2004). Endoplasmic reticulum export sites and Golgi bodies behave as single mobile secretory units in plant cells. *Plant Cell*. 16: 1753–1771.

- David, K. M., Perrot-Rechenmann, C. (2001). Characterization of a tobacco Bright Yellow 2 cell line expressing tetracycline repressor at a high level for strict of transgene expression. *Plant Physiology*. 125: 1548-1553.
- Davies, D. (1990). The structure and function of the aspartic proteinases. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*. 19: 189-215.
- Denecke, J., Botterman, J., Deblaere, R. (1990). Protein Secretion in Plant Cells Can Occur via a Default Pathway. *The Plant Cell*. 2: 51-59.
- Drakakaki, G., Marcel, S., Arcalis, E., Altmann, F., Gonzalez-Melendi, P. Fischer, R., Christou, P., Stoger, E. (2006). The intracellular fate of a recombinant protein is tissue dependent. *Plant Physiology*. 141: 578–586.
- Duarte, P., Figueiredo, R., Pereira, S., Pissarra, J. (2006). Structural characterisation of the stigma-style complex of *Cynara cardunculus* (Asteraceae) and immunolocalisation of cardosins A and B during floral development. *Canadian Journal of Botany*. 84: 737-749.
- Duarte, P., Pissarra, J., Moore, I. (2008). Processing and trafficking of a single isoform of the aspartic proteinase cardosin A on the vacuolar pathway. *Planta*. 227: 1255-1268.
- Egas, C., Lavoura, N., Resende, R., Brito, R. M. M., Pires, E., Lima, M. C., Faro, C. (2000). The saposin-like domain of the plant aspartic proteinase precursor is a potent inducer of vesicle leakage. *The Journal of Biological chemistry*. 275: 38190–38196.
- Faro, C., Gal, S. (2005). Aspartic proteinase content of the Arabidopsis genome. *Current Protein & Peptide Science*. 6: 493-500.
- Faro, C., Ramalho-Santos, M., Vieira, M., Alexandra, M., Simões, I., Andrade, R., Veríssimo, P., Lin, X., Tang, J., Pires, E. (1999). Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase. *The Journal of Biological chemistry*. 274: 28724–28729.

Figueiredo., R., Duarte., P., Pereira, S., Pissarra, J. (2006). The embryo sac of *Cynara cardunculus*: ultrastructure of the development and localisation of the aspartic proteinase cardosin B. *Sexual Plant Reproduction*. 19: 93-101.

Flückiger, R., De Caroli, M., Piro, G., Dalessandro, G., Neuhaus, J., Di Sansebastiano, G. (2003) Vacuolar system distribution in *Arabidopsis* tissues, visualized using GFP fusion proteins. *Journal of Experimental Botany*. 54: 1577-1584

Foresti, O., Denecke, J. (2008). Intermediate organelles of the plant secretory pathway: identity and function. *Traffic*. 9: 1599–1612.

Frazão, C., Bento, I., Costa, J., Soares, C. M., Verissimo, 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 flowers of *Cynara cardunculus* L.. *The Journal of Biological chemistry*. 274: 27694–27701.

Frigerio, L. Hinz, G. Robinson, D. G. 2008. Multiple Vacuoles in Plant Cells: Rule or Exception?. *Traffic*. 9: 1564–1570.

Geelen, D. N. V, Inzé, D. G. (2001). A bright future for the Bright Yellow-2 cell culture. *Plant Physiology*. 127: 1375-1379.

Hanton, S. L., Bortolotti, L. E., Renna, L., Stefano, G., Brandizzi, F. (2005). Crossing the Divide – Transport Between the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus in Plants. *Traffic*. 6: 267–277.

Hanton, S. L., Chatre, L., Renna, L., Matheson, L. A., Brandizzi., F. (2007). De novo formation of plant endoplasmic reticulum export sites is membrane cargo induced and signal mediated. *Plant Physiology*. 143: 1640–1650.

Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Hatano, K., Takeuchi, Y., Nishimura, M. (1998). Transport of Storage Proteins to Protein Storage Vacuoles Is Mediated by Large Precursor-Accumulating Vesicles. *The Plant Cell*. 10: 825–836.

Hawes, C., Osterrieder, A., Hummel, E., Sparkes, I. M. (2008). The Plant ER-Golgi interface. *Traffic*. 9: 1571-1580.

Herman, E. M., Larkins, B. A. (1999). Protein Storage Bodies and Vacuoles. *The Plant Cell*. 11: 601-613.

Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., da Silva Figueiredo, A. C., Pais, M.S.S. (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteinases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*. 29: 1405-1410.

Hillmer, S., Movafeghi, A., Robinson, D. G., Hinz, G. (2001). Vacuolar storage proteins are sorted in the *cis*-cisternae of the pea cotyledon Golgi apparatus. *The Journal of Cell Biology*. 152: 41–50.

Holmes, D. S., Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*. 114:193-197.

Hwang, I. (2008). Sorting and anterograde trafficking at the Golgi Apparatus. *Plant Physiology*, 148: 673-683.

James, M. (1998). Aspartic Proteinases: Retroviral and Cellular. *Enzymes*. Plenum, New York.

Jolliffe, N. A., Craddock, C. P., Frigerio, L. (2005). Pathways for protein transport to seed storage vacuoles. *Biochemical Society Transactions*. 33: 1016-1018.

Jürgens, G. (2004). Membrane trafficking in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 20: 481-504.

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. *The EMBO Journal*. 18: 3947–3955.

Kim, M. J., Baek, K., Park, C. (2009). Optimization of conditions for transient *Agrobacterium*-mediated gene expression assays in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*. 28: 1159-1167.

Koelsh, G., Marěš, M., Metclaf, P., Fuseka, M. (1994). Multiple functions of pro-parts of aspartic proteinase zymogens. *Federation of European Biochemical Societies*. 343: 6-10.

Koncz, C., Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular & General Genetics*. 204: 383-396.

Kościańska, E., Wypijewski, K. (2001). Electroporated intact BY-2 tobacco culture cells as a model of transient expression study. *Acta Biochimica Polonica*. 48: 657–661.

Lam, S. K., Tse, Y. C., Robinson, D. G., Jiang, L. (2007). Tracking down the elusive early endosome. *Trends in Plant Science*. 12: 497-505.

Lin, X., Koelsh, G., Wu, S. Downs, D., Dashti, A., Tang, J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the  $\beta$ -secretase site of  $\beta$ -amyloid precursor protein. *PNAS*. 97: 1456–1460.

Lee, M. H., Min, M. K., Lee, Y. J., Jin, J. B., Shin, D. H., Kim, D. H., Lee, K., Hwang, I. (2002). ADP-Ribosylation Factor 1 of *Arabidopsis* plays a critical role in intracellular trafficking and maintenance of endoplasmic reticulum morphology in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 129: 1-14.

Lo, S. W., Jiang, L. (2006). Molecular study of prevacuolar compartments in transgenic tobacco BY-2 cells. *Biotechnical in Agriculture and Forestry*. 58: 153-166.

Matsuoka, K., Neuhaus, J. (1999). *Cis*-elements of protein transport to the vacuoles. *Journal of Experimental Botany*. 50: 165-174.

Miao, Y., Yan, P. K., Kim, H., Hwang, I., Jiang, L. (2006). Localization of Green Fluorescent Protein Fusions with the Seven *Arabidopsis* Vacuolar Sorting Receptors to Prevacuolar Compartments in Tobacco BY-2 Cells. *Plant Physiology*. 142: 945–962.

Miao, Y., Li, K. Y., Li, H. Y., Yao, X., Jiang, L. (2008). Vacuolar Transport of aleurain-GFP and 2S albumin-GFP Fusions is mediated by the same prevacuolar compartments in Tobacco BY-2 and *Arabidopsis* suspension cultured cells. *Plant Journal*. 56: 824-839.

Mitsuhashi *et al.*, Mitsuhashi, N., Shimada, T., Mano, S., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2000). Characterization of Organelles in the Vacuolar-Sorting Pathway by Visualization with GFP in Tobacco BY-2 Cells. *Plant and Cell Physiology*. 41: 993-1001.

Miyazawa, Y., Sakai, A. (2006). Tobacco BY-2 cells as model for differentiation in heterotrophic plant cells. *Biotechnical in Agriculture and Forestry*. 58: 119-132.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.

Mutlu, A., Gal, S. (1999). Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiologia Plantarum*. 105: 569-576.

Neumann, U., Brandizzi, F., Hawes, C. (2003). Protein transport in plant cells: in and out of Golgi. *Annals of Botany*. 92: 167-180.

Nickel, W., Rabouille, C. (2009). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature Reviews*. 10: 148-155.

Nebenführ, A., Gallagher, L., Dunahay, T. G., Frohlick, J. A., Masurkiewicz, A. M., Meehl, J. B., Staehelin, L. A. (1999). Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the actomyosin system. *Plant Physiology*. 121: 1127-1141.

Oliveira, A. (2009). Tese de Mestrado “Expressão da cardosina B nas fases iniciais do desenvolvimento pós-embriónico - Um estudo comparativo entre *Cynara Cardunculus* e *Arabidopsis thaliana*”. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal.

Paris, N., Stanley, C. M., Jones, R. L., Rogers, J. C. (1996) Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell*. 85: 563-572.

Paris, N., Rogers, S.W., Jiang, L., Kirsch, T., Beevers, L., Phillips, T. E., Rogers, J. C. (1997). Molecular cloning and further characterization of a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Physiology*. 115: 29-39.

Pereira, C. S. (2008). Tese de Mestrado “Determinantes vacuolares da cardosina A”. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal.

Pereira, C. S., Costa, D. S., Pereira, S., Nogueira, F. M., Albuquerque, P. M., Teixeira, J., Faro, C., Pissarra, J. (2008). Cardosins in postembryonic development of cardoon: towards an elucidation of the biological function of plant aspartic proteinases. *Protoplasma*. 232: 203-213.

Pissarra, J., Pereira, C., Costa, D. S., Figueiredo, R., Duarte, P., Teixeira, J., Pereira, S. (2007). From flower to seed germination in *Cynara cardunculus*: a role for aspartic proteinases. *International journal of plant developmental biology*. 1: 274-281.

Rawlings, N. D., Morton, F. R., Kok, C. Y., Kong, J., Barrett, A. J. (2008). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*. 36: 320-325.

Ramalho-Santo, L. M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Pereira, S., Salema, R., E., Pires, E., Faro, C. J. (1997). Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus*. *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 of Biochemistry*. 255: 133-138.

Robinson, D. G., Oliviusson, P. Hinz, G. (2005). Protein sorting to the storage vacuoles of plants: a critical appraisal. *Traffic*. 6: 615–625.

Robinson, D. G., Jiang, L., Schumacher, K. (2008a). The endosomal system of plants: charting new and familiar territories. *Plant Physiology*. 147: 1482–1492.

Robinson, D. G., Langhans, M., Saint-Jore-Dupas, C., Hawes, C. (2008b). BFA effects are tissue and not just plant specific. *Trends in Plant Science*. 13: 405-408.

Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edição. Cold Spring Harbor, New York.

Schenkel, M., Sinclair, A. M., Johnstone, D., Bewley, J. D., Mathur, J. (2008). Visualizing the actin cytoskeleton in living plant cells using a photo-convertible mEos::FABD-mTn fluorescent fusion protein. *Plant Methods*. 4: 1-9.

Shaner, C. M., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E., Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange, and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. 22: 1567-1572.

Simões, I., Faro, C. (2004). Structure and function of plant aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry*. 271: 2067-2075.

Silva, S.V., Malcata., F. X. (1999). On the activity and specificity of cardosin B, a plant proteinase, on ovine caseins. *Food Chemistry*. 67: 373-378.

Soares da Costa, D. (2009). Tese de Doutoramento “Expressão e trajectos biossintéticos da cardosina B em *Cynara cardunculus* e em sistemas transgênicos”. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal.

Sparkes, I. M., Ketelaar, T., de Ruijter, N. C. A., Hawes. C. (2009). Grab a Golgi: Laser Trapping of Golgi Bodies reveals *in vivo* Interactions with the Endoplasmic Reticulum. *Traffic*. 10: 567-571.

Surpin, M., Raikhel, N. (2004). Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nature Reviews*. 5: 100-109.

Šamaj, J., Read, N. D., Volkmann, D., Menzel, D., Baluška, F. (2005). The endocytic network in plants. *Trends in Cell Biology*. 15: 425-433.

Terauchi, K., Asakura, T., Ueda, H., Tamura, A., T., Tamura, K., Matsumoto, I., Misaka, T., Hara-Nishimura, I., Abe, K. (2006). Plant-specific insertions in the soybean aspartic proteinases, soyAP1 and soyAP2, perform different functions of vacuolar targeting. *Journal of plant physiology*. 163: 856-862.

Törmäkangas, 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 in which proteins leave the endoplasmic reticulum. *The Plant Cell*. 13: 2021–2032.

Toyooka, K., Goto, Y., Asatsuma, S., Koizumi, M., Mitsui, T., Matsuoka, K. (2009). A Mobile Secretory Vesicle Cluster Involved in Mass Transport from the Golgi to the Plant Cell Exterior. *The Plant Cell*. 21: 1212-1229.

Tse, Y. C., Mo, B., Hillmer, S., Zhao, M., Lo, S. W., Robinson, D. G., Jiang, L. (2004). Identification of Multivesicular Bodies as Prevacuolar Compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 Cells. *The Plant Cell*. 16: 672–693.

Tse, C. Y., Lam, S. K., Jiang, K. (2009). Organelle Identification and Characterization in Plant Cells: Using a Combinational Approach of Confocal Immunofluorescence and Electron Microscope. *Journal of Plant Biology*. 52: 1-9.

van der Hoorn, R. A. L. (2008). Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 191-223.

- Vieira, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Castanheira, P., Costa, Y., Pires, E., Faro, C. (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.
- Vitale, A., Raikhel, N. V. (1999). What do proteins need to reach different vacuoles? *Trends in Plant Science*. 4:149-155.
- Vitale, A., Hinz, G. (2005). Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? *Trends in Plant Science*. 10: 316-323.
- Wang, J., Cai, Y., Miao, Y., Lam, S. K, Jiang, L. (2009). Wortmannin induces homotypic fusion of plant prevacuolar compartments. *Journal of Experimental Botany*. 60: 3075-3083.
- Wiedenmann J., Ivanchenko, S., Oswald, F., Schmitt, F., Röcker, C., Salih, A. Spindler, K., Nienhaus, G. U. (2004). EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *PNAS*. 101: 15905–15910.
- Wroblewski, T., Tomczak, A., Michelmore, R. (2005) Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*. 3: 259–273.
- Zouhar, J., Rojo, E. (2009). Plant vacuoles: where did they come from and where are they heading?. *Current Opinion in Plant Biology*. 12:1-8.

## **7. Anexos**

**Anexo 1:** Análise da sequência de cardosina A amplificada por PCR e inserida no vector de clonagem pCR-Blunt.

cardosinaA	<u>AT</u> GGGCACCTCAATCAAAGCAAACGTGCTTGCCTTGTCTTGTGTTTTATCTTCTATCACCT	60
cardosinaA_putative	ATGGGCACCTCAATCAAAGCAAACGTGCTTGCCTTGTCTTGTGTTTTATCTTCTATCACCT	60
	*****	
cardosinaA	ACTGTATTTTCGGTCTCCGATGACGGATTGATTCGAATTGGACTTAAAAGAGGAAGGTG	120
cardosinaA_putative	ACTGTATTTTCGGTCTCCGATGACGGATTGATTCGAATTGGACTTAAAAGAGGAAGGTG	120
	*****	
cardosinaA	GACCGAATCGACCAACTTCGTGGACGTCGTGCGTTAATGGAAGGAAATGCTCGAAAAGAT	180
cardosinaA_putative	GACCGAATCGACCAACTTCGTGGACGTCGTGCGTTAATGGAAGGAAATGCTCGAAAAGAT	180
	*****	
cardosinaA	TTCGGCTTCCGTGGTACAGTTAGGGACTCGGGTAGTGCCGTTGTTGCACTAACGAACGAT	240
cardosinaA_putative	TTCGGCTTCCGTGGTACAGTTAGGGACTCGGGTAGTGCCGTTGTTGCACTAACGAACGAT	240
	*****	
cardosinaA	AGGGATACTTCGTATTTTGGTGAGATTGGTATCGGAATCCACCTCAGAAGTTCACAGTG	300
cardosinaA_putative	AGGGATACTTCGTATTTTGGTGAGATTGGTATCGGAATCCACCTCAGAAGTTCACAGTG	300
	*****	
cardosinaA	ATTTTCGATACCGGAAGTTCGTTCATAGGGTGCCTTCTTCAAAGTCATCAATTCAAAA	360
cardosinaA_putative	ATTTTCGATACCGGAAGTTCGTTCATAGGGTGCCTTCTTCAAAGTCATCAATTCAAAA	360
	*****	
cardosinaA	GCTTGTGTCGCGCACTCAATGTATGAGTCGAGCGATTCAAGTACCTACAAGGAAAATGGG	420
cardosinaA_putative	GCTTGTGTCGCGCACTCAATGTATGAGTCGAGCGATTCAAGTACCTACAAGGAAAATGGG	420
	*****	
cardosinaA	ACATCTGGCGCTATTATATATGGAACCGGATCAATCACGGTTTTTTTTAGCCAAGACTCT	480
cardosinaA_putative	ACATCTGGCGCTATTATATATGGAACCGGATCAATCACGGTTTTTTTTAGCCAAGACTCT	480
	*****	
cardosinaA	GTCACGATCGGTGATCTTGTGTTAAAGAGCAGGATTTTATAGAGGCAACCGATGAGGCC	540
cardosinaA_putative	GTCACGATCGGTGATCTTGTGTTAAAGAGCAGGATTTTATAGAGGCAACCGATGAGGCC	540
	*****	
cardosinaA	GACAATGTTTTCTTGCATGGGTTGTTTGACGGTATACTCGGCCTTTCATTTCAAACGATC	600
cardosinaA_putative	GACAATGTTTTCTTGCATGGGTTGTTTGACGGTATACTCGGCCTTTCATTTCAAACGATC	600
	*****	
cardosinaA	TCCGTTCCCTGCTCGGTACAACATGGTTAATCAAGGGCTTGTAAAGAACGGAGGTTTTCC	660
cardosinaA_putative	TCCGTTCCCTGCTCGGTACAACATGGTTAATCAAGGGCTTGTAAAGAACGGAGGTTTTCC	660
	*****	
cardosinaA	TTTTGGTTGAATCGCAATGTGATGAGGAAGAAGGTGGCGAATCGTGTGTTGGTGGGCTT	720
cardosinaA_putative	TTTTGGTTGAATCGCAATGTGATGAGGAAGAAGGTGGCGAATCGTGTGTTGGTGGGCTT	720
	*****	
cardosinaA	GACCCTAATCATTTTAGGGTGACCACACTTATGTCCCTGTGACTTATCAGTACTATTGG	780
cardosinaA_putative	GACCCTAATCATTTTAGGGTGACCACACTTATGTCCCTGTGACTTATCAGTACTATTGG	780
	*****	
cardosinaA	CAGTTTGAATCGGTGACGTCTTATTGGAGATAAAAGTACCGGATTTGCGCCCTGGT	840
cardosinaA_putative	CAGTTTGAATCGGTGACGTCTTATTGGAGATAAAAGTACCGGATTTGCGCCCTGGT	840
	*****	
cardosinaA	TGTCAAGCATTTGCCGACTCTGGAACCTCTTGTGTCAGGTCCAACGGCTATTGTTACT	900
cardosinaA_putative	TGTCAAGCATTTGCCGACTCTGGAACCTCTTGTGTCAGGTCCAACGGCTATTGTTACT	900
	*****	
cardosinaA	CAAATCAATCATGCAATTGGCGCTAACGGGGTCATGAACCAGCAATGCAAGACAGTGGTT	960
cardosinaA_putative	CAAATCAATCATGCAATTGGCGCTAACGGGGTCATGAACCAGCAATGCAAGACAGTGGTT	960
	*****	
cardosinaA	AGTCGTTATGGAAGGGATATAATTGAGATGCTCCGATCTAAGATACAACCTGATAAAAATA	1020
cardosinaA_putative	AGTCGTTATGGAAGGGATATAATTGAGATGCTCCGATCTAAGATACAACCTGATAAAAATA	1020
	*****	
cardosinaA	TGTTTCGCACATGAAGTTATGCACTTTTGTGATGGTGCCTCGCGATGTTAGTTCATCATTGAG	1080
cardosinaA_putative	TGTTTCGCACATGAAGTTATGCACTTTTGTGATGGTGCCTCGCGATGTTAGTTCATCATTGAG	1080
	*****	

cardosinaA	AGCGTGGTTGACAAGAATAACGACAAGTCTTCTGGTGGCATAACATGATGAGATGTGCACC	1140
cardosinaA_putative	AGCGTGGTTGACAAGAATAACGACAAGTCTTCTGGTGGCATAACATGATGAGATGTGCACC *****	1140
cardosinaA	TTCTGTGAGATGGCGGTCGTTTGGATGCAAAACGAAATCAAACAAAGCGAGACTGAAGAT	1200
cardosinaA_putative	TTCTGTGAGATGGCGGTCGTTTGGATGCAAAACGAAATCAAACAAAGCGAGACTGAAGAT *****	1200
cardosinaA	AACATAATCAACTATGCCAACGAGTTGTGTGAACACTTATCCACTTCATCTGAAGAATTA	1260
cardosinaA_putative	AACATAATCAACTATGCCAACGAGTTGTGTGAACACTTATCCACTTCATCTGAAGAATTA *****	1260
cardosinaA	CAAGTAGATTGCAACACTCTTCCCTCCATGCCCAATGTTTCCTTTACAATTGGTGGCAAA	1320
cardosinaA_putative	CAAGTAGATTGCAACACTCTTCCCTCCATGCCCAATGTTTCCTTTACAATTGGTGGCAAA *****	1320
cardosinaA	AAATTGGGGCTCACCCAGAGCAGTACATCTTGAAAGTCGGTAAGGAGAAGCAACACAA	1380
cardosinaA_putative	AAATTGGGGCTCACCCAGAGCAGTACATCTTGAAAGTCGGTAAGGAGAAGCAACACAA *****	1380
cardosinaA	TGCATCAGTGGATTCACTGCGATGGATGCGACTCTTCTTGGACCTCTGTGGATCCTCGGA	1440
cardosinaA_putative	TGCATCAGTGGATTCACTGCGATGGATGCGACTCTTCTTGGACCTCTGTGGATCCTCGGA *****	1440
cardosinaA	GATGTTTTCATGCGTCCATATCACACAGTGTGTTGATTATGGCAATTTACTAGTTGGATTT	1500
cardosinaA_putative	GATGTTTTCATGCGTCCATATCACACAGTGTGTTGATTATGGCAATTTACTAGTTGGATTT *****	1500
cardosinaA	GCAGAAGCAGCTGGTACCT	1519
cardosinaA_putative	GCAGAAGCAGCTTGA----	1515
	***** *	

O fragmento de DNA de cardosina A inserido no vector pCR-Blunt foi sequenciado com os *primers* universais M13 uni (-21) e M13 rev (-29). A sequência de cardosina A obtida foi analisada por alinhamento com a sequência de cardosina A esperada (cardosinA\_putative), a partir do codão de iniciação (duplo sublinhado). A sequência de cardosina A obtida apresenta um local de restrição para a enzima *Kpn* I (a verde) no lugar do codão de terminação (sublinhado), tendo este sido inserido pelo *primer reverse* utilizado. O alinhamento foi realizado através do programa *on line* ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

## Anexo 2: Análise da sequência de linker-mCherry amplificada por PCR e inserida no vector de clonagem pCR-Blunt

LkCh	AGGAAA <b>GGTACC</b> TCCTGCAGCCCGGGGATCCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	60
LkCh .Bch	-----TCCTGCAGCCCGGGGATCCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	48
	*****	
LkCh	GATAACATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGC	120
LkCh .Bch	GATAACATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGC	108
	*****	
LkCh	TTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGC	180
LkCh .Bch	TTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGC	168
	*****	
LkCh	GAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCC	240
LkCh .Bch	GAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCC	228
	*****	
LkCh	CTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTG	300
LkCh .Bch	CTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTG	288
	*****	
LkCh	AAGCACCCCGCCGACATCCCGGACTACTTGAAGCTGTCCCTCCCGAGGGCTTCAAGTGG	360
LkCh .Bch	AAGCACCCCGCCGACATCCCGGACTACTTGAAGCTGTCCCTCCCGAGGGCTTCAAGTGG	348
	*****	
LkCh	GAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTG	420
LkCh .Bch	GAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTG	408
	*****	
LkCh	CAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCTCCGACGGC	480
LkCh .Bch	CAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCTCCGACGGC	468
	*****	
LkCh	CCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAG	540
LkCh .Bch	CCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAG	528
	*****	
LkCh	GACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTAC	600
LkCh .Bch	GACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTAC	588
	*****	
LkCh	GACGCTGAGGTCAAGACCCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTAC	660
LkCh .Bch	GACGCTGAGGTCAAGACCCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTAC	648
	*****	
LkCh	AACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAG	720
LkCh .Bch	AACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAG	708
	*****	
LkCh	TACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGGA	780
LkCh .Bch	TACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGGA	768
	*****	
LkCh	TCCGAGCTCACCT	793
LkCh .Bch	TCCGAGCTC----	777
	*****	

O fragmento de DNA de linker-mCherry inserido no vector pCR-Blunt foi sequenciado com os *primers* universais M13 uni (-21) e M13 rev (-29). A sequência de linker-mCherry obtida foi analisada por alinhamento com a sequência de linker-mCherry esperada (LkCh.Bch). A sequência de linker-mCherry obtida é iniciada por um local de restrição para a enzima *Kpn* I (a verde), o qual não existe na sequência original, tendo este sido inserido pelo *primer forward* utilizado. As sequências apresentam a sequência de terminação TAA indicada a sublinhado. O alinhamento foi realizado através do programa *on line* ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.htm>).

**Anexo 3:** Análise da sequência da construção cardosina A::linker-mCherry após sub-clonagem das sequências cardosina A e linker-mCherry no vector binário de expressão pVKH18En6.

ALkCh	ACAATTGGTGGCAAAAATTTGGGCTCACCCAGAGCAGTACATCTTGAAAGTCGGTAAG	60
AlkCh_putative	ACAATTGGTGGCAAAAATTTGGGCTCACCCAGAGCAGTACATCTTGAAAGTCGGTAAG	60
	*****	
ALkCh	GGAGAAGCAACACAATGCATCAGTGGATTCACTGCGATGGATGCGACTCTTCTTGGACCT	120
AlkCh_putative	GGAGAAGCAACACAATGCATCAGTGGATTCACTGCGATGGATGCGACTCTTCTTGGACCT	120
	*****	
ALkCh	CTGTGGATCCTCGGAGATGTTTTTCATGCGTCCATATCACACAGTGTTTGATTATGGCAAT	180
AlkCh_putative	CTGTGGATCCTCGGAGATGTTTTTCATGCGTCCATATCACACAGTGTTTGATTATGGCAAT	180
	*****	
ALkCh	TTACTAGTTGGATTTGCAGAAGCAGCTGGTACC TCCTGCAGCCCGGGGGATCCCGCCACC	240
AlkCh_putative	TTACTAGTTGGATTTGCAGAAGCAGCTGGTACC TCCTGCAGCCCGGGGGATCCCGCCACC	240
	*****	
ALkCh	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAG	300
AlkCh_putative	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAG	300
	*****	
ALkCh	GTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGC	360
AlkCh_putative	GTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGC	360
	*****	
ALkCh	CGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGTTGGCCCCCTGCC	420
AlkCh_putative	CGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGTTGGCCCCCTGCC	420
	*****	
ALkCh	TTCGCCTGGGACATCCTGTCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAG	477
AlkCh_putative	TTCGCCTGGGACATCCTGTCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAG	477
	*****	

O fragmento de DNA de cardosina A::linker-mCherry inserido no vector de expressão pVKH18En6 foi sequenciado com os *primers* Card A 15 Fwd e Cherry\_Rev (*Bam* HI e *Sac* I), os quais permitiam a sequenciação da zona de ligação entre as duas sequências da construção. A sequência de cardosina A::linker-mCherry obtida foi analisada por alinhamento com a sequência de cardosina A::linker-mCherry que se esperaria obter (ALkCh\_putative). A sequência apresentava entre as duas sequências o local de restrição para a enzima *Kpn* I (a verde), tendo este sido inserido pelos *primers* utilizados na amplificação das sequências de cardosina A e linker-mCherry. O alinhamento foi realizado através do programa *on line* ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

**Anexo 4:** Análise da sequência aminoacídica da construção cardosina A::linker-mCherry inserida no vector binário de expressão pVKH18En6.

N	T	L	S	S	M	P	N	V	S	F	T	I	G	G	K	K	F	G	L	T
P	E	Q	Y	I	L	K	V	G	K	G	E	A	T	Q	C	I	S	G	F	T
A	M	D	A	T	L	L	G	P	L	W	I	L	G	D	V	F	M	R	P	Y
H	T	V	F	D	Y	G	N	L	L	V	G	F	A	E	A	A	G	T	S	C
S	P	G	D	P	A	T	M	V	S	K	G	E	E	D	N	M	A	I	I	K
E	F	M	R	F	K	V	H	M	E	G	S	V	N	G	H	E	F	E	I	E
G	E	G	E	G	R	P	Y	E	G	T	Q	T	A	K	L	K	V	T	K	G
G	P	L	P	F	A	W														

Tradução aminoacídica da zona de ligação entre as sequências de cardosina A e linker-mCherry que foram amplificadas e sub-clonadas para a elaboração da construção cardosina A::linker-mCherry inserida no vector binário de expressão pVKH18En6. A azul, está destacada a região aminoacídica terminal da proteína cardosina A, a cinzento, o *linker*, e a vermelho, a região aminoacídica inicial de mCherry.