



Nuno Tiago Tavares da Silva **Mutantes de cardosinas para o estudo do Plant
Specific Insert**
**Obtenção de construções e sua expressão em *Nicotiana
tabacum***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica de Doutora Maria Susana Jorge Pereira, Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade do Porto e co-orientação científica de Doutor António José de Brito Fonseca Mendes Calado, Professor auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues
Professora auxiliar do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Patrícia Carla De Jesus Duarte Macedo
Investigadora do Instituto de Biologia Molecular e Celular do Porto

Prof. Doutora Maria Susana Jorge Pereira
Professora auxiliar do departamento de Biologia da Universidade do Porto

Prof. Doutor António José de Brito Fonseca Mendes Calado
Professor auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

O meu primeiro agradecimento vai para a minha família, que sempre me apoiou nas minhas decisões, sempre me aconselhou e sempre me possibilitou o cumprimento dos meus objectivos. Obrigado.

Para a Prof. Susana, que desde o primeiro dia sempre acreditou que eu seria capaz, abrindo-me as portas para uma vasta aprendizagem científica e pessoal. Muito Obrigado.

Ao grupo de investigação, principalmente à Diana, Ana, Susana e Alberto muito obrigado pela forma como me receberam, pelo exemplo, pelo apoio e por todos os ensinamentos. Sem vocês não teria conseguido.

Para a Cláudia, o meu agradecimento mais especial. Por toda a dedicação, empenho e paciência demonstrada na orientação científica dos trabalhos, no planeamento das experiências e nas discussões dos resultados. Obrigado por teres estado sempre presente, sem nunca teres deixado de acreditar. Obrigado.

Para a Andrea, obrigado pelo apoio incondicional nos momentos em que duvidei. Pela paciência e compreensão nos momentos de ausência. Por teres estado sempre do meu lado.

palavras-chave

Proteinases Aspárticas; Cardosinas; Plant Specific Insert; *Cynara cardunculus*; Sistema Endomembranar; Endereçamento Vacuolar;

resumo

A cardosina A e a cardosina B são duas proteinases aspárticas encontradas nos pistilos de cardo (*Cynara cardunculus*, L.). Apesar da sua elevada similaridade são expressas em diferentes tecidos, seguindo padrões temporais próprios e apresentam uma acumulação intracelular bastante diferente: a cardosina A é acumulada no vacúolo enquanto que a cardosina B é secretada. À semelhança de outras proteinases aspárticas vegetais, apresentam um segmento específico denominado PSI (Plant Specific Insert). Este domínio tem sido implicado no endereçamento vacuolar de proteinases aspárticas, quer pela sua acção como sinal de endereçamento, quer pela sua capacidade de interagir com membranas funcionando como um pré-requisito para o endereçamento vacuolar. Com o objectivo de contribuir para descortinar o verdadeiro papel deste domínio no endereçamento e processamento destas cardosinas, recorreu-se a técnicas de PCR para a obtenção de construções mutantes de cardosinas A e B, entre as quais se efectuou a troca do segmento PSI. Paralelamente, através do uso de técnicas de mutagénese dirigida, efectuou-se a construção de cardosinas A e B mutadas nos nucleótidos dos potenciais locais de clivagem deste domínio, evitando assim a sua remoção ao longo do processamento das cardosinas. Os resultados obtidos não permitiram uma conclusão clara sobre o papel do segmento PSI nas cardosinas A e B, uma vez que as construções testadas não revelaram alterações no direccionamento intracelular no sistema heterólogo *Nicotiana tabacum*. A possível aplicação destas construções em vários sistemas de expressão, assim como a importância destas construções para o estudo do papel desempenhado pelo PSI no endereçamento e processamento das cardosinas A e B é aqui discutida.

keywords

Aspartic Proteinases, Cardosins, Plant Specific Insert, *Cynara cardunculus*, Endomembrane system; Vacuolar sorting;

abstract

Cardosin A and cardosin B are two aspartic proteinases isolated from cardoon (*Cynara cardunculus*, L.) pistils. Despite presenting high similarity, they are expressed in different tissues, following different temporal patterns and accumulate in different compartments within the cell: cardosin A is transported and stored in vacuoles while cardosin B is secreted. A common feature of plant aspartic proteinases is the presence of a specific segment known as PSI (Plant Specific Insert). This domain has been implicated in vacuolar sorting of aspartic proteinases, acting as a sorting signal or through its capacity of membrane interaction, working as a pre-requisite for the vacuolar sorting. In order to uncover the real implication of this domain in cardosins processing and sorting, PCR techniques were used to obtain cardosins A and B mutants, in which the PSI domains were switched. In addition, techniques of site-directed mutagenesis were employed to the construction of mutants of cardosins A and B, in which the nucleotides of the potential cleavage sites of PSI were mutated, thereby preventing its removal during the processing steps of cardosins. The results obtained did not allow a clear conclusion about the biological role of PSI in cardosins, because the mutants tested did not reveal a significant variation in the intracellular sorting, using *Nicotiana tabacum* as expression system. The possible application of these constructions in different expression systems, as well as the importance of these to the study of the implication of PSI in cardosin processing and sorting are here discussed.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo.....	iv
Abstract	v
Índice	vi
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xi
Índice de abreviaturas.....	xii
1 Introdução.....	1
1.1 Sistema Endomembranar.....	2
1.1.1 Retículo endoplasmático.....	3
1.1.2 Do retículo endoplasmático ao aparelho de Golgi.....	4
1.1.3 Aparelho de Golgi: direccionando proteínas	6
1.1.4 Vias de transporte para o vacúolo	7
1.2 Sistema enzimático: Proteinases.....	11
1.2.1 Proteinases Aspárticas	11
1.2.2 Proteinases Aspárticas Vegetais.....	12
1.3 <i>Cynara cardunculus</i>	15
1.3.1 Cardosinas	16
1.3.2 PSI (Plant Specific Insert).....	18
1.3.3 PSI e as suas funções biológicas.....	19
2 Objectivos.....	22
3 Material e Métodos.....	24
3.1 Modificação do cDNA das cardosinas A e B.....	25
3.1.1 Troca das regiões do PSI.....	26
3.1.2 Mutagénesse dos locais de corte da região PSI.....	32
3.2 Estirpes bacterianas	34
3.2.1 Preparação de células competentes – <i>E. coli</i> DH5 α	35
3.2.2 Transformação de células de <i>E. coli</i> competentes.....	35
3.2.3 Preparação de células electrocompetentes de <i>A. tumefaciens</i>	35

3.2.4	Transformação de <i>A.tumefaciens</i> electrocompetentes.....	36
3.3	Manipulação e análise de DNA mutado.....	36
3.3.1	Eliminação do DNA molde.....	36
3.3.2	Electroforese em gel de agarose.....	36
3.3.3	Recuperação de DNA de gel de agarose	37
3.3.4	Minipreparação de DNA plasmídico.....	37
3.3.5	Rastreio por «colony PCR».....	38
3.3.6	Rastreio por restrição enzimática	39
3.4	Sequenciação	39
3.5	Clonagens	39
3.5.1	Introdução de adaptadores de enzimas de restrição	39
3.5.2	Clonagem em vector pCR Blunt.....	40
3.5.3	Subclonagem no vector de expressão pVKH18-En 6	41
3.5.4	Obtenção de proteínas fluorescentes.....	41
3.6	Análise da expressão proteica.....	42
3.6.1	Cultura de <i>Nicotiana tabacum</i> SR1 cv. Petit Havana	42
3.6.2	Infiltração de folhas de <i>N. tabacum</i>	42
3.6.3	Extracção de proteínas totais.....	43
3.6.4	Separação de proteínas: SDS-PAGE.....	43
3.6.5	Western blotting	44
3.6.6	Microscopia de varrimento confocal a laser	45
4	Resultados	46
4.1	Obtenção das construções cardosina A+PSIB e cardosina B+PSIA	47
4.1.1	Amplificação de fragmentos de cardosina	47
4.1.2	Ligação dos fragmentos de DNA: cardosina Δ PSI e PSI	48
4.1.3	Rastreio de clones cardosina A+PSIB e cardosina B+PSIA.....	48
4.2	Obtenção das construções de cardosina AmutPSI e cardosina BmutPSI.....	49
4.3	Clonagens	53
4.3.1	Introdução de locais de reconhecimento para enzimas de restrição	53
4.3.2	Subclonagem no vector de expressão pVKH18-En6	56
4.3.3	Obtenção de proteínas fluorescentes.....	57
4.4	Inserção das construções em <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	59
4.4.1	Rastreio de clones positivos	59

4.5	Estudo da expressão em <i>Nicotiana tabacum</i> SRI cv. Petit Havana	61
4.5.1	Análise da expressão de cardosina B+PSIA:mCherry	62
4.5.2	Análise da expressão de cardosina BmutPSI:mCherry	65
5	Discussão e Conclusão.....	67
6	Referências	74
7	Anexos	82

Índice de figuras

Figura 1.1 Esquema geral do sistema endomembranar e das relações dinâmicas entre os diferentes compartimentos intracelulares.	3
Figura 1.2 Esquema representativo do transporte entre o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi mediado por vesículas COP (Coated Protein Complex)	5
Figura 1.3 Esquema representativo de 3 modelos para o exporte de vesículas do RE para o aparelho de Golgi	6
Figura 1.4 Modelo hipotético das diferentes vias de endereçamento vacuolar a partir do aparelho de Golgi.	9
Figura 1.5 Esquema representativo da via de endereçamento para o vacúolo de armazenamento proteico a partir do retículo endoplasmático	10
Figura 1.6 Esquema representativo da estrutura dos zimogénios de várias proteinases aspárticas vegetais.	13
Figura 1.7 Representação da estrutura cristalográfica de duas proteinases aspárticas vegetais ...	14
Figura 1.8 Representação da espécie <i>Cynara cardunculus</i> (cardo)	15
Figura 1.9 Esquema representativo do processamento da cardosina A	16
Figura 1.10 Esquema representativo da sequência aminoacídica e dos locais de clivagem do PSI na cardosina A.....	19
Figura 1.11 Modelo tridimensional hipotético das procardosinas A e B.....	20
Figura 3.1 Esquema representativo das cardosinas A e B inseridas nos respectivos vectores plasmídicos.....	25
Figura 3.2 Esquema representativo do emparelhamento dos oligonucleótidos nos PCRs realizados para obtenção dos fragmentos cardosina A Δ PSI (a) e cardosina B Δ PSI (b).....	26
Figura 3.3 Esquema representativo do emparelhamento dos oligonucleótidos nos PCRs realizados para obtenção dos fragmentos PSIA (a) e PSIB (b).	27
Figura 3.4 Esquema representativo da ligação entre os fragmentos cardosina A Δ PSI e PSIB.	30
Figura 3.5 Esquema representativo da ligação entre os fragmentos cardosina B Δ PSI e PSIA.	30
Figura 4.1 Electroforese de 50 μ L de produto de PCR correspondente aos fragmentos amplificados	47
Figura 4.2 Esquema representativo do emparelhamento dos oligonucleótidos usados no PCR colony.....	48
Figura 4.3 Electroforese de 25 μ L de produto do «colony PCR» correspondente aos sete clones rastreados de cada construção	49
Figura 4.4 Representação do cDNA e respectivos aminoácidos das zonas que ladeiam os potenciais locais de clivagem do PSI (a vermelho) na cardosina A e na cardosina B	50
Figura 4.5 Esquema de emparelhamento dos oligonucleótidos mutados no local de clivagem a 5' do fragmento PSI.....	51
Figura 4.6 Alinhamento das sequências de cardosina A e cardosina B mutadas a 5' da região do PSI com as sequências de cardosina originais	51
Figura 4.7 Esquema de emparelhamento dos oligonucleótidos mutados no local de clivagem a 3' do fragmento PSI.....	52

Figura 4.8 Alinhamento das sequências de cardosina A e cardosina B mutadas a 3' da região do PSI com as sequências de cardosina originais	52
Figura 4.9 Esquema representativo das construções de cardosina com a introdução dos adaptadores para enzimas de restrição.....	53
Figura 4.10 Electroforese de 25 µl do produto de PCR para colocação dos adaptadores enzimáticos	54
Figura 4.11 Esquema representativo da clonagem das construções de cardosina com extremidades rombas no vector pCR-Blunt.....	55
Figura 4.12 Electroforese do produto de rastreio de 2µL de DNA plasmídico de 2 clones de cada uma das construções inseridas em pCR-Blunt.....	55
Figura 4.13 Esquema de inserção das construções no vector de expressão pVKH18-En6.....	56
Figura 4.14 Electroforese do produto de rastreio de 2 µL de DNA plasmídico de cada uma das construções em pVKH18-En6.....	57
Figura 4.15 Esquema representativo do vector pVKH18-En6 previamente clonado com a proteína fluorescente mCherry	58
Figura 4.16 Electroforese do produto de rastreio de 2µL de DNA plasmídico de cada uma das construções inseridas em pVKH18-En6 – mCherry com as enzimas <i>XbaI</i> e <i>SacI</i>	58
Figura 4.17 Electroforese do produto de rastreio de 2 µL de DNA plasmídico de cada uma das construções em pVKH18-En6.....	59
Figura 4.18 Electroforese do produto de rastreio de 2µL de DNA plasmídico de cada uma das construções inseridas em pVKH18-En6 – mCherry com as enzimas <i>XbaI</i> e <i>SacI</i>	60
Figura 4.19 Diferentes fases do ciclo de vida de <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Petit Havana	61
Figura 4.20 Imagem de microscopia confocal de células de epiderme foliar de <i>Nicotiana tabacum</i> transformadas com a construção 35s-GFP.	62
Figura 4.21 Imagem de microscopia confocal de células de epiderme foliar de <i>Nicotiana tabacum</i> transformadas com cardosina B+PSIA:mCherry	63
Figura 4.22 Imagem de microscopia confocal de células de epiderme foliar de <i>Nicotiana tabacum</i> transformadas com cardosina B+PSIA:mCherry	64
Figura 4.23 Imunodeteção da cardosina B+PSIA:mCherry em folhas de <i>Nicotiana tabacum</i> aos 3 e 5 dias após infiltração.	64
Figura 4.24 Imagem de microscopia confocal de células de epiderme foliar de <i>Nicotiana tabacum</i> transformadas com cardosina BmutPSI:mCherry.	65
Figura 4.25 Imagem de microscopia confocal de células de epiderme foliar de <i>Nicotiana tabacum</i> transformadas com cardosina BmutPSI:mCherry.	66
Figura 4.26 Imunodeteção da cardosina BmutPSI:mCherry em folha de <i>Nicotiana tabacum</i> aos 3 e 5 dias após infiltração.....	66
Figura 5.1 Modelo hipotético da interacção do PSI da cardosina A com o tonoplasto.....	71

Índice de tabelas

Tabela 3.1 Oligonucleótidos usados para obtenção dos fragmentos cardosina A Δ PSI e cardosina B Δ PSI.	26
Tabela 3.2 Oligonucleótidos usados para obtenção dos fragmentos PSIA e PSIB.....	27
Tabela 3.3 Reacção de PCR utilizada na amplificação dos fragmentos de cardosina.....	28
Tabela 3.4 Reacção de fosforilação dos fragmentos PSIA e PSIB.	29
Tabela 3.5 Reacção de ligação dos fragmentos cardosina Δ PSI e PSI.....	31
Tabela 3.6 Oligonucleótidos usados para obtenção das sequências de cardosina mutadas a nível dos locais de corte do PSI.....	32
Tabela 3.7 Reacção de PCR utilizada na técnica de mutagénesse dirigida.	34
Tabela 3.8 Reacção de «colony PCR» para rastreio de clones de cardosina A+PSIB e cardosina B+PSIA.	38
Tabela 3.9 Oligonucleótidos utilizados na reacção de «colony PCR».....	38
Tabela 3.10 Oligonucleótidos usados na reacção de PCR para introdução de locais reconhecimento de enzimas de restrição.....	40
Tabela 3.11 Reacção de ligação das construções de cardosina ao vector pVKH18-En6.	41

Índice de abreviaturas

APs – Proteinases Aspárticas (do inglês: *Aspartic Proteinases*)

BiP – Do inglês: *Binding immunoglobulin protein*

BP80 – Do inglês: *Binding Proteins with 80kDa*

CaMV – Vírus do mosaico da couve-flor

CCV - Vesículas Revestidas por Clatrina (do inglês: *Clathrin Coated Vesicles*)

CN-UIBBM – Comité de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

COP – Do inglês: *Coat Protein Complex*

PVC – Compartimento pré-vacuolar (do inglês: *Pre Vacuolar Compartment*)

ctVSD – Do inglês: *Carboxyl terminus VSD*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês: *desoxiribonucleic acid*)

DOC – Denominação de Origem Controlada

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 – Do inglês: *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ER – Retículo Endoplasmático (do inglês: *Endoplasmic reticulum*)

ERES – Do inglês: *Endoplasmic Reticulum Exit Sites*

Hyg – Higromicina

IPTG – Do inglês: *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*

kDa – Kilodaltons

LB – Bordo esquerdo (do inglês: *Left Border*)

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

nm – Nanómetros

PAC – Do inglês: *precursor-accumulating vesicles*

pb – Pares de bases

PCR – Reacção da Polimerase em Cadeia (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*)

PDB – Do inglês: *Protein Data Base*

PDI – Do inglês: *Protein disulfid*

PSI – Do inglês: *Plant Specific Insert*

psVSD – Do inglês: *Physical Structure VSD*

RB – Bordo direito (do inglês: *Right Border*)

RE – Retículo Endoplasmático

RGD – Sequência Arg-Gly-Asp

rpm – Rotações por minuto

SNAREs – Do inglês: *Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment Receptor*

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

ssVSD – Do inglês: *Sequence Specific VSD*

TAE – Tampão Tris acetato com EDTA

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

VSD – Domínios de endereçamento vacuolar (do inglês: *Vacuolar Sorting Domains*)

Abreviatura dos Nucleótidos	
Nucleótido	Abreviatura de uma letra
Adenosina	A
Citosina	C
Guanina	G
Timina	T

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

1 Introdução

Ao contrário da célula procariótica, que geralmente consiste num único compartimento intracelular rodeado por uma membrana plasmática, a célula eucariótica possui o seu espaço intracelular subdividido de forma elaborada, em compartimentos funcionalmente distintos, delimitados por membranas. A manutenção das características únicas de cada um desses compartimentos, assim como todo o fluxo de moléculas entre eles, depende unicamente de um complexo sistema de transporte, o sistema endomembranar (Alberts *et al.*, 2002).

1.1 Sistema Endomembranar

O sistema endomembranar é o conjunto de membranas internas presente nos eucariotas, que divide o espaço intracelular de uma forma estrutural e funcional. Os constituintes deste sistema são o retículo endoplasmático (RE), o aparelho de Golgi, a rede *trans* do Golgi, o compartimento pré-vacuolar, os compartimentos líticos e o endossoma (Nebenfuhr, 2002). A via secretora permite o transporte de material celular recentemente sintetizado desde o RE, passando por outros compartimentos endomembranares, até ao seu destino final. No sentido oposto, a via endocítica é a responsável pelo transporte de material para o interior da célula, reencaminhando-o para degradação ou reintegrando-o no sistema endomembranar. O movimento de material desde o retículo endoplasmático até à superfície membranar ou a outros compartimentos celulares designa-se por anterógrado e é acompanhado por um movimento em sentido contrário, denominado retrógrado, que funciona como reciclagem de lípidos membranares, receptores de sinais e proteínas, restituindo assim a integridade necessária ao bom funcionamento deste sistema (Richter *et al.*, 2009) (Figura 1.1).

Embora todos os eucariotas partilhem uma dinâmica funcional semelhante, assim como os mesmos constituintes básicos do sistema endomembranar, existem diferenças típicas de determinados grupos. No que diz respeito às plantas, estas caracterizam-se por possuir pelo menos dois tipos de vacúolos com funções e características diferentes (ver secção 1.1.4) ao contrário dos mamíferos em que esse papel é desempenhado pelo lisossoma. O RE está geralmente comprimido pelo enorme tamanho do vacúolo central enquanto nos mamíferos não apresenta essa limitação. Além disso, as plantas carecem da existência de um compartimento de reciclagem intermédio entre o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi, típico dos mamíferos. Para além do seu envolvimento na divisão celular, o aparelho de Golgi apresenta uma dinâmica muito superior nas plantas (Vitale e Galilli, 2001; Hanton *et al.*, 2005).

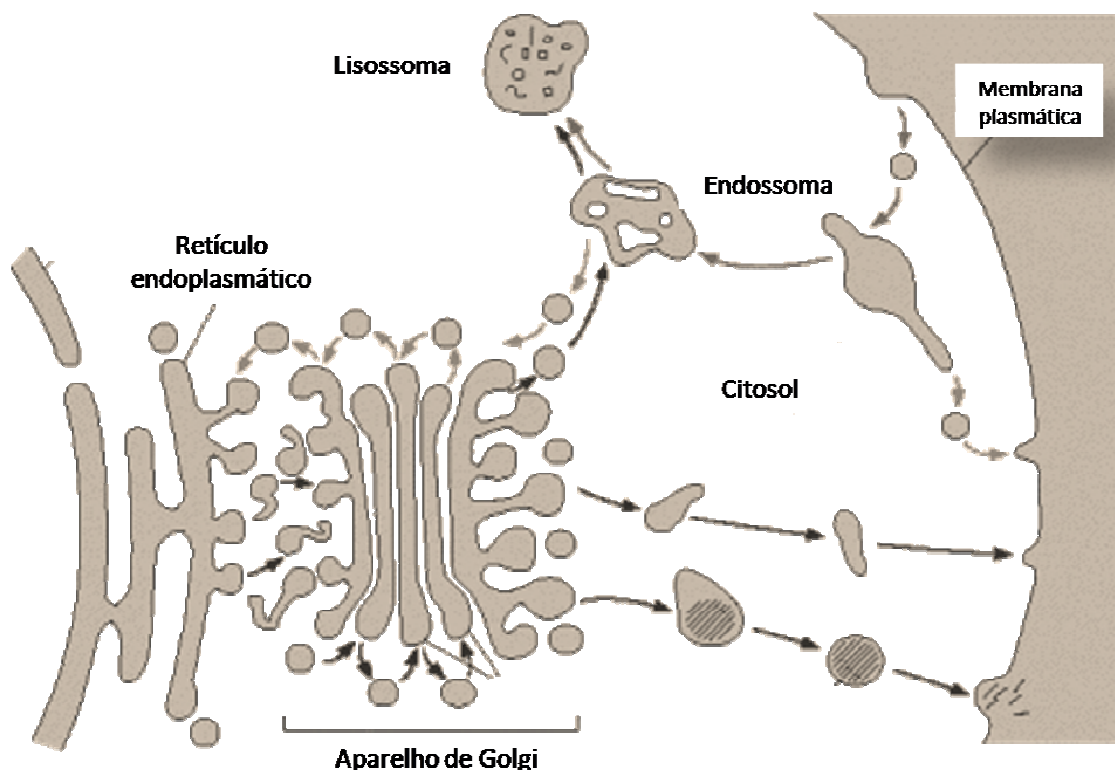


Figura 1.1 Esquema geral do sistema endomembranar e das relações dinâmicas entre os diferentes compartimentos intracelulares. Representação do transporte de proteínas ao longo da via secretora de uma célula animal: as proteínas entram na via secretora ao nível do retículo endoplasmático aquando da sua síntese, sendo posteriormente direccionadas para o aparelho de Golgi. O aparelho de Golgi é o responsável pelo direccionamento das proteínas para outros compartimentos intracelulares ou mesmo para o exterior da membrana celular. O compartimento endossomal é o responsável pelo transporte de material da superfície membranar ou do exterior, reintegrando-o no sistema endomembranar ou encaminhando-o para degradação. Adaptado de *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York.

1.1.1 Retículo endoplasmático

O RE apresenta-se como um organelo de importância central no sistema endomembranar. Cerca de metade da área total de membranas numa célula pertence ao RE (Alberts *et al.*, 2002). Com poucas excepções, a síntese proteica tem início no citosol ou em ribossomas associados à membrana do RE. As proteínas que se destinam a ser secretadas da célula ou a permanecer no sistema endomembranar iniciam o seu percurso na via secretora ao nível do RE. A passagem para o RE, designada de co-translocação, obriga à presença de um sinal de endereçamento que, no caso de proteínas solúveis, está geralmente localizado na extremidade amino-terminal, sendo geralmente composto por resíduos hidrofóbicos. Já as proteínas membranares, apesar de também poderem apresentar um sinal de endereçamento, determinam

a sua passagem e posição no RE através da informação contida nos seus domínios proteicos. Apesar da multiplicidade de passos e compartimentos celulares necessários até que as proteínas cheguem ao seu destino final, a translocação membranar ocorre somente uma vez, no RE, através de poros aquosos e sem necessidade de gastos energéticos. Todo o transporte *a posteriori* é efectuado através da mobilização e fusão de vesículas, ou do contacto directo entre os diferentes compartimentos subcelulares. O RE funciona assim como porta de entrada do sistema endomembranar. A passagem para o RE obriga a que as proteínas se apresentem numa conformação não tridimensional, sendo esta adquirida no lúmen do RE após a remoção do péptido sinal amino-terminal. De facto, o RE possui um vasto número de mecanismos que assistem na conformação tridimensional das proteínas, como por exemplo a calreticulina, a chaperona «Binding immunoglobulin protein» (BiP) e a «Protein disulfit» (PDI) (Vitale e Denecke, 1999). Caso não adquiram uma correcta estrutura tridimensional, as proteínas são deslocadas em agregados para o citosol ou enviadas para o vacúolo para degradação proteica, num processo designado de “controlo de qualidade” (Vitale e Ceriotti, 2004). Uma diferença emergente entre as células vegetais e as de origem animal é a capacidade que as primeiras apresentam em acumular proteínas em agregados de elevada densidade. Este fenómeno é típico em sementes de cereais, nos quais as prolaminas interagem com membros da família das chaperonas, promovendo a formação de agregados de grandes dimensões ao nível do RE. A sua grande dimensão parece ser o factor responsável pela impossibilidade de transporte destas proteínas do RE para o Golgi, originando assim a formação de estruturas especializadas no armazenamento de proteínas, os corpos proteicos (Vitale e Galilli, 2001).

O retículo endoplasmático é assim o principal órgão do sistema endomembranar, participando em funções de síntese, enrolamento, processamento, armazenamento e transporte proteico.

1.1.2 Do retículo endoplasmático ao aparelho de Golgi

O modo como as proteínas abandonam o RE é ainda assunto de debate, representando um mecanismo ainda não completamente elucidado. Apesar de ainda não ter sido inequivocamente demonstrado em células vegetais, o transporte de proteínas mediado por vesículas «coated protein complex» (COP) tem recebido maior atenção (Figura 1.2). No sentido anterógrado, as proteínas abandonam o RE em direcção ao aparelho de Golgi em vesículas COPII, formadas em locais específicos de transporte na membrana do RE, denominados «Endoplasmic

Reticulum Exit Sites» (ERES) (Hanton *et al.*, 2005). Motivos diacídicos e dibásicos presentes na cauda citoplasmática de proteínas membranares demonstraram estar envolvidos no desencadeamento da formação destas vesículas. Por outro lado, ainda não foi identificado nenhum motivo sinal equivalente para o transporte de proteínas solúveis, aceitando-se que este possa ocorrer por mecanismos de transporte passivo. O movimento anterógrado é compensado pelo transporte no sentido inverso, retrógrado, mediado por vesículas COPI. Ao contrário das vesículas COPII, que se formam no RE e transportam principalmente proteínas sintetizadas *de novo* para o aparelho de Golgi, as vesículas COPI medeiam o transporte da face *cis* do aparelho de Golgi para o RE, reciclando receptores de sinal e proteínas residentes do RE. O que determina a selecção de proteínas a entrar no transporte retrógrado ainda não é completamente claro, no entanto, motivos di-lisina e resíduos aromáticos são apontados como motivo sinal em proteínas membranares. No caso de proteínas solúveis, o sinal apontado é a sequência H/KDEL na extremidade C-terminal da proteína (Vitale e Denecke, 1999; Hanton *et al.*, 2006; Matheson *et al.*, 2006). Ensaio com inibidores do transporte retrógrado demonstram que o transporte anterógrado é também inibido, revelando assim que o carácter dinâmico destes tipos de transporte é essencial à manutenção do equilíbrio do sistema endomembranar (Hanton *et al.*, 2005).

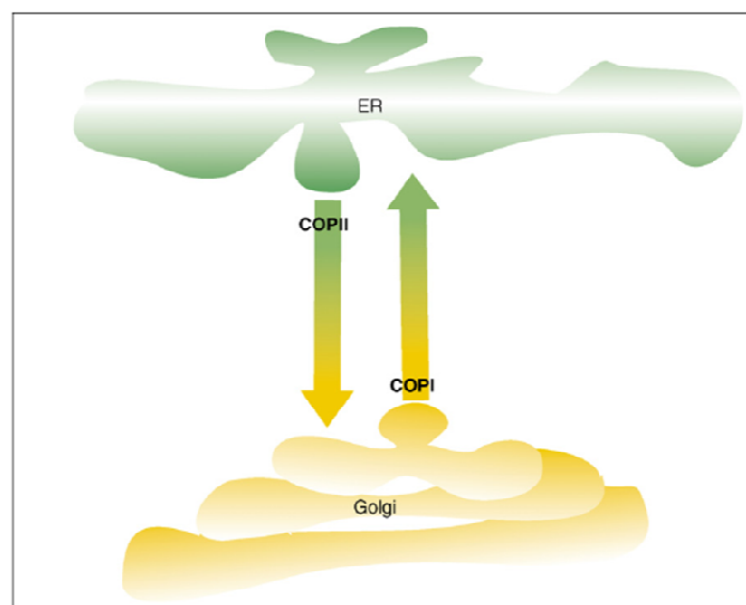


Figura 1.2 Esquema representativo do transporte entre o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi mediado por vesículas COP (Coated Protein Complex). No sentido anterógrado as vesículas COPII transportam material desde o retículo endoplasmático para a face *cis* do aparelho de Golgi. Em sentido contrário, retrógrado, as vesículas COPI medeiam o transporte entre a face *cis* do aparelho de Golgi e o retículo endoplasmático, reciclando receptores e proteínas residentes no retículo. Adaptado de Matheson *et al.*, 2006.

Vários modelos têm surgido numa tentativa de explicar o carácter dinâmico do transporte entre o RE e o aparelho de Golgi. O modelo designado de «vacuum cleaner» (Figura 1.3 A), defende que as cisternas do Golgi se deslocam sobre a superfície do RE recolhendo as vesículas a exportar. Este modelo implica que o RE possua uma grande capacidade de exportar moléculas, em toda a sua extensão, não existindo locais especializados nessa função. Em oposição a este modelo foi proposto o modelo «stop-and-go» (Figura 1.3 B) que defende que existem locais bem específicos no RE para a exportação de vesículas para as cisternas do aparelho de Golgi. Este modelo apresenta limitações, principalmente porque transmite uma imagem estacionária do RE. Um terceiro modelo, designado de «mobile export sites» (Figura 1.3 C) defende que os locais de exportação de vesículas sejam restritos a locais específicos mas apresentam uma elevada mobilidade quer pelo movimento da superfície do RE, quer pelo movimento ao longo da própria membrana reticular (Neumann *et al.*, 2003).

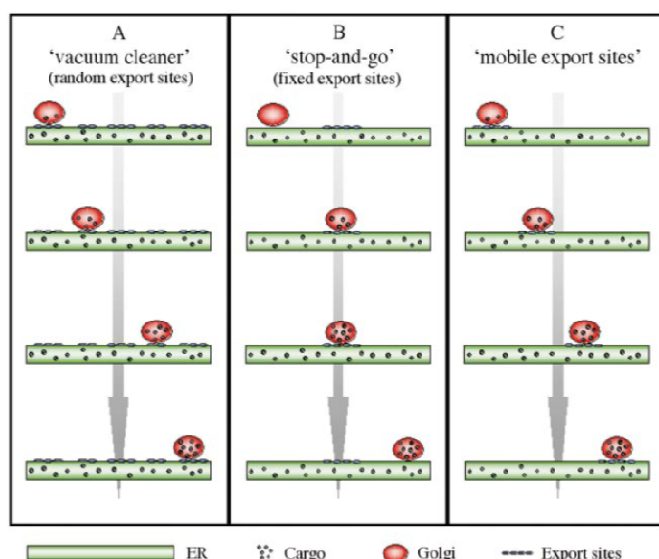


Figura 1.3 Esquema representativo de 3 modelos para o transporte de vesículas do RE para o aparelho de Golgi. A) modelo «vacuum cleaner»; B) modelo «stop and go»; C) modelo «mobile export sites». Retirado de Neumann *et al.*, 2003.

1.1.3 Aparelho de Golgi: direccionando proteínas

Do retículo endoplasmático as proteínas seguem geralmente para o aparelho de Golgi que se encarrega de as distribuir para os seus destinos finais. O aparelho de Golgi é constituído por várias unidades distribuídas pelo citoplasma celular, cada uma composta por um conjunto de cisternas em constante troca dinâmica de material. Ao contrário do que se verifica nos animais, o

aparelho de Golgi apresenta uma mobilidade muito grande nas plantas. Para além de desempenhar funções a nível da glicosilação proteica e síntese de polissacarídeos complexos, o aparelho de Golgi desempenha um papel fundamental na via secretora, como principal mediador do endereçamento para a membrana citoplasmática e para os compartimentos vacuolares. O uso de marcadores fluorescentes permitiu a visualização *in vivo* das cisternas do aparelho de Golgi, revelando uma íntima dinâmica com o RE e evidenciando o carácter móvel de todo o sistema endomembranar (Boevink *et al.*, 1998; Nebenfur *et al.*, 1999).

As proteínas entram no aparelho de Golgi pela face *cis* Golgi, deslocando-se ao longo das cisternas em direcção à rede *trans* Golgi onde a maioria abandona o organelo em direcção à membrana citoplasmática ou ao sistema vacuolar (Hanton *et al.*, 2007)

1.1.4 Vias de transporte para o vacúolo

Tradicionalmente o vacúolo tem sido caracterizado como um organelo polimórfico, apresentando-se em grande número nas células em proliferação ou um só, de grandes dimensões, em células diferenciadas. No entanto, dados recentes sugerem a existência de mais do que um tipo de vacúolo, com funções distintas, em células diferenciadas (Frigerio *et al.*, 2008). Para além da regulação osmótica, o vacúolo desempenha também funções de armazenamento e inactivação de compostos tóxicos, armazenamento de proteínas e outros metabolitos secundários e participa em fenómenos de morte celular programada (Vitale e Hinz, 2005). O refinamento das técnicas de microscopia electrónica e microscopia confocal, assim como a descoberta das aquaporinas – uma família de proteínas em que diferentes membros fazem parte do tonoplasto de diferentes tipos de vacúolos – permitiram a distinção de pelo menos dois tipos funcionais de vacúolos presentes em simultâneo em células vegetais: o vacúolo de armazenamento de proteínas – envolvido no armazenamento de proteínas – e o vacúolo lítico – envolvido na degradação proteica (Vitale e Galili, 2001). Após a descoberta da coexistência destes dois tipos de vacúolos, estudos revelaram que o transporte para cada um deles exhibe uma sensibilidade diferente na presença do inibidor wortmanina, indicando assim a possível existência de vias e mecanismos de endereçamento distintos (Vitale e Galili, 2001).

Os sinais de endereçamento e respectivas vias de endereçamento vacuolar não estão ainda completamente clarificados, representando, no entanto, o ramo da ciência mais avançado e

fascinante da biologia celular eucariota. Recentemente uma grande variedade de sinais de endereçamento vacuolares tem vindo a ser descrita parecendo suportar a existência de diferentes vias de transporte, dependendo do tipo de vacúolo alvo. A via para o vacúolo lítico parece ser dependente do aparelho de Golgi, sendo mediada pelo receptor BP80. Este receptor é uma proteína membrana residente no aparelho de Golgi que reconhece um sinal de endereçamento de sequência específica (ssVSD), tipicamente uma sequência NPIR ou semelhante na região amino-terminal da proteína a transportar (Bassham *et al.*, 2000; Vitale e Raikhel, 1999). Após o reconhecimento desse sinal, as proteínas são acumuladas em vesículas revestidas por clatrina (CCV) que abandonam o aparelho de Golgi em direcção a um compartimento pré-vacuolar (PVC), também designado de corpo multivesicular (MVB). Uma vez no PVC/MVB, os receptores libertam as proteínas transportadas, sendo reciclados para o aparelho de Golgi (Hanton *et al.*, 2007). Posteriormente o PVC/MVB funde-se com o vacúolo lítico (Figura 1.4).

Por sua vez, os mecanismos responsáveis pelas vias de endereçamento para o vacúolo de armazenamento proteico têm gerado elevada controvérsia. As proteínas destinadas a este compartimento abandonam o aparelho de Golgi tipicamente em vesículas densas (DV) e não em vesículas revestidas por clatrina. Foi sugerido o envolvimento de vários receptores, incluindo a família do receptor BP-80, tendo sido já descritos vários tipos de sinais desta via, ssVSD, ctVSD (sinal de endereçamento carboxi-terminal) e psVSD (sinal de endereçamento de estrutura terciária), sendo ctVSD os mais comuns para esta via (Vitale e Hinz, 2005). As DV fundem-se directamente com os vacúolos de armazenamento proteico. No entanto, dados recentes sugerem a existência de um compartimento semelhante ao PVC/MVB na via para este tipo de vacúolo (Hanton *et al.*, 2007). Os autores sugerem que o mesmo compartimento PVC/MVB possa estar envolvido no direccionamento de proteínas para ambos os tipos de vacúolos, faltando ainda evidências que esclareçam estes mecanismos (Figura 1.4).

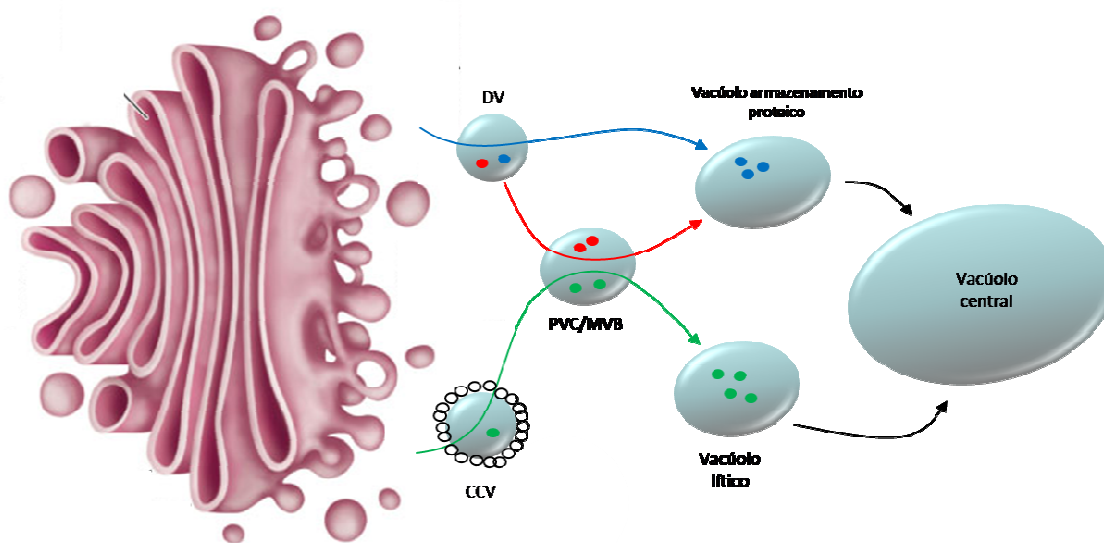


Figura 1.4 Modelo hipotético das diferentes vias de endereçamento vacuolar a partir do aparelho de Golgi. A azul está representada uma possível via de transporte para o vacúolo de armazenamento proteico através de vesículas densas (DV). A vermelho está representada uma via para o vacúolo de armazenamento proteico através de vesículas densas e mediada pelo compartimento PVC/MVB. A verde está representada uma possível via de transporte para o vacúolo lítico mediada por vesículas revestidas de clatrina (CCV) e pelo compartimento PVC/MVB.

Uma via alternativa de endereçamento para o vacúolo de armazenamento proteico foi descrita para proteínas da classe 2S e 11S em sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*), na qual estas proteínas formam agregados densos a nível do RE. Estes agregados são então incorporados em vesículas «precursor-accumulating» (PAC), muito maiores que as vesículas densas derivadas do aparelho de Golgi, sendo transportados directamente do RE para o vacúolo de armazenamento proteico. As vesículas PAC parecem ter a capacidade de receber material proveniente do aparelho de Golgi, sendo sugerido que esse material seja composto por proteínas que escapem à agregação a nível do RE, entrando no aparelho de Golgi, sendo mais tarde reintegradas em vesículas PAC (Vitale e Hinz, 2005) (figura 1.5).

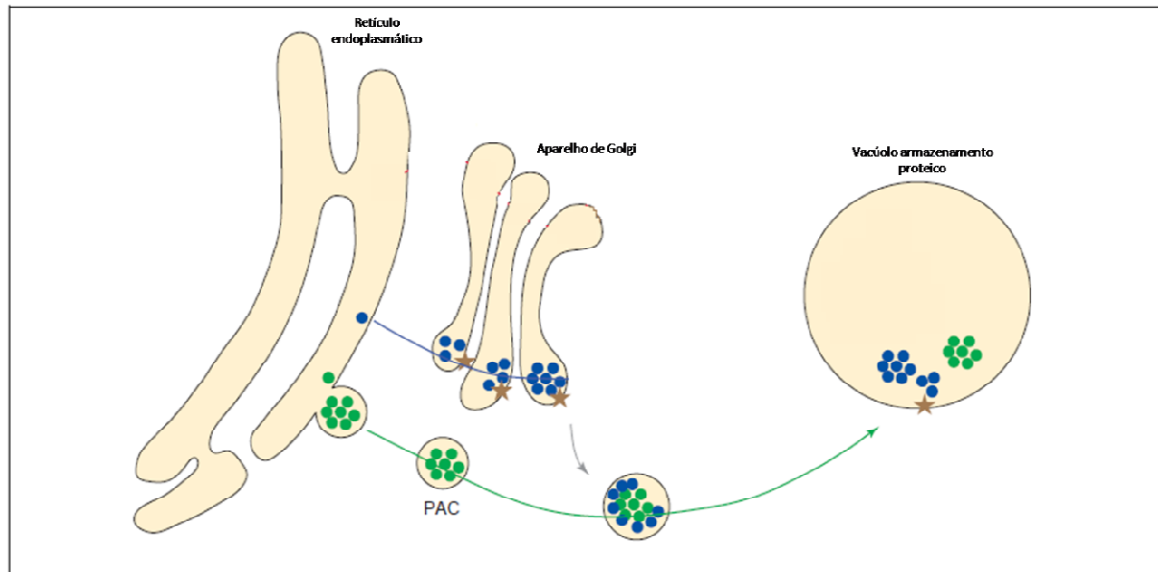


Figura 1.5 Esquema representativo da via de endereçamento para o vacúolo de armazenamento proteico a partir do retículo endoplasmático. Os agregados de proteínas formados a nível do retículo endoplasmático são transportados directamente para o vacúolo de armazenamento proteico em vesículas PAC, podendo também existir a incorporação de material proveniente do aparelho de Golgi. Adaptado de Vitale e Hinz, 2005.

1.2 Sistema enzimático: Proteinases

As enzimas apresentam-se como proteínas possuindo actividade catalítica e são fundamentais como moléculas reguladoras de reacções biológicas. A divisão em classes enzimáticas tem como critério base os diferentes tipos de reacções catalisadas, sendo reconhecidas 6 classes pelo CN-UIBBM (Comité de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular). As proteínas da classe responsável por reacções de hidrólise de ligações covalentes denominam-se de hidrolases. O nome atribuído a estas enzimas é, em geral, dado pelo “substrato” seguido do sufixo “ase”, sendo o tipo de substrato considerado o critério principal da divisão das diferentes subclasses. Como exemplo temos a subclasse das peptidases (EC 3.4) que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas. O termo proteinase surge como o conjunto de peptidases que hidrolisam ligações no interior das cadeias polipeptídicas (endopeptidases), podendo ser subdivididas em 5 diferentes grupos, classificados de acordo com a sequência de aminoácidos no local activo, a estrutura tridimensional e o mecanismo catalítico: proteinases serínicas, cisteínicas, aspárticas, treonínicas e metaloproteinases (Mutlu e Gal, 1999). Recentemente, um sexto grupo veio a ser identificado: ácido-glutamases (Fuginaga *et al.*, 2004).

1.2.1 **Proteinases Aspárticas**

As proteinases aspárticas (APs, EC 4.3.23) têm vindo a ser amplamente estudadas não só devido ao seu papel determinante em diversas funções fisiológicas de elevada importância mas também devido à sua ampla distribuição, tendo sido identificadas e caracterizadas em vertebrados, fungos, plantas, nemátodes e vírus (Simões e Faro, 2004). Em mamíferos, tem sido apontado o envolvimento de diversas APs em processos fisiológicos como a digestão de proteínas (pepsina A), regulação da pressão sanguínea (renina), desenvolvimento de cancros (catepsina D), degradação da hemoglobina por parasitas (plasmepsina) e maturação de proteínas do vírus HIV (Mutlu e Gal, 1999). O seu envolvimento em doenças gástricas, infecções parasitárias, hipertensão, cancro e SIDA tem conduzido a um incremento do interesse demonstrado pela comunidade científica face à importância revelada por este grupo de proteinases nestas doenças. Segundo a base de dados Merops (<http://merops.sanger.ac.uk>), as APs estão agrupadas em 15 diferentes famílias usando como critério base a sequência nucleotídica, que por sua vez são subdivididas em 7 clãs, de acordo com as suas relações filogenéticas e estrutura terciária (Simões e Faro, 2004).

1.2.2 Proteinases Aspárticas Vegetais

As proteinases aspárticas vegetais distribuem-se entre várias famílias de APs, sendo a família «pepsin-like» (A1) a mais representativa, englobando quase a sua totalidade. As APs encontram-se largamente distribuídas pelo reino vegetal, tendo sido identificadas e purificadas de várias plantas, incluindo gimnospérmicas (*Pinus*), monocotiledóneas (*Hordeum vulgare* – cevada, *Zea mays* – milho e *Oryza sativa* – arroz) e várias dicotiledóneas (*Arabidopsis*, *Brassica*, *Cynara cardunculus* – cardo, *Solanum tuberosum* – batateira, *Nicotiana tabacum* – tabaco, *Lycopersicon esculentum* – tomateiro) (Pissarra *et al.*, 2007). Na sua maioria estas proteinases estão envolvidas no processamento dos precursores de proteínas de reserva que se encontram em sementes. No entanto, existem registos de proteinases aspárticas purificadas de outros tecidos, nomeadamente folhas (batateira e tomateiro), grãos de pólen (milho) e flores (cardo) (Mutlu e Gal, 1999). Recentemente foi detectada uma AP da classe A1 em *Chlamydomonas reinhardtii*, demonstrando assim a presença deste grupo de proteínas nos ancestrais das plantas vasculares (Simões e Faro, 2004).

A nível celular as APs localizam-se principalmente nos vacúolos, nos corpos proteicos (em sementes) ou são secretadas para o espaço extracelular. Existem indicações que apontam para a localização de APs na parede celular de grãos de pólen no milho (Simões e Faro, 2004).

A grande maioria das APs é sintetizada sob a forma de precursores inactivos, denominados preproenzimas ou zimogénios (Figura 1.6). A sequência amino-terminal destes zimogénios contém um péptido sinal responsável pelo endereçamento para o retículo endoplasmático, seguido de um pro-segmento conservado com cerca de 40 aminoácidos. Com base na estrutura cristalográfica, e de modo análogo ao que se passa com algumas APs animais, foi sugerido que o pro-segmento possui capacidade de interacção com o local activo, sendo responsável pela inactivação das enzimas durante o seu transporte e secreção, evitando assim activação/degradação não desejada (Kervinen *et al.*, 1999). No entanto foi já demonstrado que, *in vitro*, as cardosinas A e B e duas APs de arroz apresentam actividade enquanto zimogénios, possivelmente devido à inexistência da sequência Lys/Tyr quer ao nível do pro-segmento, quer ao nível da extremidade amino-terminal da proteína madura (Ramalho-Santos *et al.*, 1998; Simões e Faro, 2004). Para além deste putativo papel, o pro-segmento está envolvido em mecanismos de enrolamento, estabilidade e direccionamento de vários zimogénios (Koelsch *et al.*, 1994). Para além do pre e do pro-segmento, a sequência das APs vegetais pode dividir-se em 3 regiões distintas: o domínio amino-terminal, o domínio carboxi-terminal e uma região de

aproximadamente 100 aminoácidos que os separa, denominada PSI (Plant Specific Insert) (ver secção 1.3.2).



Figura 1.6 Esquema representativo da estrutura dos zimogénios de várias proteinases aspárticas vegetais. Fitepsina: isolada de sementes de *Hordeum vulgare*; Cardosina A e Ciprosina: isoladas de flores de *Cynara cardunculus*; Sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático (Pre); Pro-segumento (Pro); Plant Specific Insert (PSI); Local de glicosilação (☞).

Ao grupo de proteinases aspárticas que apresenta este tipo de estrutura primária dá-se o nome de proteinases típicas. A recente sequenciação do genoma de *Arabidopsis thaliana* revelou a existência de mais de 50 potenciais genes de proteinases aspárticas, sendo notória a existência de um grupo denominado «nucelin-like», que inclui genes que codificam proteínas semelhantes à nucelina, e um terceiro grupo, o mais numeroso, que inclui genes que codificam proteinases com características intermédias entre o grupo das típicas e das «nucelin-like», denominado grupo atípico. Uma característica comum dos grupos atípicos e «nucelin-like» é a ausência da região PSI (Faro e Gal, 2005). A quase totalidade do estudo desenvolvido nas últimas décadas é referente à categoria das proteinases aspárticas típicas, sendo o conhecimento sobre as outras categorias muito reduzido. Este grupo partilha um elevado número de características, não só entre si, mas também com os seus homólogos de mamíferos e de outros microorganismos (Simões e Faro, 2004).

À semelhança de outros membros da família A1, as APs vegetais têm actividade máxima a pH ácido, são inibidas pela pepstatina (hexapeptídeo produzido por *Streptomyces sp.*) e apresentam dois resíduos conservados de aspartato no centro do local activo onde ancora o substrato, sendo estes responsáveis pela actividade catalítica da proteína. Embora na maioria das APs estes resíduos estejam contidos num motivo catalítico Asp-Thr-Gly (DTG), repetido no

domínio amino-terminal, nas APs vegetais um desses motivos é substituído por Asp-Ser-Gly (DSG) (Simões e Faro, 2004). Ainda não é evidente qual a importância evolucionária e biológica desta pequena variação.

As APs vegetais apresentam-se na forma activa como monómeros, como é o caso de uma proteinase de 28 kDa isolada de sementes de *Brassica napus*, ou heterodímeros. Foram já identificados diversos heterodímeros, por exemplo em sementes de cevada, em que duas isoformas da enzima, cada uma com duas subunidades diferentes, se agregam para originar a proteína activa (Mutlu e Gal, 1999). Apenas duas APs vegetais foram caracterizadas cristalograficamente: a forma madura da cardosina A – de *Cynara cardunculus* – e a forma precursora da fitepsina – de *Hordeum vulgare* – apresentando-se ambas como heterodímeros na sua forma madura (Simões e Faro, 2004) (Figura 1.7).

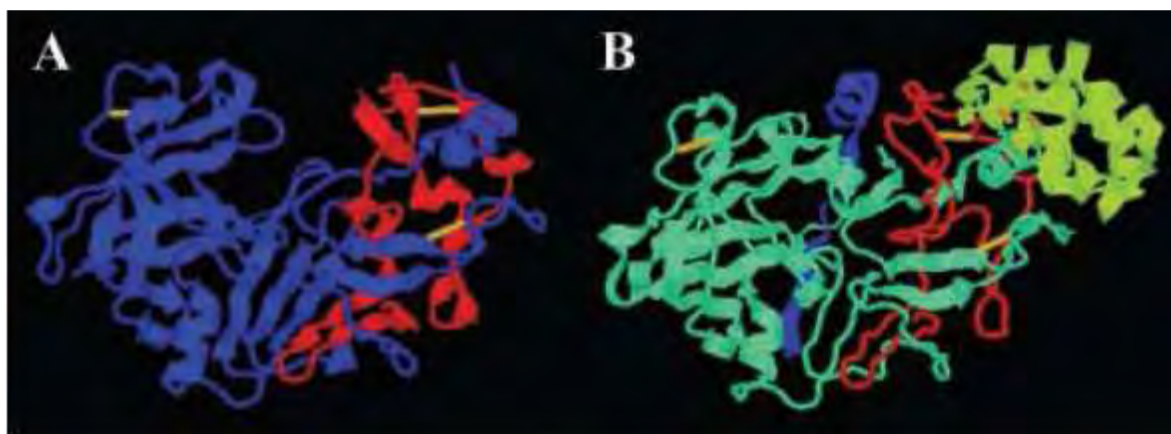


Figura 1.7 Representação da estrutura cristalográfica de duas proteinases aspárticas vegetais. A) cardosina A (PDB: 1B5F): a azul está representada a cadeia maior, a vermelho a cadeia menor e a amarelo as pontes dissulfido. B) profitepsina (PDB: 1QDM): o propéptido está representado a azul, a cadeia maior a ciano, a cadeia menor a vermelho, o PSI a verde e as pontes dissulfido a amarelo. Retirado de Simões e Faro, 2004

Em diversas APs monoméricas e heterodiméricas, a análise dos genes e seus zimogénios previstos revela uma elevada similaridade. A razão pela qual precursores semelhantes, de diferentes espécies vegetais, podem originar proteínas tão diversas ainda não está clarificada. A especificidade tecidular não parece ser a razão determinante e aceita-se que essa diferença provavelmente seja derivada da presença ou ausência de mecanismos enzimáticos de pós-tradução, que convertem a forma zimogénio na sua forma madura (Mutlu *et al.*, 1999).

1.3 *Cynara cardunculus*

A planta do cardo (*Cynara cardunculus*) é espontânea da costa sul mediterrânea, estando presente em Portugal continental, particularmente na zona centro e sul. Pertencente à família das Asteráceas, o cardo habita preferencialmente regiões em que as condições ecológicas de secura e altas temperaturas predominam, partilhando a sua ocupação em Portugal com pelo menos mais sete espécies do género *Cynara*. É uma planta perene, apresenta folhas espinhosas e porte arbustivo podendo atingir até 2 metros de altura. Caracteriza-se por possuir um ciclo de vida bianual, produzindo abundantes inflorescências de cor lilás no princípio do verão. É uma planta muito robusta e agressiva, podendo invadir e dominar habitats semi-naturais e degradados. Embora o seu papel ecológico não seja de descartar, o cardo notabiliza-se pelo seu elevado valor económico. Estudos recentes incentivam à sua utilização na produção de biomassa para fins energéticos e industriais (Projecto ECAS), no entanto o principal papel económico do cardo deriva de uma particularidade interessante dos seus extractos florais: a capacidade de coalhar o leite. Desde tempos remotos que o cardo tem vindo a ser utilizado na manufactura artesanal de vários queijos de pasta mole. Neste momento, em Portugal, existem pelo menos 6 tipos de queijo de Denominação de Origem Controlada (DOC) utilizando extractos florais de cardo: queijos de Azeitão, Beira Baixa, Évora, Nisa, Serpa e Serra da Estrela. A actividade coagulante que notabilizou a planta do cardo deve-se à presença de proteinases aspárticas nas suas flores sendo as mais comuns as ciprosinas e as cardosinas (Heimgartner *et al.*, 1990; Ramalho Santos *et al.*, 1997) (Figura 1.8).

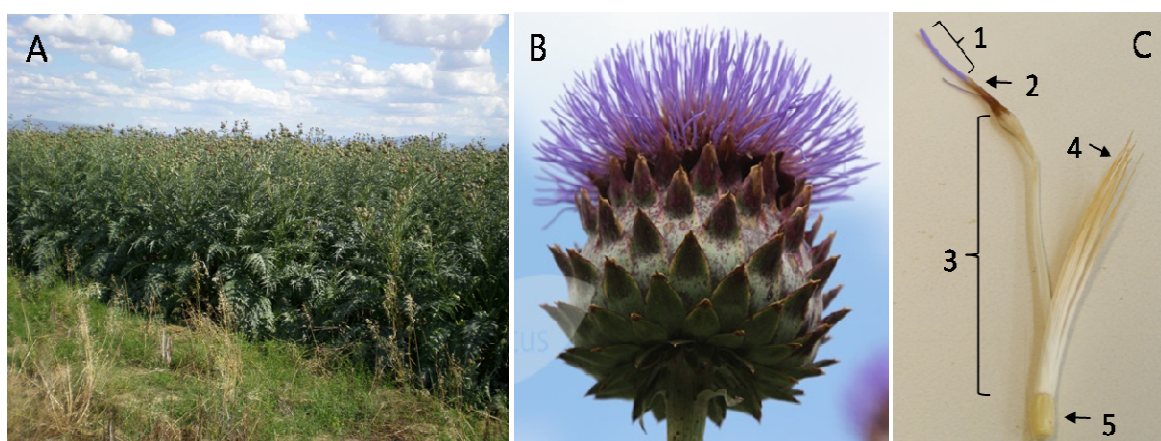


Figura 1.8 Representação da espécie *Cynara cardunculus* (cardo); A) cultura para fins energéticos (biomassa); B) inflorescência; C) detalhe da flor; 1) Estigma; 2) Estilete; 3) Tubo floral; 4) Papilho; 5) Ovário.

1.3.1 Cardosinas

Ao contrário das cipsosinas, as cardosinas têm vindo a ser profundamente estudadas quer a nível molecular quer a nível bioquímico. As cardosinas são um grupo de APs muito abundante nas flores de cardo, podendo constituir 70% do total de proteínas em algumas fases do desenvolvimento floral. A cardosina A e a cardosina B foram as duas primeiras cardosinas isoladas e caracterizadas a partir de flores de cardo (Veríssimo *et al.* 1996). Posteriormente foram identificados os genes de mais duas cardosinas, a C e a D, apresentando uma elevada similaridade com a cardosina A, sendo por isso designadas de *A-like* (Pimentel *et al.*, 2007). Recentemente foram identificadas mais quatro cardosinas *A-like* (Sarmiento *et al.*, 2009).

À semelhança do que acontece com a generalidade das APs, as cardosinas são sintetizadas como preproenzimas sendo posteriormente processadas por uma série de mecanismos específicos. Estes mecanismos consistem, na sua maioria, em sucessivas clivagens de regiões do precursor. Estas clivagens podem ser executadas pelo próprio precursor, inteiramente ou com o auxílio de uma outra proteinase, ou serem totalmente dependentes da acção de outras proteinases (Koelsch *et al.*, 1994). Ramalho Santos e colaboradores (1998) identificaram os principais passos de processamento do precursor da cardosina A, sendo registadas 3 clivagens sucessivas: a procardosina A sofre uma primeira clivagem entre a cadeia de 31kDa e o PSI. A segunda clivagem é responsável pela total remoção do PSI. O pro-segmento é a última região a ser clivada dando por encerrado o processamento (Figura 1.9).



Figura 1.9 Esquema representativo do processamento da cardosina A; Sinal de endereçamento reticular (PRE); Prosegmento (PRO); Plant Specific Insert (PSI); Local de clivagem (↓).

No entanto, outros tipos de processamento têm sido sugeridos para outras proteinases, nomeadamente para a fitepsina, em que o pro-segmento é removido antes do PSI, sendo este último removido parcialmente (Glathe *et al.*, 1998). Embora o mecanismo de processamento para a cardosina B não esteja completamente elucidado, pensa-se que seja semelhante ao da cardosina A (Vieira *et al.*, 2001).

Apesar de apresentarem uma elevada similaridade, as cardosinas A e B são o produto de genes diferentes, apresentando diferenças significativas a nível de localização tecidual e celular. Localizada sobretudo em estigmas florais, a cardosina A encontra-se nas papilas estigmáticas enquanto a cardosina B se encontra nas células do tecido de transmissão (Ramalho Santos *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 2001; Duarte *et al.*, 2006; Soares da Costa, 2009). É ainda pouco claro qual o papel que cada uma destas proteinases desempenha, no entanto o seu perfil de expressão temporal e espacial, a capacidade de processamento e/ou degradação de substratos putativos *in vitro* e a expressão específica em determinados tecidos e condições, leva a uma associação cada vez maior com funções de processamento de proteínas, morte celular associadas com a senescência, resposta a stress, morte celular programada e reprodução sexuada (Ramalho-Santos *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2001; Figueiredo *et al.*, 2006; Pissarra *et al.*, 2007). A presença de um motivo Arg-Gly-Asp (RGD), apresentando funções de reconhecimento e adesão celular em proteínas de mamíferos, assim como a localização da cardosina A ao nível da papila estigmática, sugere que esta possa desempenhar um papel preponderante na interacção pólen-pistilo (Faro *et al.*, 1999). A presença da cardosina B especificamente a nível do tecido de transmissão parece sugerir um envolvimento na laxação das paredes destes tecidos, facilitando o crescimento e progressão do tubo polínico. Foi também sugerido o seu envolvimento no desenvolvimento do pistilo, na interacção pólen-pistilo e na defesa contra agentes patogénicos (Vieira *et al.*, 2001; Duarte *et al.*, 2006; Soares da Costa, 2009). Mais recentemente a cardosina B tem sido envolvida em fenómenos de morte celular programada nas camadas de células do nucelo e do tapete, contribuindo para um fornecimento de nutrientes para o saco embrionário e grãos de pólen em desenvolvimento (Figueiredo *et al.*, 2006; Soares da Costa, 2009). Para além do potencial envolvimento na reprodução sexuada, as cardosinas foram também implicadas em fenómenos de germinação em sementes de cardo, tendo sido sugerido um envolvimento da cardosina A na degradação de proteínas de reserva, na mobilização de solutos e na permeabilização de membranas (Pereira *et al.*, 2008). Por seu lado, foi sugerido um envolvimento da cardosina B nas primeiras fases de mobilização de reservas após quebra de dormência (Oliveira, 2009). A nível bioquímico as cardosinas A e B apresentam algumas diferenças: embora presente em menores

quantidades, a cardosina B parece apresentar uma maior actividade, sendo a sua especificidade menor do que a cardosina A (Veríssimo *et al.*, 1996). É sugerido portanto que a cardosina A desempenhe funções bastante mais específicas e reguladas nas células em questão, enquanto a cardosina B se apresenta como uma AP com função mais generalista.

A nível intracelular, as cardosinas apresentam mais uma vez características distintas e muito interessantes. Apesar da elevada similaridade entre a cardosina A e a cardosina B, a sua localização intracelular é variável. Em sementes de cardo as cardosinas A e B foram detectadas em corpos proteicos, no entanto a cardosina A foi também detectada na parede celular (Pereira *et al.*, 2008; Oliveira, 2009). Ao nível das flores de cardo a sua localização intracelular é bastante interessante: a cardosina A encontra-se em vacúolos de armazenamento proteico enquanto a cardosina B é geralmente secretada para o espaço extracelular (Ramalho Santos *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 2001).

1.3.2 PSI (Plant Specific Insert)

Várias proteinases aspárticas vegetais foram já isoladas e caracterizadas, apresentando um elevado grau de semelhança estrutural e bioquímica com proteinases aspárticas animais e microbianas. No entanto, uma característica única de algumas APs vegetais é a presença de um segmento extra, com cerca de 100 aminoácidos, denominado de PSI. Embora este segmento esteja presente em diversas APs vegetais conhecidas existem excepções, nomeadamente a nucelina (Chen e Foolad, 1997), duas APs da planta carnívora *Nepenthes alata* (Athauda *et al.*, 2004), a CND41 da planta do tabaco (Kato *et al.*, 2004), assim como a CDR1 de *Arabidopsis thaliana* (Xia *et al.*, 2004). As APs vegetais apresentam uma elevada similaridade entre os seus domínios amino-terminal e carboxi-terminal mas a região PSI parece reflectir uma maior diversificação ao longo da evolução. Apesar disso, o PSI apresenta uma elevada homologia com uma família de proteínas de origem animal, a família das saposinas. Analisando a sua sequência verifica-se uma inversão dos domínios amino-terminal e carboxi-terminal quando comparada com as saposinas, razão pela qual se considera o PSI como sendo uma «swaposin» (Simões e Faro, 2004). Tal como os restantes membros da família SAPLIP's (saposin-like protein) o PSI apresenta seis resíduos de cisteína, vários resíduos hidrofóbicos e um local de glicosilação conservado (excepto na cardosina A). Tal como sugerido pela estrutura cristalográfica da profitepsina, o PSI parece apresentar uma estrutura semelhante à estrutura determinada para a NK-Lisina, uma

SAPLIP, conservando 3 pontes dissulfito e 5 hélices- α anfipáticas (Simões e Faro, 2004). Ramalho-Santos e colaboradores (1998) demonstraram que a região do PSI é totalmente removida durante o processamento da cardosina A, a pH ácido, sugerindo um auto-processamento. No mesmo estudo foram também determinadas as sequências dos locais de clivagem da região do PSI, sendo assim possível saber de forma precisa quais os aminoácidos que ladeiam a zona de corte (Figura 1.10).

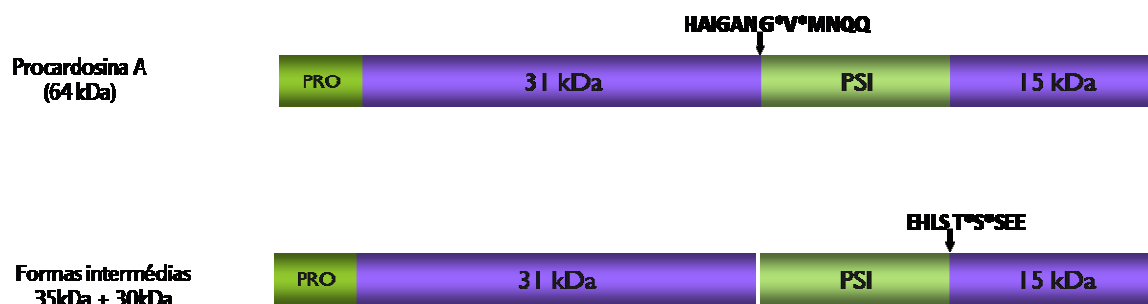


Figura 1.10 Esquema representativo da sequência aminoacídica e dos locais de clivagem do PSI na cardosina A; Sinal de endereçamento reticular (PRE); Prosegmento (PRO); Plant Specific Insert (PSI); Local de clivagem (\downarrow); Outros possíveis locais de clivagem identificados (*).

A razão pela qual ocorre a excisão da região PSI e qual o papel funcional desempenhado pela sua presença ou ausência é ainda especulativo.

1.3.3 PSI e as suas funções biológicas

A elevada similaridade da sequência PSI com as saposinas tem vindo a ser o motivo chave para muita especulação em redor da sua função. As saposinas são proteínas solúveis actuando como cofactores necessários ao funcionamento de glico-hidrolases de esfingolípidos. A sua capacidade de interacção com membranas e um possível envolvimento com o transporte intracelular de lípidos está bem documentada (Munford *et al.*, 1995). Foi também sugerido o envolvimento de uma saposina, a saposina C, no direccionamento da Catepsina D (uma AP animal) para o lisossoma (Zhu e Conner, 1994). No seguimento dessa evidência tem sido sugerido que o PSI possa desempenhar funções semelhantes de direccionamento das formas precursoras das APs vegetais em compartimentos membranares atribuindo-lhe a capacidade de funcionar como um sinal de endereçamento (Tormakangas *et al.*, 2001; Teurachi *et al.*, 2005). Um ponto interessante que apoia esse papel é o facto de este ser parcial ou completamente removido na

maior parte das APs descritas, sugerindo assim um papel passivo na actividade enzimática. Foi inclusive demonstrado que a fitepsina mantém actividade enzimática total após remoção desta região (Tormakangas *et al.*, 2001). À semelhança do descrito para a fitepsina (Kervinen *et al.*, 1999) a análise do hipotético modelo tridimensional da procardosina A e B (dados não publicados) permite verificar que o PSI forma uma subunidade independente, externa à superfície da proteína, ficando assim livre para uma possível função de reconhecimento e/ou adesão a membranas (Figura 1.11).

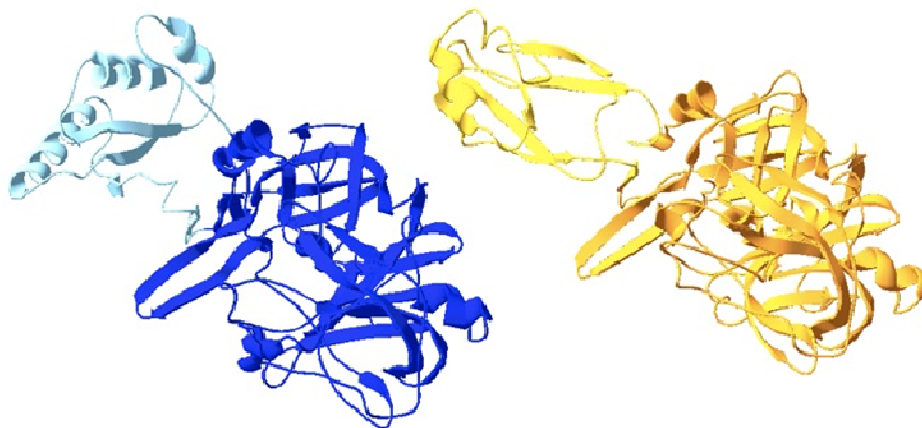


Figura 1.11 Modelo tridimensional hipotético das procardosinas A e B. Procardosina A (azul) com o PSI exposto (azul claro); Procardosina B (laranja) com o PSI exposto (laranja claro). Modelos realizados pelo software 3D-Jigsaw (dados não publicados).

Tormakangas e colaboradores (2001), em ensaios de expressão transitória em protoplastos de tabaco, demonstraram o papel fulcral do PSI no direccionamento vacuolar da fitepsina, uma vez que na sua ausência a enzima é secretada, confirmando o PSI como um possível sinal de endereçamento vacuolar neste sistema. O mesmo estudo revelou também que a deleção desta região altera a via de saída do RE, levantando a hipótese do PSI conter ou funcionar também como um sinal de exportação do retículo endoplasmático. Mais recentemente, outros estudos em APs de soja parecem indicar o PSI como um potencial sinal vacuolar (Terauchi *et al.*, 2005). Neste estudo, as proteinases AP1 e AP2, ambas direccionadas para o vacúolo, foram

sujeitas a uma remoção da região PSI. Embora o trajecto vacuolar da AP1 não tenha sido afectado, a proteína AP2 ficou retida no RE, sugerindo que o PSI, para esta proteína, possa funcionar como sinal de exportação do RE ou como sinal de endereçamento vacuolar. Este estudo veio ainda levantar a hipótese de que o PSI possa funcionar como sinal vacuolar dependendo do tipo de vacúolo alvo, uma vez que as duas APs se localizavam em tipos de vacúolos diferentes.

Para além da sua hipotética função de direccionamento intracelular, têm vindo a ser propostas outras funções para esta região. Egas e colaboradores (2000) demonstraram que para além da sua capacidade de interagir com membranas, o PSI da cardosina A funciona também como um potente indutor da libertação do conteúdo vesicular, promovendo a destabilização das membranas lipídicas. Os autores sugerem que os precursores das APs vegetais possam talvez estar envolvidos em mecanismos de defesa contra agentes patogénicos ou em fenómenos de morte celular, funcionando assim como moléculas bifuncionais. Estudos mais recentes apoiam a bifuncionalidade destas moléculas sugerindo um papel preponderante dos precursores de cardosinas na reorganização membranar durante a absorção de água e na disponibilização de solutos aquando da germinação de sementes de cardo, desempenhando assim um papel fundamental na fisiologia da germinação de sementes (Pissarra *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008). Através de estudos de imunolocalização, a forma precursora da cardosina A – contendo o PSI – foi recentemente detectado nos corpos proteicos de sementes de *Cynara cardunculus* (Pereira *et al.*, 2008). A presença da procardosina A em corpos derivados do RE, em contraste com a localização vacuolar da forma madura, pode ser explicada pela suposta capacidade do PSI em interagir com membranas a nível do RE (Tormakangas *et al.*, 2001). No mesmo estudo, a forma precursora da cardosina A, contendo o PSI, foi também detectada na parede celular, levantando a possibilidade do PSI intervir no transporte de precursores até à membrana plasmática. De facto, foi já sugerido o envolvimento do PSI no transporte da cardosina A até à membrana plasmática, através da interacção com membranas (Frazão *et al.*, 1999).

Para além da hipotética função de sinal de endereçamento e da interacção membranar, tem sido atribuído ao segmento PSI um papel importante na aquisição e estabilização da estrutura tridimensional de algumas proteínas (White *et al.*, 1999).

2 Objetivos

As cardosinas A e B são duas proteinases aspárticas (EC 3.4.23) encontradas nos pistilos de cardo (*Cynara cardunculus*, L.). Apesar da sua elevada similaridade são expressas em diferentes tecidos, seguindo padrões temporais próprios e apresentam uma acumulação intracelular bastante diferente: a cardosina A é transportada e acumulada no vacúolo, enquanto que a cardosina B é secretada. Este facto, aliado à presença de um segmento específico (PSI), típico de várias proteinases aspárticas vegetais, que possui alta identidade com um grupo de proteínas animais envolvidas no co-transporte lisossomal, revela características interessantes para o uso destas proteinases no estudo do transporte intracelular.

Estudos recentes parecem sugerir um envolvimento da região PSI no endereçamento vacuolar da cardosina A, quer pela sua acção como sinal de endereçamento, quer pela sua capacidade de interagir com membranas funcionando como um pré-requisito para o endereçamento vacuolar. No entanto, faltam ainda dados que suportem e clarifiquem a via seguida pela cardosina A para o vacúolo. Por outro lado a presença da região PSI na cardosina B não parece ser suficiente para evitar a sua secreção no sistema nativo. Assim, o que determina o endereçamento da primeira para o vacúolo e da segunda para a parede celular, é ainda uma questão por esclarecer.

O trabalho aqui apresentado teve como principal objectivo a construção e manipulação de mutantes a nível da região do PSI para ambas as cardosinas, numa tentativa de clarificar qual o papel que este domínio desempenha no endereçamento intracelular. Foram realizadas construções de cardosina A e de cardosina B com as regiões do PSI trocadas entre si (Cardosina A+PSIB e Cardosina B+PSIA), assim como construções destas cardosinas com mutações nos possíveis locais de clivagem do PSI (Cardosina A_{mut}PSI e Cardosina B_{mut}PSI). De forma a possibilitar uma avaliação da expressão, do trajecto e do padrão de acumulação destes mutantes *in vivo*, geraram-se proteínas de fusão com um marcador fluorescente, a proteína mCherry. As construções obtidas neste trabalho foram testadas por expressão transitória em folhas de *Nicotiana tabacum*, onde a sua expressão, processamento e acumulação intracelular foram testadas.

3 Material e Métodos

O trabalho proposto implicou a construção de vários mutantes de cardosina A e cardosina B a nível do PSI de modo a clarificar o seu papel na expressão, processamento e direccionamento destas proteínas no sistema heterólogo *Nicotiana tabacum*. Para tal, recorreu-se a técnicas de reacção da polimerase em cadeia (PCR) de forma a permitir uma amplificação selectiva de alguns fragmentos das cardosinas, a construção de proteínas de fusão, a introdução de mutações pontuais e a introdução de locais de restrição enzimática.

3.1 Modificação do cDNA das cardosinas A e B

Os cDNAs das cardosinas A e B, sobre as quais se efectuaram as modificações aqui detalhadas, encontravam-se previamente clonados em vectores plasmídicos, fruto de trabalhos anteriores executados neste laboratório. A cardosina A estava inserida no vector pSK (3000 pb) enquanto a cardosina B estava inserida no vector pCR 2.1 (4000 pb) (Figura 3.1).

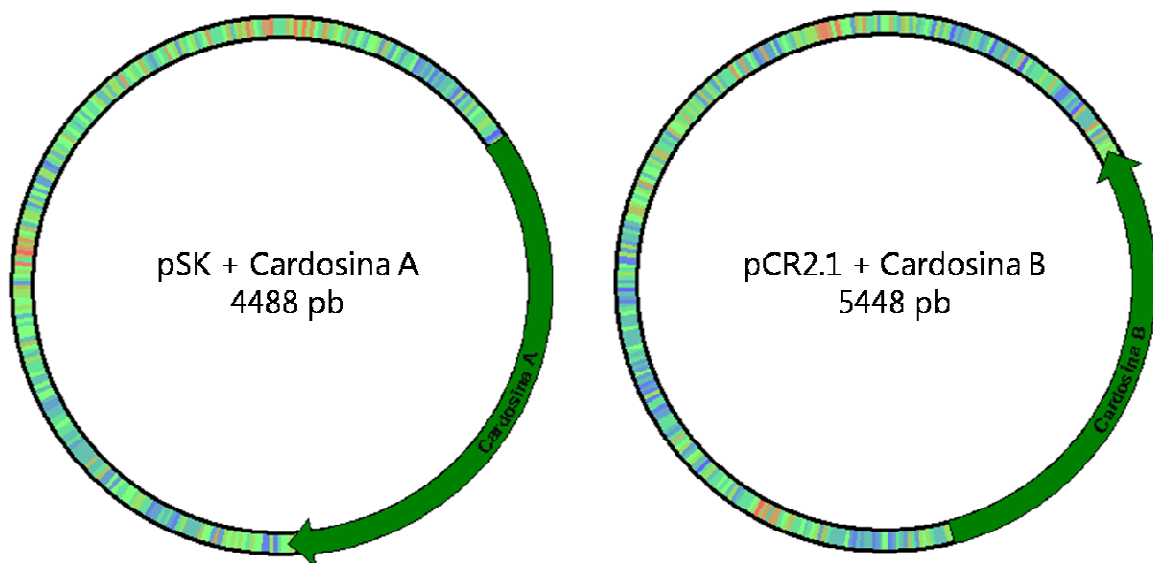


Figura 3.1 Esquema representativo das cardosinas A e B inseridas nos respectivos vectores plasmídicos.

3.1.1 Troca das regiões do PSI

Para a obtenção das construções de cardosina A e cardosina B com as respectivas regiões do PSI trocadas recorreu-se a técnicas de PCR. Para tal foi necessário o uso de oligonucleótidos específicos para as regiões a amplificar (Tabela 3.1 e 3.2). A estratégia adoptada consistiu na realização de dois PCR distintos para cada construção, um deles amplificando a sequência da cardosina inserida no vector e excluindo o PSI e outro amplificando somente a região do PSI.

Os oligonucleótidos usados foram produzidos pela empresa MWG Operon (Eurofins, Alemanha).

Tabela 3.1 Oligonucleótidos usados para obtenção dos fragmentos cardosina A Δ PSI e cardosina B Δ PSI.

	Oligonucleótido	Sequência nucleotídica (5' → 3')	Descrição
Cardosina A	A31_RevII	ACCCCGTTAGCGCCAATTGCAT	Oligonucleótido desenhado para emparelhar com o final da cadeia de 31 kDa
	A15_Fwd	ACTTCATCTGAAGAATTACAAG	Oligonucleótido desenhado para emparelhar com o início da cadeia de 15 kDa
Cardosina B	B31_RevII	AACCCCTTTGCACCAATTG	Oligonucleótido desenhado para emparelhar com o final da cadeia de 34 kDa
	B15_Fwd	TCGATAGTAGACTGCAATGG	Oligonucleótido desenhado para emparelhar com o início da cadeia de 14 kDa

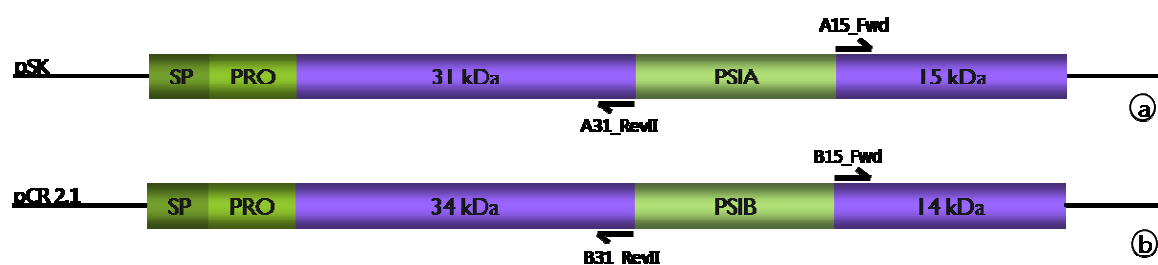


Figura 3.2 Esquema representativo do emparelhamento dos oligonucleótidos nos PCRs realizados para obtenção dos fragmentos cardosina A Δ PSI (a) e cardosina B Δ PSI (b).

Tabela 3.2 Oligonucleótidos usados para obtenção dos fragmentos PSIA e PSIB.

	Oligonucleótido	Sequência nucleotídica (5' → 3')	Descrição
Cardosina A	PSIA_Fwd	CATGAACCAGCAATGCAAGA	Oligonucleótido desenhado para emparelhar com o início da região do PSI
	PSIA_Rev	GGATAAGTGTTCACACAACCTC	Oligonucleótido desenhado para emparelhar com o final da região do PSI
Cardosina B	PSIB_Fwd	TTAAACCAACAATGCAAAACATTGG	Oligonucleótido desenhado para emparelhar com o início da região do PSI
	PSIB_Rev	TTCTGCACTTGAAGTGGGTA	Oligonucleótido desenhado para emparelhar com o final da região do PSI

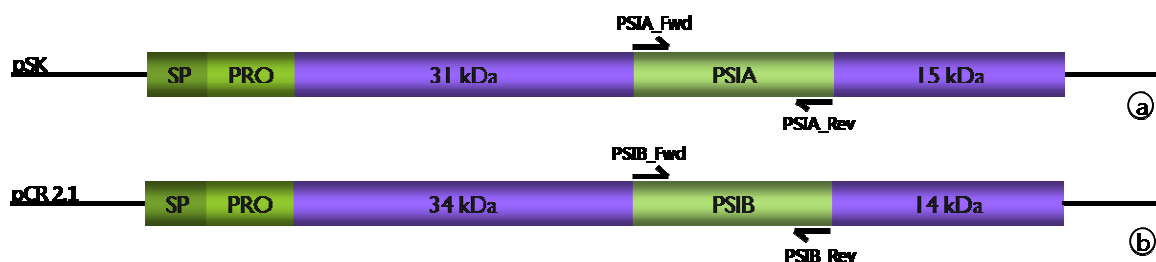


Figura 3.3 Esquema representativo do emparelhamento dos oligonucleótidos nos PCRs realizados para obtenção dos fragmentos PSIA (a) e PSIB (b).

- **Cardosina A + PSIB**

Para obter esta construção foi necessário remover a região do PSI na cardosina A e amplificar a região do PSI na cardosina B, conforme referido acima. Foram realizados dois PCRs distintos: um para amplificação da cardosina AΔPSI e todo o vector em que esta se insere (pSK) (figura 3.2 a) e outro para amplificação da região PSI da cardosina B (figura 3.3 b). Para isso foram usados os oligonucleótidos A31_RevII + A15_Fwd e PSIB_Fwd + PSIB_Rev respectivamente. Estes fragmentos foram posteriormente ligados em blunt para obter a construção de interesse.

- **Cardosina B + PSIA**

Tal como descrito para a construção cardosina A+PSIB, para a construção cardosina B+PSIA foram realizados dois PCRs distintos: um para amplificação da cardosina B Δ PSI e todo o vector em que está inserida (pCR2.1) (figura 3.2 b) e outro para amplificação da região do PSI da cardosina A (figura 3.3 a). Para isso foram usados os oligonucleótidos B31_Rev + B15_Fwd e PSIA_Fwd + PSIA_Rev respectivamente. Estes fragmentos foram posteriormente ligados em blunt para obter a construção de interesse.

- **Condições de reacção da polimerase em cadeia (PCR)**

Para a amplificação dos fragmentos cardosina Δ PSI e do PSI recorreu-se à técnica de PCR. Foi utilizada uma polimerase com actividade «Proofreading» – *Pfu* DNA polymerase (recombinante), Fermentas – para minimizar a incorporação de erros na sequência nucleotídica uma vez que, principalmente no caso de Cardosina A Δ PSI (4200 pb) e Cardosina B Δ PSI (5200 pb), o tamanho do produto a amplificar era substancial. As reacções foram executadas conforme descrito na tabela 3.3.

Tabela 3.3 Composição da reacção de PCR utilizada na amplificação dos fragmentos de cardosina.

Reagentes	Concentração final	Volume
DNA	20 ng	5 μ L
Tampão <i>Pfu</i> com MgSO ₄ (10x)	1x	2,5 μ L
Oligonucleótido 5' (20 μ M)	0,3 μ M	0,375 μ L
Oligonucleótido 3' (20 μ M)	0,3 μ M	0,375 μ L
dNTPs (2 mM)	0,2 mM	2,5 μ L
<i>Pfu</i> DNA polymerase	0,6 U	0,25 μ L
Água bidestilada e estéril	-	14 μ L
Total	-	25 μ L

As reacções de PCR decorreram num termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Realizou-se uma desnaturação inicial a 95°C durante dois minutos, sendo depois seguido o seguinte ciclo:

- Desnaturação a 95 °C durante 30 segundos
- Emparelhamento dos oligonucleótidos a 54 °C durante 30 segundos
- Extensão a 72 °C a tempo variável (2 minutos por cada 1000 pb)

Esta sequência foi repetida ao longo de 35 ciclos, terminando com uma extensão final a 72 °C, durante 7 minutos.

- **Ligação dos fragmentos Cardosina Δ PSI e PSI**

Os fragmentos cardosina Δ PSI e PSI amplificados por PCR não se apresentam fosforilados a 5' sendo deste modo impossível efectuar a ligação necessária para a obtenção das construções. Após recuperação do DNA do gel de agarose procedeu-se à fosforilação das extremidades 5' dos fragmentos PSIA e PSIB. Para aumentar a eficácia da reacção, o DNA foi previamente aquecido a 70 °C durante 5 minutos (evitando a ocorrência de estruturas secundárias) tendo sido posteriormente arrefecido em gelo antes da adição da enzima. Seguiu-se a reacção de acordo com a tabela 3.4. Incubou-se o DNA a 37 °C durante 1 hora e inactivou-se a enzima T4 Polynucleotide Kinase (BIORON) a 70 °C durante 15 minutos.

Tabela 3.4 Composição da reacção de fosforilação dos fragmentos PSIA e PSIB.

Reagentes	Concentração final	Volume
DNA	1,5 μ g	20 μ L
Tampão 10x	1x	3 μ L
ATP 100mM	1 mM	0,3 μ L
Enzima T4 PNK	10 U	1 μ L
Água bidestilada e estéril	-	5,7 μ L
Total	-	30 μ L

De seguida, para a obtenção das construções cardosina A+PSIB e cardosina B+PSIA, efectuou-se a ligação entre os fragmentos que os constituem (Figuras 3.4 e 3.5).

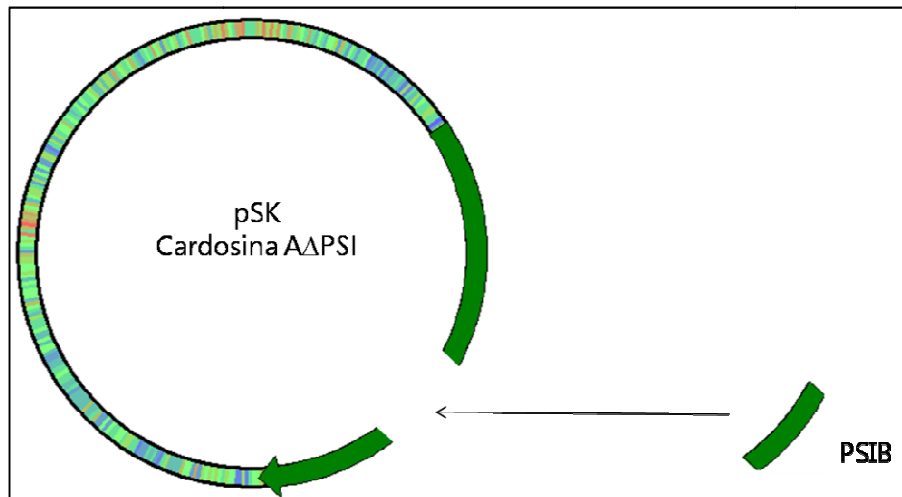


Figura 3.4 Esquema representativo da ligação entre os fragmentos cardosina A Δ PSI e PSIB.

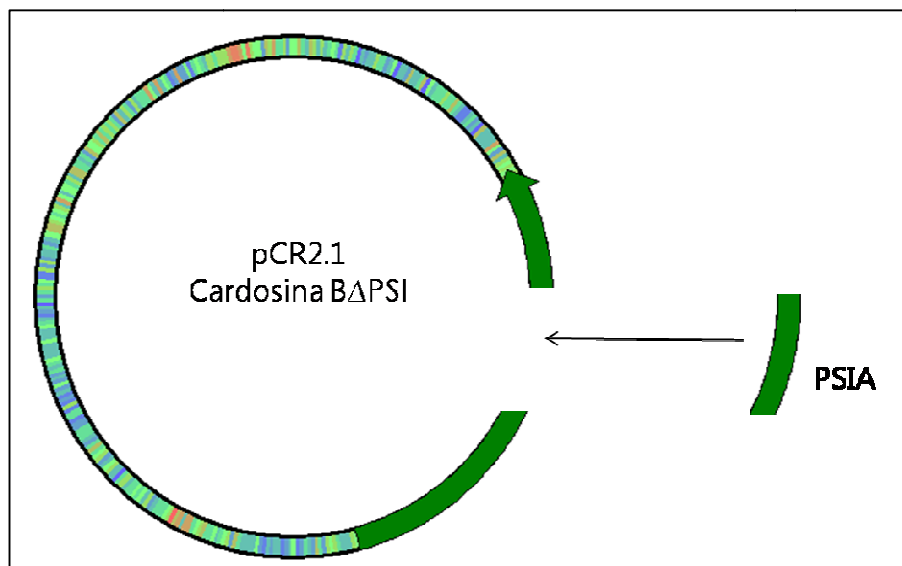


Figura 3.5 Esquema representativo da ligação entre os fragmentos cardosina B Δ PSI e PSIA.

Para a reacção de ligação dos fragmentos, recorreu-se à enzima T4 DNA ligase (Fermentas), sendo a reacção preparada de acordo com a tabela 3.5.

Tabela 3.5 Composição da reacção de ligação dos fragmentos cardosina Δ PSI e PSI

Reagentes	Concentração final	Volume
Vector	50 ng	2 μ L
Insert	100 ng	2,7 μ L
50% PEG 4000	5% (p/v)	2 μ L
Tampão 10x	1x	2 μ L
Enzima T4 DNA Ligase	1 U	1 μ L
Água bidestilada e estéril	-	10,3 μ L
Total	-	20 μ L

A reacção decorreu a 22 °C durante 1 hora sendo a enzima inactivada a 65 °C durante 10 minutos. A mistura de reacção foi posteriormente utilizada para transformação de células competentes de *Escherichia coli* (ver secção 3.2.1 e secção 3.2.2).

3.1.2 Mutagênese dos locais de corte da região PSI

Para obtenção das construções de cardosina com os locais de clivagem do PSI mutados recorreu-se à técnica de mutagênese dirigida. A utilização de oligonucleótidos iniciadores mutados permite a introdução de mutações pontuais na sequência nucleotídica a amplificar. Os oligonucleótidos foram desenhados com base nas sequências nucleotídicas das cardosinas e produzidos pela empresa MWG Operon (Eurofins, Alemanha) (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 Oligonucleótidos usados para obtenção das sequências de cardosina mutadas a nível dos locais de corte do PSI.

	Oligonucleótido	Sequência nucleotídica (5' → 3')	Descrição
Cardosina A	AmutPSI5'_Fwd	AATCATGCAATTGGCGCTCAGGGGATCATGCAGCA GCAATGCAAGA	Introdução de nucleótidos mutados (a vermelho) na região 5' do PSI.
	AmutPSI5'_Rev	TCTTGCATTGCTGCTGCATGATCCCCTGAGCGCCAT TGCATGATT	Introdução de nucleótidos mutados (a vermelho) na região 5' do PSI.
	AmutPSI3'_Fwd	GCCAACGAGTTGTGTGAACACTTAACCACTACATCT GAAGAATTACAAG	Introdução de nucleótidos mutados (a vermelho) na região 3' do PSI.
	AmutPSI3'_Rev	CTTGTAATTCTTCAGATGTAGTGGTTAAGTGTTCAC ACAACCTCGTTGGC	Introdução de nucleótidos mutados (a vermelho) na região 3' do PSI.
Cardosina B	BmutPSI5'_Fwd	CAAGCAATTGGTGCAAAAGGGATCTTACAGCAACA ATGCAAAACATTGGTTGG	Introdução de nucleótidos mutados (a vermelho) na região 5' do PSI.
	BmutPSI5'_Rev	CCAACCAATGTTTTGCATTGTTGCTGTAAGATCCCTT TTGCACCAATTGCTTG	Introdução de nucleótidos mutados (a vermelho) na região 5' do PSI.
	BmutPSI3'_Fwd	CAGTTACCCACTTCAAGTGCAGACACGATGGTAGA CTGCAATGGTATTTC	Introdução de nucleótidos mutados (a vermelho) na região 3' do PSI.
	BmutPSI3'_Rev	GGAAATACCATTGCAGTCTACCATCGTGTCTGCACT TGAAGTGGGTAAGT	Introdução de nucleótidos mutados (a vermelho) na região 3' do PSI.

- **Cardosina AmutPSI**

A construção deste mutante teve como objectivo a introdução de mutações a nível dos locais de clivagem do PSI quer a 5' quer a 3'. Para tal foi necessário introduzir mutações que alterassem um ou vários aminoácidos em questão. Realizaram-se então dois PCRs distintos: Para a mutagénese a 5' do PSI foram usados os oligonucleótidos AmutPSI5'_Fwd + AmutPSI5'_Rev. Findo este PCR, e sobre o seu produto purificado e correctamente sequenciado, foi realizado um segundo PCR dirigido a 3' do PSI tendo sido utilizados os oligonucleótidos AmutPSI3'_Fwd + AmutPSI3'_Rev.

- **Cardosina BmutPSI**

A estratégia adoptada para esta construção foi a mesma descrita para a cardosina AmutPSI embora os aminoácidos mutados sejam diferentes (ver tabela 3.6). Realizaram-se então dois PCRs distintos: Para a mutagénese a 5' do PSI foram usados os oligonucleótidos BmutPSI5'_Fwd + BmutPSI5'_Rev. Findo este PCR e sobre o seu produto purificado e devidamente sequenciado, foi realizado um segundo PCR dirigido a 3' do PSI tendo sido utilizados os oligonucleótidos BmutPSI3'_Fwd + BmutPSI3'_Rev.

- **Condições da reacção de PCR da mutagénese dirigida**

As construções foram obtidas através da realização de um PCR curto. Foi utilizada uma polimerase com actividade «Proofreading» – *Pfu* DNA polymerase (recombinante) Fermentas – para minimizar a incorporação de erros na sequência nucleotídica. As reacções foram executadas conforme descrito na tabela 3.7.

Tabela 3.7 Composição da reacção de PCR utilizada na técnica de mutagénese dirigida.

Reagentes	Concentração final	Volume
DNA	500 ng	5 µL
Tampão <i>Pfu</i> com MgSO ₄ (10x)	1x	2,5 µL
Oligonucleótido 5' (20 µM)	0,4 µM	0,375 µL
Oligonucleótido 3' (20 µM)	0,4 µM	0,375 µL
dNTPs (2 mM)	0,3 mM	2,5 µL
<i>Pfu</i> DNA polymerase	2,5 U	0,25 µL
Água bidestilada e estéril	-	14 µL
Total	-	25 µL

As reacções de PCR decorreram num termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). Realizou-se uma desnaturação inicial a 95 °C durante dois minutos, sendo depois seguido o seguinte ciclo:

- Desnaturação a 95 °C durante 30 segundos
- Emparelhamento dos oligonucleótidos a 54 °C durante 30 segundos
- Extensão a 72 °C durante 9 minutos

Esta sequência foi repetida ao longo de 18 ciclos, terminando com uma extensão final a 72 °C durante 7 minutos. O produto deste PCR foi posteriormente digerido com *DpnI* e usado para transformação de células competentes de *Escherichia coli*.

3.2 Estirpes bacterianas

Usaram-se duas estirpes bacterianas para a execução do trabalho. A estirpe DH5α de *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma das estirpes mais usadas em laboratório pois, entre outras vantagens, permite facilmente uma boa mini preparação de DNA plasmídico já que o gene *endA*, que codifica uma endonuclease intracelular responsável pela degradação de DNA plasmídico, se encontra inactivo nesta estirpe. A estirpe GV3101:pMP90 de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) é muito usada como veículo para introdução de DNA em sistemas heterólogos vegetais. O meio de cultura utilizado para cultivar ambas as estirpes foi o meio de Luria Bertani (LB) [10 g de Bactotripton, 5 g de extracto de levedura, 10g de NaCl, para 1 litro de cultura], com adição de micro-agar 1,5% (p/v) para cultura em meio sólido.

3.2.1 Preparação de células competentes – *E. coli* DH5 α

Inoculou-se uma colónia isolada de células DH5 α em 25 mL de meio LB e incubou-se a cultura a 37 °C com agitação orbital a 180 rpm durante cerca de 16 horas. Transferiu-se a cultura para 225 mL de meio LB suplementado com MgCl₂ 1 M e MgSO₄ 1 M e cultivou-se a mesma em estufa a 37 °C com agitação, até atingir um valor de absorvância DO₆₀₀=0,6. Transferiu-se a cultura para gelo durante 10 minutos e centrifugou-se 5 minutos a 3000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf). Ressuspenderam-se as células em 100 mL de tampão RF1 [RbCl 100 mM, CaCl₂ 30 mM, glicerol 15 % (v/v); pH =5,8 com MnCl₂ 500 mM e KAc 30 mM] e incubaram-se em gelo durante 15 minutos. Após nova centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos, ressuspenderam-se as células em 16 mL de tampão RF2 [RbCl 1 mM, CaCl₂ 223 mM, MOPS 10 mM e glicerol 15% (v/v); pH=8] e fizeram-se alíquotas de 100 μ L, conservadas a -80°C até posterior utilização.

3.2.2 Transformação de células competentes de *E. coli*

Para a transformação de células de *E. coli* recorreu-se ao choque térmico. Após 30 minutos de incubação em gelo, sujeitou-se a mistura de células competentes e o DNA a clonar a um choque térmico, tendo-se transferido a mistura para 42 °C durante 90 segundos e novamente para o gelo. De seguida incubou-se a mistura em 300 μ L de meio LB, a 37 °C com agitação orbital a 180 rpm durante 30 minutos permitindo assim a recuperação das células. Após centrifugação a 3000 rpm durante 2 minutos (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf), removeu-se cerca de 300 μ L de sobrenadante e ressuspendeu-se as células no restante volume. Por fim, plaquearam-se cerca de 100 μ L de células em meio LB-Agar suplementado com o 100 μ g/mL de ampicilina.

3.2.3 Preparação de células electrocompetentes de *A. tumefaciens*

Inoculou-se uma colónia isolada de *A. tumefaciens* em 10 mL de meio LB e incubou-se a cultura a 28 °C com agitação orbital a 180 rpm até saturação da cultura. Transferiu-se a cultura para 200 mL de meio LB e cultivou-se a mesma em estufa até atingir uma absorvância DO₆₀₀= 0,6. Transferiu-se a cultura para gelo durante 30 minutos e centrifugou-se durante 10 minutos a 4500 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf). Ressuspendeu-se em 100 mL de tampão HEPES 1mM previamente arrefecido em gelo. As células foram novamente centrifugadas e ressuspendidas nos mesmos moldes que anteriormente. Fez-se uma nova centrifugação e ressuspenderam-se as células em 20 mL de tampão HEPES 1mM suplementado com glicerol 10%

(v/v). Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas e divididas em alíquotas de 50 µL, conservadas a -80 °C até posterior utilização.

3.2.4 Transformação de células electrocompetentes de *A. tumefaciens*

Após clonagem no vector de expressão pVKH18-En6 (ver secção 3.5) as construções de cardosina foram inseridas em *A. tumefaciens* por electroporação (When-Jun e Forde, 1989). Adicionaram-se 10 µL de DNA purificado a 50 µL de células electrocompetentes e transferiu-se a mistura para uma cuvete de electroporação previamente arrefecida em gelo. A electroporação decorreu a 25 µF, 2,5 kV e 200 Ω num electroporador Gene Pulser Electroporation System (BioRad). Imediatamente após a electroporação adicionou-se 1mL de meio LB na cuvete. Permitiu-se a recuperação das células a 28 °C, sem agitação, durante 4 horas. Para finalizar plaquearam-se as células em meio LB-Agar suplementado com canamicina a 50 µg/mL.

3.3 Manipulação e análise de DNA mutado

3.3.1 Eliminação do DNA molde

Para minimizar a probabilidade de contaminações com DNA molde não modificado, após cada PCR procedeu-se a uma restrição enzimática com *DpnI* (Fermentas) a 37 °C durante 1 hora. A inactivação da enzima decorreu a 65 °C, durante 15 minutos. A *DpnI* só exhibe actividade enzimática sobre DNA com metilação tipo Dam (N6-methyladenine), típico de DNA proveniente de expressão em *E. coli*. Como o DNA proveniente da reacção de PCR não exhibe este padrão de metilação é possível eliminar deste modo todo o DNA molde que poderia contaminar a amostra, especialmente no caso da mutagénese dirigida em que, para além da quantidade de DNA molde ser superior, são apenas efectuados 18 ciclos originando uma concentração de DNA mutado muito baixa.

3.3.2 Electroforese em gel de agarose

Todos os produtos resultantes de PCR ou das reacções de rastreio foram sujeitos a uma electroforese em gel de agarose [Agarose 0,8% (p/v) em tampão TAE 1x (Trizma base 40 mM, ácido acético glacial 10% (v/v) e EDTA 10 mM)] contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio (EtBr). A

electroforese decorreu numa unidade comercial em tampão TAE 0,25x a uma voltagem de 200 V e amperagem não limitante. Como marcador de pesos moleculares foi utilizado o «GeneRuler DNA Ladder Mix» (Fermentas). Para visualização das bandas de DNA foi usado um transiluminador (Vilber Lourmat) com emissão a 302-365 nm e as imagens captadas digitalmente (Kodak EDAS 290, Kodak). Para o processamento de imagem recorreu-se ao software Kodak 1D, versão 3.4.5 (Kodak).

3.3.3 Recuperação de DNA de gel de agarose

Em casos em que foi necessária a recuperação do DNA do gel de agarose com o objectivo de conservar a sua integridade, este foi rapidamente removido dos géis de agarose recorrendo a um kit comercial «GenElute Extraction Kit» (SIGMA) segundo as instruções do fabricante.

3.3.4 Minipreparação de DNA plasmídico

Para fins de rastreio de colónias com o DNA de interesse foi necessário proceder ao isolamento do DNA plasmídico de células de *E. coli* e de *A. tumefaciens*. Transferiu-se para um tubo estéril 1,5 mL de cultura obtida por inoculação de uma única colónia em meio LB + antibiótico. Após 30 segundos de centrifugação a 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf) ressuspendeu-se o sedimento em 200 µL de tampão STET [Sacarose 8% (p/v), Triton X-100 0,1 % (v/v), EDTA 50 mM, e Tris-HCl 50 mM, pH=8] e adicionados 5 µL de lisozima (50 mg/mL). Após 5 minutos de incubação ferveram-se as amostras durante 45 segundos inactivando assim as enzimas (DNases e lisozima). Efectuou-se de seguida uma centrifugação durante 5 minutos a 14000 rpm. Removeu-se o sedimento com um palito estéril e precipitaram-se os ácidos nucleicos através da adição de 200 µL de isopropanol. De seguida misturou-se e centrifugaram-se as amostras durante 10 minutos a 14000 rpm. Eliminou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µL de etanol 70% (v/v), sem misturar, para lavagem do DNA. Após eliminação do etanol, secou-se o sedimento à temperatura ambiente e ressuspendeu-se em 20 µL de água estéril com adição de RNases.

Para fins de sequenciação e utilização nos processos de subclonagem, a extracção de DNA foi realizada recorrendo a um kit comercial «GenElute Plasmid Miniprep Kit» (SIGMA), segundo as instruções do fabricante.

3.3.5 Rastreio por «colony PCR»

O rastreio dos clones Cardosina A+PSIB e Cardosina B+PSIA foi efectuado recorrendo à técnica de «colony PCR». Esta técnica permitiu confirmar a incorporação do fragmento PSI e a sua posição na sequência da proteína. Como DNA molde foram usadas as células de *E. coli* transformadas com as respectivas construções, picadas directamente da placa de Petri para um tubo de PCR com 10 µL de água estéril, com o auxílio de um palito estéril. Após 1 minuto de incubação retirou-se o palito e os restantes componentes foram adicionados. A reacção de PCR decorreu segundo os parâmetros descritos em 3.1.1, usando uma temperatura de emparelhamento de 52 °C durante 30 segundos e 1 minuto de extensão. A composição da reacção e os oligonucleótidos utilizados estão descritos na tabela 3.8 e 3.9, respectivamente. O resultado foi analisado em gel de agarose.

Tabela 3.8 Composição da reacção de «colony PCR» para rastreio de clones de cardosina A+PSIB e cardosina B+PSIA.

Reagentes	Concentração final	Volume
DNA	-	-
Tampão <i>Pfu</i> com MgSO ₄ (10x)	1x	2,5 µL
Oligonucleótido 5' (20 µM)	0,3 µM	0,375 µL
Oligonucleótido 3' (20 µM)	0,3 µM	0,375 µL
dNTPs (2 mM)	0,2 mM	2,5 µL
Taq DNA polymerase	0,6 U	0,25 µL
Água bidestilada e estéril	-	10 + 6,95 µL

Tabela 3.9 Oligonucleótidos utilizados na reacção de «colony PCR».

	Oligonucleótido	Sequência nucleotídica (5' → 3')	Descrição
Cardosina A	PSIB_Fwd	TTAAACCAACAATGCAAAACATTGG	Oligonucleótido desenhado para emparelhar com o início da região PSI da cardosina B
	R1515	TCAAGCTGCTTCTGCAAATCC	Oligonucleótido desenhado para emparelhar com o final da cadeia menor da cardosina A
Cardosina B	PSIA_Fwd	CATGAACCAGCAATGCAAGA	Oligonucleótido desenhado para emparelhar com o início da região PSI da cardosina A
	R1521	TCAAAGCTGCTTCTGCAAATCCC	Oligonucleótido desenhado para emparelhar com o final da cadeia menor da cardosina B

3.3.6 Rastreio por restrição enzimática

Os rastreios após clonagem foram realizados utilizando enzimas de restrição cuja sequência de reconhecimento foi previamente introduzida pelos oligonucleótidos. As restrições duplas decorreram conforme as instruções do fabricante que diferem consoante as enzimas a utilizar (<http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html>, FERMENTAS).

3.4 Sequenciação

As construções de cardosina obtidas foram enviadas para sequenciação após rastreio positivo, como meio de confirmação da sequência nucleotídica. O DNA foi enviado para a empresa MWG Operon (Eurofins, Alemanha), segundo as instruções do fornecedor.

3.5 Clonagens

Uma vez confirmadas por restrição e sequenciação, as construções cardosina A+PSIB, cardosina B+PSIA, cardosina AmutPSI e cardosina BmutPSI foram sujeitas a clonagem no vector pCR Blunt e posteriormente subclonadas no vector de expressão pVKH18-En6 (Batoko *et al.*, 2000).

3.5.1 Introdução de adaptadores de enzimas de restrição

Para a realização das subclonagens o primeiro passo foi a introdução de locais de reconhecimento para enzimas de restrição. Este passo mostra-se fundamental para a subsequente subclonagem no vector pVKH18-En6. A técnica utilizada para a introdução de adaptadores de enzimas foi novamente o PCR. Foram usados oligonucleótidos específicos para o início e para o final da sequência de cardosina, contendo adaptadores para enzimas de restrição (Tabela 3.10).

Tabela 3.10 Oligonucleótidos usados na reacção de PCR para introdução de locais reconhecimento de enzimas de restrição.

	Oligonucleótido	Sequência nucleotídica (5' → 3')	Descrição
Cardosina A	A_Fwd_XbaI	TCTAGAGCCGCCACCATGGGTACCT	Introdução de um local de restrição para a enzima <i>XbaI</i> antes do nucleótido iniciador
	A_Rev_SacI	CTGAGCTCTCAAGCTGCTTCTGCAAATC	Introdução de um local de restrição para a enzima <i>SacI</i> após o codão stop.
	A_Rev_SalI	GTCGACGCTGCTTCTGCAAATCCAAC	Remoção do codão stop e introdução de um local de restrição para a enzima <i>SalI</i> .
Cardosina B	B_Fwd_XbaI	CATCTAGACTCGAGCCACCATGGGAACCCCAATCA AAGCAAACG	Introdução de um local de restrição para a enzima <i>XbaI</i> antes do nucleótido iniciador
	B_Rev_SacI	CTGAGCTCTCAAAGCTGCTTCTGCAAATCC	Introdução de um local de restrição para a enzima <i>SacI</i> após o codão stop.
	B_Rev_SalI	GTCGACACTGCTTCTGCAAATCCCAC	Remoção do codão stop e introdução de um local de restrição para a enzima <i>SalI</i> .

O PCR decorreu como descrito em 3.1.1 usando uma temperatura de emparelhamento de 54 °C durante 30 segundos e um tempo de extensão de 3 minutos. O resultado foi analisado em gel de agarose e o DNA correspondente foi rapidamente recuperado do gel como descrito em 3.3.3.

3.5.2 Clonagem em vector pCR Blunt

Após introduzidos os adaptadores de enzimas de restrição por PCR obtivemos um DNA com extremidades rombas. Isto impossibilita a sua directa ligação ao vector de expressão pVKH18-En6. Deste modo todas as construções de cardosina foram clonadas no vector pCR-Blunt (Zero Blunt Cloning Kit, Invitrogen) segundo as instruções do fabricante. O rácio molar entre o insert e o vector foi de 10:1, tendo sido usada a seguinte fórmula para cálculo da quantidade de insert (ng):

$$ng\ insert = \frac{n^{\circ}\ bp\ insert \times ng\ vector}{n^{\circ}\ bp\ vector} \times 10$$

3.5.3 Subclonagem no vector de expressão pVKH18-En 6

Uma vez clonados em pCR-Blunt procedeu-se à excisão do DNA correspondente às construções de cardosina, usando as enzimas de restrição cuja sequência de reconhecimento foi introduzida pelos oligonucleótidos. Deste modo, obtemos um DNA com extremidades coesivas sendo possível a subclonagem no vector pVKH18-En6. As restrições duplas decorreram conforme as instruções do fabricante que diferem consoante as enzimas a utilizar (<http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html>, FERMENTAS).

A mistura de reacção foi analisada em gel de agarose, tendo sido recuperado o DNA das bandas correspondentes ao tamanho dos fragmentos excisados (1500 bp), conforme descrito no ponto 3.3.3.

As construções de cardosina excisadas do vector pCR Blunt foram clonadas em pVKH18-En6 previamente digerido com as enzimas de restrição cuja sequência de reconhecimento foi introduzida pelos oligonucleótidos (*XbaI-SacI* e *XbaI-BamHI*). A reacção de ligação ao vector decorreu à temperatura ambiente durante a noite, de acordo com a tabela 3.11.

Tabela 3.11 Composição da reacção de ligação das construções de cardosina ao vector pVKH18-En6.

Reagentes	Volume
Vector	1 µl
Insert	3 µl
Tampão 10x	2 µl
Enzima T4 DNA Ligase	1 U
Água bidestilada e estéril	Até 20 µL

3.5.4 Obtenção de proteínas fluorescentes

Para a obtenção de proteínas acopladas com a proteína fluorescente mCherry procedeu-se do modo descrito em 3.5.3 com a excepção de que o vector pVKH18-En6 possuía já o gene codificante da proteína mCherry e encontrava-se previamente digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *Sall*. Para clonagem usaram-se as construções às quais foi retirado o codão STOP de modo a que a clonagem ocorresse na mesma grelha de leitura da proteína fluorescente.

3.6 Análise da expressão proteica

Com o objectivo de analisar o processamento e direccionamento das construções de cardosina obtidas neste trabalho, recorreu-se ao sistema de expressão transitória em folhas de *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) (Batoko *et al.*, 2000).

3.6.1 **Cultura de *Nicotiana tabacum*SR1 cv. Petit Havana**

A germinação de sementes decorreu em placas de Petri revestidas a papel de filtro previamente humedecido em água bidestilada e desionizada, à temperatura de 21 °C. Após germinação, transferiram-se as plântulas para substrato adubado (Substrato Universal – Compo), em vasos individuais. O desenvolvimento das plântulas decorreu em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16h e temperatura de 21 °C.

3.6.2 **Infiltração de folhas de *N. tabacum***

As culturas de *A. tumefaciens* transformadas com as construções de cardosina cultivaram-se a 28 °C. Após saturação, transferiu-se 1 mL da cultura para um tubo de 1,5 mL e centrifugou-se a 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf) durante 1 minuto. Ressuspendeu-se o sedimento em 1 mL de tampão de infiltração (MgCl₂ 10 mM; MES 10 mM; pH=5,6) e centrifugou-se durante 1 minuto a 14000 rpm. Ressuspendeu-se novamente o sedimento em 1 mL de tampão de infiltração mas desta vez suplementado com acetosseringona 100 µM (para aumentar a virulência do *A. tumefaciens*). Procedeu-se a nova centrifugação a 14000 rpm e ressuspendeu-se novamente em 1 mL de tampão de infiltração suplementado com 100 µM de acetosseringona. De seguida efectuou-se uma diluição na razão de 1/5 da suspensão celular e leu-se a absorvância a 600 nm, utilizando como branco o tampão de infiltração suplementado com acetosseringona. A mistura de infiltração foi preparada de acordo com a equação:

$$(DO_{600} \text{ desejada} / DO_{600} \text{ diluição}) \times 1000 = \chi$$

Utilizou-se uma densidade óptica de 0,3 para todas as construções, sendo χ o volume necessário da diluição para preparar 1 mL de mistura de infiltração. Para infiltração recorreu-se a uma seringa de 1 mL, sem agulha, exercendo-se pressão controlada na epiderme abaxial de uma folha

de *N. tabacum* de forma a introduzir a suspensão celular pelos estomas. Após infiltradas, as plantas foram colocadas nas condições de cultura descritas em 3.6.1.

3.6.3 Extração de proteínas totais

De forma a analisar a expressão proteica e o estado de processamento das construções de cardosina, realizou-se a extração de proteínas totais de porções de folha de tabaco com aproximadamente 70 mg de peso fresco, aos 3 dias e 5 dias após infiltração. As porções de folha foram imediatamente armazenadas a -80 °C até posterior extração de proteínas. Para a extração das proteínas totais, adicionaram-se 2 volumes de tampão de extração de proteínas [Citrato de Sódio 50 mM, pH=5,5; SDS 5% (p/v); BSA 0,01 % (p/v); Cloreto de Sódio 50 mM; β -mercaptoetanol 2% (v/v) e 10 μ L de inibidor de proteases (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich) por cada 300 mg de tecido] e homogeneizaram-se as amostras com o auxílio de uma vareta de vidro e areia de quartzo. Após 10 minutos de fervura, centrifugaram-se as amostras a 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf), a 6 °C, durante 30 minutos. Recuperou-se o sobrenadante para um novo tubo. Para a quantificação de proteínas recorreu-se ao método de Bradford (Bradford, 1976).

3.6.4 Separação de proteínas: SDS-PAGE

Para análise das proteínas extraídas realizou-se uma electroforese vertical em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Após montagem do aparato de electroforese vertical (SE 260, Amersham Biosciences) preparou-se o gel separador [3,14 mL de água desionizada; 4,16 mL de poliacrilamida (30% Acrylamide, BioRad); 2,5 mL de tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8; 100 μ L SDS 10% (p/v); 100 μ L APS 10% (p/v) e 9 μ L TEMED]. Adicionaram-se 200 μ L de etanol absoluto sobre o gel para permitir a sua polimerização e nivelamento da superfície. Após polimerização eliminou-se o etanol e lavou-se a superfície do gel com água desionizada. Preparou-se o gel concentrador [2,1 mL de água desionizada; 495 μ L de poliacrilamida (30% Acrylamide, BioRad); 375 μ L de tampão Tris-HCl 0,5M pH 6.8; 1,5 μ L de vermelho fenol; 30 μ L de SDS 10% (p/v); 30 μ L APS 10% (p/v) e 9 μ L TEMED] que se colocou sobre o gel separador já polimerizado e introduziu-se o pente. Após polimerização retirou-se o pente e lavaram-se os poços com água desionizada. Prepararam-se as amostras com tampão de amostra [0,225 M Tris-HCl pH 8; 50% (v/v) Glicerol; 5% (p/v) SDS; 0,05% (p/v) Azul de bromofenol e 0,25 M DTT] na razão de 1:5, utilizando 15 μ g de proteína total em cada amostra. Após 5 minutos de incubação a

65 °C as amostras foram aplicadas no gel concentrador, no aparato vertical contendo tampão de corrida SDS-PAGE [Trizma base 165 mM, Glicina 128 mM e SDS 1% (p/v)] tendo a electroforese decorrido a 100V. Foram executados dois SDS-PAGE, um para as construções de cardosina A e outro para as construções de cardosina B.

3.6.5 Western blotting

Para detecção das construções de cardosina obtidas neste trabalho recorreu-se à técnica de «Western blotting». Esta técnica foi realizada sobre as proteínas separadas por SDS-PAGE, recorrendo a dois anticorpos policlonais de coelho que reconhecem a cadeia maior da cardosina A e da cardosina B, respectivamente (Pereira *et al.*, 2008). Os géis resultantes da electroforese descrita em 3.6.4 e duas membrana de nitrocelulose (BioTrace™ NT, Pall Corporation) foram incubados em tampão de transferência [Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20% (v/v)] durante 5 minutos. A unidade de transferência foi montada (Omnipage mini, Cleaver Scientific) conforme as instruções do fabricante, tendo o cuidado de não deixar bolhas de ar entre o gel e a membrana. A transferência decorreu durante 1 hora a 100V com agitação constante. Após transferência as membranas foram lavadas com TBS-T [Tris 50 mM; NaCl 200 mM; Tween 20 0,1% (v/v)] para eliminar vestígios de metanol. As membranas foram bloqueadas durante 30 minutos, à temperatura ambiente, com solução de bloqueio [Leite em pó magro 5% (p/v); BSA 1% (p/v); Tween 0,5% (v/v) em TBS-T]. O anticorpo primário foi diluído na solução de bloqueio, na razão de 1:1000 e as membranas incubadas na solução durante 1 hora à temperatura ambiente e com agitação constante. Após incubação com anticorpo primário as membranas foram lavadas com TBS-T. Como anticorpo secundário utilizou-se a «Alkaline phosphatase antirabbit» IgG (H+L). O anticorpo foi diluído em TBS-T na razão de 1:1000 e as membranas incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente e com agitação constante. Após lavagem com TBS-T e água desionizada as membranas foram incubadas numa solução de «Western blue stabilized substrate for Alkaline phosphatase» (Promega) até completa revelação das bandas. A reacção de revelação foi parada com solução STOP (EDTA 20 mM) e as membranas guardadas em ambiente seco e protegido da luz.

3.6.6 Microscopia de varrimento confocal a laser

Para avaliação da expressão e endereçamento intracelular, as construções de cardosina fundidas com a proteína fluorescente mCherry foram analisadas aos 3 e 5 dias após infiltração de folhas de *Nicotiana tabacum*, por microscopia de varrimento confocal a laser. Retiraram-se porções de folhas com aproximadamente 1 cm² e montaram-se as mesmas em água desionizada sobre lâminas de vidro. Foram obtidas imagens da epiderme abaxial, utilizando um microscópio confocal Leica SP2 Confocal Microscope, (Leica Microsystems). O comprimento de onda da radiação de excitação foi de 561 nm, sendo o comprimento de onda de emissão de 610 nm. Para análise e processamento das imagens obtidas utilizou-se o software «Leica Confocal Software, 2.61 Build 1538 – LCS Lite».

4 Resultados

4.1 Obtenção das construções cardosina A+PSIB e cardosina B+PSIA

4.1.1 Amplificação de fragmentos de cardosina

Para a obtenção das construções de Cardosina A+PSIB e Cardosina B+PSIA o primeiro passo foi a amplificação da cardosina A Δ PSI e cardosina B Δ PSI inseridas nos respectivos vectores, e a amplificação dos fragmentos PSIA e PSIB. Estes fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose para análise (Figura 4.1).

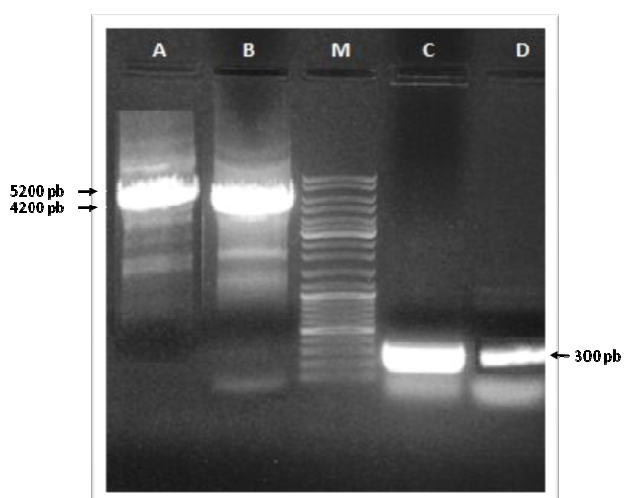


Figura 4.1 Electroforese de 50 μ L de produto de PCR correspondente aos fragmentos amplificados; A) Cardosina A Δ PSI inserida no vector pSK; B) Cardosina B Δ PSI inserida no vector pCR2.1; C) PSIA; D) PSIB; M) marcador de pesos moleculares (GeneRuler DNA Ladder Mix – Fermentas).

O tamanho das bandas observado para cada uma das construções foi o esperado. Para a cardosina A Δ PSI inserida no vector pSK (figura 4.1-A) observamos uma banda de aproximadamente 4200 pb que corresponde ao somatório do vector pSK (3000 pb) e da cardosina A Δ PSI (1200 pb). Para a cardosina B Δ PSI inserida no vector pCR2.1 (figura 4.1-B) observamos uma banda de aproximadamente de 5200 pb que corresponde ao somatório do vector pCR2.1 (4000 pb) e da cardosina B Δ PSI (1200 pb). No caso do PSIA (figura 4.1-C) e PSIB (figura 4.1-D) observamos uma banda de aproximadamente 300 pb que corresponde ao tamanho do fragmento PSI em ambas as cardosinas. Todos os fragmentos foram imediatamente extraídos do gel e guardados a -20 °C até posterior utilização.

4.1.2 Ligação dos fragmentos de DNA: cardosina Δ PSI e PSI

Uma vez que os fragmentos amplificados por PCR não se encontravam fosforilados, foi necessário proceder à sua fosforilação de modo a permitir uma posterior ligação nucleotídica entre estes. Os fragmentos PSI A e B foram os escolhidos para serem fosforilados. Optou-se por não fosforilar os fragmentos cardosina Δ PSI (contidos no vector respectivo) porque, uma vez fosforilados, haveria a possibilidade de re-ligação do vector, impossibilitando a introdução do fragmento PSI e aumentando o número de falsos positivos. Assim os fragmentos cardosina Δ PSI não fosforilados apresentam-se linearizados, estando aptos à introdução de um «insert». Esta técnica demonstrou ser bastante eficaz uma vez que se obtiveram inúmeras colónias de *E. coli* transformadas.

4.1.3 Rastreo de clones cardosina A+PSIB e cardosina B+PSIA

Como modo de despistagem de falsos positivos as colónias de *E. coli* foram rastreadas recorrendo à técnica de «colony PCR». Esta técnica permite confirmação não só da incorporação do fragmento PSI, como a sua orientação na sequência da proteína. Usando oligonucleótidos específicos a 5' do PSI e a 3' da cadeia menor da cardosina, o resultado esperado caso o PSI fosse correctamente inserido seria a amplificação de um fragmento de aproximadamente 650 pb (Figura 4.2). Caso houvesse contaminação pelo DNA original, o oligonucleótido a 5' não emparelharia, não sendo visível qualquer banda.

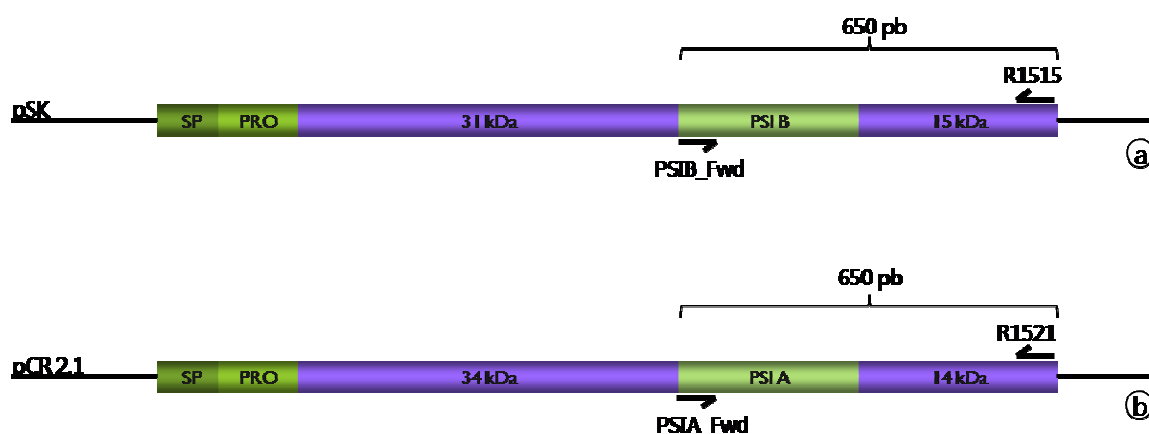


Figura 4.2 Esquema representativo do emparelhamento dos oligonucleótidos usados no PCR colony. a) Cardosina A +PSIB; b) Cardosina B +PSIA

Foram seleccionadas 7 colónias de cada construção para rastreio. Após o «colony PCR» o resultado foi analisado em gel de agarose (Figura 4.3).

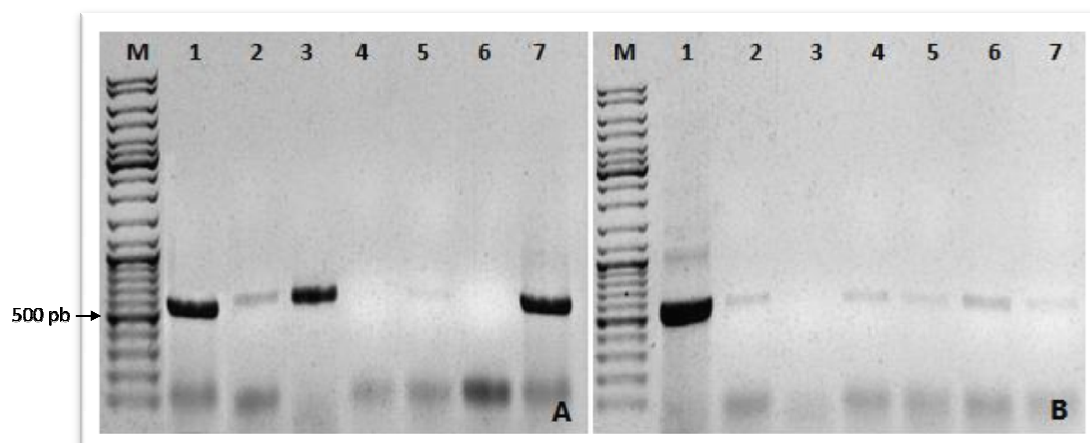


Figura 4.3 Electroforese de 25 μ L de produto do «colony PCR» correspondente aos sete clones rastreados de cada construção; A) Cardosina A+PSIB; B) Cardosina B+PSIA; M) marcador de pesos moleculares (GeneRuler DNA LadderMix – Fermentas).

O resultado foi o esperado, sendo visível em ambas as construções uma banda de aproximadamente 650 pb que corresponde à zona amplificada por «colony PCR». Para a construção cardosina A+PSIB (Figura 4.3-A) os clones rastreados 1,2,3,5 e 7 originaram uma banda de aproximadamente 650 pb correspondente ao PSIB+cadeia menor da cardosina A, sendo considerados como positivos. Para a cardosina B+PSIA (Figura 4.3-B) todos os clones rastreados, excepto o clone 3, apresentaram uma banda de 650 pb correspondente ao PSIA+cadeia menor da cardosina B, sendo também considerados como positivos. Foi seleccionado um clone positivo de cada uma das construções, tendo sido realizada uma minipreparação de DNA plasmídico e enviado para sequenciação para confirmação da sequência nucleotídica. Após ter sido realizado o alinhamento das sequências obtidas com as sequências originais de cardosinas A e B, foi seleccionado um clone de cada uma das construções (ver anexo 1 e 2).

4.2 Obtenção das construções de cardosina AmutPSI e cardosina BmutPSI

Para a obtenção das construções cardosina AmutPSI e cardosina BmutPSI recorreu-se à técnica de mutagénese dirigida. Esta técnica tem sido amplamente usada no estudo funcional de proteínas. A utilização de oligonucleótidos modificados promove a introdução de mutações pontuais, no cDNA codificante das proteínas, permitindo assim avaliar qual o impacto de

pequenas alterações. A introdução de mutações nos locais de clivagem do PSI teve como objectivo avaliar o impacto da não remoção desta sequência (que nas cardosinas é removido ao longo do seu processamento para aquisição da forma madura) no processamento e direccionamento das cardosinas.

Ramalho Santos e colaboradores (1998) identificaram os possíveis locais de clivagem da região do PSI para a cardosina A. Embora o mesmo tipo de estudo não tenha sido ainda efectuado para a cardosina B, admite-se que o tipo de processamento possa ser semelhante, devido principalmente à elevada similaridade das duas proteínas. A partir das sequências de cardosina procedeu-se ao estudo das regiões que ladeiam o PSI (Figura 4.4):

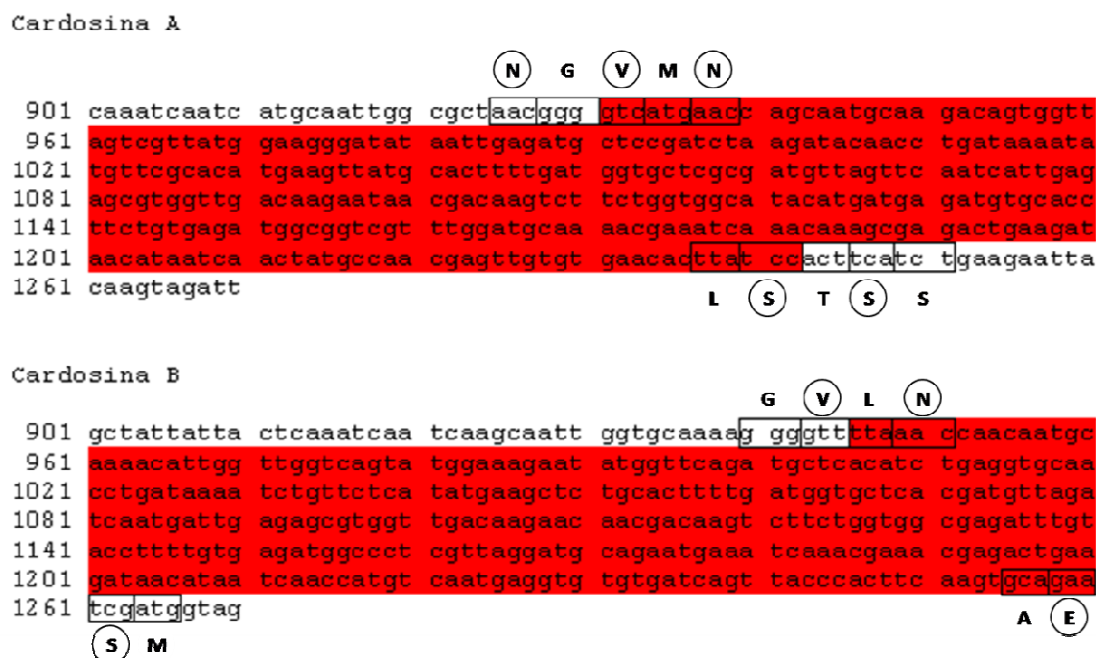


Figura 4.4 Representação do cDNA e respectivos aminoácidos das zonas que ladeiam os potenciais locais de clivagem do PSI (a vermelho) na cardosina A e na cardosina B; Os aminoácidos a mutar estão assinalados com uma circunferência. A- Alanina; E- Ácido Glutâmico; G- Glicina ; L- Leucina; M- Metionina; N- Asparagina; S- Serina; T- Treonina; V- Valina.

Foram desenhados oligonucleótidos mutados, específicos para as zonas de clivagem do PSI para que, com o menor número de alterações possíveis, os aminoácidos assinalados (figura 4.4) fossem substituídos. Houve o cuidado de efectuar a mutação para um outro aminoácido pertencente à mesma família, mantendo portanto as suas propriedades químicas. Deste modo a interacção com outros aminoácidos aquando da aquisição da estrutura tridimensional não fica comprometida.

O primeiro passo da mutagénese dirigida foi a introdução de mutações pontuais no local de clivagem a 5' do PSI. Para isso recorreu-se à técnica de PCR usando oligonucleótidos mutados amplificando o cDNA de cada cardosina assim como todo o vector em que esta estava inserida (Figura 4.5).

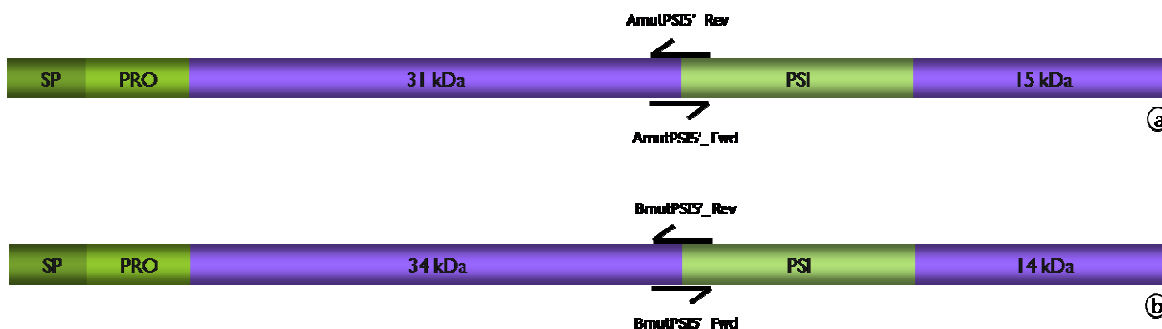


Figura 4.5 Esquema de emparelhamento dos oligonucleótidos mutados no local de clivagem a 5' do fragmento PSI. a) cardosina A; b) cardosina B.

Todo o volume do produto de PCR foi sujeito a uma restrição com *DpnI*, eliminando o DNA molde, sendo depois utilizado para transformação de células de *E. coli* competentes. Devido às alterações no cDNA serem pontuais e não causarem qualquer alteração no padrão de restrição enzimática, estas construções não puderam ser rastreadas usando enzimas de restrição. Após crescimento bacteriano dos transformantes foi seleccionado um clone aleatoriamente, realizada uma minipreparação de DNA plasmídico e o DNA foi enviado para sequenciação. Foi seleccionado um clone de cada uma das construções como correcto após ter sido realizado o alinhamento das sequências obtidas com as sequências originais de cardosinas A e B (ver anexo 3 e 4) e terem sido confirmadas as alterações pretendidas (Figura 4.6).

```

                ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
CardosinaA      CAAATCAATCATGCAATTGGCGCTAACGGGGTCATGAACCAGCAATGCAAGACAGTGGTT 960
cardosinaAmutPSI CAAATCAATCATGCAATTGGCGCTCAGGGGATCATGCAGCAGCAATGCAAGACAGTGGTT 960
                ***** * *** ***** * *****

                ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
CardosinaB      GCTATTATTACTCAAATCAATCAAGCAATTGGTGCAAAAAGGGGTTTTAAACCAACAATGC 960
CardosinaBmutPSI GCTATTATTACTCAAATCAATCAAGCAATTGGTGCAAAAAGGGATCTTACAGCAACAATGC 960
                ***** * *** * *****
    
```

Figura 4.6 Alinhamento das sequências de cardosina A e cardosina B mutadas a 5' da região do PSI com as sequências de cardosina originais; As setas indicam os nucleótidos mutados; Alinhamentos efectuados com o software ClustalW2.

Após confirmadas, por sequenciação, as alterações introduzidas a 5', procedeu-se à introdução de mutações pontuais nos locais de clivagem a 3' do PSI. Esta mutagénese dirigida utilizou como DNA molde o DNA extraído no passo anterior, ou seja, as cardosinas com o local 5' previamente mutado (Figura 4.7).



Figura 4.7 Esquema de emparelhamento dos oligonucleótidos mutados no local de clivagem a 3' do fragmento PSI. a) Cardosina A; b) Cardosina B. Local mutado a 5' assinalado com estrela.

O resultado do PCR foi igualmente sujeito a restrição por *DpnI* e o volume de reacção foi usado para transformar células de *E.coli* competentes. Foi seleccionado um clone, extraído o seu DNA e enviado para sequenciação. Após ter sido realizado o alinhamento das sequências obtidas com as sequências originais (ver anexo 3 e 4) e terem sido confirmadas as alterações pretendidas foi seleccionado um clone de cada uma das construções como correcto (Figura 4.8).

```

      ↓      ↓
CardosinaA      TTATCCACTTCATCTGAAGAATTACAAGTAGATTGCAACACTCTTTCTCCATGCCCAAT 1380
CardosinaAmutPSI TTAACCACTACATCTGAAGAATTACAAGTAGATTGCAACACTCTTTCTCCATGCCCAAT 1380
*** *****

cardosinaB      GATAACATAATCAACCATGTCAATGAGGTGTGTGATCAGTTACCCACTTCAAGTGCAGAA 1260
cardosinaBmutpsi GATAACATAATCAACCATGTCAATGAGGTGTGTGATCAGTTACCCACTTCAAGTGCAGAC 1260
*****

cardosinaB      TCGATGGTACTGCAATGGTATTTCTCCATGCCTAATATTGCCCTTCACAAATTGGTAGC 1320
cardosinaBmutpsi ACCATGGTACTGCAATGGTATTTCTCCATGCCTAATATTGCCCTTCACAAATTGGTAGC 1320
*****

```

Figura 4.8 Alinhamento das sequências de cardosina A e cardosina B mutadas a 3' da região do PSI com as sequências de cardosina originais; As setas indicam os nucleótidos mutados; Alinhamentos efectuados com o software ClustalW2.

Os resultados obtidos para a mutagénese foram os esperados, tendo sido introduzidas mutações pontuais nos nucleótidos pretendidos em ambas as extremidades do PSI.

4.3 Clonagens

Após correcta sequenciação e confirmadas as alterações no cDNA, as construções Cardosina A+PSIB, Cardosina B+PSIA, Cardosina AmutPSI e Cardosina BmutPSI foram sujeitas a uma série de modificações com o objectivo de facilitar a clonagem no vector de expressão plasmídico pVKH18-En6.

4.3.1 Introdução de locais de reconhecimento para enzimas de restrição

O primeiro passo para a clonagem em pVKH18-En6 foi a introdução de adaptadores para enzimas de restrição. Este passo é fundamental para a posterior ligação no vector de expressão, previamente cortado com as mesmas enzimas. A estratégia encontrada para a introdução dos adaptadores foi a realização de um PCR em que foram usados oligonucleótidos específicos para o início e para o final de cada uma das construções, aos quais se introduziu uma sequência de reconhecimento para as enzimas seleccionadas. A selecção das enzimas *XbaI*, *SacI*, *BamHI* e *Sall* reflectiu a pré-existência desses locais de restrição no vector de expressão (ver secção 4.3.2 e 4.3.3). A escolha da enzima *SacI* para a cardosina A e a *BamHI* para a cardosina B evita a ocorrência de locais de reconhecimento no interior da sequência de cada uma das construções (figura 4.9).

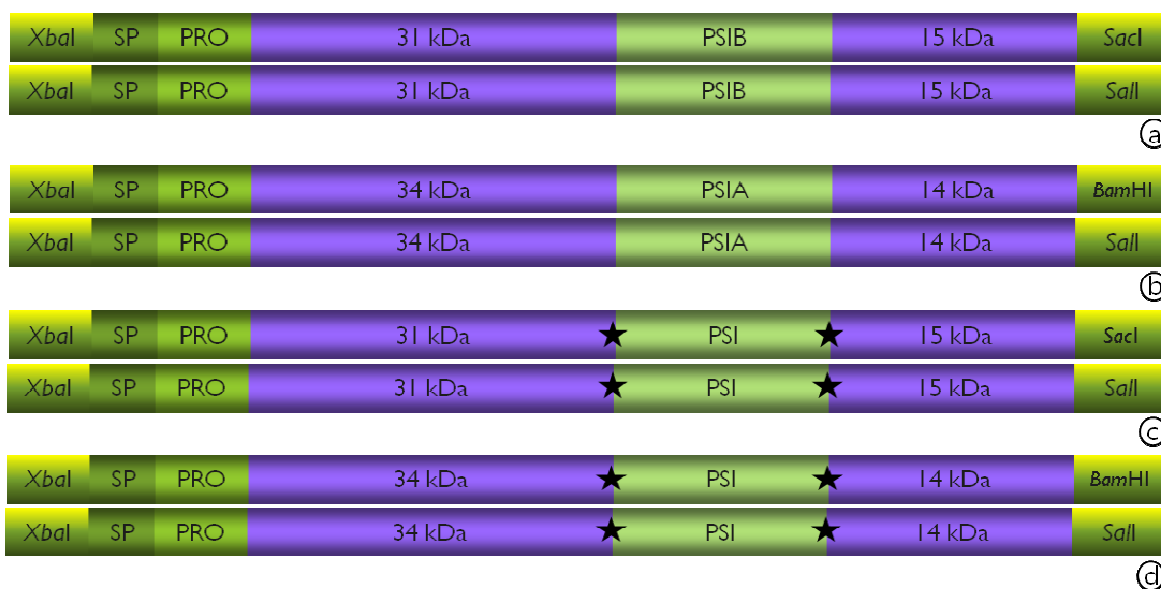


Figura 4.9 Esquema representativo das construções de cardosina com a introdução dos adaptadores para enzimas de restrição. a) Cardosina A+PSIB; b) Cardosina B+PSIA; c) Cardosina AmutPSI; d) Cardosina BmutPSI.

Analisou-se o resultado dos PCRs em gel de agarose, sendo de esperar, para cada uma das construções, uma única banda de aproximadamente 1500 pb correspondente ao tamanho de cada construção de cardosina com os respectivos adaptadores enzimáticos (Figura 4.10).

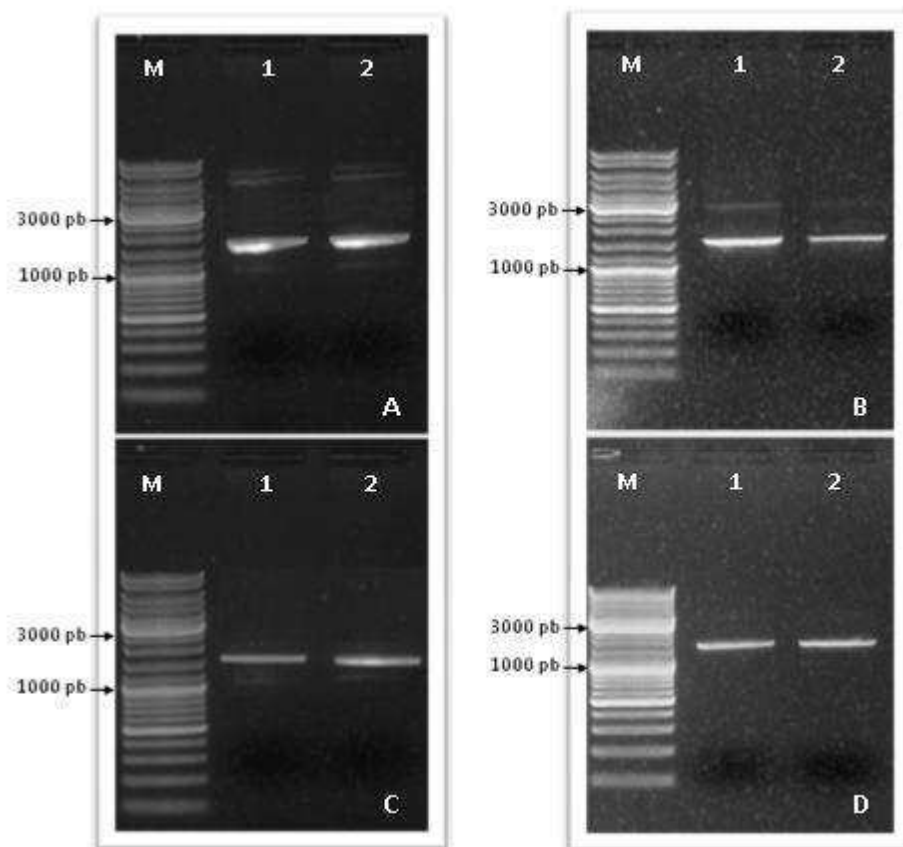


Figura 4.10 Electroforese de 25 μ l do produto de PCR para colocação dos adaptadores enzimáticos; A) Cardosina A+PSIB com adaptadores *XbaI* e *SacI* (1) e *XbaI* e *Sall* (2); B) Cardosina B+PSIA com adaptadores *XbaI* e *BamHI* (1) e *XbaI* e *Sall* (2); C) Cardosina AmutPSI com adaptadores *XbaI* e *SacI* (1) e *XbaI* e *Sall* (2); D) Cardosina BmutPSI com adaptadores *XbaI* e *BamHI* (1) e *XbaI* e *Sall* (2); M) marcador de pesos moleculares (GeneRuler DNA Ladder Mix – Fermentas).

O resultado foi o esperado, sendo bem visível uma banda de aproximadamente 1500 pb para cada uma das construções. As respectivas bandas foram imediatamente excisadas e o seu DNA recuperado para posterior clonagem. Devido ao facto do produto do PCR para introdução dos adaptadores enzimáticos ser um produto de extremidades rombas, a sua introdução directa no vector de expressão pVKH18-En6 não é exequível. Optou-se assim por uma estratégia diferente: os produtos de PCR foram clonados num vector plasmídico específico para extremidades rombas, o pCR-Blunt (Invitrogen Corporation) (Figura 4.11). Este vector oferece um meio rápido, fácil e de elevada eficácia (superior a 95%) na clonagem de produtos de PCR de extremidades rombas.

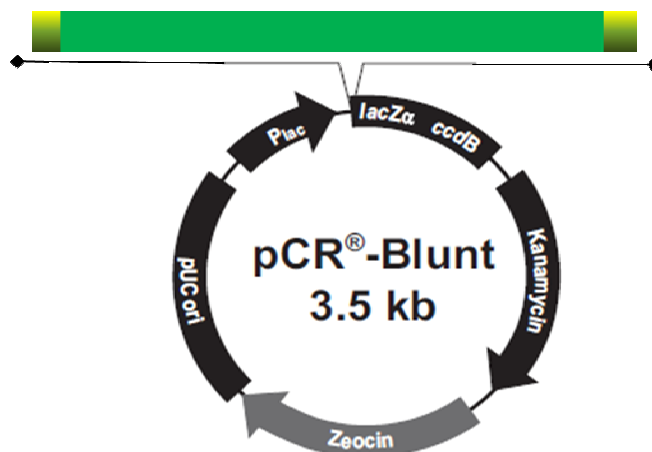


Figura 4.11 Esquema representativo da clonagem das construções de cardosina com extremidades rombas no vector pCR-Blunt; ■ - adaptadores de enzimas de restrição; ■ - construções de cardosina.

Após ligação entre o vector e os vários «inserts» as misturas de reacção foram utilizadas para transformar células de *E. coli* competentes. Dos clones obtidos, foram seleccionados dois de cada construção para rastreio por restrição enzimática, usando as enzimas de restrição cuja sequência de reconhecimento foi introduzida pelos oligonucleótidos. Seria de esperar, para cada uma das construções, uma banda de aproximadamente 3500 pb correspondente ao vector (pCR-Blunt) e uma outra de aproximadamente 1500 pb, correspondente à construção de cardosina inserida. O resultado da restrição foi analisado em gel de agarose (Figura 4.12)

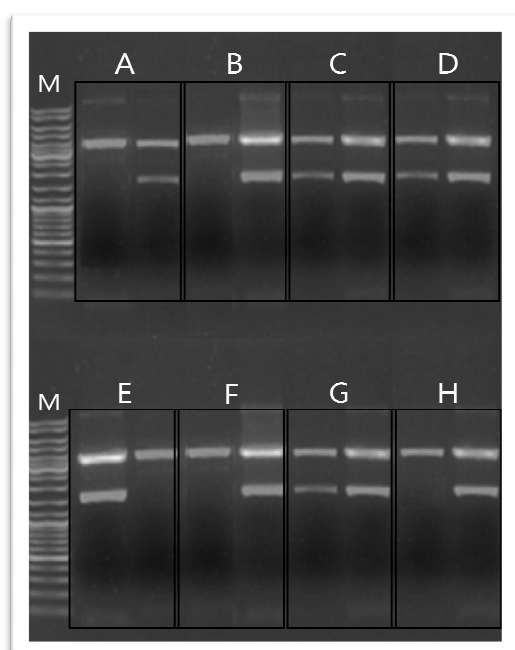


Figura 4.12 Electroforese do produto de rastreio de 2µL de DNA plasmídico de 2 clones de cada uma das construções inseridas em pCR-Blunt; A) Digestão de Cardosina A+PSIB com *XbaI* e *SacI*; B) Digestão de Cardosina A+PSIB com *XbaI* e *Sall*; C) Digestão de Cardosina B+PSIA com *XbaI* e *BamHI*; D) Digestão de Cardosina B+PSIA com *XbaI* e *Sall*; E) Digestão de Cardosina AmutPSI com *XbaI* e *SacI*; F) Digestão de Cardosina AmutPSI com *XbaI* e *Sall*; G) Digestão de Cardosina BmutPSI com *XbaI* e *BamHI*; H) Digestão de Cardosina BmutPSI com *XbaI* e *Sall*; M) Marcador de pesos moleculares “GeneRuler DNA Ladder Mix” – Fermentas.

Observou-se, para todas as construções, uma banda ligeiramente acima dos 3000bp correspondente ao vector pCR-Blunt (3500 pb) no qual se inseriam as construções. No entanto nem todos os clones testados apresentaram uma banda com aproximadamente 1500 pb, sendo estes considerados como negativos e imediatamente excluídos. Foi seleccionado um clone positivo de cada construção, extraído o respectivo DNA e enviado para sequenciação. Uma vez verificada a correcta sequência nucleotídica das construções procedeu-se à subclonagem no vector de expressão pVKH18-En6.

4.3.2 Subclonagem no vector de expressão pVKH18-En6

Após confirmada a correcta clonagem no vector pCR-Blunt procedeu-se à subclonagem no vector de expressão pVKH18-En6. Este vector binário tem sido amplamente utilizado para expressão transitória em sistemas heterólogos (Batoko *et al.*, 2000). Seis repetições do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), para além de outras sequências reguladoras, asseguram a adequada expressão do transgene (Figura 4.13).

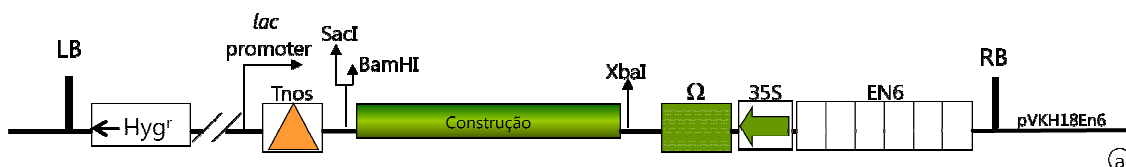


Figura 4.13 Esquema de inserção das construções no vector de expressão pVKH18-En6. LB – Bordo esquerdo; Hyg^r – gene de resistência à higromicina; Tnos – gene codificante da nopalina sintetase; RB – Bordo direito. (Adaptado de Batoko *et al.*, 2000).

Após ligação ao vector pVKH18-En6, a mistura de reacção foi utilizada para transformar células de *E. coli* competentes. Os clones obtidos foram rastreados por restrição enzimática, usando enzimas cuja sequência de reconhecimento foi introduzida pelos oligonucleótidos. O resultado da restrição foi analisado em gel de agarose (Figura 4.14).

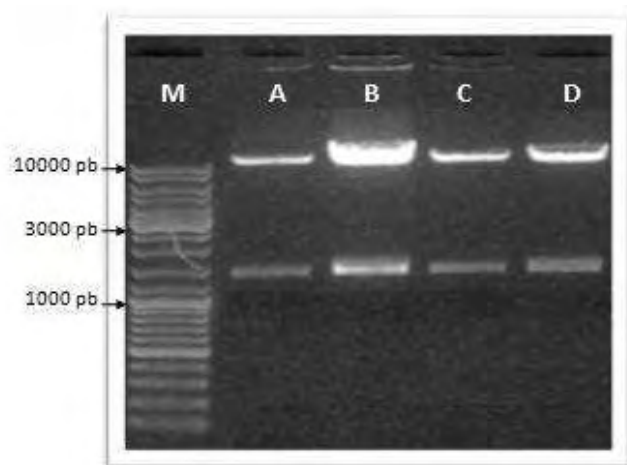


Figura 4.14 Electroforese do produto de rastreio de 2 μ L de DNA plasmídico de cada uma das construções em pVKH18-En6; A) Digestão de cardosina A+PSIB com *XbaI* *SacI*; B) Digestão de cardosina B+PSIA com *XbaI* *Bam*HI; C) Digestão de cardosina AmutPSI com *XbaI* *SacI*; D) Digestão de cardosina BmutPSI com *XbaI* *Bam*HI; M) Marcador de pesos moleculares "GeneRuler DNA Ladder Mix" – Fermentas.

Foram considerados positivos aqueles que apresentavam duas bandas bem visíveis, uma de aproximadamente 12000 pb correspondente ao vector pVKH18-En6, e outra de aproximadamente 1500 pb correspondente à construção de cardosina. Observou-se para todas as construções uma banda ligeiramente acima dos 10000 pb correspondente ao vector. Foi também observada uma banda de aproximadamente 1500 pb em todos os clones testados, correspondente ao fragmento excisado, ou seja, à construção de cardosina mutada. O DNA dos clones positivos de cada uma das construções foi utilizado para transformação de *Agrobacterium tumefaciens*.

4.3.3 Obtenção de proteínas fluorescentes

A proteína mCherry é uma proteína fluorescente cujo pico de emissão se situa nos 610 nm. A utilização de uma proteína fluorescente prende-se com a possibilidade de analisar *in vivo* e em tempo real o direccionamento e o padrão de acumulação das nossas construções num sistema heterólogo, bastando para isso recorrer a técnicas de microscopia confocal de fluorescência. Esta proteína foi colocada a 3' das construções de cardosina às quais foi removido o codão stop. Para a subclonagem utilizou-se o vector pVKH18-En6, onde já havia sido previamente clonada a mCherry (Figura 4.15).

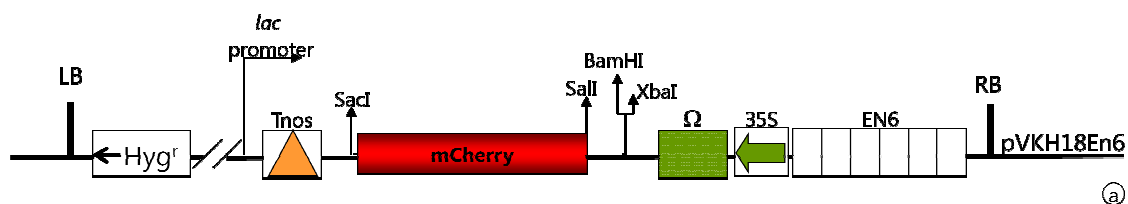


Figura 4.15 Esquema representativo do vetor pVKH18-En6 previamente clonado com a proteína fluorescente mCherry; LB – Bordo esquerdo; Hyg^r – gene de resistência à higromicina; Tnos – gene codificante da nopalina sintetase; RB – Bordo direito.

Após a ligação ao vetor pVKH18-En6—mCherry, usou-se a mistura de reacção para transformar células de *E. coli* competentes. Os clones resultantes da subclonagem foram rastreados por restrição enzimática usando as enzimas *XbaI* e *SacI*. O uso destas enzimas permite a excisão simultânea das construções de cardosina e da proteína fluorescente mCherry. O resultado foi analisado em gel de agarose, sendo de esperar uma banda de aproximadamente 12000 pb correspondente ao vetor pVKH18-En6 e uma outra de 2250 pb correspondente à construção de cardosina (1500 pb) acoplada à proteína mCherry (750 pb) (Figura 4.16).

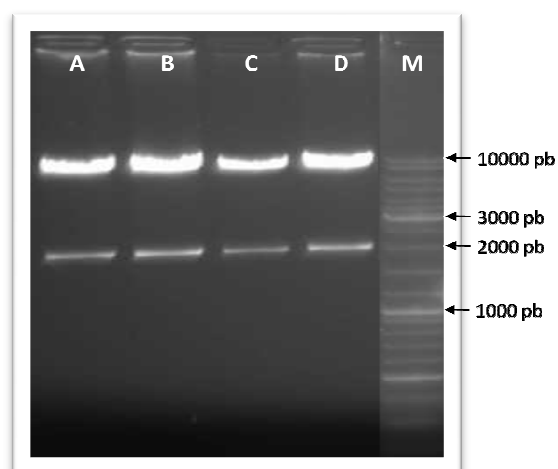


Figura 4.16 Electroforese do produto de rastreio de 2µL de DNA plasmídico de cada uma das construções inseridas em pVKH18-En6 – mCherry com as enzimas *XbaI* e *SacI*; A) Cardosina A+PSIB; B) Cardosina B+PSIA; C) Cardosina AmutPSI; D) Cardosina BmutPSI; M) Marcador de pesos moleculares “GeneRuler DNA Ladder Mix” – Fermentas.

Para todas as construções é bem visível uma banda de aproximadamente 12000 pb correspondente ao vetor de expressão. Todas as construções apresentaram também uma banda de aproximadamente 2250 pb correspondente ao fragmento excisado pela restrição, ou seja, a construção de cardosina (1500 pb) acoplada à proteína mCherry (750 pb). Todos os clones rastreados foram então considerados positivos. De modo a confirmar a correcta inserção da construção de cardosina na mesma grelha de leitura da proteína fluorescente, o DNA dos clones positivos de cada construção foi enviado para sequenciação. Uma vez confirmada a correcta

inserção da construção, o DNA dos clones positivos foi utilizado para transformação de *Agrobacterium tumefaciens*.

4.4 Inserção das construções em *Agrobacterium tumefaciens*

4.4.1 Rastreio de clones positivos

Obtidas as construções de cardosinas e uma vez clonadas em pVKH18-En6 e em pVKH18-En6—mCherry, procedeu-se à transformação de células de *A. tumefaciens* electrocompetentes. O baixo grau de pureza que o DNA dos transformantes de *A. tumefaciens* apresenta impossibilita a sua manipulação directa nos ensaios de rastreio por restrição enzimática. Deste modo, o DNA extraído das células de *A. tumefaciens* transformadas foi utilizado para transformar células de *E. coli* competentes sendo o ensaio de rastreio efectuado sobre o DNA extraído de *E. coli*. As subclonagens no vector pVKH18-En6 foram rastreadas usando enzimas de restrição cuja sequência de reconhecimento foi introduzida pelos oligonucleótidos (Figura 4.17).

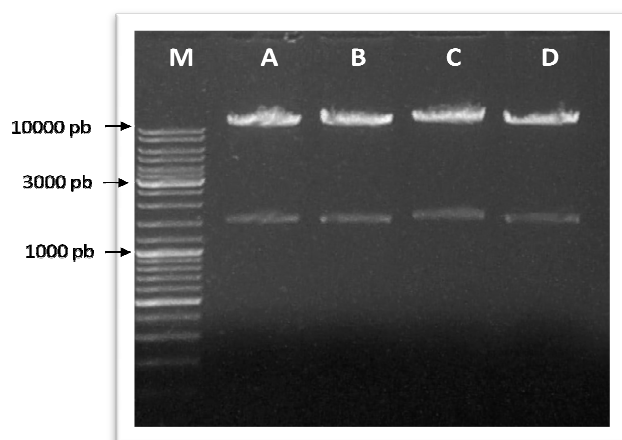


Figura 4.17 Electroforese do produto de rastreio de 2 μ L de DNA plasmídico de cada uma das construções em pVKH18-En6; A) Digestão de cardosina A+PSIB com *XbaI* *SacI*; B) Digestão de cardosina B+PSIA com *XbaI* *Bam*HI; C) Digestão de cardosina AmutPSI com *XbaI* *SacI*; D) Digestão de cardosina BmutPSI com *XbaI* *Bam*HI; M) Marcador de pesos moleculares “GeneRuler DNA Ladder Mix” – Fermentas.

Observou-se, para todas as construções, uma banda de aproximadamente 12000 pb correspondente ao vector pVKH18-En6, assim como uma banda de aproximadamente 1500 pb correspondente à construção de cardosina excisada pela restrição. As construções foram assim consideradas positivas.

As subclonagens no vector pVKH18-En6—mCherry foram rastreadas recorrendo às enzimas *XbaI* e *SacI* (Figura 4.18).

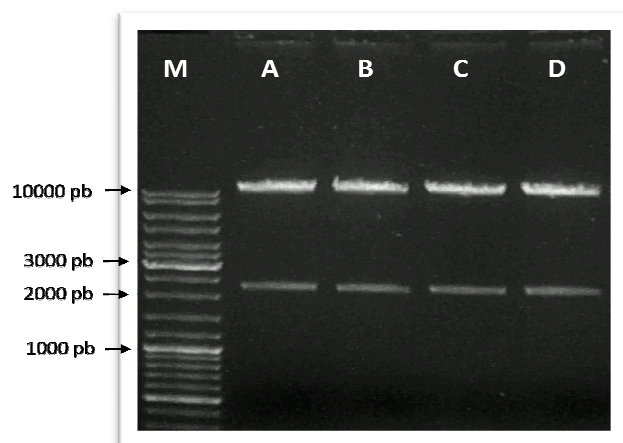


Figura 4.18 Electroforese do produto de rastreio de 2 μ L de DNA plasmídico de cada uma das construções inseridas em pVKH18-En6 – mCherry com as enzimas *Xba*I e *Sac*I; A) Cardosina A+PSIB; B) Cardosina B+PSIA; C) Cardosina AmutPSI; D) Cardosina BmutPSI; M) Marcador de pesos moleculares “GeneRuler DNA Ladder Mix” – Fermentas.

Observou-se uma banda de aproximadamente 12000 pb, em todas as construções, correspondente ao vector pVKH18-En6. Foi também identificada uma banda de aproximadamente 2250 pb que corresponde à construção de cardosina (1500 pb) acoplada à proteína mCherry (750 pb). As construções foram consideradas positivas.

Os transformantes de *A. tumefaciens* correspondentes a cada uma das construções rastreadas positivamente foram seleccionados e guardados a -80 °C para posterior utilização no estudo de expressão, processamento e direccionamento em *Nicotiana tabacum*.

4.5 Estudo da expressão em *Nicotiana tabacum* SR1 cv. Petit Havana

A avaliação da expressão, estado de processamento e direccionamento das construções obtidas ao longo deste trabalho foi feita recorrendo a um sistema de expressão transitório em folhas de *Nicotiana tabacum*, mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Durante o ciclo de vida de *Nicotiana tabacum* (figura 4.19) as condições de crescimento foram mantidas estáveis, de forma a minimizar os impactos nos níveis de expressão.



Figura 4.19 Diferentes fases do ciclo de vida de *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana. a) Plântulas com cerca de 3 dias de germinação; b) Plantas com 3 semanas; c) Plantas com 5 semanas; d) Plantas com 8 semanas após germinação.

Para os ensaios de infiltração utilizaram-se plantas com cerca de 8 semanas após germinação (figura 4.19 d), correspondendo a uma fase de desenvolvimento em que os níveis de expressão são óptimos.

Para a extracção de proteínas, assim como para a análise por microscopia confocal de varrimento, usaram-se as construções de cardosina fundidas com a proteína fluorescente mCherry, tendo sido recolhidas amostras aos 3 e 5 dias após infiltração.

Como controlo de expressão infiltrou-se uma folha de cada planta utilizada com *Agrobacterium tumefaciens* transformado com pVKH18-En6 – 35S-GFP, um marcador que é expresso no citoplasma e que é normalmente utilizado no nosso laboratório (figura 4.20).

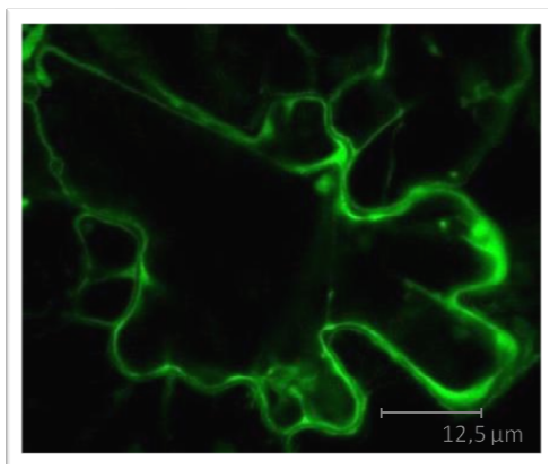


Figura 4.20 Imagem de microscopia confocal de células de epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* transformadas com a construção 35s-GFP. A imagem foi obtida 3 dias após infiltração das folhas. É visível expressão ao nível do citoplasma das células.

Nas células da epiderme de *Nicotiana tabacum* o vacúolo apresenta grandes dimensões, empurrando todo o conteúdo citoplasmático em direcção à membrana citoplasmática. Desta forma a expressão citosólica é apenas visível à periferia da célula. Observa-se, em todas as plantas utilizadas, a expressão ao nível do citosol uma vez que a construção 35S-GFP não possui nenhum sinal de endereçamento para a via secretora.

Os ensaios utilizando as construções cardosina A+PSIB e cardosina AmutPSI não revelaram qualquer tipo de expressão em *Nicotiana tabacum* pelo que os resultados serão omissos.

4.5.1 Análise da expressão de cardosina B+PSIA:mCherry

A expressão da construção cardosina B+PSIA fundida com a proteína fluorescente mCherry foi bem sucedida, obtendo-se bons níveis de expressão para o clone utilizado. Aos 3 dias após infiltração observa-se expressão da construção principalmente no vacúolo das células da epiderme de *Nicotiana tabacum* (figura 4.21). Pelo facto do vacúolo apresentar grandes

dimensões, ocupando a quase totalidade do volume da célula, a expressão neste organelo traduz-se numa fluorescência vermelha em praticamente toda a célula. Não se detecta expressão no citoplasma, no retículo endoplasmático, nem na zona correspondente à parede celular (figura 4.21 a, seta branca). O retículo perinuclear também não apresenta qualquer marcação fluorescente (figura 4.21 a, seta amarela).

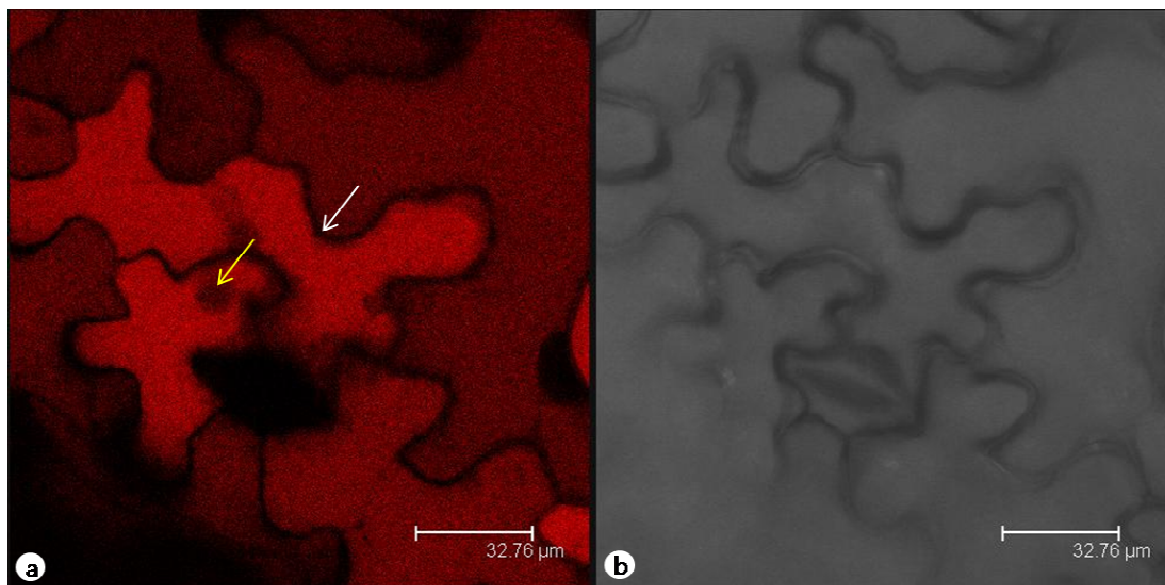


Figura 4.21 Imagem de microscopia confocal de células de epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* transformadas com cardosina B+PSIA:mCherry. As imagens foram obtidas 3 dias após infiltração. Detecta-se expressão evidente no vacúolo das células. A zona correspondente ao citoplasma e parede celular não apresenta marcação (seta branca). No retículo perinuclear também não se detecta expressão (seta amarela). a) Imagem relativa à excitação com o laser 561 nm; b) imagem correspondente de contraste de interferência diferencial (DIC).

Aos 5 dias após infiltração (figura 4.22) os níveis de expressão continuam elevados. Mais uma vez, a principal expressão desta construção detecta-se ao nível dos vacúolos, sendo ainda detectada alguma fluorescência no retículo endoplasmático em algumas células (figura 4.22 a, setas brancas). No entanto, a maioria das células não apresenta expressão ao nível do citoplasma, do retículo endoplasmático e da parede celular.

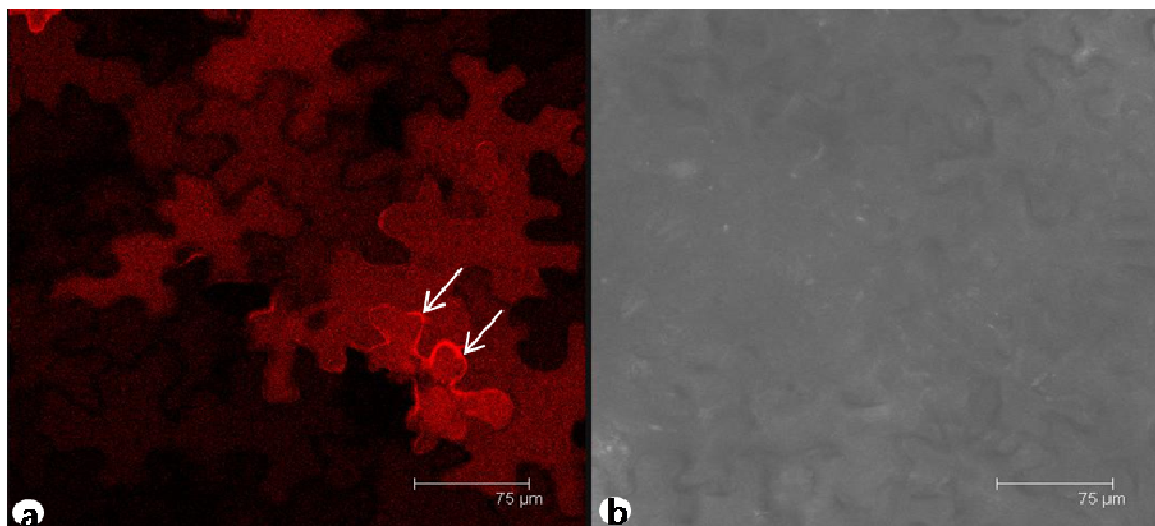


Figura 4.22 Imagem de microscopia confocal de células de epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* transformadas com cardosina B+PSIA:mCherry. As imagens foram obtidas 5 dias após infiltração. Detecta-se expressão evidente no vacúolo das células, assim como alguma expressão a nível do retículo endoplasmático em algumas células (setas brancas). a) Imagem relativa à excitação com o laser 561 nm; b) imagem correspondente de contraste de interferência diferencial (DIC).

O extracto proteico de folha de *N. tabacum* a expressar cardosina B+PSIA, avaliado por «Western blotting», revelou a presença de uma banda de aproximadamente 34 kDa aos 3 e 5 dias após infiltração, correspondente à cadeia maior da cardosina B, indicando assim que a construção sofreu um correcto processamento.

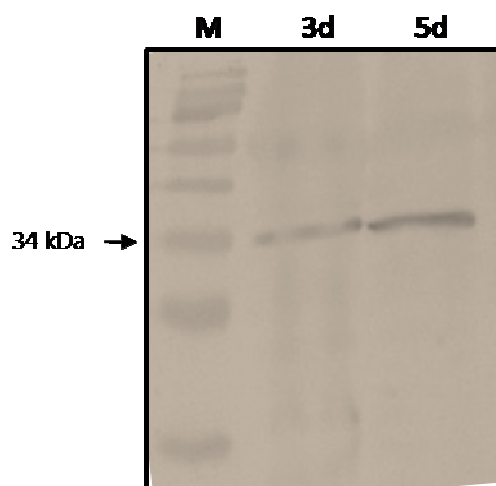


Figura 4.23 Imunodeteção da cardosina B+PSIA:mCherry em folhas de *Nicotiana tabacum* aos 3 e 5 dias após infiltração. Usou-se um anticorpo específico da cadeia maior da cardosina B. Não se registam alterações significativas nos níveis de expressão nos dois tempos analisados. O tamanho detectado (34 kDa) corresponde à forma processada da cardosina B; d – dias; M – Marcador de pesos moleculares “PageRuler™ Prestained Protein Ladder – Fermentas”.

4.5.2 Análise da expressão de cardosina BmutPSI:mCherry

A expressão da construção cardosina BmutPSI fundida com a proteína fluorescente mCherry foi bem sucedida, obtendo-se níveis de expressão suficientes para uma correcta visualização *in vivo*. Aos 3 dias após infiltração observa-se expressão da construção principalmente no vacúolo das células da epiderme de *Nicotiana tabacum* (figura 4.24). Embora a expressão detectada nos vacúolos seja de intensidade inferior quando comparado com a construção cardosina B+PSIA:mCherry, o que poderia indicar um atraso no endereçamento, a expressão a nível do retículo endoplasmático não é detectável (figura 4.24 a, setas brancas), indicando que houve tempo suficiente para que a proteína chegasse ao vacúolo.

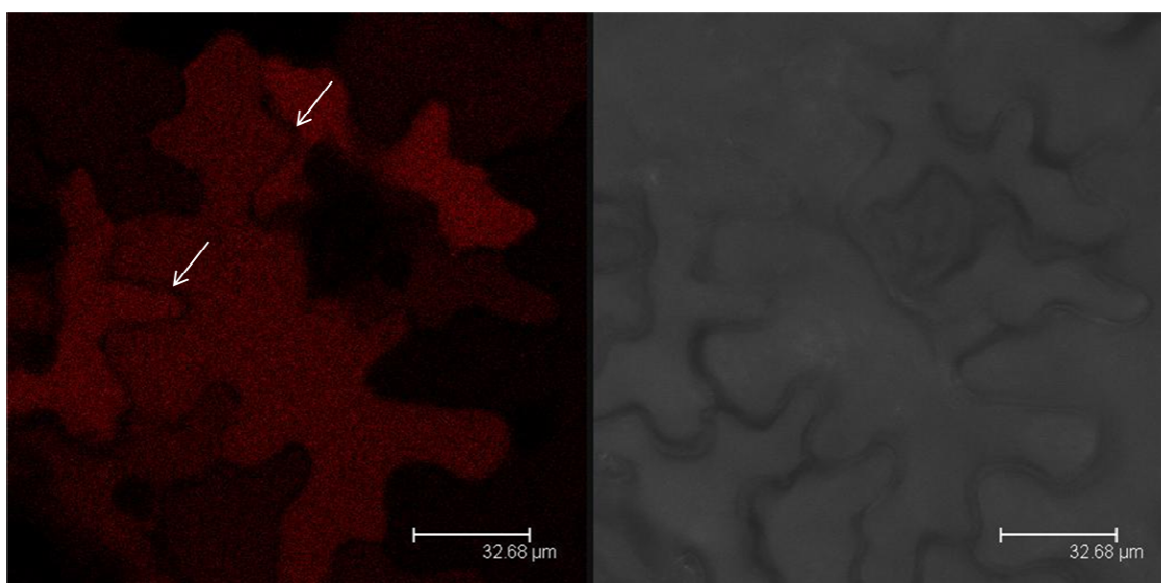


Figura 4.24 Imagem de microscopia confocal de células de epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* transformadas com cardosina BmutPSI:mCherry. As imagens foram obtidas 3 dias após infiltração. Detecta-se expressão no vacúolo das células e ausência de expressão ao nível do retículo endoplasmático, citoplasma e parede celular (setas brancas). a) Imagem relativa à excitação com o laser 561 nm; b) imagem correspondente de contraste de interferência diferencial (DIC).

Aos 5 dias após infiltração da construção, os níveis de expressão são mais elevados. Verifica-se novamente uma expressão a nível do vacúolo das células da epiderme foliar de *N. tabacum* e a inexistência de expressão ao nível do retículo perinuclear (seta amarela), retículo endoplasmático, citoplasma e parede celular (figura 4.25 a, seta branca).

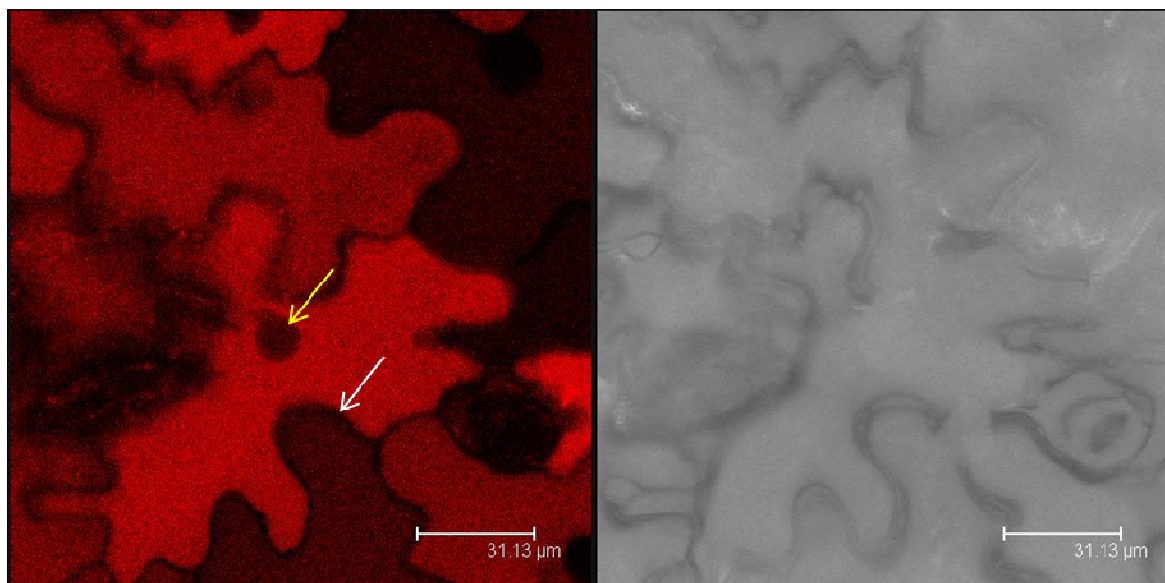


Figura 4.25 Imagem de microscopia confocal de células de epiderme foliar de *Nicotiana tabacum* transformadas com cardosina BmutPSI:mCherry. As imagens foram obtidas 5 dias após infiltração. Detecta-se expressão no vacúolo das células e ausência de marcação ao nível do retículo perinuclear (seta amarela), retículo endoplasmático, citoplasma e parede celular (seta branca). a) Imagem relativa à excitação com o laser 561 nm; b) imagem correspondente de contraste de interferência diferencial (DIC).

Após a avaliação da extracção proteica por «Western blotting», seria de esperar a presença de uma banda de aproximadamente 80 kDa, correspondente à construção de cardosina não processada acoplada à proteína fluorescente mCherry. No entanto a análise dos resultados obtidos não revela a presença de nenhuma banda (Figura 4.26).

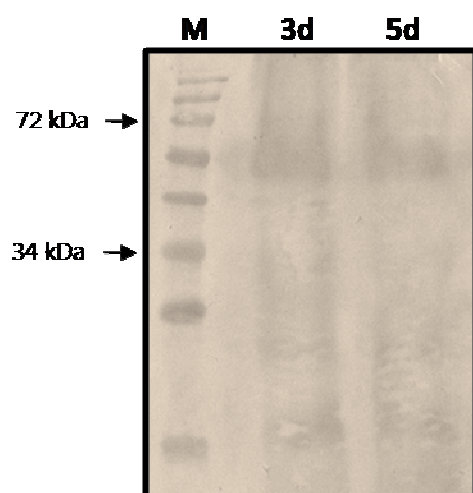


Figura 4.26 Imunodeteccção da cardosina BmutPSI:mCherry em folha de *Nicotiana tabacum* aos 3 e 5 dias após infiltração. Usou-se um anticorpo específico da cadeia maior da cardosina B. Não se regista a presença de qualquer banda; d – dias; M – Marcador de pesos moleculares “PageRulertm Prestained Protein Ladder – Fermentas”.

5 Discussão e Conclusão

As cardosinas A e B são duas proteinases aspárticas isoladas a partir de flores de *Cynara cardunculus* L. (cardo). Embora presentes também em outros tecidos, é principalmente nos tecidos florais e em sementes em germinação que estas duas proteinases se acumulam em quantidades apreciáveis (Pissarra *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008). Ambas as cardosinas possuem uma elevada similaridade entre elas, no entanto, estudos anteriores de localização tecidual revelam uma distribuição da cardosina A nas células da papila estigmática enquanto que a cardosina B é detectada no tecido de transmissão. A característica mais peculiar desta diferença na distribuição espacial é evidenciada a nível intracelular, sendo a cardosina A acumulada nos vacúolos de armazenamento proteico, enquanto a cardosina B é secretada para o exterior da célula (Ramalho-Santos *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 2001). Esta característica, para além da sua homologia, torna estas duas proteinases num interessante modelo de estudo para as proteinases aspárticas, com especial evidência para o estudo das vias de endereçamento intracelular.

Com este estudo foi possível a obtenção de quatro construções mutantes de cardosinas recombinantes inseridas em vectores binários para expressão em plantas e as mesmas fundidas com a proteína fluorescente mCherry. Estando todas as construções inseridas em *Agrobacterium tumefaciens* é possível o seu uso imediato para estudos de expressão transitória ou estável, contribuindo assim para o esclarecimento do papel do PSI no processamento, actividade e endereçamento das cardosinas.

As vias de endereçamento intracelular das proteinases aspárticas têm sido bastante estudadas recentemente, contribuindo para uma melhor compreensão do funcionamento dinâmico e complexo do sistema endomembranar. A via vacuolar tem merecido especial destaque, uma vez que a maioria dessas proteinases se acumulam no vacúolo. Tormakangas e colaboradores (2001) conduziram um estudo onde demonstraram o papel fundamental do PSI no endereçamento vacuolar de uma proteinase aspártica vegetal, a fitepsina. Nesse estudo foram realizadas construções de fitepsina recombinantes, às quais foram removidas a região do PSI, sendo a sua expressão e endereçamento analisados em protoplastos de *Nicotiana tabacum*. Tal como a cardosina A, a fitepsina é acumulada em compartimentos vacuolares (Tormakangas *et al.*, 1994). A remoção do domínio PSI conduziu a alterações drásticas no padrão de acumulação da fitepsina, passando esta a ser secretada. A análise do hipotético modelo tridimensional da procardosina A e procardosina B revela grandes semelhanças com a profitepsina a nível da posição do PSI uma vez que, em ambos os casos, este forma uma subunidade independente, externa à superfície da proteína (Kervinen *et al.*, 1999; dados não publicados). Outros estudos têm revelado um potencial papel do PSI no que diz respeito ao direccionamento vacuolar.

Teurachi e colaboradores (2006) demonstraram que a remoção do segmento PSI de duas APs de soja, ambas vacuolares, conduziu à retenção no RE de uma delas enquanto o endereçamento vacuolar da segunda permaneceu inalterado, em protoplastos de *Arabidopsis thaliana*.

Parece evidente que a construção de cardosinas recombinantes com mutações a nível do PSI poderá contribuir para elucidar se este domínio é ou não determinante para o endereçamento vacuolar destas proteinases aspárticas. A construção da cardosina A com deleção da região PSI foi obtida em estudos recentes (Pereira, 2008). Estudos de expressão para esta construção foram conduzidos em linhas de investigação semelhantes às descritas anteriormente e analisados por expressão transitória de folhas de tabaco, onde a cardosina A é tipicamente acumulada no vacúolo. Comparativamente à cardosina A, a construção mutada apresenta uma diminuição dos níveis de expressão, sendo no entanto detectada no vacúolo. Apesar da remoção do PSI não ser suficiente para evitar o seu direccionamento vacuolar, a proteína mutada é parcialmente retida no RE, sendo visível uma acumulação em vesículas, que o autor sugere serem vesículas de degradação proteica, derivadas do controlo de qualidade efectuado neste compartimento. Por outro lado, a cardosina B com deleção da região PSI, não revela qualquer alteração na expressão e endereçamento vacuolar, nem se observa a formação de vesículas de degradação proteica (Oliveira, dados não publicados).

Vários autores têm vindo a salientar a influência exercida pelo PSI no modo como as proteínas abandonam o RE, atribuindo a este domínio um duplo papel de sinalização. Tormakangas e colaboradores (2001) sugerem que, no caso da fitepsina, o PSI possa funcionar não só como um sinal vacuolar mas também como um sinal de saída do RE através de vesículas COPII. No caso das cardosinas A e B ainda não existem dados suficientes para a confirmação de tal hipótese. No entanto, é sugerido que a remoção da região do PSI possa interferir com o correcto enrolamento da proteína e por isso influenciar a sua retenção ou não a nível do RE (Pereira 2008). Atendendo aos diferentes comportamentos revelados pelas cardosinas com deleção do PSI, o uso de cardosinas recombinantes em que os domínios PSI estão trocados poderá contribuir para uma melhor compreensão do seu papel.

Estudos recentes (Pereira – Tese de doutoramento em preparação) demonstram que o PSI da cardosina A (PSIA) fundido com a proteína fluorescente mCherry, tipicamente secretada em células da epiderme folha de *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*), tem a capacidade de a redireccionar para o vacúolo. Estes resultados parecem sugerir que o PSI da cardosina A funciona como um sinal vacuolar, tendo a capacidade de redireccionar proteínas tipicamente secretadas. A análise dos dados obtidos neste trabalho para a construção cardosina B+PSIA:mCherry não revela

alterações ao nível da expressão e do endereçamento desta construção, quando comparados com dados obtidos em *N. tabacum* para a cardosina B (Soares da Costa, 2009). O facto de ser detectada uma banda de aproximadamente 34 kDa em «Western blot» revela que esta construção sofre processamento de modo semelhante à proteína nativa, demonstrando a sua correcta construção e a viabilidade do seu uso em estudos de expressão em sistemas heterólogos. No entanto, o sistema foliar de *N. tabacum* não se revela o modelo mais adequado para o estudo da influência do PSI no endereçamento intracelular, uma vez que a cardosina B não é secretada como no sistema nativo, mas endereçada para o vacúolo. Seria então de todo o interesse obter um sistema no qual a cardosina B fosse secretada. Têm vindo a ser desenvolvidos esforços nesse sentido, através do uso de tecido caloso de cardo, assim como cultura de células em suspensão, que estão já a ser testados como modelo de estudo para esta proteinase. Estudos desenvolvidos em *Arabidopsis thaliana*, transformada estavelmente com cardosina B, revelaram que, em sementes, a cardosina B é secretada (Oliveira, 2009). Os protoplastos de *N. tabacum* também se revelaram ser um bom modelo de estudo para a cardosina B, uma vez que esta é sempre secretada neste sistema (Soares da Costa, 2009). Se, através da utilização da construção cardosina B+PSIA, se verificar um redireccionamento para o vacúolo, poderemos concluir que o PSI da cardosina A, mas não o PSI da cardosina B, poderá funcionar como um sinal de endereçamento vacuolar para as cardosinas. No caso de não se registar qualquer alteração no endereçamento da cardosina B podemos sugerir que muito provavelmente a parede celular está implicada em processos de regulação da secreção, como é sugerido pelo autor no trabalho citado.

A capacidade apresentada pela região PSI em interagir com membranas vem reforçar o papel indirecto do PSI no trajecto para o vacúolo. Foi sugerido por vários autores que o PSI funcione como pré-requisito para a via vacuolar através da sua capacidade de interacção com membranas ao longo do sistema endomembranar (Kervinen *et al.*, 1999; Tormakangas *et al.*, 2001). Esta teoria é suportada pela elevada similaridade entre o PSI e as saposinas. De facto, estudos recentes demonstram que o domínio PSI possui uma actividade semelhante à saposina C, funcionando como activador enzimático e demonstrando propriedades de interacção lipídica (Brodelius *et al.*, 2005). A associação da saposina C, a mais semelhante ao PSI, com a catepsina D em células de mamíferos, é referida como sendo responsável pelo seu endereçamento para o lisossoma, onde o complexo se dissocia. Duarte e colaboradores (2008) detectaram, através de estudos de fraccionamento celular em folhas de *N. tabacum* a expressar cardosina A, a presença da forma intermédia de 35kDa assim como a forma madura de 31kDa na fracção vacuolar, sugerindo assim que o último passo do processamento da cardosina A ocorre no vacúolo.

Recentemente, devido a estudos de localização do PSI da cardosina A, que revelaram uma associação íntima deste domínio com o tonoplasto, foi proposto um modelo passível de explicar o papel do PSI no endereçamento vacuolar da cardosina A (Pereira – Tese de doutoramento em preparação). Foi levantada a hipótese de interacção do PSI com o tonoplasto, ficando o restante zimogénio em contacto com o lúmen do vacúolo, onde ocorrem os últimos passos do processamento (Figura 5.1).

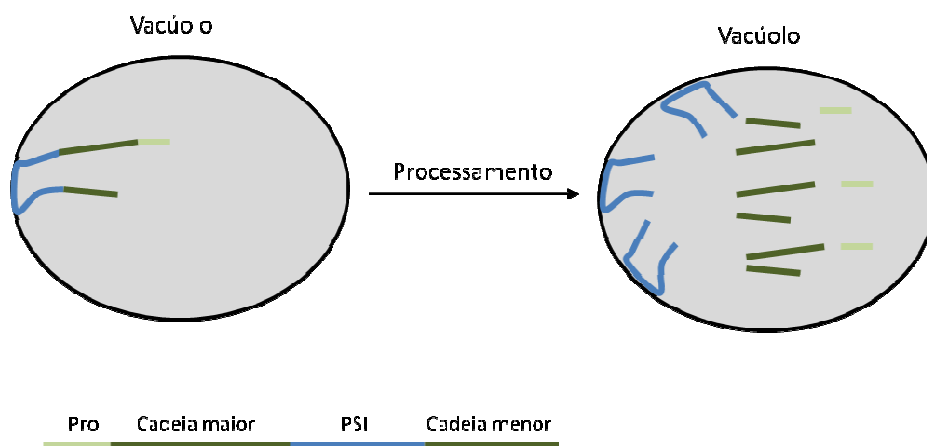


Figura 5.1 Modelo hipotético da interacção do PSI da cardosina A com o tonoplasto.

A utilização da construção cardosina AmutPSI neste sistema seria bastante interessante. Através da mutação dos locais de clivagem do PSI impedimos o seu processamento, ficando a cardosina A retida junto do tonoplasto, sendo possível detectar, por imunolocalização, a forma precursora. Deste modo, estes resultados poderão fornecer dados concretos para a validação da hipótese proposta de interacção membranal do PSI no endereçamento vacuolar.

Estudos recentes em *N. tabacum* parecem indicar que a cardosina B sofre processamento numa fase bastante inicial do seu trajecto endomembranal, ao contrário do que foi verificado para a cardosina A. O uso de mutantes dominantes negativos de Rab-D2a (que impedem o trânsito entre o RE e o aparelho de Golgi) permitem detectar a forma processada da cardosina B ainda no RE (Soares da Costa, 2009). A remoção precoce da região PSI pode ser a explicação para a secreção da cardosina B em *Cynara cardunculus*. A construção cardosina BmutPSI impedirá o processamento desta proteinase ao nível do PSI, podendo contribuir para uma melhor compreensão deste dilema se testada em vários sistemas heterólogos, onde a cardosina B seja secretada ou vacuolar. A análise dos dados obtidos neste trabalho para a construção cardosina BmutPSI:mCherry não revela alterações na expressão e endereçamento da construção, quando

comparada com os dados para a cardosina B, no mesmo sistema (Soares da Costa, 2009). No entanto, em «Western blot» não foi possível a detecção de qualquer banda apesar de ser visível a expressão fluorescente em células de *N. tabacum*. Este facto pode ser explicado pela baixa representatividade da construção relativamente às restantes proteínas da amostra. Será necessária a repetição dos ensaios de infiltração e «Western blotting» usando maior concentração de proteínas e/ou uma menor diluição de anticorpo.

Vários estudos referem as proteínases aspárticas como sendo sintetizadas na forma de zimogénios inactivos, adquirindo função biológica aquando do processamento. Foi já demonstrado que a forma precursora da cardosina A, *in vitro*, apresenta actividade enzimática (Ramalho Santos *et al.*, 1998; Castanheira *et al.*, 2005) no entanto não é ainda claro se de facto, *in vivo*, os precursores das cardosinas se apresentam numa forma activa. A obtenção de cardosinas recombinantes com mutação a nível dos locais de clivagem do PSI, ou seja, que não sofre processamento, permitirá um estudo mais profundo sobre a sua actividade *in vivo*, por exemplo, conjugando substratos putativos com fluoróforos «quenched» (Bodipy) que, ao serem degradados, emitem um forte sinal fluorescente (Welder *et al.*, 2002).

A construção genética de mutantes tem-se revelado uma excelente estratégia para o estudo das propriedades bioquímicas das proteínas. No entanto a manipulação genética apresenta limitações. As alterações induzidas nos cDNA das proteínas podem conduzir à formação de estruturas defeituosas ou simplesmente à alteração da estrutura tridimensional da proteína, contribuindo para uma perda de actividade enzimática. Este facto foi tido em consideração durante todo o trabalho de obtenção das construções aqui apresentadas. A troca das regiões do PSI foi realizada usando a totalidade do segmento, de forma a não ocorrerem erros na grelha de leitura da proteína. Devido à elevada similaridade entre as cardosinas a probabilidade de esta modificação conduzir a uma má formação da proteína é baixa. No entanto não podemos descartar as interações que poderão existir entre aminoácidos específicos e possivelmente distantes aquando da aquisição da forma tridimensional. As mutações pontuais realizadas na obtenção das construções cardosina AmutPSI e cardosina BmutPSI conduzem à substituição de alguns aminoácidos na cadeia polipeptídica, numa zona exposta da proteína. A análise do modelo tridimensional da procardosina A e da procardosina B (dados não publicados), assim como a análise cristalográfica da estrutura da profitepsina (Kervinen *et al.*, 1999) revela que a zona que ladeia a região PSI provavelmente requer alta flexibilidade, de forma a expor o domínio PSI ao exterior da superfície proteica. A presença do aminoácido Glicina a montante do PSI em ambas as cardosinas parece corroborar esta teoria uma vez que este aminoácido apresenta uma elevada

flexibilidade quando integrado na sequência peptídica. Uma alteração deste aminoácido poderia conduzir a uma incapacidade por parte da proteína em adquirir uma estrutura adequada ao seu processamento ou mesmo à sua conformação tridimensional. Atendendo a esse facto, o aminoácido Glicina foi mantido para diminuir o impacto que as alterações peptídicas possam desencadear na estrutura tridimensional da proteína. No entanto, como forma de rastrear possíveis más conformações na aquisição tridimensional das proteínas mutantes aqui apresentadas, e como perspectiva de trabalho futuro, serão realizados estudos recorrendo a software informático que permitirá prever o modelo tridimensional destes mutantes, à semelhança do já efectuado para as procardosinas A e B.

As construções cardosina A+PSIB:mCherry e cardosina AmutPSI:mCherry não revelaram qualquer expressão nos ensaios de infiltração em *N. tabacum*. Uma vez que as plantas utilizadas expressaram a construção 35s-GFP, podemos concluir que o problema seja dos clones utilizados na infiltração. O curto período para a execução dos trabalhos não permitiu a repetição dos ensaios, sendo necessário a sua repetição usando os mesmos clones mas fazendo variar a densidade óptica da solução de infiltração e, no caso de se continuar a registar uma expressão nula, considerar a utilização de outros clones das mesmas construções. Uma outra explicação possível para a não detecção de expressão poderá advir do facto de estas construções estarem a ser degradadas à medida que a ocorre a síntese. O retículo endoplasmático possui mecanismos que assistem na conformação tridimensional das proteínas e, caso as alterações introduzidas resultem na incapacidade de aquisição da estrutura tridimensional por parte das construções, as marcam para degradação. O recurso a técnicas de RT-PCR para detecção de transcritos das proteínas mutantes não foi possível em tempo útil, mas será considerado em trabalhos futuros.

Com a possibilidade de testar e analisar os níveis de expressão, estado de processamento e o padrão de acumulação destas construções e compará-los com os dados obtidos para a cardosina A e cardosina B, em vários sistemas heterólogos, estaremos a caminhar no sentido de descortinar o papel do segmento PSI no endereçamento intracelular.

6 Referências

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition. *Garland Science*, New York.

Athauda, S.B., Matsumoto, K., Rajapakse, S., Kuribayashi, M., Kojima, M., Kubomura, N., Iwamatsu, A., Shibata, C., Inoue, H. e Takahashi, K. (2004) Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases. *Biochemical Journal*, 381: 295-306.

Bassham, D., Sanderfoot, A., Kovaleva, V., Zheng, H. e Raikhel, N. (2000) AtVPS45 complex formation at the trans-Golgi network. *Molecular Biology of the Cell*, 11: 2251-2265.

Batoko, H., Zheng, H.-Q., Hawes, C., e Moore, I. (2000). A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants. *Plant Cell*, 12: 2201-2218.

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

Bradford, M.M., (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Annals of Biochemistry*, 72:248-54.

Brodelius, M., Hiraiwa, M., Marttila, S., Al Karadaghi, S., Picaud, S. e Brodelius, P. (2005) Immunolocalization of the saposin-like insert of plant aspartic proteinases exhibiting saposin C activity. Expression in young flower tissues and in barley seeds. *Physiologia Plantarum*, 125: 405-418.

Castanheira, P., Samyn, B., Sergeant, K., Clemente, J.C., Dunn, B.M., Pires, E., Beeument, J.V. e Faro, C. (2005) Activation, Proteolytic Processing, and Peptide Specificity of Recombinate Cardosin A. *The journal of Biological Chemistry*, 13: 13047-13054.

Chen, F. e Foolad, M. (1997) Molecular organization of a gene in barley which encodes a protein similar to aspartic proteinases and its specific expression in nucellar cells during degeneration. *Plant Molecular Biology*, 35: 821-831.

Duarte, P., Figueiredo, R., Pereira, S. e Pissara, J. (2006) Structural characterization of the stigma-style complex of *Cynara cardunculus* (Asteracea) and immunolocalization of cardosins A and B during floral development. *Canadian Journal of Botany*, 84: 737 -749.

Egas, C., Lavoura, N., Resende, R., Brito, R., Pires, E., Pedroso de Lima, M. e 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 (49): 38190-38196.

Faro, C., Ramalho-Santos, M., Vieira, M., Mendes, A., Simões, I., Andrade, R., Veríssimo, P., Lin, X., Tang, J. e Pires, E. (1999) Cloning and characterization of a cDNA encoding cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 28724-28729.

Faro, C. e Gal, S. (2005) Aspartic proteinase content of the *Arabidopsis* genome. *Current Protein and Peptide Science*, 6: 493-500.

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

Frazão, C., Bento, I., Costa, J., Soares, C., Veríssimo, P., Faro, C., Pires, E., Cooper, J., e Carrondo, M., (1999) Crystal structure of cardosin A, a glycosylated and Arg-Gly-Asp containing aspartic proteinases from the flowers of *Cynara cardunculus*. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (39): 27694-27701.

Frigerio, L., Hinz, G. e Robinson, DG. (2008) Multiple Vacuoles in Plant Cells: Rule or Exception? *Traffic*, 9: 1564-1570.

Fujinaga, M., Cherney, M.M., Oyama, H., Oda, K., James, M.N. (2004) The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. *PNAS*, 101: 3364-3369.

Glathe, S., Kervinen, J., Nimtz, M., Li, GH., Tobin, GJ., Copeland, TD., Ashford, DA., Wlodawer, A., e Costa, J. (1998) Transport and activation of the vacuolar aspartic proteinases phytepsin in barley (*Hordeum vulgare*, L.). *Journal of Biological Chemistry*, 273 (47): 31230-31236.

-
- Hara-Nishimura, I.,** Shiada, T., Hatano, K., Takeuchi, Y. e Nishimura, M. (1998) Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell*, 10: 825-836.
- Hanton, S. L.,** Bortolotti, L., Renna, L., Stefano, G. e Brandizzi, F. (2005) Crossing the divide – transport between the Endoplasmic Reticulum and Golgi apparatus in plants. *Traffic*, 6: 267-277.
- Hanton, S. L.,** Matheson, L. A. e Brandizzi, F. (2006) Seeking a way out: export of proteins from the plant Endoplasmic Reticulum. *Trends in Plant Science*, 11: 335-343.
- Hanton, S.L.,** Matheson, L.A., Chatre, L., Rossi, M., Brandizzi, F. (2007) Post-Golgi protein traffic in the plant secretory pathway. *Plant Cell Reports*, 26: 1431–1438.
- 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 proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29(5): 1405-1410.
- Kato, Y.,** Murakami, S., Yamamoto, Y., Chatani, H., Kondo, Y., Nakano, T., Yokota, A., Sato, F. (2004) The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta*, 220 (1): 97-104.
- Kervinen, J.,** Tobin, G., Costa, J., Waugh, D., Wlodawer, A. e Zdanov, A. (1999) Crystal structure of plant aspartic proteinases prophytepsin: inactivation and vacuolar targeting. *The EMBO Journal*, 18(14): 3947-3955.
- Koelsch, G.,** Mares, M., Metcalf, P. e Fusek, M. (1994) Multiple functions of pro-parts of aspartic proteinase zymogens. *FEBS Letters*, 343: 6-10.
- Matheson, L.A.,** Hanton, S.L., Brandizzi, F. (2006) Traffic between the plant endoplasmic reticulum and Golgi apparatus: to the Golgi and beyond. *Current Opinion in Plant Biology*, 9 (6), 601-609
- Munford, R.S.,** Sheppard, P.O. e O’Hara, P.J. (1995) Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *Journal of Lipid Research*, 36: 1653-1663.

-
- Mutlu, A.** e Gal, S. (1999) Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiologia Plantarum*, 105: 569-576.
- Nebenfuhr, A.**, Gallagher, L.A., Dunahay, T.G., Frohlick, J.A., Mazurkiewicz, A.M., Meehl, J.B., e Staehelin, L.A. (1999) Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the actin-myosin system. *Plant Physiology*, 121: 1127-1141
- Nebenfuhr, A.** (2002) Vesicle traffic in the endomembrane system: a tale of crops, Rabs and Snares. *Current opinion in Plant Biology*, 5: 507-512.
- Neumann, U.**, Brandizzi, F., Hawes, C.(2003) Protein transport in plant cells: In and out of the Golgi. *Annals of Botany* 92 (2): 167-180.
- Oliveira, A.** (2009) Expressão da cardosina B nas fases iniciais do desenvolvimento pós-embriónico. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal.
- Pereira, C.** (2008) Determinantes vacuolares da cardosina A. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal.
- Pereira, C.**, Soares da Costa, D., Pereira, S., Nogueira, F., Albuquerque, P., Teixeira, J., Faro, C. e Pissarra, J. (2008) Cardosins in post-embryonic development of cardoon: towards an elucidation of biological function of plant aspartic proteinases. *Protoplasma*, 232 (3-4): 203-213.
- Pimentel, C.**, Van Der Straeten, D., Pires, E., Faro, C., Rodrigues-Pousada, C. (2007) Characterization and expression analysis of the aspartic protease gene family of *Cynara cardunculus* L. *FEBS Journal* 274 (10): 2523-2539.
- Pissarra, J.**, Pereira, C., Soares da Costa, D., 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 Develop Biology*, 2: 274-281.
- Ramalho-Santos, M.**, Pissarra, J., Veríssimo, P., Pereira, S., Salema, R., Pires, E. e Faro, C.J. (1997) Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 203: 204-212.

-
- Ramalho-Santos, M.**, Veríssimo, P., Cortes, L., Samyn, B., Van Beeumen, J., Pires, E., Faro, C. (1998) Identification and proteolytic processing of procarnosin A. *European journal of Biochemistry*, 255: 133-138.
- Richter, S.**, Voß, U. e Jurgens, G. (2009) Post-Golgi traffic in plants. *Traffic*, 10(7): 819-828.
- Sarmiento, A.**, Lopes, H., Oliveira, C., Vitorino, R., Samyn, B., Sergeant, K., Debyser, G., Van Beeumen, J., Domingues, P., Amado, F., Pires, E., Domingues, R. e Barros, M. (2009) Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 230(2): 429-439.
- Wen-jun, S.** e Forde, B. (1989) Efficient transformation of *Agrobacterium spp* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 17: 83-85.
- Simões, I.** e Faro, C. (2004) Structure and function of plant aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry*, 271: 2067-2075.
- Soares da Costa, D.** (2009) Carnosin B expression and Biosynthetic pathways in *Cynara sp* and in heterologous systems. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal.
- Teurauchi, K.**, Asakura, T., Ueda, H., Tamura, T., Tamura, K., Matsumoto, I., Misaka, T., Hara-Nishimura, K. e Abea, K. (2006) Plant-specific insertions in the soybean aspartic proteinases, soyAP1 and soyAP2, perform different functions of vacuolar targeting. *Journal of Plant Physiology*, 163(8): 856-862.
- Tormakangas, K.**, Kervinen, J., Ostman, A. e Teeri, T. (1994) Tissue specific localization of aspartic proteinase in developing and germinating barley grains, *Planta*, 195: 116-125.
- Tormakangas, K.**, Hadlington, J., Pimpl, P., Hillmer, S., Brandizzi, F., Teeri, T. e 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.

-
- Veríssimo, P.,** Faro, C., Moir, A.J.G., Lin, Y.Z., Tang, J. e Pires, E. (1996) Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *European journal of Biochemistry*, 235: 762-768.
- Vieira, M.,** Pissarra, J., Veríssimo, P., Castanheira, P., Costa, Y., Pires, E. e Faro, C. (2001) Molecular cloning and characterization of a 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.,** Denecke J. (1999) The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. *Plant Cell*, 11: 615-628.
- Vitale, A.,** Raikhel, N.V. (1999) What do proteins need to reach different vacuoles? *Trends in Plant Science* 4 (4): 149-155.
- Vitale, A.,** Galili, G. (2001) The endomembrane system and the problem of protein sorting. *Plant Physiology* 125 (1): 115-118.
- Vitale, A.,** Ceriotti, A. (2004) Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interests? *Plant Physiology* 136 (3): 3420-3426.
- Vitale, A.,** Hinz, G. (2005) Sorting of proteins to storage vacuoles: How many mechanisms? *Trends in Plant Science* 10 (7): 316-323.
- White, P.C.,** Cordeiro, M.C., Arnold, D., Brodelius, P.E., John, K. (1999) Processing, activity, and inhibition of recombinant cyprosin, an aspartic proteinase from cardoon (*Cynara cardunculus*) *Journal of Biological Chemistry*, 274 (24): 16685-16693.
- Welder, F.,** Moody, E., McCorquodale, Colyer, C.L. (2002) Proteinase assay by capillary electrophoresis employing fluorescence-quenched protein-dye conjugates. *Electrophoresis*, 23 (11):1585-1590.
- Xia, Y.,** Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z., Patel, K., Dixon, R.A., Lamb, C. (2004) An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *EMBO Journal*, 23 (4): 980-988.

Zhu, Y., Conner, G.E. (1994) Intermolecular association of lysosomal protein precursors during biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (5): 3846-3851.

7 Anexos

Anexo 1:

Alinhamento da sequência de cardosina B com o resultado das sequenciações da construção cardosina A+PSIB, inserida no vector pSK, com os oligonucleótidos M13uni e M13rev. A região PSI está destacada a vermelho. O alinhamento foi realizado recorrendo ao programa ClustalW2.

CardosinaB	ATGGGAACCCCAATCAAAGCAAACGTGCTTGCCTTGTCTGTTTTTCTTCTATCTCCC	60
CardosinaA+PSIB	ATGGGTACCTCAATCAAAGCAAACGTGCTTGCCTTGTCTGTTTTATCTTCTATCACCT *****	60
CardosinaB	ACTGCATTTTCGGTCTCCAACGGCGGATTGCTTCCGGTGGACTTAAAAAGAGGAAGGTG	120
CardosinaA+PSIB	ACTGTATTTTCGGTCTCCGATGACGGATTGATTGGAATTGGACTTAAAAAGAGGAAGGTG ****	120
CardosinaB	GACCGACTCGACCAACTTCGTGCACATGGCGTGCATATGTTAGGAAATGCTCGAAAAGAT	180
CardosinaA+PSIB	GACCGAATCGACCAACTTCGTGGCGTTCGTGCGTAAATGGAAGGAAATGCTCGAAAAGAT *****	180
CardosinaB	TTTGGCTTCCGCCGTACGCTCAGGGACTCGGGTAGTGGCATTGTTGCACTAACGAACGAT	240
CardosinaA+PSIB	TTTCGGCTTCCGTTGACGTTAGGACTCGGGTAGTGCCGTTGTTGCACTAACGAACGAT **	240
CardosinaB	AGGGATACTGCGTATTATGGTGGAGATTGGTATCGGAACTCCACCTCAAACCTTCGCGATG	300
CardosinaA+PSIB	AGGGATACTTCGTATTTTGGTGGAGATTGGTATCGGAACTCCACCTCAGAAGTTCACAGTG *****	300
CardosinaB	ATTTTGTACACCGGAAGTTCGTATCTATGGGTACCTTCTACAAAGTGCACACTTCACTA	360
CardosinaA+PSIB	ATTTTCGATACCGAAGTTCGTATCTATGGGTGCCTTCTCAAAGTGCATCAATTCAAAA *****	360
CardosinaB	GCTTGTGTGATTACCCCAAGTACGACTCGGGCGATTCAAGTACCTACAAGGGAATGGG	420
CardosinaA+PSIB	GCTTGTGTCGCGCACTCAATGTATGAGTACGAGCGATTCAAGTACCTACAAGGGAATGGG *****	420
CardosinaB	ACAACCTGCGAGTATTCAATATGGGACCGGAGCGATCGTTGGTTTTTATAGCCAAGACTCT	480
CardosinaA+PSIB	ACATCTGGCGCTATTATATATGGAACCGGATCAATCACGGTTTTTTATAGCCAAGACTCT ***	480
CardosinaB	GTCGAAGTGGGTGATCTTGTGTTGAACACCAGGATTTTATAGAGACAACCGAAGAGGAC	540
CardosinaA+PSIB	GTCACGATCGGTGATCTTGTGTTAAAGAGCAGGATTTTATAGAGGCAACCGATGAGGCC ***	540
CardosinaB	GACACTGTGTTCTTGAAGCGAGTTTGTGATGATGACTTGGCCTTGGATTTCAAGAGATC	600
CardosinaA+PSIB	GACAATGTTTTCTTGCATGGGTTGTTGACGGTATACTCGGCCTTTCATTTCAAACGATC ****	600
CardosinaB	TCGGCTGGGAAGCGGTTCTGTCTGGTACAACATGGTTAATCAAGGGCTTGTGTAAGAA	660
CardosinaA+PSIB	TCCG-----TTCTGTCTGGTACAACATGGTTAATCAAGGGCTTGTGTAAGAA **	648
CardosinaB	GCTGTGTTTTCTTTTGGCTTAATCGCAATGTTGATGAGGAAGAAGGGGAGAGCTCGTG	720
CardosinaA+PSIB	CGGAGGTTTTCTTTGGTTGAATCGCAATGTTGATGAGGAAGAAGGTGGCGAATCGTG *****	708
CardosinaB	TTTGGTGGGTTGATCCTAATCATTTTAGGGGTAACCACACTTATGTCCCTGTGACTCGA	780
CardosinaA+PSIB	TTTGGTGGGCTTGACCCTAATCATTTTAGGGGTGACCACACTTATGTCCCTGTGACTTAT *****	768
CardosinaB	AAGGGCTATTGGCAGTTTGAAGTGGGTGACGTTCTTATTGGAGATAAAAGTCCGGATTT	840
CardosinaA+PSIB	CAGTACTATTGGCAGTTTGAAGTGGGTGACGTTCTTATTGGAGATAAAAGTACCGGATTT **	828
CardosinaB	TGTGCCGGTGGTTGTGCGACAAATGCAGACTCTGGAACCTCTTTCTTTGCAGGTCCAACG	900
CardosinaA+PSIB	TGCGCCCTGTTGTCAAGCATTTGCCGACTCTGGAACCTCTTTGTTGTGAGGTCCAACG **	888
CardosinaB	GCTATTATTACTCAAATCAATCAAGCAATTGGTGCAAAAGGGGTTTAAACCAACAATGC	960
CardosinaA+PSIB	GCTATTGTTACTCAAATCAATCATGCAATTGGCGCTAACGGG---TAAACCAACAATGC *****	945

CardosinaB	AAACATTGGTTGGTCAGTATGGAAGAATATGGTTCAGATGCTCACATCTGAGGTGCAA	1020
CardosinaA+PSIB	AAACATTGGTTGGTCAGTATGGAAGAATATGGTTCAGATGCTCACATCTGAGGTGCAA *****	1005
CardosinaB	CCTGATAAAATCTGTTCTCATATGAAGCTCTGCACCTTTTGATGGTGCTCACGATGTTAGA	1080
CardosinaA+PSIB	CCTGATAAAATCTGTTCTCATATGAAGCTCTGCACCTTTTGATGGTGCTCACGATGTTAGA *****	1065
CardosinaB	TCAATGATTGAGAGCGTGGTTGACAAGAACAACGACAAGTCTTCTGGTGGCGAGATTTGT	1140
CardosinaA+PSIB	TCAATGATTGAGAGCGTGGTTGACAAGAACAACGACAAGTCTTCTGGTGGCGAGATTTGT *****	1125
CardosinaB	ACCTTTTGTGAGATGGCCCTCGTTAGGATGCAGAATGAAATCAAACGAAACGAGACTGAA	1200
CardosinaA+PSIB	ACCTTTTGTGAGATGGCCCTCGTTAGGATGCAGAATGAAATCAAACGAAACGAGACTGAA *****	1185
CardosinaB	GATAACATAATCAACCATGTCAATGAGGTGTGTGATCAGTTACCCACTTCAAGTGCAGAA	1260
CardosinaA+PSIB	GATAACATAATCAACCATGTCAATGAGGTGTGTGATCAGTTACCCACTTCAAGTGCAGAA *****	1245
CardosinaB	-----TCGATGGTAGACTGCAATGGTATTTCTCCATGCCTAATATTGCC	1305
CardosinaA+PSIB	ACTTCATCTGAAGAATTACAAGTAGATTGCAACACTCTTCTCCATGCCAATGTTCC * ***** * ***** *** **	1305
CardosinaB	TTCACAATTGGTAGCAAATTTTTGAGGTCACCCAGAACAGTACATCTATAAAGTGGGT	1365
CardosinaA+PSIB	TTTACAATTGGTAGCAAATAATTTGGGCTCACCCAGAGCAGTACATCTTGAAAGTCGGT ** ***** ***** * ***** ***** ***** **	1365
CardosinaB	GAGGGAGAAGCAGCAACATGCATCAGTGGATTCAGTCTCGATATTATGTCTCCTCAA	1425
CardosinaA+PSIB	AAGGGAGAAGCAACACAATGCATCAGTGGATTCAGTCTCGATGGATGC---GACTCTCTT ***** ** ***** * *** * ** **	1422
CardosinaB	GGACCTATATGGATCTTGGGAGATATGTTTATGGGTCCATACCACACAGTGTTCGATTAT	1485
CardosinaA+PSIB	GGACCTCTGTGGATCCTCGGAGATGTTTTTCATGCGTCCATATCACACAGTGTTCGATTAT ***** * ***** * ***** * *** ***** ***** *****	1482
CardosinaB	GGCAAGTTACGAGTGGGATTTGCAGAAGCAGTTTGGAGAGATGA----AAAACCATCCTA	1540
CardosinaA+PSIB	GGCAATTTACTAGTTGGATTTGCAGAAGCAGCTTGGAGAGCTCAGCCTGAATTCAGCACA ***** ***** ** ***** ***** * * ** ** * *	1542
CardosinaB	CCAGCTCCAATAAAAGCCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCT	1600
CardosinaA+PSIB	CTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTAT * ** * * * * * * * * * * * * *	1602
CardosinaB	C-----	1601
CardosinaA+PSIB	TCTAACGCGTCA	1614

Anexo 2:

Alinhamento da sequência de cardosina A com o resultado das sequenciações da construção cardosina B+PSIA, inserida no vector pCR2.1, com os oligonucleótidos M13uni e M13rev. A região PSI está destacada a vermelho. O alinhamento foi realizado recorrendo ao programa ClustalW2.

CardosinaA	ATGGGCACCTCAATCAAAGCAAACGTGCTTGCCTTGTCTTGTGTTTATCTTCTATCACCT	60
CardosinaB+PSIA	ATGGGAACCCCAATCAAAGCAAACGTGCTTGCCTTGTCTTGTGTTTATCTTCTATCTCCC	60
	***** ** *	
CardosinaA	ACTGTATTTTCGGTCTCCGATGACGGATTGATTCGAATTGGACTTAAAAAGAGGAAGGTG	120
CardosinaB+PSIA	ACTGCATTTTCGGTCTCCAACGGCGGATTGCTTCGGGTTGGACTTAAAAAGAGGAAGGTG	120
	*** * ** *	
CardosinaA	GACCGAATCGACCAACTTCGTGGACGTCGTGCGTAAATGGAAGGAAATGCTCGAAAAGAT	180
CardosinaB+PSIA	GACCGACTCGACCAACTTCGTGCGATGGCGTGCATATGTTAGGAAATGCTCGAAAAGAT	180
	***** * * * * *	
CardosinaA	TTCGGCTTCCGTGGTACAGTTAGGACTCGGGTAGTGCCGTGTTGCACTAACGAACGAT	240
CardosinaB+PSIA	TTTGGCTTCCGCCGTACGCTCAGGACTCGGGTAGTGCCATTGTTGCACTAACGAACGAT	240
	** * * * * * * * * * *	
CardosinaA	AGGGATACTTCGTATTTGGTGAGATTGGTATCGGAACTCCACCTCAGAAGTTCACAGTG	300
CardosinaB+PSIA	AGGGATACTGCGTATTTGGTGAGATTGGTATCGGAACTCCACCTCAAACTTCGCAAGTG	300
	***** * * * * *	
CardosinaA	ATTTTCGATACCGAAGTTCTGTTCTATGGGTGCCTTCTCAAAGTGCATCAATTCAAAA	360
CardosinaB+PSIA	ATTTTTCGATACCGAAGTTCTGATCTATGGGTGCCTTCTCAAAGTGCACACTTCACTA	360
	***** ** * * * * *	
CardosinaA	GCTTGTGTCGCGCACTCAATGTATGAGTCGAGCGATTCAAGTACCTACAAGGAAAATGGG	420
CardosinaB+PSIA	GCTTGTGTCGATTCAACCAAGGTACGACTCGGGCGATTCAAGTACCTACAAGGAAAATGGG	420
	***** ** * * * * *	
CardosinaA	ACATCTGGCGCTATTTATATATGGAACCGGATCAATCACGGGTTTTTTTAGCCAAGACTCT	480
CardosinaB+PSIA	ACAATCTGCGAGTATTTCAATATGGGACCGGAGCGATCGTTGGTTTTTATAGCCAAGACTCT	480
	*** ** * * * * * * * * *	
CardosinaA	GTCACGATCGGTGATCTTGTGTTAAAGAGCAGGATTTTATAGAGGCAACCGATGAGGCC	540
CardosinaB+PSIA	GTCAAGTGGGTGATCTTGTGTTGAACACCAGGATTTTATAGAGACAACCGAAGAGGAC	540
	*** * * * * * * * * * *	
CardosinaA	GACAATGTTTCTTGCATGGGTTGTTGACGGTATACTCGGCCTTCATTTCAAACGATC	600
CardosinaB+PSIA	GACTGTGTTCTTGAAAAGCGAGTTTGATGGTATACTTGGCCTTGATTTCAAGAGATC	600
	*** ** * * * * * * * * *	
CardosinaA	TCCG-----TTCTGTCTGGTACAACATGGTTAATCAAGGGCTTGTAAAGAA	648
CardosinaB+PSIA	TCCGCTGGGAAAGCGTTCCTGTCTGGTACAACATGGTTAATCAAGGGCTTGTAAAGAA	660
	** * * * * * * * * * *	
CardosinaA	CGGAGGTTTTCCTTTTGGTTGAATCGCAATGTTGATGAGGAAGAAGGTGGCAACTCGTG	708
CardosinaB+PSIA	GCTGTGTTTTCCTTTTGGCTTAATCGCAATGTTGATGAGGAAGAAGGGGAGAGCTCGTG	720
	***** * * * * * * * * *	
CardosinaA	TTTGGTGGGCTTGACCCTAATCATTTTAGGGGTGACCACACTTATGTCCCTGTGACTTAT	768
CardosinaB+PSIA	TTTGGTGGGCTTGATCCTAATCATTTTAGGGGTAACCACACTTATGTCCCTGTGACTCGA	780
	***** * * * * * * * * *	
CardosinaA	CAGTACTATTGGCAGTTTGAATCGGTGACGTTCTTATTGGAGATAAAAGTACCGGATTT	828
CardosinaB+PSIA	AAGGGCTATTGGCAGTTTGAATCGGTGACGTTCTTATTGGAGATAAAAGTACCGGATTT	840
	** * * * * * * * * * *	
CardosinaA	TGCGCCCCTGGTTGTCAAGCATTTGCCGACTCTGGAACCTCTTTGTTGTGAGTCCAACG	888
CardosinaB+PSIA	TGTGCCGGTGGTTGTGAGCAATTCGAGACTCTGGAACCTCTTTCTTTGCGAGTCCAACG	900
	** * * * * * * * * * *	
CardosinaA	GCTATTGTTACTCAAATCAATCATGCAATTGGCGCTAACGGGT---CATGAACCGCAA	945
CardosinaB+PSIA	GCTATTATTACTCAAATCAATCAAGCAATTGGTGCAAAGGGTTGTCATGAACCGCAA	960
	***** * * * * * * * * *	

CardosinaA	TGCAAGACAGTGGTTAGTCGTTATGGAAGGGATATAAATTGAGATGCTCCGATCTAAGATA	1005
CardosinaB+PSIA	TGCAAGACAGTGGTTAGTCGTTATGGAAGGGATATAAATTGAGATGCTCCGATCTAAGATA *****	1020
CardosinaA	CAACCTGATAAAAATATGTTTCGCACATGAAGTTATGCACCTTTTGATGGTGCCTCGCGATGTT	1065
CardosinaB+PSIA	CAACCTGATAAAAATATGTTTCGCACATGAAGTTATGCACCTTTTGATGGTGCCTCGCGATGTT *****	1080
CardosinaA	AGTTCAATCATTGAGAGCGTGGTTGACAAGAATAACGACAAGTCTTCTGGTGGCATAACAT	1125
CardosinaB+PSIA	AGTTCAATCATTGAGAGCGTGGTTGACAAGAATAACGACAAGTCTTCTGGTGGCATAACAT *****	1140
CardosinaA	GATGAGATGTGCACCTTCTGTGAGATGGCGGTCTGTTGGATGCAAAAACGAAATCAAACAA	1185
CardosinaB+PSIA	GATGAGATGTGCACCTTCTGTGAGATGGCGGTCTGTTGGATGCAAAAACGAAATCAAACAA *****	1200
CardosinaA	AGCGAGACTGAAGATAACATAATCAACTATGCCAACGAGTTGTGTGAACACTTATCCACT	1245
CardosinaB+PSIA	AGCGAGACTGAAGATAACATAATCAACTATGCCAACGAGTTGTGTGAACACTTATCCACT--- *****	1257
CardosinaA	TCATCTGAAGAATTACAAGTAGATTGCAACACTCTTTCCTCCATGCCCAATGTTTCCTTT	1305
CardosinaB+PSIA	-----TCGATAGTAGACTGCAATGGTATTTCCCTCCATGCCTAATATTGCCTTC * * * * * * * * * *	1305
CardosinaA	ACAATTGGTGGCAAAAATTTGGGCTCACCCAGAGCAGTACATCTTGAAAGTCGGTAAG	1365
CardosinaB+PSIA	ACAATTGGTAGCAAACTTTTGGAGTCCACCCAGAACAGTACATCTATAAAGTGGGTGAG ***** * * * * * * * * *	1365
CardosinaA	GGAGAAGCAACACAATGCATCAGTGGATTCACTGCGATGGATGCGA---CTCTTCTTGGGA	1422
CardosinaB+PSIA	GGAGAAGCAGCAACATGCATCAGTGGATTCACTGCTCTCGATATTATGTCTCCTCAAGGA ***** * * * * * * * * *	1425
CardosinaA	CCTCTGTGGATCCTCGGAGATGTTTTCATGCGTCCATATCACACAGTGTGTTGATTATGGC	1482
CardosinaB+PSIA	CCTATATGGATCTTGGGAGATATGTTTATGGGTCCATACCACACAGTGTTCGATTATGGC * * * * * * * * * *	1485
CardosinaA	AATTTACTAGTTGGATTTGCAGAAGCAG-----CTTGAAT-CAAGCTTATCGATA-CC	1533
CardosinaB+PSIA	AAGTTACGAGTGGATTTGCAGAAGCAGTGTGACCCCTGAATTCAGCACACTGGCGGCC * * * * * * * * * *	1545
CardosinaA	GTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTT-TGTTCCCTTTAGTGAGGGTAATG--	1590
CardosinaB+PSIA	GTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTAACGCG * * * * * * * * * *	1605
CardosinaA	-----	
CardosinaB+PSIA	TCACCW 1611	

Anexo 3:

Alinhamento da sequência de cardosina A com o resultado das sequenciações da construção cardosina AmutPSI, inserida no vector pSK, com os oligonucleótidos M13uni e M13rev. As mutações introduzidas pelos oligonucleótidos mutados estão destacadas a vermelho. O alinhamento foi realizado recorrendo ao programa ClustalW2.

CardosinaA	ATGGGCACCTCAATCAAAGCAAACGTGCTTGCCTTGGTCTTGTGTTTATCTTCTATCACCT	60
CardosinaAmutPSI	ATGGGCACCTCAATCAAAGCAAACGTGCTTGCCTTGGTCTTGTGTTTATCTTCTATCACCT	60

CardosinaA	ACTGTATTTTCGGTCTCCGATGACGGATTGATTGAAATGGACTTAAAAAGAGGAAGGTG	120
CardosinaAmutPSI	ACTGTATTTTCGGTCTCCGATGACGGATTGATTGAAATGGACTTAAAAAGAGGAAGGTG	120

CardosinaA	GACCGAATCGACCAACTTCGTGGACGTCGTGCGTTAATGGAAGGAAATGCTCGAAAAGAT	180
CardosinaAmutPSI	GACCGAATCGACCAACTTCGTGGACGTCGTGCGTTAATGGAAGGAAATGCTCGAAAAGAT	180

CardosinaA	TTCGGCTTCCGTGGTACAGTTAGGGACTCGGGTAGTGCCGTTGTTGCACTAACGAACGAT	240
CardosinaAmutPSI	TTCGGCTTCCGTGGTACAGTTAGGGACTCGGGTAGTGCCGTTGTTGCACTAACGAACGAT	240

CardosinaA	AGGGATACTTCGTATTTTGGTGAGATTGGTATCGGAACTCCACCTCAGAAGTTCACAGTG	300
CardosinaAmutPSI	AGGGATACTTCGTATTTTGGTGAGATTGGTATCGGAACTCCACCTCAGAAGTTCACAGTG	300

CardosinaA	ATTTTCGATACCGGAAGTTCTGTTCTATGGGTGCCTTCTTCAAAGTGCATCAATTCAAAA	360
CardosinaAmutPSI	ATTTTCGATACCGGAAGTTCTGTTCTATGGGTGCCTTCTTCAAAGTGCATCAATTCAAAA	360

CardosinaA	GCTTGTCTGTCGCACTCAATGTATGAGTCGAGCGATTCAAGTACTTACAAGGAAAATGGG	420
CardosinaAmutPSI	GCTTGTCTGTCGCACTCAATGTATGAGTCGAGCGATTCAAGTACTTACAAGGAAAATGGG	420

CardosinaA	ACATCTGGCGCTATTATATATGGAACCGGATCAATCACGGGTTTTTTTAGCCAAGACTCT	480
CardosinaAmutPSI	ACATCTGGCGCTATTATATATGGAACCGGATCAATCACGGGTTTTTTTAGCCAAGACTCT	480

CardosinaA	GTCACGATCGGTGATCTTGTGTTAAAGAGCAGGATTTTATAGAGGCAACCGATGAGGCC	540
CardosinaAmutPSI	GTCACGATCGGTGATCTTGTGTTAAAGAGCAGGATTTTATAGAGGCAACCGATGAGGCC	540

CardosinaA	GACAATGTTTTCTTGCATGGGTTGTTTACGGTATACTCGGCCTTTCATTCAAACGATC	600
CardosinaAmutPSI	GACAATGTTTTCTTGCATGGGTTGTTTACGGTATACTCGGCCTTTCATTCAAACGATC	600

CardosinaA	TCCGTTCTCTGTCTGGTACAACATGGTTAATCAAGGGCTTGTTAAAGAACGGAGTTTTCC	660
CardosinaAmutPSI	TCCGTTCTCTGTCTGGTACAACATGGTTAATCAAGGGCTTGTTAAAGAACGGAGTTTTCC	660

CardosinaA	TTTGGTTGAATCGCAATGTTGATGAGGAAGAAGGTGGCGAACTCGTGTGTTGGTGGGCTT	720
CardosinaAmutPSI	TTTGGTTGAATCGCAATGTTGATGAGGAAGAAGGTGGCGAACTCGTGTGTTGGTGGGCTT	720

CardosinaA	GACCCTAATCATTTTAGGGGTGACCACACTTATGTCCCTGTGACTTATCAGTACTATTGG	780
CardosinaAmutPSI	GACCCTAATCATTTTAGGGGTGACCACACTTATGTCCCTGTGACTTATCAGTACTATTGG	780

CardosinaA	CAGTTTGGAAATCGGTGACGTTCTTATTGGAGATAAAAGTACCGGATTTTGCGCCCTGGT	840
CardosinaAmutPSI	CAGTTTGGAAATCGGTGACGTTCTTATTGGAGATAAAAGTACCGGATTTTGCGCCCTGGT	840

CardosinaA	TGTCAAGCATTGCGGACTCTGGAACCTCTTTGTGTGTCAGGTCCAACGGCTATTGTTACT	900
CardosinaAmutPSI	TGTCAAGCATTGCGGACTCTGGAACCTCTTTGTGTGTCAGGTCCAACGGCTATTGTTACT	900

CardosinaA	CAAATCAATCATGCAATTGGCGCTAACGGGTCATGAACCAGCAATGCAAGACAGTGGTT	960
CardosinaAmutPSI	CAAATCAATCATGCAATTGGCGCTAACGGGTCATGAACCAGCAATGCAAGACAGTGGTT	960

CardosinaA	AGTCGTTATGGAAGGGATATAAATTGAGATGCTCCGATCTAAGATACAACCTGATAAAATA	1020
CardosinaAmutPSI	AGTCGTTATGGAAGGGATATAAATTGAGATGCTCCGATCTAAGATACAACCTGATAAAATA *****	1020
CardosinaA	TGTTTCGCACATGAAGTTATGCACCTTTTGATGGTGCTCGCGATGTTAGTTCAATCATTGAG	1080
CardosinaAmutPSI	TGTTTCGCACATGAAGTTATGCACCTTTTGATGGTGCTCGCGATGTTAGTTCAATCATTGAG *****	1080
CardosinaA	AGCGTGGTTGACAAGAATAACGACAAGTCTTCTGGTGGCATAACATGATGAGATGTGCACC	1140
CardosinaAmutPSI	AGCGTGGTTGACAAGAATAACGACAAGTCTTCTGGTGGCATAACATGATGAGATGTGCACC *****	1140
CardosinaA	TTCTGTGAGATGGCGGTCGTTTGGATGCAAAACGAAATCAAACAAAGCGAGACTGAAGAT	1200
CardosinaAmutPSI	TTCTGTGAGATGGCGGTCGTTTGGATGCAAAACGAAATCAAACAAAGCGAGACTGAAGAT *****	1200
CardosinaA	AACATAATCAACTATGCCAACGAGTTGTGTGAACACTTATCCACTTCACTGAAGAATTA	1260
CardosinaAmutPSI	AACATAATCAACTATGCCAACGAGTTGTGTGAACACTTATCCACTTCACTGAAGAATTA *****	1260
CardosinaA	CAAGTAGATTGCAACACTCTTTCCTCCATGCCCAATGTTTCCTTTACAATTGGTGGCAAA	1320
CardosinaAmutPSI	CAAGTAGATTGCAACACTCTTTCCTCCATGCCCAATGTTTCCTTTACAATTGGTGGCAAA *****	1320
CardosinaA	AAATTTGGGCTCACCCCAGAGCAGTACATCTTGAAAGTCGGTAAGGGAGAAGCAACACAA	1380
CardosinaAmutPSI	AAATTTGGGCTCACCCCAGAGCAGTACATCTTGAAAGTCGGTAAGGGAGAAGCAACACAA *****	1380
CardosinaA	TGCATCAGTGGATTCACTGCGATGGATGCGACTCTTCTTGGACCTCTGTGGATCCTCGGA	1440
CardosinaAmutPSI	TGCATCAGTGGATTCACTGCGATGGATGCGACTCTTCTTGGACCTCTGTGGATCCTCGGA *****	1440
CardosinaA	GATGTTTTTCATGCGTCCATATCACACAGTGTGTTGATTATGGCAATTTACTAGTTGGATT	1500
CardosinaAmutPSI	GATGTTTTTCATGCGTCCATATCACACAGTGTGTTGATTATGGCAATTTACTAGTTGGATT *****	1500
CardosinaA	GCAGAAGCAGCTTGAATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGCCCGGTACC	1560
CardosinaAmutPSI	GCAGAAGCAGCTTGAATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGCCCGGTACC *****	1560
CardosinaA	CAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTAATG	1590
CardosinaAmutPSI	CAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTAATG *****	1590

Anexo 4:

Alinhamento da sequência de cardosina B com o resultado das sequenciações da construção cardosina BmutPSI, inserida no vector pCR2.1, com os oligonucleótidos M13uni e M13rev. As mutações introduzidas pelos oligonucleótidos mutados estão destacadas a vermelho. O alinhamento foi realizado recorrendo ao programa ClustalW2.

CardosinaB	ATGGGAACCCCAATCAAAGCAAACGTGCTTGCCTTGTCTTGTGTTTTTCTTCTATCTCCC	60
CardosinaBmutPSI	ATGGGAACCCCAATCAAAGCAAACGTGCTTGCCTTGTCTTGTGTTTTTCTTCTATCTCCC *****	60
CardosinaB	ACTGCATTTTCGGTCTCCAACGGCGGATTGCTTCGGGTGGACTTAAAAAGAGGAAGGTG	120
CardosinaBmutPSI	ACTGCATTTTCGGTCTCCAACGGCGGATTGCTTCGGGTGGACTTAAAAAGAGGAAGGTG *****	120
CardosinaB	GACCGACTCGACCAACTTCGTGCACATGGCGTGCATATGTTAGGAAATGCTCGAAAAGAT	180
CardosinaBmutPSI	GACCGACTCGACCAACTTCGTGCACATGGCGTGCATATGTTAGGAAATGCTCGAAAAGAT *****	180
CardosinaB	TTTGGCTTCCGCCGTACGCTCAGGGACTCGGGTAGTGGCATTGTTGCACTAACGAACGAT	240
CardosinaBmutPSI	TTTGGCTTCCGCCGTACGCTCAGGGACTCGGGTAGTGGCATTGTTGCACTAACGAACGAT *****	240
CardosinaB	AGGGATACTGCGTATTATGGTGAGATTGGTATCGGAACTCCACCTCAAAACTTCGCAGTG	300
CardosinaBmutPSI	AGGGATACTGCGTATTATGGTGAGATTGGTATCGGAACTCCACCTCAAAACTTCGCAGTG *****	300
CardosinaB	ATTTTGGACACCGGAAGTTCGTGATCTATGGGTACCTTCTACAAAGTGCACACTTCACTA	360
CardosinaBmutPSI	ATTTTGGACACCGGAAGTTCGTGATCTATGGGTACCTTCTACAAAGTGCACACTTCACTA *****	360
CardosinaB	GCTTGTGTGATTACCCAAGGTACGACTCGGGCGATTCAAGTACCTACAAGGGAAATGGG	420
CardosinaBmutPSI	GCTTGTGTGATTACCCAAGGTACGACTCGGGCGATTCAAGTACCTACAAGGGAAATGGG *****	420
CardosinaB	ACAACCTGCGAGTATTCAATATGGGACCGGAGCGATCGTTGGTTTTTATAGCCAAGACTCT	480
CardosinaBmutPSI	ACAACCTGCGAGTATTCAATATGGGACCGGAGCGATCGTTGGTTTTTATAGCCAAGACTCT *****	480
CardosinaB	GTCGAAGTGGGTGATCTTGTGTTGAACACCAGGATTTTATAGAGACAACCGAAGAGGAC	540
CardosinaBmutPSI	GTCGAAGTGGGTGATCTTGTGTTGAACACCAGGATTTTATAGAGACAACCGAAGAGGAC *****	540
CardosinaB	GACACTGTGTTCTTGAAAAGCGAGTTTGATGGTATACTTGGCCTTGGATTTCAGAGATC	600
CardosinaBmutPSI	GACACTGTGTTCTTGAAAAGCGAGTTTGATGGTATACTTGGCCTTGGATTTCAGAGATC *****	600
CardosinaB	TCGGCTGGGAAAGCGGTTCTGTCTGGTACAACATGGTTAATCAAGGGCTTGTGAAGAA	660
CardosinaBmutPSI	TCGGCTGGGAAAGCGGTTCTGTCTGGTACAACATGGTTAATCAAGGGCTTGTGAAGAA *****	660
CardosinaB	GCTGTGTTTTCTTTTGGCTTAATCGCAATGTTGATGAGGAAGAAGGGGGAGAGCTCGTG	720
CardosinaBmutPSI	GCTGTGTTTTCTTTTGGCTTAATCGCAATGTTGATGAGGAAGAAGGGGGAGAGCTCGTG *****	720
CardosinaB	TTTGGTGGGGTTGATCCATCAATTTTAGGGGTAACCACACTTATGTCCTGTGACTCGA	780
CardosinaBmutPSI	TTTGGTGGGGTTGATCCATCAATTTTAGGGGTAACCACACTTATGTCCTGTGACTCGA *****	780
CardosinaB	AAGGGCTATTGGCAGTTTGAAAAGGGTGACGTTCTTATTGGAGATAAAAGTTCGGATT	840
CardosinaBmutPSI	AAGGGCTATTGGCAGTTTGAAAAGGGTGACGTTCTTATTGGAGATAAAAGTTCGGATT *****	840
CardosinaB	TGTGCCGGTGGTTGTGCAGCAATGCAGACTCTGGAACCTCTTTCTTTGCAGGTCCAACG	900
CardosinaBmutPSI	TGTGCCGGTGGTTGTGCAGCAATGCAGACTCTGGAACCTCTTTCTTTGCAGGTCCAACG *****	900
CardosinaB	GCTATTATACTCAAATCAATCAAGCAATGGTGCAAAGGGTTTTAAACCAACAATGC	960
CardosinaBmutPSI	GCTATTATACTCAAATCAATCAAGCAATGGTGCAAAGGGATCTTACAGCAACAATGC ***** * * * *	960

CardosinaB	AAAACATTGGTTGGTTCAGTATGGAAAGAATATGGTTCAGATGCTCACATCTGAGGTGCAA	1020
CardosinaBmutPSI	AAAACATTGGTTGGTTCAGTATGGAAAGAATATGGTTCAGATGCTCACATCTGAGGTGCAA *****	1020
CardosinaB	CCTGATAAAATCTGTTCTCATATGAAGCTCTGCACTTTTGATGGTGCTCACGATGTTAGA	1080
CardosinaBmutPSI	CCTGATAAAATCTGTTCTCATATGAAGCTCTGCACTTTTGATGGTGCTCACGATGTTAGA *****	1080
CardosinaB	TCAATGATTGAGAGCGTGGTTGACAAGAACAACGACAAGTCTTCTGGTGGCGAGATTTGT	1140
CardosinaBmutPSI	TCAATGATTGAGAGCGTGGTTGACAAGAACAACGACAAGTCTTCTGGTGGCGAGATTTGT *****	1140
CardosinaB	ACCTTTTGTGAGATGGCCCTCGTTAGGATGCAGAATGAAATCAAACGAAACGAGACTGAA	1200
CardosinaBmutPSI	ACCTTTTGTGAGATGGCCCTCGTTAGGATGCAGAATGAAATCAAACGAAACGAGACTGAA *****	1200
CardosinaB	GATAACATAATCAACCATGTCAATGAGGTGTGTGATCAGTTACCCACTTCAAGTCAGAA	1260
CardosinaBmutPSI	GATAACATAATCAACCATGTCAATGAGGTGTGTGATCAGTTACCCACTTCAAGTCAGAA *****	1260
CardosinaB	TCGATGGTAGACTGCAATGGTATTTCCATGCCTAATATTGCCTTCACAATTGGTAGC	1320
CardosinaBmutPSI	TCGATGGTAGACTGCAATGGTATTTCCATGCCTAATATTGCCTTCACAATTGGTAGC *****	1320
CardosinaB	AACTTTTGGAGGTCACCCAGAACAGTACATCTATAAAGTGGGTGAGGGAGAAGCAGCA	1380
CardosinaBmutPSI	AACTTTTGGAGGTCACCCAGAACAGTACATCTATAAAGTGGGTGAGGGAGAAGCAGCA *****	1380
CardosinaB	ACATGCATCAGTGGATTCAGTCTCTCGATATTATGTCTCCTCAAGGACCTATATGGATC	1440
CardosinaBmutPSI	ACATGCATCAGTGGATTCAGTCTCTCGATATTATGTCTCCTCAAGGACCTATATGGATC *****	1440
CardosinaB	TTGGGAGATATGTTTATGGGTCCATACCACACAGTGTTCGATTATGGCAAGTTACGAGTG	1500
CardosinaBmutPSI	TTGGGAGATATGTTTATGGGTCCATACCACACAGTGTTCGATTATGGCAAGTTACGAGTG *****	1500
CardosinaB	GGATTGTCAGAAGCAGTTTGAG	1522
CardosinaBmutPSI	GGATTGTCAGAAGCAGTTTGAG *****	1522