



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

DIEGO PEREIRA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CORRELAÇÕES ESTRUTURAIS COM
ADIPONECTINA HUMANA DE UMA PROTEÍNA PURIFICADA DO LÁTEX DE
Cryptostegia grandiflora R. BR.**

**FORTALEZA
2014**

DIEGO PEREIRA DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CORRELAÇÕES ESTRUTURAIS COM
ADIPONECTINA HUMANA DE UMA PROTEÍNA PURIFICADA DO LÁTEX DE
Cryptostegia grandiflora R. BR.

Tese submetida à Coordenação
do Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade
Federal do Ceará, como requisito
parcial para a obtenção do grau
de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio
Viana Ramos

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

S714c Souza, Diego Pereira de.
Caracterização molecular e correlações estruturais com adiponectina humana de uma proteína purificada do látex de *Cryptostegia grandiflora* r. BR. / Diego Pereira de Souza. – 2014.
113 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Bioquímica vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.

1. Látex. 2. Modelagem molecular. 3. Fitoquímicos. I. Título.

CDD 574.192

DIEGO PEREIRA DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CORRELAÇÕES ESTRUTURAIS COM
ADIPONECTINA HUMANA DE UMA PROTEÍNA PURIFICADA DO LÁTEX DE
CRYPTOSTERGIA GRANDIFLORA R. BR.

Tese submetida à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica.

Tese aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. José Helio Costa (Examinador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Auclécio Cunha de Oliveira (Examinador)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dra. Luciana Magalhães Rabelo Alencar (Examinador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Em memória de
Ananias Azevedo de Souza.

AGRADECIMENTOS

INSTITUCIONAIS

Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

- Universidade Federal do Ceará (UFC), através do Laboratório de Plantas Laticíferas, coordenado pelo Professor Dr. Márcio Viana Ramos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM);
- Universidade Federal do Ceará (UFC), através do Laboratório de Genética, coordenado pelo Professor Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
- Universidade de Fortaleza (Unifor), através do Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos, coordenado pela Professora Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira, do Curso de Farmácia – Centro de Ciências da Saúde (CCS);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP)
- Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

PESSOAS

Ao Professor Márcio Viana pela competência e valorização acadêmica que sempre procurou semear em mim. Agradeço a confiança e paciência (muita paciência). Por me fazer acreditar em um futuro grandioso. Pela sua obstinação em viabilizar meu crescimento como estudante e pessoa. Pela orientação. Por ter acreditado em mim e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa pela valiosa orientação científica. Por ter recebido em seu laboratório. Agradeço pela disponibilidade em me ajudar, mesmo sabendo da minha inexperiência em biologia molecular.

Ao Prof Dr. Cléverson Diniz pelo incentivo que sempre me deu e por seu empenho e amizade ao longo da minha vida acadêmica, bem como contribuir com meu desenvolvimento intelectual

Aos Prof. Dr^a. Ana Cristina por ter me recebido em seu laboratório e por sua disponibilidade em me ajudar.

Ao Dr. Dr. Frederico Bruno por seu companheirismo. Pela orientação e por estar sempre disposto a esclarecer dúvidas e fornecer valiosas sugestões para a complementação do presente trabalho.

Ao Ms. José Ednézio por seu companheirismo e sua imensa disponibilidade em me ajudar em qualquer hora.

Aos amigos de Laboratório de Proteínas Lácticíferas. Pela ótima e agradável convivência e amizade. A Danielle Aragão, Raquel Sombra, Carol Viana pela amizade inconfundível. Ao Jefferson Soares pelos grandiosos ensinamentos e amizade.

Aos professores do Departamento de Biologia e de Bioquímica e Biologia Molecular. Pelas valiosas contribuições na minha formação acadêmica e como cidadão

Aos amigos do Laboratório de Genética do Departamento de Biologia UFC pelo apoio e amizade.

A Jamile, minha namorada, pela dedicação e companheirismo.

A minha família (Priscilla, Delan, Dione, Helena, Ananias) pelo amor, carinho, compreensão e apoio a mim concedido. ***Que possamos continuar unidos em todos os momentos das nossas vidas***

"A natureza, assim parece, é o nome popular
Para milhares e milhares e milhares
De partículas jogando seu jogo infinito
De "bilhares" e "bilhares" e "bilhares""
Piet Hein

RESUMO

Diversas plantas produzem um fluido de aspecto leitoso denominado de látex, que é sintetizado e armazenado sob pressão em sistemas de canais formados por células especializadas, os laticíferos. A mais atrativa e estudada hipótese sobre a relevância biológica dos laticíferos sugere que estes participem ativamente da defesa vegetal. Partindo desta Tese, aspectos bioquímicos e moleculares foram estudados no látex da planta *Cryptostegia grandiflora*. É descrita a purificação e caracterização molecular de uma proteína do látex cuja identificação sugeriu ser uma osmotina e por isto foi designada como CgOsm. CgOsm foi purificada por meio de cromatografia de troca catiônica em coluna MonoS acoplado ao sistema de FPLC. A pureza e a identificação da proteína foi avaliada por SDS-PAGE, sequência NH₂-terminal e espectrometria de massas. O RNA mensageiro total de *C. grandiflora* foi isolado, purificado e usado para a síntese da primeira fita do cDNA através de PCR. A segunda fita de cDNA foi amplificada utilizando iniciadores degenerados e o produto com aproximadamente 600 pb foi subclonado no vetor pGEN-T easy e introduzido em *Escherichia coli* eletrocompetentes. Os plasmídeos recombinantes foram purificados e sequenciados. A sequência de aminoácidos deduzida revelou alta identidade com osmotinas de *Heliathus annuus* e *Piper columbrinum*. O modelo da estrutura tridimensional da CgOsm deduzida foi realizada por modelagem por homologia utilizando a estrutura da act d2 (PDB: 4BCT) resolvida por raio X. CgOsm é composta por três domínios: domínio I consiste de 11 folhas beta, formando uma conformação do tipo beta sanduiche; domínio II é formado por diversos loops que se estendem até o domínio I e o domínio III consiste de um pequeno loop. Análise *in silico* revelou que a CgOsm possui seguimentos estruturais com estrutura similar a adiponectina, um hormônio proteico humano sintetizado pelos adipócitos cuja ação tem implicações na obesidade, diabetes do tipo II, doenças cardiovasculares e ateroscleroses. Ensaio de modelagem demonstraram que CgOsm poderia interagir com o receptor de adiponectina favoravelmente, fato que conduz a hipótese de que CgOsm poderia mimetizar atividades da adiponectina humana. Assim, os resultados descritos neste trabalho apontam uma perspectiva a ser explorada sobre os potenciais farmacológicos desta proteína.

Palavras-Chave: Látex. Modelagem molecular. Fitoquímicos.

ABSTRACT

Several plant species produce a fluid with milky aspect called latex, which is synthesized and stored under pressure in a system of channels formed by specialized cells termed laticifers. Latex is an emulsion of many kind of substances suspended in aqueous media. Many studies have suggested that latex compounds are involved in plant defense. Here, we describe the purification, cDNA cloning and molecular modeling of an osmotin (CgOsm) from *Cryptostegia grandiflora* latex. Osmotin of *C. grandiflora*, named CgOsm, was purified by using a simple protocol consisting cation exchange chromatography on MonoS column coupled to FPLC system. The protein purity was confirmed by mass spectrometry. Total RNA was isolated from young leaves of *C. grandiflora* by Concert (Invitrogen) method. The yield and purity of RNA was determined spectrophotometrically and the quality of RNA was tested on 1% agarose gel. The first strand of cDNA was synthesized by the process of reverse transcription standard. The second strand of cDNA and then subsequent amplification of CgOsm cDNA was performed using forward primer (based on first seven N-terminal amino acid of CgOsm) and oligo dT as reverse primer. The PCR products were subcloned into pGEM-T vector and then introduced into *Escherichia coli* cloning host TOP10F'. The recombinant plasmids were purified from transformed bacterial cell and submitted to DNA sequencing. The 3D model of CgOsm was constructed using SWISS-MODEL program by homology modeling using X-ray crystal structure of act d 2 (PDB ID: 4BCT). Model quality was evaluated by MolProbity server. The computational analysis of the deduced sequence of CgOsm shown that it is a protein of apparent molecular weight about 21.966 Da and isoelectric point of 8.1. The complete structure of CgOsm is composed of three domains: domain I consists of 11 beta-strands, arranged in the shape of a beta-sandwich, domain II consists of several loops extending from domain I and stabilized by four disulfide bonds and domain III consists of a small loop with two disulfide bonds. MolProbity analysis revealed that 96.5% residues were present in most favored region. In silico analysis revealed that the structural segments of CgOsm show similarity with folding adiponectin, a human protein hormone synthesized by adipocytes whose action has implications in obesity, type II diabetes, cardiovascular disease and atherosclerosis. Tests have demonstrated that modeling CgOsm could interact with the adiponectin receptor, fact that leads to the hypothesis that CgOsm could mimic activities of human adiponectin. Thus, the results described in this study show a perspective to be explored about the pharmacological potential of this protein.

Key-words: Latex. Molecular modeling. Phytochemical.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Princípios da imunidade da planta.....	19
Figura 2	Aspectos gerais da planta <i>Cryptostegia grandiflora</i>	21
Figura 3	Representação esquemática e anatomia dos dois tipos de laticíferos.....	24
Figura 4	Mecanismo de ação da osmotina.....	31
Figura 5	Mapa do vetor de clonagem P-GEM T easy.....	50
Figura 6	Eletroforese bidimensional (12,5%) das proteínas do látex de <i>Cryptostegia grandiflora</i>	56
Figura 7	Cromatografia em coluna de troca catiônica “Mono-S Sepharose” acoplada ao sistema Akta Purifier.....	58
Figura 8	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) sob condições não redutoras dos picos obtidos após cromatografia de troca catiônica.....	60
Figura 9	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) sob condições redutoras dos picos obtidos após cromatografia de troca catiônica.....	60
Figura 10	Determinação da massa molecular da proteína purificada por MALDI-TOF.....	63
Figura 11	Representação dos dados MS/MS obtidos por espectrometria de massas da proteína purificada.....	65
Figura 12	Imagem topográfica da solução de CgOsm adsorvida em mica por microscopia de força atômica.....	66
Figura 13	Eletroforese em gel de agarose 1,2% do RNA total extraído de folhas <i>Cryptostegia grandiflora</i>	67
Figura 14	Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados da PCR usando cDNA isolado de <i>C. grandiflora</i> em diferentes temperatura de anelamento.....	69

Figura 15	Colônias brancas e azuis em meio LB ágar.....	70
Figura 16	Eletroforese em gel de agarose 1% dos plasmídios pGEM-T easy::CgOsm extraídos de células de <i>E. coli</i> TOP10F'....	71
Figura 17	Eletroforese em gel de agarose 1% dos plasmídios pGEM-T easy::CgOsm extraídos de células de <i>E. coli</i> TOP10F' após digestão com EcoR I.....	71
Figura 18	Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos clones 3, 5, 7 e 9 utilizando o software ClustalW2.....	72
Figura 19	Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos deduzidas para os clones 3, 5, 7 e 9 utilizando o software ClustalW2.....	73
Figura 20	Sequência consenso de nucleotídeos e aminoácidos predita para osmotina de <i>C. grandiflora</i>	74
Figura 21	Alinhamento múltiplo da sequência traduzida da osmotina de <i>C. grandiflora</i> com seis sequências com mais alta similaridade na análise pelo BLASTp.....	76
Figura 22	Árvore filogenética das estruturas primárias de diferentes proteínas da família PR-5.....	77
Figura 23	Modelos das estruturas tridimensionais obtidos para a sequência de CgOsm usando diversos programas.....	80
Figura 24	Mapa de Ramachandran, no qual estão mostradas as regiões fisicamente permitidas para os aminoácidos do modelo CgOsm usando diversos programas.....	81
Figura 25	Esquema da estrutura secundária deduzida para CpOsm utilizando o software PDBsum.....	82
Figura 26	Predição topologia da estrutura secundária da osmotina de <i>C. grandiflora</i> usando o servidor PDBsum.....	83

Figura 27	Domínios estruturais da CgOsm construído com o programa SWISS-MODEL.....	83
Figura 28	Sobreposição da representação em “ribbon” de CgOsm e outras osmotinas e Mapeamento dos potenciais eletrostáticos da superfície.....	84
Figura 29	Modelo tridimensional do monômero de adiponectina e CgOsm e do receptor de adiponectina.....	86
Figura 30	Modelo tridimensional trímero de CgOsm e de adiponectina.....	87
Figura 31	Sequências completas das proteínas usadas nesse estudo	88
Figura 32	Complexo ADIPOQ/ADIPOR1 e CgOsm/ADIPOR1.....	89
Figura 33	Modelos tridimensional de ADIPOR1 complexado com CgOsmPep1 e CgOsmPep2.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Hierarquia taxonômica da planta <i>Cryptostegia grandiflora</i> R. Br.....	21
Tabela 2	Iniciadores usados na clonagem da osmotina de <i>C. grandiflora</i>	47
Tabela 3	Constituintes e respectivos volumes utilizados na reação de PCR.....	48
Tabela 4	Constituintes e respectivos volumes utilizados na reação de clonagem, para uma razão 5:1 (inserto: vetor).....	51
Tabela 5	Lista proteínas de defesa identificadas em gel bidimensional de LPCg por ESI-Q-TOF-MS/MS.....	57
Tabela 6	Lista proteínas de defesa identificadas nos picos cromatográficos por ESI-Q-TOF-MS/MS.....	61
Tabela 7	Sequência de aminoácidos N-terminal de uma proteína do látex de <i>Cryptostegia grandiflora</i>	64
Tabela 8	Comparação das propriedades físico-químicas da osmotina derivados dos aminoácidos deduzidos utilizando a ferramenta Pepstats com dados experimentais.....	75
Tabela 9	Avaliação da qualidade dos modelos gerados por diferentes plataformas.....	79
Tabela 10	Análise dos complexos. Energia de ligação e valor de score.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
AMPK	Proteína Quinase Ativada pelo AMP
BLAST	<i>Basic Local Alignment search Tool</i>
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CgOsm	Osmotina de <i>Cryptostegia grandiflora</i>
CpOsm	Osmotina de <i>Calotropis procera</i>
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DTT	Dithiothreitol
ETI	Imunidade Dirigida Pelo Efetor
HR	Resposta hipersensitiva
IAA	Iodoacetamida
IES	Ionização por esletrospray
IPTG	Isopropil-tio- β -galactosídeo
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MAMPs	Padrões Moleculares Associados a Micróbios
NB-LRR	Receptor Rico em Leucinas Ligante a Nucleotídeo
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCD	Morte celular programada
PLCg	Proteínas do látex de <i>Crypstostegia grandiflora</i>
PLCp	Proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i>
PRP	Proteínas relacionada à patogênese
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PTI	Imunidade Dirigida por Padrão
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
TLP	Próteínas de tipo taumatina
TOF	Time of Fly

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Sistema Imune inato de plantas	17
1.2	Plantas Laticíferas	20
1.2.1	<i>Cryptostegia grandiflora</i> R. Br.	20
1.3	Látex: características gerais	22
1.4	Evidências do látex como defesa	24
1.5	Proteínas relacionadas à patogênese	25
1.6	Proteínas da família PR-5	26
1.7	Características gerais de osmotinas	27
1.8	Osmotinas recombinantes	27
1.9	As funções das osmotinas	29
1.9.1	Atividade antifúngica da osmotina	30
1.9.2	Interação com citocininas	32
1.8.3	Interação da osmotina com o receptor humano de adiponectina	32
2	HIPÓTESE	34
3	OBJETIVOS	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
	MATERIAL	36
4.1	Reagentes	36
4.2	Material vegetal	36
4.3	Fungos	37
	MÉTODOS	37
4.4	Coleta e fracionamento do látex	37
4.5	Eletroforese bidimensional	37
4.6	Seleção e processamento dos spots para espectrometria de massas	38
4.7	Cromatografia em coluna de troca catiônica “Mono-S Sepharose” acoplada ao sistema ÄKTApurifier.....	39
4.8	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	39
4.9	Análises por espectrometria de massas dos picos cromatográficos em coluna MonoS.....	40
4.9.1	Análises de peptídeos trípticos obtidos de cada pico	40
4.9.2	Análises de massa intacta do pico 1	41
4.10	Determinação da sequência de aminoácidos NH ₂ -Terminal do pico 1	41
4.11	Análise por microscopia de força atômica	42
4.12	Ensaio biológicos	42
4.12.1	Cultivo dos fungos	42
4.12.2	Obtenção da suspensão de esporos	42
4.12.3	Ensaio de inibição do crescimento fúngico em meio líquido ..	43
4.12.4	Ensaio de inibição da germinação de esporos	43

4.13	Preparo de material livre de RNase	44
4.14	Extração do RNA total	44
4.13	Eletroforese em gel de agarose	45
4.15	Análise da integridade do RNA total	45
4.16	Tratamento do RNA total com DNase	45
4.17	Purificação do RNA total	46
4.18	Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores específicos	46
4.19	Obtenção de cDNA	47
4.20	Amplificação da região codificadora da CgOsm	47
4.21	Purificação dos produtos de PCR	48
4.22	Ligação dos produtos de PCR amplificados no vetor de clonagem pGEM-T easy	49
4.24	Transformação de <i>Escherichia coli</i> TOP10F'	49
4.25	Seleção dos clones e purificação dos plasmídeos	51
4.26	Digestão com a enzima de restrição EcoRI	52
4.27	Sequenciamento de cDNAs	52
4.28	Análises das sequências de DNA	52
4.29	Modelagem Computacional	53
4.30	Validação dos modelos	54
4.31	Complexo proteína- proteína	54
5	RESULTADOS	55
6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÃO	100
8	REFERÊNCIAS	101

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Imune inato de plantas

As plantas são organismos sésseis que para sobreviver precisam resistir a estresses bióticos e abióticos sem a opção de escapar. Para se defender contra ataques de patógenos e herbívoros, as plantas possuem um eficiente sistema imune inato (SPOEL; DONG, 2012).

Para contornar os mecanismos de defesa de plantas, os patógenos adaptados podem liberar moléculas efetoras diretamente dentro das células das plantas. Cepas de *Pseudomonas syringae* contém dezenas destas moléculas (JONES; DANGL, 2006). Alguns desses efetores, tais como AvrPto 1, promovem a virulência pela supressão de proteínas relacionadas a imunidade (ZIPFEL; RATHJEN, 2008). A cada inovação nos mecanismos de defesas estabelecidos pelas plantas, novas maneiras para contornar essas defesas evoluíram no invasores. Ao longo do tempo, essa luta co-evolucionária entre invasores e plantas estabeleceu uma das interações mais complexas e interessantes conhecidas na biologia (TAYLOR, 1998). A interação planta – patógeno pode ser considerada uma guerra aberta, onde as principais armas são as proteínas sintetizadas em ambos os organismos (FERREIRA *et al.*, 2006).

Reações de defesas e respostas celulares são iniciadas logo após o patógeno entrar em contato com a planta. Esses mecanismos podem ser subdivididos de respostas muito rápidas ou rápidas (1 - 30 minutos após o contato com o patógeno) e respostas lentas (horas - dias após o contato com o patógeno) (BOLLER; FELIX, 2009). As características das respostas rápidas são o influxo de íons (NÜRNBERGER *et al.*, 2004), produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (APEL; HIRT, 2004), produção de etileno (SPANU *et al.*, 1994), ativação da proteína quinase ativada por mitogênio (ASAI *et al.*, 2002) e a expressão de genes relacionados a defesa (ZIPFEL *et al.*, 2004, 2006). As respostas lentas incluem as modificações na parede celular, tais como deposição de calose (GOMEZ-GOMEZ *et al.*, 1999) e inibição do crescimento da raiz (ZIPFEL *et al.*, 2006). Uma reação de resistência bastante estudada é a resposta hipersensitiva (HR) incluindo a morte celular programada (PCD) do

tecido infectado. Essa necrose é dirigida por proteínas de resistência codificadas pelos genes R e restringe o desenvolvimento do patógeno para prevenir as plantas de mais danos (LUKASIK; TAKKEN, 2009).

Em adição as respostas restritas ao local da infecção, mencionadas anteriormente, respostas sistêmicas também podem ser ativadas pelas plantas. São chamadas de resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR) (SPOEL; DONG, 2012).

No entanto, uma defesa bem-sucedida depende de um sistema de reconhecimento específico e altamente sensível que possui a capacidade de sentir o “perigo” e, conseqüentemente, “ligar” os mecanismos de defesas (MUTHAMILARASAN; PRASAD, 2013). Os patógenos, por sua vez, fornecem assinaturas ou “padrões” característicos que servem como um "cartão de identidade molecular" que permitem que as plantas percebam o invasor externo (ZVEREVA; POOGGIN, 2012). Essas “assinaturas” em geral são designadas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os exemplos mais proeminentes são os padrões moleculares associados a micróbios (MAMPs) que derivam de típicas estruturas microbianas, tais como, quitina de fungos, peptídeoglicano bacteriano, peptídeo derivado da flagelina bacteriana (SEGONZAC; ZIPFEL, 2011).

Em adição, muitos patógenos utilizam enzimas que degradam barreiras estruturais dos tecidos das plantas. Os produtos que são gerados em consequência dessa degradação, tais como, fragmentos de parede celular e peptídeos derivados de proteínas degradadas, podem funcionar como indutores endógenos e são chamados padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (HENRY *et al.*, 2012). Para detectar esses padrões moleculares indicativos de ataque por patógenos, as plantas possuem uma variedade de diferentes receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) como por exemplo, as quinases do tipo receptor e proteínas do tipo receptor (ALBERT *et al.*, 2010).

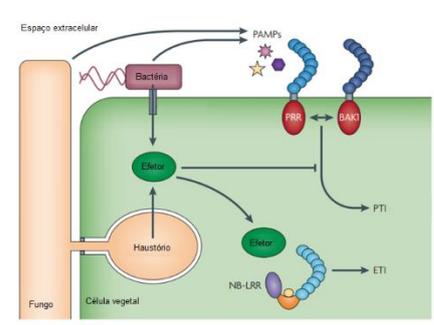
A imunidade dirigida por padrão (PTI) representa a primeira linha de reações de defesas das plantas estabelecendo um conjunto de respostas relacionadas à patogênese incluindo a produção de espécies reativas de

oxigênio, ativação de várias proteínas quinases, mudanças sucessivas no estado de fosforilação de várias proteínas celulares, alterações na regulação gênica, o que leva à síntese de vários compostos antimicrobianos (TENA; BOUDSOCQ; SHEEN, 2011).

Muitos patógenos produziram mecanismos para superar a PTI com as chamadas “proteínas efetoras” (efetores) que entram na célula vegetal. Esses efetores agem como fatores de transcrição que ativam diretamente a transcrição nas células hospedeiras, afetam o enovelamento de histonas e na configuração da cromatina, promovem a liberação de nutrientes necessário a sobrevivência do patógeno (FENG; ZHOU, 2012). Exemplos típicos de efetores são TTSEs AvrPto, AvrPtoB que atuam diretamente na supressão da PTI (GÖHRE *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010).

Por sua vez, as plantas desenvolveram sistemas de detecção desses efetores e montaram a segunda linha de reação de defesa chamada de imunidade dirigida pelo efetor (ETI) (Figura 1) (SPOEL; DONG, 2012). Na ETI, os receptores NB-LRR (receptor rico em leucinas ligante a nucleotídeo), codificadas pelos genes R, tem um papel importante na detecção dos efetores patogênicos e na inicialização de uma forte e rápida resposta hipersensitiva e morte celular programada (PCD) que neutraliza localmente o ataque e progressão dos patógenos (MAEKAWA, *et al.*, 2011).

Figura 1 - Princípios da imunidade da planta



Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são liberados pelo patógeno no espaço extracelular, tais como lipopolissacarídeo, peptidoglicano e flagelina que são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) na superfície da célula que desencadeiam a imunidade dirigida por padrão (PTI). PRRs geralmente consistem de receptores ricos em leucinas (LRR) extracelulares (azul) e um domínio quinase intracelular (vermelho). PRRs

interagem com outras proteínas do tipo quinases, como a BAK1 e inicia a PTI. Patógenos liberam efetores como AvrPto e AvrPtoB que frequentemente atuam na supressão da PTI. Contudo, muitos são reconhecidos por receptores NB-LRR que induzem a imunidade dirigida por efetores (ETI) (DODDS; RATHJEN, 2010).

1.2 Plantas Laticíferas

Plantas laticíferas são aquelas que, ao serem submetidas a injúrias mecânicas, exsudam um líquido de aparência leitosa, denominado látex. Essas plantas crescem em ambientes diversos e possuem diferentes hábitos de vida tais como ervas, arbustos e árvores (KONNO, 2011). Dentre as famílias de plantas produtoras de látex destacam-se Euphorbiaceae e Apocynaceae (HAGEL, YEUNG, FACCHINI, 2008), embora outras famílias como Asteraceae, Caricaceae, Convolvulaceae e Moraceae também produzam látex (DOMSALLA, MELZIG, 2008). A planta laticífera mais conhecida e estudada é a seringueira (*Hevea brasiliensis*), também chamada de árvore da borracha, pois é a partir do látex desta planta que é extraída a matéria prima para a produção da borracha. A característica peculiar das plantas produtoras de látex é a presença dos laticíferos. Essas células altamente especializadas são definidas pelas suas características anatômicas e conteúdo citoplasmático distinto, o látex (AGRAWAL, KONNO, 2009).

1.2.1 *Cryptostegia grandiflora* R. Br

Cryptostegia grandiflora R. Br. é uma espécie pertencente à família Apocynaceae (Tabela 1), popularmente conhecida no Estado do Ceará como “unha-de-gato”, “bombom” e “unha-de-bruxa”. É uma planta arbustiva e trepadeira, com caules, folhas e frutos que exsudam látex quando danificados (LORENZI, SOUZA, 1999). *C. grandiflora* (Figura 2) pode crescer até 2 metros de altura como um arbusto, mas quando cresce por cima de outros tipos de vegetação pode atingir até 30 metros de comprimento. Sua estratégia adaptativa deve-se, aparentemente, à grande produção de sementes, capacidade de aproveitamento de pouca umidade para germinação, desenvolvimento de raízes

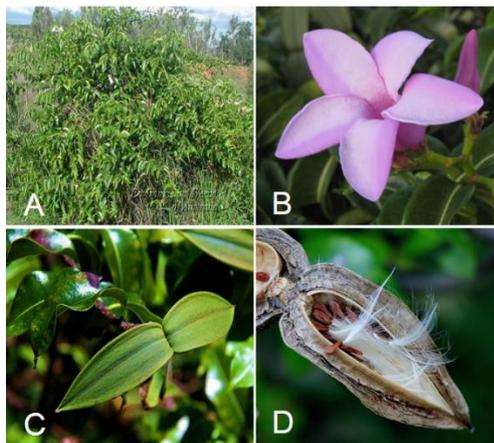
especializadas e boa captação de luz (GRICE, 1996; BROWN, SCANLAN, MCIVOR, 1998).

Tabela 1 - Hierarquia taxonômica da planta *Cryptostegia grandiflora* R. Br.

Taxon	Classificação
Reino	Plantae
Sub-reino	Viridiplantae
Infrarreino	Streptophyta
Divisão	Tracheophyta
Sub-divisão	Spermatophytina
Infradivisão	Angiospermae
Classe	Magnoliopsida
Superordem	Asteranae
Ordem	Gentianales
Família	Apocynaceae
Gênero	<i>Cryptostegia</i> R. Br.
Espécie	<i>Cryptostegia grandiflora</i> R. Br.

Fonte: Apocynaceae of North America Update, database (version 2011)

Figura 2 - Aspectos gerais da planta *Cryptostegia grandiflora*



(A) Arbusto; (B) Flor; (C) Frutos verdes, que normalmente ocorrem em pares e se desenvolvem no final dos caules; (D) Frutos secos, onde as sementes são espalhadas pelo vento.

Embora endêmica de Madagascar (África), *C. grandiflora* é amplamente distribuída em áreas tropicais (TOMLEY, 1995). No Brasil, *C. grandiflora* figura na lista de espécies exóticas invasoras no semiárido da região Nordeste (HERRERA, MAJOR, 2006). Também é considerada uma espécie extremamente venenosa, sendo tóxica principalmente para ruminantes que morrem logo após a ingestão da planta (DOAK *et al.*, 2004).

C. Grandiflora é utilizada na medicina popular na Índia para o tratamento de gonorreia, feridas e eczemas (MUKHERJEE *et al.*, 1999). Além disso, a literatura relata a presença de algumas atividades biológicas, tais como, atividade hipoglicemiante (DHAWAN *et al.*, 1977); atividade bactericida em extratos de diversas partes da planta (MUKHERJEE *et al.*, 1999; SINGH *et al.*, 2011); atividade contra o vírus do herpes (VIJAYAN *et al.*, 2004) no extrato metanólico da planta; atividade moluscicida nos extratos da folha e do caule (ADEWUNMI, SOFOWORA, 1980; ABDALLAH *et al.*, 1990) e atividade inibitória em cultura de células tumorais atribuída a cardenolídeos isolados a partir do extrato alcoólico de partes aéreas da planta (DOSKOTCH *et al.*, 2006).

Pouco tem sido investigado quanto à composição protéica do seu látex. Até o momento, foram relatadas atividades anti-oxidantes e proteolíticas (FREITAS *et al.*, 2010), atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (RAMOS *et al.*, 2009) e atividade bacteriolítica (SUKLA, KRISHNAMURTHY, 1961). Uma fração protéica do látex de *C. grandiflora* apresentou atividade antifúngica sobre vários fitopatógenos (SOUZA *et al.*, 2011). Albuquerque e colaboradores (2009) mostraram que as proteínas solúveis do látex de *C. grandiflora* possuem atividade pró-inflamatória em modelos animais. Frações proteicas do látex de *Cryptostegia grandiflora* também foram capazes de induzir a coagulação, através da ativação do fibrinogênio (VIANA *et al.*, 2013).

1.3 Látex: Características Gerais

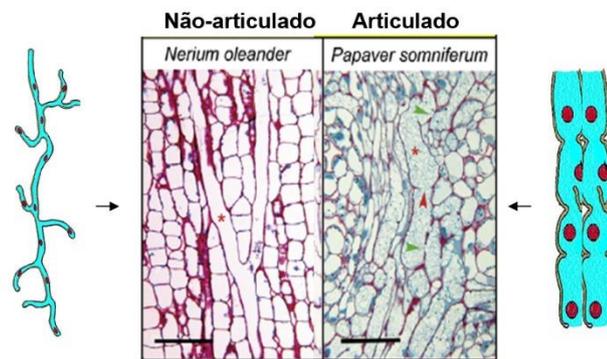
O termo látex é amplamente usado para descrever um líquido de aspecto leitoso, presente em, aproximadamente, 20.000 espécies de plantas de 40 famílias (DOMSALLA, MELZIG, 2008). Quando esses vegetais sofrem algum tipo de injúria física, o látex é liberado, e aglutina progressivamente, impedindo

que patógenos penetrem na área danificada. Devido a essa e outras observações, o látex tem sido amplamente relacionado com a defesa vegetal contra a invasão de patógenos e insetos (FARREL *et al.*, 1991; BERNAYS, CHAPMAN, 1994, HAGEL *et al.*, 2008). O látex também pode ter uma ação colante imobilizando pequenos insetos ou mesmo uma lagarta (DUSSOURD, 1995). Entretanto, além deste efeito mecânico, a composição química do látex parece ser também objeto de defesa, neste caso agindo quimicamente no combate a fungos e insetos (GIORDANI *et al.*, 2002; RAMOS *et al.*, 2007).

Látex é uma suspensão aquosa ou emulsão de vários tipos de partículas sintetizadas e armazenadas sob pressão em um sistema de canais formados por células denominadas de laticíferos. Neste fluido são encontrados proteínas, terpenos, alcalóides, vitaminas, lipídios, aminoácidos livres, amido, açúcares, óleos, taninos, resinas, borracha e típicas estruturas sub-celulares, variando seu teor de acordo com a espécie (MORCELLE *et al.*, 2004; DOMSALLA, MELZIG, 2008). Geralmente, metabólitos específicos presentes no látex são derivados do metabolismo primário do vegetal, que não são reaproveitados pelas células (HAGEL *et al.*, 2008). Embora o látex, na maioria das vezes, apresente aspecto leitoso, este pode apresentar coloração amarelada ou alaranjada, como em plantas pertencentes à família Papaveraceae, marrom-amarelado em plantas do gênero *Cannabis*, ou pode ser límpido como em *Nerium oleander* (KEKWICK, 2001).

Os laticíferos podem ser divididos, considerando seus aspectos anatômicos, em dois tipos: os articulados, que são formados por células sequenciais interrompidas pela parede celular, mas interconectadas; e os não articulados, que são formados por uma única célula que cresce nos espaços intercelulares e eventualmente se ramificam nos tecidos das plantas de um modo similar às hifas de fungos (KEKWICK, 2001) (FIGURA 3).

Figura 3 – Representação esquemática e anatomia dos dois tipos de laticíferos



Cortes longitudinais do caule de *Nerium oleander* (não-articulado) e *Papaver somniferum* (articulado). O canal laticífero está indicado pelo asterisco vermelho. Adaptado de HAGEL *et al.*, 2008.

1.4 Evidências do látex como defesa

Cerca de 9,8 % de todas as plantas angiospermas exsudam látex após algum dano tecidual, e esse látex não tem nenhuma função conhecida no metabolismo primário (em termos de aquisição e alocação de recursos para planta) (HUNTER, 1994; AGRAWAL, LAJEUNESSE, FISHBEIN, 2008). Nos últimos 20 anos há um número crescente de publicações sobre aspectos bioquímicos, ecológicos e evolucionários do látex de plantas (HAGEL, YEUNG, FACCHINI, 2008). No que diz respeito ao papel fisiológico do látex, várias hipóteses são levantadas, tais como excreção de resíduos, cobertura de tecido danificado, defesa contra predadores e invasores (KONNO, 2011). Entre essas hipóteses, há uma grande quantidade de evidências que apoiam o papel de defesa do látex contra herbívoros e patógenos, especialmente os herbívoros (AGRAWAL, KONNO, 2009).

Konno e colaboradores (2004) mostraram o envolvimento do látex na defesa de diferentes plantas contra seis insetos da ordem Lepdoptera. Similarmente, Ramos e colaboradores (2007) mostraram o efeito inseticida de proteínas do látex de *Calotropis procera* sobre diferentes pragas agrícolas.

Látex é bastante conhecido pela grande quantidade de proteínas envolvidas na defesa contra insetos, tais como, proteinases cisteínicas (RASMANN JOHNSON, AGRAWAL, 2009; RAMOS *et al.*, 2010), proteinases serínicas (PATEL, SINGH, JAGANNADHAM, 2007; TOMAR, KUMAR, JAGANNADHAM, 2008) quitinases (KITAJIMA *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2010), inibidores de proteinases (WALZ *et al.*, 2004; AZARKAN *et al.*, 2006; KEHR, 2006), osmotinas (LOOZE *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2011a), lectinas (LYNN, CLEVETTE-RADFORD, 1986) e peroxidases (PATEL *et al.*, 2008; SETHI *et al.*, 2009).

Além do papel na defesa contra insetos, o látex pode ser ativo contra fungos (VAN LOON, VAN STTRIEN, 1999; TAIRA *et al.*, 2005). Proteínas do látex de *Calotropis procera* e *Carica candamarcensis* inibiram fortemente o crescimento de seis espécies de fungos fitopatogênicos (SOUZA *et al.*, 2011).

1.5 Proteínas Relacionadas à Patogênese

Proteínas vegetais cuja expressão é induzida em resposta à infecção por agentes patogênicos ou estresse abióticos pertencem ao grupo das proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) (LINTHORST, 1991). O acúmulo dessas proteínas mostra uma correlação com o desenvolvimento da imunidade dirigida por padrões (PTI) (SPOEL; DONG, 2012). A expressão de PR-proteínas é induzida por diferentes sinais, tais como, acúmulo de ácido salicílico, etileno, auxina, salinidade, seca, frio, luz ultra violeta, fermento, infecções por vírus e fungos (MACKOVA *et al.*, 2009). As PR-proteínas apresentam propriedades físico-químicas típicas que as distinguem das demais proteínas encontradas em plantas, tais como, estabilidade em baixo pH, baixa massa molecular, termoestabilidade e resistência à proteólise (GORJANOVIC, 2009). As proteínas relacionadas à patogênese são divididas em dezoito famílias (PR-1 a PR-18) e em cada família, incluem-se classes com diferentes isoformas (VIKTOROVA, *et al.*, 2011). A divisão em famílias é baseada em similaridades bioquímicas e biológicas, tais como, estrutura primária e terciária, relações sorológicas, atividades biológicas e enzimáticas (LIU, STURROCK, EKRAMODDOULLAH,

2010). As famílias das PR-proteínas são enumeradas em ordem de descobrimento e contém membros com as mesmas atividades enzimáticas. A família PR-2, 3, 4, 8 e 11 possuem atividade quitinásica, além disso, a família PR-4 tem atividade de ligação à quitina. A família PR-7 incluem as proteases. A função de permeabilização de membranas é encontrada na PR-5, assim como em PR-12, 13 e 14 (VIKTOROVA *et al.*, 2011).

1.6 Proteínas da Família PR-5

A família PR-5, também chamada de proteínas do tipo taumatina (TLP), é um grupo de proteínas ricas em cisteína que compartilham alta identidade na sequência de aminoácidos com a proteína taumatina de sabor adocicado, que está presente nos frutos da planta tropical *Thaumatococcus daniellii*. O resíduo de alanina localizado no sítio de clivagem da sequência N-terminal e dezesseis resíduo de cisteína, que são distribuídos ao longo da proteína formando pontes dissulfetos, são conservados em quase todas as proteínas da família PR-5 (MIN *et al.*, 2004). As pontes dissulfeto formadas por esses resíduos de cisteína conservados ajudam a estabilizar a molécula e permite o enovelamento correto e altamente estável em condições extremas de pH e temperaturas, bem como a resistência a degradação proteolítica (LIU, STURROCK, EKRAMODDOULLAH, 2010). As proteínas do tipo taumatina com massa molecular variando entre 21 e 26 kDa foram encontradas em vários organismos incluindo animais, nematódeos, insetos, fungos e plantas (LIU, STURROCK, EKRAMODDOULLAH, 2010).

Muitos membros da PR-5, como as osmotinas e proteínas do tipo osmotina, mostram atividade antifúngica contra um amplo espectro de fungos patogênicos. A zeamatina, uma proteína do tipo osmotina do milho, não tem atividade quitinásica, glucanásica, proteolítica, ribonucleásica. Baseado na capacidade da zeamatina em causar a liberação do conteúdo citoplasmático de hifas de fungos, é proposto que as TLPs agem permeabilizando a membrana celular dos fungos assim como as permatinas (TOKURIKI, TAWFIK, 2009).

1.7 Características gerais das Osmotinas

Osmotina foi primeiramente identificada e caracterizada em culturas celulares de plantas de *Nicotiana tabacum* adaptadas a condições de salinidade (SINGH *et al.*, 1987). Osmotina de *Nicotiana tabacum* é uma proteína catiônica de 244 resíduos, com massa molecular de 26,4 kDa e ponto isoelétrico de 8,13 ou 7,8 dependendo da isoforma. Tanto as osmotinas como a taumatina pertencem à família 5 das proteínas relacionadas à patogênese (PR-5). A estrutura da osmotina é composta de três domínios e apresenta o enovelamento similar a taumatina e outras proteínas da família PR-5, tais como, zeamatina e proteína PR-5d de tabaco (SINGH *et al.*, 1987). A estrutura secundária é composta por 12% de conformação helicoidal e 37% de folhas beta. É sintetizada, assim como outras PR-proteínas, como um precursor com um peptídeo sinal N-terminal, que dirige o transporte através da membrana do retículo endoplasmático. Além disso, inclui um domínio C-terminal que é necessário para o seu direcionamento para o vacúolo (ABDIN, KIRAN, ALAM, 2011).

A osmotina é mais abundante em tecidos como raízes, epiderme, corola, botões florais imaturos e quase indetectável em outros tecidos (VIKTOROVA *et al.*, 2011).

Estudos de cristalografia de raio X revelou que as osmotinas são compostas de três domínios. O domínio I consiste de 11 fitas beta formando uma estrutura do tipo beta sanduíche estabilizado por três pontes dissulfeto. O domínio II é constituído basicamente por uma α -hélice estabilizada por três pontes dissulfeto. O domínio III é compreendido por um longo loop e uma folha beta antiparalela. Este domínio é estabilizado por duas pontes dissulfeto (GHOSH, CHAKRABARTI, 2008).

1.8 Osmotinas recombinantes

Apesar da descoberta da osmotina na década de 1980, suas aplicações são limitadas devido à baixa disponibilidade da proteína purificada. Expressão

de osmotina recombinante é complicada devido à sua toxicidade e as propriedades físicas. Geralmente as bactérias transformadas expressam a osmotina dentro de corpos de inclusão e devido a osmotina ter oito pontes dissulfetos, sua renaturação é muito difícil (VIKTOROVA *et al.*, 2011). Além disso, a osmotina purificada apresenta baixa solubilidade em água (0,6 mg/ml), o que faz o processo de renaturação ainda mais difícil (CAMPOS *et al.*, 2008). Esses fatos fazem da expressão recombinante de osmotina em bactérias uma tarefa difícil. Poucos trabalhos mostram a expressão em *Escherichia coli* (VIKTOROVA *et al.*, 2012, TZOU *et al.*, 2011).

Campos *et al.* (2008) publicaram a expressão de uma proteína do tipo osmotina de *Solanum nigrum*. Essa proteína recombinante difere da osmotina de tabaco em alguns amino ácidos importantes na superfície da proteína. Outro trabalho mostra a expressão da osmotina de tabaco em *E. coli* sem a sequência N-terminal. A atividade antifúngica da osmotina de tabaco recombinante foi mantida (TZOU *et al.*, 2011). Mani e colaboradores (2012) clonaram duas isoformas de osmotina de *Piper colubrinum* em *E. coli*. As duas isoformas diferem pela deleção de cinquenta resíduos de amino ácidos internos que produz uma osmotina de 16,4 kDa e outra de 21,5 kDa com valores de pI de 5,6 e 8,3, respectivamente. Porém somente a osmotina de 21,5 kDa exibe atividade antifúngica.

Outros organismos usados para expressão recombinante de osmotinas são as plantas. As plantas geneticamente modificadas desempenham papel importante na biotecnologia. Seu campo de aplicação é amplo e novas possibilidades ainda estão ocorrendo. A utilização de osmotina na biotecnologia pode prevenir infecção causada por fungos na indústria de alimentos (TZOU *et al.*, 2011) ou para aumentar a capacidade das culturas para evitar danos por estresses bióticos e abióticos na agricultura (VIKTOROVA *et al.*, 2012). A transformação de plantas com o gene da osmotina é relativamente fácil, pois as análises da sequência feita por Sato e colaboradores (1996) mostraram que não possui introns. Dessa forma, uma grande quantidade de trabalhos relatando a transformação de plantas conduzindo o gene de osmotina ou proteína do tipo

osmotina já foram publicados (MANI, SIVAKUMAR, MANJULA, 2012; NOORI, SOKHANSANJ, 2008).

Goel e colaboradores (2010) produziram plantas transgênicas contendo o gene da osmotina de tabaco que foram analisadas quanto a tolerância a salinidade. As sementes das plantas transformadas foram capazes de germinar na presença de NaCl 150 mM. As plantas transgênicas mostraram ser altamente resistentes ao estresse salino e hídrico. Além disso, os frutos produzidos pelas plantas modificadas sob estresse salino apresentaram características similares aos frutos de plantas de tomate não transformadas.

Plantas transgênicas de amora expressando osmotina de tabaco toleram melhor estresse salino e hídrico que plantas não transformadas. Além disso, são mais resistentes a infecção de *Fusarium pallidoroseum*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum dematium* que plantas de amora selvagem (DAS *et al.*, 2011).

Osmotinas exibem função crioprotetora, ou seja, conferem proteção a baixas temperaturas. D'Angeli e Altamura (2007) mostraram que a osmotina é produzida durante o período de aclimação ao frio em plantas de oliva transformada com o gene da osmotina e está envolvida na regulação da dinâmica do citoesqueleto em resposta ao frio.

Esses experimentos indicam que a osmotina pode ter um papel defensivo durante a infecção fúngica ou estresses abióticos quando é superexpressa em sistemas heterólogos.

1.9 As funções das osmotinas

Osmotina é uma proteína multifuncional de plantas, sua atividade antifúngica, e a função protetora contra o frio, salinidade e deficiência hídrica são bem documentadas.

As osmotinas apresentam multidomínios, onde um domínio pode exercer sua função independentemente, ou em cooperação com domínios vizinhos

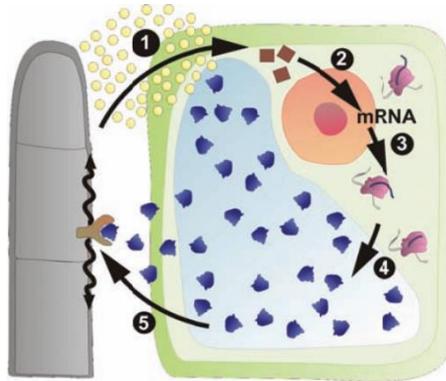
(OSTERMEIER, BENKOVIC, 2000). A análise do genoma completo de algumas espécies de plantas mostra que osmotinas podem interagir com diferentes domínios de outras proteínas, chamados de domínios parceiros. Os domínios parceiros mais conhecidos capazes de interagir com osmotinas são domínios de proteínas do tipo quinase (ABDIN, KIRAN, ALAM, 2011). Sabe-se que as proteínas quinases catalisam reações de fosfotransferência fundamentais para a maioria dos processos de sinalização e regulação das células eucarióticas. As proteínas quinases regulam uma grande variedade de processos celulares, tais como a ativação de enzimas, montagem de macromoléculas e degradação de proteínas (ABDIN, KIRAN, ALAM, 2011).

1.9.1 Atividade antifúngica de osmotina

Através de diversos ensaios *in vitro*, foi demonstrado que osmotinas apresentam atividade antifúngica contra uma grande variedade de fungos (VIGERS *et al.*, 1992). Osmotina pode inibir tanto fungos patogênicos como linhagens não patogênicas (TZOU *et al.*, 2011). Osmotinas são efetivas contra micélios e esporos (LIU *et al.*, 1994). Constatou-se que osmotina causa lise em esporos de *Phytophthora infestans* a uma concentração de 1 µg/ml enquanto a lise das hifas ocorre somente em concentrações mais altas (40 µg/ml) (WOLOSHUK *et al.*, 1991).

A capacidade da osmotina em inibir o crescimento de hifas e germinação de esporos é diretamente relacionada com o aumento da permeabilidade da membrana plasmática fúngica e com a incapacidade das células manterem o gradiente de pH. O mecanismo da atividade antifúngica da osmotina é demonstrado na Figura 4. Uma osmotina purificada do látex de *Calotropis procera* exerceu atividade antifúngica contra *Fusarium solani*, *Neurospora sp* e *Colletotrichum gloeosporioides* provavelmente atuando sobre a membrana plasmática dos microorganismos (FREITAS *et al.*, 2011b).

Figura 4 - Mecanismo de ação da osmotina



(1) As células antifúngicas liberam elicitores (MAMPs), que degradam a parede celular da planta hospedeira. Esses elicitores são reconhecidos por receptores (PRRs) que induzem a formação de moléculas sinalizadoras. (2) Essas moléculas sinalizadoras induzem a transcrição do gene da osmotina. (3) O RNA mensageiro é traduzido para a sequência da proteína. (4) A osmotina é transferida para o vacúolo através da informação contida no peptídeo sinal. (5) A osmotina é armazenada no vacúolo e então é liberada após degradação da membrana e se liga no receptor do fungo causando danos na membrana (BUCHANAN, GRUISSEM, JONES, 2006).

No entanto, osmotinas não são universalmente eficazes contra todos os fungos. *Aspergillus flavus*, *A. parasitica*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Neurospora crassa*, todos os agentes patogênicos que ocorrem em todo o mundo e em diversos hospedeiros parecem ser insensíveis aos efeitos de osmotina de tabaco (VIKTOROVA, *et al.*, 2012).

As variações na composição da parede celular dos patógenos são responsáveis pelas diferentes sensibilidades frente a osmotina em diversas linhagens de *S. cerevisiae*, e alguns componentes específicos da parede celular desempenham um papel importante na modulação da toxicidade da osmotina indicando uma especificidade entre a proteína antifúngica e a sua célula alvo (LEE *et al.*, 2010).

1.9.2 Interação com citocininas

O papel fisiológico das citocininas é promover a proliferação e diferenciação celular em plantas. Contudo, o mecanismo molecular de sua atividade biológica ainda não é bem entendido. Citocininas podem se ligar a receptores e afetar o influxo de íons, proteínas regulatórias da fosforilação, transcrição, tradução e secreção. Assim, muitos estudos relatam a presença de proteínas que se ligam a citocininas modulando suas funções (BARCISZEWSKI, MASSINO, CLARK, 2007).

Kobayashi e colaboradores (2000) isolaram uma proteína do tipo osmotina de 26 kDa capaz de se ligar a benziladenina, de *callus* de tabaco. A ligação da proteína do tipo osmotina com a benziladenina é reversível, saturável, e com características físico-química semelhante a outras proteínas que se ligam a citocinina relatadas na literatura. Assim, pode haver uma estreita relação entre osmotina e citocininas. Muitas bactérias utilizam atividade das citocinina do hospedeiro para seu próprio benefício, o caso mais conhecido é da *Agrobacterium tumefaciens*. Tendo em vista que a osmotina não tem atividade bactericida direta, há relatos que a osmotina pode se ligar com citocininas causando sua desativação, e assim a bactéria não é capaz de criar o tumor. A eliminação da citocinina previne a proliferação da infecção bacteriana. A atividade antibacteriana indireta pode ser um papel adicional da osmotina (KOBAYASHI, *et al.*, 2000).

1.9.3 Interação da osmotina com o receptor humano de adiponectina

Adiponectina é uma proteína recentemente descoberta produzida nos adipócitos e que desempenha um papel crucial na regulação da glicemia e metabolismo de lipídeos, inflamação e estresse oxidativo (KADOWAKI, YAMAUCHI, 2005; JORTAY, *et al.*, 2012). A adiponectina representa 0,01% do total de proteínas do plasma humano e é a proteína mais abundante do tecido adiposo. O decréscimo da concentração de adiponectina no soro é correlacionada com obesidade, diabetes de tipo 2, doenças cardiovasculares, e

com o aumento do risco de diversos tipos de câncer (MATSUZAWA, 2010; DALAMAGA, DIAKOPOULOS, MANTZOROS, 2012). A obesidade é o estado de deficiência de adiponectina. A adiponectina atua no metabolismo da glicose através da proteína quinase ativada pelo AMP (AMPK) que aumenta a oxidação do ácidos graxos e entrada de glicose na célula. De fato, a substituição da adiponectina pode tornar-se uma nova abordagem farmacológica para o tratamento da resistência à insulina e aterosclerose (HALUZIK, PARIZKOVA, HALUZIK, 2004)

Osmotina não tem nenhuma identidade significativa com sequência primária da adiponectina (< 10%), porém ambas apresentam um domínio interno semelhante. Tanto a osmotina quanto a adiponectina se ligam no mesmo receptor em *S. cerevisiae*, chamado de PHO36 (MIELE, COSTANTINI, COLONNA, 2011). Esse receptor é homólogo com o receptor da adiponectina em mamíferos e está envolvido com o metabolismo de lipídeos e fosfato em levedura. Comparando as estruturas secundárias destes dois receptores, é evidente que elas tem estruturas muito semelhante (NARASIMHAN *et al.*, 2005). Osmotina é capaz de interagir com o PHO36 e com o receptor de adiponectina ativando a mesma via de sinalização da adiponectina. É interessante, que duas proteínas, sem semelhanças de sequência e com um domínio estrutural comum entre várias proteínas, partilham uma atividade funcional altamente específica que tem significado importante em várias doenças humana (MIELE, COSTANTINI, COLONNA, 2011). Isso sugere que osmotina pode ser utilizado com modelo para o desenho de drogas em estratégias terapêuticas para o tratamento da resistência à insulina relacionada com a obesidade.

2 – Hipótese

As plantas possuem naturalmente nos seus diversos tecidos e órgãos moléculas que atuam na defesa contra vários tipos de estresse abiótico e bióticos. Entre essas moléculas, estão as proteínas que em muitos casos, tem seu padrão de expressão alterado em resposta a um ataque. Porém, essa alteração, seja o aumento ou diminuição da expressão, muitas vezes não garante uma defesa eficiente para a planta. Desse modo, muitas pesquisas são direcionadas para a transformação de plantas com genes exógenos objetivando aumentar o potencial molecular para defesa vegetal contra estresses. Para isso é necessário: (1) purificação e caracterização de proteínas envolvidas com a defesa; (2) identificação dos genes que codificam as proteínas de interesse; (3) clonagem e expressão em sistemas heterólogos das proteínas que exibem tal atividade; (4) avaliar seu potencial em plantas transformadas. Assim, a purificação de proteínas com tais potencialidades é a condição inicial para o estabelecimento dessa linha de pesquisa.

Reforçando que os látices de diversas plantas possuem proteínas que atuam na defesa vegetal, podemos sugerir a seguinte hipótese: O látex de *C. grandiflora* possui proteínas envolvidas com defesa vegetal.

Para validar esta hipótese, é necessário cumprir, dentre outras etapas, aquelas numeradas acima (1 - 4). Este trabalho está diretamente vinculado ao desenvolvimento da primeira etapa “purificação e caracterização de proteínas de defesa”. Atingindo o sucesso na primeira etapa, abre-se perspectiva para a realização das etapas posteriores, que dará subsídios para solidificar ou não a hipótese inicial e, assim, compreender mais profundamente o papel de algumas proteínas na defesa.

3 – OBJETIVOS GERAIS

Identificar e purificar proteína do látex de *C. grandiflora* através de técnicas cromatográficas; caracterizar em termos bioquímicos e moleculares; obter a estrutura tridimensional da proteína purificada por homologia estrutural. analisar as características estruturais *in silico* da proteína purificada.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar proteínas extraídas do látex de *C. grandiflora* através de análise por espectrometria de massas (NanoUPLC-ESI-Q-TOF);
- Purificar proteínas do látex de *C. grandiflora* através de técnicas cromatográficas;
- Identificar a proteína purificada através de análise por espectrometria de massas (UPLC-ESI-Q-TOF);
- Otimizar as técnicas de isolamento e purificação do RNA total a partir de folhas de *C. grandiflora*;
- Amplificar a região codificadora da proteína CgOsm a partir do RNA mensageiro usando a técnica de RT- PCR;
- Clonar e sequenciar a região codificadora da proteína purificada;
- Obter a modelagem da estrutura tridimensional da proteína deduzida por homologia.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

4.1 Reagentes

Os meios de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e Yeast Peptone Dextrose (YPD) foram obtidos da DIFCO e Himedia, respectivamente. Marcadores de Massa Molecular, Persulfato de Amônio, Membrana de diálise com poro de exclusão de 8.000 Da foram obtidos de Sigma ou Sigma-Aldrich Co. USA.

Ditiotreitol (DTT), Dodecil sulfato de sódio (SDS), etilenodiaminotetraacético (EDTA), foram obtidos da Amersham Bioscience, USA. Azul de bromofenol foi obtido da Acros Organics, USA. Acrilamida, azul brilhante de coomassie (G e R) 250, azul de bromofenol, N,N"-metileno bisacrilamida, β -mercaptoetanol, persulfato de amônio, N,N,N,N-tetrametiletilenodiamino (TEMED), polivinilpolipirrolidona (PVPP), antibióticos, canamicina e estreptomicina, foram obtidos da Sigma Chemical Co., EUA. Matriz cromatográficas MonoS, tiras de eletrofocalização foram obtidos da GE HealthCare do Brasil. Outros reagentes como enzimas de restrição, Kits de extração e purificação de RNA, vetores de clonagem utilizados nos experimentos de biologia molecular foram obtidos da Invitrogen (USA), Qiagen (Alemenha) e Promega (USA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 Material vegetal

Plantas saudáveis e não cultivadas de *Cryptostegia grandiflora* R. Br. existentes nas proximidades de Fortaleza-Brasil, foram utilizadas como fontes de látex fresco. Uma espécime foi identificada pelo botânico Prof. Edson de Paula Nunes da Universidade Federal do Ceará. Uma exsicata de *C. grandiflora* (N. 040409) foi depositada no Herbário Prisco Berreza da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará.

4.3 Fungos

Os fungos fitopatogênicos, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*, foram obtidos da micoteca mantida pelos Laboratórios de Plantas Laticíferas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará.

MÉTODOS

4.4 Coleta e fracionamento do látex

O látex de *C. grandiflora* foi coletado de plantas saudáveis através de incisões nos ápices caulinares em tubo do tipo Falcon contendo água destilada para produzir uma mistura de 1:1 (v/v). O látex de *C. grandiflora* foi coletado de ramos finais em água como descrito acima. A mistura (látex e água) foi cuidadosamente agitada durante a coleta para minimizar os efeitos da coagulação. A amostra foi centrifugada a 5000 g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado contendo grande parte de borracha foi descartado e o sobrenadante foi extensivamente dialisado contra água destilada utilizando membranas com poros de 8000 Da. O material retido na membrana foi novamente centrifugado nas mesmas condições descritas acima. O sobrenadante límpido e livre de borracha foi liofilizado, foi chamado de proteína do látex de *Cryptostegia grandiflora* (PLCg) e usado nos ensaios subseqüentes. Esse procedimento elimina compostos insolúveis em água e de baixa massa molecular.

4.5 Eletroforese bidimensional

Inicialmente, a extração das proteínas consistiu em dissolver a fração PLCg em PVPP (polivinilpolipirrolidona) e solução de piridina (50 mM piridina, 10 mM tiouréia, 1% SDS, pH 5.0), na proporção 1:2:40, respectivamente. Após agitação por 2 horas à temperatura ambiente, a solução foi centrifugada (20.000 x g por 30 minutos, a 4 °C) e o sobrenadante foi misturado com 4 volumes de acetona gelada contendo 10% de TCA por 12 horas à -20°C. Posteriormente, após centrifugação nas mesmas condições da anterior, o sobrenadante foi descartado e o precipitado submetido a três lavagens com metanol seguidas de três lavagens com acetona. Cada lavagem consistiu na

adição do solvente, centrifugação (20.000 x g por 5 minutos, a 4 °C) e descarte do sobrenadante. Após a última lavagem, o precipitado foi submetido ao vácuo para completa remoção da acetona. Ao fim do processo de precipitação, as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) para determinação da quantidade a ser aplicada no gel.

As proteínas (300 µg) foram, então, dissolvidas em tampão de hidratação (uréia 7M, tiuréia 2M, CHAPS 1%, IpG-buffer 2%, azul de bromofenol) e a solução aplicada em tiras Immobiline DryStrips, pH 3-10 (13 cm) (Amersham Biosciences), as quais foram deixadas para reidratar *overnight*. Em seguida, a eletrofocalização foi realizada num sistema Ettan IPGphor II (Amersham Pharmacia Biotech) sob condições sugeridas pelo fabricante.

Depois da primeira dimensão, as tiras foram submetidas a duas lavagens de 20 min cada, à temperatura ambiente com 3 mL de tampão de equilíbrio (Tris 50 mM, glicerol 30%, uréia 6 M, SDS 2% e azul de bromofenol) contendo DTT (10:1 p/v) e iodoacetamida IAA (25:1 p/v), respectivamente.

A segunda dimensão foi realizada em sistema vertical com gel de separação 12,5% (14 x 14 cm), a temperatura ambiente, sendo as condições da corrida 200 V e 30 mA por placa. O gel foi corado com Coomassie R-250 e escaneado com Imager Scanner (Amersham Biosciences) e LabScan software. A análise do gel foi realizada com ImageMaster 2D Platinum Software (Amersham Biosciences).

4.6 Seleção e processamento dos *spots* para espectrometria de massas

Todas as proteínas coradas com Coomassie Brilhante Blue foram retiradas dos géis bidimensionais com o auxílio de um bisturi e transferidas para tubos eppendorfs de 1 mL, onde foi realizada a digestão com tripsina, de acordo com o método de Hellman *et al.* (1995). Os spots foram descorados em solução de bicarbonato de amônio 25 mM/ acetonitrila 50 % em pelo menos 3 lavagens de 30 min, e desidratados, duas vezes, com acetonitrila 100% por 5 minutos. O solvente remanescente foi removido dos pedaços de gel em concentrador de amostra Speed Vac (Savant). Os spots foram reidratados com 15 µL de solução

de bicarbonato de amônio 50 mM contendo 0,2 µg de tripsina grau seqüenciamento modificada (Promega). Após 1 h a 4 °C, foram adicionados 20 µL do tampão bicarbonato de amônio 50 mM em cada tubo e a digestão realizada a 37 °C em banho por 16 h. Em seguida, os peptídeos trípticos foram extraídos dos géis com uma solução de acetonitrila 50% e ácido trifluoracético (TFA) 5% com auxílio de um sonicador por 30 min.

4.7 Cromatografia em coluna de troca catiônica “Mono-S Sepharose” acoplada ao sistema ÄKTApurifier

A fração proteica do Látex de *Cryptostegia grandiflora* (PLCg) foi submetida à cromatografia de troca catiônica, usando uma coluna “Mono-S Sepharose” acoplada ao sistema ÄKTA purifier 10 (GE Healthcare - USA). A coluna foi previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,5. O pico não retido foi eluído com Tris-HCl 25 mM pH 7,5 (10 mL), e em seguida, as proteínas retidas foram eluídas com Tris-HCl 25 mM pH 7,5 contendo NaCl 1 M (0,0 – 0,4 M por 25 mL). O fluxo foi de 1 mL/min e as frações de 0,5 mL foram coletadas de acordo com os picos de densidade ótica em 280 nm. Os picos semelhantes das cromatografias foram reunidos e concentrados utilizando o sistema de ultrafiltração a 4 °C

4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

SDS-PAGE foi conduzida de acordo com Laemmli (1970). O teor de proteínas solúveis das amostras estudadas foi determinado pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976). As amostras foram preparadas com tampão de amostra Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo SDS 2% e 2-mercaptoetanol 5% para uma concentração final de 2 mg/mL, aquecidas a 100°C por 5 minutos em banho maria e centrifugadas a 5000 g por 5 minutos. Após resfriadas, foram adicionados cristais da sacarose e 3µL de azul de bromofenol 0,1% (m/v) às amostras, logo em seguida foram aplicadas em gel poliacrilamida (gel de concentração 5 % e de separação 12,5 %) na presença de SDS (PAGE-SDS). As corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura ambiente, a 25 mA por um período entre 90 e 120 minutos. As bandas protéicas foram coradas

com Coomassie Brilliant Blue (R-250) 0,1% em solução aquosa com ácido acético e metanol (6:1:3 v/v/v). O gel foi descorado com a mesma solução na ausência do corante.

4.9 Análises por Espectrometria de Massas dos picos cromatográficos em coluna MonoS

4.9.1 Análises de peptídeos trípticos obtidos de cada pico (1 ao 12)

Inicialmente, as proteínas relacionadas aos picos oriundo da cromatografia de troca catiônica foram digeridas com tripsina de acordo com Hellman *et al.* (1995). Os peptídeos foram separados em uma coluna de fase reversa nanoACQUITY HSS T3 C18 (75 μ m x 200 mm) utilizando um gradiente de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico, com gradiente de 3% a 85% a um fluxo de 400 nL/min. Os espectros de massa foram adquiridos em instrumento SYNAPT G1 HDMS Acquity UPLC (Waters Co., Milford, EUA). A aquisição de dados de massas foi obtida por meio de modo de aquisição de dados dependente da intensidade dos três íons precursores mais abundantes para cada MS, com carga +2, +3 e +4. Os dados foram obtidos também para a fragmentação destes íons mais intensos, onde foram fragmentados (MS/MS) em uma célula de colisão contendo gás argônio. Para correção das massas adquiridas o equipamento utilizou a fonte de nanoLockSpray contendo GFP a 500 fmol, que a cada 30 segundos foi feita uma leitura (MS) a fim de que as massas obtidas de MS para precursores e MS/MS para produtos fossem corrigidas em tempo real.

Os dados coletados foram processados usando o software Protein Lynx Global Server 2 e convertidos em arquivos de texto para a busca em bancos de dados. A fim de identificar as proteínas, as buscas foram realizadas contra os bancos de dados NCBI nr e Swissprot usando MASCOT Daemon, assumindo como parâmetros um única clivagem perdida, oxidação de resíduos de metionina e alquilação de resíduos de cisteínas. Uma tolerância de massa de 0,1 Da para

peptídeos e de 0,5 Da para os produtos da fragmentação foram utilizados para busca.

4.9.2 Análises de massa intacta do pico 1

A amostra obtida no pico 1 da cromatografia em coluna MonoS foi diluída em ácido fórmico 0,1% e acetoneitrila 30% em água ultrapura, centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi aplicado por infusão direta a uma concentração de 10 µg/mL. A aquisição de dados (MS) foi realizada com um espectrômetro de massas Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK), programado com uma RF offset (perfil MS) ajustada de forma que os dados de MS foram efetivamente adquiridos de 1000-4000 m/z, o que possibilitou a obtenção das massas distribuídas múltiplamente carregadas. Para todas as medições, o espectrômetro de massas foi operado no modo 'V', com uma potência de resolução de, pelo menos, 10.000 m/z. Todas as análises foram realizadas utilizando ionização por electrospray no modo ESI(+) e a coleta de dados foi realizada utilizando o programa MassLynx 4.1 (Waters – USA) e os espectros de distribuição de cargas foram deconvoluídos para análise dos resultados.

4.10 Determinação da sequência de aminoácidos NH₂-Terminal do pico 1

A determinação da sequência de aminoácidos NH₂-terminal foi realizada pelo método de Edman no sequenciador automático de proteínas (Shimadzu PPSQ -23A). Para tanto, o pico foi solubilizado em água ultrapura e submetida ao sequenciamento. No processo de identificação dos aminoácidos, os derivados de feniltioidantoína dos aminoácidos (PTH-aminoácidos) foram detectados a 269 nm, após separação em coluna de fase reversa C18 (4,6 x 2,5 mm), conduzida sob condições isocráticas de acordo com as instruções do fabricante. A sequência N-terminal obtida foi comparada com outras sequências existentes no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando a ferramenta de busca BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>).

last.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi).

4.11 Análise por microscopia de força atômica (AFM)

As proteínas foram caracterizadas no Microscópio de Força Atômica do Laboratório de Microscopia Avançada (Departamento de Física - UFC). A proteína foi solubilizada em água ultra pura para uma concentração final de 0,12 µg/mL e então centrifugada a 13000 g por 10 min a 25 °C. Em seguida, 1 µL da proteína foi aplicado diretamente na superfície da mica e incubada em dessecador por 30 min. As imagens foram geradas no equipamento Nanoscope Multimode IIIa (Bruker). O método utilizado foi o de varredura por contato intermitente (tapping mode) utilizando uma sonda de cantilever retangular (TESP - Bruker) com constante de mola de 42 N/m. As imagens foram adquiridas com varreduras de 0.5 Hz e resolução de 512 x 512 linhas (máximo do equipamento). As medidas foram realizadas em ar e temperatura ambiente.

4.12 Ensaio biológicos

4.12.1 Cultivo dos fungos

O cultivo dos fungos foi realizado em 25 mL de Sabouraud Dextrose Agar (SDA) estéril, distribuídos em placas de Petri (100 x 15 mm), mantidos em câmara de germinação do tipo B.O.D., a 27 ± 2 °C, umidade de 70% e fotoperíodo de 12 horas. O meio de cultura era constituído de 65 g de SDA dissolvido em 1 litro de água destilada e autoclavado por 20 minutos, a 120 °C, 1,5 kgf. Os fungos eram renovados mensalmente através da transferência de *pellets* de uma placa contendo os fungos para outra placa contendo apenas meio de cultura SDA. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar contendo chama de fogo.

4.12.2 Obtenção da suspensão de esporos

A obtenção das suspensões de esporos foi realizada segundo Melo e colaboradores (2005). Após os fungos terem tomado todo diâmetro da placa de Petri, cerca de 15 dias após o repique (cultura fresca), essas foram abertas em

capela de fluxo laminar e 10 mL de água destilada foram adicionados aos meios de culturas contendo os respectivos fungos. Com auxílio de uma alça de Drigalski (previamente flambada), movimentos suaves na superfície do micélio foram realizados para a liberação dos esporos. As suspensões obtidas foram filtradas em malhas finas de nylon estéreis para a retirada das hifas remanescentes. O filtrado resultante foi denominado de suspensão padrão de esporos. Para a realização dos ensaios de inibição de crescimento e da germinação de esporos, as suspensões contendo os esporos foram ajustadas para uma concentração de 2×10^5 esporos/mL. Os esporos foram contados com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico (Olimpus System Microscope BX 60).

4.12.3 Ensaio de inibição do crescimento fúngico em meio líquido

Os ensaios de inibição do crescimento foram realizados conforme a metodologia descrita por Broekaert e colaboradores (1990), com algumas adaptações. Os ensaios foram desenvolvidos em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato (estéreis) de 96 poços. Cada poço continha 10 μ l de uma suspensão de esporos (2×10^5 esporos/mL) e 90 μ L de meio YPD (“Yeast Peptone Dextrose”). Após 16 h na ausência de luz, a 27 °C, 100 μ l das amostras foram adicionados. Os controles negativos e positivos para inibição do crescimento foram o tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, e o peróxido de hidrogênio 200 mM, respectivamente. Todas as amostras foram filtradas em membranas de 0,22 μ m. O crescimento fúngico foi monitorado através de leituras de absorbância a 620 nm, em intervalos de 12 ou 24 horas, até um total de 48 ou 72 horas, em leitor de ELISA (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences).

4.12.4 Ensaio de inibição da germinação de esporos

O efeito das frações sobre a germinação dos esporos foi avaliado de acordo com o método descrito por Ji e Kúc (1996), adaptado para uso de placas de polietileno reticuladas. Uma alíquota de 10 μ L da suspensão de esporos ($2,0 \times 10^5$ esporos/mL) foi incubada com 10 μ L das amostras. Como controles foram utilizados tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 estéril, BSA 5 mg/mL,

peróxido de hidrogênio 200 mM. As placas de germinação foram mantidas a 27 °C, por 24 horas, na ausência de luz, conservando a umidade do local por meio de um papel de filtro embebido de água. Decorrido o tempo de germinação, o material foi visualizado em microscópio óptico (“Olimpus System Microscope BX 60”). Foram considerados germinados os esporos que apresentaram tubo germinativo de, ao menos, duas vezes o seu comprimento.

4.13 Preparo de material livre de RNase

Para evitar a degradação do RNA por RNases, todas as soluções e reagentes foram preparados com água previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) na concentração de 1%, por 16 horas a 37 °C, seguida de autoclavagem (120° C, 1 atm, 20 minutos). Com a mesma finalidade, todo material plástico utilizado foi incubado por 12 horas em água tratada com DEPC e em seguida autoclavados.

4.14 Extração do RNA total

RNA total de folhas de *Cryptotegia grandiflora* foi obtido com o reagente Concert Plant Reagent (Invitrogen®). As folhas de *C. grandiflora* foram coletadas em nitrogênio líquido, maceradas e armazenadas em ultrafreezer. Em seguida foi adicionado de 0,5 mL do reagente de extração para cada 0,1 g de folha pulverizada. Após 5 minutos, o material foi centrifugado a 12.000 g (Eppendorf®MiniSpin, Model 533), durante 2 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 mL estéril e adicionado 0,1 mL de NaCl 5 M. Em seguida, foi adicionado 0,3 mL de clorofórmio e centrifugado a 12.000 g, por 10 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril e adicionado isopropanol na relação de 1:1 (v/v). A amostra foi centrifugada nas mesmas condições e a fase aquosa descartada. O precipitado de RNA total foi submetido a uma lavagem utilizando solução de etanol a 75% (1 mL de etanol para cada 0,5 mL do reagente de extração) e centrifugado a 12.000 g por 1 min à temperatura ambiente. A fase aquosa foi descartada. O precipitado de RNA total foi seco a temperatura

ambiente e, em seguida, hidratado com 30 μL de água livre de RNase. A quantificação da amostra de RNA total foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific), sendo considerado uma unidade de DO 260nm equivalente a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para essa análise, foi empregado 1 μL da amostra de RNA total.

4.15 Eletroforese em gel de agarose

Eletroforese em gel de agarose foi uma estratégia utilizada para avaliar diversos experimentos desse trabalho, como por exemplo, a confirmação da extração do RNA total, amplificação dos produtos nas reações de PCR, extração do DNA plasmidial.

O gel foi preparado com agarose na concentração de 1 ou 1,2% (m/v) em 50 mL de tampão TBE (Tris-Borato 45 mM, pH 8,0, contendo EDTA 1 mM.). A mistura foi aquecida até a total solubilização da agarose. As amostras foram preparadas com o tampão 5X Green GoTaq Reaction Buffer (Promega). A corrida ocorreu com uma corrente constante de 100 mA, por cerca de 40 min. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por 30 min. As bandas de DNA ou RNA foram visualizadas por exposição do gel à luz ultravioleta ($\lambda = 302 \text{ nm}$) em transluminador (Gel Transilluminator Bio-Rad).

4.16 Análise da integridade do RNA total

A integridade da amostra de RNA total foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1,2 % como descrito anteriormente. 10 μL de RNA total foi misturado com 2 μL de tampão 5X Green GoTaq Reaction Buffer e aplicados no gel. A corrida foi realizada a 100 V.

4.17 Tratamento do RNA total com DNase

Para eliminar o DNA genômico extraído indevidamente, o RNA total foi tratado com DNase (RQ1 DNase, Promega®). 8 μL (1 μg) de RNA total foi incubado com 1 μL da enzima DNase e 1 μL de tampão da enzima 10x, a 37 °C durante 30 min. Cada alíquota foi tratada com 1 U da enzima DNase. A reação foi parada com a adição de 1 μL da solução de parada e incubada a 65 °C por

10 min. Em seguida, o RNA total tratado foi estocado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento da purificação do RNA total.

4.18 Purificação do RNA total

A purificação do RNA total foi realizada usando o RNeasy Mini Kit (Quiagen). O volume das amostras foi ajustado para 100 μL com água livre de RNase. Em seguida, foram adicionados 350 μL de tampão RLT e 250 μL de etanol 100%. A mistura foi imediatamente transferida para uma coluna (RNeasy Mini Spin Column) acoplada a um microtubo de 2 mL e centrifugados a 8.000 x g, por 15 segundos à temperatura ambiente. O filtrado foi descartado. Em seguida foi adicionado 500 μL do tampão RPE e centrifugado nas mesmas condições anteriores. A coluna foi transferida para um novo microtubo (1,5 mL) estéril e adicionados 30 μL de água livre de RNase. O RNA purificado foi recuperado através de centrifugação de 8.000 x g, à temperatura ambiente, durante 1 min. O RNA purificado foi estocado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento da síntese da primeira fita de cDNA.

4.19 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores específicos

Os oligonucleotídeos iniciadores degenerados utilizados para clonagem do gene da CgOsm foram os mesmos desenhados pelo nosso grupo de estudo com base na sequência NH₂-terminal para uma osmotina (CpOsm) purificada de látex da planta *Calotropis procera*, devido à alta similaridade entre a sequência NH₂terminal de CpOsm e CgOsm. Os iniciadores foram desenhados a partir de sequências consenso de osmotinas obtidas no banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.gov) utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor® (Tabela 2). O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores foi realizado com a inserção de sítios de restrição para as enzimas XBa e EcoRI para clonagem em pGEM-T easy.

Tabela 2 - Iniciadores usados na clonagem da osmotina de *C. gradiflora*

Nome	Sequência
1 oligo dT(18)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT
2 CpOsm - F	CCGGCCACNTTYACNATHCGNAACAAYTGYCC
3 CpOsm - R	CCGGGRCARAANAYAACYCTRTRARTTDGT

CpOsm - F: Iniciador degenerado senso; CpOsm - R: Iniciador degenerado reverso

4.20 Obtenção de cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada pela enzima transcriptase reversa, em tubos eppendorf de 200 μ L, e consistiu na adição de 1,0 μ L de oligo(dT)18 (Promega®), a 2,6 μ L de RNA purificado (1500 ng) e 8 μ L de água livre de RNase, que foi incubada em termociclador, a 70 °C, por 5 min, seguido de 4 °C por 5 min. Ao fim dessa etapa, o termociclador foi parado e aos tubos de reação foi adicionada uma solução que consistia de 4,0 μ L do tampão da enzima Improm II, 2,4 μ L de MgCl₂ 25 mM, 1,0 μ L de dNTP 1,0 mM e 1,0 μ L da enzima Improm II (transcriptase reversa, 1 unidade/ μ L), totalizando 20 μ L de volume reacional. A programação no termociclador foi, então, retomada, sendo a reação conduzida de acordo com os parâmetros que se seguem: 25 °C por 5 min, 42 °C por 1 h, 70 °C por 15 min, 4 °C. O produto da RT-PCR foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific) e utilizado nas reações de PCR subsequentes.

4.21 Amplificação da região codificadora da CgOsm

A amplificação do gene da CgOsm foi realizada usando PCR convencional. As reações de PCR para um volume final de 10 μ L foram realizadas em microtubo estéril de 200 μ L, contendo os componentes mostrados na Tabela 3. O processo de amplificação foi realizado em no termociclador Techine TC-512, programado para um passo inicial de desnaturação (3 min a 95 °C), seguido por 33 ciclos de 1 min a 95 °C (desnaturação), 1 min a uma temperatura de 50 °C a 60 °C (gradiente - anelamento) e 5 min a 72 °C (extensão). No último ciclo, realizou-se uma última fase de extensão final a 72 °C por 8 min. As amostras permaneceram a 4 °C no termociclador até a coleta

dos produtos de reação. Para análise do produto da reação, uma alíquota de 5 μL foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1%.

Tabela 3 – Constituintes e respectivos volumes utilizados na reação de PCR

Componentes da reação de PCR	Volume utilizado (μL)
cDNA	1 (500 ng)
dNTPs 1mM	2
Tampão 5X*	2
CpOsm R 5 μM	1
CpOsm F 5 μM	1
GoTaq Polimerase 5 U/ μL	0,2
Água Ultra Pura	2,8
Total	10

*Tampão 5X *Green GoTaq Reaction Buffer* com MgCl_2 (Tris-HCl 50 mM, pH 9; NaCl 50 mM; MgCl_2 5 mM)

4.22 Purificação dos produtos de PCR

Após a realização de várias reações de PCR nas condições descritas anteriormente para acúmulo de material, o produto foi purificado utilizando o kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band* (GE Healthcare). O volume total do produto de amplificação foi ajustado para 100 μL com água ultra pura e adicionado 500 μL de tampão de captura (Capture buffer). A mistura foi transferida para uma coluna de purificação (GFX MicroSpin column) acoplada a um tubo de coleta (Collection tube) e centrifugado a 13.400 x g por 30 segundos a 25 °C. O filtrado obtido no tubo de coleta foi descartado, a coluna novamente acoplada a esse tubo, e 500 μL do tampão de lavagem (Wash buffer) adicionados à coluna, sendo o conjunto centrifugado nas mesmas condições anteriores. Esse procedimento foi realizado por duas vezes, sendo o filtrado descartado. Por fim, a coluna foi acoplada a um tubo virgem de 1,5 mL (tipo Eppendorf®), 30 μL do tampão de eluição (Elution buffer) foi adicionado e deixado incubar por 1 min à temperatura de 25 °C. O DNA foi eluído por

centrifugação a 13.400 x g durante 1 minuto a temperatura de 25 °C. O produto purificado foi estocado em freezer -80 °C e utilizado para a ligação no vetor de clonagem.

4.23 Ligação dos produtos de PCR amplificados no vetor de clonagem pGEM-T Easy

O produto amplificado foi ligado ao plasmídeo pGEM-T *Easy Vector* (Promega, USA) (Figura 5) de acordo com as especificações do fabricante (Tabela 4). O cálculo para a quantidade de DNA utilizada, tanto para o vetor quanto para o produto de PCR, para uma razão de 5:1 (inserto : vetor) obedeceu a seguinte fórmula:

$$\frac{[\text{vetor (ng)} \times \text{tamanho do inserto (pb)}]}{\text{tamanho do vetor (pb)}} \times \text{razão} = \text{inserto (ng)}$$

A ligação procedeu a 4 °C por 16 horas em termociclador Techine TC-512. O produto ligado ao plasmídeo, chamado de pGEM::CgOsm, foi utilizado para transformação de *Escherichia coli* TOP10F'.

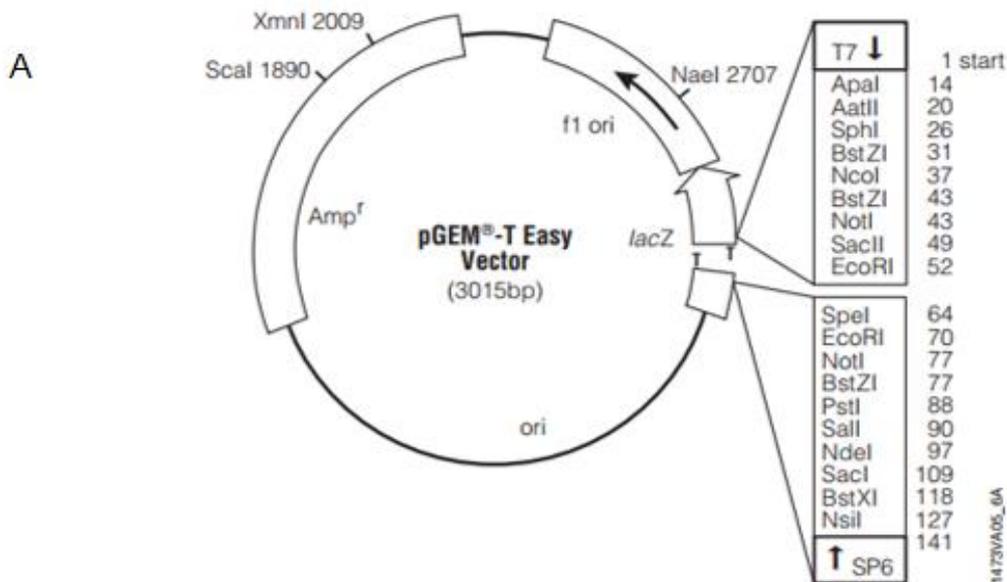
4.24 Transformação de *Escherichia coli* TOP10F'

As células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10F' foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará – UFC coordenado pelo Professor Dr. Thales Barbosa Granjeiro.

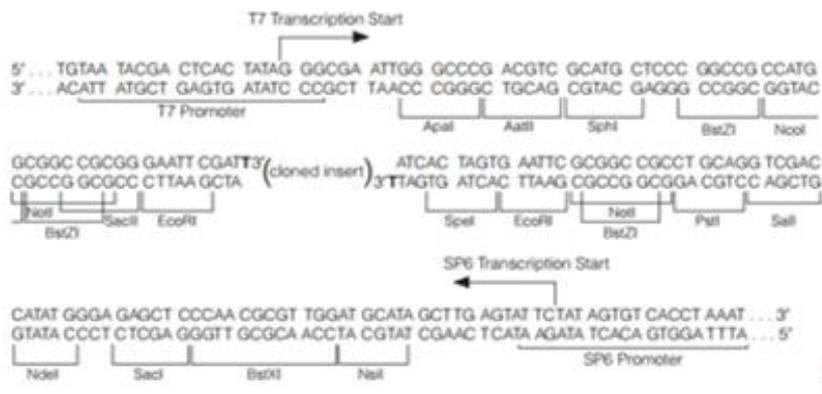
Após a reação de ligação, os produtos ligados foram eletroporados a 2.500 V (Eletroporador 2510 Eppendorf, USA) em células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10F'. Logo após ao choque foi adicionado ao eletroporado 1 mL de meio SOC pré-aquecido a 37 °C. As células foram incubadas a 37 °C por 1 hora a 200 rpm. Foram plaqueados, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, 100 µL da solução contendo as células eletroporadas com os produtos da ligação, em

placas de Petri contendo meio LB Agar (carbenicilina 100 µg/mL, estreptomicina 30 µg/mL, IPTG 0,5 mM e X-Gal 80 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa de crescimento a 37 °C, por 16 h.

Figura 5 - Mapa do vetor de clonagem P-GEM T-easy



B



(A) Diferentes sítios de restrição de diferentes enzimas, a região do gene que confere resistência à ampicilina, e o gene lacZ; (B) Detalhamento do sítio múltiplo de clonagem

Tabela 4 – Constituintes e respectivos volumes utilizados na reação de clonagem, para uma razão 5:1 (inserto: vetor)

Componentes da reação de clonagem	Volume utilizado
Produto amplificado por PCR	2,5 µL (30 ng)
Tampão 2x <i>Rapid Ligation Buffer</i>	5 µL
T4 DNA Ligase 10 U/µL	1 µL
Vetor pGEM-T Easy	1 µL
Água ultra pura	0,5 µL
Total	10 µL

4.25 Seleção dos clones e purificação dos plasmídeos

Alíquotas de 50 µL de bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar (peptona 10 g, extrato de levedura 5 g, NaCl 5 g, q.s.p. 1 L), contendo estreptomicina (30 µL/mL), carbenicilina (100 µL/mL), isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG, 100 µL/mL) e 5-bromo-4-cloro-indoil-β-D-galactosídeo (X-GAL, 80 µL/mL) e incubadas a 37 °C, durante 16 h.

Para extração de DNA plasmidial, 9 colônias brancas e 1 azul (controle), foram cultivadas em 5 mL de caldo LB contendo estreptomicina (100 µg/mL) e carbenicilina (50 µg/mL) sob agitação a 180 rpm, por 12 h, a 37 °C. Após essa etapa, os plasmídeos foram extraídos e purificados do cultivo bacteriano usando o kit MiniPrep para extração de DNA plasmidial. De cada cultura selecionada, foram centrifugados 4 mL, durante 1 min, à temperatura ambiente (Eppendorf® MiniSpin, Model 533). O sobrenadante foi descartado, sendo o precipitado ressuspenso com 250 µL de tampão S1 (contém RNase) e agitado (vórtex). Em seguida, foram adicionados 250 µL de tampão de lise S2 (contém SDS e NaOH) e 350 µL de tampão de neutralização S3 e misturados gentilmente (6 e 8 vezes) por inversão do microtubo. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g, durante 10 min, à temperatura ambiente. Imediatamente, as amostras foram transferidas para colunas (MiniPrep), previamente acopladas a microtubos de 2

mL, e centrifugadas a 12.000 x g, durante 1 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado. Logo após essa etapa, por duas vezes seguidas, 700 µL de tampão de dessalinização W2 (contém etanol 100%) foram adicionados às colunas contendo as amostras de plasmídeos e centrifugadas nas mesmas condições anteriores.

Posteriormente, as colunas foram recolocadas em seus devidos microtubos e centrifugadas a 12.000 x g, por 1 min, à temperatura ambiente. Finalmente, as amostras foram eluídas com tampão TE (Tris-HCl 2,5 mM, pH 8,5, EDTA 1 mM), aquecido previamente a 60 °C. As amostras foram armazenadas a -20 °C para uso posterior.

4.26 Digestão com a enzima de restrição EcoRI

Para confirmação da transformação, os plasmídios transformados (pGEM::CgOsm) foram digeridas com a enzima de restrição EcoRI (Promega®) por 3 h a 37 °C, em tampão de digestão. Ao fim da reação, os produtos foram analisados em gel de agarose (1%, m/v). Os clones que se apresentaram positivamente transformados foram selecionados e submetidos ao sequenciamento.

4.27 Sequenciamento de cDNAs

Os clones que tiveram sua transformação confirmada foram devidamente aliquotados e enviados para serem sequenciados na empresa MacroGen (<http://dna.macrogen.com/eng/>) utilizando os iniciadores universais M13F-pUC (GTTTTCCCAGTCACGAC) e M13R (GCGGATAACAATTCACACAGG). A MacroGen é uma empresa sul-coreana que oferece serviços de sequenciamento automatizado de DNA com alta acurácia e rapidez.

4.28 Análises das sequências de cDNAs

A análise das sequências foi realizada com auxílio do programa PSI-BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), além de outras ferramentas de bioinformática disponíveis on line, nos sites do National Center for Biotechnology Information, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools>), Swiss Institute of Bioinformatics, SIB

(<http://www.expasy.ch/tools>) e outros. Os alinhamentos múltiplos das sequências de aminoácidos e de DNA foram realizados com o programa ClustalW2 (LARKIN et al., 2007), posteriormente, corrigidos manualmente.

Para obtenção da sequência deduzida de aminoácidos, foi utilizada a ferramenta de tradução TRANSLATE tool ExPASy (<http://expasy.org/tools/>). As sequências deduzidas de aminoácidos, no formato FASTA, foram comparadas com proteínas já depositadas no Banco de Dados do NCBI (GenBank), através do programa pBLAST, que alinha sequências de proteínas fornecidas em relação as sequências de proteínas já catalogadas pelo GenBank.

4.29 Modelagem Computacional

Foram utilizadas quatro ferramentas de bioinformática para gerar o modelo tridimensional através de modelagem por homologia. A modelagem por homologia foi empregada para a construção do modelo 3D da proteína alvo, com o resultado do alinhamento da sequência alvo e o molde. O método utilizado para a construção do modelo 3D foi o de modelagem pela satisfação de restrições espaciais. Este método calcula as restrições espaciais da estrutura molde e usa o alinhamento múltiplo, aplicando-os a sequência alvo. O modelo é derivado da minimização das violações das restrições espaciais, e construído pela imposição dessas restrições de ângulos e distâncias na sequência alvo, derivadas do alinhamento com o molde.

O programa SWISS-MODEL foi utilizado na construção do modelo tridimensional da proteína alvo. Este programa automático on line utiliza a sequência no formato PDB adquirida do alinhamento com o molde pelo programa SPDBV (ARNOLD et al., 2006), para a construção do modelo levando em conta os parâmetros estereoquímicos anteriormente citados e otimiza a estrutura através da minimização de energia (minimização mecânica). A estrutura de uma proteína do tipo taumatina de kiwi (PDB, 4BCT) foi utilizada como molde para a construção do modelo tridimensional da sequência da osmotina em estudo. A osmotina de *C. grandiflora* também foi modelada pelos softwares CPH Server (NIELSEN, et al, 2010), Phyre² (KELLEY, STERNBERG, 2009) e Modeller Server (SALI, BLUNDELL, 1993). O modelo tridimensional da adiponectina

(ADIPOQ) e do receptor de adiponectina (ADIPOR1) foram gerados utilizando o SWISS-MODEL.

4.30 Validação dos modelos

A etapa final do processo de modelagem consiste em avaliar os diferentes níveis de organização estrutural. Nessa etapa analisam-se os vários níveis de empacotamento global da proteína, os possíveis erros estruturais em regiões localizadas e os parâmetros estequiométricos.

OS programas utilizados na avaliação dos parâmetros estereoquímicos foram o MolProbity, ProSA e ERRAT plot os quais avalia os comprimentos de ligação, os ângulos planos, a planaridade dos anéis de cadeias laterais, a quiralidade, as conformações das cadeias laterais, a planaridade das ligações peptídicas, os ângulos torcionais da cadeia principal e das cadeias laterais, o impedimento estérico entre pares de átomos não ligados e a qualidade do Mapa de Ramachandran (RAMACHANDRAN, SASISEKHARAN, 1968).

O programa 3DSS (KOPP, SCHWEDE, 2004), foi usado para o cálculo do RMSD e para a sobreposição estrutural entre o modelo obtido por modelagem comparativa e a estrutura resolvida por difração de raio-X utilizada como molde.

4.31 Complexo proteína- proteína

A interação proteína- proteína foi realizada com o auxílio do Cluspro server (COMEAU *et al.*, 2004). O Cluspro é um servidor baseado na transformação de Fourier que é capaz de avaliar bilhões de conformações de interação. O servidor retorna os melhores modelos baseados na energia e no tamanho do complexo. O mais baixo valor de score foi escolhido para ser analisado. O complexo resultante foi analisado no software Gromacs.

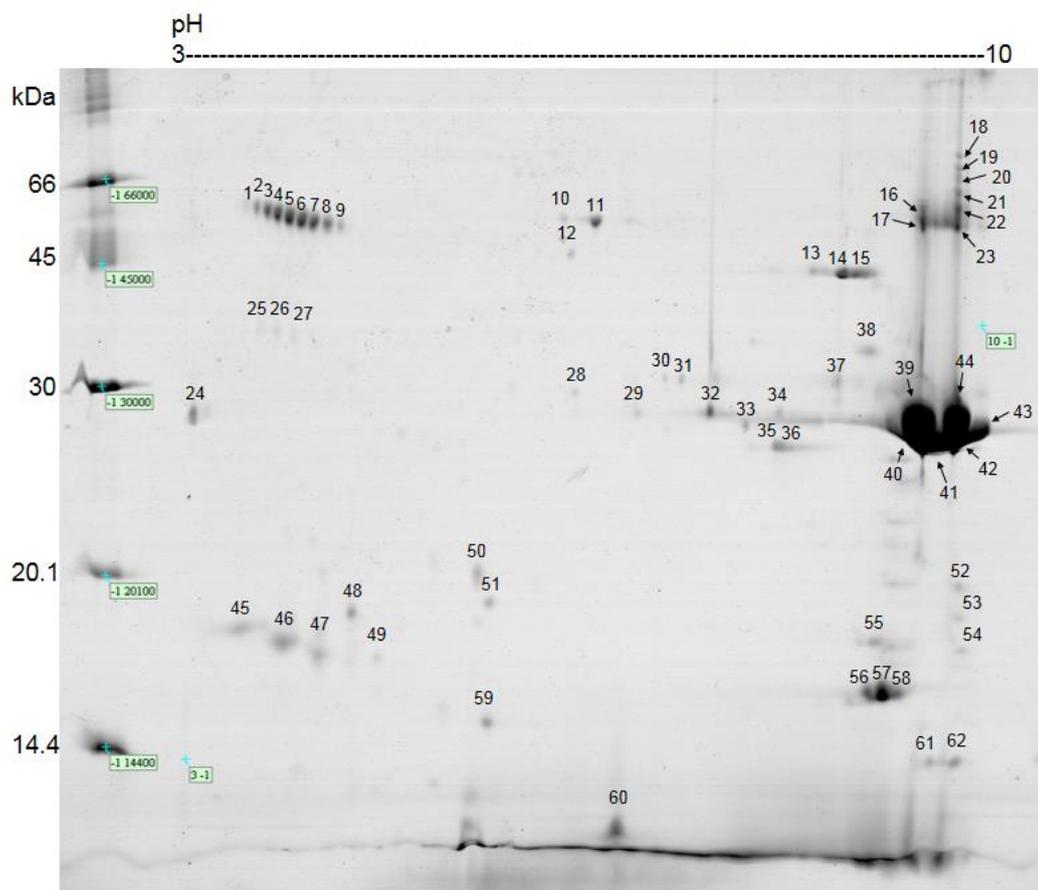
5- RESULTADOS

Na tentativa de identificar proteínas de defesa no látex de *Cryptostegia grandiflora*, as proteínas da fração LPCg (proteínas do látex de *C. grandiflora*) foram separadas através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida e analisadas por espectrometria de massa. O perfil bidimensional revelou a presença de diversas proteínas incluindo suas possíveis isoformas, no intervalo de pH de 3-10. A maioria dos spots encontra-se na faixa de pH 8 a 9, com massa molecular predominante em torno de 30 kDa, porém algumas proteínas estão dispostas em áreas distintas do gel, o que caracteriza uma grande diversidade de proteínas, com diferentes propriedades físico-químicas, presentes no látex de *C. grandiflora* (Figura 6).

Para identificar as proteínas separadas por eletroforese bidimensional, 62 spots foram removidos do gel, digeridos com tripsina e analisados por espectrometria de massa. Dessa forma, foram identificados 59% (36 de um total de 61) dos spots analisados. Foi detectada a presença de proteínas de reserva, proteínas estruturais, alérgenos e proteínas de defesa. As proteínas de defesa na fração PLCg representam 44% (16 de um total de 36) do total de spots identificados e são representadas pelas proteases cisteínicas, osmotinas e proteínas relacionadas à patogênese (Tabela 5).

Devido à presença de proteínas reconhecidamente envolvidas na defesa vegetal, o estudo dessas proteínas isoladas serve como estratégia para o entendimento do papel fisiológico dos látices em plantas. Com o objetivo de isolar proteínas do látex de *C. grandiflora*, LPCg foi fracionada através de cromatografia em uma coluna de troca catiônica “Mono-S Sepharose” acoplada ao sistema Akta Purifier (GE Healthcare).

Figura 06: Eletroforese bidimensional (12,5%, pH 3 - 10) de LPCg.



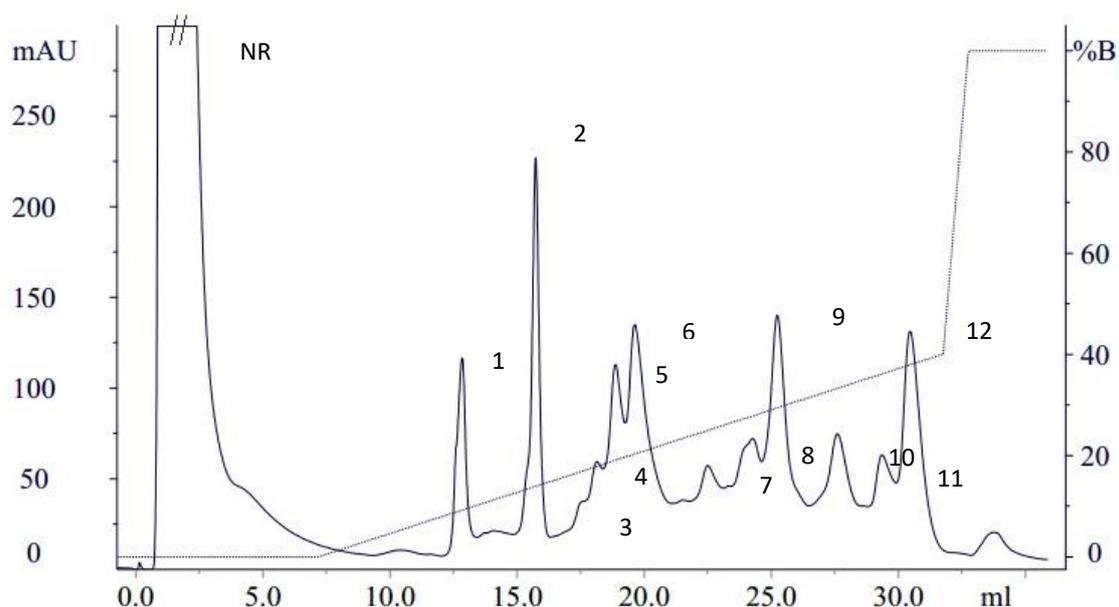
O gel foi corado com Coomassie R 250 (PhastGel Blue R). Os spots proteicos foram numerados, excisados do gel, digeridos com tripsina e analisados por ESI-Q-TOF-MS/MS.

Tabela 5 – Lista de proteínas de defesa identificadas em gel bidimensional de LPCg por ESI-Q-TOF-MS/MS.

Spot	Sequências dos peptídeos idênticos	Proteína	Número de Acesso NCBI	Organismo de referência
18 - 23	K.LISLSEQELVDCDK.T	Protease cisteínica		<i>Daucus carota</i>
24	K.LISLSEQELVDCDK.T	Protease cisteínica	gi 50355621	<i>Daucus carota</i>
35	R.CPDAYSYPK.D R.APGGCNNPCTVFK.T K.DDPTSTFTCPGGTNYR.V R.CPDAYSYPKDDPTSTFTCPGGTNYR.V	Osmotina	gi 197253347	<i>Piper colubrinum</i>
36	R.CPDAYSYPK.D R.APGGCNNPCTVFK.T K.DDPTSTFTCPGGTNYR.V	Osmotina	gi 197253347	<i>Piper colubrinum</i>
39 - 44	K.LISLSEQELVDCDK.T	Protease cisteínica	gi 50355621	<i>Daucus carota</i>
52	K.VGAYCATWDAGQPLWWR.Q	PRP	gi 208659723	<i>Lycoris radiata</i>
55	R.APGGCNNPCTVFK.T	Osmotina	gi 197253347	<i>Piper colubrinum</i>
56	K.LISLSEQELVDCDK.T	Protease cisteínica	gi 50355621	<i>Daucus carota</i>
57	K.VGAYCATWDAGQPLWWR.Q	PRP	gi 208659723	<i>Lycoris radiata</i>

O processo cromatográfico separou a fração inicial (LPCg) em um pico não retido (NR) e doze picos retidos (1 – 12) (Figura 07). Os picos retidos foram eluídos com Tris-HCl 25 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,0 – 0,4 M em 25 minutos com um fluxo de 1 ml/min. Após a realização de várias cromatografias, os picos foram coletados separadamente e concentrados. A concentração protéica dos picos foi estimada pelo método de Bradford (1976) utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Figura 07 - Cromatografia em coluna de troca catiônica “Mono-S Sepharose” acoplada ao sistema Akta Purifier.



Foram aplicados 5 mg de PLCg. O pico não retido foi eluído com Tris-HCl 25 mM pH 7,5 (10 min), e em seguida, os picos retidos foram eluídos com Tris-HCl 25 mM pH 7,5 contendo NaCl 1 M (0,0 – 0,4 M por 25 min). Fluxo: 1 mL/min. O perfil protéico foi medido pela absorbância em 280 nm.

Com o objetivo de avaliar o grau de pureza e as massas moleculares dos picos cromatográficos, foram realizadas eletroforeses sob condições redutoras e não redutoras. Eletroforese sob condições não redutoras mostrou que o pico 1 apresentava massa molecular aparente de 21 kDa e parecia ser homogêneo. O pico 2 apresentou uma banda proeminente em torno de 13 kDa. Os picos 3 a 9

apresentaram um pool de proteínas com massas moleculares variando entre 13 a 45 kDa. Os picos 10, 11 e 12 apresentaram bandas com massas variando entre 28 e 40 kDa (Figura 08).

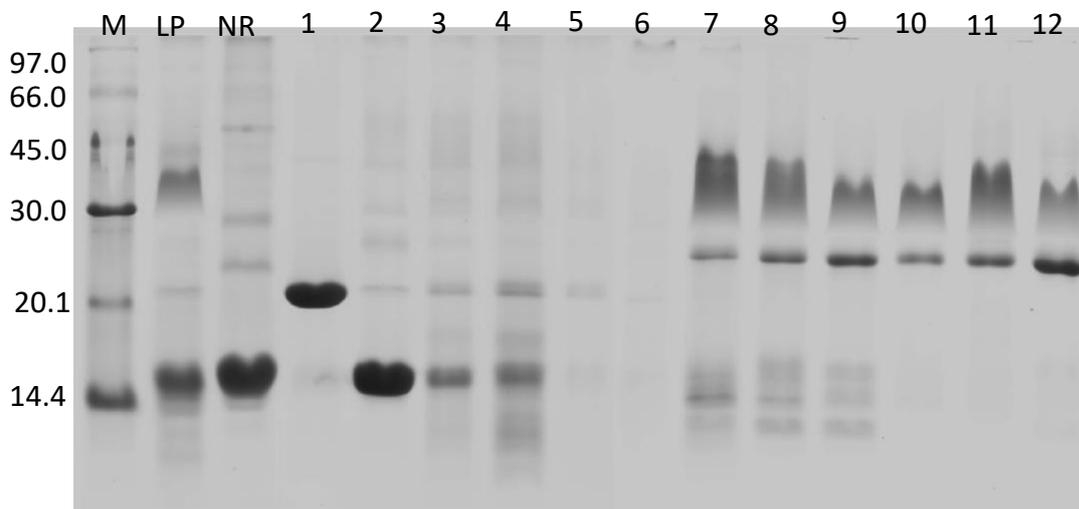
Todos os picos foram tratados com β -mercaptoetanol e analisados por eletroforese. Observou-se uma mudança notória no perfil eletroforético de todos os picos (Figura 09). Esse resultado sugere que a maioria das proteínas retidas são estabilizadas por pontes dissulfeto.

Para identificar as proteínas presentes em cada pico cromatográfico, alíquotas foram coletadas, digeridas e analisadas por espectrometria de massas.

A identificação realizada com auxílio do software MASCOT e o banco de dados do NCBI mostrou que os picos 1 e 2 apresentaram osmotina e proteínas do tipo osmotina, que são proteínas homólogas classificadas dentro da família 5 das proteínas relacionadas à patogênese. Nos picos 3 ao 12 foi encontrada a mesma sequência de aminoácidos (K.LISLSEQELVDCK.T), que foi identificada como uma protease cisteínica de *Daucus carota* (Tabela 06).

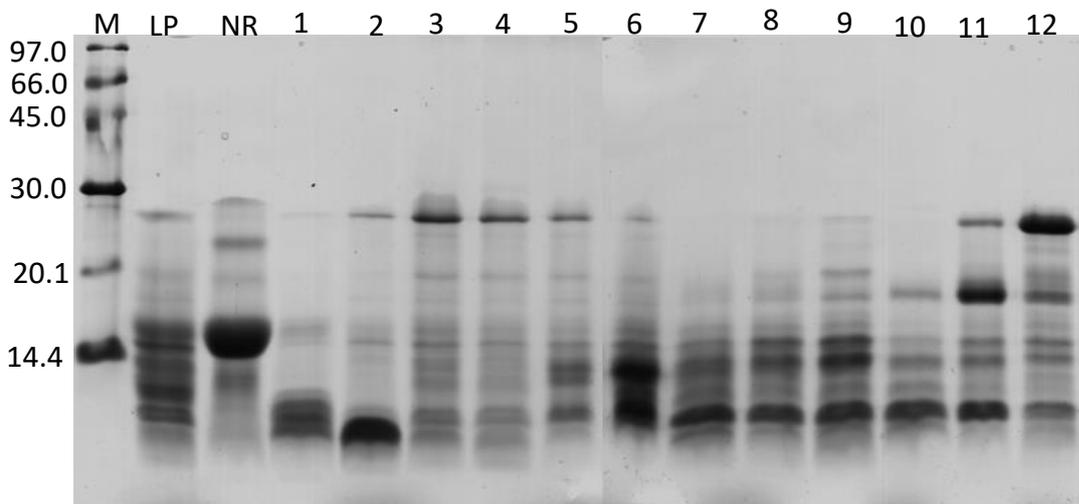
O perfil eletroforético do pico 1 que apresentou uma única banda com massa molecular aparente de 21 KDa, teve sua homogeneidade avaliada através da massa intacta por espectrometria de massas. A proteína apresentou um espectro contendo 2 picos mono carregados com massa de 21696,0020 e 21753,0020 Da e um pico duplamente carregado correspondendo a metade da massa (10848,0010 Da) (Figura 10). O grau de pureza também foi confirmado pela reação de degradação automatizada de Edman, que mostrou uma única sequência NH₂-terminal de 40 resíduos de aminoácidos (ATFDIRSNCPYTVWAAAVPGGGRRLLDRGQWTINVAPGTA). A sequência é altamente consistente com osmotinas ou taumatinas. A sequência alinha com mais similaridade com a sequência NH₂-terminal de osmotina de látex de *Calotropis procera* (Tabela 07).

Figura 08 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) sob condições não redutoras dos picos obtidos após cromatografia de troca catiônica.



Linha M: Marcador de massa molecular; Linha LP: Fração LPCg; Linha NR: Pico não retido; Linhas 1 a 12 representa, respectivamente, os picos 1 ao 12. Foram aplicados 10 μ g de proteína por poço. Gel corado com "Coomassie Brilliant Blue" R-250.

Figura 09 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) sob condições redutoras dos picos obtidos após cromatografia de troca catiônica.



Linha M: Marcador de massa molecular; Linha LP: Fração LPCg; Linha NR: Pico não retido; Linhas 1 a 12 representa, respectivamente, os picos 1 ao 12. Foram aplicados 10 μ g de proteína por poço. Gel corado com "Coomassie Brilliant Blue" R-250.

Tabela 06 – Lista de proteínas de defesa identificadas nos picos cromatográficos em coluna MonoS por ESI-Q-TOF-MS/MS.

Pico	Score	íon parental	Sequências dos peptídeos idênticos	Número de acesso NCBI	Proteína	Organismo de referência
1	89	1787.7472	K.DDPTSTFTCPGGTNYR.V	gi 197253347	Osmotina	<i>Piper colubrinum</i>
	66	2869.2076	R.CPDAYSYPKDDPTSTFTCPGGTNYR.V			
	76	1421.6180	R.APGGCNNPCTVFK.T			
2	66	1419.5998	K.APGGCNNPCTVFK.T	gi 2213852	Proteína do tipo osmotina	<i>Vitis vinifera</i>
		1420.6296	K.APGGCNNPCTVFK.N	gi 4456760	Proteína do tipo osmotina	<i>Quercus suber</i>
3	80	1647.8082	K.LISLSEQELVDCDK.T	gi 50355621	Protease cisteínica	<i>Daucus carota</i>
		942.4844	K.VPASIDWR.K	gi 224133764	Proteína hipotética	<i>Populus trichocarpa</i>
4	78	1647.8088	K.LISLSEQELVDCDK.T	gi 50355621	Protease cisteínica	<i>Daucus carota</i>
		942.4828	K.VPASIDWR.K	gi 224133764	Proteína hipotética	<i>Populus trichocarpa</i>
5	80	1647.8068	K.LISLSEQELVDCDK.T	gi 50355621	Protease cisteínica	<i>Daucus carota</i>

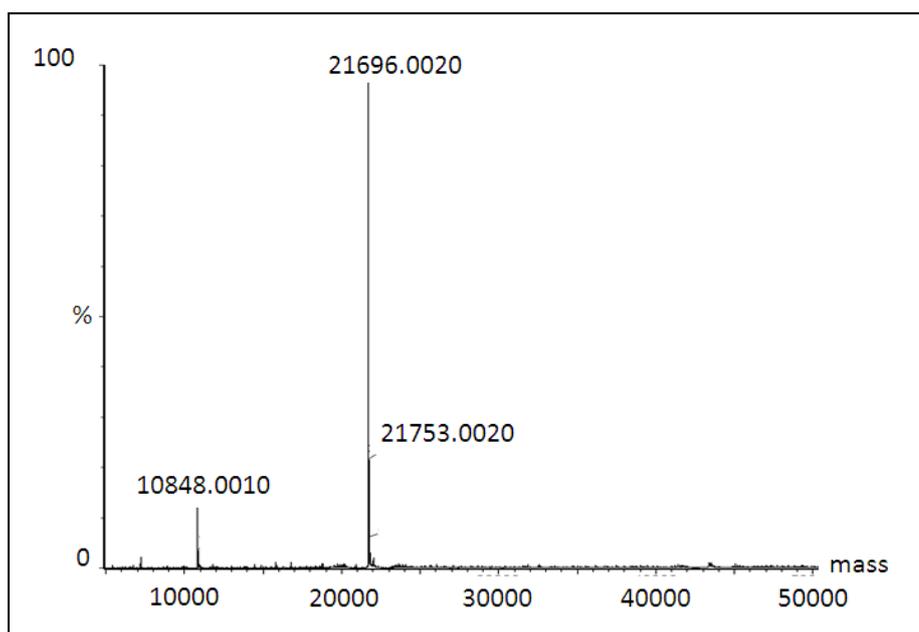
Tabela 06: Continuação

6	*					
8	83	1647.7566	K.LISLSEQELVDCDK.T	gi 50355621	Protease cisteínica	<i>Daucus carota</i>
	60	1334.6034	K.LSEQELVDCSR.N	gi 474419109	Protease cisteínica	<i>Triticum urartu</i>
9	99	1646.7048	K.LISLSEQELVDCDK.T	gi 50355621	Protease cisteínica	<i>Daucus carota</i>
10	83	1646.7742	K.LISLSEQELVDCDK.T	gi 50355621	Protease cisteínica	<i>Daucus carota</i>
11	99	1646.8580	K.LISLSEQELVDCDK.T	gi 50355621	Protease cisteínica	<i>Daucus carota</i>
	59	1334.6046	K.LSEQELVDCSR.N	gi 474419109	Protease cisteínica	<i>Triticum urartu</i>
12	83	1646.7750	K.LISLSEQELVDCDK.T	gi 50355621	Protease cisteínica	<i>Daucus carota</i>
	65	1334.6044	K.LSEQELVDCSR.N	gi 474419109	Protease cisteínica	<i>Triticum urartu</i>

* Proteínas não identificadas

Essa homologia também foi confirmada por análises de MS/MS dos peptídeos digeridos com tripsina (Figura 11). A proteína purificada do látex de *Cryptostegia grandiflora* identificada como uma osmotina foi denominada de CgOsm.

Figura 10 - Espectro de *electrospray* da massa íntegra do pico 1 da cromatografia de troca iônica do látex de *Cryptostegia grandiflora*.



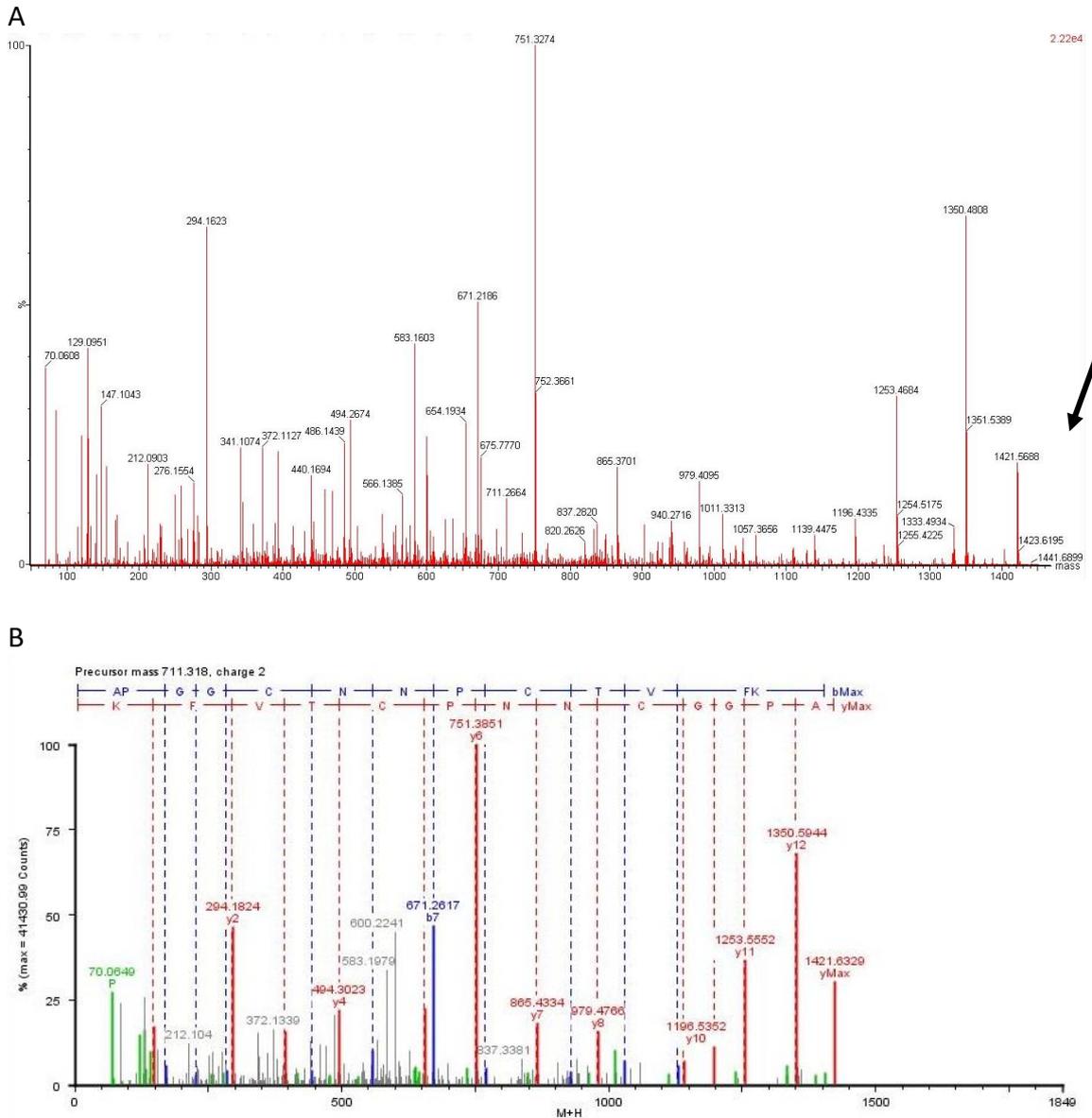
Análise por microscopia de força atômica da CgOsm em uma concentração de 0,12 $\mu\text{g/ml}$ mostrou que grande parte das proteínas estão suficientemente espaçadas, mas formando aglomerados o que dificulta a caracterização das moléculas individuais (Figura 12 A, B, C). Contudo, uma análise mais detalhada da topografia em alta resolução mostra claramente um complexo molecular em forma de um trímero (Figura 12 D).

Tabela 07 - Comparação da sequência de aminoácidos NH₂-terminal de uma proteína purificada do látex de *Cryptostegia grandiflora* e banco de dados do NCBI (Viridiplantae)

Organismo	Identificação	Sequência	ID (NCBI)	Similaridade (%)	E – value
<i>Cryptostegia grandiflora</i>		01 ATFDIRSNCPYTVWAAAVP-GGGRRRLDRGQWTINVPAGTA 40			
<i>Calotropis procera</i>	Osmotina	01 ATFTIRNNCPYTI-WAAAVP-GGGRRRLNSGGTWTINVPAGTA 40	sp P86363.1 OSMO_CALPC	85	3e ⁻¹⁷
<i>Populus balsamifera</i>	Osmotina	24 ATFEIRNNCPYTVWAAASP-GGGRRRLDRGQTWYLNVPAGTS 63	b ACZ67186.1 	80	2e ⁻¹⁵
<i>Populus deltoides</i>	Taumatina	24 ATFEIRNNCPYTVWAAASP-GGGRRRLDRGQTWYLNVPAGTS 63	gb ACZ67185.1 	80	9e ⁻¹⁵
<i>Capsicum annuum</i>	Taumatina	22 ATFEVRNNCPYTVWAASTPVGGRRRLDRGQWTINAPPAGTA 63	gb AAK97184.1 	80	1e ⁻¹⁴

Posições com resíduos conservados estão sombreadas em cinza.

Figura 11 - Representação dos dados MS/MS obtidos por espectrometria de massas da proteína purificada de *Cryptostegia grandiflora*



C - Fragmento interno Identificado: R.APGGCNNPCTVFK.T (Score: 276. Íon parental: 1421.6180; Osmotina de *P. colubrinum*)

(A) Espectro de massa dos peptídeos gerados pela digestão triptica da proteína purificada. (B) Espectro de massas MS/MS e sequência deduzida para o peptídeo observado em 1421,5688 m/z (Indicado com um seta em A). (C) Identificação do peptídeo 1421,5688 m/z pela ferramenta MASCOT no bando de dados do NCBI.

Figura 12: Microscopia de força atômica

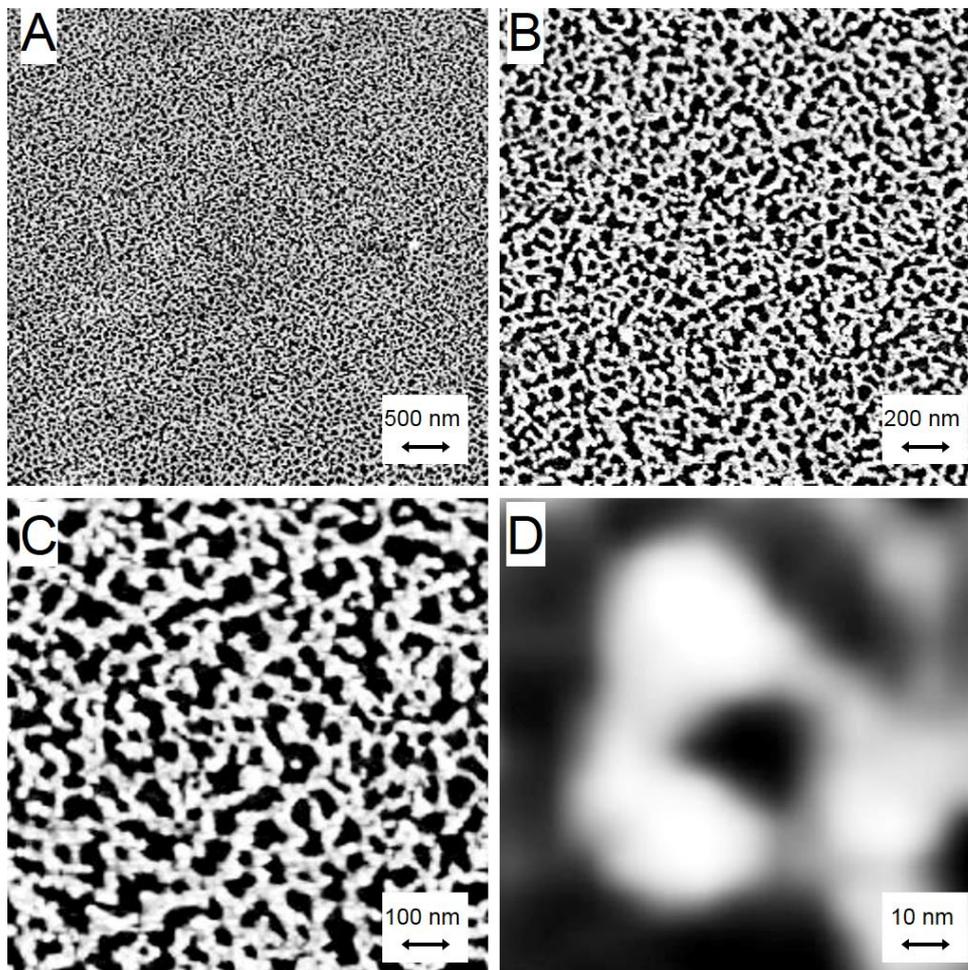


Imagem topográfica (A, B, C e D) da solução de CgOsm (0,12 $\mu\text{g/ml}$) adsorvida em mica por microscopia de força atômica. Um “zoom” da imagem C sugere uma formação em trímero da estrutura de CgOsm (Imagem D).

Devido ao fato que as proteínas da família PR-5, principalmente osmotinas e proteínas do tipo osmotina, serem reconhecidamente antifúngica (TZOU *et al.*, 2011), investigamos a capacidade da CgOsm, na concentração de 0,25, 0,5 e 1 mg/mL, de inibir a germinação de esporos e o crescimento de hifas de duas espécies de fungos fitopatogênicos. CgOsm não foi capaz de inibir o crescimento *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani*, em nenhuma das concentrações testadas. Além disso, a proteína também não foi capaz de inibir a germinação dos esporos das espécies testadas (dados não mostrados).

Para estudos da caracterização molecular de CgOsm, RNA total foi extraído de folhas jovens de *C. grandiflora* utilizando o reagente Concert (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi imediatamente armazenado em ultra freezer a -80°C . A partir de 100 mg de tecido vegetal foram obtidos $6.598\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de RNA total. O perfil eletroforético em gel de agarose da amostra de RNA mostrou a integridade da molécula, assim como a presença de DNA genômico, típico desse procedimento de extração (Figura 13). Após a digestão com a enzima DNase (Promega) e purificação, o RNA total foi usado com molde para a síntese da primeira fita por RT-PCR com o iniciador oligo dT₍₁₈₎. A subsequente PCR foi realizada usando a primeira fita de cDNA como molde e iniciadores degenerados senso e antisense desenhados para uma osmotina purificada de látex da planta *Calotropis procera* (CpOsm).

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% do RNA total extraído de folhas *Cryptostegia grandiflora*



Foram aplicados $4\ \mu\text{g}$ de RNA total. O gel foi corado com brometo de etídio.

Reações de PCR foram realizadas com diferentes temperaturas de anelamento ($50,0$, $52,7$, $55,3$, $57,5$ e $60,0\ ^{\circ}\text{C}$) para detectar qual a melhor temperatura de hibridização dos iniciadores com a fita molde de cDNA. As reações de PCR realizadas nas temperaturas de anelamento de $57,5$ e $60,0\ ^{\circ}\text{C}$ renderam um fragmento de aproximadamente 600 pb (Figura 14 A). A temperatura de $57,5\ ^{\circ}\text{C}$ foi a melhor dentre as testadas, pois apresentou um fragmento com maior intensidade no gel de agarose 1%.

Os fragmentos obtidos na reação de RT-PCR foram purificados e concentrados usando o kit PureLink™ PCR Purification, em seguida, clonados no vetor plasmidial pGEM-T easy. A ligação dos produtos de amplificação ao pGEM-T easy (chamado de pGEM-T easy::CgOsm) foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 14 B).

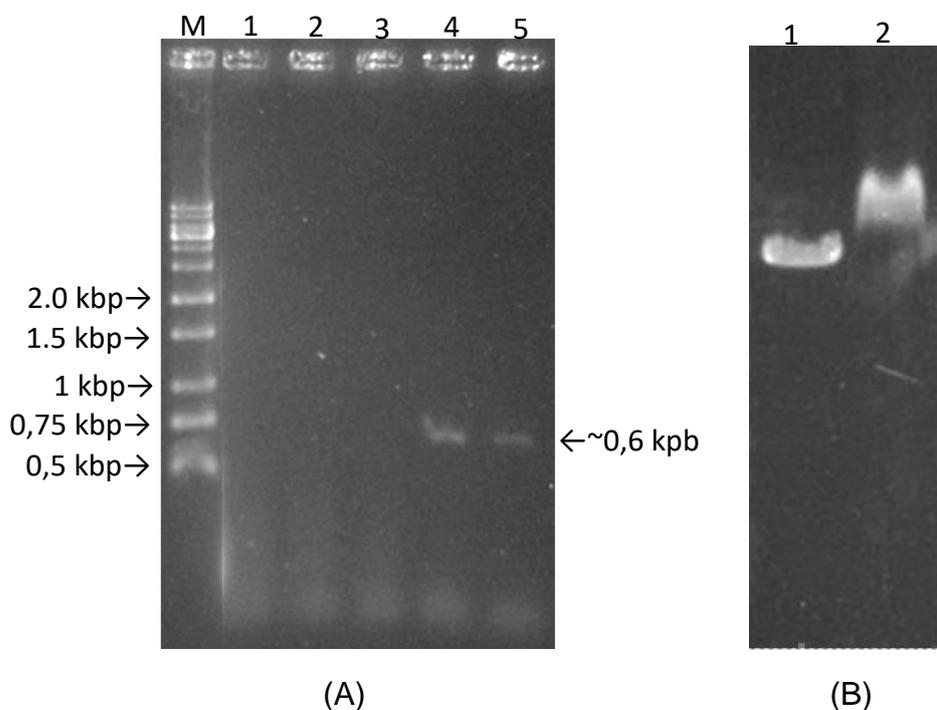
O vetor recombinante foi utilizado para a transformação de células de *E. coli* TOP10F' eletrocompetentes. As células *E. coli* eletroporadas foram plaqueadas em meio LB ágar contendo carbenicilina 100 µg/mL, estreptomicina 30 µg/mL, X-Gal 80 µg/mL e IPTG 0,5 mM. Foi observado o aparecimento de colônias de *E. coli* TOP10F' possivelmente transformadas (colônias brancas).

A seleção das colônias baseou-se no fato dos plasmídeos pGEM-T easy apresentarem a sequência do gene LacZ que codifica para a enzima β-galactosidase. Essa enzima hidroliza X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoilo-β-D-galactopiranosídeo) em galactose e 4-cloro-3-bromo-indigo, que forma um precipitado de cor azul. Como o sítio múltiplo de clonagem (local de inserção do fragmento de DNA exógeno) do plasmídeo pGEM-T easy ocupa a região do gene que codifica a porção N-terminal da β-galactosidase, e o fragmento de DNA clonado foi inserido nesta região, as bactérias com plasmídeos recombinantes, incapazes de produzir a β-galactosidase funcional, formaram colônias brancas, permitindo assim uma seleção inicial dos clones recombinantes. A visualização das colônias foi feita após 24 horas do inóculo. A Figura 15 apresenta uma placa contendo colônias brancas (provavelmente transformadas com o plasmídeo recombinante) e azuis (transformadas com o plasmídeo íntegro).

Nove colônias brancas de *E. coli* foram selecionadas de forma randômica e cultivadas em meio LB caldo contendo carbenicilina 50 µg/mL e estreptomicina 100 µg/mL por 16 h a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Em seguida, as células foram submetidas a extração plasmidial utilizando o kit MiniPrep para extração de DNA plasmidial e confirmação da transformação por digestão com a enzima de restrição EcoR1 (Promega). A Figura 16

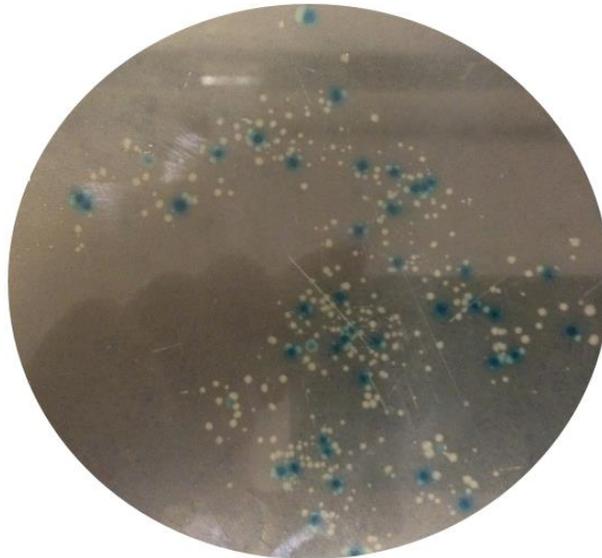
mostra a eletroforese em gel de agarose 1% dos plasmídios pGEM-T easy::CgOsm extraídos dos clones selecionados (clones 1 a 9). O produto da digestão dos plasmídios pGEM-T easy::CgOsm com EcoR1, analisado através de eletroforese, revelou que somente os clones 3, 5, 7 e 9 apresentaram um produto liberado do vetor de tamanho coerente para a ORF CgOsm (600 pb) (Figura 17), confirmando a transformação.

Figura 14: (A) - Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados da PCR usando cDNA de *C. grandiflora* em diferentes temperaturas de anelamento. (B) - Confirmação da ligação do fragmento CgOsm com o vetor pGEM-T easy.



Linha M: Marcador molecular de DNA (Ladder 1 Kb Ludwig Biotec); Linha 1: 50,0 °C; Linha 2: 52,7 °C; Linha 3: 55,3 °C; Linha 4: 57,5 °C; Linha 5: 60,0 °C. Foram aplicados 5 μ L de cada amostra. (B) - Confirmação da ligação do fragmento CgOsm com o vetor pGEM-T easy. Linha 1: Vetor pGEM-T easy; Linha 2: Construção pGEM-T easy::CgOsm (representa o vetor pGEM-T easy ligado ao produto da PCR). Foram aplicados 0,5 μ L de cada amostra. O gel foi corado com brometo de etídio.

Figura 15 - Colônias brancas e azuis em meio LB ágar

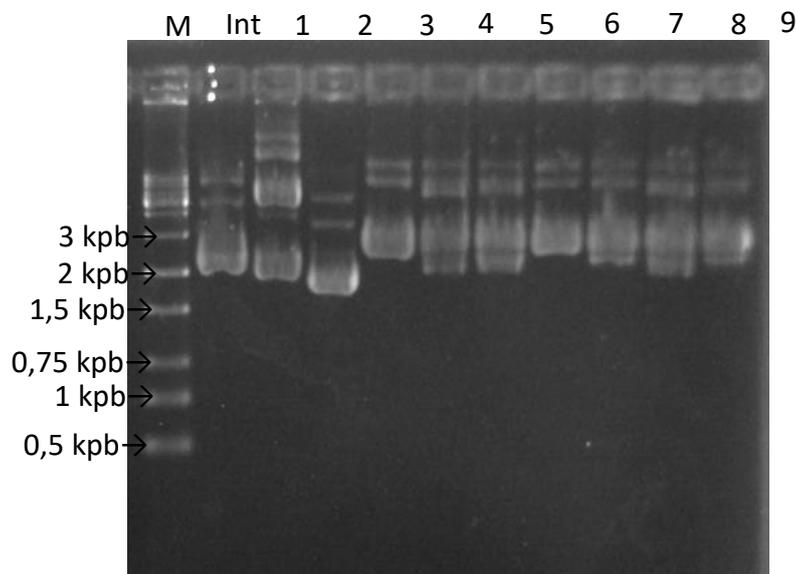


Suplementado com carbenicilina 100 µg/mL, estreptomicina 30 µg/mL, X-Gal 80 µg/mL e IPTG 0,5 mM) após 16 horas do inóculo de células eletrocompetentes de *E. coli* eletroporadas com o vetor pGEM-T easy::CgOsm.

Os quatro clones que tiveram sua transformação confirmada foram sequenciados na empresa MacroGen (<http://dna.macrogen.com/eng/>) utilizando os iniciadores universais M13F-pUC (GTTTTCCCAGTCACGAC) e M13R (GCGGATAACAATTTTCACACAGG). O resultado do sequenciamento dos quatro clones realizado pela empresa MacroGen foi de ótima qualidade. A Figura 18 mostra o alinhamento das sequências de nucleotídeos dos clones 3, 5, 7 e 9.

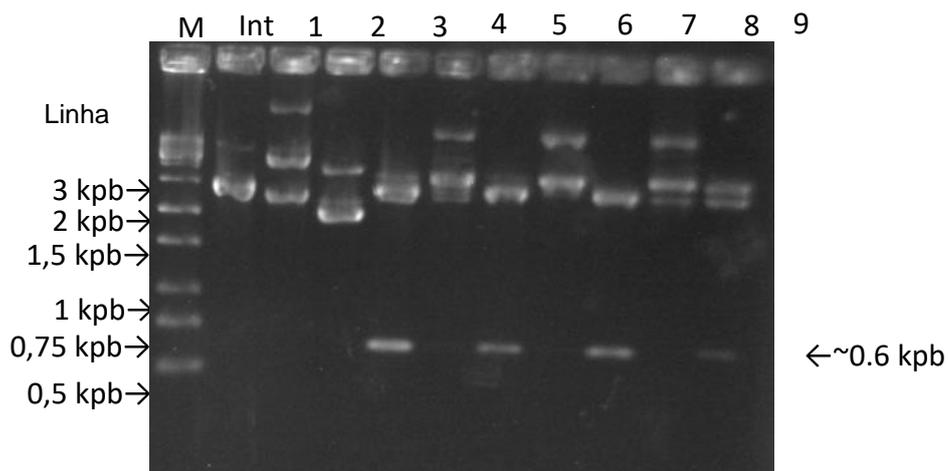
De acordo com os resultados do BLASTn a sequência mostrou alta similaridade com sequências da superfamília da taumatina. As sequências apresentaram identidade de 95% com sequências de nucleotídeos de *Piper colubrinum* (ID: EU271754).

Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1% dos plasmídios pGEM easy::CgOsm extraídos de células de *E. coli* TOP10F'.



Linha M: Marcador molecular de DNA (Ladder 1 Kb Ludwig Biotec);
 Linha Int: 4 µg de plasmídio pGEM easy::CgOsm íntegro; Linha 1 a 9: 4 µg do plasmídio pGEM::CgOsm extraídos dos clones 1 a 9, respectivamente. O gel foi corado com brometo de etídio.

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 1% dos plasmídios pGEM easy::CgOsm extraídos de células de *E. coli* TOP10F' após digestão com EcoR I.



M: Marcador molecular de DNA (Ladder 1 Kb Ludwig Biotec); Linha Int: 4 µg do plasmídio pGEM easy::CgOsm íntegro; Linha 1 a 9: 4 µg de plasmídio pGEM::CgOsm extraídos dos clones 1 a 9, respectivamente. O gel foi corado com brometo de etídio.

Figura 18 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos dos clones 3, 5, 7 e 9 utilizando o software ClustalW2

```

Clone 3      GCCACTTTCACGATTTCGCAACAACCTGCCCTACACAATTTGGGCAGCAGCAGTGCCAGGC 60
Clone 5      GCCACGTTTACGATACGTAAACAACCTGTCCCTACACAATTTGGGCAGCAGCAGTGCCAGGC 60
Clone 7      GCCACGTTTACGATACGTAAACAACCTGTCCCTACACAATTTGGGCAGCAGCAGTGCCAGGC 60
Clone 9      GCCACGTTTACGATACGTAAACAACCTGTCCCTACACAATTTGGGCAGCAGCAGTGCCAGGC 60
*****
Clone 3      GGCGGAAGACGCCTAAATTCGGGACAAACATGGACCATCAACGTGGCACCCGGTACCCT 120
Clone 5      GGCGGAAGACGCCTAAATTCGGGACAAACATGGACCATCAACGTGGCACCCGGTACCCT 120
Clone 7      GGCGGAAGACGCCTAAATTCGGGACAAACATGGACCATCAACGTGGCACCCGGTACCCT 120
Clone 9      GGCGGAAGACGCCTAAATTCGGGACAAACATGGACCATCAACGTGGCACCCGGTACCCT 120
*****
Clone 3      GGAGCACGTATTTGGCCCAGAACTAACTGCAACTTCGACGGCGCCGGACGTGGCAGATGC 180
Clone 5      GGAGCACGTATTTGGCCCAGAACTAACTGCAACTTCGACGGCGCCGGACGTGGCAGATGC 180
Clone 7      GGAGCACGTATTTGGCCCAGAACTAACTGCAACTTCGACGGCGCCGGACGTGGCAGATGC 180
Clone 9      GGAGCACGTATTTGGCCCAGAACTAACTGCAACTTCGACGGCGCCGGACGTGGCAGATGC 180
*****
Clone 3      CAAACCGGCGACTGCAACGGAGTTCTCGAATGCAAAGGTTACGGTCAGCCGCCGAACACC 240
Clone 5      CAAACCGGCGACTGCAACGGAGTTCTCGAATGCAAAGGTTACGGTCAGCCGCCGAACACC 240
Clone 7      CAAACCGGCGACTGCAACGGAGTTCTCGAATGCAAAGGTTACGGTCAGCCGCCGAACACC 240
Clone 9      CAAACCGGCGACTGCAACGGAGTTCTCGAATGCAAAGGTTACGGTCAGCCGCCGAACACC 240
*****
Clone 3      TTGGCCGAATACGCATTAATCAGTTCAAAATTTGGACTTTTTTCGACATATCCTTAGTT 300
Clone 5      TTGGCCGAATACGCATTAATCAGTTCAAAATTTGGACTTTTTTCGACATATCCTTAGTT 300
Clone 7      TTGGCCGAATACGCATTAATCAGTTCAAAATTTGGACTTTTTTCGACATATCCTTAGTT 300
Clone 9      TTGGCCGAATACGCATTAATCAGTTCAAAATTTGGACTTTTTTCGACATATCCTTAGTT 300
*****
Clone 3      GACGGGTTCAACGTGCCTATGGAATTTAGTCCAGTTTCTGGTTCCGGTGACAAATGCCGT 360
Clone 5      GACGGGTTCAACGTGCCTATGGAATTTAGTCCAGTTTCTGGTTCCGGTGACAAATGCCGT 360
Clone 7      GACGGGTTCAACGTGCCTATGGAATTTAGTCCAGTTTCTGGTTCCGGTGACAAATGCCGT 360
Clone 9      GACGGGTTCAACGTGCCTATGGAATTTAGTCCAGTTTCTGGTTCCGGTGACAAATGCCGT 360
*****
Clone 3      GCTATACGTTGTACGGCAGATATAAGCGGACAGTGTCCGAATGAACTTAGAGCTCCCGGT 420
Clone 5      GCTATACGTTGTACGGCAGATATAAGCGGACAGTGTCCGAATGAACTTAGAGCTCCCGGT 420
Clone 7      GCTATACGTTGTACGGCAGATATAAGCGGACAGTGTCCGAATGAACTTAGAGCTCCCGGT 420
Clone 9      GCTATACGTTGTACGGCAGATATAAGCGGACAGTGTCCGAATGAACTTAGAGCTCCCGGT 420
*****
Clone 3      GGATGTAATAATCCGTGCACGGTGTTTAAGACCGATAAGTATTGCTGTAATTCGGGTAGT 480
Clone 5      GGATGTAATAATCCGTGCACGGTGTTTAAGACCGATAAGTATTGCTGTAATTCGGGTAGT 480
Clone 7      GGATGTAATAATCCGTGCACGGTGTTTAAGACCGATAAGTATTGCTGTAATTCGGGTAGT 480
Clone 9      GGATGTAATAATCCGTGCACGGTGTTTAAGACCGATAAGTATTGCTGTAATTCGGGTAGT 480
*****
Clone 3      TGTGGACCCACTACTTATTCGAGGTTTTTTAAGGAGAGGTGTTGGGATGCTTATAGTTAT 540
Clone 5      TGTGGACCCACTACTTATTCGAGGTTTTTTAAGGAGAGGTGTTGGGATGCTTATAGTTAT 540
Clone 7      TGTGGACCCACTACTTATTCGAGGTTTTTTAAGGAGAGGTGTTGGGATGCTTATAGTTAT 540
Clone 9      TGTGGACCCACTACTTATTCGAGGTTTTTTAAGGAGAGGTGTTGGGATGCTTATAGTTAT 540
*****
Clone 3      CCGAAAGATGATCCGACAGTACGTTTACTTGTCTCGGTGGGACCAACTACAGAGTTGTG 600
Clone 5      CCGAAAGATGATCCGACAGTACGTTTACTTGTCTCGGTGGGACCAACTACAGAGTTGTG 600
Clone 7      CCGAAAGATGATCCGACAGTACGTTTACTTGTCTCGGTGGGACCAACTACAGAGTTGTG 600
Clone 9      CCGAAAGATGATCCGACAGTACGTTTACTTGTCTCGGTGGGACCAACTACAGAGTTGTG 600
*****
Clone 3      TTTTGCCCCGGA 612
Clone 5      TTCTGCCCCGGA 612
Clone 7      TTCTGCCCCGG- 611
Clone 9      TTCTGCCCCGGA 612
** *****

```

Os quatro clones sequenciados foram traduzidos com a ferramenta TRANSLATE tool ExPASy (<http://expasy.org/tools/>) e alinhados com o auxílio do software ClustalW2. A proteína traduzida possui 202 resíduos de aminoácidos e apresenta quatro diferenças entre os clones, ²⁵Leu→Val, ¹²⁹Ser→Asn, ¹⁶⁷Ser→Leu, ¹⁹²Pro→Leu (Figura 19). Estas modificações são relacionadas a aminoácidos com identidades químicas semelhantes, exceto na posição 167.

As propriedades físico-químicas das sequências deduzidas dos clones foram calculadas com servidor Pepstats (Tabela 8). A massa molecular predita foi ligeiramente diferente da experimental definida por espectrometria de massa citada anteriormente (Figura 10). Os pontos isoelétricos preditos para os clones foram identificados como 7,8 na qual reflete o caráter positivo na superfície de CgOsm em pH neutro ou baixo. Esses 16 resíduos de cisteína provavelmente estão envolvidos na formação de 8 ligações dissulfeto comumente encontrados em osmotinas (VIKTOROVA, *et al* 2012). O clone 9 (Figura 20) foi escolhido como a sequência consenso e usado nos experimentos de modelagem molecular por homologia.

Figura 19 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos foi deduzido a partir das sequências de nucleotídeos determinadas para os clones 3, 5, 7 e 9 utilizando o software ClustalW2.

```

                25
Clone 3      ATFTIRNNCPYTIWAAAAPGGGRRRLNSGQTWTINVAPGTAGARIWPRTCNFDGAGRGR 60
Clone 5      ATFTIRNNCPYTIWAAAAPGGGRRRLNSGQTWTINVAPGTAGARIWPRTCNFDGAGRGR 60
Clone 7      ATFTIRNNCPYTIWAAAAPGGGRRRLNSGQTWTINVAPGTAGARIWPRTCNFDGAGRGR 60
Clone 9      ATFTIRNNCPYTIWAAAAPGGGRRRLNSGQTWTINVAPGTAGARIWPRTCNFDGAGRGR 60
              *****;*****

Clone 3      QTGDCNGVLECKGYGQPPNTLAEYALNQFNLDFFDISLVDGFNVPMEFSPVSGSGDKCR 120
Clone 5      QTGDCNGVLECKGYGQPPNTLAEYALNQFNLDFFDISLVDGFNVPMEFSPVSGSGDKCR 120
Clone 7      QTGDCNGVLECKGYGQPPNTLAEYALNQFNLDFFDISLVDGFNVPMEFSPVSGSGDKCR 120
Clone 9      QTGDCNGVLECKGYGQPPNTLAEYALNQFNLDFFDISLVDGFNVPMEFSPVSGSGDKCR 120
              *****

                129                167
Clone 3      AIRCTADISGQCPNELRAPGGCANNPCTVFKTDKYCCNSGSCGPTTYSRFFKERCDAYS 180
Clone 5      AIRCTADINGQCPNELRAPGGCANNPCTVFKTDKYCCNSGSCGPTTYLRFKERCWDAYS 180
Clone 7      AIRCTADINGQCPNELRAPGGCANNPCTVFKTDKYCCNSGSCGPTTYSRFFKERCDAYS 180
Clone 9      AIRCTADINGQCPNELRAPGGCANNPCTVFKTDKYCCNSGSCGPTTYSRFFKERCDAYS 180
              *****

                192
Clone 3      PKDDPTSTFTCEGGTNYRVVFC 202
Clone 5      PKDDPTSTFTCEGGTNYRVVFC 202
Clone 7      PKDDPTSTFTCEGGTNYRVVFC 202
Clone 9      PKDDPTSTFTCEGGTNYRVVFC 202
              *****

```

Os resíduos de aminoácidos diferentes estão destacados em cinza.

Figura 20. Sequência consenso de nucleotídeos e aminoácidos predita para osmotina de *C. grandiflora*

```

gccacgttcacgatacgtacaactgtccctacacaatttgggcagcagcagtgccaggc
A T F T I R N N C P Y T I W A A A V P G
ggcgggaagacgcctaaattccggacaaacatggaccatcaacgtggcaccggtaccgct
G G R R L N S G Q T W T I N V A P G T A
ggagcacgtatttggcccagaactaactgcaacttcgacggcgccggacgtggcagatgc
G A R I W P R T N C N F D G A G R G R C
caaaccggcgactgcaacggagttctcgaatgcaaaggttacggtcagccgccgaacacc
Q T G D C N G V L E C K G Y G Q P P N T
ttggccgaatacgcattaaatcagttccaaaatttggactttttcgacatatccttagtt
L A E Y A L N Q F Q N L D F F D I S L V
gacgggttcaacgtgcctatggaatttagtccagtttctggttccggtgacaaatgccgt
D G F N V P M E F S P V S G S G D K C R
gctatacgttgtacggcagatataaacggacagtgccgaatgaacttagagctcccggg
A I R C T A D I N G Q C P N E L R A P G
ggatgtaataatccgtgcacgggtgtttaagaccgataagtattgctgtaattccggtagt
G C N N P C T V F K T D K Y C C N S G S
tgtggaccactacttatttcgaggttttttaaggagaggtgttgggatgcttatagttat
C G P T T Y S R F F K E R C W D A Y S Y
ccgaaagatgatccgaccagtagctttacttgtcccgggtgggaccaactacagagttgtc
P K D D P T S T F T C P G G T N Y R V V
ttctgccccgga
F C P G

```

A sequência de aminoácidos foi deduzida usando a ferramenta TRANSLATE tool of ExPASy (<http://expasy.org/tools/>).

A análise da sequência deduzida de CgOsm (clone 9) pelo BLASTp mostrou alta identidade com à superfamília da taumatina TLP (Figura 21). A família taumatina apresenta uma assinatura (G-x-[GF]-x-C-x-T-[GA]-D-C-x(1,2)-[GQ]-x(2,3)-C) e inclui membros com localização extracelular e vacuolar. Vários membros da família apresentam significativa atividade *in vitro* de inibir o crescimento de hifas ou a germinação de esporos de vários fungos, provavelmente, por um mecanismo de permeabilização da membrana. CgOsm mostrou 87 % de similaridade com act d 2 (PDB: 4BCT), uma proteína do tipo taumatina do fruto de *Actinidia deliciosa* que pertence à família TLP que possui várias outras estruturas cristalizadas (PDB: 4bct:A, 1z3q:A, 1pcv:A, 2i0w:A, 4l5h:A, 1du5:A).

Com o resultado do alinhamento múltiplo foi possível determinar um dendrograma das sequências de aminoácidos obtidas para CgOsm, bem

como de outras sequências relacionadas. Esse resultado pode ser visto na Figura 22.

Tabela 8 - Comparação das propriedades físico-químicas dos aminoácidos deduzidos para os clones 3, 5, 7, 9 utilizando a ferramenta Pepstats com dados experimentais de outras osmotinas descritas na literatura.

	Massa molecular (Da)	Ponto isoelétrico	Cisteína
Clone 3	21955.50	7.8542	16
Clone 5	21992.56	7.8542	16
Clone 7	21952.45	7.8542	16
Clone 9	21966.48	7.8281	16
CgOsm ^E	21696.00	-	16
CpOsm ^E	22340.47/22536.81	8,9/9,1	-
PTLP ^E	22137.00	-	16
act d 2 ^E	24	9.4	16

^T – Procedimentos teóricos; ^E – Procedimento experimentais

CpOsm: Osmotina do látex de *Calotropis procera* (sp|P86363.1|OSMO_CALPC); PTLP: proteína do tipo taumatina do látex de *Carica papaya* (EX255680_1); act d2: proteína do tipo taumatina do fruto de kiwi (PDB id: 4BCT).

Figura 21 - Alinhamento múltiplo da sequência traduzida da osmotina de *C. grandiflora* com seis sequências com estruturas resolvidas de mais alta similaridade na análise pelo BLASTp (PDB: 4bct:A, 1z3q:A, 1pcv:A, 2i0w:A, 4l5h:A, 1du5:A) pelo Clustal w2..

```

CgOsm      ATFTIRNNCPYTIWAAAVP-GGGRRLLNSGQTWTINVPAGTAGARIWPRNTNCFDAGRGR 59
4bct_A     ATFNIIINCPFTVWAAAVP-GGGKRLDRGQNWIIINPGAGTKGARVWPRTGCFDAGRGRK 59
1z3q_A     ATFEIVNRCSYTVWAAAVP-GGGRQLNQGSWTINVNAGTTGGRIWGRTGCSFDGSSGRGR 59
1pcv_A     ATIEVRNNCPYTVWAAASTPIGGRRLLDRGQTVWINAPRGTKMARVWGRTNCFNAAGRGT 60
2i0w_A     ATIEVRNNCPYTVWAAASTPIGGRRLLNRGQTVWINAPRGTKMARIWGRTGCFNAAGRGT 60
4l5h_A     ATFDILNKCTYTVWAAASP-GGGRRLLDSGQSWTITVNPGTNARIWGRTSCTFDANGRGRK 59
1du5_A     AVFTVVNQCPFTVWAAASVPVGGGRQLNRGESWRITAPAGTTAARIWARTGCKFDASGRGS 60
          *.: :*. *.:*:***: * **::*: *.:* * . ** .*: * **.*.: **
          **

CgOsm      CQTGDCNGVLECKGYGQPNTLAEYALNQFNLDFFDISLVDGFNVPMEFSPVSGSGDKC 119
4bct_A     CQTGDCNGLLQCAFGQPNTLAEYALNQFNLDFFDISLVDGFNVAMEFSPSTSGG--TC 117
1z3q_A     CQTGDCGGVLSCTAYGNPNTLAEFALNQFNLDFFDISLVDGFNVPMDFSPTSG---GC 116
1pcv_A     CQTGDCGGVLCCTGWGKPPNTLAEYALDQFSGLDFFDISLVDGFNIPMTFAPTNPSSGGK 120
2i0w_A     CQTGDCGGVLCCTGWGKPPNTLAEYALDQFSLNDFWDISLVDGFNIPMTFAPTNPSSGGK 120
4l5h_A     CETGDCNGLLECKGYGSPNTLAEFALNQFNLDYIDISLVDGFNIPMDFS-----GC 112
1du5_A     CRTGDCGGVLCCTGYGRAPNTLAEYALKQFNLDFFDISLIDGFNVPMSFLPDGSSG-SC 119
          *.****.*:*.* .:* .*****:*.* .***: *****:*****:.* *

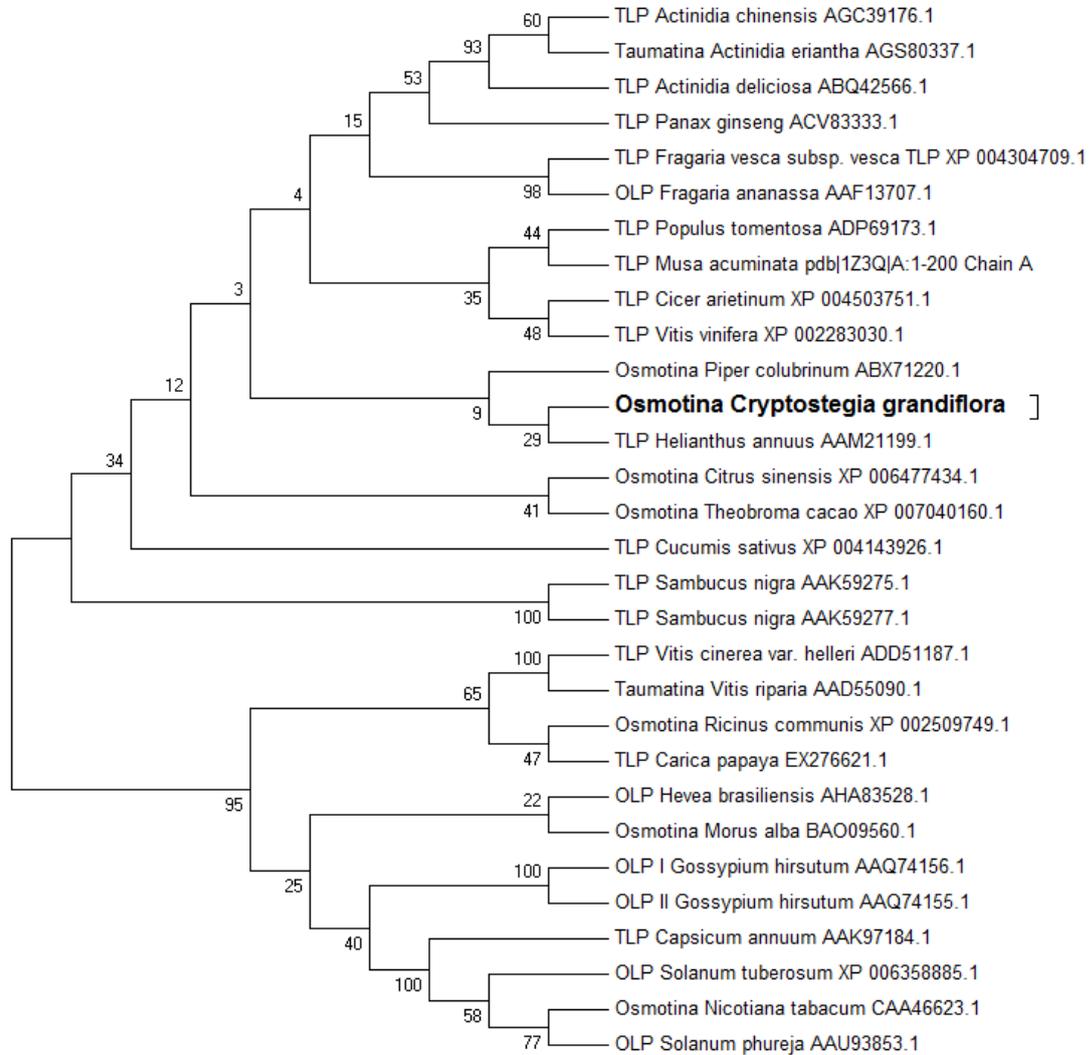
CgOsm      RAIRCTADINGQCPNELRAPGGCNPCTVFKTDKYCCNSGS---CGPTTYSRFFKERKWD 176
4bct_A     RGIRCTADINGQCPNELRAPGGCNPCTVFKTDQYCCNSGN---CGLTNFSKFFKDRCPD 174
1z3q_A     RGIRCAADINGQCPGALKAPGGCNPCTVFKTDQYCCNSGA---CSPTDYSQFFKRNCPD 173
1pcv_A     HAIHCTANINGECPRELKRVPGGCNPCTTFGGQQYCCTQGP---CGPTFFSKFFKQRCPD 177
2i0w_A     HAIHCTANINGECPRALKVPGGCNPCTTFGGQQYCCTQGP---CGPTELSKFFKRCPD 177
4l5h_A     RGIQCSDVDINGQCPSELKAPGGCNPCTVFKTNEYCCTDGP-GSCGPTTYSKFFKDRCPD 171
1du5_A     RGPRCAVDVNARCPAELRQDGVNACPVFKKDEYCCVGSAAANDCHPTNYSRYFKQRCPD 179
          :. :*.:*:..** * : * **.*.* * ::* * . * * *.:** .* *

CgOsm      AYSYPKDDPTSTFTCPGG-TNYRVVFC--- 202
4bct_A     AYSYPKDDQTSTFTCPAG-TNYKVVFVCP-- 201
1z3q_A     AYSYPKDDQTTTFTCPGG-TNYRVVFCP-- 200
1pcv_A     AYSYPQDDPTSTFTCPGGSTNYRVIFVCP-- 205
2i0w_A     AYSYPQDDPTSTFTCPGGSTNYRVVFCPNG 207
4l5h_A     AYSYPQDDKTSLFTCPSG-TNYKVVFVCP-- 198
1du5_A     AYSYPKDDATSTFTCPAG-TNYKVVFVCP-- 206
          *****:* * : *****.* **:* * **

```

Os resíduos de cisteína conservados estão indicados em cinza. O motivo que representa a família PR-5 é destacada dentro do retângulo (G-x-[GF]-x-C-x-T-[GA]-D-C-x(1,2)-[GQ]-x(2,3)-C)

Figura 22 - Árvore filogenética das estruturas primárias de diferentes proteínas da família PR-5 gerada com o auxílio do programa Mega 5.



Foi utilizado o método neighbor-joining e um bootstrap de 500.

A proteína act d 2 foi escolhida como molde para o modelamento da estrutura tridimensional de CgOsm (clone 9) devido sua alta similaridade de sequência com uma cobertura de 96 % e por ter sua estrutura tridimensional resolvida por cristalografia a 0.98 Å (PDB: 4bct, cadeia A).

Foram utilizadas quatro plataformas de bioinformática para gerar o modelo tridimensional para sequência deduzida de CgOsm: CPH Server, Swiss Model Server, Phyre² e Modeller Server. Os modelos gerados pelos programas mencionados anteriormente, utilizando a proteína act d 2 (PDB: 4bct, cadeia A) como molde, apresentam estruturas muito semelhantes (Figura 23).

A qualidade dos quatro modelos gerados por cada uma das plataformas foi validada pelo MolProbity através do gráfico de Ramachandran, pelo software ProSA e ERRAT plot. Análise feita no MolProbity revelou que o modelo feito no Swiss Model Server foi o de melhor qualidade com 100% dos resíduos presentes em regiões fisicamente permitidas do mapa de Ramachandran (Figura 24). Desses, 96,5% dos resíduos estavam situados em regiões mais favoráveis, 4,5% estavam em regiões adicionalmente permitidas e nenhum dos resíduos de aminoácidos estavam em regiões desfavoráveis para a formação das estruturas secundárias em relação aos ângulos torsonais phi (ϕ) e psi (ψ).

A validação do modelo feita nos software ProSA e ERRAT plot também revelou que o modelo gerado pelo Swiss Model Server tinha a melhor qualidade dentre os modelos gerados (Tabela 9). Em todos os parâmetros de validação analisados o modelo gerado pelo Swiss Model Server foi o que teve melhores resultados, por isso esse o modelo foi selecionado para as demais análises. O fator de qualidade global foi de 89.254 e o Z- score -6.1 que se aproxima dos valores encontrados para a estrutura tridimensional de act d 2 resolvida por cristalografia.

A diferença entre a estrutura cristalizada da proteína act d 2 (PDB: 4bct) e a estrutura do modelo CgOsm foi calculada pela sobreposição de ambas as estruturas com auxílio do software 3DSS. O valor de RMSD (raiz

quadrada do desvio médio) entre a estrutura resolvida por difração de raio-X e o modelo de CgOsm foi calculado através do carbono alfa e a cadeia principal resultando em 0.36 Å. O valor de RMSD que mede a acurácia do modelo (quando igual a zero indica um ajuste perfeito) indicou a pequena variabilidade entre o modelo CgOsm e da proteína act d 2 que por consequência refletiu a forte similaridade no padrão de dobramento entre essas proteínas.

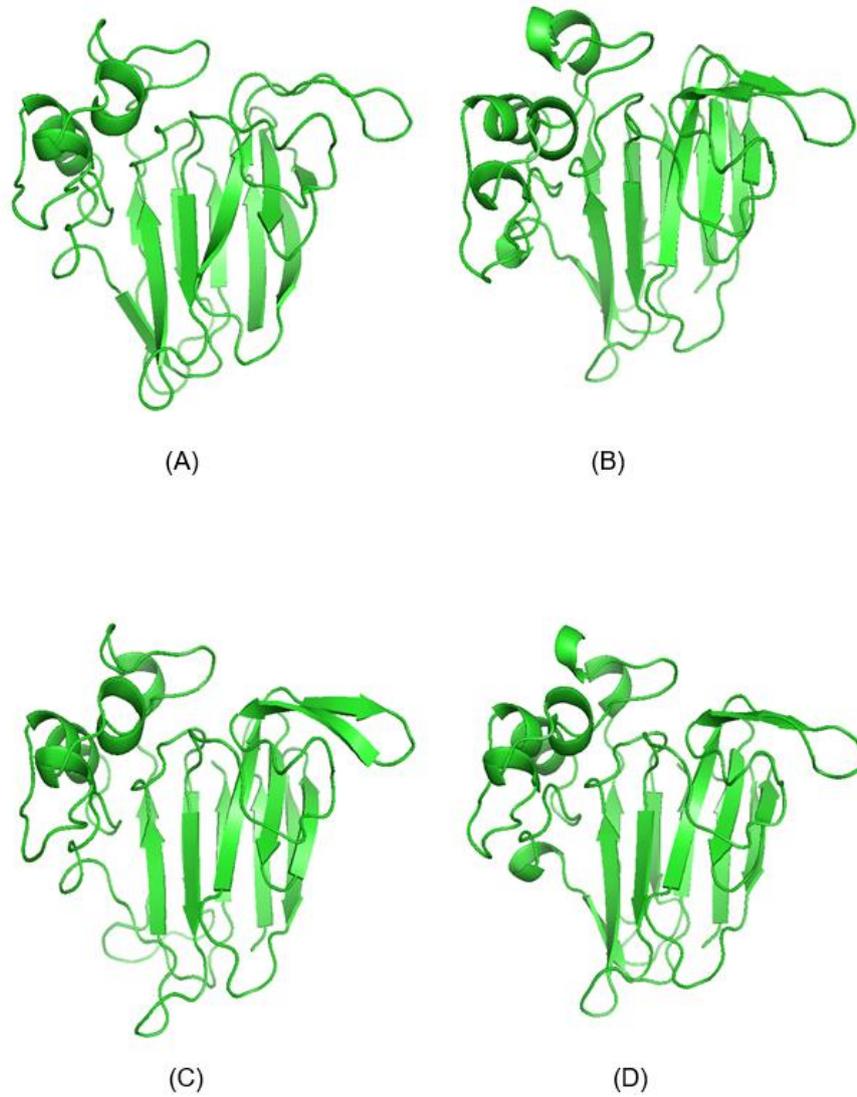
Tabela 9 - Avaliação da qualidade dos modelos gerados por diferentes plataformas.

Plataformas de bioinformática	ProSA (Z- score)	ERRAT plot (fator de qualidade global)
CPH Server	-5.2	70.062
Swiss Model Server	-6.1	89.254
Phyre ²	-5.5	85.789
Modeller Server	-5.9	80.412
Act d 2	-6,5	93,229

Os elementos de estrutura secundária de CgOsm determinada pelo PDBsum (<https://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>) revelaram que a sequência está organizada em α -hélices, folhas- β e voltas (*coils*), sendo que, a maioria dos aminoácidos encontra-se organizados estruturalmente em α -hélices. A estrutura é estabilizada por 8 pontes dissulfetos Cys9–Cys202, Cys50–Cys60, Cys65–Cys71 Cys119–Cys191, Cys124–Cys174, Cys132–Cys143, Cys146–Cys155, Cys156–Cys161 que são extremamente conservadas entre osmotinas (Figura 25).

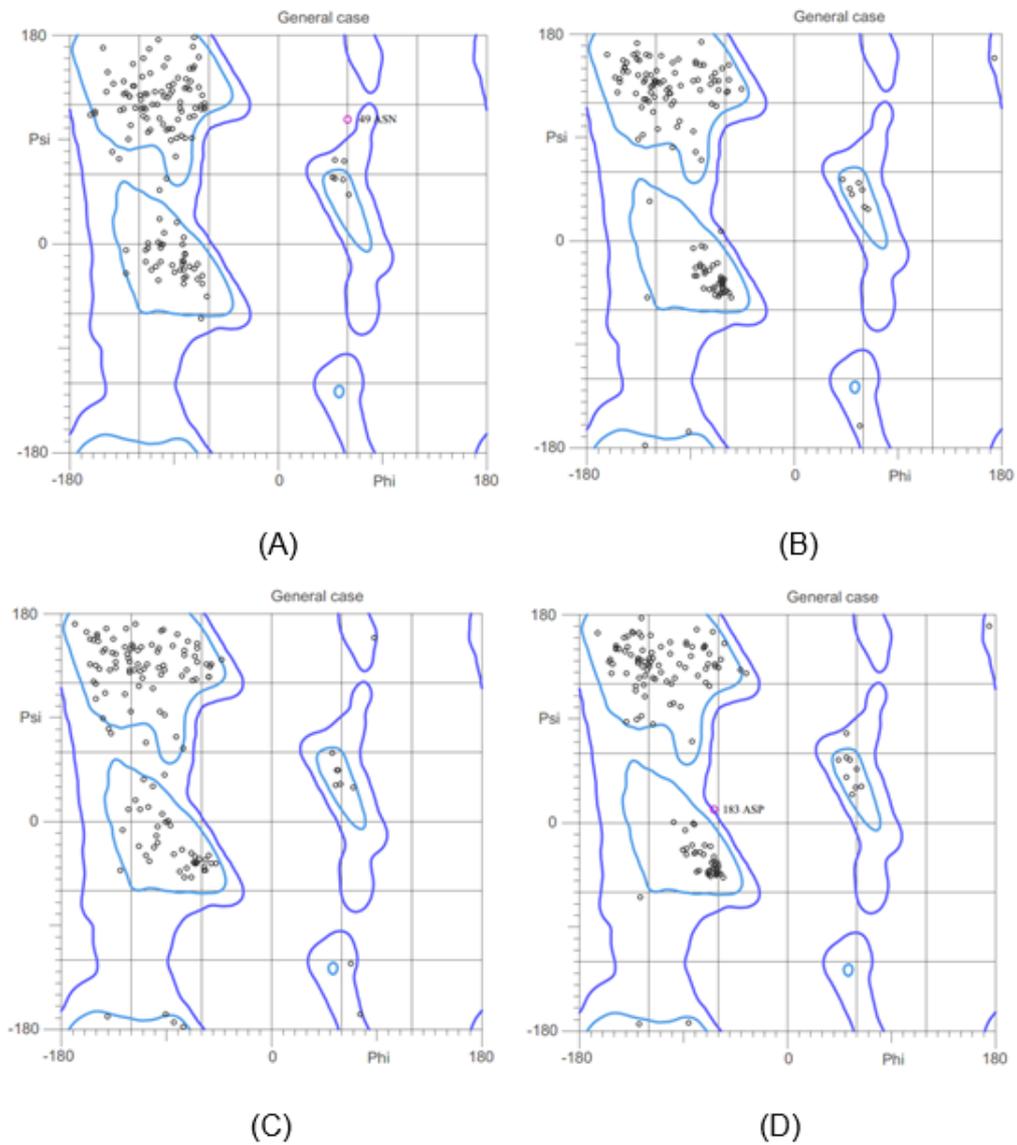
A topologia mostra que a porção N-terminal é dominada somente por fitas β antiparalelas (seta rósea) enquanto o C-terminal possui tanto fitas β quanto α hélices (cilindro vermelho) (Figura 26).

Figura 23 - Modelos das estruturas tridimensionais obtidos para a sequência de CgOsm usando diversos programas



(A) CPH Server; (B) Swiss Model Server; (C) Phyre2; (D) Modeller.

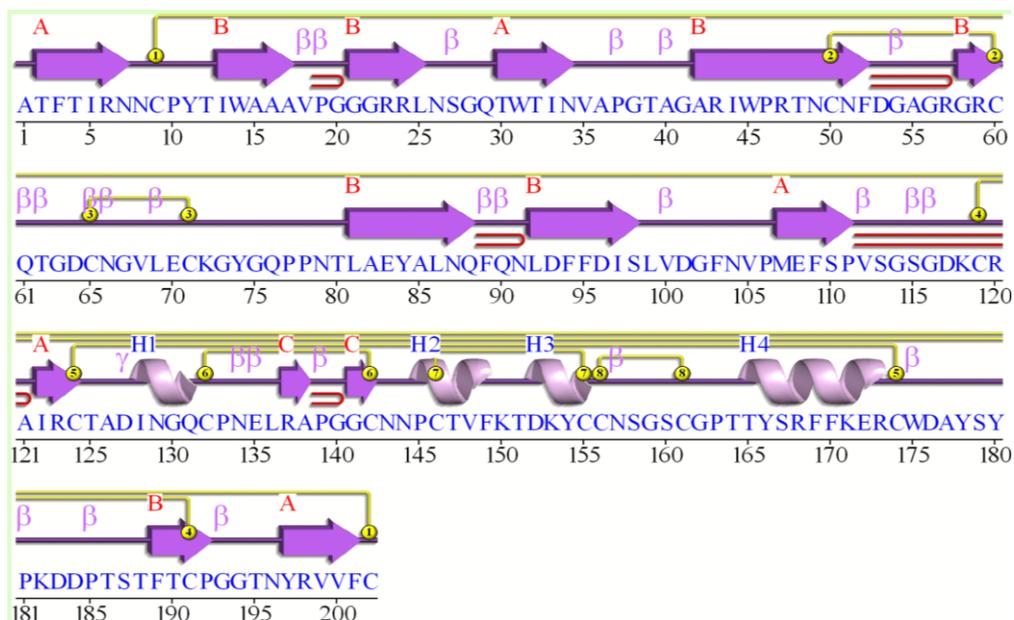
Figura 24 - Mapas de Ramachandran das estruturas tridimensionais obtidos para a sequência de CgOsm usando diversos programas



(A) CPH Server; (B) Swiss Model Server; (C) Phyre2; (D) Modeller.

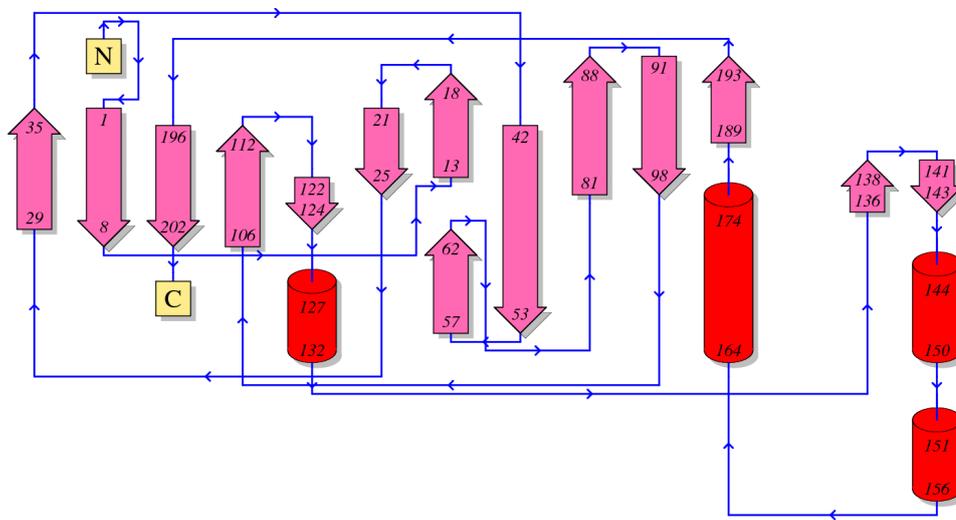
Os domínios estruturais de CgOsm é mostrado na Figura 27. CgOsm tem uma estrutura típica de proteínas do tipo taumatina com três domínios distintos. O domínio I forma a estrutura principal destas proteínas. Ele é composto por 11 folhas beta formando uma estrutura similar a um sanduíche onde seis folhas betas antiparalelas interagem com outras cinco folhas betas. O domínio II é constituído basicamente por α -hélices. O domínio III é compreendido por um longo loop e uma folha beta antiparalela. Em conformidade, CgOsm sobrepõe bem com outras proteínas do tipo taumatina com estruturas tridimensionais conhecidas (Figura 28 A). O domínio I e II cria uma fenda central que é rica em resíduos ácidos e conseqüentemente é uma região com forte caráter eletronegativo (Figura 28 B). Deve se notar que uma fenda central com caráter eletronegativo foi anteriormente identificada na estrutura cristalina da zeamatina de *Zea mays* (BATALIA, et al., 1996) e osmotina de tabaco (MIN, et al., 2004).

Figura 25 - Esquema da estrutura secundaria deduzida para CpOsm utilizando o software PDBsum



Dezesseis resíduos de cisteínas formam oito pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura.

Figura 26: Predição da topologia da estrutura secundária da osmotina de *C. grandiflora* usando o servidor PDBsum.



A Porção N-terminal é dominada somente por fitas β antiparalelas (seta rósea) enquanto o C-terminal possui tanto fitas β quanto α hélices (cilindro vermelho)

Figura 27 - Domínios estruturais da CgOsm construído com o programa SWISS-MODEL

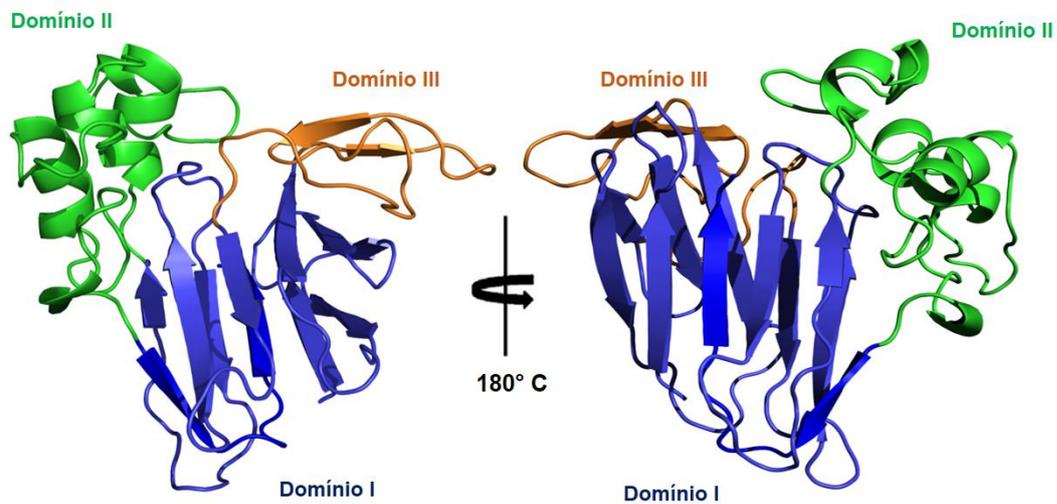
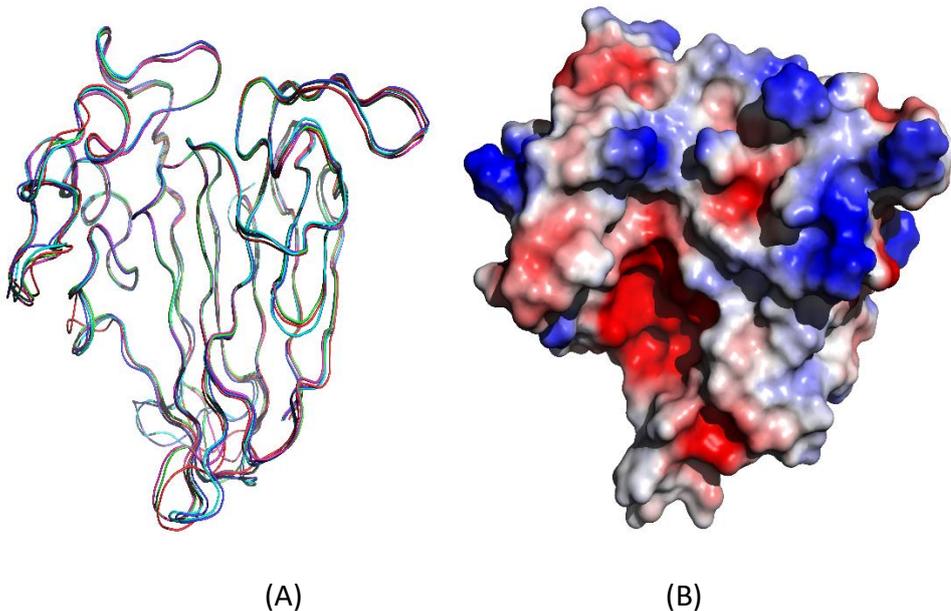


Figura 28 - Modelo da estrutura tridimensional global de CgOsm



(A) Sobreposição da representação em “ribbon” de CgOsm (verde) e outras osmotinas. TLP do kiwi (rósea), TLP de banana (vermelho), TLP de tabaco (azul) e TLP de tomate (ciano). Os códigos do PDB das proteínas são: TLP do kiwi (4bct), TLP de banana (1z3q), TLP de tabaco (1pcv), TLP de tomate (2i0w). (B) Mapeamento dos potenciais eletrostáticos da superfície molecular de CgOsm. Os potenciais negativos e positivos estão coloridos de vermelho e azul, respectivamente. Superfícies neutras estão brancas.

Adiponectina é um hormônio protéico produzido e secretado pelos adipócitos, envolvido na regulação do metabolismo de lipídios e glicose em mamíferos (KADOWAKI, YAMAUCHI, 2005). Foi mostrado anteriormente em levedura que uma osmotina de *Nicotiana tabacum* se liga ao receptor homólogo do receptor de adiponectina humano. E também compartilha similaridades funcionais com a adiponectina no desencadeamento da fosforilação da AMP quinase em miócitos C2C12 via receptores de adiponectina (NARASIMHAN, et al., 2005). Essas observações sugerem que a osmotina interage com receptor da adiponectina (ADIPOR1) em ambiente celular e ativa a mesma via de sinalização da adiponectina (JORTAY, et al., 2012). Assim, a osmotina poderia ser um polipeptídeo com mecanismos funcionais e moleculares similares aos da adiponectina. Baseado nessa hipótese, nós investigamos in silico se a osmotina

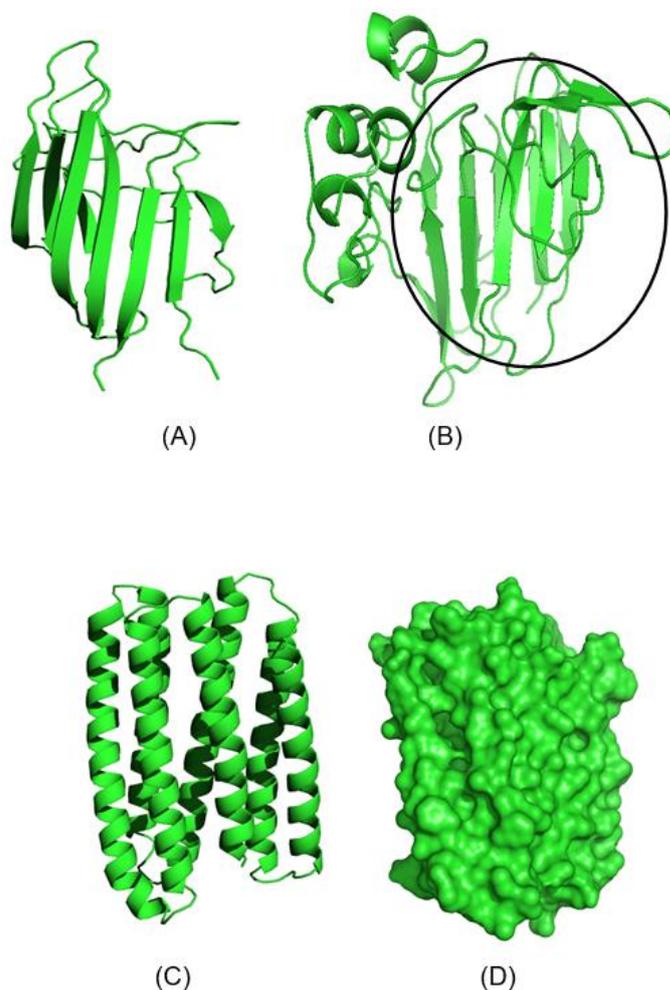
purificada do látex de *C. grandiflora* é capaz de interagir com o receptor de adiponectina.

Usamos métodos de modelagem molecular para auxiliar na busca de respostas para nossas questões. Nós modelamos o domínio globular da adiponectina (ADIPOQ), bem como seu receptor (ADIPOR1). Além disso, também modelamos os complexos ADIPOQ/ ADIPOR1, CgOsm/ ADIPOR1. Selecionamos dois pequenos peptídeos derivado de CgOsm e avaliamos a sua habilidade de interagir com ADIPOR1. A seleção dos peptídeos baseou-se na similaridade com o peptídeo descrito anteriormente que foi capaz de interagir com ADIPOR1 (MIELE, COSTANTINI, COLONNA, 2011).

O Modelo tridimensional da adiponectina humana foi realizado utilizando como molde uma cadeia da adiponectina de rato, devido a similaridade entre as sequências serem de 91%. O modelo apresentou o Z-score avalizado pelo programa ProSA de -4.68 e 92,5% dos resíduos estavam em regiões favoráveis. Esses valores, comparados com os da literatura, indicam uma boa qualidade do modelo. O modelo da adiponectina (Figura 29 A) apresenta 11 folhas betas organizadas em uma arquitetura do tipo sanduiche beta semelhante ao domínio I da CgOsm (Figura 29 B).

O modelo do receptor de adiponectina (ADIPOR1) foi construído utilizando como estrutura molde a rodopsina II (PDB: 1GU8). O modelo tem Z-score de -3.45 e 90% dos resíduos estavam em regiões favoráveis. Esses valores mostram uma boa qualidade do modelo, quando comparados com os valores das estruturas moldes. A arquitetura do modelo de ADIPOR1 é formada com sete hélices e loops (Figura 29 C e D).

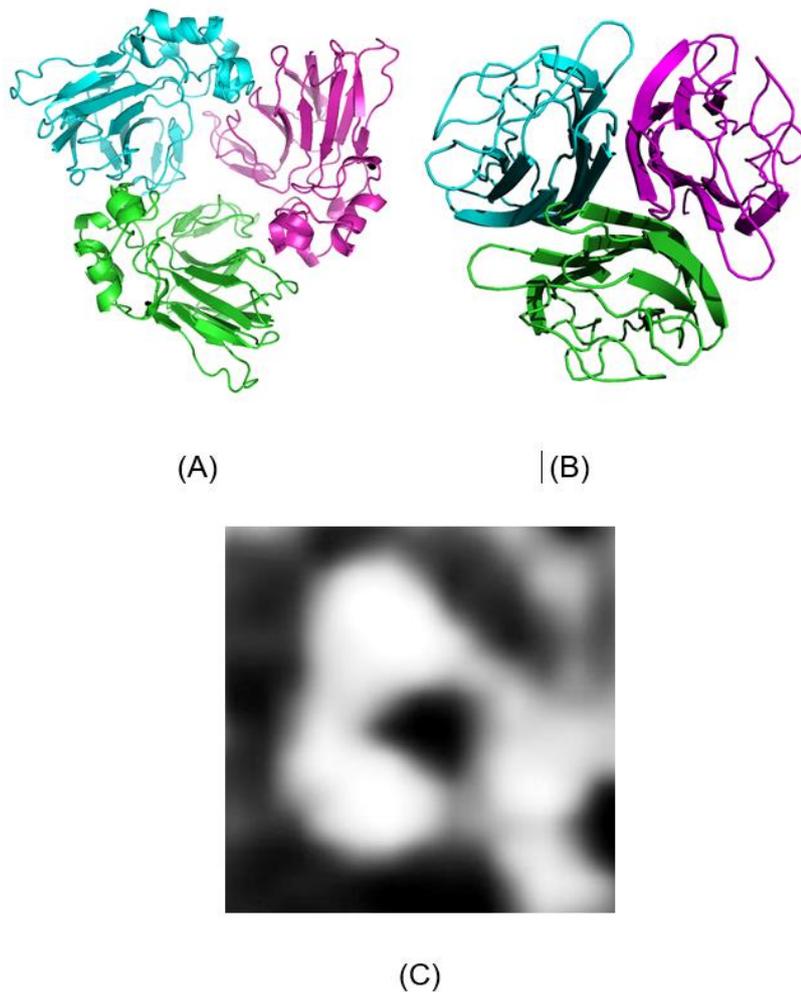
Figura 29 - Modelo tridimensional em *cartoon*



(A) Monômero de adiponectina ; (B) CgOsm. Modelo tridimensional do receptor de adiponectina em *cartoon* (C) e em superfície (D). O círculo preto evidencia que o domínio I da osmotina possuem uma arquitetura semelhante a adiponectina.

Utilizando o programa SymmDock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/SymmDock/>) simulamos a interação entre três monômeros de CgOsm, tendo em vista, as evidências experimentais de AFM que mostra que CgOsm interage formando trímero (Figura 30 C). O modelo do trímero de CgOsm apresenta uma estrutura semelhante o trímero de da adiponectina humana (PDB: 4DOU) (Figura 30 A e B).

Figura 30 - Modelo tridimensional do trímero



(A) adiponectina; (B) CgOsm. Detalhe da topologia de CgOsm adsorvida em mica por microscopia de força atômica (C).

O complexo ADIPORQ/ADIPOR1 foi modelado e as regiões de interação (Figura 31) foram analisadas em termos de energia de ligação e valor de *score* (Tabela 9). A adiponectina interage com ADIPOR1 pelo topo do domínio globular (Figura 32 A). No complexo CgOsm/ADIPOR1, CgOsm interage através de folha beta e hélices localizadas entre o domínio I e II (Figura 32 B).

Dois peptídeos CgOsm^{Pep1} e CgOsm^{Pep2} (CNSGSCGPT, região 156 – 164 e 180 – 188 da sequência de amino ácidos de CgOsm, respectivamente) localizados na interface do complexo CgOsm/ADIPOR1 foram avaliados isoladamente, por modelagem, quanto a capacidade de interagir com ADIPOR1. CgOsm^{Pep1} interagiu com loops localizados na margem do topo da estrutura de ADIPOR1, enquanto CgOsm^{Pep2} interagiu com resíduos localizados na região central do topo da ADIPOR1 (Figura 33). A energia de ligação livre do complexo CgOsm^{Pep1}/ADIPOR1 foi cerca de duas vezes menor que no complexo CgOsm^{Pep2}/ADIPOR1 demonstrando mais afinidade pelo receptor (Tabela 10).

Figura 31 - Sequências completas das proteínas usadas nesse estudo. Os aminoácidos em cinza claro não foram usados no modelo tridimensional.

Receptor de adiponectina (ADIPOR1)

MSSHKGSVVAQNGAPASNREADTVELAELGPLLEEKGKRVIANPPKAEQTCVPVQEEEEVVRV
LTLPLQAHHAMEKMEEFVYKVVWEGRWVPIPYDVLDPDWLKDNDYLLHGHRPPMPSFRACFKSIFRIH
TETGNIWTHLLGFVLFVFLGILTMLRPNMYFMAPLQEKVVFGMFFLGAVLCLSFVSWLFHTVYCHSE
KVSRTFSKLDYSGIALLIMGSFVWLYYSFYCSPQPRLIYLSIVCVLGISAIIVAQWDRFATPKHR
QTRAGVFLGLGLSGVVPTMHEFTIAEGEVKATTVGOMGWFFLMAVMIITGAGLYAARI PERFFPGKF
DIWFQSHQIFHVLVVAAAFVHFYGVSNLQEFRYGLGEGCTDDTLL

Adiponectina (ADIPOQ)

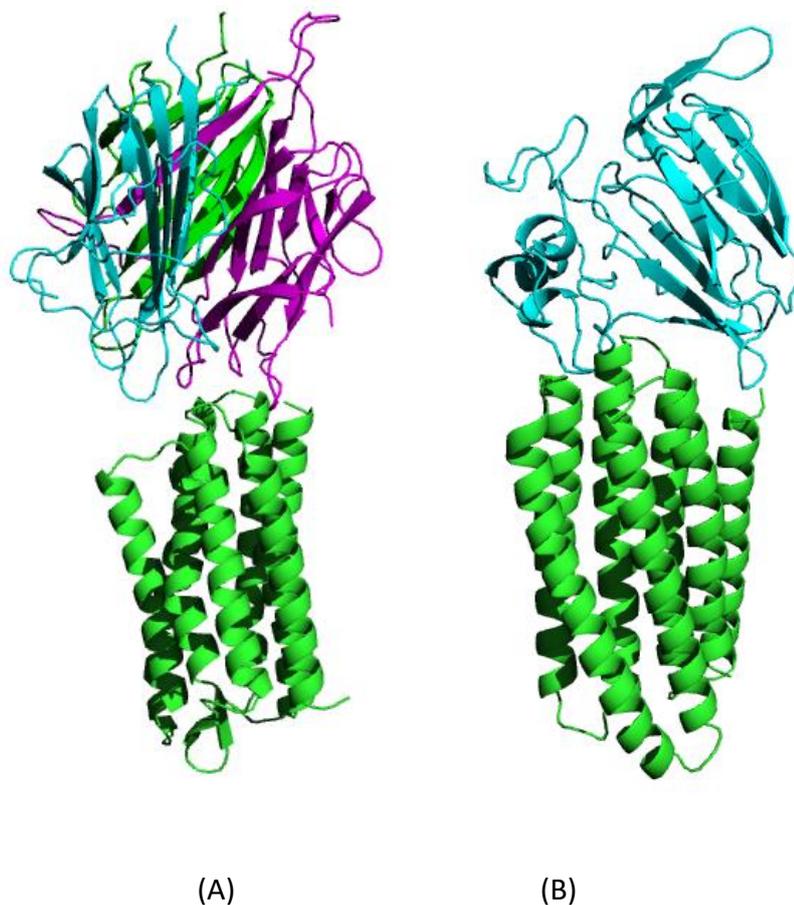
MLLLGAVLLLLLALPGHDQETTTQGGVLLPLPKGACTGWMAGIPGHPGHNGAPGRDGRDGTPEKKG
EKGDPGLIGPKGDIGETGVPGAEGPRGFPPIQGRKGEPEGAYVYRSFAFSVGLETYVTIPNMPPIRF
TKIFYNQNHYDGTGKGFHCNIPGLYYFAYHITVYMKDVKVSFLFKKDKAMLFYDQYQENNVDAQS
GSVLLHLEVGQVWLQVYGEGERNGLYADNDNDSTFTGFLLY
HDTN

CgOsm

ATFTIRNNCPYTIWAAAVPGGRRRLNSGQTWTINVAPGTAGARIWPRTNCFDAGRGRCQTGDCN
GVLECKGYGQPPNTLAEYALNQFNLDFFDISLVDGFNVPMFSPVSGSGDKCRAIRCTADINGQC
PNELRAPGGCNPCTVEFKTDKYCCNSGSCGPTTYSRFFKERCWDAYSYPKDDPTSTFTCPGGTNYR
VVFC

Os aminoácidos destacados em cinza representam os resíduos que interagem nos complexos. As sequências dos peptídeos estão sublinhadas.

Figura 32: Modelo tridimensional de dois complexos.

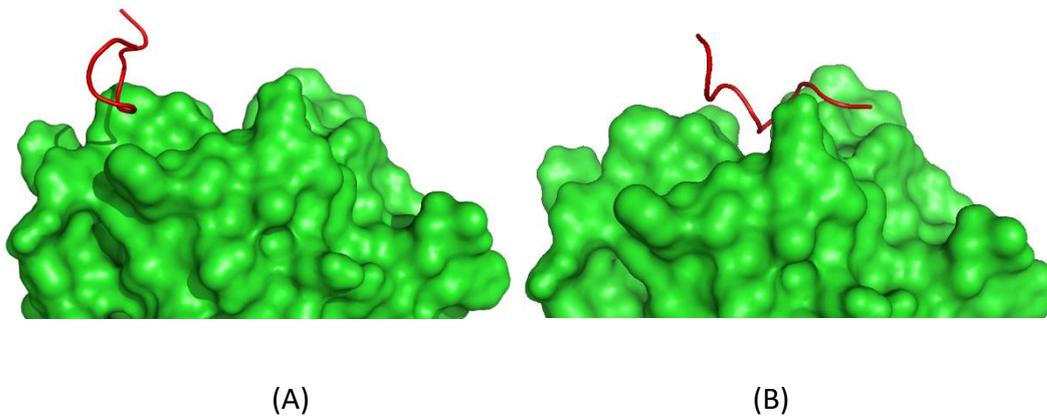


(A) Complexo ADIPOQ/ADIPOR1 e (B) Complexo CgOsm/ADIPOR1

Tabela 10 - Análise dos complexos. Energia de ligação e valor de *score*

Complexo	Energia de ligação (kcal/mol)	<i>score</i>
ADIPOQ/ADIPOR1	- 10,12	- 6,02
CgOsm/ADIPOR1	- 8,15	- 4,90
CgOsm ^{Pep1} /ADIPOR1	- 3,02	- 2,87
CgOsm ^{Pep2} /ADIPOR1	- 5,88	- 3,91

Figura 33: Modelos tridimensional de ADIPOR1 complexado



(A) CgOsm^{Pep1} ; (B) CgOsm^{Pep2}.

6 – DISCUSSÃO

Látex é uma suspensão aquosa ou emulsão de vários tipos de partículas sintetizadas e armazenadas sob pressão em um sistema de canais formados por células altamente especializadas denominadas de laticíferos. Neste fluido, são encontrados proteínas, alcalóides, amido, açúcares livres, óleos, taninos, resinas, borracha e típicas estruturas sub-celulares (DOMSALLA & MELZIG, 2008).

Ao longo dos últimos 20 anos, muitos trabalhos foram publicados sobre látex, principalmente estudos bioquímicos, ecológicos e evolucionários dos laticíferos. A maioria das evidências desses estudos tem reforçado a hipótese que o látex tem um papel fundamental na defesa de plantas contra patógenos e herbívoros (AGRAWAL & KONNO, 2009).

Muitas proteínas isoladas de látex de diversas espécies de plantas, estão envolvidas na defesa vegetal. Elas são agrupadas com base na participação como agentes de proteção contra danos causados por predadores como insetos ou invasores como vírus, bactérias e fungos (FREITAS, *et al.*, 2011a). Essas proteínas são chamadas de proteínas relacionada à patogênese (Proteínas-PR) e sua expressão aumenta em resposta a estresses bióticos ou abióticos (FERREIRA, *et al.*, 2006). É um grupo diversificado de proteínas incluindo quitinases, proteases, inibidores de proteases, taumatina e osmotinas (VAN LOON, REP, PIETERCE, 2006; LOOZE *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2011a).

Taumatinas e osmotinas pertencem a família PR-5 que estão envolvidas com estresse osmótico e respostas de defesa em plantas (CHOI, HONG, HWANG, 2013). Essas proteínas são de fato proteínas PR pois evidências experimentais mostraram mudanças na expressão de RNA mensageiro sob condições de estresse (HONG *et al.*, 2004; VIKTOROVA, *et al.*, 2011). Apesar do grande número de osmotinas já descritas, poucas

foram purificadas ou caracterizadas em fluidos laticíferos (FREITAS *et al.*; 2011a, b).

A sequência NH₂-terminal de uma osmotina de *Hevea brasiliensis*, purificada através de cromatografia de fase reversa, foi a primeira osmotina purificada de látex (SUBROTO *et al.*, 2001). Looze e colaboradores (2009) purificaram e caracterizaram uma proteína que é induzida em resposta a ferimento do látex de *Carica papaya*. Esta proteína foi identificada como uma proteína do tipo taumatina com base na sua sequência parcial de aminoácidos. Recentemente, uma osmotina antifúngica de 22 kDa foi purificada e caracterizada do látex de *Calotropis procera* (FREITAS *et al.*; 2011a, b).

Pouco se tem investigado sobre atividades biológicas do látex de *Cryptostegia grandiflora*, apesar de que látex, em geral, é amplamente relacionado com defesa vegetal (KONNO *et al.*, 2011). Recentemente Ramos e colaboradores (2014) isolaram uma protease cisteínica de 24 kDa do látex de *C. grandiflora*. Essa protease, denominada de Cg24-I, inibiu a germinação de esporos de *Fusarium solani* e sua toxicidade parece envolver a permeabilidade da membrana plasmática dos esporos. Esse foi o primeiro relato da purificação de uma proteína nesse látex. Frações protéicas do látex de *C. grandiflora* apresentam atividade anti-oxidante e proteolítica (FREITAS *et al.*, 2010), assim como, atividade larvicida (RAMOS *et al.*, 2009) e bactericida (SHUKLA, KRISHNA, 1961).

Wang e colaboradores (2010) relataram um método, baseado em eletroforese bidimensional, compatível com espectrometria de massas para a separação e a análise de proteínas do látex de *Hevea brasiliensis*. Apesar desses estudos, a literatura ainda é escassa em análise proteômica do látex.

Na tentativa de identificar proteínas relacionadas à defesa, estudamos uma fração rica em proteínas do látex de *Cryptostegia grandiflora*. As proteínas de PLCg foram separadas através de eletroforese bidimensional. Cerca de 61 spots foram removidos do gel, submetidos à

digestão trípica para identificação das proteínas presentes por espectrometria de massas.

Várias proteínas relacionadas à defesa foram identificadas em PLCg através de pesquisa em bancos de dados NCBI e Swissprot usando a ferramenta de bioinformática MASCOT, dentre essas, proteases cisteínicas, osmotinas, alérgenos, PRPs (pathogen related protein). A presença de proteases cisteínicas foi previamente descrita na fração PLCg (RAMOS, *et al.*, 2013, FREITAS *et al.*, 2010). As proteases são reconhecidamente relacionadas à patogênese (DOMSALLA, MELZIG, 2008; VIKTOROVA *et al.*, 2011; TZOU *et al.*, 2011), e tem seu padrão de expressão alterado em resposta a estresses bióticos e abióticos (MACKOVA *et al.*, 2009). Proteínas relacionadas à patogênese, tais como, proteases cisteínicas, osmotinas e quitinases foram identificadas em uma fração protéica do látex de *Calotropis procera* (SOUZA, *et al.*, 2011).

Tendo em vista a presença de proteínas de defesa no látex de *C. grandiflora*, nós tentamos isolar e caracterizar uma dessas proteínas. Para isso, a fração PLCg foi submetida a cromatografia de troca iônica em sistema de purificação de alta performance. O processo cromatográfico resultou na separação de PLCg em doze picos retidos que foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida e espectrometria de massas. Análise por eletroforese mostrou que o pico 1 parecia ser homogêneo com massa molecular em torno de 21 kDa. Os demais picos apresentavam bandas com massas moleculares variando de 13 a 45 kDa. As análises por espectrometria de massas dos peptídeos de cada pico revelaram a presença de osmotinas, proteínas do tipo osmotinas e proteases cisteínicas. A principal vantagem desse procedimento cromatográfico foi separar as frações de uma única etapa de cromatografia que resultou em um pico com alta grau de pureza.

Com a finalidade de avaliar o grau de homogeneidade do pico 1 da cromatografia, que foi identificado por espectrometria de massa como uma osmotina, nós realizamos a análise desse pico íntegro (sem digestão) por

espectrometria de massas. O espectro confirmou a pureza da amostra que apresenta dois picos monocarregados com massas muito semelhantes de 21696.0020 e 21753.0020 Da e um pico com carga dupla correspondendo a metade da massa (10848.0010 Da). Como reportado na literatura, osmotinas possuem massa molecular variando entre 20 e 30 kDa (CHU, NG, 2003; VIKTOROVA, *et al.*, 2012).

Osmotinas purificadas do látex de *Carica papaya* e de *Calotropis procera* apresentam massas moleculares de 22.137 e 22,340 kDa, respectivamente (LOOZE *et al.*, 2009, FREITAS, *et al.*, 2011b). A presença de dois picos com massas ligeiramente diferentes (21696.0020 e 21753.0020 Da) no espectro pode ser resultante de isoformas ou modificações pós-graducionais. Interessantemente é que a diferença entre essas massas é de 57 Da que corresponde a massa molecular da glicina (57.0513 Da). Portanto, pode existir duas isoformas da osmotina *C. grandiflora* com apenas um resíduo de glicina diferente. A presença de isoformas de osmotinas parece ser comum nas plantas. Duas isoformas de osmotinas foram descritas no látex de *Calotropis procera* com massas moleculares de 22.340 e 22.536 Da (FREITAS, *et al.*, 2011b). Oito isoformas de osmotinas foram identificadas em cevada por cDNA, sete de folha e uma de semente. Todas elas apresentaram massas moleculares variaram de 15,6 a 21,8 kDa e pontos isoelétricos diferentes (REISS *et al.*, 2006).

Uma única sequência de 40 resíduos de aminoácidos NH₂-terminal foi encontrada para a proteína purificada. A sequência é altamente consistente com outras osmotinas ou proteínas do tipo taumatina (LOOZE *et al.*, 2009). O NH₂-terminal alinha com alta similaridade com osmotinas de látex de *Calotropis procera* (CpOsm) e de *Populus balsamifera*. Esta similaridade também é confirmada por experimentos de MS/MS dos peptídeos trípticos da proteína purificada de *C. grandiflora*. Esses conjuntos de dados (eletroforese, espectrometria de massas e sequenciamento NH₂-

terminal) confirmam que a proteína é homogênea. A proteína purificada do látex de *C. grandiflora* foi denominada de CgOsm.

Muitos trabalhos utilizam a microscopia de força atômica como uma ferramenta de análise que fornece informações importantes no que diz respeito as estruturas quaternárias formadas por proteínas, sugerindo como as subunidades interagem para formação de complexos moleculares. Nesse trabalho, análise por microscopia de força atômica mostrou que monômeros de CgOsm interagem formando complexos moleculares de três unidades. Não há relatos na literatura que utilizam essa técnica para a análise da estrutura de osmotinas. Contudo, existem evidências que algumas proteínas, como a adiponectina humana que compartilham similaridade estruturais e funcionais com osmotinas, formam trímeros, hexâmeros ou oligômeros de ordem maiores (AOUIDA, *et al.*, 2013).

Atividade antifúngica de osmotinas é bem documentada (LIU *et al.*, 2010, FREITAS, *et al.*, 2011b, LEE, *et al.*, 2010). Provavelmente o modo de ação das osmotinas envolvem alterações na permeabilidade da membrana plasmática dos microrganismos (NARASIMHAN *et al.*, 2001). Usamos dois fungos fitopatogênicos para avaliar o potencial antifúngico de CgOsm. *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani* que não foram afetados pela CgOsm em nenhum dos parâmetros avaliados. Osmotinas e proteínas do tipo taumatinas não são universalmente eficazes em inibir fungos fitopatogênicos (VIKTOROVA, *et al.*, 2012, MANI SIVAKUMAR, MANJULA 2012). *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Neurospora crassa*, todos os agentes patogênicos que ocorrem em todo o mundo e em diversos hospedeiros parecem ser insensíveis aos efeitos de osmotina de tabaco (ABAD, *et al.*, 1996). Testamos a capacidade antifúngica de CgOsm contra apenas duas espécies de fungos, portanto não descartamos a possibilidade que CgOsm possa inibir o crescimento de outras espécies de fungos, tendo em vista, que a resistência ou susceptibilidade é, muitas vezes, determinada por uma

especificidade estrita entre a proteína antifúngica e a sua célula alvo (LEE, *et al.*, 2010).

De modo geral, os estudos com proteínas purificadas têm como objetivo o entendimento funcional da molécula no ambiente celular, assim como uma perspectiva da aplicação das potencialidades dessas proteínas nas diversas áreas do conhecimento. Logo, faz necessário um estudo minucioso dos aspectos moleculares, como identificação dos genes que codificam as proteínas de interesse, clonagem e expressão em sistemas heterólogos. Esse trabalho está diretamente relacionado com a purificação e clonagem de proteínas com potencialidades biotecnológicas.

Para clonagem do gene da CgOsm foram utilizados iniciadores degenerados desenhados para uma osmotina de látex *Calotropis procera* (CpOsm), devido à alta similaridade entre os 40 resíduos NH₂-terminais das duas osmotinas e a disponibilidade desses iniciadores no nosso grupo de trabalho. A amplificação usando cDNA de *C. grandiflora* e iniciadores degenerados (CpOsm F e CpOsm R) gerou um fragmento de aproximadamente 612 pb no qual foi ligado em um vetor de clonagem. As células de *E. coli* eletrocompetentes foram transformadas e os plasmídeos transformados foram sequenciados.

As análises das sequências de nucleotídeos (clones 3, 5, 7 e 9) pelo BLASTn mostraram identidade com a superfamília da taumatina TLP e apresentaram mais alta similaridade com osmotina de *Piper colubrinum* (MANI, MANJULA, 2010). A proteína putativa apresentou ponto isoelétrico de 8.1 que reflete o caráter positivo da proteína em pH baixo ou neutro. Osmotinas básicas são bastante comuns em plantas (MANI, SIVAKUMAR, MANJULA, 2012). A sequência de aminoácidos deduzida compartilha homologia com osmotinas e proteínas do tipo taumatina apresentando a reconhecida assinatura molecular da família TLP (G-x-[GF]-x-C-x-T-[GA]-D-C-x(1,2)-[GQ]-x(2,3)-C) (TACHI *et al.*, 2009). A sequência da osmotina de *C. grandiflora* apresenta 16 resíduos de cisteína que é altamente conservado entres as osmotinas. Pontes dissulfeto formadas por essas

cisteínas conservadas auxiliam na estabilidade da molécula e permitem o correto enovelamento e alta estabilidade sob condições extremas de pH e temperatura, bem como a resistência a proteólise (VIKTOROVA, *et al.*, 2012).

A modelagem computacional de uma proteína através do método de homologia baseia-se no conceito de sobreposições de aminoácidos a partir de modelo já determinado. A estratégia baseia-se no conhecimento de que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada que sua sequência de aminoácidos durante o processo evolutivo, e que pequenas mudanças na sequência, em geral, resultam em, apenas, sutis modificações na estrutura tridimensional (NAYEEM, *et al.*, 2006).

O modelo gerado pela plataforma Swiss Model Server foi o que apresentou melhor qualidade. Análises do MolProbity revelou que 96,5% dos resíduos estavam situados em regiões mais favoráveis, 4,5% estavam em regiões adicionalmente permitidas e nenhum dos resíduos de aminoácidos estavam em regiões desfavoráveis. O fator de qualidade global foi de 89.254 e o Z- score -6.1. Esses valores estão de acordo com valores encontrados para outras proteínas (MANI, SIVAKUMAR, MANJULA, 2012; SINGH, YADAV, DUBEY, 2013) e para proteína act d 2 que foi utilizada como molde (fator de qualidade global: 93,229; Z- score - 6.5). Essas análises indicam que o modelo gerado para CgOsm tem boa qualidade do modelo.

A estrutura da CgOsm exhibe uma arquitetura típica de TLPs, que é composta por três domínios (LEONE *et al.*, 2006). O núcleo do domínio I corresponde a uma estrutura do tipo sanduiche beta. O domínio II é constituído basicamente por α -hélices. O domínio III é compreendido por um longo loop e uma folha beta antiparalela. Os três domínios são estabilizados por pontes dissulfetos Cys9–Cys202, Cys50–Cys60, Cys65–Cys71 Cys119–Cys191, Cys124–Cys174, Cys132–Cys143, Cys146–Cys155, Cys156–Cys161, que são altamente conservadas em osmotinas (MIN, *et al.*, 2004) e taumatina (OGATA *et al.*, 1996). Os domínios I e II

formam uma fenda central, que é composta principalmente por resíduos hidrofílicos envolvidos por resíduos aromáticos Tyr74, Phe89, Phe94 e Tyr178. Essa fenda é particularmente rica em resíduos ácidos (Glu83, Asp96, Asp101, Asp183) e conseqüentemente é uma região com forte caráter eletronegativo (MANI, SIVAKUMAR, MANJULA, 2012).

Muitos estudos correlacionam a atividade antifúngica das osmotinas com a presença dessa fenda negativa no domínio I (LEONE *et al.*, 2006). Zeamatina de *Zea mays* e osmotina de tabaco que detém atividade antifúngica contra várias espécies, exibem essa fenda negativa. Por outro lado, taumatina e outras proteínas do tipo taumatina de frutas são ineficientes contra fungos e apresentam uma fenda carregada eletropositivamente (MIN, *et al.*, 2004). A osmotina de *C. grandiflora* apresentou um forte caráter negativo entre o domínio I e II, porém não exibiu atividade antifúngica. Mani e colaboradores (2012) expressaram duas isoformas de osmotinas de *Piper colubrinum* de 16.4 e 21.5 kDa. A isoforma menor possui uma deleção de cerca de 50 aminoácidos o que resulta em uma conformação incomum no domínio III. As duas isoformas possuem o a fenda negativa comum as osmotinas, porém a isoforma de 16,4 kDa não exibiu qualquer atividade antifúngica, enquanto a isoforma de 21.5 kDa foi capaz de inibir a germinação de esporos de *Phytophthora capsici* e conídios de *Fusarium oxysporum*. Assim, a atividade antifúngica provavelmente não é determinada somente pela presença da fenda negativa, mas outras características, ainda desconhecidas, na estrutura são relevantes para a atividade.

Foi descrito anteriormente uma correlação entre as estruturas tridimensionais de osmotinas e adiponectina, um hormônio protéico humano que vem ganhando cada vez mais atenção da comunidade científica por estar relacionado com uma série de doenças humanas (DALAMAGA, DIAKOPOULOS, MANTZOROS, 2012). Além de correlação estrutural, pesquisas recentes mostram similaridade funcional entre essas proteínas não relacionadas, pois osmotinas podem ativar as mesmas vias

de sinalização que a adiponectina em células humana (MATSUZAWA, 2010).

Neste trabalho, realizamos estudos de modelagem molecular em CgOsm, adiponectina (ADIPOQ) e seu receptor (ADIPOR1) com objetivo de ter um conhecimento sobre as interações envolvidas nas regiões de ligação e identificar um peptídeo candidato para estudos de desenho de drogas como um possível agonista do receptor de adiponectina. Por essas razões nós modelamos o complexo ADIPOQ e ADIPOR1 e analisamos as propriedades físico-químicas dos resíduos na região de interação. A ADIPOQ expõem resíduos carregados positivamente e negativamente (Lys 169, Arg 221, Asp 170, Asp 187), e dois resíduos positivos (Lys 170 a Arg 235) são encontrados em ADIPOR1. Esses dados sugerem que a interação entre a adiponectina e seu receptor tem base eletrostática (MIELE, COSTANTINI, COLONNA, 2011).

Quando os complexos ADIPOQ/ADIPOR1 e CgOsm/ADIPOR1 são comparados, o domínio do tipo sanduiche beta da ADIPOQ não está na mesma orientação de CgOsm. Contudo, é evidente que os determinantes estruturais dessas interações são muito similares (AOUIDA, *et al.*, 2013). Tanto CgOsm como a adiponectina mostram afinidade similar com ADIPOR1 em termos de energia livre de ligação (LIU *et al.*, 2004; MIELE, COSTANTINI, COLONNA, 2011). As análises da interação de ADIPOR1 com os peptídeos de CgOsm mostraram que a interação ocorre com os mesmos resíduos do complexo CgOsm/ ADIPOR1.

Nós obtivemos resultados similares a que Miele e colaboradores (2011) encontraram em suas pesquisas usando a mesma estratégia experimental. Porém, Miele sintetizou quimicamente um peptídeo da osmotina *Nicotina tabacum* e avaliou o efeito *in vivo* da adiponectina, osmotina e do peptídeo. Os resultados mostraram que tanto a osmotina quanto o peptídeo interagem com o mesmo receptor desencadeando a mesma via de sinalização da adiponectina. Portanto, esses peptídeos poderiam ser candidatos para estudos de desenho de drogas em

estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças relacionadas com a deficiência nos níveis de adiponectina.

7 - CONCLUSÃO

O estudo revelou que o látex é rico em proteínas relacionadas com a defesa da planta, principalmente osmotinas e proteases cisteínica. A proteína purificada de 21 kDa foi identificada com um membro da família PR-5 e apresenta alta similaridade com osmotina.

A estrutura tridimensional de CgOsm compartilha enovelamento altamente conservado entre as TLP.

CgOsm compartilha um domínio que tem similaridade estrutural com a adiponectina. Supõe-se que interage com o receptor de adiponectina com propriedades físico-químicas semelhante as da adiponectina.

8 - REFERÊNCIAS

ABAD, L.R.; DURZO, M.P.; LIU, D.; NARASIMHAN, M.L.; REUVENI, M.; ZHU, J.K.; NIU, X.M.; SINGH, N.K.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN R.A. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci* .118 , 11-23, 1996.

ABDIN, M.Z.; KIRAN, U.; ALAM, A. Analysis of osmotin, a PR protein as metabolic modulator in plants. *Bioinforma* ., 5 ,336-340, 2011.

ABDALLAH, A. A.; BRAIN, K.; BASHIR, A. K. Screening of Sudanese plant for molluscicidal activity and identification of leaves of *Tacca leontopetaloides* (L.) (Taccaceae) as a potential new exploitable resource. *Phytother. Res.*, 4(2): 62-65, 1990.

ADEWUNMI, C. O.; SOFOWORA, E. A. Preliminary screening of some plant extracts for molluscicidal activity. *Planta Med.*, 39: 57-65, 1980.

AGRAWAL, A.A. & KONNO, KOTARO. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 40: 311-31, 2009.

AGRAWAL, A.A.; LAJEUNESSE, M.J.; FISHBEIN M. Evolution of latex and its constituent defensive chemistry in milkweeds (*Asclepias*): a test of phylogenetic escalation. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 128:126–38, 2008.

ALBERT M, JEHLE AK, LIPSCHIS M, MUELLER K, ZENG Y, FELIX G. Regulation of cell behaviour by plant receptor kinases: pattern recognition receptors as prototypical models. *European Journal of Cell Biology* 89, 200–207, 2010

ALBUQUERQUE, T.; ALENCAR, N.; FIGUEIREDO, J.; FIGUEIREDO, I.; TEIXEIRA, C.; BITENCOURT, F.; SECCO, D.; ARAUJO, E ; ANAMARIALEAO, C ; RAMOS, M ; RAMOS, M. V. . Vascular permeability, neutrophil migration and edematogenic effects induced by the latex of *Cryptostegia grandiflora*. *Toxicon* (Oxford) , 53: 15-23, 2009.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHENG, Z., MILER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST – A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25:3389-3402, 1997.

APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373–399, 2004.

ASAI T, TENA G, PLOTNIKOVA J, WILLMANN MR, CHIU WL, GOMEZ-GOMEZ L, BOLLER T, AUSUBEL FM, SHEEN J. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415, 977–983. 2002.

AOUIDA, M. KIM, K., SHAIKH, A.R., PARDO, J.M., EPPINGER, J., YUN, D. BRESSAN, R.A. MEENA L. NARASIMHAN, M.L. A *Saccharomyces cerevisiae* Assay System to Investigate Ligand/AdipoR1 Interactions That Lead to Cellular Signaling. *Plos One*, 8, 2013.

ARNOLD K., BORDOLI L., KOPP J., AND SCHWEDE T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 22,195-201, 2006.

AZARKAN, M.; DIBIANI, R.; GOORMAGHTIGH, E.; RAUSSENS, V.; BAEYENS-VOLANT, D. The papain Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable β -sheet glycoprotein. ***Biochemica et Biophysica Acta*, 1764**: 1063-1072. 2006

BARCISZEWSKI, J., MASSINO, F., CLARK, B. F.C. Kinetin—A multiactive molecule. *International Journal of Biological Macromolecules* 40, 182–192, 2007.

BATALIA, M.A., MONZINGO, A.F., ERNST, S., ROBERTUS, J.D. The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. *Nature Structural & Molecular Biology*., 3:19–23. 1996.

BERNAYS, E. A., CHAPMAN, R. F. **Host-plant selection by phytophagous insects**. Chapman & hall. New York, 1994.

BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern recognition receptors. ***Annual Review of Plant Biology***, 60, 379–406. 2009.

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

BROWN, J. R.; SCANLAN, J. C.; MCIVOR, J. G. Competition by herbs as a limiting factor in shrub increase: a test with different growth forms. *J. Veget. Sci.*, 9(6):829–836, 1998.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. *Biochemistry and Molecular Biology of plants*, 6 th ed.; Wiley & Sons: New York, 2006.

CAMPOS, M.D.; SILVA, M.S.; MAGALHAES, C.P.; RIBEIRO, S.G.; SARTO, R.P.D.; VIEIRA, E.A.; DE SA, M.F.G. Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum*. *Microb. Cell Fact.*, 7, 7-17, 2008.

CHOI, D.S.; HONG, J.K.; HWANG, B.K. Pepper osmotin-like protein 1 (CaOSM1) is an essential component for defense response, cell death, and oxidative burst in plants. *Planta*, 238:1113–1124, 2013.

CHU K.T., NG T.B, Isolation of a large thaumatin-like antifungal protein from seeds of the Kweilin chestnut *Castanopsis chinensis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 364 e 370, 2003.

COMEAU, S.R., GATCHELL, D.W., VAJDA, S. CAMACHO, C.J. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes, *Bioinformatics* 20, 45–50, 2004.

DALAMAGA M, DIAKOPOULOS KN, MANTZOROS CS . The role of adiponectina in cancer: a review of current evidence. *Endocr Rev* 33: 547–594, 2012.

D'ANGELI, S.; ALTAMURA, M.M. Osmotin induces cold protection in olive trees by affecting programmed cell death and cytoskeleton organization. *Planta* ,225, 1147-1163, 2007.

DAS, M.; CHAUHAN, H.; CHHIBBAR, A.; HAQ, Q.M.R.; KHURANA, P. High-efficiency transformation and selective tolerance against biotic and abiotic stress in mulberry, *Morus indicacv. K2*, by constitutive and inducible expression of tobacco osmotin. *Transgenic Res.* 20, 231-246, 2011

DHAWAN, B. N.; PATNAIK, G. K.; RASTOGI, R. P.; SIGH, K. K.; TANDON, J.S. Sreenin of Indian plants for biological activity: Part VI. *Indian J. Exp. Biol.*, 15:208-219, 1977.

DOAK, A.; DEVEZE, M.; MARCH, N.; OSMOND, R.; MCKENZIE. *Rubber Vine*

DODDS, P.N.; RATHJEN, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews | Genetics*, 11, 539 – 548, 2010.

DODDS, P. N. RATHJEN P. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103 , 8888–8893, 2006.

DOMSALLA, A.; MELZIG, M.F. Occurrence and properties of proteases in plant látices. ***Planta Medica*, 74:** 699-711, 2008.

DOSKOTCH, R. W; MALIK, M. Y.; HUFFORD, C. D.; MALIK, S. N.; TRENT, J. E.; KUBELKA, W. Antitumor agents V: Cytotoxic cardenolides from *Cryptostegia grandiflora* (Roxb.) R. Br. J. Pharmac. Sci., 61(4): 570-573, 2006.

DUSSOURD, D.E. Entrapment of aphids and whiteflies in lettuce latex. ***Annals of the Entomological Society of America*, 88:** 163-172, 1995.

FARREL, B. D., DUSSOURD, D.E., MITTER, C. Escalation of Plant Defense: Do Latex and Resin Canals Spur Plant Diversification? ***The American Naturalist*, 138 (4):** 881-900, 1991.

FENG F AND ZHOU JM Plant-bacterial interactions mediated by type III effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.*15469–476, 2012.

FERREIRA, R. B.; SARA M.; FREITAS R.; SANTOS , C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L.M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A.R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. ***Molecular Plant Pathology* 8(5):** 677–700. 2007.

FREITAS, C. D. T, SOUZA, D. P; ARAÚJO, E. S, MARIANA G. CAVALHEIRO, M. G; LUCIANA S. OLIVEIRA, L. S; RAMOS, M. V. Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. *Brazilian Society of Plant Physiology*, 22(1): 11-22, 2010.

FREITAS, C.D.T.; NOGUEIRA, F.C.S.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A.; DOMONT, G.B.; RAMOS, M. V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 738-743, 2011a.

FREITAS, C.D.T; LOPES, J.L.S.; BELTRAMINI, L.M.; OLIVEIRA, R.S.B.; OLIVEIRA, J.T.A.; RAMOS. M.V. Osmotin from *Calotropis procera* latex:

New insights into structure and antifungal properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808: 2501–2507, 2011b.

GHOSH, R., CHAKRABARTI, C. Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein. *Planta*, 228:883–890. 2008.

GIORDANI, R., REGLI, P., BUC, J. Antifungal effect of *Hevea brasiliensis* latex with various fungi. Its synergistic action with amphotericin B against *Candida albicans*. *Mycoses*, **45**: 476–481, 2002.

GOEL, D.; SINGH, A.K.; YADAV, V.; BABBAR, S.B.; BANSAL, K.C. Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) *Protoplasma*, 245, 133-141, 2010.

GÖHRE V, SPALLEK T, HAWEKER H, MERSMANN S, MENTZEL T, BOLLER T, DE TORRES M, MANSFIELD JW AND ROBATZEK S. Plant pattern recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr. Biol.* 18 1824–1832, 2008.

GRICE, A. C. Seed production, dispersal and germination in *Cryptostegia grandiflora* and *Ziziphus mauritiana*, two invasive shrubs in tropical woodlands of northern Australia. *Aust. J. Ecol.*, 21(3):324–331, 1996.

HAGEL, J. M; YEUNG, E.C.; FACCHINI. P.J. Got milk? The secret life of laticifers. *Trends in Plant Science*, 13 (12):568 – 571, 2008.

HALUZIK, M.; PARIZKOVA, J.; HALUZIK, M.M. Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications. *Physiol. Res.*, 53, 123-129, 2004.

HELLMAN U.; WERNSTEDT, C.; GONEZ, J.; HELDIN, C.H. Improvement of an "in-gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem*; 224(1):451-455, 1995.

HENRY G, THONART P, ONGENA M. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others; an update on the diversity of plant immune elicitors. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 16257–268, 2012

HERRERA, O.; MAJOR, I. Visitantes Perigosos no Nordeste – Brasil Tropical. *Ciência Hoje*, 38: 42–44, 2006.

HONG JK, JUNG HW, LEE BK, LEE S C, LEE YK, HWANG BK an osmotin-like protein gene, *CaOSM1*, from pepper: differential expression and in situ localization of its mrna during pathogen infection and abiotic stress. *Physiol Mol Plant Pathol* 64:301–310. 2004

HUNTER J. Reconsidering the functions of latex. *Trees - Structure and Function*, 9:1–5, 1994.

Integrated Taxonomic Information System; Apocynaceae of North America Update, database (version 2011). Disponível em: <http://www.itis.gov/>. Acesso: 14/01/2013

JI, C., KUC, J. Antifungal activity of cucumber beta-1,3-glucanase and Chitinase. ***Physiological and Molecular Plant Pathology***, 49: 257-265, 1996.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. ***Nature***, 444, 323–329, 2006.

JONES, J. D. G., DANGL, J. L. The plant immune system. *Nature* 444 , 323–329, 2006.

JORTAY J, SENOU M, ABOU-SAMRA M, NOEL L, ROBERT A . Adiponectin and skeletal muscle: pathophysiological implications in metabolic stress. *Am J Pathol* 181: 245–256. 2012

KADOWAKI T, YAMAUCHI T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26: 439–451, 2005.

KELLEY, L.A., STERNBERG, M.J.E. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4, 363 - 371 2009

KITAJIMA, S. & SATO, F. Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. ***The Journal of Biochemistry***, 125: 1–8, 1999.

KOBAYASHI, K.; FUKUDA, M.; IGARASHI, D.; SUNAOSHI, M. Cytokinin binding proteins from tobacco callus share homology with osmotin-like protein and an endochitinase. *Plant Cell Physiol.*,41, 148-157, 2000.

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry*, 72: 1510–1530, 2011.

KOPP J. AND SCHWEDE T. The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. *Nucleic Acids Research*. 32, D230- D234, 2004.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. ***Nature.***, 227: 680-685, 1970.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P. A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. v. 23, p. 2947–2948, 2007

LEE, H.; DAMSZ, B.; WOLOSHUK, C.P.; BRESSAN, R.A.; NARASIMHAN, M.L. Use of the Plant Defense Protein Osmotin To Identify *Fusarium oxysporum* Genes That Control Cell Wall Properties. *Eukaryot. Cell* ,9, 558-568, 2010.

LEONE P, MENU-BOUAOUICHE L, PEUMANS WJ, PAYAN F, BARRE A, ROUSSEL A, VAN DAMME EJM, ROUGE´ P. Resolution of the structure of the allergenic and antifungal banana fruit thaumatin-like protein at 1.7 Å . *Biochimie* 88:45–52. 2006.

LINTHORST, H.J.M. Pathogenesis-related proteins of plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, ,10, 123-150, 1991.

LIU S, ZHANG C, ZHOU H, ZHOU Y. A physical reference state unifies the structure-derived potential of mean force for protein folding and binding. *Proteins* 56: 93–10, 2004.

LIU, J.J.; STURROCK, R.; EKRAMODDOULLAH, A.K.M. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Rep.*29, 419-436. ,2010

LOOZE Y., P. BOUSSARD, J. HUET, G. VANDENBUSSCHE, V. RAUSSENS, R. WINTJENS, Purification and characterization of a wound-inducible thaumatin-like protein from the latex of *Carica papaya*, *Phytochemistry* 70 (2009) 970 e 978.

LUKASIK E, TAKKEN FL.. STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 427–436, 2009.

MACKOVA, M.; NEUBAUEROVÁ, T.; MACEK, T.; KOUTEK, B. Antimicrobial Cationic Peptides. *Chem. Lett.*, 103, 460-468, 2009.

MAEKAWA T, KUFER TA, SCHULZE-LEFERT P.. NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nature Immunology* 12, 817–826, 2011.

MANI, T., MANJULA, S. Cloning and characterization of two osmotin isoforms from *Piper colubrinum*. *Biologia Plantarum*, 54, 377–380. 2010.

MANI, T., SIVAKUMAR, K. C., MANJULA, S. Expression and Functional Analysis of Two Osmotin (PR5) Isoforms with Differential Antifungal Activity from *Piper colubrinum*: Prediction of Structure–Function Relationship by Bioinformatics Approach. *Mol Biotechnol* 52:251–261, 2012.

MATSUZAWA Y () Adiponectin: a key player in obesity related disorders. *Curr Pharm Des* 16: 1896–1901, 2010.

MELO, V.M.M., VASCONCELOS, I.M., GOMES, V.M., CUNHA, M., SOARES, A.A., OLIVEIRA, J.T.A. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant Science**, 169: 629-639, 2005.

MIELE, M.; COSTANTINI, S.; COLONNA, G. Structural and Functional Similarities between Osmotin from *Nicotiana Tabacum* Seeds and Human Adiponectin. *Plos One*, 6, 2011.

MIN, K.; HA, S.C.; Hasegawa, P.M.; Bressan, R.A.; Yun, D.J.; Kim, K.K. Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein. *Proteins Struct.Funct.Genet.*, 54, 170-173, 2004.

MORCELLE, S.R.; CAFINI, N.O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. **Fitoterapia** 75: 480-493, 2004.

MUKHERJEE, K. P.; GUNASEKHARAN R.; SUBBURAJU, T.; DHANBAL, S. P.;

DURAI SWAMY, B.; P.; SURESH B. V. Studies on the antibacterial potential of

103 *Cryptostegia grandiflora* R. BR. (Asclepiadaceae) extract. *Phytother. Res.*, 3(1): 70-72, 1999

MUKHERJEE, K. P.; GUNASEKHARAN R.; SUBBURAJU, T.; DHANBAL, S. P.;

MUTHAMILARASAN, M.; PRASAD, M. Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *J. Biosci.* 38:433–449, 2013

NARASIMHAN, M.L., DAMSZ, B., COCA, M.A., IBEAS, J.I., YUN, D.J., PARDO, J.M., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A. A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Molecular Cell.*, 8: 921-930. 2001.

NARASIMHAN, M.L.; COCA, M.A.; JIN, J.B.; YAMAUCHI, T.; ITO, Y.; KADOWAKI, T.; KIM, K.K.; PARDO, J.M.; DAMSZ, B.; HASEGAWA, P.M.; YUN, D.J.; BRESSAN, R.A. Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. *Mol. Cell*, 17, 611-611, 2005.

NAYEEM, A.; SITKOFF, D.; JUNIOR, S.K. A comparative study of available software for high accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. *Protein Science*. v.15, p. 808-824, 2006.

NIELSEN, M.; LUNDEGAARD, C.; LUND O.,.; PETERSEN, T.N. CPH models-3.0 - Remote homology modeling using structure guided sequence profiles *Nucleic Acids Research*, 2010, Vol. 38, doi:10.1093, 2010

NOORI ,S.A.S, SOKHANSANJ,A. Wheat plants containing an osmotin gene show enhanced ability to produce roots at high NaCl concentration. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55,256-258, 2008.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLING, B.; PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. ***Immunological Reviews***, 198, 249–266, 2004.

OGATA, C.M., GORDON, P.F., VOS, A.M., KIM, S.H. Crystal structure of a sweet tasting protein thaumatin I, at 1.65 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 228, 893– 08 1992.

OSTERMEIER M, BENKOVIC SJ. Evolution of protein function by domain swapping. *Adv Protein Chem.*;55:29-77, 2000.

PATEL, A.K., SINGH, V.K., JAGANNADHAM, M.V., Carnein, a serine protease from noxious plant weed *Ipomoea carnea* (morning glory). *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 5809–5818, 2007.

PATEL, A.K., SINGH, V.K., MOIR, A.J., JAGANNADHAM, M.V. Biochemical and spectroscopic characterization of morning glory peroxidase from an invasive and hallucinogenic plant weed *Ipomoea carnea*. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9236– 9245, 2008.

RAMACHANDRAN, G.N.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Adv. Protein Chem.* 23, 283-437, 1968.

RAMOS, M.V.; FREITAS, C.D.T.; STANISÇUASKI, F.; MACEDO, L. L. P.; SALES, M.P.; SOUSA, D. P.; CARLINI, C. R. B. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis*

procera: role of laticifer proteins in plant defense. **Plant Science**, **173**:349–357, 2007

RAMOS, M.V.; PEREIRA, D.A.; SOUZA, D.P.; ARAÚJO, E.S.; FREITAS, C.D.T.; CAVALHEIRO, M.G.; MATOS, M.P.V.; CARVALHO, A.F.U. Potential of laticifer fluids for inhibiting *Aedes aegypti* larval development: evidence for the involvement of proteolytic activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **104(6)**: 805-812, 2009.

RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T.B.; FREIRE, E.A.; SALES, M.P.; SOUZA, D.P.; ARAUJO, E.S.; FREITAS, C.D.T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Arthropod-Plant Interactions**, DOI10.1007/s11829-010-9084-5, 2010.

RASMANN, S.; JOHNSON, M.D.; AGRAWAL, A.A. Induced responses to herbivory and jasmonate in three milkweed species. *Journal of Chemical Ecology*, **35**: 1326–1334, 2009.

REISS, E., SCHLESIER, B., BRANDT, W. cDNA sequences, MALDI-TOF analyses, and molecular modelling of barley PR-5 proteins. **Phytochemistry**, **67**: 1856–1864. 2006.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*. v. 234, p. 779-815, 1993.

SATO, F.; KITAJIMA, S.; KOYAMA, T.; YAMADA, Y. Ethylene-induced gene expression of osmotin-like protein, a neutral isoform of tobacco PR-5, is mediated by the AGCCGCC cis-sequence. *Plant Cell Physiol.*, **37**, 249-255, 1996.

SEGONZAC, C.; ZIPFEL, C. Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2011, **14**, 54–61.

SETHI, A.; MCAUSLANE, H.J.; RATHINASABAPATHI, B.; NUSSLY, G.S.; NAGATA, R.T. Enzyme induction as a possible mechanism for latex-mediated insect resistance in romaine lettuce. **Journal of Chemical Ecology**, **35**: 190–200, 2009.

SINGH, A.N., YADAV, P., DUBEY, V.K. cDNA Cloning and Molecular Modeling of Procerain B, a Novel Cysteine Endopeptidase Isolated from *Calotropis procera*. *PLOS ONE* **8**, 2013.

SINGH, B.; SHARMA, R.A.; VYAS, G.K.; SHARMA, P. Estimation of phytoconstituents from *Cryptostegia grandiflora* (Roxb.) R. Br. in vivo and

in vitro. II. Antimicrobial screening. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(9), pp. 1598-1605, 4 May, 2011

SINGH, N.K.; BRACKER, C.A.; HASEGAWA, P.M.; HANDA, A.K.; BUCKEL, S.; HERMODSON, M.A.; PFANKOCH, E.; REGNIER, F.E.; BRESSAN, R.A. Characterization of osmotin - a thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. *Plant Physiol.*, 85, 529-536, 1987

SOUZA, D.P.; FREITAS, C.D.T.; PEREIRA, D.A.; NOGUEIRA, F.C.; SALAS, C.E.; RAMOS, M. V. Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. *Planta Heidelberg*, 1:1-11, 2011.

SPANU, P, GROSSKOPF DG, FELIX G, BOLLER T. The apparent turnover of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato cells is regulated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Plant Physiology* 106, 529–535, 1994.

SPOEL SH, DONG X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* 12, 89–100, 2012.

SUKLA, O. P.; KRISHNAMURTHY, C. R. Bacteriolytic activities of plant lattices. *J. Sci. Indust. Res.*, 20: 225-226, 1961.

SUBROTO T.; H. VRIES, J.J. SCHURINGA, U.M.S. SOEDJANAATMADJA, J. HOFSTEENGED, P.A. JEKEL, J.J. BEINTEMA, Enzymatic and structural studies on processed proteins from the vacuolar (luteoid-body) fraction of latex of *Hevea brasiliensis*, *Plant Physiol. Biochem.* 39 1047e 1055. 2001.

TACHI H, FUKUDA-YAMADA K, KOJIMA T, SHIRAIWA M, TAKAHARA H. Molecular characterization of a novel soybean gene encoding a neutral PR-5 protein induced by high-salt stress. *Plant physiol biochem* 47:73–79, 2009

TAIRA, T., OHDOMARI, A., NAKAMA, N., SHIMOJI, M., ISHIHARA, M. Characterization and antifungal activity of Gazyumaru (*Ficus microcarpa*) latex Chitinases: Both the chitin-binding and the antifungal activities of class I Chitinases are reinforced with increasing ionic strength. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.**, 69: 811-818. 2005.

TAYLOR, C.B. Defense responses in plants and animals-more of the same. **Plant Cell**, 10: 873–876, 1998.

TENA, G.; BOUDSOCQ, M.; SHEEN, J. Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Curr. Opin. Plant. Biol* 14, 519–529, 2011.

TOKURIKI N, TAWFIK DS. Stability effects of mutations and protein evolvability. *Curr Opin Struct Biol* 19, 596–604. 2009

TOMAR, R.; KUMAR, R.; JAGANNADHAM, M.V., A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: purification and biochemical properties. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 1479–1487, 2008.

TOMLEY, A. J. The biology of australian weeds 26. *Cryptostegia grandiflora* R. Br. *Plant Protec. Quart.*, 10(4): 122–130, 1995.

TZOU, Y.M.; HUANG, T.S.; HUGGINS, K.W.; CHIN, B.A.; SIMONNE, A.H.; SINGH, N.K. Expression of truncated tobacco osmotin in *Escherichia coli*: purification and antifungal activity. *Biotechnol.Lett.*, 33, 539-543, 2011.

van LOON, L. & van STRIEN, E. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. ***Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55: 85–97, 1999.**

Van Loon, L.C., M. Rep, C.M.J. Pieterse, Significance of inducible defense-related proteins in infected plants, *Annu. Rev. Phytopathol.* 44 135 e162, 2006.

VIANA, C. A.; OLIVEIRA, J. S.; FREITAS, C. D. T.; ALENCAR, N. M. N.; CARVALHO, C. P. S.; NISHI, B. C.; RAMOS, M. V. Thrombin and plasmin-like activities in the latices of *Cryptostegia grandiflora* and *Plumeria rubra*. ***Blood Coagulation and Fibrinolysis***, (in press), 2013.

VIGERS, A.J.; WIEDEMANN, S.; ROBERTS, W.K.; LEGRAND, M.; SELITRENNIKOFF, C.P.; FRITIG, B. Thaumatine-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Sci.*, 83, 155-161, 1996.

VIJAYAN, P.; RAGHU, C.; ASHOK, G.; DHANARAJ, S.A.; SURESH, B. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. *Indian J. Med. Res.*, 120:24-29, 2004.

VIKTOROVA, J.; KRASNY, L.; KAMLAR, M.; NOVAKOVA, M.; MACKOVA, M.; MACEK, M. Osmotin, a Pathogenesis-Related Protein. *Current Protein and Peptide Science*, 13, 672-681, 2012.

WALZ, C.; GIAVALISCO, P.; SCHAD, M.; JUENGER, M.; KLOSE, J.; KEHR, J. Proteomics of cucurbit phloem exudates reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry*, 65: 1795–1804, 2004.

WANG Y, LI J, HOU S, WANG X, LI Y, REN D, CHEN S, TANG X AND ZHOU J-M. ADP-ribosyltransferase inhibits Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* 22:2033–2044, 2010.

WOLOSHUK, C.P.; MEULENHOF, J.S.; SELABUURLAGE, M.; VANDENELZEN, P.J.M.; CORNELISSEN, B.J.C. Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*, 2, 1991

ZIPFEL C, KUNZE G, CHINCHILLA D, CANIARD A, JONES JD, BOLLER T, FELIX G. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125, 749–760, 2006.

ZIPFEL C, ROBATZEK S, NAVARRO L, OAKELEY EJ, JONES JD, FELIX G, BOLLER T. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428, 764–767, 2004.

ZIPFEL, C.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: AvrPto targets the frontline. ***Current Biology***, 18, 218–220, 2008.

ZVEREVA, A. S.; POOGGIN, M.M. Silencing and Innate Immunity in Plant Defense Against Viral and Non-Viral Pathogens. *Viruses*, 4, 2578-2597, 2012.