

PROTEASES DE TEGUMENTOS DE SEMENTES QUIESCENTES DE
Glycine max E SUA RELAÇÃO COM MORTE CELULAR
PROGRAMADA

GUSTAVO LEMOS ROCHA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO- UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES- RJ

ABRIL - 2013

PROTEASES DE TEGUMENTOS DE SEMENTES QUIESCENTES DE
Glycine max E SUA RELAÇÃO COM MORTE CELULAR
PROGRAMADA

GUSTAVO LEMOS ROCHA

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.”

ORIENTADOR: Dr^a. Kátia Valevski Sales Fernandes

CAMPOS DOS GOYTACAZES- RJ

ABRIL - 2013

PROTEASES DE TEGUMENTOS DE SEMENTES QUIESCENTES DE
Glycine max E SUA RELAÇÃO COM MORTE CELULAR
PROGRAMADA

GUSTAVO LEMOS ROCHA

“Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da Universidade
Estadual do Norte Fluminense, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre em
Biociências e Biotecnologia.”

Defendida em 3 de Abril de 2013

Comissão Examinadora

Membro externo: Dr. André Teixeira da Silva Ferreira - Tecnologista em Saúde
Pública - Laboratório de Toxinologia/FIOCRUZ

Membro interno: Prof. Dr. Gustavo Lazzaro Rezende - Professor Associado
LQFPP - CBB - UENF

Membro interno: Prof. Dr. Vanildo Silveira - Professor Associado
LBT - CBB - UENF

Orientador: Prof^a. Dr^a. Kátia Valevski Sales Fernandes - Professor Associado
LQFPP - CBB - UENF

Agradecimentos

À minha família pelo constante incentivo, pela segurança proporcionada e pela confiança depositada em minhas ações durante toda minha trajetória, além de ser meu porto seguro durante os momentos difíceis.

À professora Kátia Valevski Sales Fernandes pelo constante incentivo, dedicação, ensino, conselhos, suporte e pelo apoio nos momentos difíceis em todos esses anos de parceria, sendo uma orientadora exemplar.

Aos meus amigos do LQFPP, pela lealdade, pela confiança depositada, pelos momentos de descontração, pelas constantes ajudas e sugestões, pelos conselhos e incentivos. Em especial aos amigos Lucilene, Nathália, Nádia, Dayanni, Alanna e Daniel.

Ao professor Claudio Andrés Retamal e à sua equipe, cujos membros me acolheram muito bem, depositaram confiança no trabalho e são grandes amigos.

Ao professor Jorge Hernández Fernandez por me ensinar e colaborar com toda a parte de modelagem molecular, além do constante incentivo.

Ao Dr. André Teixeira da Silva Ferreira e à equipe do Laboratório de Toxinologia da FIOCRUZ pelo acolhimento e dedicação durante a preparação para as análises espectrométricas.

A todos os companheiros de universidade, cuja interação é essencial para a construção de um excelente ambiente de estudo e interação social.

Aos meus amigos mais antigos, que sempre confiaram e apostaram em mim.

A todos os professores que participaram de minha formação, incluindo o corpo docente de UENF (cuja qualidade é inquestionável) e os professores de minhas etapas educacionais anteriores.

Aos membros da banca por terem aceitado nosso convite. Incluindo o revisor e membro suplente Dr. Newton de Medeiros Vidal.

Ao Criador, pela luz da existência, tornando possíveis as conquistas de cada dia.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Morte Celular Programada em Plantas.....	1
1.2- Proteases e sua Conexão com Morte Celular Programada.....	4
1.3- Sementes e o Processo de Morte Celular Programada.....	11
1.4- Justificativa.....	12
2- OBJETIVOS	14
2.1- Objetivo Geral.....	14
2.2- Objetivos Específicos	14
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1- Material Vegetal.....	15
3.2- Extração protéica.....	15
3.3- Precipitação de Proteínas com Sulfato de Amônia.....	16
3.4- Quantificação de Proteínas	16
3.5- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS (SDS-PAGE) ..	16
3.6- Coloração por Coomassie Brilliant Blue	17
3.7- Revelação por Nitrato de Prata	17
3.8- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, em Presença de SDS e Gelatina (SDS-PAGE-Gelatina).....	18
3.9- Ensaio de Atividade Enzimática utilizando os Substratos DEVD-pNa (Caspases 3 e 7), LHED-pNa (Caspase 9) e VEID-pNa (Caspase 6), na Presença e Ausência de seus Respective Inibidores (SDS-PAGE-Gelatina-Inibidores).....	18
3.10- Estudos Estruturais Eletroforéticos (bidimensionais) das Atividades Enzimáticas Encontradas	19
3.11- Concentração das Enzimas com Atividades de Interesse	19
3.12- Sonicação das Faixas de Géis	20
3.13- Precipitação de Proteínas com Ácido Tricloroacético (TCA)	20
3.14- Dosagem de Proteínas por 2D-QuantKit (Amersham-Biosciences)	21
3.15- Digestão de Proteínas	21
3.16- Análise do Conteúdo Protéico das Amostras por Espectrometria de Massas	21
3.17- Análise da fragmentação do DNA através da detecção de oligonucleossomos em tegumentos de <i>Glycine max</i> durante o desenvolvimento ..	22

3.18- Alinhamento de Proteínas do tipo Caspase e Metacaspase	23
3.19- Modelagem Molecular da Metacaspase 4 de <i>Glycine max</i>	24
4- RESULTADOS.....	25
4.1- Teor de Proteínas dos Extratos Protéicos de Tegumentos de <i>Glycine max</i>	25
4.2- Perfis Protéicos de Tegumentos de <i>Glycine max</i> por SDS-PAGE/SDS-PAGE- gelatina	25
4.3- Detecção de Atividades Caspase-símile <i>in vitro</i> a partir de Extratos Protéicos de Tegumentos de Sementes de <i>Glycine max</i>	27
4.4- Estudos Eletroforéticos das Atividades Enzimáticas Encontradas	29
4.5- Extração e Acumulação das Amostras Provenientes das Eletroforeses Através de Sonicação	31
4.6- Conteúdo Protéico dos Precipitados por TCA	33
4.7- Análise do Conteúdo Protéico das Amostras por Espectrometria de Massas	34
4.8- Análise da fragmentação do DNA através da detecção de fragmentos oligonucleossomais em tegumentos de sementes de soja durante o desenvolvimento.....	35
4.9- Alinhamento das Proteínas.....	36
4.10- Predição da Estrutura Molecular da Metacaspase 4 de <i>Glycine max</i>	40
5- DISCUSSÃO	43
6- CONCLUSÕES.....	55
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

RESUMO

Morte celular programada (MCP) é um fenômeno que se caracteriza como uma morte celular altamente controlada, essencial para o desenvolvimento normal e para respostas efetivas a fatores bióticos e abióticos. Ocorre em organismos multicelulares, mas um número crescente de relatos também indica que eventos dessa natureza ocorrem em organismos unicelulares, envolvendo uma maquinaria bioquímica comum que inclui a ativação e a ação de várias proteases cisteínicas. O envolvimento geral dessas proteases em eventos de MCP em plantas sugere que essas enzimas desempenham papéis críticos no processo. Os aspectos bioquímicos do desenvolvimento do tegumento de sementes ainda são pouco conhecidos, visando contribuir para o melhor entendimento desse fenômeno, o presente trabalho teve como meta central investigar presença e a conexão de atividade de proteases em eventos de MCP do tegumento de sementes de *Glycine max* (soja). Extratos protéicos de tegumentos de sementes quiescentes exibiram atividades de proteases cisteínicas por zimografia e por clivagem de substratos de enzimas relacionadas a MCP em testes *in vitro*. A natureza destas atividades mostrou-se distinta, sendo estas provavelmente originadas enzimas diferentes. Os experimentos zimográficos indicam a formação de complexos protéicos ou de uma cascata proteolítica que envolve autoclivagem. A análise espectrométrica não detectou sequência de protease, porém uma proteína hipotética contendo um domínio BAG pôde ser constatada. Esse domínio é comumente presente em proteínas detentoras de atividade anti-apoptótica, em metazoários, e estimuladoras de MCP, em plantas. A ocorrência de MCP no desenvolvimento do tegumento foi demonstrada por meio do padrão crescente de fragmentação de DNA ao longo do processo. Em conjunto, esses dados comprovam a ocorrência de MCP em estágios precedentes à quiescência e sugerem o envolvimento das atividades enzimáticas, além de uma possível ação regulatória da proteína hipotética detectada. Como processos similares envolvem a ação de metacaspases, a predição estrutural de uma metacaspase do tipo II de soja mostra-se importante para nortear o início de trabalhos futuros de busca por substratos relacionados a MCP endógenos ao tegumento, iniciando uma nova fase de geração de dados mais conclusivos em relação à natureza do evento.

ABSTRACT

Programmed cell death (PCD) is a phenomenon that is characterized as a highly controlled cellular death, essential to the normal development and to effective responses to biotic and abiotic factors. It happens in multicellular organisms taxa, being that an expanding number of reports also indicate that events of this nature happen in unicellular organisms, involving common biochemistry machinery that includes the activation and the action of several cysteine proteases. The almost total involvement of such proteases in plant PCD events suggests that the enzymes perform critical roles in the process. Given that the biochemistry aspects of the seed coat development are poorly understood, the present work had as central aim the investigation of the presence and connection of protease activities in PCD events of such region of *Glycine max* seeds. Protein extracts from quiescent seeds exhibited cysteine proteases activities by zymography and cleavage activities of substrates of PCD related enzymes in *in vitro* tests. The nature of such activities was shown to be distinct, being that probably originated from groups of different proteases. The zymographic experiments indicate the formation of protein complexes or a proteolytic cascade that involves auto cleavage. The spectrometric analysis have not detected protease sequence, however a predicted protein containing a BAG domain could be evidenced. This domain is commonly present in proteins detainer of anti-apoptotic activities (metazoa) and in PCD stimulators (plants). The PCD occurrence during seed coat development was shown by the DNA fragmentation pattern throughout the process. Together, these data assure the PCD occurrence on quiescence precedent stages and suggest the involvement of the enzymatic activities, as well the regulatory action of the detected predicted protein. As similar processes involve the action of metacaspases, the structural prediction of a type II metacaspase from soybean shows to be important to guide future searches of endogenous seed coat substrates related to PCD, introducing a new stage of building more conclusive data related to the nature of the event.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Mecanismo de catálise enzimática das quatro classes de enzimas proteolíticas..... 4
- Figura 2-** Propriedades estruturais de caspases, paracaspases e metacaspases..8
- Figura 3-** Eletroforese SDS-PAGE de tegumentos de *Glycine max*..... 26
- Figura 4-** Eletroforese SDS-PAGE-gelatina de tegumentos de *Glycine max*..... 27
- Figura 5-** Atividade enzimática de extratos de tegumentos de *Glycine max*, *in vitro*, contra substratos de caspases na presença e na ausência de seus inibidores específicos..... 28
- Figura 6-** Atividade enzimática de extratos de tegumentos de *Glycine max*, *in vitro*, contra substrato Ac-LHED-pNa..... 29
- Figura 7-** Eletroforeses SDS-PAGE (A) e SDS-PAGE-gelatina (B) na concentração de 8% realizadas nas dimensões vertical e horizontal do extrato de tegumentos de *Glycine max* 30
- Figura 8-** Diagrama explicativo e eletroforese SDS-PAGE-gelatina para os géis corridos vertical e horizontalmente com o extrato de tegumentos de *Glycine max*..... 31
- Figura 9-** Diagrama das eletroforeses realizadas para acumulação das faixas de atividade de interesse..... 32
- Figura 10-** Eletroforese SDS-PAGE (A) e SDS-PAGE-gelatina (B) para as faixas de géis referentes às atividades enzimáticas que foram removidas a partir de eletroforeses cumulativas..... 33

Figura 11- Análise da fragmentação do DNA através da detecção de oligonucleossomos em tegumentos de sementes de <i>Glycine max</i> durante o desenvolvimento e quiescência.....	36
Figura 12- Alinhamento das sequências primárias referentes à subunidade p20 de caspases e metacaspases.....	38
Figura 13- Alinhamento das sequências primárias referentes à subunidade p10 de caspases e metacaspases.....	39
Figura 14- Modelos estruturais da metacaspase YCA1 de <i>Saccharomyces</i> , da caspase 7 humana, e MCA2 de <i>Trypanossoma brucei</i>	41
Figura 15- Modelo estrutural gerado para a metacaspase 4 de <i>Glycine max</i>	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proteínas utilizadas nas análises de alinhamentos de sequência.....	24
Tabela 2: Quantificação de proteínas dos extratos protéicos de <i>Glyine max</i> obtidos a partir de extração com tampão fosfato de sódio 100mM, 1% de PVPP pH 7,5 por 2 h; e com tampão HEPES-KOH 50mM pH 7,0	25
Tabela 3: Quantificação de proteínas dos precipitados protéicos obtidos a partir da precipitação, com TCA, das proteínas acumuladas por eletroforeses.....	34
Tabela 4: Análise do conteúdo das bandas eletroforéticas por espectrometria de massas.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABTS:** 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
- Ac-DEVD-AMC:** Acetyl Asp-Glu-Val-Asp 7-amido-4-methylcoumarin
- Ac-DEVD-CHO:** Acetyl Asp-Glu-Val-Asp aldehyde
- Ac-DEVD-pNa:** Acetyl Asp-Glu-Val-Asp p-Nitroanilide
- Ac-IETD-CHO:** Acetyl -Ile-Glu-Thr-Asp aldehyde
- Ac-IETD-pNa:** Acetyl -Ile-Glu-Thr-Asp p-Nitroanilide
- Ac-LEHD-pNa:** Acetyl Leu-Glu-His-Asp p-Nitroanilide
- Ac-YVAD-AMC:** Acetyl Tyr-Val-Ala-Asp 7-amido-4-methylcoumarin
- AC-YVAD-CMK:** Acetyl Tyr-Val-Ala-Asp chloromethylketone
- Ac-VEID-pNa:** Acetyl Val-Glu-Ile-Asp p-Nitroanilide
- anti-DNA-POD:** Anti-DNA antibody conjugated with peroxidase
- BI1:** Bax inhibitor-1
- CHAPS:** 3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonium)-1-propanesulfonate
- DNA:** Deoxyribonucleic acid
- DTT:** Dithiothreitol
- EDTA:** Ethylenediamine tetraacetic acid
- ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- HEPES:** 4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazine ethanesulfonic acid
- HPLC:** High-performance liquid chromatography
- MCP:** Morte Celular Programada
- NCBI:** National Center for Biotechnology Information
- PARP:** Poly (ADP-ribose) polymerase
- PDB:** Protein Data Bank
- PVPP:** Polyvinylpolypyrrolidone
- RUBISCO:** Ribulose-Bisfosfato Carboxilase Oxigenase
- SDS-PAGE:** Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
- TATD-CHO:** Thr-Ala-Thr-Val aldehyde
- TCA:** Trichloroethanoic acid
- TUNEL:** Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

1- INTRODUÇÃO

1.1- Morte Celular Programada em Plantas

Morte celular programada (MCP) é um mecanismo fisiológico inato, controlado geneticamente que envolve a morte seletiva de células individuais, tecidos ou órgãos inteiros. Este processo é diferente da necrose, já que esta, por sua vez, ocorre de uma maneira passiva em resposta a perturbações do ambiente (Pennel e Lamb, 1997). Juntamente com a maquinaria de remodelamento da cromatina, com os sistemas de regulação do ciclo celular, com o envelope nuclear e com o citoesqueleto, esse processo é universal entre os eucariotos e permitiu o desenvolvimento de organismos mais complexos (Maynard Smith e Szathmary, 1997).

Evidências indicam que a maquinaria de MCP tenha evoluído desde muito cedo na história evolutiva e que essa evolução processou-se através de eventos de expansão e inovação de domínios de recrutamento e da derivação de domínios efetores de proteínas relacionadas a MCP, bem como de eventos de transferência horizontal de genes (Koonin e Aravind, 2002).

Os modelos de estudo com enfoque em organismos animais são os mais bem conhecidos com relação a MCP e com base na morfologia da célula e na organela envolvida, duas categorias principais deste evento são reconhecidas: apoptose e autofagia (Schweichel e Merkel, 1974; Clarke, 1990; Baehrecke, 2003; Gozuacik e Kimchi, 2004; Lima *et al.*, 2012).

A apoptose é definida por três características morfológicas principais: fragmentação do DNA (ácido desoxidorribonucléico) nuclear, formação de corpos apoptóticos e engolfamento e degradação dos corpos apoptóticos no lisossomo de uma outra célula (Schweichel e Merkel, 1974; Baehrecke, 2003; Lima *et al.*, 2012).

A autofagia é o principal sistema de degradação e reciclagem em células eucarióticas, contribuindo para a degradação de componentes celulares e porções citoplasmáticas. Esse processo pode ocorrer de duas formas: através do sequestro de porções do citoplasma no interior do vacúolo, ou do sequestro de grandes porções do citoplasma, formando uma estrutura denominada autofagossomo (Otto *et al.*, 2003; Yoshimori, 2004, Reape *et al.*, 2008).

Em situações pelas quais um conjunto celular passa por uma condição de estresse mais intenso de modo que as células não sejam aptas a ativar a via de MCP apoptótica, ocorre morte celular por necrose, que é caracterizada por um inchaço do protoplasma devido à perda da habilidade de osmoregulação que resulta na migração de água e ions para o interior das células (Lennon *et al.*, 1991).

Em organismos vegetais, MCP é observada em diversas situações durante todo o ciclo de vida, bem como em respostas a fatores bióticos e abióticos, permitindo plasticidade bioquímica e desenvolvimental, (Dangl *et al.*, 2000), tais como:

- na degeneração de células de tecidos de função transitória, como cotilédones, células do suspensor, certas folhas, pétalas (Drew *et al.*, 2004) e tecidos secretores (Bosabalidis, 1994);
- na eliminação de células excessivamente produzidas, como no caso de algumas flores unissexuadas que produzem inicialmente órgãos sexuais femininos e masculinos e têm de eliminar um dos grupos para tornarem-se funcionais (Caporali *et al.*, 2003);
- no remodelamento corporal que ocorre, por exemplo, durante a formação de tecidos condutores (Liljeroth e Bryngelsson, 2001; Obara *et alii*, 2001) e no estabelecimento da morfologia de determinadas folhas (Kaplan *et al.*, 1982);
- em respostas a patógenos (Heath, 2000; Del Pozo e Lam 1998; Hatsugai *et al.*, 2004; Wakabayashi e Karbowski, 2001);
- em respostas a fatores abióticos, como exposição excessiva à luz ultravioleta (He *et al.*, 2008).

Em sementes em desenvolvimento ocorre morte celular, mas não se conhece plenamente como as células morrem, apesar de se saber que não é por autofagia, já que a célula morta permanece inteira até a germinação e seus conteúdos são então mobilizados. Nenhuma evidência de permeabilização do tonoplasto foi encontrada para células do endosperma em cereais, mas, se isso ocorre, o conteúdo vacuolar é aparentemente incapaz de realizar degradação de macromoléculas em larga escala (Van Doorn e Woltering, 2005).

Um outro tipo de MCP presente em sistemas vegetais ocorre durante a senescência, onde os cloroplastos são degradados inicialmente, seguindo-se a uma ruptura de vacúolos e do núcleo (Thomas *et al.*, 2003).

Durante a germinação de sementes de cevada, em especial após o segundo dia, foram detectados núcleos apoptóticos através do método TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) na camada de aleurona da região próxima ao embrião; também houve a detecção de fragmentação de DNA para este tecido três dias após a germinação (Wang *et al.*, 1996). A fragmentação de DNA também foi detectada em cultura de células de cenoura sob condições de choque térmico a 55°C e 85°C (sendo os fragmentos de DNA de menor peso molecular, no último) e sob tratamento com peróxido de hidrogênio (Maccabe *et al.*, 1997).

O processo de MCP que ocorre durante as respostas defensivas contra patógenos, não aparenta possuir características típicas de autofagia (van Door e Woltering, 2005). Na resposta da epiderme de *Vigna unguiculata* contra o fungo *Uromyces vignae*, ocorre o desmantelamento do protoplasma, a clivagem de DNA nuclear (observada pela técnica de TUNEL), seguidos pelo encolhimento do protoplasma de uma maneira sugestiva, diferente daquela que ocorre com a perda de turgor (Heath, 2000).

Esse tipo de morte celular, encontrado também em processos desenvolvimentais, tem sido denominado apoptose-símile, já que o núcleo é degradado primeiro, a cromatina se condensa e o DNA sofre fragmentação (Fukuda, 2000). Mas apesar dessas similaridades com o processo apoptótico, nesses casos não há evidências que sugiram a formação de corpos apoptóticos, o que dificulta a inserção dos casos estudados nessa categoria de MCP (van Doorn e Woltering, 2005).

Também foi proposto que alguns eventos de morte celular necrose-símiles não sejam meramente eventos não controlados pelo organismo em questão, mas sim eventos programados (Proskuryakov *et al.*, 2003; Goldstein e Kroemer, 2007). Dessa forma, não pode ser excluída a possibilidade de ocorrência desse tipo de mecanismo em sistemas celulares vegetais, apesar do requerimento de investigações futuras em relação a este conceito (Reape *et al.*, 2008).

Como a ultraestrutura celular durante MCP em plantas carece de mais detalhes, a categorização desses eventos ainda é difícil de ser estabelecida.

1.2- Proteases e sua Conexão com Morte Celular Programada

Proteases são bem conhecidas quanto à sua função de degradação de proteínas em unidades de aminoácidos. Além dessa função, elas determinam o destino de outras proteínas, sendo, assim, reguladores chave em diferentes processos de respostas a fatores ambientais e sinais desenvolvimentais (Van der Hoorn, 2008).

A clivagem de ligações peptídicas por proteases pode ser interna, para endopeptidases, na porção N-terminal, para aminopeptidases, ou C-terminal, para carboxipeptidases. Todas as proteases polarizam o grupo carbonil da ligação peptídica do substrato pela estabilização do oxigênio em um buraco oxianiónico, o que faz com que o átomo de carbono se torne mais vulnerável para o ataque de um nucleófilo ativado. O nucleófilo é determinante para o mecanismo utilizado na catálise enzimática, que pode ocorrer de quatro formas, de maneira a agrupar as proteases em quatro principais classes catalíticas: proteases cisteínicas, metaloproteases, proteases serínicas e proteases aspárticas (Dunn, 2001) (Figura 1).

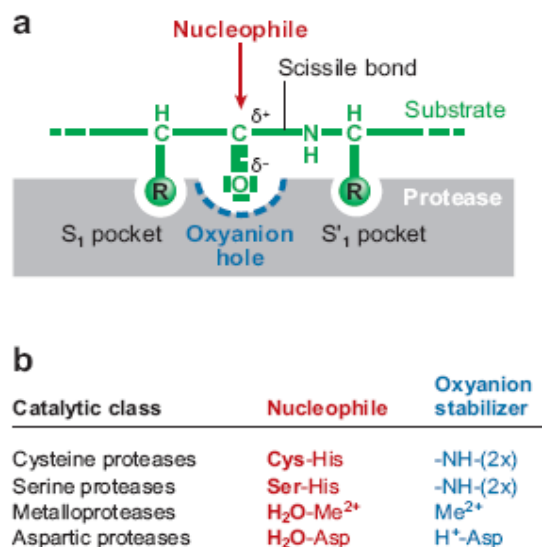


Figura 1- Mecanismo de catálise enzimática das quatro classes de enzimas proteolíticas. Retirado de van der Hoorn (2008).

Genomas de espécies vegetais codificam aproximadamente 140 proteases cisteínicas, pertencentes a 15 famílias e 5 clãs (Rawlings *et al.*, 2006). Muitas dessas proteases desempenham papéis em MCP, em resposta tanto a fatores ambientais como a patógenos. Outras regulam o destino das células epidérmicas, período de

florescência, arquitetura da inflorescência e desenvolvimento e germinação do pólen e do embrião (Van der Hoorn, 2008).

Neste contexto, três subfamílias de proteases cisteínicas têm sido relacionadas a essas funções: a subfamília C1A, compreendida por proteinases cisteínicas papaína-símile; a subfamília C13, compreendida pelas legumaínas, e a subfamília C14, que engloba as caspases (metazoários) e as metacaspases (plantas) (Trobacher *et al.*, 2006).

Em relação à subfamília C1A, foram detectadas a expressão da protease Tr-cp 14 na diferenciação de elementos traqueais de *Trifolium repens* (Asp *et al.*, 2004); da protease O141 durante a degeneração do integumento interno que ocorre no desenvolvimento da semente de *Phalaenopsis sp.* (Nadeau *et al.*, 1996), e da protease BnCysP1 durante o desenvolvimento da semente de *Brassica napus* (Wan *et al.*, 2002).

Proteases da família das legumaínas têm sido relacionadas à senescência floral, como visto para a proteína DAFSAG3 de *Narcissus pseudonarcissus* (Hunter *et al.*, 2002), à resposta hipersensível induzida pelo vírus do mosaico do tabaco em *Nicotiana tabacum*, no caso de VPEs (Hatsugai *et al.*, 2004), e em folhas senescentes de *Zea mays* (Smart *et al.*, 1995).

Em relatos mais recentes, proteínas da família C14 têm sido relacionadas tanto a processos desenvolvimentais, quanto a processos responsivos. Suarez *et alii*, em 2004, e Bozhkov *et alii*, em 2005, detectaram a presença de mclI-Pa em núcleos TUNEL-positivos de células degenerantes do suspensor de *Picea abies*. Hoeberichts *et alii* em 2003 constataram a expressão aumentada de transcritos de LeMCA1 de *Lycopersicon esculentum* em resposta à infecção por *Botrytis cinerea*.

Atividades enzimáticas de proteases cisteínicas originadas de diversos tecidos vegetais frequentemente têm sido relacionadas a MCP através do emprego de substratos tetrapeptídicos desenhados a partir da sequência de aminoácidos que representam o sítio preferencial de clivagem consenso de membros da família das caspases de mamíferos (Bonneau *et al.*, 2007). As caspases constituem uma família de proteases cisteínicas que estão ligadas a MCP, contribuindo para a exibição do fenótipo típico de células apoptóticas.

As caspases são sintetizadas como zimógenos e são divididas em dois tipos quanto à sua estrutura geral e ao seu modo de ativação: caspases executoras, que são ativadas pela separação proteolítica de suas subunidades maiores (p20) e

menores (p10), e pelo rearranjo destes segmentos em estruturas heterotetraméricas (p20)₂(p10)₂; e caspases iniciadoras, que têm uma extensão N-terminal, o prodomínio, necessário para recrutá-las em complexos protéicos que funcionam como plataformas de ativação, chamados apoptossomos (Vercammen *et al.*, 2007) (Figura 2).

A ativação de caspases iniciadoras não requer clivagem proteolítica, mas mudanças conformacionais após oligomerização. Uma vez ativas, estas podem disparar uma cascata proteolítica, através da ativação de caspases efetoras que, por sua vez, clivam inúmeros substratos, gerando as características morfológicas típicas da apoptose (Vercammen *et al.*, 2007).

Apesar de não serem específicos para caspases, os substratos tetrapeptídicos empregados têm facilidade de encaixe no sítio ativo dessas enzimas e em outras proteases (Stennicke e Salvesen, 2000). Estudos com inibidores sintéticos de caspases, que bloqueiam atividades de proteínas caspase-símile, também têm sido realizados e apontam para a correlação entre essas atividades e a indução do processo de MCP (Bonneau *et al.*, 2007). Esse conjunto de atividades de clivagem e a inibição dessas atividades têm sido utilizados para a predição de atividades caspase-símiles em diversos organismos.

No trabalho de Del Pozo e Lam (1998), a aplicação de dois inibidores que mimetizam a sequência peptídica preferencial de clivagem de caspases em seus substratos (Ac-YVAD-CMK e Ac-DEVD-CHO) reduziu o número de lesões foliares durante a resposta em folhas de plantas jovens de tabaco infectadas por vírus do mosaico do tabaco, no sítio de infecção. Atividades caspase-símile contra os substratos Ac-YVAD-AMC e Ac-DEVD-AMC foram detectadas *in vitro* a partir dos tecidos estudados, sendo que estas foram abolidas com o uso dos inibidores específicos. Esses dados foram os pioneiros na descrição de atividades caspase-símile em um sistema vegetal. Desde então, muitas dessas atividades vêm sendo relatadas em múltiplos tempos para várias espécies e em diversos tecidos ou tipos celulares (Bonneau *et al.*, 2007).

Em um estudo da resposta de folhas de tabaco contra a proteína VirD2 de *Agrobacterium tumefaciens* foi constatada uma atividade de protease capaz de clivar VirD2 no mesmo sítio clivado pela caspase 3 humana. Essa atividade não pôde ser inibida por DEVD-CHO, mas sim pela sequência TATD-CHO, que também é específica para caspase 3, demonstrando maior especificidade de substrato da

protease da planta em relação à caspase controle. A inibição *in vivo* dessa atividade por TATD-CHO, também apresentou efeito significativo na redução do número de lesões nas folhas (Chichkova *et al.*, 2004).

Lombardi *et alii* (2007), em estudo com *Sechium edule*, constataram que o nucelo, um tecido da semente de origem materna, apresentou marcadores apoptóticos de MCP por detecção, em gel, de fragmentação do DNA nuclear e marcação da degeneração de núcleos celulares por TUNEL (“terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labelling”). Tais fenômenos foram associados com a presença de proteases com atividade contra Ac-YVAD-pNa, Ac-DEVD-pNa e Ac-VEID-pNa, as quais foram propostas como sendo de origem vacuolar, liberadas a partir do colapso do vacúolo.

Em contrapartida, um estudo utilizando um sistema livre de células baseado em extratos citosólicos de ovos de *Xenopus*, em presença de mitocôndrias obtidas a partir de células embrionárias de cevada, mostrou que estas são capazes de iniciar a ativação de proteases caspase-3 símile. Também foi visto, através de um ensaio de micro-injeção em células internodais de *Chara*, que a localização destas atividades *in vivo* era citosólica (Korthout *et al.*, 2000).

Acredita-se que essas proteases caspase-símile não sejam aparentadas com caspases (Van der Hoorn e Jones, 2004). Mas, de forma geral, a constatação do envolvimento de atividades desse tipo em muitas respostas de morte celular programada e dos efeitos da inibição destas, sugerem que elas façam parte de um mecanismo real de morte celular programada em plantas (Bonneau *et al.*, 2007).

No fim de 2000, análises estruturais e sequenciais utilizando dados genômicos revelaram uma grande diversidade de genes de proteases aparentadas com caspases em plantas, fungos e protozoários, que foram designadas como metacaspases (Uren *et al.*, 2000). Estas foram encaradas como candidatas a desempenhar um papel central em MCP, nestes organismos (Aravind e Koonin, 2002).

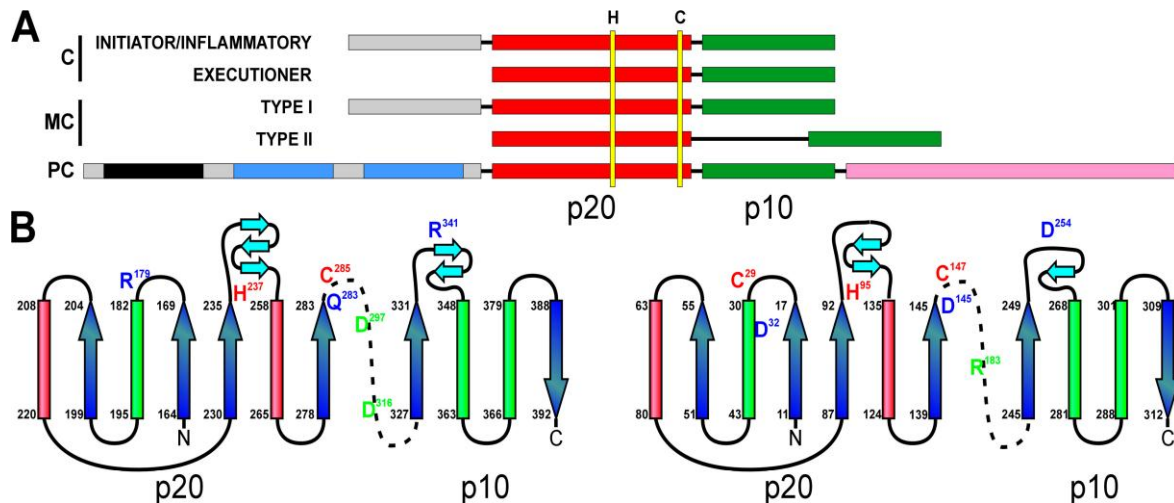


Figura 2- Propriedades estruturais de caspases, paracaspases e metacaspases. A- Representação esquemática dos domínios de caspases (C), metacaspases (MC) e paracaspases (PC). A posição dos resíduos catalíticos de histidina (H) e cisteína (C) estão em destaque. B- Diagrama topológico da estrutura da caspase 8 humana e da metacaspase 9 de *Arabidopsis thaliana*, com alguns resíduos de aminoácidos importantes em destaque. Retidado de Vercammen *et alii* (2007).

Observações iniciais usando extratos celulares sugeriram que metacaspases poderiam corresponder às atividades caspase-símiles em plantas (Suarez *et al.*, 2004). Entretanto, quatro casos mostram que metacaspases de plantas são incapazes de clivar substratos de caspases (Vercammen *et al.*, 2004; Bozkov *et al.*, 2005; Watanabe & Lam, 2005; He *et al.*, 2008).

Apesar de as metacaspases não possuírem atividades caspase-símiles, muitos trabalhos sugerem que elas tenham um papel em MCP (Bonneau *et al.*, 2007). A inibição de uma metacaspase do tipo II suprime MCP em células do sensor de uma cultura embriogênica de *Picea abies* (Suarez *et al.*, 2004). Durante a embriogênese de *Picea abies* L. (Pinaceae), averiguou-se que uma protease cisteínica metacaspase II (MclIPa) é translocada do citosol para o núcleo, onde sua presença se correlacionou com detecção de fragmentação de DNA. Em experimentos com um sistema livre de células em presença de uma variante da proteína mutante para seu sítio ativo, não foram constatadas alterações nucleares (Bozkov *et al.*, 2005).

Esses dados indicam que MclIPa está diretamente envolvida em uma via que gera a degradação nuclear, que é um evento presente na maioria dos programas de morte celular eucarióticos. Nessa via, a protease pode ter o papel de clivagem de proteínas estruturais do núcleo, similar ao que ocorre para as caspases efetoras de metazoários (Bozkov *et al.*, 2005).

Não pode ser excluído, portanto, que as metacaspases possam não estar envolvidas diretamente na regulação de MCP, mas sim, direta ou indiretamente em cascatas de sinalização que levam à morte da célula (Bonneau *et al.*, 2007).

Atualmente está bem estabelecido o fato de que, apesar do compartilhamento de uma topologia estrutural relacionada, caspases e metacaspases exibem uma diferença marcante com relação à especificidade de clivagem de seus substratos, onde as primeiras realizam clivagens em seus substratos após resíduos de aspartato e as segundas clivam após resíduos de asparagina ou lisina (Tsiatsiani *et al.*, 2011).

Assim, o papel funcional das metacaspases ainda permanece em debate, bem como sua classificação, já que existem evidências favoráveis e outras contrárias a seu agrupamento em conjunto com caspases (Carmona-Gutierrez *et al.*, 2010; Enoksson e Salvesen, 2010).

Um mecanismo de cascata comparável ao de cascatas de caspases em sistemas vegetais foi proposto por Dangl *et alii* (2000) em relação a proteases cisteínicas de folhas em senescência e de sementes em maturação. Bozkov *et alii* (2005) reforçam a idéia de que a execução de MCP em plantas é controlada por dois grupos de enzimas com localização celular separada. Um deles é acumulado em compartimentos líticos e vacúolos e o outro tem localização citoplasmática-nuclear, como no caso da metacaspase MCII-Pa.

Recentemente, especialmente a partir de trabalhos com *Arabidopsis thaliana*, proteases subtilisina-símile foram sugeridas como uma alternativa às caspases animais. Dentre elas estão proteases serínicas coletivamente denominadas de saspases e fitaspases que clivam um espectro de substratos de caspases a partir de resíduos de aspartato. Dados sugerem que saspases degradam proteoliticamente a RUBISCO (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase) durante MCP biótica e abiótica, enquanto a superexpressão e o silenciamento de genes que codificam para fitaspases alteram o fenótipo relacionado a MCP em condições de estresses bióticos e abióticos (Vartapetian *et al.*, 2011).

Essas proteases vegetais, diferentemente das caspases, parecem ser constitutivamente processadas e secretadas de células saudáveis para o espaço extracelular. Em resposta a um estímulo indutor de morte celular, elas se realocizam no interior celular onde ocorre uma ativação auto-catalítica (Vartapetian *et al.*, 2011).

Esse mecanismo proposto constitui uma forma de controle de atividade enzimática que é distinta do que é visto para metazoários; além disso, a ativação de

proteases subtilisina-símile provavelmente é apenas um passo da cascata proteolítica total que controla MCP nesses sistemas vegetais.

Em adição, plantas transgênicas de tabaco contendo genes anti-apoptóticos selecionados de genoma animal, exportaram as respectivas proteínas para os cloroplastos e mitocôndria (Chen e Dickman, 2004). O tratamento dessas plantas com herbicidas direcionados ao cloroplasto não resultou em morte ou em fenótipos apoptótico-símile nas plantas transgênicas. Já as plantas de fenótipo selvagem morreram e exibiram características associadas com apoptose (Chen and Dickman, 2004).

Sun *et alii* (1999) já haviam demonstrado que ocorre a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol durante morte celular induzida por menadiona em protoplasto de tabaco. A adição de inibidores específicos de caspases ao sistema inibiu atividade de clivagem de PARP (poli-ADP ribose-polimerase), que é um substrato da caspase 3, mas não obteve efeito na liberação do citocromo c. Também foi observado que o extrato de protoplasma de tabaco em presença de mitocôndria de tabaco foi capaz de induzir a degradação de PARP e apoptose do núcleo de células de fígado de camundongo.

Na última década também foi demonstrada a presença de genes homólogos a genes supressores de MCP (*bcl-2* e a *Bcl-XL* de humanos e a *ced-9* de *Caenorhabditis elegans*) no genoma de *Arabidopsis*. Matsumura *et alii* (2003), também utilizando *Arabidopsis* como modelo de estudo, constataram que um gene homólogo ao gene que codifica para o inibidor de *Bax* (BI-1) em mamíferos foi capaz de inibir a ação pró-MCP de *Bax* expresso em plantas transgênicas.

Esses dados sugerem que um mecanismo de morte celular pode ser conservado em plantas e animais, e que os reguladores mostram pouca especificidade entre as espécies.

A constatação de diversas atividades caspase-símile em diferentes tecidos de espécies vegetais, o requerimento de determinadas metacaspases em MCP e seu provável envolvimento em cascatas de sinalização que geram a morte celular, bem como o indício de que existem passos conservados na via que gera MCP em plantas e apoptose em animais, apontam para dois caminhos: a convergência ou a divergência evolutiva de passos básicos das vias de MCP em plantas e animais.

1.3- Sementes e o Processo de Morte Celular Programada

As sementes desempenham papéis fundamentais para muitas civilizações, assim como para muitas espécies de organismos vivos em nosso planeta. Apesar de terem sido objeto de diversos estudos por muitos anos, estão sendo, na atualidade, mais profundamente investigadas em relação a mecanismos de controle do desenvolvimento e da germinação e aspectos genético-moleculares. O tegumento da semente apresenta um papel central no ciclo de vida de muitas plantas, controlando o desenvolvimento embrionário, bem como a dormência e germinação das sementes. Além disso, sintetiza uma grande variedade de componentes, o que lhe confere um dinamismo fisiológico e metabólico (Moïse *et al.*, 2005). Dessa forma, o tegumento não é apenas um envoltório protetor ou promotor de dispersão.

Sementes em desenvolvimento importam aminoácidos e sacarose do floema. Esses assimilatos são carregados pelo tegumento e absorvidos pelo embrião e endosperma. O transporte apoplástico em sementes pode influenciar o particionamento de assimilatos fotossintéticos e a síntese de produtos de reserva. Os vários transportadores de membranas situados no tegumento e nas células epidérmicas do embrião podem fornecer, portanto, pontos regulatórios óbvios desse processo (Wobus e Weber, 1999). Existe um crescente número de evidências que sugerem a existência de comunicação externa entre o tecido materno e a semente em desenvolvimento. Nesse caso o tegumento desempenha um papel principal no fornecimento de um fluxo adequado de sinais (Wan *et al.*, 2002).

Em algumas espécies cultivadas, o tegumento possui implicações econômicas. *Brassica napus* e *Brassica rapa* têm seu teor nutritivo reduzido pela persistência prolongada do tegumento, que ainda possui efeito anti-nutritivo por possuir compostos fenólicos em sua composição química. Apesar da biologia molecular do desenvolvimento do embrião e acumulação de reservas, bem como da maturação, ser relativamente bem conhecida, o desenvolvimento do tegumento tem recebido pouca atenção (Wan *et al.*, 2002).

Quanto à sua origem, o tegumento deriva-se dos integumentos internos e externos do óvulo. Estudos com *Arabidopsis thaliana* permitiram o conhecimento do integumento externo em detalhes (Western *et al.*, 2000; Windsor *et al.*, 2000). Contudo o integumento interno tem sido pouco investigado. Em seu desenvolvimento, o tegumento sofre uma fase expansiva precedida por uma fase

reduzida, quanto ao seu número de camadas celulares. Tecidos presentes nos estágios iniciais do desenvolvimento desaparecem; o integumento interno, por exemplo, tem suas camadas celulares comprimidas e acumula pigmentos (Beeckman *et al.*, 2000; Wan *et al.*, 2002).

Em *Pisum sativum*, entre 10 e 15 dias após a ântese (abertura da flor) ocorre um aumento no número de camadas celulares do tegumento, além de eventos de diferenciação celular. A protoderme e a hipoderme originam, respectivamente, as camadas de macrosclereídeos e osteosclereídeos, e as demais células formam um tecido parenquimático que sofre deterioração de suas camadas celulares mais internas à medida que os cotilédones e o embrião se expandem (Van Dongen *et al.*, 2003).

O desenvolvimento da semente é dividido em três fases. A síntese de proteínas de reserva no cotilédone ocorre na fase intermediária e estas são catabolisadas por proteases durante a germinação (Beers *et al.*, 2000). Em *Brassica napus*, BnCysP1, uma protease cisteínica, é sintetizada apenas durante a fase do desenvolvimento que precede a síntese de proteínas de reserva e parece ser exclusiva do integumento interno do tegumento. Isto sugere que a produção dessa protease é temporalmente e espacialmente controlada pela planta de modo a limitá-la à fase degenerativa do desenvolvimento do integumento interno (Wan *et al.*, 2002). Essa protease pode, portanto, estar relacionada com possíveis eventos de MCP que ocorrem durante o desenvolvimento deste tecido. Esse é um dos poucos eventos em que a expressão de um gene foi demonstrada como específica do tegumento, na fase do desenvolvimento pós-fertilização.

1.4- Justificativa

O processo de morte celular programada tem sido alvo de muitos estudos em modelos experimentais classicamente estabelecidos, em particular metazoários superiores. Apesar dos numerosos progressos relativos à sua compreensão, ainda são necessárias novas abordagens para se adquirir uma visão completa dos diferentes modos com que esses fenômenos ocorrem, assim como suas particularidades em relação ao processo evolutivo dos diferentes grupos de seres vivos. Mesmo com o aumento do número de trabalhos com enfoque no processo de MCP em plantas, o volume de dados gerados ainda é insuficiente para permitir a construção de um panorama mais completo acerca desses processos. Nosso grupo

de pesquisa tem investigado a presença de proteases em tegumentos de sementes de leguminosas, tendo em vista a importância fisiológica deste tecido protetor da semente. Lima, em 2001, detectou atividades de proteases cisteínicas *in vitro* a partir de extratos protéicos do tegumento de sementes de *Vigna unguiculata* no estágio quiescente. Nesse trabalho, foi proposta a participação dessas atividades em eventos de MCP. Rocha (2011) detectou atividades de proteases através de zimografias dos extratos protéicos de tegumentos de sementes quiescentes de *Albizia sp.*, *Cicer arietinum* e *Lens culinaris* incubados em condições favoráveis para atividades de proteases cisteínicas, além de atividades *in vitro* contra substratos de caspases para as referidas amostras. Demonstrou ainda a presença de uma estrutura semelhante a protoplasma em processo de encolhimento na epiderme paliçádica de tegumentos de *Albizia sp.* Adicionalmente, Lima, em 2010, detectou atividades proteolíticas *in vitro* contra substratos de caspases em tegumentos de *V. unguiculata* em diferentes dias após ântese. Esses dados são reforçados pelo trabalho de Wan *et al.* (2002), no qual uma protease cisteínica foi detectada em estágios de desenvolvimento do integumento interno da semente de *Brassica napus*, anteriores à síntese de proteínas de reserva, onde também ocorreu uma intensa redução do número de camadas de células com simultânea detecção de núcleos marcados por TUNEL. Para uma melhor compreensão da natureza dessas atividades de proteases e do evento de MCP em tegumentos de sementes, pretendemos investigar a ocorrência das mesmas em tegumentos de sementes quiescentes de soja (*Glycine max*), bem como sua caracterização estrutural, de modo a permitir a inferência de seus aspectos funcionais. Esse tipo de abordagem tornou-se viável com o advento de estudos genômicos dessa espécie. No genoma completo de soja foram preditos 46.430 genes codificadores para proteínas, 70% a mais que *Arabidopsis thaliana*, sendo que 75% desses genes estão presentes em múltiplas cópias e 12,2% são prováveis fatores de transcrição (Schmutz *et al.*, 2010). Com a sequência genômica disponível, são possíveis análises comparativas através de uma base de bancos de dados.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Verificar a relação de proteases com eventuais processos de morte celular programada relacionados ao desenvolvimento e maturação do tegumento de sementes de *Glycine max*, caracterizando-as estruturalmente e quanto à sua capacidade de clivagem de substratos específicos de caspases.

2.1- Objetivos Específicos:

- Detectar atividades proteolíticas em condições favoráveis à ação preferencial de proteases cisteínicas em tegumentos de sementes de *Glycine max*.
- Caracterizá-las quanto à capacidade de clivar substratos de caspases (Ac-DEVD-pNa, Ac-LHED-pNa e Ac-VEID-pNa).
- Correlacionar eventos morfológicos típicos de processos de morte celular programada com as atividades proteolíticas detectadas, durante diferentes estágios de desenvolvimento dos tegumentos de sementes de *Glycine max*.
- Purificar as proteases responsáveis pelas atividades detectadas para *Glycine max*.
- Caracterizar as proteases relacionadas ao evento a nível estrutural, por estudos de modelagem molecular.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Material Vegetal

No presente trabalho foram utilizados dois grupos de sementes de *Glycine max*: sementes no estágio quiescente obtidas comercialmente, que foram empregadas nos experimentos de caracterização de atividade enzimática; e sementes do cultivar (TMG 801 UFV) adquiridas junto ao Laboratório de Fitotecnia (LFIT) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), sendo estas, utilizadas para a obtenção de tegumentos de sementes em desenvolvimento para os ensaios de caracterização quanto à formação de fragmentos oligonucleossomais.

3.2- Extração Protéica

As farinhas obtidas a partir da maceração dos tegumentos das sementes quiescentes de *G. max* receberam tratamento com metanol 80% para a remoção de pigmentos. Após essa fase, foi realizado o procedimento de extração protéica com tampão fosfato de sódio monobásico pH 7,5, 100 mM, 1% PVPP a 4°C sob constante agitação, por 2 h. A extração foi processada respeitando uma razão massa/volume de 1:10 (g/mL).

A esses procedimentos se seguiu uma centrifugação a 10.000g, na temperatura de 4°C, por 20 min, para separação do sobrenadante e de um precipitado, dos quais o nosso interesse estava voltado ao sobrenadante, que representa a fração protéica solubilizada pelas condições de extração empregadas. O sobrenadante foi dialisado exaustivamente (48h, com três trocas do meio de diálise contra água), liofilizado e empregado nos experimentos de eletroforese.

Para os ensaios de atividade e de inibição *in vitro* contra substratos de caspases (descritos adiante) foi empregada a metodologia de extração protéica descrita por Lombardi *et alii* (2007), com a utilização de tampão de extração de proteínas HEPES-KOH 50mM pH 7,0, Sacarose 10% (massa/volume), CHAPS 0,1% (massa/volume), DTT 5mM, EDTA 1mM por um período de 2 h sob constante agitação. Cada 100 mg de amostra foi ressuspensa em 0,8 volumes do tampão. Os

sobrenadantes foram então separados dos precipitados (descartados) por centrifugação por 10 min a 20.800xg a 4°C.

3.3- Precipitação de Proteínas com Sulfato de Amônia

Os volumes dos extratos obtidos foram mensurados para o cálculo da quantidade de sulfato de amônia a ser utilizada em uma precipitação de índice de 0 a 90%, segundo Green & Hughes (1955). Pequenas quantidades de sulfato de amônia foram adicionadas em intervalos regulares, de aproximadamente 2 min, aos recipientes contendo os sobrenadantes das extrações das amostras, sob constante agitação. Depois da adição da quantidade total do sal, as amostras ficaram em repouso por 16 h para posterior centrifugação a 20.800g por 10 min à temperatura de 4°C e passaram por liofilização e diálise contra água.

3.4- Quantificação de Proteínas

O teor protéico dos extratos protéicos derivados das amostras foi mensurado através de ensaios seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976). Foi construída uma curva padrão a partir de dez tubos contendo concentrações crescentes de albumina bovina. Também foram adicionados 1 mL de solução Bradford em cada um dos tubos. Após 10 min, os tubos tiveram suas absorvâncias medidas em espectrofotômetro. Cada amostra (1mg/300µL) foi adicionada em tubos nas quantidades de 5, 10 e 15µL, nos quais também foram adicionados volumes de tampão Tris 0,1M pH 7,0 suficientes para levar o volume para 20µL, bem como 1mL de solução Bradford. A absorvância de cada um dos tubos foi medida (595nm) após 10 min e, a partir desses dados e foi calculado a concentração de proteínas por mg de pó de amostra.

3.5- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS (SDS-PAGE)

O protocolo de eletroforese SDS-PAGE seguiu a metodologia descrita por Laemmli (1970). Foram utilizados 10µg de proteína para cada poço, em gel a 15%. As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris/HCl 0,5M pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS e 1% de Bromofenol blue) receberam quatro tratamentos de

fervura: 2, 5, 10 e 15 min. Os marcadores moleculares utilizados foram: miosina (200 KDa), galactosidase (116 KDa), fosfolipase b (97 KDa), albumina bovina (66 KDa), albumina de ovo de galinha (45 KDa), anidrase carbônica (29 KDa), triosefosfato isomerase (26,6 KDa), mioglobina (17 KDa), α -lactalbumina (14,2 KDa), aprotinina (6,5 KDa), cadeia B da insulina oxidada (3,496 KDa) e bradicinina (1,06 KDa). Os géis foram ora revelados por solução de nitrato de prata ora corados por Coomassie Brilliant Blue R. Nesses géis se utilizaram os seguintes marcadores de peso molecular: miosina (200 KDa), galactosidase (116 KDa), fosfolipase b (97 KDa), albumina bovina (66 KDa), albumina de ovo de galinha (45 KDa), anidrase carbônica (29 KDa), inibidor de tripsina (21,5 KDa), lisozima (14,5 KDa) e aprotinina (6,5 KDa).

3.6- Coloração por Coomassie Brilliant Blue

Os géis foram corados com uma solução contendo Coomassie Brilliant Blue R, tendo sido posteriormente descorados com uma solução contendo metanol 35%, ácido acético 10% e água.

3.7- Revelação por Nitrato de Prata

A revelação por prata seguiu a metodologia de Dunn *et alii* (1994). Nesse processo os géis foram fixados em uma solução contendo metanol 50%, ácido acético 12%, formol 37% por 1 h. Após isso foram lavados com solução de etanol 50%, etanol 30% e água destilada. Aos géis foi então adicionada a solução de nitrato de prata (200mg/100mL) com mais 75 μ L de formol, seguidas por duas lavagens com água destilada. Em seguida, foi adicionada uma solução de carbonato de sódio (6g/100mL), formol (50 μ L) e 400 μ L de tiosulfato de sódio (1mg/mL) por aproximadamente 10 min, até o aparecimento das bandas protéicas. A solução fixadora foi reutilizada para parar a reação da solução com as bandas dos géis, e a isso se seguiram mais lavagens com água destilada. Os géis foram então armazenados com uma solução de glicerol 2%.

3.8- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, em Presença de SDS e Gelatina (SDS-PAGE-Gelatina)

Os géis SDS-PAGE gelatina tiveram a concentração de 0,1% de gelatina, acrescentada aos demais componentes do gel. A quantidade de proteína por poço foi de 10µg em géis a 15%. As amostras receberam quatro tratamentos de fervura: 2, 5, 10 e 15 min, como anteriormente mencionado, e os marcadores moleculares utilizados foram: miosina (200 KDa), galactosidase (116 KDa), fosfolipase b (97 KDa), albumina bovina (66 KDa), albumina de ovo de galinha (45 KDa), anidrase carbônica (29 KDa), inibidor de tripsina (21,5 KDa), lisozima (14,5 KDa) e aprotinina (6,5 KDa). Após a corrida os géis foram incubados em tampão citrato fosfato (citrato de sódio 100 mM, triton X-100 0,1%, DTT 1,5 mM pH 5,6) em banho maria a 37°C, durante 16 h, o que proporcionou condições favoráveis para a ocorrência de atividades de proteases cisteínicas. Em seguida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R e então descorado com uma solução descorante contendo metanol 35%, ácido acético 10% e água.

3.9- Ensaio de Atividade Enzimática utilizando os Substratos DEVD-pNa (Caspases 3 e 7), LHED-pNa (Caspase 9) e VEID-pNa (Caspase 6), na Presença e Ausência de seus Respetivos Inibidores

A atividade proteolítica contra substratos de caspases foi medida por uma mistura de reação em placas de ensaio tendo como base a metodologia descrita por Lombardi *et alii* (2007). Os poços contiveram um volume final de 150µL e quantidades de amostras suficientes para prover 25µg de proteínas que foram previamente dissolvidas em 100µL de tampão acetato 50mM pH 5,6 ou 7,4 contendo DTT 50mM, aos quais foram adicionados os substratos Ac-DEVD-pNa, Ac-VEID-pNa e Ac-LHED-pNa (concentração final nos poços 74,6mM) previamente dissolvidos em dimetilsulfóxido e tampão acetato 50mM pH 5,6 ou 7,4. Os substratos foram adicionados somente após o conteúdo de amostras mais tampão acetato ter passado por um processo de centrifugação a 5.000g por 3 min para remoção de eventuais materiais de difícil dissolução comuns aos conteúdos dos extratos, de modo a reduzir-se a interferência desses materiais à leitura do ensaio. O tempo de incubação foi de 5 h em banho-maria a 37°C seguida por leitura da absorbância da

placa em leitor a 405nm. Os brancos dos ensaios foram estabelecidos com poços contendo apenas cada substrato e tampão acetato, recebendo a mesma condição de centrifugação descrita acima.

Os ensaios de inibição foram realizados na presença dos inibidores Ac-DEVD-CHO e Ac-VEID-CHO cuja concentração final nos poços foi de 298,6mM juntamente com as amostras e substratos, sob as mesmas condições descritas acima. Os inibidores foram adicionados 20 min antes da incubação com os substratos. Um poço referente ao branco dos inibidores dos ensaios foi estabelecido contendo respectivamente inibidor (298,6mM), seu substrato específico (74,6mM) e tampão suficiente para completar o volume de 150 µL.

3.10- Estudos Estruturais Eletroforéticos (reeletoforeses) das Atividades Enzimáticas Encontradas

Foram corridos géis SDS-PAGE na concentração de 8% aplicando-se 30µg de proteínas de tegumento de *Glycine max* (ressuspendido em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0) por poço. Os marcadores moleculares e as condições das corridas foram os mesmos dos ensaios eletroforéticos descritos anteriormente. Ao final do processo, os poços contendo as amostras foram removidos e resubmetidos a novas corridas eletroforéticas SDS-PAGE e SDS-PAGE-gelatina na mesma concentração de 8%. Os géis SDS-PAGE-gelatina foram lavados com Triton X-100 por duas vezes de 30 min cada e incubados com tampão citrato-fosfato 100mM pH 5,6 a 37°C por 16h. Em seguida, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R e então descorados por uma solução descorante contendo metanol 35%, ácido acético 10% e água. Também foram realizadas eletroforeses (com gel na concentração de 10%) cujos poços referentes ao extrato de *G.max* foram removidos e divididos em fragmentos tamanhos similares. Cada um destes foram então aplicados em poços individuais de um novo gel 10% na presença de gelatina, recebendo, ao final da corrida, o mesmo tratamento descrito neste item.

3.11- Concentração das Enzimas com Atividades de Interesse

Foi utilizada uma combinação das técnicas eletroforese SDS-PAGE, SDS-PAGE-gelatina e sonicação para a identificação, remoção e acumulação de faixas de

géis referentes às atividades enzimáticas de interesse. Inicialmente, foram aplicadas 900µg de proteínas em géis SDS-PAGE-gelatina. Após a corrida eletroforética, as faixas referentes às atividades foram excisadas utilizando, como referência, poços controle do mesmo gel que foram previamente coletados e corados com Coomassie brilliant blue R. As canaletas foram acumuladas e passaram por um processo de sonicação para remoção das proteínas dos géis e resolubilização. A solução obtida foi liofilizada e passou por nova corrida eletroforética SDS-PAGE e SDS-PAGE-gelatina para separação dos fragmentos de gelatina e visualização das atividades enzimáticas.

3.12- Sonicação das Faixas de Géis

As faixas de géis foram acondicionadas em tubos falcon, ressuspendidas em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0 e cuidadosamente acondicionadas em gelo. Após isso, passaram por 15 repetições do processo de sonicação com duração de 20 s cada, com 15 s de intervalo. Após isso, os recipientes foram centrifugados a 3000g a 10°C por 30 min. Os sobrenadantes foram armazenados e os precipitados foram ressuspendidos em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0, sendo ressonicadas como descrito anteriormente. Esse processo foi repetido por três vezes. Ao final do processo a quantidade total do sobrenadante foi liofilizada e o liofilizado, ressuspendido em 500µL de tampão Tris/HCl 50mM pH 8,0. Destes, 30µl foram visualizados por eletroforese SDS-PAGE e SDS-PAGE-gelatina (gel a 15%) como descrito no item “Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, em Presença de SDS e Gelatina (SDS-PAGE-Gelatina).

3.13- Precipitação de Proteínas com Ácido Tricloroacético (TCA)

Proteínas removidas das faixas de géis previamente sonicadas como descrito na seção 3.12, foram precipitadas com TCA para a remoção de SDS das amostras. Os liofilizados foram ressuspendidos em água mili-Q de forma a prover 30µg de amostra por mL. Destes, um volume de 250µL foi incubado em gelo com 69,5µL de TCA 50% por 80 min. Após isso, o material foi centrifugado a 16.000g por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram lavados com acetona 90% (gelada) por duas vezes. A isso se seguiu uma nova centrifugação a

16.000g por 10 min a 4°C com remoção dos sobrenadantes. O precipitado foi então secado a temperatura ambiente.

3.14- Dosagem de Proteínas por 2D-QuantKit (Amersham-Biosciences)

Os conteúdos obtidos a partir da precipitação das amostras com TCA tiveram seu teor protéico dosado pelo 2D-QuantKit (Amersham/Biosciences), seguindo as especificações do fabricante.

3.15- Digestão de Proteínas

Uma quantidade de 45,5µg de proteínas referente à amostra originada do processamento da faixa de gel da banda A (de menor peso molecular) e de 36,1µg de proteínas referente a banda B, foram dissolvidas em 20µL de NH₄ HCO₃ 0,4M/uréia 8M. A estas foram acrescentados 5µL de DTT 100mM, etapa seguida por incubação a 37°C por 3 h e resfriamento à temperatura ambiente. Após isso, foram adicionados 5µL de iodoacetamida 400mM aos tubos, e os mesmos foram incubados por 15 min à temperatura ambiente protegidos da luz. Seguiu-se então uma adição de 130µL de água mili-Q, de tripsina na proporção 1:50 (m/m) de enzima/substrato (proteínas da amostra) e incubação a 37°C por 16 h, seguida por resfriamento à temperatura ambiente. Após isso, seguiu-se uma incubação a 56°C por 45 min, sucedida por novo resfriamento à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 20 µL de ácido fórmico a 10% (v/v) em água para uma concentração final de 1% (v/v).

3.16- Análise do Conteúdo Protéico das Amostras por Espectrometria de Massas

As amostras tripsinizadas e dessalinizadas foram preparadas em uma coluna de fase reversa de 10 cm e separadas em linha para o espectrômetro de massas usando Proxeon easy-nLC-System (Proxeon Biosystems). Volumes iniciais de 4µL foram aplicados em uma coluna de retenção de 2 cm de comprimento (100µm de diâmetro interno) empacotada com 5 µm de matriz 200 A Magic C18 AQ (Michrom Bioresources, USA) seguida por separação em uma coluna de 10 cm de

comprimento (75 μm de diâmetro interno) que foi empacotada com a mesma matriz diretamente em uma coluna PicoFrit de 15 μm (New Objective, USA). As amostras foram passadas na coluna de retenção no fluxo de 2000 nL/min, mesmo fluxo utilizado na separação cromatográfica. A fase móvel A consistiu-se de ácido fórmico 0,1% (v/v) em água enquanto a fase móvel B consistiu-se de 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (v/v). Os peptídeos foram eluídos em um gradiente de 2 a 60% da solução B por 32 min seguido por 80% de B em 4 min, mantendo essa concentração por mais 2 min antes da reequilibração da coluna. O sistema HPLC foi acoplado a LQT-Orbitrap via uma interface LC nanoscale (Proxeon Biosystem). A fonte de voltagem foi ajustada para 1,9 kV, a temperatura do capilar aquecido foi ajustada para 200°C e a voltagem da lente tubular foi de 100V. Os valores de retenção iônica completa e do alvo MSn AGC foram de 30.000 e 10.000 respectivamente, enquanto o alvo FTMS full AGC foi ajustado para 500.000. O espectro MS1 foi adquirido no analisador Orbitrap (300 a 1.700 m/z) em uma resolução de 60.000 (para m/z 445.1200). Para cada espectro, os 10 ions mais intensos foram submetidos à fragmentação CID (sinal mínimo requerido de 10.000; amplitude de isolamento de 2.5; energia de colisão normalizada de 35.0; ativação Q de 0,25 e tempo de ativação de 30 s), seguida por aquisição MS2 no analisador de retenção linear. A opção de exclusão dinâmica foi habilitada e ajustada com os seguintes valores para cada parâmetro: repetir contagem= 1; repetir duração= 30 s; lista de tamanho de exclusão= 500; duração da exclusão= 45 s e amplitude de massa da exclusão= 10 ppm. Os dados foram obtidos utilizando-se o programa Xcalibur (versão 2.0.7), empregando um banco de dados contendo um misto de proteínas (base de dados NCBI) de *Glycine max* e de contaminantes clássicos comumente presentes em resultados de análises espectrométricas.

3.17- Análise da Fragmentação do DNA Através da Detecção de Oligonucleossomos em Tegumentos de *Glycine max* Durante o Desenvolvimento

Para a detecção de oligonucleossomos como consequência da MCP, foi empregado o kit Cell Death Detection ELISA (Roche Applied Science - version 10.0). 50 mg de tegumentos de sementes quiescentes e de sementes de 7 e 22 dias após a polinização foram imersos em nitrogênio líquido para o rompimento das paredes

celulares. Tampão de lise (400 µl) foi adicionado às amostras e incubadas a 4°C por 30 min. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas a 200g, por 10 min e 20 µL do sobrenadante foram adicionados a uma placa de micropoços, previamente sensibilizada, já fornecida no kit pelo fabricante. Uma alíquota de 80 µl do imunoreagente provido no kit, contendo uma mistura de anti-histona-biotina e anti-DNA-POD (peroxidase) foi adicionada. Após a incubação por 2h em agitação (300rpm) e à temperatura ambiente, as amostras foram lavadas e a revelação realizada com tabletes de ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotriazolina-6-sulfônico), de acordo com as instruções do fabricante.

3.18- Alinhamento de Proteínas do tipo Caspase e Metacaspase

Para a compreensão da organização estrutural de uma metacaspase do tipo II de *Glycine max* foi feita a delimitação dos domínios p20 e p10 da metacaspase 4 (gi 356556698), assim como a análise de seus resíduos de aminoácidos catalíticos e a conservação de motivos com outras metacaspases e caspases, através de um alinhamento com as proteínas apresentadas na tabela 1, utilizando o programa Clustal X (Larkin *et al.*, 2007) (<http://www.clustal.org/>). As sequências protéicas foram obtidas a partir do banco de dados do National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e passaram por um tratamento de remoção de pró-domínios e alças para adequação ao alinhamento. Nesse processo foram utilizados os trabalhos de *Vercammen et alii* (2007) e de *Uren et alii* (2000) como guias na delimitação dos domínios e dos resíduos catalíticos.

Tabela 1: Proteínas utilizadas nas análises de alinhamentos de sequência.

Proteína	Espécie	Código Identificador (gi)
Caspase 8	<i>Homo sapiens</i>	12862693
Caspase 8	<i>Mus musculus</i>	29436722
Caspase 8	<i>Gallus gallus</i>	16555407
Caspase 8	<i>Xenopus laevis</i>	148228484
Caspase 8	<i>Danio rerio</i>	46397548
CED3/NEDD2-like	<i>Drosophila melanogaster</i>	220901640
CED3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	11967321
Metacaspase tipo II	<i>Nicotiana tabacum</i>	195963550
Metacaspase 9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	332191328
Metacaspase tipo II	<i>Picea abies</i>	328887884
Metacaspase tipo II	<i>Medicago truncatula</i>	357451305
Metacaspase tipo II	<i>Triticum aestivum</i>	267850617
Proteína do látex	<i>Hevea brasiliensis</i>	4235430
Metacaspase I	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	151945290
Metacaspase I	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	19076003

3.19- Modelagem Molecular da Metacaspase 4 de *Glycine max*

Os domínios p20 e p10 de caspases e metacaspases foram confrontados contra o banco de dados do Protein Data Bank (<http://www.wwpdb.org/>) para a busca de moldes (*templates*) para modelagem molecular, utilizando o programa Swiss Model (Kiefer *et al.*, 2009) (<http://swissmodel.expasy.org/>). A visualização, a análise, a validação, a modelagem e o refinamento das estruturas protéicas foram realizadas com a utilização do programa NOC (Cang *et al.*, 2006) (<http://noch.sourceforge.net>).

4- RESULTADOS

4.1- Teor de Proteínas dos Extratos Protéicos de Tegumentos de *Glycine max*

Como evidenciado na tabela 2, as duas metodologias de extração obtiveram rendimentos quantitativamente similares, sendo o emprego de tampão fosfato de sódio (16,05%) levemente superior em rendimento ao de tampão HEPES-KOH (14,79%). O extrato derivado da extração com tampão HEPES-KOH, assim como na literatura, foi utilizado nos ensaios de atividade enzimática *in vitro*, já o obtido a partir do emprego de tampão fosfato de sódio foi utilizado nos demais experimentos.

Tabela 2: Quantificação de proteínas dos extratos protéicos de *Glycine max* obtidos a partir de extração com tampão fosfato de sódio 100mM, 1% de PVPP pH 7,5 por 2 h; e com tampão HEPES-KOH 50mM pH 7,0.

Amostra	µg/mg de farinha	% de proteína
<i>Glycine max</i> HEPES	147,9	14,79
<i>Glycine max</i> T. fosfato	160,5	16,05

4.2- Perfis Protéicos de Tegumentos de *Glycine max* por SDS-PAGE/SDS-PAGE-gelatina

O perfil protéico de tegumentos de *G. max* apresentado na figura 3, revela quatro bandas com melhor definição. Estas são visíveis tanto nos géis revelados por prata (figura 3A), quanto nos géis corados por Coomassie (figura 3B). As duas primeiras apresentam massas moleculares entre 31 e 45KDa, já as bandas inferiores assinalam massas moleculares próximas a 21,5KDa.

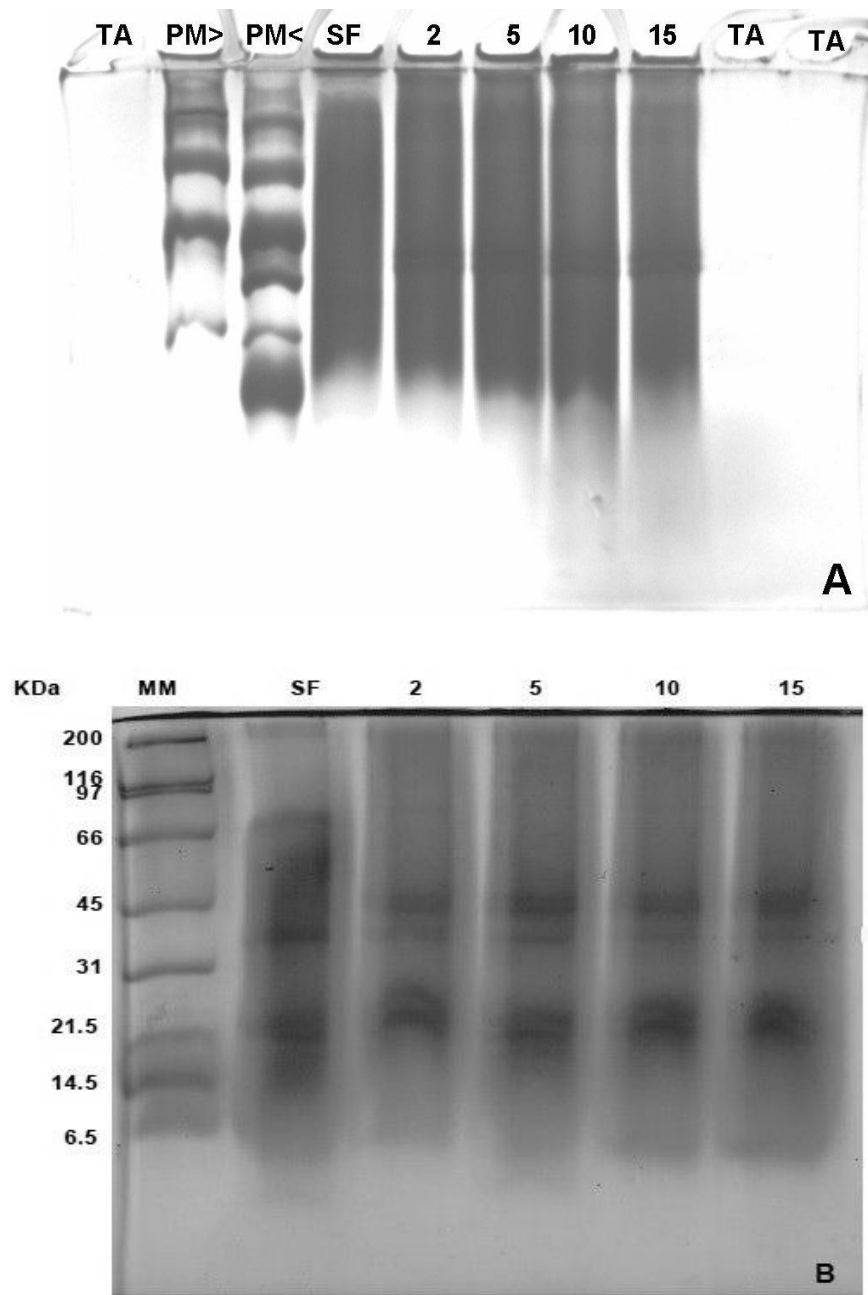


Figura 3- Eletroforese SDS-PAGE de tegumentos de *Glycine max* revelada por nitrato de prata (A) ou corada com Coomassie Brilliant Blue R (B). MM= marcadores de massa molecular; PM>= marcadores de alto peso; PM<=marcadores de baixo peso; TA= tampão de amostra; SF= amostra sem ferver; 2, 5, 10 e 15= amostras aquecidas a 97°C por 2, 5, 10 e 15 min, respectivamente.

Os géis SDS-PAGE na presença de gelatina e incubados em condições favoráveis para atividades de proteases da classe cisteínica (figura 3) revelaram duas bandas de atividades gelatinolíticas; a primeira constitui-se de uma zona de atividade gelatinolítica referente à uma região demarcada no topo do gel, acima de 97KDa; a segunda, mais definida, apresenta uma forma com melhor definição e

localizou-se entre os marcadores de 66KDa e 45KDa. A banda de massa inferior revelou estabilidade térmica, ao permanecer presente no gel após todos os tratamentos de fervura, já a de massa mais elevada, não pôde ser detectada mesmo após o primeiro tratamento de fervura (não apresentando termo-estabilidade).

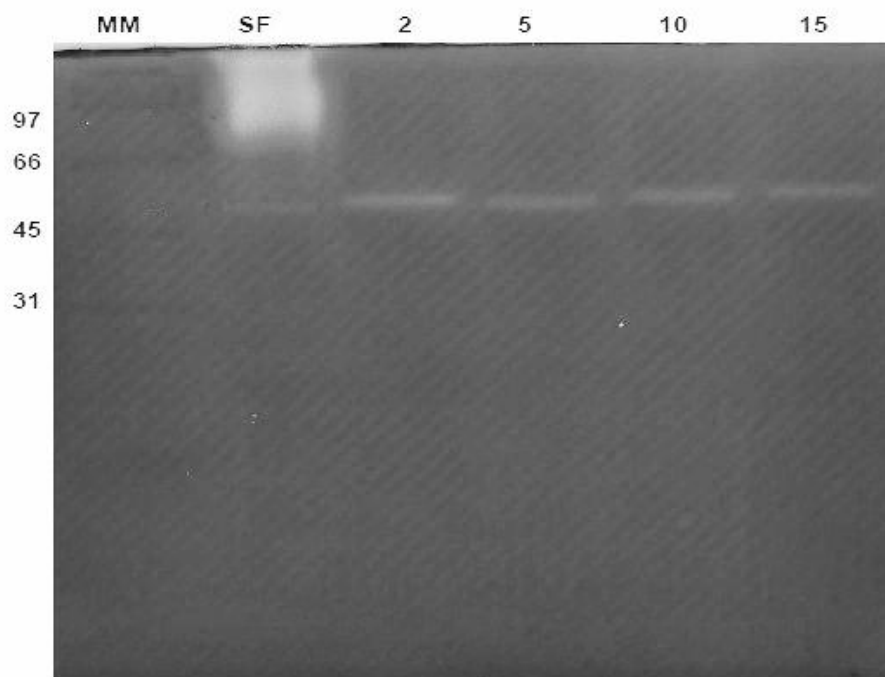


Figura 4- Eletroforese SDS-PAGE-gelatina de tegumentos de *Glycine max*, onde o gel foi incubado com tampão citrato fosfato 100mM pH 5,6 contendo DTT 1,5mM por 16 h. MM= marcadores de massa molecular; SF= amostra sem o tratamento de fervura; 2, 5, 10 e 15= tratamento de fervura por 2, 5, 10 e 15 min, respectivamente.

4.3- Detecção de Atividades Caspase-símile *in vitro* a partir de Extratos Protéicos de Tegumentos de Sementes de *Glycine max*

Atividades caspase-símeis foram detectadas para o extrato de *G. max*, extraído por tampão HEPES-KOH 50mM pH 7,0, sobre todos os substratos testados. Após 5 horas de incubação (figura 5), o extrato apresentou atividade lítica de aproximadamente $0,9 \times 10^{-3}$ UA (unidades de atividade) sobre os substratos Ac-DEVD-pNa e Ac-VEID-pNa nos pHs 4,5 e 7,4, respectivamente, sendo a primeira inibida em aproximadamente 81,1% quando em presença de 298,6mM de Ac-DEVD-CHO e a segunda em 100% quando em presença de 298,6mM de Ac-VEID-CHO. A atividade contra Ac-LHED-pNa (figura 6) foi testada em pH 5,6 e pH 7,4 e exibiu

respectivamente $0,822 \times 10^{-3}$ UA e $1,625 \times 10^{-3}$ UA. Esta não pôde ser testada na presença de seu inibidor específico.

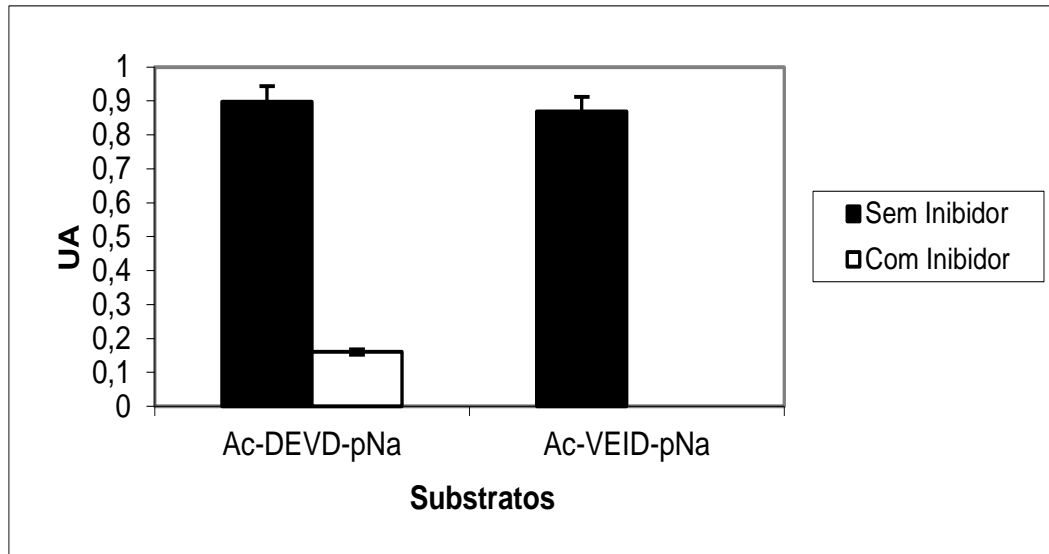


Figura 5- Atividade enzimática de extratos de tegumentos de *Glycine max*, *in vitro*, contra substratos de caspases na presença e na ausência de seus inibidores específicos. Para Ac-DEVD-pNa os extratos foram incubados com tampão acetato de sódio 50mM pH 4,5 na presença de DTT 1,5mM; para Ac-VEID-pNa, os extratos foram incubados com o mesmo tampão, em pH 7,4. O cálculo de atividade enzimática foi realizado tendo como base orientações do manual Sigma da enzima de referência, caspase 3, onde tem-se que: $5,04 \times 10^{-3}$ unidades de atividade enzimática (UA) equivalem a 0,533 de absorvância_{504nm}, $n=3$. Desvio padrão=0,1986. AU= unidades de atividade enzimática ($\times 10^{-3}$).

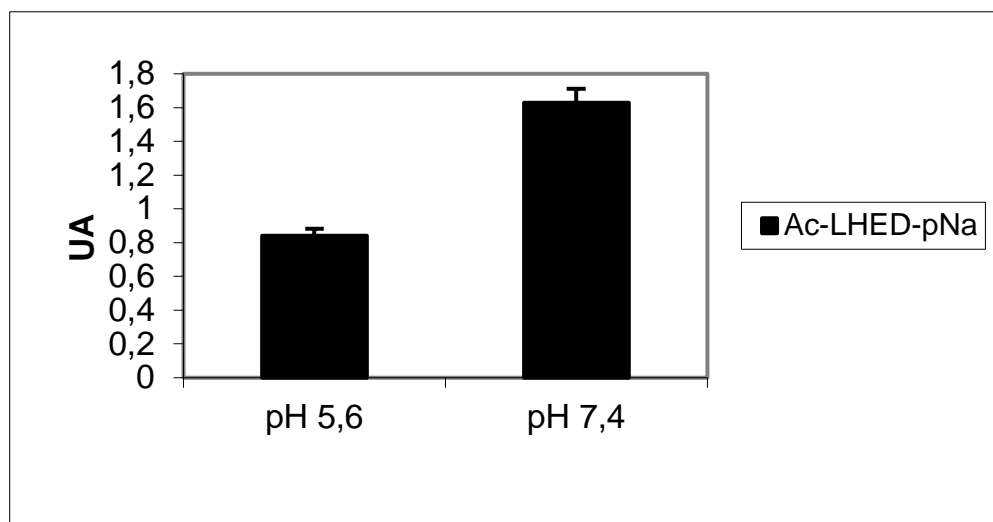


Figura 6- Atividade enzimática de extratos de tegumentos de *Glycine max*, *in vitro*, contra substrato Ac-LHED-pNa. Os extratos foram incubados com tampão acetato de sódio 50mM pH 5,6 e 7,4 na presença de DTT 1,5mM. O cálculo de atividade enzimática foi realizado tendo como base em orientações do manual Sigma de caspase 3, onde tem-se que: $5,04 \times 10^{-3}$ unidades de atividade enzimática (UA) equivalem a 0,533 de absorbância_{504nm}, $n=3$. Desvio padrão=0,1986.

4.4- Estudos Eletroforéticos das Atividades Enzimáticas

Com a finalidade de uma melhor compreensão da natureza das atividades enzimáticas encontradas nos experimentos eletroforéticos anteriores, foram realizadas eletroforeses SDS-PAGE e SDS-PAGE-gelatina que foram realizadas em baterias de corridas em sentido vertical, seguidas pela resubmissão das canaletas excisadas de géis de uma primeira corrida a novos processos eletroforéticos, com as canaletas dispostas no sentido horizontal. Como pode ser evidenciado na figura 7A, os géis de perfil protéico corados por Coomassie revelam apenas uma banda de massa molecular inferior ao marcador de 45 KDa. Com relação à zimografia (figura 7B), pode-se notar uma região ampla de atividade enzimática disposta contínua e diagonalmente, abrangendo uma região de amplitude referente a uma dimensão correspondente a massas moleculares superiores a 200 KDa até regiões inferiores ao marcador de 97 KDa. Esse aspecto é confirmado pelo experimento da figura 8, onde vários segmentos de uma canaleta vertical de gel obtida a partir de uma corrida eletroforética do tipo SDS-PAGE foram separados e aplicados em poços de um novo gel SDS-PAGE-gelatina. O padrão exibido nos dois experimentos sugere a associação da(s) atividade(s) enzimática(s) em questão com outro(s) componente(s) presente(s) no extrato enzimático, ou que essa atividade gelatinolítica seja produto

de ação proteolítica de um complexo enzimático, o que justificaria a alta massa molecular das atividades detectadas. Existe também a possibilidade dessa atividade ser correspondente a uma protease auto-catalítica cujos produtos sejam enzimas que também se auto-processam.

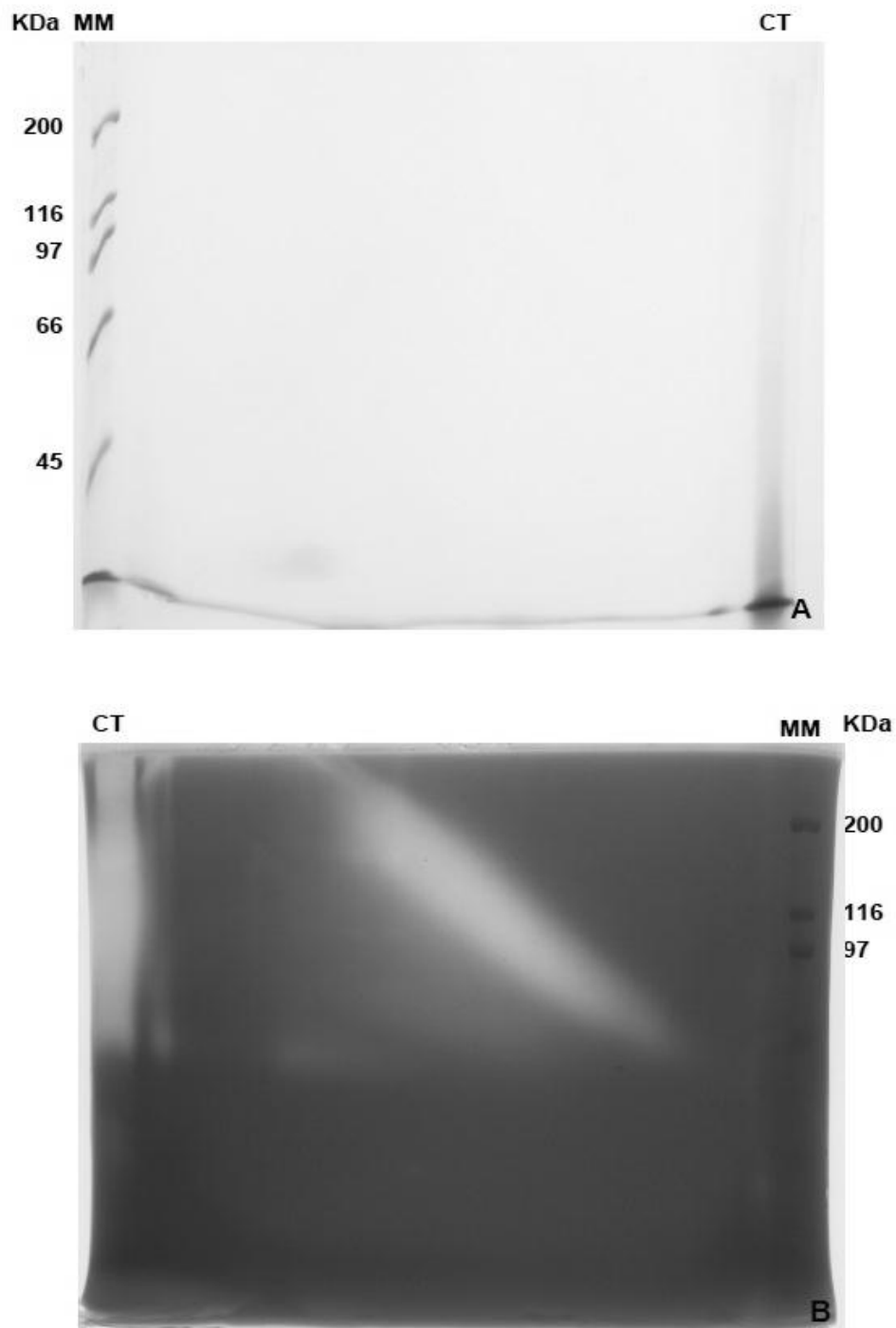


Figura 7: Eletroforeses SDS-PAGE (A) e SDS-PAGE-gelatina (B) na concentração de 8% realizadas nas dimensões vertical e horizontal do extrato de tegumentos de *Glycine max*. O gel em A foi corado com Coomassie enquanto o gel SDS-PAGE-gelatina foi incubado por 16 h em tampão citrato-fosfato 100mM pH 5,6 e 1,5mM DTT. MM= marcadores moleculares; KDa= kilodaltons e CT= controle.

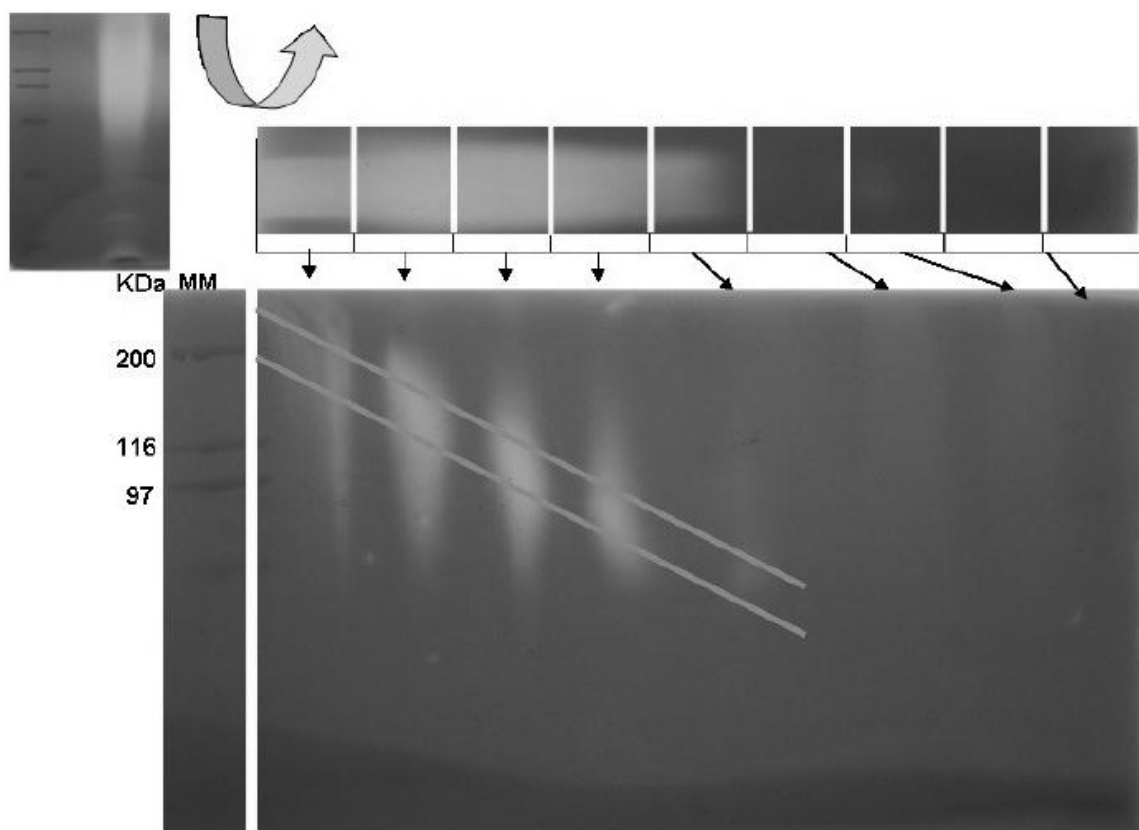


Figura 8: Diagrama explicativo e eletroforese SDS-PAGE-gelatina para os géis corridos vertical e horizontalmente com o extrato de tegumentos de *Glycine max* realizados com fins de visualização de cada trecho individual das atividades previamente detectadas. KDa= kilodalton; MM= marcador molecular. Linhas assinalam o padrão diagonal exibido pela migração dos fragmentos em gel.

4.5- Extração e Acumulação das Amostras Provenientes das Eletroforeses Através de Sonicação

As faixas de gel previamente acumuladas através de eletroforeses similares ao procedimento esquematizado na figura 9 foram removidas, sonicadas e liofilizadas. O liofilizado foi ressuspensionado em 500 μ L de tampão Tris/HCl 50mM pH 8,0 e 30 μ L dos materiais foram aplicados em nova eletroforese SDS-PAGE e SDS-PAGE-gelatina, apresentadas na figura 10. Como pode ser observado na figura 10A, bandas protéicas puderam se evidenciadas apenas para os poços referentes à banda A e que o tratamento de fervura por 5 minutos aparenta não afetar a coordenada dessa banda em gel. Com relação às atividades enzimáticas, as amostras A e Z apresentaram bandas de atividade de natureza similar, de alta massa molecular, que se comportaram de forma semelhante em relação ao tratamento de aquecimento, sendo as mesmas decompostas em duas bandas de

atividade de massa molecular entre 21,5 e 31 KDa. Isto indica que se tratam de atividades enzimáticas geradas a partir da ação de uma mesma proteína ou complexo protéico e que provavelmente sejam produto de um complexo enzimático cujas subunidades *per se*, apresentam atividade gelatinolítica.

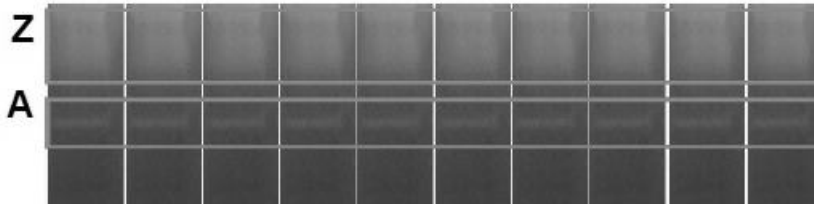


Figura 9: Diagrama das eletroforeses realizadas para acumulação das faixas de atividade de interesse. As regiões assinaladas na figura foram removidas e sonicadas. Z= zona de atividade enzimática de maior peso molecular; A= banda de atividade enzimática.

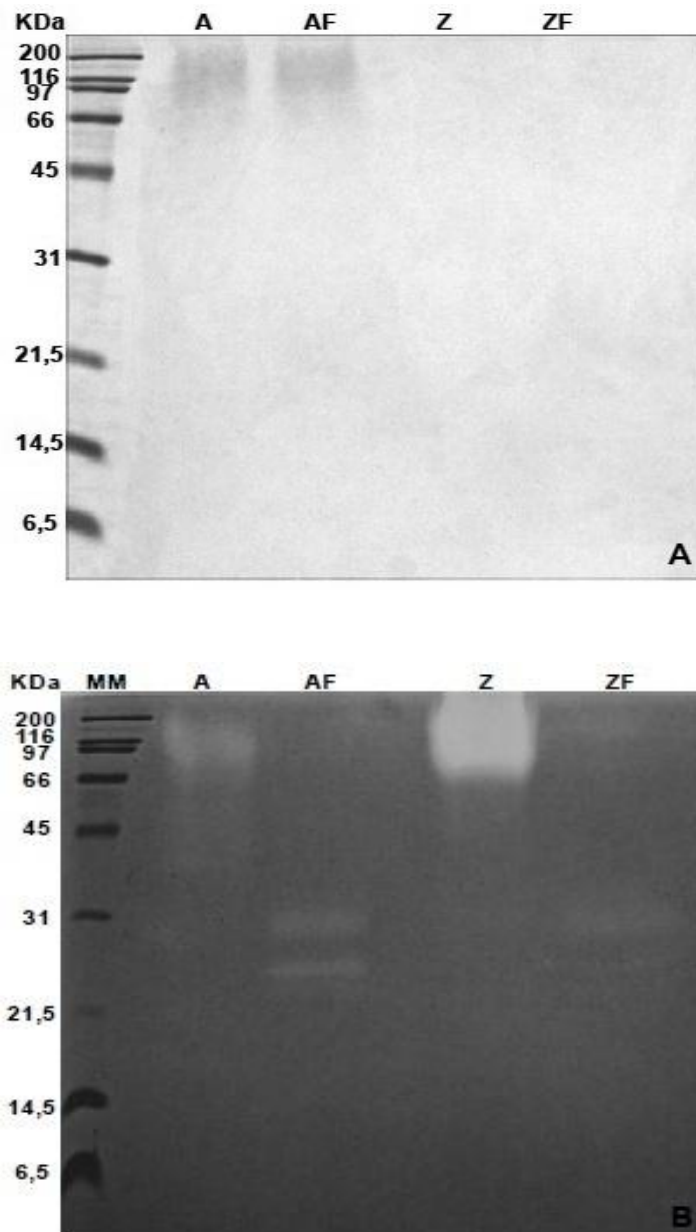


Figura 10: Eletroforese SDS-PAGE (A) e SDS-PAGE-gelatina (B) para as faixas de géis referentes às atividades enzimáticas que foram removidas a partir de eletroforeses cumulativas e que foram sujeitas à sonicação e liofilização. A- amostra da faixa de atividade referente à banda de atividade de massa molecular em torno de 45 KDa; AF- amostra A submetida a 5 min de fervura; Z- amostra da faixa de atividade referente ao arraste de atividade enzimática de elevada massa molecular; ZF- amostra Z submetida a 5 min de fervura . KDa= kilodaltons; MM= marcadores moleculares.

4.6- Conteúdo Protéico dos Precipitados por TCA

Através da precipitação de proteínas descrita no item 3.13, foi possível obter um material com conteúdo protéico na concentração de $0,91\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para a banda A, referente à região dos géis na qual a atividade enzimática de menor massa

molecular é observada e de 0,72 μ g/ μ L para a banda Z, que é referente à região de atividade visualizada de maior massa molecular, como observado na tabela 3.

Tabela 3: Quantificação de proteínas dos precipitados protéicos obtidos a partir da precipitação, com TCA, das proteínas acumuladas por eletroforeses.

Amostra	Concentração (μg/μL)	Total (μg)
Banda A	0,91	91,02
Banda Z	0,72	72,20

4.7- Análise do Conteúdo Protéico das Amostras por Espectrometria de Massas

A análise espectrométrica do conteúdo protéico das amostras a partir das metodologias utilizadas revela que houve contaminação em alguma das etapas do processamento do material, anterior à análise, já que proteínas que não pertencem à *Glycine max* foram majoritariamente detectadas. Apesar disso, houve constatação de sequências peptídicas originadas de algumas proteínas de soja (tabela 4), sendo que todas as proteínas detectadas foram depositadas na base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) como preditas a partir de análises genômicas, estando ainda não caracterizadas. Seguem seus respectivos códigos de depósito no NCBI: gi 356522550, gi 35650596, gi 356562036, gi 356573925, gi 313671264.

Tabela 4: Análise do conteúdo das bandas eletroforéticas por espectrometria de massas.

Proteína	Cobertura	Massa (KDa)	Descrição	Organismo
gi 356522550	1%	139,58	Proteína predita detentora de domínio BAG e GH18	<i>Glycine max</i>
gi 356505596	4%	53,39	Predita como endoglucanase 17-símile	Glycine max
gi 356562036	2%	52	Proteína predita detentora do domínio TPX2	Glycine max
gi 356573925	2%	53,99	Predita como membro da família carreadora ADP/ATP	Glycine max

4.8- Análise da Fragmentação do DNA Através da Detecção de Fragmentos Oligonucleossomais em Tegumentos de Sementes de Soja Durante o Desenvolvimento

Conforme constatado na figura 11, as amostras de tegumentos de sementes de soja em diferentes estágios de desenvolvimento apresentaram valores de miliunidades de oligonucleossomos (mU) diferentes, sendo mais elevados no período de 7 dias após polinização (DAP), apresentando um valor médio de 3,855mU. A intensidade da fragmentação do DNA nuclear aparenta reduzir-se já que com 22 DAP (parte final do desenvolvimento), quando os valores de miliunidades de oligonucleossomos atingiram uma média de 1,45mU. Com relação às sementes quiescentes, foi detectável uma quantidade de oligonucleossomos próxima à encontrada para sementes em 22 DAP.

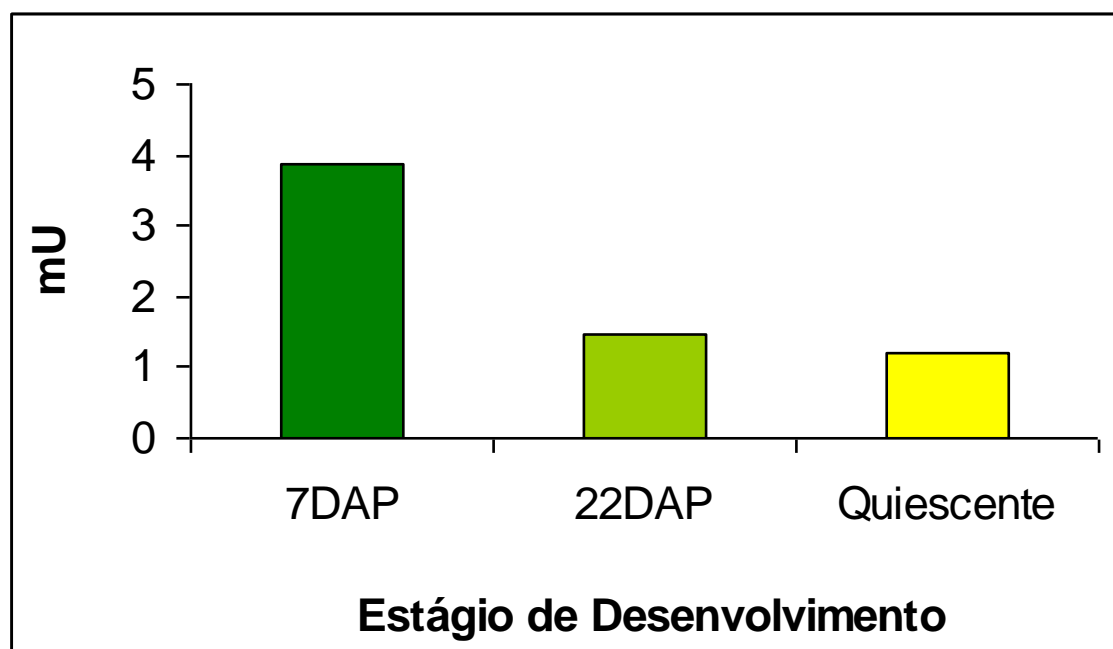


Figura 11: Análise da fragmentação do DNA através da detecção de oligonucleossomos em tegumentos de sementes de *Glycine max* durante o desenvolvimento e quiescência. DAP= dias após a polinização; mU= miliunidades de oligonucleossomos; n= 2; Barras de erro=5%.

4.9- Alinhamento das Proteínas

O alinhamento inicial das sequências inteiras das proteínas (dados não exibidos), separou as sequências em dois blocos (sequências com pró-domínios grandes e alças pequenas e sequências com pró-domínios pequenos e alças grandes) foi realizada então uma remoção dos pró-domínios e das alças para a delimitação aproximada dos domínios p20 e p10 de cada sequência, utilizando como guia o posicionamento conservado da díade catalítica histidina-cisteína. Após todos os tratamentos de remoção, o número total de resíduos de aminoácidos das sequências foi de 235 resíduos, sendo que 146 destes eram constituintes da cadeia p20 e 85 pertenciam à cadeia p10. Quatro resíduos de alanina foram adicionados para conectar as duas cadeias. A partir do processamento, foi possível a determinação dos limites aproximados dos segmentos p20 e p10 para a metacaspase de *G. max* (figura 12 e figura 13 respectivamente), e foi visto que além da conservação de posições da díade catalítica His-Cis no alinhamento, os resíduos de aminoácidos vicinais aos catalíticos (na sequência primária) compartilhavam da mesma natureza química em relação a todas as proteínas, assim como os resíduos das regiões posicionadas anteriormente à díade, quando se analisava o segmento

p20 individualmente (figura 12). Em relação à p10 (figura 13), seus resíduos catalíticos (ácidos aspárticos e argininas) apresentaram posicionamento conservado, ocupando a posição 22 do alinhamento das sequências. O segmento P10 também apresentou conservação em outras regiões ao longo da cadeia, como resíduos de serina próximos aos resíduos catalíticos, aminoácidos com cadeias laterais pequenas e aminoácidos polares. Com relação às estruturas secundárias, foi possível determinar que aproximadamente 33% dos resíduos participam de α -hélices/ hélices de 3-10 passos e que 23% integram conformações β .

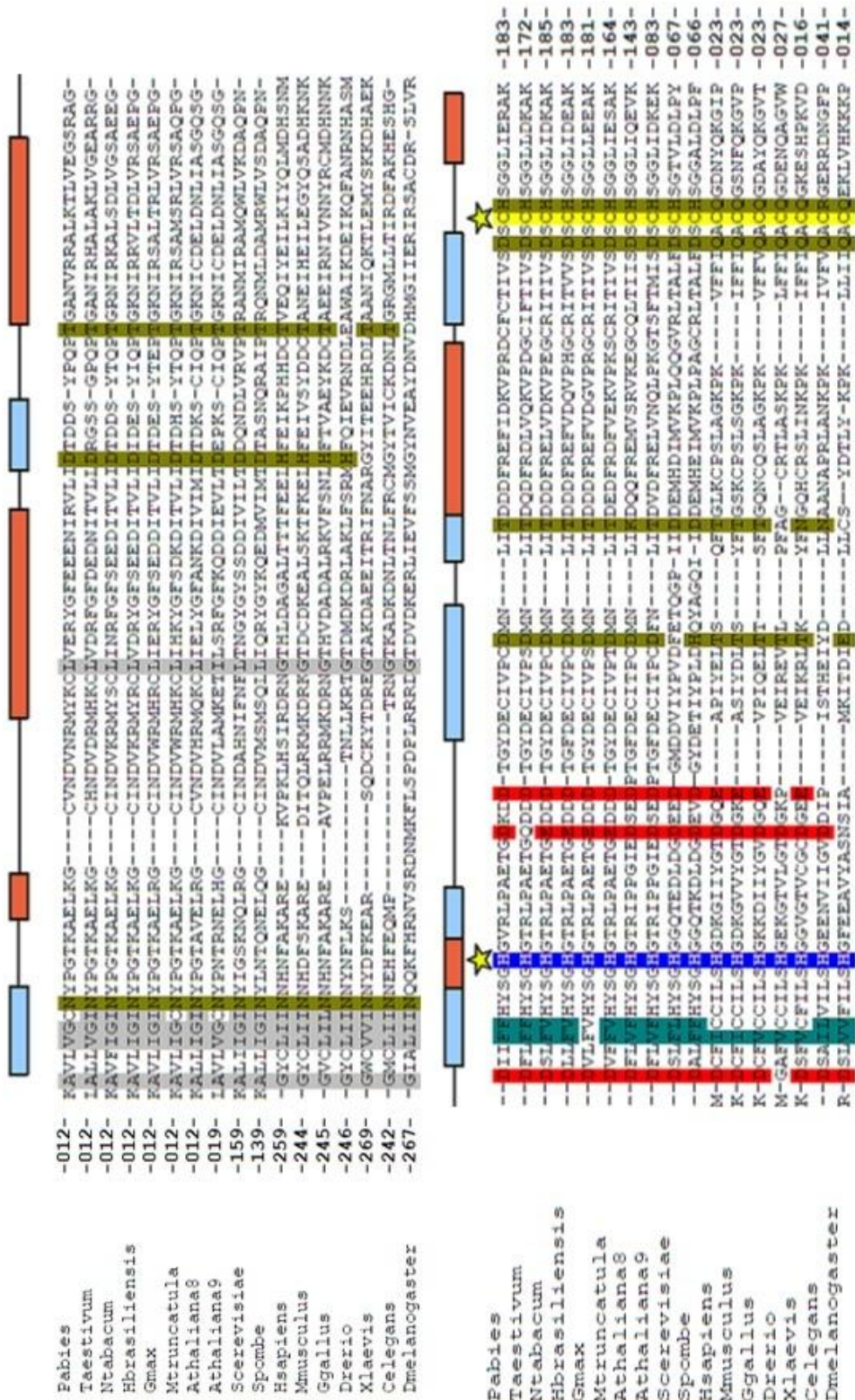


Figura 12: Alinhamento das sequências primárias referentes à subunidade p20 de caspases e metacaspases, com destaque nas principais estruturas secundárias originadas. Azul: resíduo de histidina catalítica; amarelo: resíduo de cisteína catalítica; amarelo escuro: resíduos de aminoácidos polares; cinza: resíduos de aminoácidos alifáticos; verde: resíduos de aminoácidos hidrofóbicos; vermelho: resíduos de ácido aspártico. Retângulo azul: conformação β ; retângulo vermelho: α -hélice/hélice3-10. Estrela: posicionamento dos resíduos catalíticos.

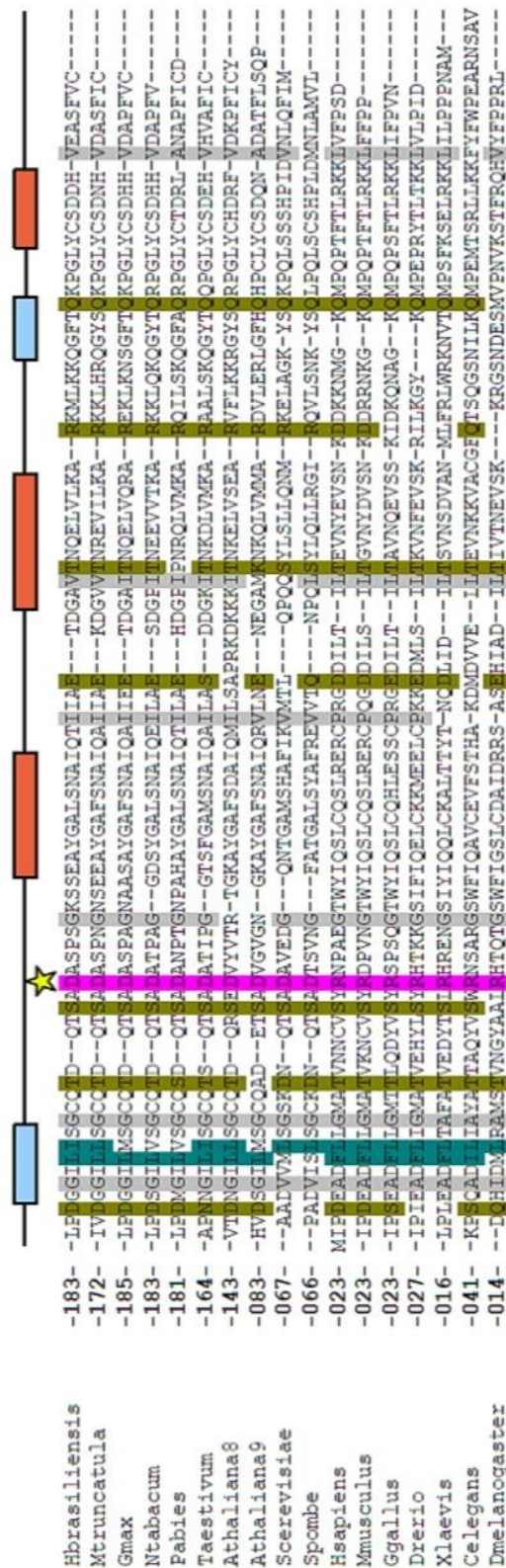


Figura 13: Alinhamento das seqüências primárias referentes à subunidade p10 de caspases e metacaspases, com destaque nas principais estruturas secundárias originadas. Amarelo escuro: resíduos de aminoácidos polares; cinza: resíduos de aminoácidos alifáticos; rosa: resíduos de ácido aspártico e de arginina catalíticos; verde: resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Retângulo azul: conformação β ; retângulo vermelho: α -hélice/hélice3-10. Estrela: posicionamento dos resíduos catalíticos.

4.10- Predição da Estrutura Molecular da Metacaspase 4 de *Glycine max*

A busca por uma proteína que pudesse ser utilizada como molde utilizando as subunidades individuais da metacaspase de *G. max*, resultou em apenas um candidato com índice significativo de similaridade de sequência para a subunidade p20 de *G. max*: a cadeia A de um complexo protéico de *Geobacter sulfurreducens*, depositada no PDB sob o código 3BIJ. A similaridade e a conservação entre o molde e p20 foi de 35% e 55% respectivamente, apenas do resíduo 60 ao 148 de 3BIJ. Como a análise da estrutura terciária das subunidades e da sequência total das proteínas foi compatível (figuras 15A e 15B), mesmo apesar da diferença de estrutura primária ser alta, 3BIJ foi utilizada como molde para a construção de um modelo estrutural para a metacaspase de *G. max*. Nesse contexto apenas uma região de alfa-hélice correspondente aos resíduos de aminoácidos 160-190 foi removida da cadeia A de 3BIJ para adequação à sequência da proteína de interesse.

Com relação ao modelo estrutural estabelecido foi possível notar que os resíduos de aminoácidos da díade catalítica (His/Cys) dispuseram-se espacialmente próximos, quando analisado o modelo tridimensional. O resíduo referente ao ácido aspártico de contato também manteve esse posicionamento, sugerindo que esses resíduos de fato estejam intimamente associados e que participem da catálise enzimática (figura 15A). O modelo também apresentou uma estrutura tridimensional muito similar à de caspases e enzimas estruturalmente relacionadas (figura 14), com uma região central de conformações betas originadas de ambas as subunidades (p20 e p10) sendo circundadas por alfa hélices também originadas das duas subunidades (figura 15B). No total, o modelo apresentou duas conformações β , uma de seis folhas ocupando uma posição central do eixo da proteína e outra com duas folhas ocupando uma das extremidades do modelo. Duas das folhas da conformação β da posição central são derivadas da sequência de p10, enquanto p20 contribui com três folhas. Com relação às α -hélices e hélices de passos 3-10, oito destas conformações são presentes na estrutura do modelo, cinco delas se organizam em torno da conformação β central, sendo que três delas têm origem a partir da sequência de p20 e as outras duas derivam-se de p10. As outras três hélices são menores e se apresentam distribuídas nas extremidades da molécula.

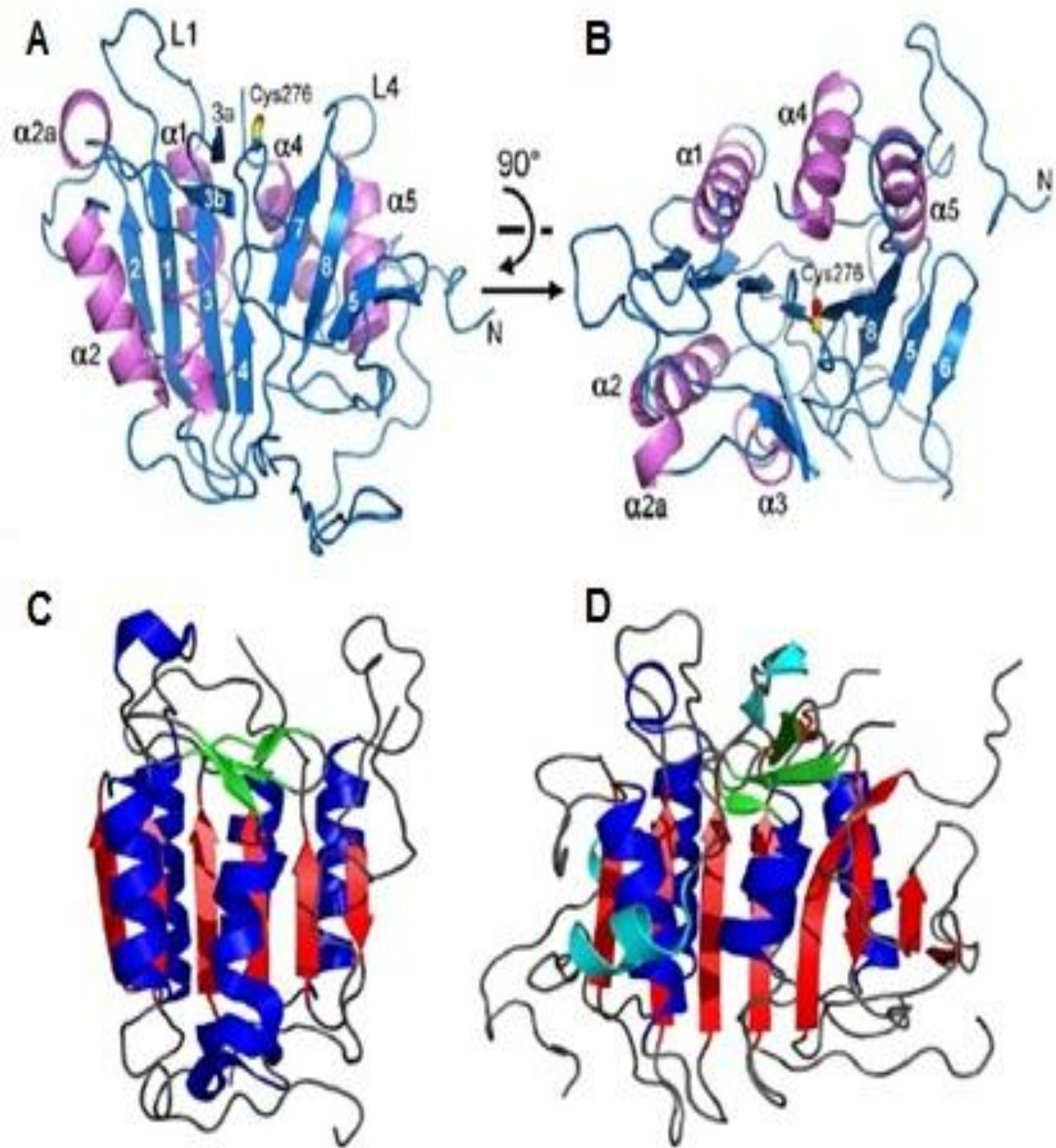


Figura 14- Modelos estruturais da metacaspase YCA1 de *Saccharomyces cerevisiae* em duas vistas perpendiculares (A) e (B); da caspase 7 humana (C), e MCA2 de *Trypanosoma brucei* (D). Retirados de Wong *et alii* (2012) (A e B) e McLuskey *et alii* (2012) (C e D).

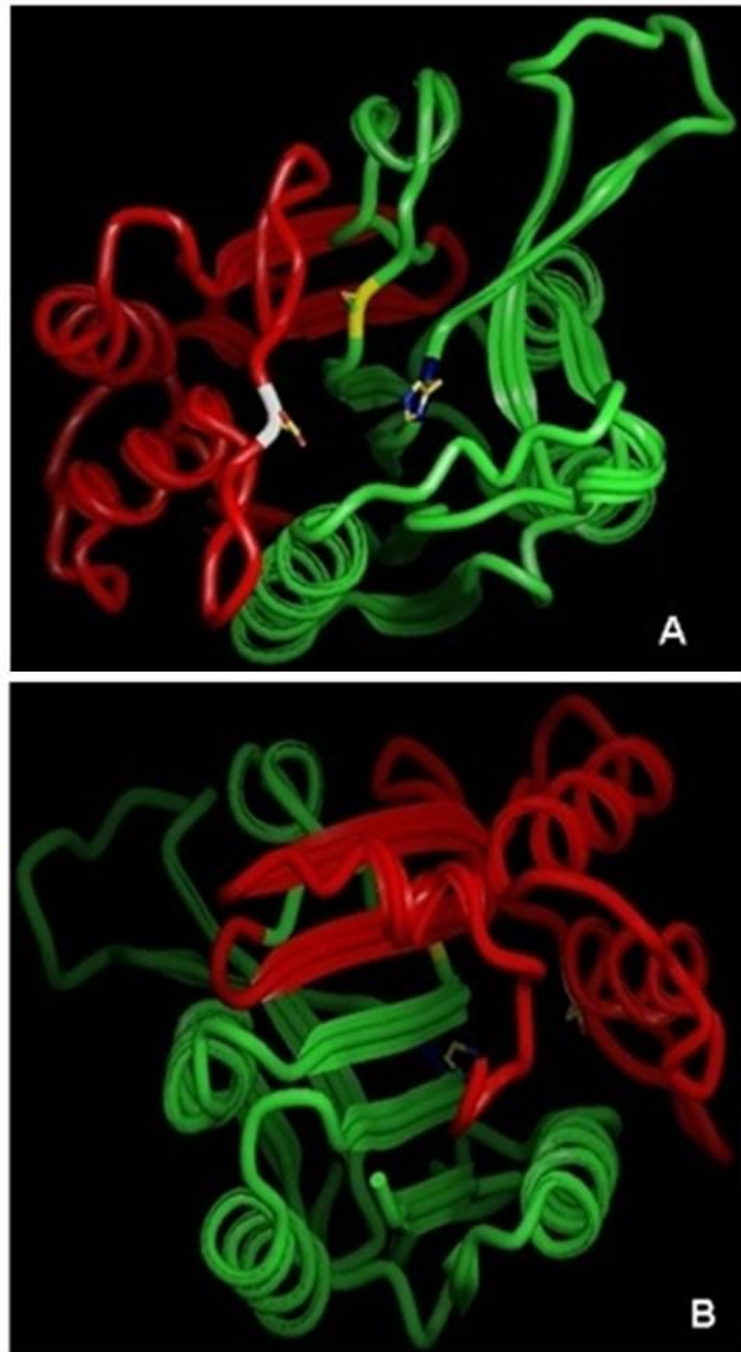


Figura 15- Modelo estrutural gerado para a metacaspase 4 de *G.max* a partir da estrutura resolvida da proteína depositada no PDB (Protein Data Bank) sob o código 3BIJ. A- resíduos de aminoácidos catalíticos em destaque. B- conformações beta da porção central da enzima. Vermelho: subunidade p10; verde: subunidade p20; branco: resíduo de ácido aspártico de contato; amarelo: resíduo de cisteína catalítica; azul escuro: resíduo de histidina catalítica.

5- DISCUSSÃO

Morte celular programada é um processo celular básico no ciclo de vida de organismos multicelulares, sendo que um número crescente de relatos têm demonstrado evidências sólidas de que eventos dessa natureza também ocorrem em organismos unicelulares, tais como *Leishmania donovani* (Lee *et al.*, 2002), *Trypanosoma cruzi* (Amiesen *et al.*, 1995), *Emiliana huxleyi* (Bidle *et al.*, 2007) e *Micrasterias denticulata* (Darehshouri *et al.*, 2008), embora nestes casos, seu papel evolutivo ainda não é totalmente compreendido.

Com relação a MCP em organismos vegetais, ainda é necessário um maior volume de informações para uma compreensão mais abrangente de eventos desta natureza, embora seja crescente o registro bibliográfico de trabalhos com esta temática. Estes estudos têm demonstrado que muitos marcadores morfológicos e bioquímicos característicos de MCP são compartilhados entre sistemas celulares vegetais e animais, tais como: o encolhimento do citoplasma, a condensação nuclear, o borbulhamento da membrana plasmática, o influxo de cálcio ao citosol, a exposição de moléculas de fosfatidilserina ao meio extracelular, a ativação de proteases específicas e a fragmentação do DNA em segmentos nucleossomais (Solomon *et al.*, 1999).

A atividade de proteases e sua ligação com eventos de MCP em processos desenvolvimentais do tegumento de sementes da leguminosa *Glycine max* foram as investigações centrais do presente trabalho, que foi inspirado por registros bibliográficos anteriores, onde atividades enzimáticas de proteases cisteínicas foram detectadas a partir de sementes quiescentes de *Vigna unguiculata* (Lima, 2001). Neste caso, um dos papéis sugeridos para a atividade detectada, foi a participação em eventos desenvolvimentais precedentes à quiescência do tegumento.

No presente trabalho, sob condições favoráveis à detecção de atividades de proteases cisteínicas, foram detectadas, duas bandas de atividade por zimografia (figura 4), nos extratos protéicos de tegumentos de sementes quiescentes de soja. De forma geral, atividades proteolíticas parecem estar associadas ao tegumento de sementes, como observado por Wan *et alii* em 2002, que detectaram atividades de proteinases cisteínicas a partir do integumento interno de *Brassica napus* em desenvolvimento. Nakaune *et alii*, em 2005, relataram que sementes mutantes de *Arabidopsis thaliana*, deficientes para a protease cisteínica δ VPE, tiveram o

desenvolvimento de suas duas camadas do tegumento atrasado e que estas enzimas se localizaram tanto no interior como no exterior das paredes celulares. Concernente ao estágio quiescente do tegumento de sementes, ao menos entre leguminosas, atividades enzimáticas com essas propriedades catalíticas parecem ser uma presença constante, tendo em vista o que fora relatado por Lima em 2001 para a semente de *Vigna unguiculata* e por Rocha (2011) para *Albizia sp.*, *Cicer arietinum* e *Lens culinaris*.

Examinando as massas moleculares aproximadas referentes às atividades enzimáticas encontradas em gel (figura 4), nota-se que estes são mais elevadas em relação ao que se observa para proteases cisteínicas, comumente descritas na literatura. Dudkiewicz *et alii*, em 2012, viram que a metacaspase TaeMCAII de trigo possui 44 KDa na sua forma de zimógeno e que esta, após atividade de autoclivagem gera duas subunidades de 16 e 20KDa. Kuroyanagi *et alii*, em 2002, viram que a δ VPE de *Arabidopsis thaliana* possui uma forma inativa com 43 KDa que, quando localizada em vacúolos ácidos, se processa auto-cataliticamente, removendo um domínio C-terminal auto-inibitório, gerando uma forma com 40 KDa. As enzimas papaína-símile de vegetais são em geral, sintetizadas como pequenas pre-proteínas de 40-50 KDa que sofrem processamento proteolítico de pré e pró-peptídeos para gerar enzimas maduras completamente ativas de 22-35 KDa (Grudokwska e Zagdanska, 2004). Isso pode indicar que as atividades detectadas sejam, na verdade, produtos de complexos enzimáticos e não de enzimas individuais, cujas propriedades permanecem inconclusíveis.

Outra característica marcante detectada para uma das bandas de atividade foi a termoestabilidade. Mesmo após 15 min de aquecimento a 97°C, a banda de menor massa molecular (entre 45 e 66KDa) permaneceu invariavelmente detectável. Essa propriedade também foi observada em nossos trabalhos anteriores (Rocha, 2011) para atividades proteolíticas em gel a partir das sementes das leguminosas *Albizia sp.*, *Cicer arietinum* e *Lens culinaris* no estágio quiescente.

Não está claro se essa propriedade tem algum significado fisiológico importante ou se tenha apenas se derivado independentemente de uma pressão evolutiva durante o curso da evolução dos organismos em questão. Apesar disso, relatos de proteases com certa estabilidade estrutural têm sido registrados a partir de estudos com sementes e muitas delas têm se relacionado com processos de mobilização de reservas durante a germinação. Uma protease cisteínica obtida de

cotilédones de sementes de *Canavalia ensiformis* em processo de germinação exibiu seu pico de atividade *in vitro* no pH 5,6 a 40°C, sendo que 20% da mesma foi mantida a 60°C (Jinka *et al.*, 2009). Mohamed Ahmed *et alii* (2009) purificaram uma protease serínica a partir de sementes de *Solanum dubium*, esta enzima apresentou-se estável em um amplo espectro de pH (3,0-12,0), sendo otimamente ativa em pH 11 a 70°C. Outra característica interessante é que esta enzima é altamente estável na presença de agentes desnaturantes, tais como 2% de SDS e uréia 7M, além de solventes orgânicos, quando incubada por 1 h.

Outra possibilidade que explicaria essa termoestabilidade seria a presença de componentes estabilizadores nos extratos utilizados para os ensaios eletroforéticos, tais como componentes de natureza oligossacarídica e galactosil ciclitolis. Essas moléculas são comumente encontradas em sementes de leguminosas, incluindo *Cicer arietinum* e *Lens culinaris* (Peterbauer e Richter, 1998), com participação em processos de aquisição de tolerância à dessecação pelas sementes, estabilizando organelas, membranas celulares, enzimas, proteínas estruturais e outras macromoléculas (Obendorf, 2008). A possibilidade da permanência de compostos deste tipo nos extratos mesmo após os processos de extração de proteínas não é descartada. Neste caso estes forneceriam termo-proteção às enzimas proteolíticas responsáveis pelas atividades detectadas.

Como suspeitamos do envolvimento das atividades enzimáticas encontradas em eventos de MCP, testes *in vitro* com substratos e inibidores de caspases foram realizados. Estes testes revelaram que o extrato protéico, quando em condições específicas de incubação, possui atividades caspase-símile contra os substratos Ac-DEVD-pNa, Ac-VEID-pNa e Ac-LHED-pNa (figuras 5 e 6). Esses substratos sintéticos apresentam o sítio preferencial de clivagem para diferentes caspases, que são enzimas que estão entre os principais executores de MCP em metazoários (van der Hoorn, 2008). Atividades similares vêm sendo descritas em estudos com sistemas de MCP vegetais desde 1998, com o trabalho de Del Pozo e Lam. Neste trabalho foi visto que a aplicação dos inibidores Ac-DEVD-CHO e Ac-YVAD-CMK aboliu os sintomas de resposta hipersensível de folhas de tabaco a patógenos bacterianos. Extratos protéicos obtidos a partir da ruptura tissular de folhas de *Oryza sativa* (arroz), *Triticum vulgare* (trigo), *Lycopersicum esculentum* (tomate), *Coffea arabica* (café), *Plantago major* (bananeira), *Hordeum vulgare* (cevada) e *Avena sativa* (aveia) revelaram a ativação de atividades caspase-símile com especificidade

para a sequência peptídica TATD. Em conjunto com outros dados, foi sugerido que estas enzimas estariam presentes sob a forma de zimógenos ou estariam limitadas por compartimentos em tecidos saudáveis e que a ruptura seria um dos estímulos para sua ativação de maneira universal entre os organismos vegetais (Chichkova *et al.*, 2008). Zhang *et alii*, em 2009, detectaram a clivagem em tempo real de um construto contendo a sequência tetrapeptídica DEVD (sítio preferencial de clivagem da caspase 3) através da técnica FRET (transferência de energia por ressonância de fluorescência), aplicada em protoplastos de plantas de tabaco sob exposição à radiação ultravioleta tipo C. A clivagem do substrato pôde ser detectada a partir de 30 min de exposição e levou cerca de 1 h para o completo desaparecimento do sinal de fluorescência (indicando total atividade de clivagem do construto), sendo abolida por tratamento com inibidor de caspase 3 e pela troca do resíduo de aspartado na posição P1 (DEVD) do peptídeo por um resíduo de glicina (DEVG). Battelli *et alii* (2011) em um estudo com flores de *Lilium longiflorum* em processo de senescência, constataram a presença de atividades enzimáticas em ensaios *in vitro* empregando os substratos Ac-YVAD-pNa, Ac-DEVD-pNa e Ac-VEID-pNa, onde cada uma delas revelou picos de atividade em pH ácido (pH 5,0-6,0) e redução de intensidade quando em presença de seus inibidores específicos.

Com relação ao tegumento de sementes, atividades caspase-símile têm sido atribuídas à ação catalítica de VPEs (Nakaune *et al.*, 2005), sendo que estas legumainas apresentam atividade contra substratos baseados na sequência YVAD e são inibidas por inibidores contruídos com base nesse tetrapeptídeo. Neste trabalho, essas enzimas foram requeridas para a MCP de camadas celulares do tegumento durante seu desenvolvimento. Além disso, há registros do requerimento dessas enzimas em mecanismos de resposta a patógenos e no estabelecimento de organismos simbiontes (Rojo *et al.*, 2004; Kuroyanagi *et al.*, 2005; Qiang *et al.*, 2012) envolvendo outros tecidos vegetais.

Como a especificidade de VPEs ligadas a MCP parece ser estritamente relacionada a sequências contendo o tetrapeptídeo YVAD (Hatsugai *et al.*, 2004; Rojo *et al.*, 2004), as atividades *in vitro* detectadas no presente estudo são provavelmente derivadas de outras enzimas que exibem ação caspase 3-símile (DEVDase), caspase 6-símile (VEIDase) e caspase 9-símile (LHEDase). Atividades de natureza diferente da apresentada por VPEs também foram encontradas em outros estudos com foco no tegumento de sementes. Wan *et alii*, em 2002,

detectaram a proteinase cisteínica BnCysP1 expressa apenas na fase inicial do desenvolvimento do tegumento interno de *Brassica napus*. Esta compartilha 75% de identidade de sequência com a proteína BnSAG12-1 de *Arabidopsis thaliana*, que é uma enzima relacionada a senescência foliar e não membro do grupo das VPEs. Trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa também demonstraram atividades caspase-símile de propriedade diferente da apresentada por VPEs a partir de extratos protéicos de sementes quiescentes de outras leguminosas (Rocha, 2011). O conjunto das atividades detectadas a partir do extrato de tegumento de sementes quiescentes de *Glycine max* no presente trabalho, sugere um complexo contexto no qual as enzimas atuam em conjunto em eventos desenvolvimentais anteriores à quiescência ou ligados a um processo posterior de germinação.

Os estudos eletroforéticos bidimensionais revelam apenas uma banda protéica abaixo do marcador de 45 KDa, quando 30µg de proteínas foi utilizada no ensaio, revelando pouca diversidade de bandas protéicas detectáveis (figura 7A). A zimografia deste experimento (figura 7B) no entanto, revelou uma intensa atividade proteolítica cuja natureza sugere que seja originada a partir de complexos enzimáticos ou de proteases que atuam em cascata, dado o padrão diagonal e contínuo da única e extensa banda de atividade visualizada. Curiosamente, este mesmo padrão foi observado através de uma análise zimográfica alternativa, no qual fragmentos de uma canaleta de um primeiro gel foram separados e aplicados em canaletas individuais de uma segunda corrida eletroforética.

Tanto a formação de complexos enzimáticos, como cascatas proteolíticas, são atributos clássicos de vias de MCP, em especial a apoptótica. Coffeen e Wolpert (2004) detectaram evidências de que a via de degradação de RUBISCO (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase) disparada durante MCP em resposta ao tratamento de folhas de plantas sensíveis de *Avena sativa* com victorina (uma toxina produzida pelo fungo *Cochliobolus victoriae*) envolve a ação em cascata de múltiplas proteases, incluindo proteases serínicas denominadas saspases. Bozkov *et alii*, em 2005, em um trabalho com mclIPa, uma metacaspase do tipo II presente no suspensor *Picea abies* durante a embriogênese, viram que esta enzima não cliva substratos de caspases, incluindo os baseados na sequência peptídica VEID, cuja atividade de clivagem fora detectada em trabalhos anteriores a partir do mesmo objeto de estudo (Suarez *et al.*, 2004). Em face destes dados Bozkov *et alii* (2005) sugerem um mecanismo de ação em cascata no qual mclIPa seria ativada

posteriormente a uma protease, ainda não identificada, detentora de atividade VEIDase na mesma via de MCP requerida no processo em questão.

Quanto a complexos enzimáticos, a alta massa molecular das atividades proteolíticas detectadas em gel, seria produto de interações entre a(s) protease(s) responsáveis ativa(s) com alguma outra macromolécula, tais como moléculas de galactosil ciclitolis e oligossacarídeos sugeridos como promotores do efeito termoprotetor descrito anteriormente ou de complexos enzimáticos semelhantes ao que se observa no apoptossomo, que é uma estrutura formada no citosol de células de metazoários sob processos apoptóticos, que inclui moléculas de citocromo c, Apaf-1, dATP que associam-se e ativam a procaspase 9 (Gaussand, 2007). A associação de Apaf-1 com a procaspase 9 forma complexos de elevada massa molecular (700-1400 KDa) (Cain *et al.*, 1999; Saleh *et al.*, 1999; Rodriguez e Lezebnik, 1999). Nesse contexto é notável um número crescente de trabalhos que têm demonstrado o envolvimento de proteínas da família Bcl-2 em processos que envolvem morte celular em organismos vegetais, especialmente em respostas hipersensitivas. Como demonstrado por Yu *et alii*, em 2002, uma proteína ortóloga de *Arabidopsis thaliana* do inibidor de MCP, Bax-1, de animais, de maneira surpreendente, induziu morte celular em leveduras e em células de mamíferos. Chen e Dickman (2004) viram que plantas transgênicas de tabaco expressando membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 exibiram resistência a tratamento com herbicida, o qual fora capaz de induzir morte celular no tipo selvagem. Neste estudo também foi visto que essas proteínas, não só localizaram-se nas mesmas frações celulares que em mamíferos, mas também na fração referente à membrana do cloroplasto. A liberação do citocromo c da mitocôndria ao citosol também parece estar relacionada a MCP em sistemas vegetais, como demonstrado por Balk *et alii* (1999) para cotilédones de pepino, sob tratamento de aquecimento. No mesmo ano, Sun *et alii* demonstraram a translocação do citocromo c ao citosol a partir da mitocôndria a em folhas de tabaco sob tratamento com menadiona e Zhao *et alii*, relataram que o citocromo c animal era capaz de ativar proteínas caspase-símile no citoplasma de cenoura, sendo as mesmas capazes de degradar núcleos de células hepáticas de camundongos de forma parecida com a que ocorre na apoptose. Esses relatos sugerem que ocorra a formação de complexos protéicos similares ao apoptossomo durante MCP em organismos vegetais.

Um fato interessante observado na figura 10, ainda com relação a experimentos eletroforéticos, é que quando as bandas de atividade são obtidas e separadas como esquematizado na figura 9 e posteriormente ressolubilizadas por sonicação para nova corrida, nota-se que tanto a zona de maior massa molecular (do topo do gel até 66 KDa) como a de menor massa molecular (entre 45 e 66 KDa) apresentam o mesmo aspecto, mesmo em relação ao tratamento de fervura, no qual duas bandas de atividades são formadas a partir da banda de peso molecular mais elevada. Em conjunto, esses dados sugerem que a banda de menor massa molecular seja produto de uma mesma enzima cuja atividade é visualizada na parte superior do gel. Outra possibilidade é que parte das bandas de menor massa integre um complexo (representado pela banda de maior massa), que se refaz quando as mesmas são ressolubilizadas, e que a outra parte da população de enzimas referentes à mesma se apresentariam de forma semelhante à banda de menor massa propriamente dita mostrada na figura 3.

Para uma compreensão da relação das atividades enzimáticas encontradas *in gel* e o processo de MCP, corridas eletroforéticas seriadas foram realizadas para acumular material de proteases em quantidade suficiente para análises estruturais por espectrometria de massas. Apesar da detecção majoritária de cRAPs (common Repository of Adventitious Proteins) a partir da análise espectrométrica em comparação com um banco de dados contendo contaminantes comumente encontrados em experimentos de proteômica, a tabela 4 mostra que uma proteína hipotética predita a partir de análises genômicas de *Glycine max* pôde ser detectada (gi 356522550). Essa proteína possui um domínio quitinase (GH18), o qual está presente em inibidores de xilanases e em quitinases do tipo III (Scheltinga *et al.*, 1994). Ambos os grupos estão relacionados a respostas de plantas a patógenos (fungos e bactérias), o que as elegeram como candidatos a participar de respostas hipersensíveis, estão intimamente ligadas ao processo de MCP. Juge *et alii*, em 2004, resolveram a estrutura de Xip-I (Proteína Inibidora de Xilanase I) em complexo com xilanases da família GH10 e GH11 de *Aspergillus nidulans* e *Penicillium funiculosum* respectivamente, revelando as bases moleculares de sua interação em processos de inibição das mesmas. Outro domínio apresentado pela proteína de tegumentos de sementes de *G. max*, este ainda mais interessante para o presente trabalho, é o domínio BAG, que é parte integrante de proteínas da família BAG-1, que é conservada evolutivamente, sendo presente em leveduras, invertebrados e

mamíferos, que apresenta papel importante na regulação de chaperonas membros da família HSP70 em mamíferos e como potencializadores das funções de Bcl-2, sendo mantenedoras de mecanismos pró-sobrevivência celular (ação anti-apoptótica) (Takayama *et al.*, 1998).

Proteínas contendo o domínio BAG existem não só apenas nos grupos de organismos supracitados, estando bem distribuída em um grande número de eucariotos (Doong *et al.*, 2002). Kang *et alii* (2006) caracterizaram um gene de *Arabidopsis thaliana* que codifica uma proteína homóloga de BAG (AtBAG6) e viram que a expressão do mesmo induz morte celular em plantas e em leveduras por meio de uma via de sinalização que envolve a interação com a calmodulina. Dessa forma essa proteína com domínio BAG teria um papel diferente da observada em proteínas relacionadas em mamíferos. A sequência protéica assinalada no presente trabalho, que apresenta domínios descritos na literatura como relacionados à resposta a patógenos (domínio GH18) e outro a MCP (domínio BAG), sugere que esta proteína hipotética possa ter um papel multifuncional, neste caso, estando envolvida em duas vias de sinalização, na qual as proteínas responsáveis pelas atividades *in vitro* e *in gel* que foram observadas nos experimentos anteriores teriam participação. O fato de o domínio BAG estar envolvido em interações com chaperonas, também torna possível o envolvimento da proteína em estudo (gi 356522550) em um mecanismo termoprotetor capaz de manter a atividade enzimática das amostras aquecidas observadas nas zimografias (figura 4). Como este domínio está ligado tanto a proteínas com ação anti-apoptótica (Takayama *et al.*, 1998) quanto a proteínas pró-apoptóticas, no caso de AtBAG6 (Kang *et al.*, 2006), uma possível participação da proteína detectada no presente estudo em eventos de MCP de alguma etapa do desenvolvimento do tegumento de *Glycine max* pode incluir a proteção de tipos celulares específicos que devam permanecer viáveis no estágio quiescente. Neste caso, estas células provavelmente teriam um papel a ser cumprido em eventos germinativos, ou então, a função destas proteínas seria a de induzir a morte destas células, após sua função ter sido desempenhada.

Com relação à detecção de marcadores moleculares tradicionais de MCP, a fragmentação do DNA em um padrão oligonucleossomal e sua associação com cascatas de caspases, constitui-se uma cadeia de eventos característica da apoptose (Robertson *et al.*, 2000). A partir do final da década de 1990, um número crescente de relatos relacionando esse marcador com MCP em sistemas vegetais

vêm sendo registrado. Em um primeiro relato do gênero, Wang *et alii*, em 1996, observaram que ocorre a fragmentação de DNA nuclear de células da camada de aleurônio durante a germinação de sementes de cevada e que este fenômeno parece ser controlado pela ação de fitormônios. Em um estudo com protoplastos de plantas de tabaco sob tratamento com a toxina menadiona, Sun *et alii* (1999) detectaram fragmentação de DNA nuclear, que esteve ligada à liberação do citocromo c da mitocôndria. Núcleos TUNEL positivos foram detectados do escutelo, no coleóptilo, na radícula e no suspensor durante a embriogênese de *Zea mays* (Giulliani *et al.*, 2002). Wan *et alii*, em 2002, relataram a presença de núcleos TUNEL positivos no integumento interno de *Brassica napus* em 10DAP, que foram associados a outras características de morte celular e à presença de uma protease tegumento-específica (BnCysP1). A fragmentação do DNA nuclear também foi detectada em células do suspensor de embriões de *Picea abies* (7 DAP), sendo relacionada à atividade da matabaspase mclIPA (Bozkhov *et al.*, 2005). Lombardi *et alii*, em 2007, detectaram fragmentação de DNA a partir do nucelo de sementes de *Secchium edule* tanto por TUNEL como por eletroforese, sendo esta associada às atividades caspase-símile também detectadas.

A análise do padrão de fragmentação do DNA nuclear em fases do desenvolvimento de sementes de *Glycine max* anteriores à quiescência foi apresentada na figura 11. Conforme o observado, as amostras de tegumentos de sementes de soja em diferentes estágios de desenvolvimento apresentaram valores de miliunidades de oligonucleossomos (mU) diferentes, sendo mais elevados no período de 7DAP (valor médio de 3,855mU), que é um estágio no qual o tegumento ainda está em fase de intensa divisão celular e remodelamento histológico, o que sugere a ocorrência eventos de morte celular em grande proporção. A intensidade dos eventos de MCP aparenta reduzir-se, já que com 22DAP (parte final do desenvolvimento), os valores de miliunidades de oligonucleossomos atingiram uma média de 1,45mU, indicando que o processo de remodelamento tecidual esteja próximo de sua fase final, tendo em vista que a semente está próxima ao seu período de quiescência. Com relação às sementes quiescentes, foi detectável uma quantidade de oligonucleossomos similar à encontrada a partir de sementes em 22DAP, o que sugere que mesmo neste estágio, eventos ligados a MCP possam estar ocorrendo.

Considerando o padrão de detecção de DNA fragmentado ao longo do desenvolvimento do tegumento, bem como a natureza das atividades enzimáticas encontradas a partir dos tegumentos de sementes quiescentes de *G. max*, que revelaram atividades caspase-símile, formulou-se a hipótese da participação de uma metacaspase no evento estudado, considerando que estas enzimas têm sido cogitadas como peças importantes para a execução do programa de morte celular em vegetais.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como uma de suas metas, a elucidação da estrutura tridimensional e o conhecimento de propriedades estruturais que são importantes para a organização de uma metacaspase do tipo II de *Glycine max* (metacaspase 4) para uma melhor compreensão da posição de uma enzima desta natureza no cenário de MCP do tegumento de sementes de soja.

A análise das sequências dos segmentos protéicos p20 e p10 claramente demonstra diferenças de sequência aminoacídica entre as metacaspases e caspases. Apesar disso, como constatado nas figuras 12 e 13, os segmentos puderam ser alinhados e apresentaram em posições conservadas os seus resíduos de aminoácidos catalíticos além de outros resíduos com cadeias laterais com propriedades físico-químicas parecidas, o que é importante para a formação de estruturas secundárias similares. Dentre as estruturas secundárias de p20, seis sequências peptídicas participam da composição de α -hélices e hélices de passo 3-10 e sete integram conformações β ; para p10, três sequências integram α -hélices e hélices de passo 3-10 e duas compõem conformações β . Em conjunto essas estruturas se organizam de uma forma típica observada em proteases cisteínicas da família C14 do clã CD, que inclui caspases e metacaspases (Trobacher *et al.*, 2006). O modelo contruído a partir da sequência da metacaspase de soja figura (14 A e B) utilizando como molde a proteína 3BIJ mostra que estas sequências se organizam de forma a apresentar uma região de folha beta na posição central circundada por 5 α -hélices, com os resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo localizados em um dos pólos do eixo central da enzima, fora da estrutura de folhas β e α -hélices.

A sequência molde utilizada no presente trabalho, foi a cadeia A de uma proteína ainda não caracterizada funcionalmente (3BIJ) de *Geobacter sulfurreducens*. Essa mesma proteína foi utilizada por Dudkiewicz e Piszczek, em 2012 para a predição de um modelo para uma metacaspase II de *Triticum aestivum*. De forma interessante, ela mostrou-se um melhor molde para a metacaspase em

questão do que a caspase 7 humana, com a qual também compartilhou alta similaridade. Carmona-Gutierrez *et alii*, em 2010, destacam que, pelo fato de caspases ocorrerem em animais enquanto metacaspases serem presentes em todos os reinos exceto o animal, por estas enzimas apresentarem especificidade de clivagem após resíduos de aminoácidos diferentes e pelo recente registro de substratos em comum (Sundstrom *et al.*, 2009), estes grupos enzimáticos provavelmente apresentam origem evolutiva compartilhada, o que é reforçado e explica o fato de o molde encontrado no presente trabalho ser uma proteína procariótica que apresenta similaridade com duas metacaspases e com a caspase 7.

Outro fato interessante foi o posicionamento conservado dos resíduos de arginina e ácido aspártico catalíticos (figura 12). Isso se deu, pois apesar da diferença química apresentada entre eles, os mesmos interagem de maneira semelhante com a díade catalítica His-Cys, atuando como nucleófilos promotores da polarização do átomo de carbono do grupo carboxil da ligação peptídica sésil em conjunto com um buraco oxianiônico, de modo a permitir a hidrólise da mesma, como apresentado na figura 1, elaborada por van der Hoorn (2008). A diferença química apresentada pelos resíduos de ácido aspártico, que possui caráter ácido, e a arginina, que tende a exibir um caráter básico, presentes na cadeia p10 de metacaspases e caspases, respectivamente, contribuiria para explicar a diferença observada no padrão de clivagem de seus substratos.

Curiosamente, uma série de trabalhos recentes tem demonstrado que existe uma diferença de especificidade de clivagem de substratos entre caspases e metacaspases. A metacaspase recombinante mclIPa de *Picea abies* mostrou-se eficiente na clivagem de substratos com sequência peptídica EGR e GRR, enquanto não clivou VEID e YVAD, que são clivados por caspases (Bozkov *et al.*, 2005). Em 2008, He *et alii* demonstraram que a metacaspase 8 recombinante de *Arabidopsis thaliana* também foi eficiente na clivagem do substrato com a sequência GRR, sendo incapaz de clivar DEVD, VEID, IETD e YVAD. Essa diferença na natureza das atividades enzimáticas de metacaspases e caspases têm gerado discussões abertas na literatura. A própria denominação caspase (originada a partir de sua especificidade de clivagem após resíduos de ácido aspártico) dá abertura a essas discussões neste contexto face às particularidades apresentadas por metacaspases e caspases. Carmona-Gutierrez *et alii* (2010) sugerem que metacaspases e caspases apresentam características que preenchem os critérios de homologia, por

participarem de um programa celular comum, por compartilharem substratos e pelo fato de genes de metacaspases estarem presentes em todos os organismos exceto em animais superiores, os quais apresentam caspases. Dessa forma, para os autores, genes de caspases seriam evolutivamente derivados de metacaspases. Em resposta, Enoksson e Salvesen (2010) defendem que leveduras e plantas, nos quais os relatos de metacaspases têm se concentrado, possuem programas de MCP, mas não apoptose, que é uma inovação do reino animal e que mesmo que metacaspases e caspases compartilhem evolutivamente sua estrutura tridimensional, a especificidade de clivagem diferente apresentada pelas mesmas, indicaria que estas são derivadas de um ancestral comum, que não é nem uma caspase nem uma metacaspase. Esse cenário seria apoiado pelo que foi sugerido por Aravind e Koonin (2002), no qual suas análises demonstraram que metacaspases possuem similaridades com homólogos de α -proteobactéria, grupo ao qual pertenceu o ancestral endossimbionte da mitocôndria, sendo assim a origem de metacaspases seria bacteriana. Também foi demonstrado que homólogos bacterianos de proteases relacionadas às caspases mostram maior diversidade na distribuição filética, arquitetura de domínios e de sequências que suas contrapartes eucarióticas, sugerindo uma transferência de genes de bactérias para eucariotos e, portanto, a distribuição de membros da família caspase-símile (proteínas relacionadas às caspases) assume múltiplas infusões de genes bacterianos (Dudkiewicz e Piszczek, 2012).

Neste âmbito, a elucidação estrutural dos segmentos p20 e p10, assim como a sua integração no modelo tridimensional gerado para a metacaspase II de *Glycine max* contribuiria para trabalhos futuros de reconhecimento de substratos da enzima em questão, a partir de simulações de interações do modelo com sequências de substratos diversos em estudos *in silico*, servindo, como guia para uma procura por substratos relacionados a MCP que estejam presentes no tegumento de sementes de soja.

6- CONCLUSÕES

- ❖ Atividades de proteases em condições favoráveis à ação enzimática de proteases cisteínicas foram detectadas por zimografia do extrato protéico de tegumentos de sementes quiescentes de *Glycine max*.
- ❖ O extrato protéico também exibiu atividades caspase-símile, contra os substratos Ac-DEVD-pNa, Ac-VEID-pNa e Ac-LHED-pNa, em ensaios *in solutio*.
- ❖ As atividades contra Ac-DEVD-pNa e Ac-VEID-pNa foram inibidas quando em presença dos inibidores Ac-DEVD-CHO e Ac-VEID-CHO, respectivamente.
- ❖ Uma das bandas de atividade visualizadas *in gel* exibiu termoestabilidade (banda entre 45-66 KDa), permanecendo ativa mesmo após tratamento de fervura de 15 minutos a 97°C.
- ❖ Amostras de tegumentos de sementes de *Glycine max* exibiram uma taxa decrescente de fragmentação de DNA nuclear ao longo das fases de desenvolvimento que precedem sua quiescência.
- ❖ O modelo estrutural predito a partir da metacaspase II de *Glycine max* foi compatível com o apresentado por outras proteínas da família C14 do clã CD de proteases cisteínicas, utilizando uma proteína de *Geobacter sulfurreducens* como molde.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amiesen, J.C., Idzorek, T., Billaut-Mulot, O., Loyens, M., Tissier, J.P., Potentier, A., Ouaisssi, A. (1995) Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death and Differentiation*. 2:285-300.
- Asp, T., Bowra, S., Borg, S., Holm, P.B. (2004) Molecular cloning, functional expression in *Escherichia coli* and enzymatic characterization of a cysteine protease from white clover (*Trifolium repens*). *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*. 1699:111-122.
- Baehrecke, E.H. (2003) Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation*. 10: 940-945.
- Balk, J., Leaver, C.J., McCabe, P.F. (1999) Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *Febs Letters*. 463:151-4.
- Battelli, R., Lombardi, L., Rogers, H.J., Picciarelli, P., Lorenzi, R., Ceccarelli, N. (2011) Changes in ultrastructure, protease and caspase-like activities during flower senescence in *Lilium longiflorum*. *Plant Science*. 180:716-725.
- Beeckman, T., De Rycke, R., Viane, R., Inzé, D. (2000) Histological study of seed coat development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*. 113:139-148.
- Beers, E.P., Woffenden, B.J., Zhao, C.S. (2000) Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology*, 44:399-415.
- Bidle, K.D., Haramaty, L., Barcelos e Ramos, J., Falkowski, P. (2007) Viral activation and recruitment of metacaspases in the unicellular coccolithophore, *Emiliania huxleyi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104:6049-6054.
- Bonneau, L., Ge, Y., Drury, G.E., Gallois, P. (2007) What happened to plant caspases? *Journal of Experimental Botany*. 59:491-499.
- Bosabalidis, A.M. (1994) Developmental features of autophagy in aging secretory cells of *Tamarix aphylla* L. salt glands. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*. 26:473-479.
- Bozhkov, P.V., Filonova, L.H., Suarez, M.V., Helmerssom, A., Smertenko, A.P., Zhivotovsky, B., Von Arnold, S. (2004) VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death and Differentiation*. 11:175-182.
- Bradford, M.M. (1976) 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.

- Cain, K., Brown, D.G., Langlais, C., Cohen, G.M. (1999) Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *The Journal of biological chemistry*. 274:22686-22692.
- Cang, H.X, Chen, M.E., Nymeyer, H. (2006) NOC: a free molecular explorer for protein structure visualization, validation and analysis. Florida: Nymeyer's group, Institute of Molecular Biology, Florida State University.
- Caporali, E.I., Spada, A., Marziani, G., Failla, O., Scienza, A. (2003) The arrest of development of abortive reproductive organs in the unisexual flower of *Vitis vinifera* ssp. *silvestris*. *Sexual Plant Reproduction*. 15:291-300.
- Carmona-Gutierrez, D., Fröhlich, K., Kroemer, G., Madei, F. (2010) Metacaspases are caspases. Doubt no more. *Cell Death and Differentiation*. 17:377-378.
- Chen, S., Dickman, M.B. (2004) Bcl-2 family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides. *Journal of Experimental Botany*. 55:2617-2623.
- Chichkova, N.V., Kim, S.H., Titova, E.S., Kalkum, M., Morozov, V.S., Rubtsov, Y.P., Kalinina, N.O., Taliansky, M.E., Vertapetian, A.B. (2004) A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *The Plant Cell*. 16:157-171.
- Chichkova, N., Galiullina, R.A., Taliansky, M.E., Vartapetian, A.B. (2008) Tissue disruption activates a plant caspase-like protease with TATD cleavage specificity. *Plant stress*. 2:89-95.
- Clarke, P. G. (1990) Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology*. 181:195–213.
- Coffeen, W.C., Wolpert, T.J. (2004) Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell*. 16:857-863.
- Dangl, J., Deitrich, R., Thomas, H. (2000) Senescence and Programmed Cell Death. In: Buchanan, B.B., Wilhelm G., Russell, L. J. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville: Courier. 1045-1100.
- Darehshouri, A., Affenzeller, M., Lütz-Meindl, U. (2008) Cell death upon H₂O₂ induction in the unicellular green alga *Micrasterias*. *Plant Biology*. 10:732-745.
- Del Pozo, O.; Lam, E. (1998) Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Current Biology*. 8:1129-1132.
- Doong H, Vrailas A, Kohn EC. (2002) What's in the 'BAG'? A functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Letters*. 188:25-32.
- Drew, M.C., He, C.J.C, Morgan, P.W. (2000) Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Science*. 5:123-127.

- Dudkiewicz, M.Z., Piszczek, E. (2012) Bacterial putative metacaspase structure from *Geobacter sulfurreducens* as a template for homology modeling of type II *Triticum aestivum* metacaspase (TaeMCAII). *Acta Biochimica Polonica*. 54:401-406.
- Dunn, M.J., Crisp, S.J. (1994) Detection of Proteins in Polyacrylamide Gels Using an Ultrasensitive Silver Staining Technique. In: Walker, J. *Methods in Molecular Biology*, Humana Press: New York. 113-118.
- Dunn, B.M. (2001) Determination of protease mechanism. In: Beynon, R.J., Bond, J.S. *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press. 77-104.
- Enoksson, M., Salvesen, G.S. (2010) Metacaspases are not caspases- always doubt. *Cell Death and Differentiation*. 17:1221.
- Fukuda, H. (2000) Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Molecular Biology*. 44:245-253.
- Gaussand, G.M.D. (2007) Programmed cell death in plants and caspase-like activities. Department of Molecular and Developmental Genetics, Institute of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Leiden University.
- Goldstein, P., Kroemer, G. (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*. 32:37-43.
- Gozuacik, D., Kimchi, A. (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*.12:2891-2906.
- Green, A.A., Huges, W.L. (1955) Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Academic Press In*. 1:67-90.
- Grudkowska, M., Zagdanska, B. (2004) Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*. 51:609-624.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*. 305:855-858.
- He, R., Drury, G.E., Rotari, V.I.; Gordon, A., Willer, M., Tabasum, F., Woltering, E.J., Gallois, P. (2008) Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by UV and H₂O₂ in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*. 283:774-783.
- Heath, M.C. (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*. 44:321-334.
- Hoerberichts, F.A., ten Have, A., Woltering, E.J. (2003) A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta*. 217:517-522.

- Hunter, D.A., Steele, B.C., Reid, M.S. (2002) Identification of genes associated with perianth senescence in daffodil (*Narcissus pseudonarcissus* L. 'dutch master'). *Plant Science*. 163:13-21.
- Jinka, R., Ramakrishna, V., Rao, S.K. (2009) Purification and characterization of cysteine protease from germinating cotyledons of horse gram. *BMC Biochemistry*. 10:314-320.
- Juge, N., Payan, F., Williamson, G. (2004) XIP-I, a xylanase inhibitor protein from wheat: a novel protein function. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1696:203-11.
- Kang, C.H., Jung, W.Y., Kang, Y.H., Kim, J.Y., Kim, D.G., Jeong, J.C., Baek, D.W., Jin, J.B., Lee, J.Y., Kim, M.O., Chung, W.S., Mengiste, T., Koiwa, H., Kwak, S.S., Bahk, J.D., Lee, S.Y., Nam, J.S., Yun, D.J., Cho, M.J. (2006) AtBAG6, a novel calmodulin-binding protein, induces programmed cell death in yeast and plants. *Cell death and differentiation*. 13:84-95.
- Kaplan, D.R., Dengler, N.G., Dengler, R.E. (1982) The mechanism of plication inception in palm leaves: problem and developmental morphology. *Canadian Journal of Botany*. 60:2939-2975.
- Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L., Schwede, T. (2009) The SWISS-MODEL repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*. 37:387-392.
- Koonin, E.V., Aravind, L. (2002) Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death and Differentiation*. 9:394-404.
- Korthout, H.A., Berecki, G., Bruin, W., van Duijn, B., Wang, M. (2000) The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells. *FEBS Letters*. 475:139-144.
- Kuroyanagi, M., Nishmura M., Hara-Nishmura, I. (2002) Activation of *Arabidopsis* vacuolar processing enzyme by self-catalytic removal of an auto-inhibitory domain of the C-terminal propeptide. *Plant and Cell Physiology*. 43:143-151.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lee, N., Bertholet, S., Debrabant, A., Muller, J., Duncan, R., Nakhasi, H.L. (2002) Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death and Differentiation*. 9:53-64.
- Lennon, S.V., Martin, S.J., Cotter, T.G. (1991) Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Proliferation*. 24:203-214.
- Liljeroth, E. e Bryngelsson, T. (2001) DNA fragmentation in cereal roots indicative of programmed root cortical cell death. *Physiologia plantarum*. 111:365-372.
- Lima, R.M. (2001) Proteinases cisteínicas e serínicas presentes em sementes de *Vigna unguiculata* em maturação, quiescentes e germinação. Dissertação de mestrado - Campos dos Goytacazes - RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 80 p.

- Lima, N.B., Oliveira, A.E.A., Fernandes, K.V.S. (2012) Programmed cell death in plants: the tip of the iceberg. *Recent Research Developmetal Biochemistry*. 10:13-31.
- Lombardi, L., Casani, S., Ceccarelli, N.; Galleschi, L., Picciarelli, P., Lorenzi, R. (2007) Programmed cell death of the nucellus during *Sechium edule* Sw. seed development is associated with activation of caspase-like proteases. *Journal of Experimental Botany*. 58:2949-2958.
- Maynard Smith, J., Szathmary, E. (1997) The major transitions in evolution. *Oxford University Press*.
- Matsumura, H., Nirasawa, S., Kiba, A., Urasaki, N., Saitoh, H., Ito, M., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H. and Terauchi, R. (2003) Overexpression of Bax-inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. *The Plant Journal*. 33:425-434.
- McLuskey, K., Rudolf, J., Proto, W.R., Isaacs, N.W., Coombs, G.H., Moss, C.X., Mottram, J.C. (2012) Crystal structure of a *Trypanosoma brucei* metacaspase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109:7469-7474.
- Mohamed Ahmed, I.A., Morishima, I., Babiker, E.E., Mori, N. (2009) Dubiumin, a chymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium* Fresen. *Phytochemistry*. 70:483-491.
- Moïse, J.A., Han, S., Gudynait-Savitch, L., Johnson, D.A., Miki, B.L.A. (2005) Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 41:620-644.
- Nadeau, J.A., Zhang, X.S., Li, J., O'Neill, S.D. (1996) Ovule development: Identification of stage-specific and tissue-specific cDNAs. *Plant Cell*. 8:213-239.
- Nakaune, S., Yamada, K., Kondo, M., Kato, T., Tabata, S., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2005) A vacuolar processing enzyme, deltaVPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *Plant Cell*. 17:876-887.
- Obara, K., Kuriyama, H., Fukuda, H. (2001) Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in *Zinnia*. *Plant Physiology*. 125:615-626.
- Obendorf, R.L. (2008) Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research*. 7:63-74.
- Otto, G.P., Wu, M.Y., Kazgan, N. (2003) Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Biological Chemistry*. 278:17636-17645.
- Pennel, R.I., Lamb, C. (1997) Programmed cell death in plants. *The Plant Cell*. 9:1157-1168.
- Peterbauer, T., Richter, A. (1998) Galactosyl ononitol and stachyose synthesis in

seeds of adzuki bean. Purification and characterization of stachyose synthase. *Plant Physiology*. 117:165-172.

Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G.; Gabai, V.L. (2003) Necrosis a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research*. 283:1-16.

Qiang, X., Zechmann, B., Reitz, M.U., Kogel, K.H., Schäfer, P. (2012) The mutualistic fungus *Piriformospora indica* colonizes *Arabidopsis* roots by inducing an endoplasmic reticulum stress-triggered caspase-dependent cell death. *Plant Cell*. 24: 794-809.

Rawlings, N.D., Morton F.R., Barrett A.J. (2006) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*. 34:270-272.

Reape, T.J., Molony, E.M., McCabe, P.F. (2008) Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of Experimental Botany*. 59:435-444.

Robertson, J.D., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2000) Review: nuclear events in apoptosis. *Journal of Structural Biology*. 129:346-58.

Rodriguez, J., Lazebnik, Y. (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes and Development*. 13:3179-3184.

Rocha, G.L. (2011) Atividades de Proteases Cisteínicas e Morte Celular Programada em Tegumentos de Sementes Quiescentes. Monografia – Campos dos Goytacazes – RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 73p.

Rojo, E., Martín, R., Carter, C., Zouhar, J., Pan, S., Plotnikova, J., Jin, H., Paneque, M., Sánchez-Serrano, J.J., Baker, B., Ausubel, F.M., Raikhel, N.V. (2004) VPEgamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Current Biology*. 14:1897-1906.

Saleh, A., Srinivasula, S.M., Acharya, S., Fishel, R., Alnemri, E.S. (1999) Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 274:17941-17945.

Schmutz, J., Cannon, S.B, Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D.L., Song, Q., Thelen, J.J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G.D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M.K, Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquis, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X., Shinozaki, K., Nguyen, H.T., Wing, R.A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker R.C. and Jackson, S.A. (2010) Genome Sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*. 463:178-183.

Schweichel J.U., Merkel H.J. (1974) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*. 7:253-266.

Smart, C.M., Hosken, S.E., Thomas, H., Greaves, J.A., Blair, B.G., Schuch, W. (1995) The timing of maize leaf senescence and characterization of senescence-related cDNAs. *Physiologia Plantarum*. 93:673-682.

Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E., Levine, A. (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant cell*. 11:431-444.

Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. (2000) Caspase assays. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. *Methods in Enzymology*. Academic Press: Massachusetts. 91-100.

Suarez, M.F., Filonova, L.H., Smertenko, A., Savenkov, E.I., Clapham, D.H., von Arnold, S., Zhivotovsky, B., Bozhkov, P.V. (2004) Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Current Biology*. 14:339-340.

Sun, Y.L., Zhao, Y., Hong, X., Zhai, Z., H. (1999) Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Letters*. 462:317-321.

Sundström, J.F., Vaculova, A., Smertenko, A.P., Savenkov, E.I., Golovko, A., Minina, E., Tiwari, B.S., Rodriguez-Nieto, S., Zamyatnin, A.A., Välineva, T., Saarikettu, J., Frilander, M.J., Suarez, M.F., Zavialov, A., Ståhl, U., Hussey, P.J., Silvennoinen, O., Sundberg, E., Zhivotovsky, B., Bozhkov, P.V. (2009) Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionarily conserved component of the programmed cell death degradome. *Nature Cell Biology*. 11:1347-1354.

Takayama, S., Krajewski, S., Krajewska, M., Kitada, S., Zapata, J.M., Kochel, K., Knee, D., Scudiero, D., Tudor, G., Miller, G.J., Miyashita, T., Yamada, M., Reed, J.C. (1998) Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer research*. 58:3116-31.

Thomas, H., Ougham, H.J., Wagstaff C., Stead A.D. (2003) Defining senescence and death. *Journal of Experimental Botany*. 54:1127-1132.

Trobacher, C.P., Senatore, A., Greenwood, J. (2006) Masterminds or minions? Cysteine proteinases in plant programmed cell death. *Canadian Journal of Botany*. 84:651-667.

Tsiatsiani, L., Van Breusegem, F., Gallois, P., Zavialov, A., Lam, E., Bozhkov, P. (2011) Metacaspases. *Cell Death and Differentiation*. 18:1278-1288.

Uren, A.G., O'Rourke, k., Aravind, I., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., Dixit V.M. (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular Cell*. 6:961-967.

van Dongen, J.T., Ammerlaan, A.M.H., Wouterlood, M., van Aelst, A.C., Borstlap, A.C. (2003) Structure and developing Pea seed coat and the post-phloem transport pathway of nutrients. *Annals of Botany*. 91:729-737.

van der Hoorn, R.A.L., Jones, J.D.G. (2004) The plant proteolytic machinery and its role in defense. *Current Opinion in Plant Biolog*. 7:400-407.

van der Hoorn, R.A.L. (2008) Plant proteases from phenotypes to molecular mechanisms. *The Annual Review of Plant Biology*. 59:191-223.

van Doorn, W.G.; Woltering, E.J. (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science*. 10:117-122.

Vartapetian, A.B., Tuzhikov, A.I., Chichkova, N.V, Taliansky, M., Wolpert, T.J. (2011) A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases. *Cell Death and Differentiation*. 18: 1289-1297.

Vercammen, D., van de Cotte, B., De Jaeger, G., Eeckhout, D., Casteels, P., Vandepoele, K., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Inzé, D., Van Breusegem, F. (2004) Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *Journal of Biological Chemistry*. 279:45329-45336.

Vercammen, D., Declercq, W., Vandenabeele, P., Van Breusegem, F. (2007) Are metacaspases caspases? *Journal of Cell Biology*, 3: 375-380.

Wakabayashi, T., Karbowski, M. (2001) Structural changes of mitochondria related to apoptosis. *Biological Signals and Receptors*. 10:26-56.

Wan, L., Xia, Q., Qiu, X., Selvaaraj, G. (2002) Early stages of seed development in *Brassica napus*: a seed coat-specific cysteine proteinase associated with programmed cell death of the inner integument. *The Plant Journal*. 30:1-10.

Wang, M., Oppedijk, B.J., Lu, X., van Duijn, B., Schilperoort, R.A. (1996) Apoptosis in barley aleurone during germination and its inhibition by abscisic acid. *Plant Molecular Biology*. 32:1125-1134.

Watanabe, N., Lam, E. (2005) Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. *Journal of Biological Chemistry*. 280:14691–14699.

Western, T.L., Skinner, D.J., Haughn, G.W. (2000) Differentiation of mucilage secretory cells of the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiology*. 122:345-356.

Windsor, J.B., Symonds, V.V., Mendenhall, J., Lloyd, A.M. (2000) *Arabidopsis* seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *The Plant Journal*. 22:483-493.

Wobus, U., Weber, H. (1999) Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biological Chemistry*. 380:937-944.

Wong, A.H.H., Yan, C., Shi, Y. (2012) Crystal structure of the yeast metacaspase YCA1. *Journal of Biological Chemistry*. 287:29251-29259.

Yoshimori, T. (2004) Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313:453-458.

Yu, L.H., Kawai-Yamada, M., Naito, M., Watanabe, K., Reed, J.C., Uchimiya, H. (2002) Induction of mammalian cell death by a plant Bax inhibitor. *FEBS Letters*. 512:308-12.

Zhang, L., Xu, Q., Xing, D., Gao, C., Xiong, H. (2009) Real-time detection of caspase-3-like protease activation in vivo using fluorescence resonance energy transfer during plant programmed cell death induced by ultraviolet C overexposure. *Plant Physiology*. 150:1773-1783.

Zhao, Y., Jiang, Z.F., Sun, Y.L., Zhai, Z.H. (1999) Apoptosis of mouse liver nuclei induced in the cytosol of carrot cells. *FEBS Letters*. 448:197-200.