

Estudo funcional de inibidores de proteases do cacau (*Theobroma cacao* L.), visando o controle da morte celular em culturas celulares de *Nicotiana benthamiana*.

Ivina B. de Oliveira¹; Geiseane V. Amaral²; Lívia S. dos Santos³; Carlos P. Pirovani⁴.

¹Estudante de IC da Universidade Estadual de Santa Cruz- UESC, email: *barbosaivina@hotmail.com;

²Estudante de IC da Universidade Estadual de Santa Cruz- UESC, email: geiseane_veloso@hotmail.com;

³Discente do PPGGBM/UESC, email: liliusantana@hotmail.com;

⁴Docente do Curso de Ciências Biológicas DCB/UESC, e-mail: pirovanicp@gmail.com.

Palavras Chave: *Células em suspensão, PCD, Theobroma cacao*.

Introdução

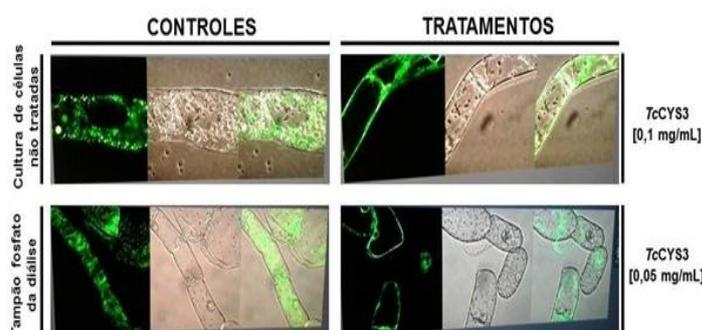
A cultura do cacau tem grande importância econômica, social e ecológica no Brasil e no mundo. A ocorrência de doenças, principalmente fúngicas, aponta a necessidade da continuidade das pesquisas moleculares e biotecnológicas voltadas para a cultura do cacau. As cistatinas, proteínas que estão presentes em diferentes espécies de plantas, apresentam atividade antifúngica. Quatro cistatinas do cacau produzidas em bactéria apresentam atividade contra o fungo da vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*). Análises preliminares indicam que as cistatinas do cacau nas mesmas concentrações que inibem o fungo, também afetam células de plantas. Desta forma o objetivo deste trabalho é caracterizar a morte celular, avaliando culturas de células de *Nicotiana benthamiana* que expressam GFP (*Green Fluorescence Protein*), submetidas a tratamentos com inibidores de cisteíno-proteases do cacau, por meio de técnicas enzimáticas e de microscopia de fluorescência. Clones de expressão em bactéria das proteínas foram utilizados para produção e purificação das proteínas. Estas proteínas foram testadas em diferentes concentrações sobre as células em suspensão produzidas no laboratório.

Resultados e Discussão

Uma cultura de células em suspensão fotossinteticamente ativa foi obtida por indução de calogênese de Explantes foliares. As cistatinas (*TcCYS3*, *TcCYS4* e região carboxi estendida da *TcCYS4*) utilizadas para o ensaio, foram expressas em células de *Escherichia coli*, purificadas por cromatografia de afinidade em coluna Histrap FF crude (GE HealthCare) e quantificadas pelo método de Bradford. As frações das proteínas obtidas foram avaliadas em SDS-PAGE, mostrando elevada pureza e homogeneidade. No ensaio de avaliação da morte celular foi utilizada somente a proteína *TcCYS3* nas concentrações 0,1 e 0,05 mg/mL. Para avaliação da morte celular durante os tratamentos as células foram observadas em microscópio óptico e microscópio confocal de epifluorescência. Para as duas doses testadas, o ensaio com GFP mostrou uma desestruturação no interior das células. No tratamento controle e com tampão fosfato a expressão do GFP foi distribuída no citoplasma. No tratamento com a proteína em quaisquer concentrações, a expressão do GFP migrou para periferia da célula, indicando uma possível desestruturação citoplasmática nas células de *N. benthamiana* (Fig. 01). Para avaliar a modulação do proteoma das células pela cistatina, proteínas totais foram extraídas de *N. benthamiana*, submetidas aos tratamentos, e quantificadas com 2D Quant kit da GE Healthcare. Em seguida, as proteínas foram submetidas a SDS-PAGE 2D em pH 3-10NL. Os géis apresentaram vários spots diferenciais, cujas proteínas podem estar envolvidas no processo de desestruturação celular. Essas proteínas

serão identificadas por espectrometria de massas e a relação de suas funções com a desestruturação celular de *N. benthamiana* provocada pela proteína *TcCYS3* será avaliada.

Figura 1. Observações das células em microscopia de epifluorescência.



Conclusões

A cistatina *TcCYS3* induz a morte celular em *N. benthamiana*, ao provocar desestruturação no interior das células em suspensão, sugerindo morte celular vacuolar. A presença de vários spots proteicos diferenciais confirma a modulação do proteoma de *N. benthamiana*, pela cistatina recombinante do cacau. A identificação dessas proteínas por espectrometria de massa, possivelmente, permitirá explicar o mecanismo pelo qual a cistatina desencadeia a morte celular.

Agradecimentos

Agradeço à Fapesb pelo apoio financeiro. A UESC pela oportunidade, aos colegas de laboratório, em especial ao LCT e Proteômica, pela ajuda e incentivo.

PIROVANI, C. P., et al. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. *Electrophoresis*, v.29, n. 11, p. 2391-401, 2008.

PIROVANI, C.P., et al. *Theobroma cacao* cistatins impair *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth and are involved in postponing cell death symptoms. *Planta*, v. 232, p.1485-1497, 2010.

SOLOMON, M., et al. A.The Involvement of Cysteine Proteases and Protease Inhibitor Genes in the Regulation of Programmed Cell Death in Plants. *The plant cell*, v.11, p. 431-443,1999.

TREMACOLDI, Célia Regina. *Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Plantas Contra Pragas*. 1ª edição, p. 9-22, 2009.