Universidade Federal do
Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Endopeptidases da *Canavalia ensiformis*:
um estudo da germinação e estágios iniciais da plântula

Diogo Ribeiro Demartini

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Orientadora:

Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Co-orientador estágio sanduíche PDEE-CAPES:

Alexander Wlodawer

Porto Alegre, Agosto de 2007

COMPOSIÇÃO DA BANCA DE DOUTORADO

_____

Prof. Dr. Arthur Fett Neto

(PPGBCM - UFRGS)

_____

Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

(Depto. Bioquímica e Biologia Molecular– UFC)

_____

Profa. Dra. Ana Maria Moura-da-Silva

(Depto. Imunopatologia– Instituto Butantan)

_____

Revisor Prof. Dra. Vera Maria Treis Trindade

(Depto. Bioquímica - UFRGS)

_____

Suplente: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

(PPGBCM - UFRGS)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Proteínas Tóxicas do Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, e no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação da Profa Dra. Célia R. Carlini. Os auxílios recebidos foram do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (MCT/PRONEX), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Parte do trabalho também foi desenvolvida no Macromolecular Crystallography Laboratory , em Frederick-MD, EUA, sob a orientação do Dr. Alexander Wlodawer, durante o período de estágio sanduíche com bolsa CAPES-PDEE.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo espetáculo da vida e pelo fato de podermos estudar as Suas manifestações nas mais diversas formas!

Agradeço profundamente aos meus pais, Vilmar Demartini e Rosa Maria Ribeiro Demartini. Sou eternamente grato pelo incentivo ao estudo, a me ensinar a questionar sobre as situações da vida, a não aceitar o que é incorreto e à busca do melhor sempre! Acima de tudo ao amor que sentimos e à dedicação e paciência comigo, principalmente nos dias prévios à defesa! Pai e Mãe, muito obrigado!

Agradeço a Profa. Dra. Célia Carlini, que há quase 10 anos me recebeu em seu laboratório, e me ofereceu uma escada à qual quis subir. Consegui subir alguns degraus, e tenho certeza que a seu ensino e amizade foram fundamentais. Faltam vários a subir, mas o empurrão inicial foi dado. Muito obrigado Célia!

Agradeço a todos os amigos do LAPROTOX, aos que estão lá, e aos que já passaram por lá. Muito obrigado pelas filosofias, churrascos e momentos de descontração que só fazem o trabalho ser cada vez melhor.

Agradeço à Ticiana Fettermann Oliveira por sua amizade, competência e dedicação ao trabalho no tempo em que trabalhamos juntos!

Agradeço aos professores Arthur Fett Neto e Carlos Termignoni pelas inúmeras sugestões ao longo destes anos, como membros da Comissão de Acompanhamento.

Agradeço ao Prof. Carlos Termignoni e Prof. Jorge Guimarães, estendido a todos os seus alunos, pelo uso das instalações dos seus laboratórios, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Da mesma forma, agradeço ao Prof. Arthur e seus alunos pelas várias vezes em que fiz uso das suas salas de germinação.

Agradeço à Silvia e ao Luciano pela competência e agilidade.

Agradeço ao Dr. Alexander Wlodawer, do Macromollecuar Crystallography Laboratory, NCI, Frederick, MD, USA, por ter me recebido como um amigo de longa data, quando fiz estágio de doutorado no seu laboratório.

Agradeço às demais pessoas durante meu estágio nos EUA: Susan Matheson, por ter me ajudado de forma incondicional; Jerry Alexandratus: por sua ajuda contínua nos experimentos e explicações; Nicole LaRonde-LeBlank: por ter me ensinado e me ajudado muito em experimentos de cristalografia que foram feitos. Às demais pessoas do laboratório, que de uma forma ou de outra me ajudaram.

Agradeço à Anne Moussburg: por ter me recebido em sua casa também como um amigo de longa data

Agradecimento especial ao Dr. Douglas Luster (Foreign Disease-Weed Science, USDA – Frederick, MD, USA), pelo uso da Greenhouse e inúmeras discussões a respeito do andamento do trabalho.

Agradeço à Profa. Vera Trindade, que me apresentou ao mundo das enzimas na disciplina de Bioquímica I, e que fez a revisão desta tese de doutorado.

Aos meus parentes e amigos que me apoiaram e apóiam nesta jornada!

A todos os Mestres e discípulos que me ajudaram a chegar até aqui!

Ao meu esforço, pois sem ele não chegaria aqui!

Muito obrigado!!!

Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o Senhor e através do céu, passavam cenas da minha vida.

Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era meu e o outro era do Senhor.

Quando a última cena passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver. Isso me aborreceu deveras e perguntei então ao Senhor:

- Senhor, Tu me disseste que, uma vez que resolvi te seguir, Tu andarias sempre comigo, em todo o caminho. Contudo, notei que durante as maiores atribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo porque nas horas em que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixaste sozinho.

O Senhor me respondeu:

- Meu querido filho. Jamais eu te deixaria nas horas de provas e de sofrimento. Quando viste, na areia, apenas um par de pegadas, eram as minhas. Foi exatamente aí que eu te carreguei nos braços.

Do livro "Pegadas na areia" - Margareth Fishback Powers - Ed.Fundamento

Introdução 12
1 Germinação e endopeptidases 13
2 *Canavalia ensiformis* ou feijão-de-porco 19
3 As ureases e a canatoxina 19
3.1 Canatoxina 20
3.2 Papel fisiológico de urease/canatoxina na *Canavalia ensiformis* 21
3.3 Efeito entomocida e mecanismo de ação da urease/canatoxina em insetos 22
4 Peptidases 24
4.1 Serino-Carboxil Endopeptidases 29

Objetivos 32

Metodologia 33
1 Sementes e Condições de germinação 34
2 Produção dos extratos brutos dos materiais vegetais 34
2.1 Produção dos extratos brutos ultrafiltrados 35
2.2 Determinação do conteúdo de proteínas 35
3 Cromatografias 36
3.1 Cromatografia de troca catiônica 36
3.2 Cromatografia de troca aniônica 37
3.3 Cromatrografia de Gel Filtração 38
3.4 Cromatografia de Afinidade em Pepstatina-A Agarose® (Sigma) 38
4 Ensaios enzimáticos 39
4.1 Ensaios enzimáticos com substratos macromoleculares 39
4.2 Ensaio para aspártico proteases e sedolisinas 40
4.3 Ensaio para serino proteases e cisteíno proteases 41
5 Preparo da urease e medida da atividade ureásica 42
6 Preparo do peptídeo recombinante Jaburetox-2ec 42
7 Ensaios com espectrometria de massas 43
7.1 Determinação do ponto de hidrólise de Abz-AIAFFSRQ-EDDnp 43
7.2 Digestão tríptica de proteínas para seqüenciamentos por MS/MS 44
8 Seqüenciamento N-terminal 44
9 Eletroforeses 45
10 Ensaios Imunológicos 45
10.1 Dot Blot 46
10.2 Western Blot 47
10.3 Elisa 47
10.4 Anticorpos 48
11 Degradação *in vitro* (auto-digestão) das proteínas endógenas da semente 48
12 Ensaio biológico com *Dysdercus peruvianus* 50
13 Ensaios do Capítulo 3 51
13.1 Determinação do *KM* 51
13.2 Hidrólise de substratos macromoleculares 52

Resultados 53

Capítulo 1: Estudo da germinação e mobilização de ureases em *Canavalia ensiformis* 54
1 Resultados gerais sobre a germinação 55
2 Produção dos extratos integrais 56
2.1 Ensaios de atividade inseticida com extratos integrais 57
2.2 Ensaios de atividade inseticida com extratos ultrafiltrados 60
3 Atividade ureásica e mobilização das ureases durante a germinação 61
4 Estudo de auto digestão em pH 4.0 65
5 Estudo de auto digestão em pH 8.0 68

Capítulo 2: Endopeptidases acídicas da *Canavalia ensiformis* 70
1 Purificação parcial de uma enzima sensível à pepstatina-A e à tirostatina presente em sementes germinantes de *C. ensiformis* 74
1.1 Determinação do ponto de hidrólise do substrato Abz-AIAFFSRQ-EDDNp ... 79
1.2 Seqüenciamento de peptídeos internos da enzima oriundos de hidrólise tríptica e seqüenciamento N-terminal 80
2 Purificação parcial de uma enzima tipo aspártico-protease por cromatografia de afinidade por Pepstatina-A agarose 87

Capítulo 3: Endopeptidases serínicas da *Canavalia ensiformis* 90

1 Estudos comparativos da expressão de serino proteinases em sementes quiescentes e plântulas de *Canavalia ensiformis* 91
2 Estudos comparativos entre as enzimas Q-SP e C-SP 105
3 Resultados 105

Discussão 108

Conclusões 118

Referências Bibliográficas 119

Anexo 1 – CURICULUM VITAE 126

Resumo

Endopeptidases de diversas classes da semente quiescente e plântulas de *Canavalia ensiformis* foram investigadas neste trabalho. Aplicando técnicas de purificação e caracterização de proteínas identificamos e isolamos endopeptidases representantes de aspártico endopeptidases, serino endopeptidases, e uma enzima forte candidata à ser uma sedolisina, uma família de endopeptidases serínicas ainda não descrita em plantas. Também investigamos a mobilização da urease/canatoxina, isoformas de proteínas inseticidas presentes nas sementes da *Canavalia ensiformis*. Por estudos de auto-digestão e análise por técnicas imunoquímicas, foi possível observar a ação de enzimas atuantes em pH 4 sobre a urease/ canatoxina. Os fragmentos derivados da urease formados pelas enzimas da própria planta são diferentes do fragmento liberado pela hidrólise da canatoxina por catepsinas digestivas nos insetos suscetíveis alimentados com a proteina. Duas enzimas atuantes em pH ácido forma caracterizadas, sendo que o n-terminal e fragmentos oriundos por hidrólise tríptica da enzima de *C. ensiformis* sensível à tirostatina revelaram similaridade com metaloproteínas e metaloproteases. Também foi possível a caracterização de uma atividade serino endopeptidásica presente ao longo de todo o processo germinativo e de desenvolvimento inicial da planta. Concluímos que a *Canavalia ensiformis* possui diversos sistemas enzimáticos atuando durante a germinação, e que a urease foi hidrolisada por enzimas endógenas da planta em pH ácido, da mesma forma que acontece nos insetos suceptíveis ao efeito tóxico da proteína, mas liberando fragmentos diferentes. Entre as endopeptidases da planta caracterizadas neste trabalho, identificamos uma enzima com características de uma sedolisina, uma família de proteínas ainda não descrita em vegetais.

Abstract

Endopeptidases from the quiescent seed and early stages of developing *Canavalia ensiformis* plants were studied in this work. Using raw protein extract purification and separation approaches, we were able to characterize aspartic and serine endopeptidases. An enzyme with characteristics to be a candidate of sedolisin family, which belongs to serine endopeptidase class, was also characterized. This enzyme family was not described in plants yet. The mobilization of urease/canatoxin, isoforms of an entomotoxic protein, present in *Canavalia* seeds, was also investigated. Using immunological techniques, we demonstrated that urease/ canatoxin is hydrolyzed by endogenous acidic enzymes which release peptides different from those formed by cathepsins B and D in susceptible insects fed with the insecticidal protein. Two acidic enzymes were purified and characterized. The N-terminal sequence and MS-analysis of trypsin peptides of a tyrostatin sensitive enzyme indicate its similarity with metaloproteins and metalloproteinases. Serine endopeptidase activities found in the quiescent seed and during early stages of germination and in developing plants were also described. In summary, different enzymatic mechanisms participate in germination and early development of *Canavalia ensiformis* plants. Urease /canatoxin was hydrolyzed by acidic endopeptidases present in the seed but the released fragments are different from those formed by insect digestive enzymes. Among the endopeptidases described in this work we found evidences of the presence of a sedolisin, a type of enzyme so far reported in plants

Lista de Abreviaturas

1- 1D, nD: material vegetal de n dias de germinação e/ou crescimento;

2- Anti-: anticorpo anti-

3- BZ: benzamidina;

4- C: cotilédones;

5- CNTX: canatoxina;

6- C-SP: serino endopeptidase de cotilédones;

7- D-Pro-Phe-Phe-MCA: D-prolina-fenilalanina-fenilalanina-7-amido-4-metilcumarina;

8- D-Pro-Phe-Arg-MCA: D-prolina-fennilalanina-arginina-7-amido-4-metilcumarina;

9- DL-BApNA: *N*α-benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida

10- DMF: *N*,*N*-dimetillformamida;

11- DMSO: dimetilsulfóxido;

12- DTT: dithiothrietol;

13- EB: extrato bruto;

14- EBUF: extrato bruto ultra filtrado;

15- E-64: L-trans-epoxisuccinil-leucilamido-butano;

16- EDTA: ácido etiledo diaminotetracético

17- Q: sementes;

18- Q-SP: serino endopeptidases de sementes quiescentes;

19- TBS, TTBS: solução TRIS HCl salina: 10 mM TRIS + 137 mM NaCl pH 7,4, acrescido de 0,05% Tween® 20 no caso do TTBS;

20- Z-Arg-Arg-MCA: *N*-benzoilcarbonil-L-arginil-L-arginina-7-amido-4-metilcumarina;

Introdução

1 Germinação e endopeptidases

O processo de germinação em sementes é bastante complexo e finamente regulado (Muntz *et al.,* 2001). De acordo com Bewly and Black**.,** 1985, a germinação começa quando a semente inicia o processo de absorção de água (embebição). São vários os critérios que determinamo término da germinação, podendo ser morfológicos e até moleculares (Hiraiwa *et al.,* 1997; Schernthaner *et al.,* 2003). Segundo critério morfológicos, diz-se que a germinação terminou quando a radícula rompe a testa da semente (Muntz *et al.,* 2001; Tiedemann *et al.,* 2001).

Durante a germinação, a semente usa fontes endógenas de energia para o seu crescimento, sendo que o nitrogênio reduzido, encontrado nas proteínas de reserva que serão mobilizadas, é um dos componentes essenciais para o crescimento da planta (Gruis *et al.,* 2002). As sementes também utilizam lipídeos e carboidratos como fonte de energia durante a germinação. De acordo com Jiang *et al.,* 2001, os corpos protéicos em grande parte das sementes são compostos por três regiões distintas: matriz, “cristalóide” e “globulóide”. As proteínas de estoque encontram-se nas regiões matriz e cristalóide, sendo que a região “globulóide” contém ácidos fíticos e cristais.

Um aspecto ainda não completamente esclarecido diz respeito às peptidases que participam dos processos de maturação e germinação de sementes. Diversas famílias de enzimas estão envolvidas, ocorrendo compartimentalizadas em diferentes localizações sub-celulares. Algumas estão pré-armazenadas como

zimogênios, enquanto outras são sintetizadas já ativas, no momento da sua necessidade.

A presença em sementes de endopeptidases acídicas, das classes das aspártico-proteinases e das cisteíno-proteinases tem sido descrita, bem como o envolvimento dessas na germinação e mobilização de proteínas de reserva das sementes (Hiraiwa *et al.,* 1997; Sutoh *et al.,* 1999; Tiedemann *et al.,* 2001). Em sementes de dicotiledôneas, cisteíno-endopeptidases parecem ser responsáveis pela mobilização de proteínas endógenas (Tiedemann *et al.,* 2001).

O acúmulo de proteínas de reserva nas sementes de dicotiledôneas ocorre principalmente durante a fase intermediária e final do processo de maturação. As proteínas de reserva são depositadas nos corpos protéicos, oriundos do retículo endoplasmático. Durante o período em que as proteínas estão sendo depositadas na semente em maturação, elas estão protegidas contra o ataque de endopeptidases endógenas (Muntz *et al.,* 2001). De acordo com Antao & Malcata, 2005, serino proteases são sintetizadas durante o processo de apoptose de células de *Zinnia elegans* L., e mantidas inativas nas vacúolos. Quando ocorre a diferenciação celular e crescimento da parede celular secundária, estas enzimas atuam sobre esta parede, promovendo um influxo de Ca^{+2} para a célula, e com isso, a morte da mesma. Ou seja, a serino protease funciona como um regulador.

A presença de cisteíno endopeptidases também é bastante relatada na cevada; Zhang & Jones, 1996, relataram a presença de até 46 diferentes

endopeptidases identificadas no 4º dia de germinação, sendo que não se sabe o quão ativa elas são, e quais são zimogênios ou não.

A mobilização das substâncias de reserva da semente não ocorre simultaneamente em todas as células, mas sim em tempos e locais bastante diferenciados (Tiedemann *et al.,* 2001). Nesta etapa, há uma população enzimática variada atuando nas diferentes partes da planta nascente. Precursores enzimáticos são sintetizados no retículo endoplasmático, e são transportados para o interior dos corpos protéicos. Após ativação das enzimas, ocorre a hidrólise das proteínas endógenas.

A atividade de endopeptidases é bastante específica quanto aos substratos hidrolisáveis, ao tecido ou órgão, e o estágio de desenvolvimento em que ocorre sua expressão. De acordo com Sutoh *et al.,* 1999, uma endopeptidase está envolvida no processo de degradação de proteínas de reserva da semente quando atende às três situações abaixo:

- tanto a enzima quanto o seu substrato devem ser encontrados no interior dos corpos protéicos;
- a endopeptidase deve agir sobre o substrato, degradado ou não, *in vitro*;
- deve haver uma correspondência entre os tempos de ensaio *in vitro* com o tempo transcorrido para a degradação da proteína *in vivo;*

Diversas enzimas podem ser detectadas em sementes quiescentes, ou germinadas por diferentes períodos de tempo. Observa-se, na germinação, um

visível deslocamento das atividades enzimáticas detectadas para outros tecidos ou localizações sub-celulares, associado à degradação de substratos protéicos. Com 7 dias de germinação de sementes de *Vicia sativa* L., por exemplo, é possível detectar-se o aparecimento e aumento de três tipos diferentes de atividades proteolíticas dentro dos corpos protéicos, com afinidade por substratos bastante distintos (Muntz *et al.,* 2001; Tiedemann *et al.,* 2001), ocorrendo posteriormente um decréscimo dessas atividades (Sutoh *et al.,* 1999).

Considerando da semente quiescente até o final da germinação, quando ocorre o rompimento da testa da semente pela radícula, há um conjunto definido de enzimas atuantes; a partir deste momento, ocorre uma mudança nas proteinases presentes na semente germinante e/ou na plântula (Sutoh *et al.,* 1999). São enzimas das mesmas famílias das anteriores, mas com afinidade por substratos diferentes, eventualmente passam também a ter localização tecidual ou sub-celular diferente, se comparado antes e após o término da germinação. Tiedemann *et al.* (2001), estudaram por microscopia eletrônica a mobilização de proteases em sementes, ao longo da germinação. Nesse artigo os autores mostraram que cisteíno-proteinases tipo B hidrolisam a globulina de reserva somente após o ataque inicial de uma cisteíno-proteinase, tipo papaína, ou seja, evidenciando um sistema de cascata enzimática.

Uma endopeptidase aspártica composta de duas cadeias de 32 kDa e 16 kDa, presente nos vacúolos da semente de mamona foi descrita por Hiraiwa *et al.,*

1997, como responsável pela hidrólise de proteínas armazenadas no vacúolo, sendo que seu conteúdo aumenta ao longo da germinação.

Diversos são os mecanismos de controle da expressão de proteases envolvidas no processo de degradação de proteínas endógenas em sementes:

- aparecimento de novas proteases, sejam elas sintetizadas *de novo* ou ativadas a partir de zimogênios inativos.

- presença de inibidores de proteases ou síntese destes durante a germinação (Kumar *et al.,* 2002). Diversos inibidores das classes cisteíno endopeptidases e serino endopeptidases foram descritos em plantas. As cistatinas (inibidores de cisteíno-proteinases), presentes em diversas sementes, são degradadas assim que a germinação começa. Um exemplo interessante é o potente inibidor protéico de catepsinas B presente na flor do girassol, com massa de 12 kDa (Zhang *et al.,* 2006). Estes inibidores também atuam no mecanismo de defesa da semente contra insetos predadores que possuem cisteíno-proteases como enzimas digestivas (Arai *et al.,* 2002).

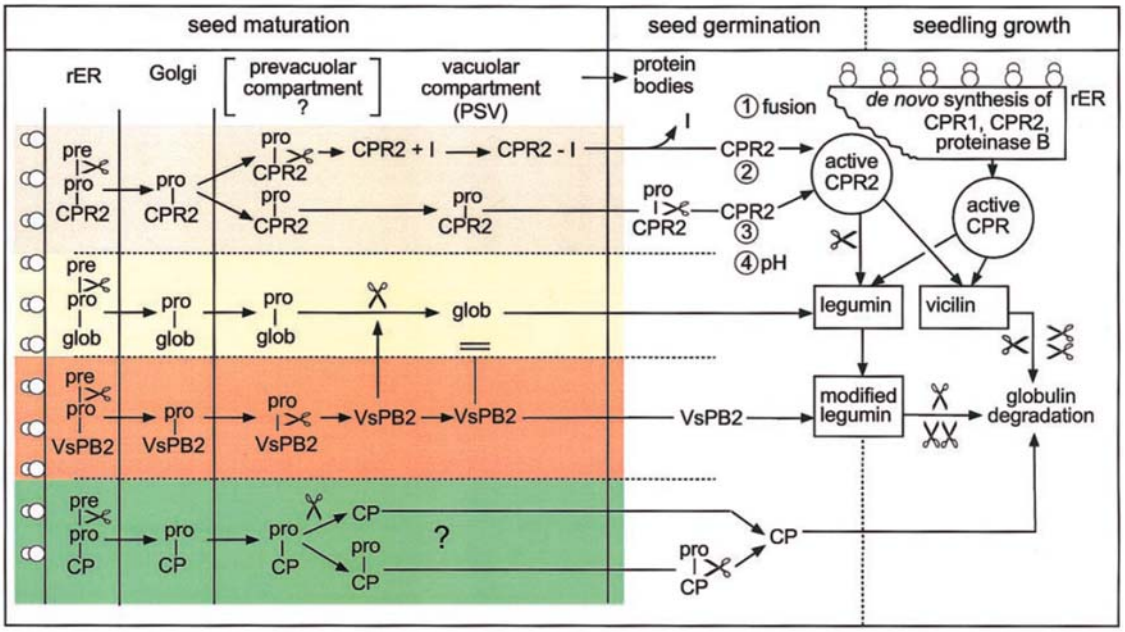

Figura 1: Representação do processo de maturação, germinação e crescimento de sementes de leguminosas (Muntz *et al.*, 2001).

A figura 1, exaustivamente explicada em Muntz *et al.*, 2001, representa como é complexo o mecanismo de regulação das endopeptidases durante o processo de maturação, germinação e crescimento inicial. Os diferentes estágios estão representados, bem como os prováveis locais subcelulares de síntese das endopeptidases. Diversas destas enzimas são sintetizadas como zimogênios(pro-), e sinalizadas para determinado local subcelular(pré-), requerendo proteólise múltipla ou não a fim de tornar-se ativa (uma ou mais tesouras). Dado que parece ser unânime é o fato de após, o período germinativo, termos a síntese de novas endopeptidases, mesmo que sejam praticamente iguais às presentes em etapas anteriores, mas a afinidade por substratos e localização celular serão distintas.

2 *Canavalia ensiformis* ou feijão-de-porco

As leguminosas do gênero *Canavalia* são nativas do Novo Mundo, com 48 espécies de distribuição pan-tropical, tendo sido cultivadas em épocas pré-colombianas, como alimento humano e de animais domésticos. No Extremo Oriente, as vagens novas são ingeridas em saladas verdes. A *Canavalia ensiformis*, o feijão-de-porco ou "jackbean" em inglês, possui cerca de 300 g de proteínas e 600 g de carbohidratos por quilo de semente, e apresenta excelentes características agronômicas, produzindo de 2,5 a 5,4 t de sementes por ha (Udedibie & Carlini, 1998). A planta é excepcionalmente resistente ao ataque de insetos, que se atribuí ser devido à presença de metabólitos secundários, como a canavanina (Rosenthal & Dahlman, 1986).

A semente de *Canavalia ensiformis* é ainda fonte de várias proteínas de interesse, como a urease (Sumner, 1926), lectina concanavalina A (Sumner & Howell, 1936), inibidores de tripsina, e a canatoxina (Carlini & Guimaraes, 1981).

3 As ureases e a canatoxina

As ureases (EC 3.5.1.5 uréia amidohidrolase) são enzimas dependentes de níquel (Dixon *et al.*, 1975; King *et al.*, 1995) que catalisam a reação de hidrólise da uréia à amônia e dióxido de carbono. A primeira proteína a ser cristalizada foi a urease de sementes de *Canavalia ensiformis***,** em 1926 por Sumner (Sumner, 1926). Este trabalho é um marco da enzimologia, pois conferiu às enzimas o caráter protéico (Sumner, 1926).

As ureases são amplamente distribuídas em bactérias, fungos e plantas, sendo abundantes em sementes de leguminosas. Ureases apresentam alta homologia e mecanismos catalíticos similares, diferindo apenas na estrutura quaternária. Enquanto que ureases vegetais e fúngicas são trímeros ou hexâmeros de uma subunidade de 90 kDa, as ureases bacterianas são multímeros de complexos formados por duas ou três subunidades. As ureases bacterianas estão envolvidas na patogênese de muitas condições clínicas, como a ulceração péptica e a formação de cálculos urinários, contribuindo para a patogênese de pielonefrites, encefalopatia causada por amônia, coma hepático, câncer gástrico (Mobley & Hausinger, 1989; Zerner, 1991; Mobley *et al.*, 1995).

Apesar da abundância de urease em alguns tecidos e principalmente em sementes, pouco se sabe sobre sua função no vegetal. Postula-se que a principa função das ureases de plantas esteja relacionada à reciclagem de nitrogênio (Sirko & Brodzik, 2000) ainda que a uréia, que é seu principal substrato, não seja um metabólito importante em plantas (Polacco & Holland, 1993).

3.1 Canatoxina

A canatoxina é uma proteína tóxica isolada de sementes de *Canavalia ensiformis* (Carlini & Guimaraes, 1981), que posteriormente foi caracterizada como uma isoforma da urease (Follmer *et al.*, 2001). A canatoxina produz convulsão e morte de camundongos e ratos (DL_{50} = 0.5-2.0 mg/kg); (Carlini *et al.*, 1984). A proteína é ativa por várias vias de administração (ip, iv, im, sc), mas mostra-se

inócua quando dada por via oral. Estruturalmente, a CNTX é um dímero de cadeias polipeptídicas de 95 kDa, ligadas não covalentemente. Ela apresenta alta homologia (85% identidade) com a urease da mesma semente, mas apenas 30 – 40% da sua atividade enzimática sobre uréia (Follmer *et al.*, 2001). A urease de *Canavalia ensiformis* é um hexâmero de cadeias de 90,7 kDa, com dois átomos de níquel localizados no sítio catalítico em cada monômero (Follmer *et al.*, 2001; Zerner, 1991). A baixa atividade ureolítica da canatoxina pode estar relacionada com sua forma dimérica, ou então com a presença em cada monômero de um átomo de níquel e um de zinco (Follmer *et al.*, 2001).

3.2 Papel fisiológico de urease/canatoxina na *Canavalia ensiformis*

Proteínas "canatoxina-like", ou seja tóxicas e imunoreativas contra anticorpos anti-canatoxina ou anti-urease, foram detectadas em sementes de várias espécies de leguminosas, incluindo várias comestíveis, como soja, ervilha, lentilha, feijão comum, grão-de-bico (Carlini *et al.*, 1988; Vasconcelos *et al.*, 1994). Os níveis de canatoxina em sementes imaturas de *Canavalia brasiliensis* aumentam progressivamente, até atingir nível máximo no final do processo de maturação (Barcellos *et al.*, 1993). No conjunto, estes dados sugerem que essas proteínas poderiam ter um importante papel fisiológico nas leguminosas. Concordando com essa hipótese, canatoxina e ureases de diferentes fontes são tóxicas para fungos fitopatogênicos (Oliveira *et al.*, 1999; Becker-Ritt *et al*., 2007, no prelo) e insetos, e provavelmente sejam proteínas de defesa da planta contra esses agressores.

3.3 Efeito entomocida e mecanismo de ação da urease/canatoxina em insetos

A canatoxina e/ou a urease foram testadas oralmente em insetos pertencentes a diferentes ordens, revelando uma potente atividade entomocida. Os modelos de insetos testados foram os seguintes: *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae), *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae), *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) e *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Os testes apontaram uma relação entre as enzimas digestivas dos insetos e a ação tóxica da proteína sobre os insetos (Carlini & Udedibie, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000; Follmer *et al.*, 2004; Staniscuaski *et al.*, 2005). Nos insetos susceptíveis, *C. maculatus, R. prolixus, N. viridula* e *D. peruvianus*, o trato digestório é acídico e as enzimas proteolíticas são do tipo catepsina, sugerindo que a especificidade da ação tóxica estaria diretamente relacionada com o sistema digestivo dos insetos. Já os insetos resistentes, têm trato digestório alcalino e enzimas do tipo tripsina (Terra & Ferreira, 1994; Carlini & Grossi-de-Sa, 2002).

Estudos do mecanismo da ação entomocida da canatoxina mostraram que a proteína é "ativada" proteoliticamente no trato digestivo dos insetos sensíveis, como *C. maculatus* ou *R. prolixus* (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Concordam com esta hipótese os seguintes fatos: a) ausência de efeito por injeção

da toxina diretamente na hemocele ou metatórax dos insetos; b) o efeito letal da canatoxina em *R. prolixus*. só aparece com 24-48 horas após a "refeição" de toxina; c) quando a digestão da canatoxina/urease pelo inseto sofre interferência pela presença de inibidores (pepstatina A e E-64) das suas principais enzimas proteolíticas, há redução acentuada da letalidade causada pela proteína tóxica; d) um peptídeo de 10 kDa obtido da canatoxina por hidrólise com homogenado de larvas de *C. maculatus* é letal quando ingerido por *R. prolixus* e também por injeção intrametatorácica, ao contrário da holotoxina, que não é tóxica por essa via; e) os inibidores pepstatina A e E-64 não protegem os insetos contra o efeito inseticida desse peptídeo.

Um peptídeo recombinante, denominado jaburetox 2Ec, equivalente ao produzido por hidrólise enzimática da canatoxina pelo homogenato de *C. maculatus* , foi obtido por expressão heteróloga em *Escherichia coli*, mostrando potencial para uso como bioinseticida (Mulinari *et al*., 2004 – Patente sob o número: INPI-S: 001120/RS. 2004). O peptídeo jaburetox-2Ec mostrou ser altamente tóxico contra o percevejo *D. peruvianus* (Staniscuaski *et al.,* 2005), bem como contra a lagarta do cartucho do milho *S. frugiperda***,** inseto insensível a canatoxina/urease devido às características de suas enzimas digestivas (Tomazetto *et al.,* 2007, no prelo). O peptídeo recombinante de JBURE-II não apresenta toxicidade aguda quando administrados por via oral ou intraperitoneal em ratos neonatos e camundongos adultos. A partir disto surge o interesse de avaliação do uso deste peptídeo como bioinseticida, uma vez que seu espectro de ação atinge um grupo de insetos não

susceptíveis aos efeitos das toxinas *Bt*, como percevejos e alguns grupos de besouros e, provavelmente, pulgões.

4 Peptidases

De acordo com a International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB (www.chem.qmul.ac.uk/iumbmb/enzyme), peptidases são hidrolases que agem sobre a ligação peptídica, promovendo a hidrólise desta ligação. De acordo com a IUBMB, o termo peptidases é o preferencial de uso na nomenclatura das enzimas que hidrolisam ligações peptídicas. As peptidases podem ser exopeptidases, promovendo hidrólise a partir das porções C–terminal (carboxipeptidases) ou N-terminal (aminopeptidases). Nestes casos, ocorre a liberação de um aminoácido livre, dipeptídeo, tripeptídeo, feito respectivamente por amino/carboxi-peptidase, amino/carboxi-dipeptidase, amino/carboxi-tripeptidase, e assim sucessivamente.

Barrett e Rawlings propuseram em 1993 uma classificação por famílias e "clãs", que não são baseadas em mecanismo de catálise como no caso dos grupos. Esta classificação nasceu a partir da análise de seqüências até então conhecidas, e as enzimas foram agrupadas de duas formas: de acordo com as suas homologias de seqüência, em famílias, e de acordo com suas similaridades evolucionárias, no caso os clãs (Rawlings & Barrett, 1993). Uma fonte de informações sobre peptidases, bem como as suas classificações é o MEROPS Database (http://merops.sanger.ac.uk/) (Rawlings *et al.*, 2006). Desta forma, de acordo com o

MEROPS, as peptidases estão atualmente agrupadas em grandes famílias dentro dos grupos principais: aspártico, metalo, serino, cisteíno, treonino, glutâmico e desconhecidas (GarciaCarreno & Deltoro, 1997).

Os mecanismos utilizados nos processos catalíticos das proteinases envolvem a ativação de uma molécula de água (como é o caso das peptidases de ácido aspártico, glutâmico e metaloproteinases), que adquire caráter nucleofílico, e é capaz de atacar a carbonila da ligação peptídica, ou pela formação de um intermediário covalente onde as cadeias laterais dos aminoácidos (peptidases de cisteína, serina e treonina) são os próprios nucleófilos.

a. Proteinases de ácido aspártico (EC 3.4.23) – Família A1

As proteinases de ácido aspártico são compostas por 7 clãs (AA, AB, AC, AD, AE, AF, A-) divididas em 14 famílias. A peptidase representante da família A1 é a pepsina A de *Homo sapiens*. As enzimas lisossomais catepsinas D e E são exemplos clássicos desta classe (Barrett, 1972; Vonclausbruch & Tschesche, 1988; Fusek *et al.*, 1992).

Peptidases desta classe possuem dois resíduos de ácido aspártico no sítio catalítico. Proteinases aspárticas são sintetizadas como zimogênios, capazes de promoverem auto-ativação em pH ácido. Enzimas da família A1 são endopeptidases ativas em pHs ácidos (abaixo de 4,0) e possuem especificidade típica por resíduos de cadeias laterais hidrofóbicas. O inibidor mais utilizado na identificação desta classe de enzimas é a pepstatina-A (Barrett & Dingle, 1972).

b. Proteinases de ácido glutâmico – Família G1

As proteinases de ácido glutâmico compreendem um único clã: GA. A enzima representante desta família (G1) é a peptidase do fungo *Scytalidium lignicolum*.

A enzima possui resíduos de glutamato e glutamina no sítio catalítico, exerce sua atividade proteolítica máxima em pH ácido e é inibida por 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propano.

c. Metaloproteinases (EC. 3.4.24) – Família M1

As metalopeptidases são compostas por 15 clãs (MA, MC, MD, ME, MF, MG, MH, MJ, MK, MM, MO, MP, MQ e M-) divididas em 53 famílias. A peptidase representante da família M1 é a aminopeptidase N de *Homo sapiens*.

O sítio ativo da proteinase contém os resíduos histidina, tirosna e glutamina além de um íon metálico divalente. Os metais não formam complexo com o substrato durante o processo de catálise, mas são essenciais na manutenção da estrutura da enzima, e conseqüentemente do centro ativo da enzima (Nduwimana *et al.*, 1995). Todos os membros desta família atuam na região N-terminal de polipeptídeos e grande parte age como aminopeptidases. Bestatina e amastatina são inibidores efetivos, assim como EDTA e 1,10 – ortofenantrolina.

d. Proteinases de serina (EC 3.4.21) – Família S1

As proteinases de serina são compostas por 7 clãs (SB, SC, SE, SF, SH, SJ, SK) divididas em 41 famílias. A peptidase representante desta família é a quimotripsina A de *Bos taurus*. São sintetizadas como pro-enzimas.

Peptidases desta família possuem a tríade catalítica composta por histidina, ácido aspártico e serina. Atuantes em pHs na faixa de 7-9, sendo o resíduo de serina extremamente reativo, formando uma ligação covalente com o substrato. Todas as peptidases com atividade de quimotripsina possuem atividade endopeptidásica e a especificidade das enzimas é dependente do resíduo posicionado em P1. Três tipos principais de enzimas compõem este grupo: tripsina, que prefere Arg ou Lys em P1, quimotripsina, que prefere resíduos hidrofóbicos em P1, e elastase, que prefere Ala em P1. Inibidores naturais desta família incluem ovomucóide, aprotinina, Bowman-Birk e serpinas, como o inibidor tipo Künitz. Inibidores sintéticos incluem organofosforados, como o diisopropilfluorofosfato e o PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), leupeptina, TLCK (tosil-lisil-cloro-metil-cetona).

e. Proteinases cisteínicas (EC 3.4.22) – Família C1

As cisteíno proteinases são compostas por 7 clãs (CA, CD, CE, CF, CH, CL e C-) divididas em 61 famílias. A peptidase representante da família C1 é a papaína extraída da *Carica papaya*. Representantes são encontrados em lisossomos de diversos organismos (Fazili & Qasim, 1986; Deval *et al.*, 1990; Vasconcelos *et al.*, 1994; Kawada *et al.*, 1995), inclusive em plantas (Kembhavi *et al.*, 1993; Zhang & Jones, 1996; Sakuta *et al.*, 2001).

Cisteíno proteinases da família C1 requerem um ambiente redutor levemente ácido para sua atividade ótima. São endopeptidases em sua maioria, e a especificidade pelo substrato é determinada pela região S2 da enzima que preferencialmente é ocupada por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Em algumas famílias desta classe, somente a díade Cys-His parece ser essencial para a catálise. No entanto, outras proteinases possuem um resíduo de Asn envolvido na orientação do grupamento imidazol da histidina. O grupamento –SH no sítio catalítico que é essencial para a sua atividade. A formação do complexo intermediário feito pela cisteína é a etapa limitante das reações catalisadas por essas enzimas. São inibidas por reagentes que oxidam o grupo tiol, como metais pesados, agentes alquilantes e oxidantes, como o ρ-hidroximercuribenzoato e E-64 (trans-epoxisuccinil-L-leucilamino - (4-guanidino)-butano) (Barrett *et al.*, 1982). Inibidores típicos de proteinases serínicas como PMSF, leupeptina e TLCK em concentrações mais elevadas podem inibir algumas proteinases cisteínica

f. Proteinases de treonina – Família T1

As proteinases de treonina compreendem um único clã T- divididas em quatro famílias. A proteinase representante da família T1 é componente do proteassoma de *Thermoplasma acidophilum*.

A quimostatina inibe a atividade quimotripsínica enquanto a leupeptina a atividade tripsínica. Compostos de origem bacteriana como a lactacistatina, a

epoxomicina e a eponemicina também são capazes de inativar a treonina catalítica do proteassoma.

4.1 Serino-Carboxil Endopeptidases

Um grupo bastante interessante de enzimas, de descoberta mais recente, é formado pelas serino-carboxil endopeptidases, ou sedolisinas. Reunindo concomitantemente características das aspártico- e das serino-endopeptidases, quanto à organização do sítio catalítico e afinidade por substratos, são estruturalmente e mecanisticamente relacionadas à subtilisina, tendo sido classificadas como nova família das serino peptidases (Wlodawer *et al.*, 2001a). A tríade catalítica é formada pelos aminoácidos serina-glutamina-ácido aspártico (SED), dos quais deriva a denominação **sed**olisina. São insensíveis à Pepstatina-A, ao PMSF, bem como aos dois inibidores juntos (Oda *et al.*, 1992), sendo inibidas pela análogo peptídico tirostatina (Wlodawer *et al.*, 2001b). O primeiro representante destas enzimas foi isolado de *Pseudomonas* sp. 101 por Oda *et al*., 1987.

Essas enzimas apresentam cerca de 600 aminoácidos, com um domínio catalítico de aproximadamente 375 aminoácidos, e um íon cálcio complexado de forma tetraédrica (Wlodawer *et al.*, 2003). São ativas em baixos pHs (3), e estáveis em pHs 4 e 5. A figura 1 ilustra o íon cálcio presente na estrutura das sedolisinas, e os aminoácidos que complexam o íon, uma marca característica destas enzimas. Até o momento não foram descritas sedolisinas vegetais (Wlodawer *et al.*, 2003). A

maioria dos estudos recentes de caracterização dessas enzimas utilizou ferramentas de biologia molecular para identificação, e não a purificação da proteína nativa (Reichard *et al.*, 2006).

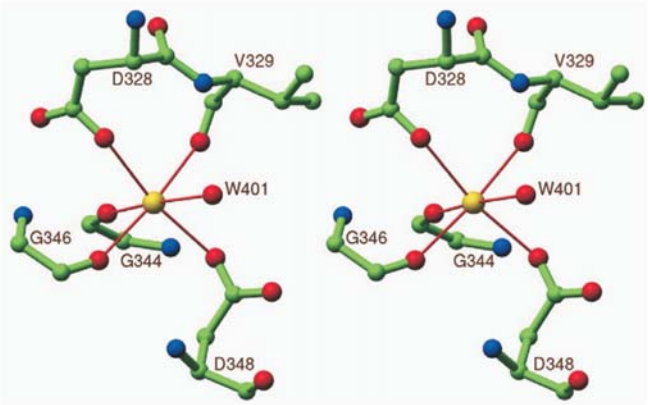

Figura 2: Stereo view do sítio de ligação ao cálcio (esfera amarela), de sedolisina de *Pseudomonas* 101 (Wlodawer *et al.*, 2003).

As sedolisinas até então descritas não apresentam similaridae significativa de seqüência de aminoácidos. Elas possuem sim homologia estrutural. Todas as sedolisinas até então cristalizadas ou com seqüência completa, apresentam a tríade catalítica conservada, a região do *loop* de ligação ao cálcio (figura 2), coordenados pelos mesmos aminoácidos. A figura 3 ilustra o alinhamento das sedolisinas até então conhecidas, com atenção especial aos aminoácidos pertencentes à tríade catalítica, que são conservados.

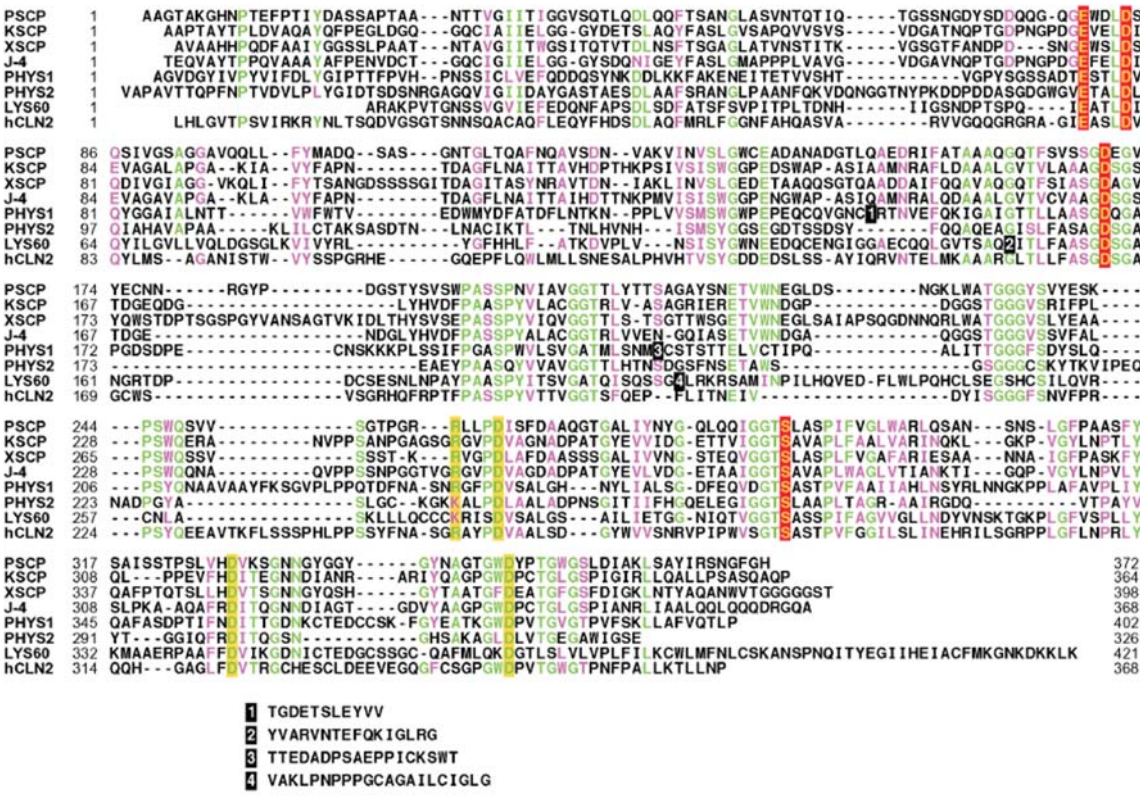

Figura 3:Alinhamento das enzimas sedolisinas. Os resíduos do sítio ativo estão representados em amarelo, com fundo vermelho. Demais resíduos conservados e que são importantes para a estrutura estão marcados com fundo amarelo. Abreviações: PSCP: sedolisina de *Pseudomonas* sp 101; KSCP: kumamolisina, isolada de *Bacillus novo* sp; XSCP: sedolisina de *Xanthomonas* sp. T-22; J-4: kumamolisina-B isolada de *Bacillus coagulans*; LYS60: sedolisina-x*Ap*B; PHYS1: "physarolisin", do fungo *Physarum polycephalum*; PHYS2: "physarolisin-B", produto do de um gene de replicação tardia, do fungo *Physarum polycephalum*; CNL2: tripeptidi-peptidase I de humanos. Adaptado de (Wlodawer *et al.*, 2003).

Objetivos

Estudos preliminares (Demartini *et al.*, 2001; Demartini, *et al*., 2005) mostraram que a canatoxina/urease não é degradada nos momentos iniciais da germinação da *C. ensiformis.* Verificamos ainda que a semente é rica em proteinases acídicas, sendo que o perfil dessa atividade enzimática muda durante a germinação da semente. Tais observações sugeriram que proteinases endógenas da semente de *C. ensiformis* pudessem clivar a urease/canatoxina durante a germinação formando peptídeos inseticidas, o que contribuiria para a proteção da plântula nesse período. Assim, essa tese teve como objetivo geral identificar e caracterizar endopeptidases da semente de . *ensiformis* e estudar a mobilização da urease/canatoxina durante a germinação.

Objetivos Específicos

Investigar o processo de mobilização das proteínas da semente de *Canavalia ensiformis* em diferentes tempos de germinação;

Investigar se a hidrólise proteolítica da urease/canatoxina durante a germinação levaria à formação de peptídeos inseticidas;

Isolar e caracterizar enzima(s) proteolítica(s) da semente e plântula de *C. ensiformis*, buscando identificar aquela(s) que agem sobre a urease/canatoxina.

Metodologia

1 Sementes e Condições de germinação

As sementes utilizadas neste trabalho foram procedentes do fornecedor Casa Naterra & Produtores Associados, Wolf Seeds do Brasil, Ribeirão Preto, SP.

As sementes foram desinfectadas por imersão em soluções de hipoclorito de sódio 1% (v/v), etanol 70 % e água destilada a 45^{o}C, 1 min em cada banho. Por fim, as sementes foram enterradas em terra preta, em potes tamanho médio (20 cm diâmetro x 15 cm altura), em grupos de 15–20 sementes por pote. A germinação e crescimento da planta foram feitos a 25 ^{o}C, umidade constante de 70 %, sob luz artificial com fotoperíodo de 16 h claro e 8 h escuro. Os potes foram regados diariamente, com cerca de 100 mL de água.

Atingido o período de germinação ou desenvolvimento inicial do material vegetal de interesse (sementes, plântulas, raízes, cotilédones e folhas), este foi exaustivamente lavado com água destilada, para a remoção de qualquer resíduo de terra remanescente (com atenção especial para as raízes), congelado em nitrogênio líquido e em seguida liofilizado. Ao final da liofilização, o material vegetal foi finamente moído, armazenado a –20 ^{o}C, ou imediatamente utilizado.

2 Produção dos extratos brutos dos materiais vegetais

A extração das proteínas presentes nos materiais vegetais liofilizados foi feita em tampão NaPB 20 mM pH 6,0, na proporção de 5:1 (volume, mL:massa, g), sob agitação durante 2 h, a 4 ^{o}C. Ao final deste período, a mistura foi submetida à centrifugação 8.500 *x* g, durante 1 h, a 4 ^{o}C. O sobrenadante foi então

exaustivamente dialisado contra o tampão de extração, em membrana com 14 kDa de corte. O material retido ao final da diálise foi designado como "extrato bruto integral" (EB), por conter todas as proteínas que foram extraídas nestas condições. Paralelo à produção destes extratos, foram preparados extratos em água, da mesma forma, extraindo-se o material vegetal em água grau MiliQ®.

2.1 Produção dos extratos brutos ultrafiltrados

O extrato bruto ultrafiltrado (EB-UF) foi obtido da seguinte forma: o tampão utilizado na primeira diálise do extrato bruto integral, contendo peptídeos menores de 14 kDa, foi concentrado até 40 vezes em célula de concentração por pressão de nitrogênio, utilizando-se membranas YM–3 (Millipore®), com corte de 3 kDa. Limitou-se a 2 L deste tampão para a produção do extrato bruto ultrafiltrado, por motivos operacionais. O material concentrado sofreu uma última filtração em cartucho Centriprep® (Millipore), 50 kDa de corte, a fim de eliminar qualquer eventual contaminação com urease/canatoxina, aproveitando-se apenas o material não retido no cartucho. Ao final do processo de concentração, o material enriquecido em peptídeos entre 3 kDa e 14 kDa foi designado como extrato bruto ultrafiltrado (EB-UF).

2.2 Determinação do conteúdo de proteínas

A determinação do conteúdo de proteínas das amostras e durante as etapas de purificação foi feito através da medida da absorbância a 280nm.

Alternativamente, foi utilizado o método de Bradford, sendo o padrão de proteína a albumina sérica bovina.

3 Cromatografias

Em todas as cromatografias, as amostras a serem analisadas foram dialisadas contra o tampão usado no equilíbrio da resina (exceto gel filtração), e centrifugadas a 20.00 *x* g, 10 min, antes de serem aplicadas nas resinas ou colunas. Condições diferentes destas estão explicadas quando necessário.

3.1 Cromatografia de troca catiônica – resina CM-Sepharose® e coluna HiTrap®SP-HP (GE-Lifesciences)

A resina CM-Sepharose®, equilibrada com tampão NaPB 20 mM pH 6,0, foi misturada em um béquer com a amostra, mantendo-se a mistura por 2 h sob suave agitação em banho de gelo. Após esse tempo, a mistura foi transferida para um funil de placa de vidro sinterizado e a lavagem das proteínas que não interagiram com a resina foi feita com o tampão de equilíbrio. A eluição foi feita de modo descontínuo (stepwise) utilizando o tampão NaPB 20 mM pH 6,0 acrescido de 100 mM NaCl, 300 mM NaCl e 500 mM NaCl. Todo o procedimento foi realizado à 4^{o}C, coletando-se frações de 50 mL para a lavagem e 10 mL para as eluições.

As cromatografias utilizando a coluna HiTrap®SP-HP foram feitas utilizando-se duas colunas conectadas, totalizando um volume de 10 mL de resina, com um fluxo de 1 mL/min. A amostra foi aplicada com o auxílio de bomba

peristáltica, e a fração não retida, foi re-aplicada. As condições de equilíbrio e eluição foram as mesmas utilizadas na cromatografia utilizando CM-Sepharose®, coletando-se frações de 10 mL. Todo o procedimento também foi realizado à 4°C.

As cromatografias em CM-Sepharose® ou HiTrap-SP®-HP foram utilizadas como primeira etapa na purificação das enzimas tipo aspártico protease e sedolisina. A resina CM-Sepharose® também foi utilizada como primeira etapa na purificação das serino proteases estudadas no trabalho. As amostras, quantidades, volumes, e demais dados estão detalhados nos resultados. As frações com atividade enzimática de interesse foram reunidas e concentradas em cartucho Centriprep® 10 kDa (Millipore) para a etapa seguinte.

3.2 Cromatografia de troca aniônica – colunas HiTrapQ-HP®, Source–Q® e Mono–Q® (GE-Lifesciences)

Para purificação parcial de aspártico proteases e sedolisinas foram usadas as colunas Source–Q®, equilibrada com 20 mM de NaAc pH 5,6, e a coluna MonoQ®, equilibrada em 20 mM NaAc pH 4,0. As cromatografias foram realizadas em sistema FPLC (GE-Lifesciences), à temperatura ambiente, com monitoramento a 280 nm e 214 nm, e coleta de frações por pico detectados a 280 nm. Eluições foram realizadas com gradientes crescentes até 1M NaCl no tampão de equilíbrio.

As frações com atividade de interesse foram reunidas e preparadas para etapas subseqüentes.

3.3 Cromatrografia de Gel Filtração em Coluna Superdex® 75 HR 10/30(GE-Lifesciences)

A cromatografia de gel filtração, em sistema FPLC, foi feita utilizando coluna Superdex®75 HR 10/30, previamente calibrada na faixa de 3 kDa a 80 kDa. Os tampões utilizados nas corridas estão descritos nos resultados. As amostras, contendo no máximo 1,5 mg de proteína em 500 μL por corrida, foram previamente centrifugadas a 10.000 *x* g por 1 min. O fluxo foi no máximo de 0,5 mL/min, com coleta das frações por pico em 280 nm ou 214 nm, num volume total de 30 mL.

3.4 Cromatografia de Afinidade em Pepstatina-A Agarose® (Sigma)

As cromatografias de afinidade foram realizadas em sistema Äkta (GE-Lifesciences), a 4°C, da seguinte forma: uma coluna contendo 5 mL de resina Pepstatina-A Agarose®, foi equilibrada com 20 mM NaAc, 500 mM NaCl, pH 4,0. Aplicou-se a amostra com um fluxo de 0,3 mL/min. A fração não retida foi novamente aplicada na coluna. Após a coleta da segunda fração não retida, procedeu-se a lavagem da coluna com o tampão de equilíbrio, seguindo-se a eluição da coluna com tampão 50 mM TRIS-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0. As frações eluídas (1 mL cada) foram imediatamente acidificadas para pH 5,6, adicionando-se NaAc para uma concentração final de 50 mM. Por fim, as amostras eluídas foram

reunidas, concentradas e “lavadas” com 50 mM NaAc pH 5,6 em cartuchos Centriprep® 3 kDa.

4 Ensaios enzimáticos

Para os ensaios enzimáticos, os tampões utilizados foram os seguintes:

- ensaios em pH 4,0 ou 5,6: 100 mM NaAc;
- ensaios em pH 8,0: 100 mM TRIS-HCl;

4.1 Ensaios enzimáticos com substratos macromoleculares: hidrólise de hemoglobina, caseína e azocaseína

Os ensaios de hidrólise de substratos macromoleculares foram feitos de acordo com (Barrett, 1986; Barrett & Dingle, 1972), com pequenas modificações. As amostras de interesse foram testadas com uma concentração final de substrato a 0,2 % (m/V), em 500 μL de volume final de reação. A reação foi disparada com a adição do substrato. Transcorrido o tempo desejado, no máximo de 2 h a 37^{o}C, adicionou-se ácido tricloroacético numa concentração final de 5% para interromper a reação, precipitando a proteína não hidrolisada. Após um repouso de 30 min, os tubos foram centrifugados a 20.000 *x* g por 10 min, separando-se o sobrenadante para a leitura da absorbância a 280 nm (hemoglobina ou caseína) dos peptídeos solúveis no ácido tricloroacético, refletindo a hidrólise do substrato. Para a azocaseína, o sobrenadante foi neutralizado com NaOH 2 M, e a intensidade de cor laranja formada foi lida a 420 nm. Para verificar o efeito de inibidores enzimáticos,

estes foram pré-incubados com as amostras por 10 min, no meio devidamente tamponado, e à temperatura ambiente (22^{o}C), antes do disparo da reação por adição do substrato.

4.2 Ensaio para aspártico proteases e sedolisinas: hidrólise do peptídeo fluorogênico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp

O substrato fluorogênico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp utilizado, contendo o ácido aminobenzóico (Abz), na porção C-terminal, como emissor de fluorescência, a seqüência AIAFFSRQ de aminoácidos, e o *N*-2,4(dinitrofenil)etilenodiamino, na porção N-terminal é clivado por aspártico endopeptidases, em especial catepsinas D, entre as duas fenilalaninas (FF) (Juliano *et al.,* 1990; Pimenta *et al.*, 2001). Uma vez hidrolisado, detecta-se a emissão de fluorescência, até então apagada, por interferência da porção ácido aminobenzóico (Abz) sobre o seqüestrante da fluorescência do EDDnp. O sinal de fluorescência é detectado quando ocorre hidrólise em qualquer ponto da seqüência peptídica do substrato (Juliano *et al.*, 1990; Gershkovich & Kholodovych, 1996). Para os ensaios de acompanhamento da purificação das proteases acídicas, o substrato em concentração final de 20 μM, foi incubado com as amostras em meio tamponado com NaAc 100 mM pH 4,0, em presença ou não de inibidores, a 37 ^{o}C até no máximo 60 minutos. Os ensaios foram montados em placas de 96 poços, com volume final de reação de 100 μL já com o substrato. Quando presente o inibidor irreversível de aspártico endopeptidases, pepstatina-A, ou o inibidor de sedolisinas, a tirostatina, estes foram pré-incubados

com a amostra por 10 minutos a 22 ^{o}C, antes do disparo da reação por adição do substrato. As leituras de fluorescência foram realizadas em um fluorímetro *f*max® ou SpectraMax M2e® (Molecular Devices), utilizando um software para análise cinética, com intervalo máximo de leitura entre os poços de 20 s. Os comprimentos de onda utilizados foram: $\lambda_{excitação}$= 320 nm e $\lambda_{absorção}$= 430 nm. As quantidades ensaiadas, concentrações de inibidores testados estão descritas nos resultados. As velocidades das reações foram expressas em mRFU/min (mRFU = mili-unidades relativas de fluorescência). Para fins de cálculo de parâmetros cinéticos, as medidas de velocidade foram feitas com menos de 20% do total de substrato hidrolisado, de acordo com as curvas-padrão de fluorescência periodicamente preparada para este substrato.

4.3 Ensaio para serino proteases e cisteíno proteases: hidrólise do substrato cromogênico DL-BAPNA

A hidrólise de DL-BAPNA (benzoil-DL-arginil-*p*-nitroanilida) pelas frações em teste foi acompanhada a 37^{o}C, com uma concentração final de 1 mM de substrato em 200 μL de meio reacional em placas de 96 poços. Para análise de serino-proteases, o meio foi tamponado com 100 mM de TRIS- HCl pH 8.0. Para a análise de cisteíno proteases, o tamponamento foi feito com 100 mM NaAc pH 5,6, na presença de 10 mM de ditiotreitol (DTT). Quando presentes o DTT, ou outros inibidores, estes foram pré-incubados com a amostra por 30 min à temperatura ambiente, antes de ser iniciada a reação por adição de substrato. As leituras de

absorbância a 405 nm, da *p*-nitroanilina liberada a partir da hidrólise do substrato, foram realizadas em um espectrofotômetro de SpectraMax® (Molecular Devices), utilizando um software para análise cinética. O intervalo máximo de leitura entre os poços foi de 12 s. As quantidades ensaiadas e concentrações de inibidores testados estão descritas nos resultados. A velocidade da reação foi expressa em mOD/min (OD=absorbância), sendo que para fins de cálculo de parâmetros cinéticos considerou-se apenas medidas obtidas com um máximo de 10% de substrato hidrolisado.

5 Preparo da urease e medida da atividade ureásica

A urease utilizada no trabalho foi preparada a partir de sementes maduras de *Canavalia ensiformis*, conforme descrito por Follmer *et al.*, 2004.

A atividade ureásica foi calculada pelo método colorimétrico do fenilnitroprussiato-hipoclorito, que se baseia na quantificação de amônia liberada a partir da hidrólise da uréia, medida a 570 nm (Weatherburn, 1967). Uma unidade de atividade ureásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de amônia por minuto, em 20 mM NaPB pH 7,5 à 37^{o}C.

6 Preparo do peptídeo recombinante Jaburetox-2Ec

O peptídeo recombinante jaburetox-2 EC foi obtido por expressão em *E.coli* BL 21 (DE) e purificado por cromatografia de afinidade, conforme Mulinari *et al*., 2004 – Patente sob o número: INPI-S: 001120/RS. 2004, e Tomazetto *et al.*, 2007.

7 Ensaios com espectrometria de massas

Dois ensaios foram feitos em que a análise final foi feita por LC-ESI-MS (cromatografia líquida acoplada a ionização por eletron-spray e espectrometria de massas): o ponto de hidrólise do substrato Abz-AIAFFSRQ-EDDnp e o seqüenciamento de peptídeos internos resultantes de hidrólise tríptica de proteínas de interesse. Para ambos os ensaios, as amostras a serem submetidas à análise por espectrometria de massas foram acidificadas com TFA 1% (pH ~3) e adsorvidas em coluna resina C-18, equilibrada em TFA 0,046%. O material retido na resina C-18 foi eluído com TFA 0,046%/Acetonitrila 80%. Em seguida, o material eluído foi liofilizado e analisado por espectrometria de massas, conforme o experimento desejado.

7.1 Determinação do ponto de hidrólise de Abz-AIAFFSRQ-EDDnp

O ponto de hidrólise do substrato Abz–AIAFFSRQ–EDDnp foi determinado da seguinte forma: em um meio tamponado com NaAc 100 mM pH 4,0, 20 μM de Abz–AIAFFSRQ–EDDnp foram totalmente hidrolisados pelas enzimas em estudo durante 24 h, a 37^{o}C. Foram preparadas três condições: substrato sozinho, substrato com enzima controle, e substrato mais enzima teste. Ao final do experimento, a amostra foi preparada para análise por espectrometria de massa, como explicado no item 7. O material previamente liofilizado foi solubilizado em 15 uL de ácido fórmico 0,1%. A separação dos fragmentos gerados na hidrólise foi feita em um cromatógrafo NanoAcquity® (Waters), equipado com

uma coluna preparativa Simetry C18® (Waters), e uma coluna analítica BEH 130-C18®(Waters), com um gradiente de 0–80% acetonitrila em ácido fórmico (0,1%). Os picos separados foram analisados por ESI-MS em um espectrômetro de massas Q-Tof-Micro®(Waters) e as coletas foram feitas no modo negativo, na faixa de 400 a 1400 m/z. A voltagem do capilar e do cone de extração utilizadas foram de 3500 V e 40 V, respectivamente.

7.2 Digestão tríptica de proteínas para seqüenciamentos por MS/MS

Para este experimento, foi utilizada tripsina de pâncreas suíno, grau sequenciamento (T-6567), numa proporção de 1:50 da proteína a ser digerida. A reação ocorreu a 37^{o}C durante 12 h em 100 mM TRIS-HCl pH 8,0. Ao final da reação, as amostras foram preparadas como explicado no item 7. O material liofilizado e solubilizado em ácido fórmico foi analisado para sequenciamento por espectrometria de massas em tandem (MS/MS), modo negativo, na faixa de 400 a 2000 m/z. As voltagens do capilar e do cone de extração utilizadas foram de 3500 V e 40 V, respectivamente.

8 Seqüenciamento N-terminal

O sequenciamento N-terminal foi feito a partir de proteínas transferidas para membrana de difluoreto de polivilinideno (PVDF-Hybond®P), poro 0,45 µm. Após separação das proteínas de interesse por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% ou 12%, estas foram transferidas por gravidade para a membrana de PVDF.

As membranas foram coradas com Coomassie Blue, e após a marcação das bandas, foram descoradas com 50% metanol. As bandas foram então recortadas das membranas e submetidas à seqüenciamento N-terminal por degradação de Edman em seqüenciador Shimadzu PPSQ-10, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, ou ABI Procise 494 cLC Protein Sequencer, NCI-Frederick, Frederick, MD, USA. Em ambos os casos, conforme as instruções do fabricante.

9 Eletroforeses

As eletroforeses foram realizadas de acordo com Laemmli (1970), utilizando-se géis de poliacrilamida (1,0 mm de espessura) de concentrações 10% e 12%, desnaturantes e não redutores. As quantidades de material aplicadas no gel bem como os padrões de massa molecular utilizados estão descritos no respectivo experimento. Os géis foram corados com Coommasie Blue coloidal ou revelados por prata, conforme Bollang, *et al.* (1996).

10 Ensaios Imunológicos

Fragmentos protéicos de ureases foram detectados por imuno-ensaios tipo Dot Blot e Western Blot, contra anticorpos policlonais anti-CNTX ou anti-jaburetox-2Ec, conforme Towbin *et al.* (1979), com pequenas modificações. Os materiais analisados, anticorpos primários e secundários utilizados em cada experimento, bem como as diluições utilizadas, estão apresentados nos respectivos resultados.

10.1 Dot Blot

Para os ensaios de Dot Blot, alíquotas de 5 µL (2 x 2,5 uL) de diluições seriadas (1:10) de ureases ou das frações em teste foram aplicadas diretamente sobre uma membrana de nitrocelulose (GE-Lifesciences). Após a secagem das gotas, a membrana foi bloqueada com o tampão de bloqueio (TTBS-caseína), contendo 5 g% de caseína, em TBS com 0,05% v/v de Tween 20 (TTBS). Após duas horas, lavou-se a membrana por 3 vezes com 50 mL de TTBS-caseína, 5 minutos cada, sob leve agitação. A membrana foi então incubada em 10 mL de uma solução do anticorpo primário (Ac1º), preparada em TTBS-caseína, por duas horas à temperatura ambiente. Após lavagem em TTBS, a membrana foi incubada por 2 h a temperatura ambiente, com solução do anticorpo secundário (Ac2º) acoplado a fosfatase alcalina, diluído em TTBS-caseína.

Após as incubações com os anticorpos e lavagens, a revelação da fosfatase alcalina fixada foi feita com uma solução de 0,75 µM de nitroblue tetrazolium (NBT) e 30 nM de 5-bromo-4-cloro-indoil-fosfato (BCIP), $MgCl_2$ 10 mM, TRIS-HCL 20 mM pH 9,2, à temperatura ambiente, até o desenvolvimento de cor desejado.

10.2 Western Blot

As transferências para membranas de PVDF foram realizadas conforme explicado no item 8, e o desenvolvimento do Western Blot foi idêntico ao descrito no item 10.1.

10.3 Elisa

O ensaio imunoenzimático (Elisa) foi realizado à temperatura ambiente e da seguinte forma: 50 μL das amostras foram incubados em placas (MaxiSorb®, Nunc), por 2 h. Após o processo de adsorção, foi adicionado TBS – 5g% caseína, para o bloqueio, seguindo-se lavagens (3 x 100 μL cada) e incubação com os anticorpos primário e secundário (2 h cada; valores de diluição e anticorpos usados descritos nos resultados). Ao final da incubação do anticorpo secundário, os poços foram lavados somente com TBS. A revelação foi feita com *p*-nitrofenilfostafo 1mg/mL em 50 mM borato de sódio 5 mM $MgCl_2$ pH 9,2, por 30 min, a 37°C, em leitor de microplacas SpectrMax® (Molecular Devices), para quantificação do *p*-nitrofenol liberado a 405 nm, e comparação contra curvas padrões de urease ou jaburetox-2Ec, na faixa de concentração de 0.2 – 10 μg/mL, construídas nas mesmas condições.

10.4 Anticorpos Utilizados

As diluições dos anticorpos usados estão descritas nos respectivos resultados. Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes:

Imunoglobulinas G anti-canatoxina, anti-concanavalina A e anti-jaburetox, produzidas em coelho (conforme (Barcellos *et al.,* 1993; Follmer *et al.,* 2001);

Imunoglobulinas G anti-urease: anticorpo monoclonal comercial (Sigma – U4879);

Os anticorpos secundários utilizados foram:

Anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma);

Anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma);

11 Degradação *in vitro* (auto-digestão) das proteínas endógenas da semente e análises por Western Blot e por cromatografia de Gel filtração acoplada com Elisa

A atividade proteolítica dos extratos brutos atuando sobre as suas próprias proteínas como substratos, foi ensaiada incubando-se cada extrato nos pH ótimos das enzimas em estudo, por 18 h a 37^{o}C. Para tal, extratos brutos equivalentes a 50 mg de proteína a partir de extratos brutos recém preparados (ver item 2), foram incubados nos seguintes meios, visando favorecer respectivamente um tipo de atividade enzimática:

- Aspártico proteases e sedolisinas: 100 mM NaAc pH 4,0.

- Cisteíno proteases: 100 mM NaAc, 10 mM DTT, pH 5,6, 10 μM leupeptina, ou 10 mM benzamidina.

- Serino proteases: 100 mM TRIS-HCl pH 8,0.

Como controles, os extratos tamponados nas mesmas condições de pH foram incubados (ou mantidos em geladeira) por igual tempo a 4^{o}C. Após a incubação, os extratos foram centrifugados a 10.000 *x* g por 20 min e a concentração de proteínas do sobrenadante foi determinada. Em seguida, alíquotas dos sobrenadantes foram processadas para eletroforese em gel de poliacrilamida, seguida de Western Blot, conforme o item 9 e 10.2, utilizando-se anti-CNTX, anti–ConA, anti-urease ou anti-jaburetox como anticorpos primários. Os anticorpos e as amostras analisadas estão descritos nos respectivos resultados.

Complementando os estudos de digestão das proteínas endógenas, os extratos foram analisados também por cromatografia de gel filtração utilizando coluna Superdex® 75 HR 10/30, equilibrada em NaPB 20 mM pH 6,0, com monitoramento a 280 nm e 214 nm em sistema FPLC (GE-Lifesciences). Alíquotas equivalentes a 1,5 mg de proteína de cada extrato após o ensaio de auto-digestão foram aplicadas na coluna, coletando-se frações de 1 mL. As corridas foram feitas com fluxo de 0,5 mL/min, utilizando o tampão NaPB 20 mM pH 6,0. Em seguida, as frações coletadas foram analisadas por Elisa, utilizando anti-CNTX e anti-jaburetox como os anticorpos primários, conforme descrito no item 10.3.

12 Ensaio biológico com *Dysdercus peruvianus*

O modelo de inseto utilizado nos bioensaios foi o percevejo manchador da flor do algodão, *Dysdercus peruvianus* (Hemíptera). Os insetos são mantidos a 25^{o}C, 70% de umidade relativa do ar, ciclo claro-escuro de 12 h, água *ad libitum*, alimentando-se diretamente de sementes lintadas de algodão (*Gossypium hirsutum*). O ciclo de vida do inseto tem a duração aproximada de 30 dias, incluindo 5 estágios larvais, com as ecdises a cada 5-6 dias em média, até a forma adulta. Para os ensaios, são confeccionadas "sementes artificiais", consistindo de cápsulas de gelatina preenchidas com farinha de cotilédone de algodão à qual se adiciona a substância teste (Staniscuaski *et al.*, 2005).

Os materiais testados foram: farinha de algodão, extratos brutos de semente quiescente, extratos brutos de sementes germinadas por 3 e 7 dias. Para confecção das sementes artificiais, sobre uma massa de farinha de algodão adicionou-se o volume de extrato necessário para uma concentração de 2 % ou 4 % de proteína (m/m; considerando-se uma leitura de A_{280} de 1,0 dos extratos como equivalente a 1 mg), e elevou-se a um volume final a 1 mL com água. As misturas resultantes foram liofilizadas, homogeneizadas em gral, e acondicionadas manualmente em cápsula de gelatina dura n^{o} 3. Para os testes, cada ponto experimental em triplicata, foram separados grupos de 14 ninfas de 2^{o} estágio, que receberam como alimento as sementes artificiais contendo o material em teste. Quando o conteúdo das cápsulas de qualquer grupo experimental terminava, esta era substituída por outra contendo apenas farinha de algodão. Acompanhou-se, em intervalos de 2–3 dias, a letalidade

e o peso dos insetos vivos até o 21^{o} dia. A proporção de ninfas e de adultos entre os insetos sobreviventes de cada grupo no 22^{o} dia foi também registrada.

13 Ensaios do Capítulo 3

13.1 Determinação do *KM*

Para determinação dos valores de *KM*, foram usados os seguintes substratos, (soluções iniciais): CBZ-RR-MCA (80 μM), Z-FR-MCA (80 μM), D-Pro-FF-MCA (50 μM), Abz-AIAFFSRQ-EDDnp (60 μM). Foi feita uma cinética por adição do substrato. Em meio reacional de 1 mL tamponado com 100 mM TRIS-HCl pH 8,0, 37^{o}C, foram adicionados, em cada análise, 17 ng de enzima Q-SP ou 557 ng de enzima C-SP. Após a adição da enzima em estudo, foi adicionado substrato para o primeiro valor de concentração de substrato para a determinação do *KM*. Ao ser atingido o valor de 10% do total de substrato hidrolisado, foi adicionado ao mesmo meio reacional mais substrato para atingir o segundo valor de concentração, e assim sucessivamente, até ser atingido o último valor de concentração, sem que o volume da solução inicial de substrato ultrapassasse 100 μL (10% do volume inicial). A hidrólise do substrato foi menor do que 10% do total de substrato em cada concentração. As determinações foram feitas em um Espetrofluorímetro Shimadzu RF-1501 equipado com lâmpada de xenônio. Os comprimentos de onda de emissão e absorção dos substratos metilcumarínicos (MCA foram: $\lambda_{excitação}$=360 nm; $\lambda_{absorção}$=470 nm, e do fluoróforo Abz: $\lambda_{excitação}$=320

nm; $\lambda_{absorção}$=430 nm. A velocidade da reação enzimática foi expressa em μM de substrato hidrolisado por segundo por nanograma de proteína ($\mu M.s^{-1}.ng^{-1}$). O valor do *KM* foi determinado pela equação dos duplos recíprocos.

13.2 Hidrólise de substratos macromoleculares

Para este ensaio, foram utilizados os seguintes substratos nas suas respectivas quantidades: hemoglobina (10 μg), caseína (5 μg), albumina (10 μg). Cerca 1 μg de enzima Q-SP ou C-SP foi incubada com os substratos durante 16 h a 37^{o}C, em 100 mM TRIS-HCl pH 8,0, num volume de reação de 500 μL. Ao final da incubação, foi adicionado tampão de amostra e os incubados foram imediatamente preparados para análise por SDS-PAGE, como descrito na metodologia, 4.1. Os géis foram corados com Coomassie Blue coloidal.

Resultados

Os resultados desta tese estão divididos em três capítulos, listados a seguir:

Capítulo 1:

Estudo da germinação e mobilização de ureases da ***Canavalia ensiformis***.

Capítulo 2:

Endopeptidases acídicas da ***Canavalia ensiformis***

Capítulo 3:

Endopeptidases serínicas da ***Canavalia ensiformis***

Capítulo 1:

Estudo da germinação e mobilização de ureases em *Canavalia ensiformis*

1 Resultados gerais sobre a germinação

De acordo com a definição morfológica de germinação, nas condições experimentais usadas, a *Canavalia ensiformis* termina o período de germinação ao redor do 3^o dia, quando há o rompimento da testa e aparecimento da radícula. Descrevemos o processo de germinação e crescimento da planta contando os dias corridos a partir do momento em que estas sementes foram colocadas para embebição, sendo este o dia zero. Diversos lotes de sementes foram utilizados neste trabalho, o que resultou em uma certa variação nos resultados. Por este fato, procurou-se separar cada lote de sementes para determinado experimento.

A radícula começa a ser vista no 3^o dia, sendo que no 7^o, as plântulas já estão com uma longa radícula, testa totalmente solta dos cotilédones, e por volta do 18^o – 20^o dia, apresentam folhas bem distendidas e raízes perfeitamente formadas. A partir daí, a planta começa a enfraquecer se não estiver no solo. Observamos que alguns fenômenos bioquímicos apresentaram variações no tempo de ocorrência de uma partida de sementes para outra. Por exemplo, algumas atividades enzimáticas somente eram percebidas em momentos bastante específicos, como no caso da enzima sensível à tirostatina, cuja atividade era detectada em evidência ao redor do 4^o–5^o dia, durante o período do verão, principalmente.

O suporte mais adequado para a germinação foi a terra preta, ao invés da vermiculita. Diversas tentativas foram feitas em vermiculita, mas a planta apresentava germinação irregular e baixos níveis das atividades enzimáticas

estudadas. O processo de lavagem à quente das sementes (ver metodologia, item 1) foi decisivo para uma germinação mais homogênea. A figura 4 mostra o aspecto da *Canavalia ensiformis* com 20 dias de crescimento, no verão.

Figura 4: *Canavalia ensiformis* com 20 dias de crescimento. Foram plantadas 15 sementes por pote.

2 Produção dos extratos integrais

Os extratos brutos integrais (EB) de sementes até o 6º dia são leitosos, com alto conteúdo protéico e lipídico. Ainda que um processo prévio de delipidação pudesse facilitar etapas de purificação subseqüentes, todos os protocolos testados levaram à perda das atividades enzimáticas estudadas.

Os extratos brutos preparados em água (não tamponados) das sementes até o 6º dia da embebição (metodologia, item 2) apresentaram pH ácido, variando de 6,15 a 5,85, com um pico de acidificação no 5º dia, observado em várias extrações.

O gráfico da figura 5 mostra o perfil típico dos valores de pH dos extratos feitos em água grau MilliQ®.

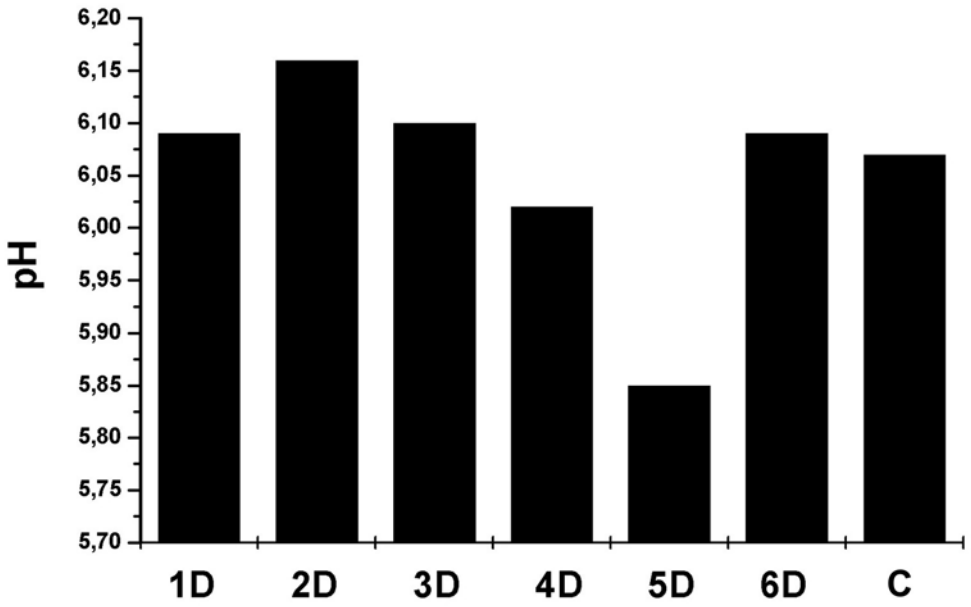

Figura 5: Valores de pH de extratos aquosos de sementes da *Canavalia ensiformis* em diferentes dias após embebição. Os extratos brutos foram preparados em água grau MilliQ, conforme descrito em métodos, sendo o pH medido após centrifugação. O gráfico mostra médias dos valores de pH de uma partida de extratos, de 4 extrações feitas em água com resultados similares. Os dias após embebição estão indicados no eixo x; C: cotilédones.

2.1 Ensaios de atividade inseticida com extratos integrais – efeito do tempo de germinação

Os extratos brutos de sementes quiescentes (EB–Q), de sementes de 3 dias (EB–3D) e de 7 dias (EB–7D) foram testados no inseto *Dysdercus peruvianus*, como descrito no item 12. Os insetos foram acompanhados por 21 dias. Até 12^{o} dia, os insetos alimentaram-se das cápsulas contendo os extratos, sendo então substituídas por outras contendo somente farinha de algodão. O grupo controle

(C0%), tratado somente com farinha de algodão, foi usado para averiguar se os insetos estavam, de fato, alimentando-se. A figura 6 mostra que o extrato de sementes germinadas por 7 dias (7D4%) foi pelo menos tão tóxico para os insetos quanto o extrato da semente quiescente (Q4%). Por outro lado, o extrato de sementes germinadas por 3 dias, na mesma concentração, não apresentou toxicidade significativa para os insetos.

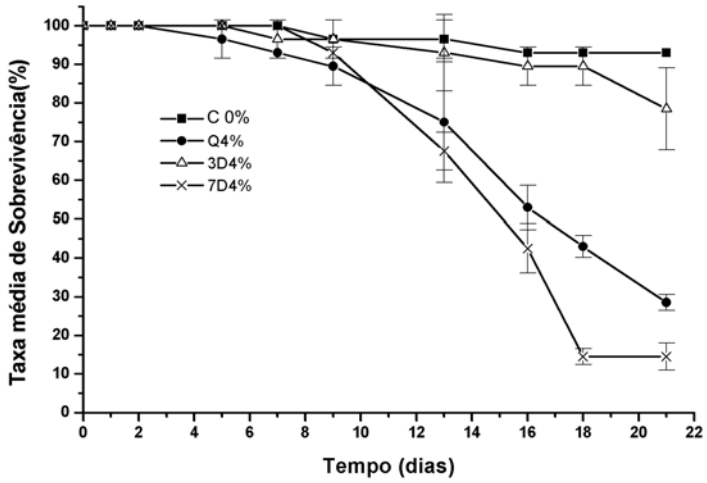

Figura 6: Sobrevivência (%) de *Dysdercus peruvianus* alimentados com extratos de sementes de *C.ensiformis*. C0%: controle, cápsulas somente com farinha de algodão; Q4 %: cápsulas contendo farinha de algodão acrescida de extrato bruto de semente quiescente (EB–Q) a 4 % (m/m); 3D4 % e 7D4 %: cápsulas de farinha de algodão enriquecidas com extrato bruto de sementes de 3 dias (EB–3D) e 7 dias (EB–7D) pós embebição, respectivamente, a 4 % (m/m). Cada ponto, experimental ou controle, foi composto por 3 potes com 14 insetos cada. Valores expressos são médias dos percentuais de insetos vivos ± desvio padrão.

A figura 7 mostra a distribuição dos insetos quanto à fase do ciclo vital ao final do experimento, e evidencia que os extratos de sementes quiescentes ou germinadas promoveram um retardo na muda dos insetos de 3/4^{o} estágio para adultos. Ao final dos 21 dias, cerca de 50% dos insetos sobreviventes do grupo 7D2 % eram ninfas, sendo que nenhum inseto atingiu a fase adulta no grupo 7D4 %. A última pesagem, feita no 18^{o} dia, não revelou variação significativa da massa média

dos insetos tratados com extratos quiescentes e germinados, ou dos controles alimentados somente com farinha de algodão (dado não mostrado).

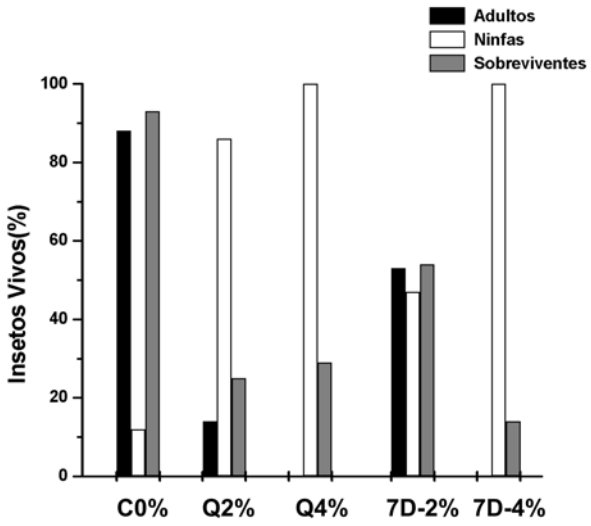

Figura 7: Retardo no desenvolvimento de *Dysdercus peruvianus* alimentados com extrato bruto de sementes de *C. ensiformis* quiescentes e germinadas por 3 ou 7 dias. Os valores em y são percentuais em relação ao número de insetos vivos ao final do experimento (21-22 dias). C0 %: cápsulas contendo apenas farinha de algodão; C2 % e 4 %: cápsulas contendo farinha de algodão acrescida de extrato bruto de semente quiescente (EB–Q) a 2% e 4% (m/m); 7D 2% e 4 %: cápsulas de farinha de algodão acrescidas com extrato bruto de sementes de 3 dias (EB–3D) e 7 dias (EB–7D) após a embebição, a 2 % e 4 % (m/m). Os dados são do mesmo experimento descrito na Figura 6.

Os resultados apresentados nas figuras 6 e 7 mostram que moléculas com massas acima de 14 kDa (retidas na diálise) mantém a toxicidade da semente até o 7^0 dia do processo de germinação, em grau comparável ao verificado para a semente quiescente, apesar da mobilização das proteínas que está ocorrendo nessa fase de desenvolvimento da planta.

2.2 Ensaios de atividade inseticida com extratos ultrafiltrados – efeito do tempo de germinação

Extratos ultrafiltrados (EBUF), contendo moléculas entre 3 kDa e 14 kDa, foram obtidos a partir das sementes nos diferentes tempos como descrito na metodologia, item 2.1. Os EBUF foram inicialmente analisados por dot-blot, na procura por fragmentos imunorreativos contra os anticorpos anti-CNTX, anti-urease e anti-jaburetox. Observamos que os extratos EBUF–3 D e EBUF–7D apresentaram reatividade contra o anticorpos anti-CNTX. Entretanto, não foi observada imunorreatividade desses extratos testados contra o anticorpo monoclonal anti-urease ou contra o anticorpo anti-jaburetox, (dados não mostrados).

Os extratos EBUF–3D e EBUF–7D foram submetidos à cromatografia de gel filtração, em coluna Superdex® 75 HR 10/30, utilizando o tampão 20 mM NaPB pH 6,2. As reações de dot-blot das frações contra o anticorpo anti-CNTX deram sinais muito fracos, mesmo após concentração. Foi observada imunorreatividade em frações cujos volumes corresponderam a peptídeos muito pequenos (menos de 3 kDa), ou talvez retardados na coluna por interações inespecíficas.

Bioensaios dos extratos EBUF–3D e EBUF–7D no inseto *D.peruvianus* não mostraram atividade inseticida apreciável desses materiais, revelando que não há contribuição importante de peptídeos com massas entre 3 kDa e 14 kDa, derivados ou não de ureases, para a toxicidade da *C. ensiformis* entre o 3º e 7º dia após embebição.

3 Atividade ureásica e mobilização das ureases durante a germinação

Para investigar a contribuição das ureases para a atividade inseticida dos extratos de sementes germinadas de *C. ensiformis*, estudamos a mobilização da urease ao longo da germinação por técnicas imunoquímicas (dot blot e Western Blot), de sementes quiescentes até o 6º dia e, também com raízes, cotilédones e folhas de plantas com 20 dias. Como mostrado na figura 8, a atividade ureásica por miligrama de proteína manteve-se relativamente constante até o 6º dia. Os cotilédones residuais de plantas com 20 dias, entretanto, apresentaram o maior nível de atividade específica detectada, sendo cerca de seis vezes superior aos níveis encontrados nas sementes quiescentes (Fig. 7). Apesar de níveis bastante baixos quando comparados com as sementes em qualquer tempo, folhas e raízes de plantas com 20 dias apresentaram discreta atividade ureásica.

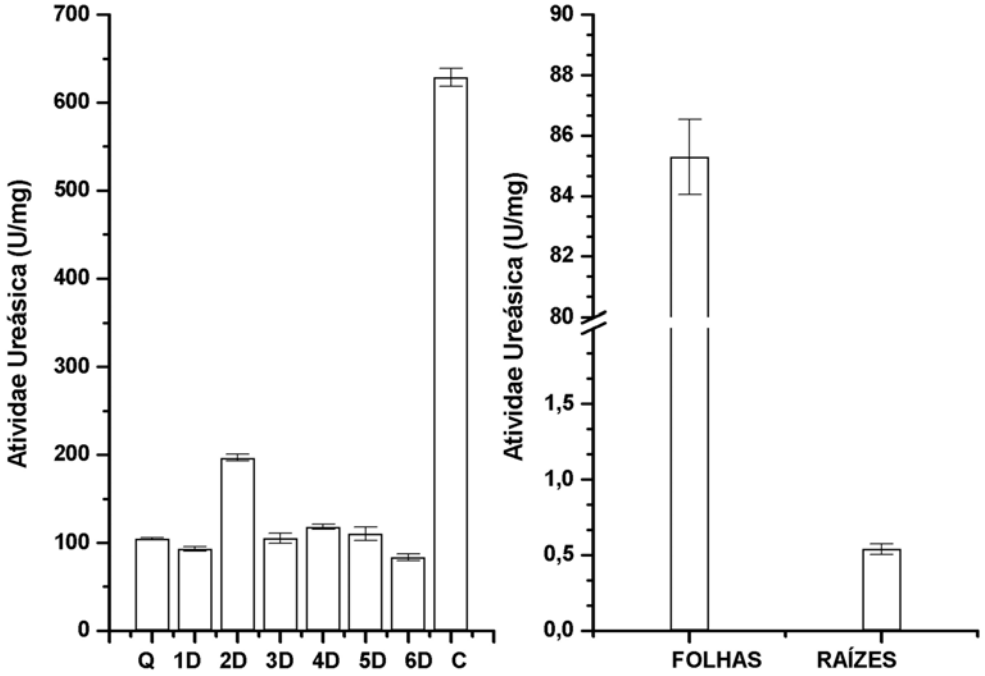

Figura 8: Atividade ureásica durante a germinação e em tecidos de plantas com 20 dias. A atividade ureásica dos extratos foi ensaiada utilizando-se 10 mM uréia, em 20 mM NaPB pH 7,5. por 10 min, a 37^{o}C, como descrito na metodologia. Uma unidade (U) de atividade ureásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de amônia por minuto, em 20 mM NaPB pH 7,5 à 37^{o}C, por mg de proteína. Valores são médias e desvios padrão de triplicatas. Q: extrato de semente quiescente; 1D a 6D: extratos de sementes do 1^{o} ao 6^{o} dia da embebição, respectivamente; C: extrato de cotilédones de plantas com 20 dias.

Contrastando com a aparente preservação da urease ao longo da germinação, houve intensa degradação de proteínas endógenas, em especial da principal proteína de reserva canavalina (45 kDa, que apresenta menores níveis a partir do 4^{o} dia, e não é mais observada, por SDS-PAGE, nos cotilédones de plantas com 20 dias (Fig. 9A). Além da banda de 90 kDa correspondente à subunidade intacta da urease/canatoxina, fragmentos com massa de 40 kDa e 28 kDa, imunorreativos contra o anticorpo anti-CNTX, foram detectados na semente quiescente até o 5^{o} dia, tendendo a desaparecer a partir do 6^{o} dia de germinação, ainda que a cadeia principal continue presente (Fig. 9B). A lectina concanavalina-A

(subunidade de 27 kDa e fragmentos de 14 e 13 kDa); (Cunningham *et al.*, 1972), permanece conservada até o 6º dia após embebição.

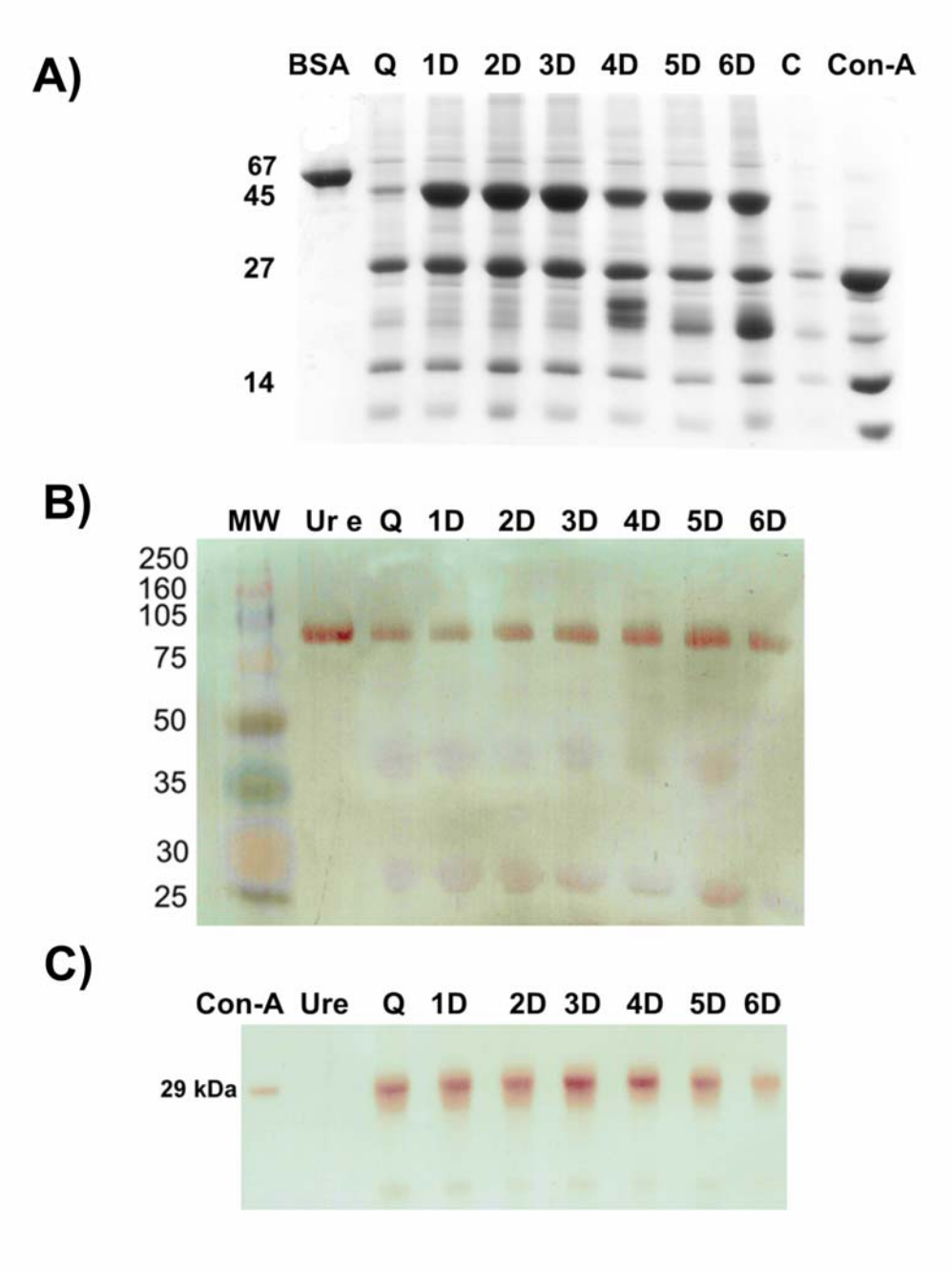

Figura 9: Análise por Western Blot da mobilização das ureases e concanavalina-A durante a germinação. A)Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, desnaturante não redutor, dos extratos brutos das sementes germinadas. Foram aplicados cerca de 30 μg de proteína por poço. Em B) e C) Western Blots de géis corridos nas mesmas condições de A, utilizando anti-CNTX (em B) e anti-Con-A (em C) como anticorpos primários, nas diluições de 1:10,00 e 1:5,000. Ure: urease purificada de *C. ensiformis* (4 μg); Q: extrato da semente quiescente; 1D a 6D: extratos de diferentes tempos pós embebição; C: extrato de cotilédones de 20 dias; BSA: albumina bovina (5 μg); Con-A: concanavalina-A. MW em B) padrão de massa molecular commercial denominado "Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker" (GE-Lifesiences).

4 Estudo de auto digestão em pH 4.0

Para testar a hipótese de que as ureases estariam protegidas de endopeptidases durante a germinação por uma compartimentalização subcelular, estudamos a capacidade dos extratos brutos em diferentes dias, de hidrolisarem a urease presente nestes mesmos extratos, *in vitro*, acompanhando a identificação de fragmentos imunorreativos contra os anticorpos anti-CNTX e anti-jaburetox, que poderiam ter sido formados por enzimas atuantes em pH 4,0. Este ensaio foi chamado de autodigestão. Conforme descrito no item 11 da metodologia, o material resultante da autodigestão (1,5 mg de proteína em 500 μL) foi fracionado por cromatografia de gel-filtração e a presença de fragmentos imunorreativos foi testada por Elisa.

A figura 10 ilustra o perfil proteico e a imunorreatividade contra anticorpos anti-CNTX e anti-jaburetox dos produtos de auto-digestão obtidos em pH 4,0 nos extratos de sementes germinadas por 2, 3 e 4 dias. No 3º dia, há o aparecimento de fragmentos imunorreativos para anticorpos anti–CNTX, com massas ao redor de 88 kDa e 12 kDa, nas frações de auto-digestão em pH 4,0, comparando com os respectivos extratos não digeridos (Fig. 10). Já no 4º dia, observamos um deslocamento dos picos imunorreativos para volumes de eluição que correspondem a fragmentos menores, de massa de 54 kDa e 8 kDa. Não foi possível observar a presença do monômero da cantoxina (95 kDa) no Elisa, provavelmente em função de precipitação por proximidade de seu ponto isoelétrico, que é em pH 4,7 (Follmer *et al.,* 2004). Os resultados comprovam que há nos extratos de sementes germinadas

endopeptidases acídicas capazes de hidrolisar ureases. O fato da mobilização da proteína *in planta* não ocorrer nesse período da germinação (Figura 9B) sugere que estas enzimas estão em compartimentos sub-celulares diferentes do citoplasma, que é a localização conhecida para a urease (Sehgal *et al*., 1966).

A Figura 10 mostra ainda que o anticorpo anti-jaburetox deu baixa imunorreatividade com as frações dos autodigeridos em pH 4,0, e evidenciou o mesmo padrão de fragmentos imunorreativos independente da incubação. Os fragmentos de baixa massa detectados pelo anticorpo anti-CNTX não foram detectados pelo anticorpo anti-jaburetox, mostrando que se tratam de outros fragmentos de urease. Assim, somado com a ausência de toxicidade no inseto *D. peruvianus* das moléculas com massas de 3 a 14 kDa obtidas de sementes germinadas por 3 ou 7 dias, os resultados sugerem que as sementes na fase de germinação avaliada não possuem enzimas capazes de gerar, a partir das ureases, peptídeos equivalentes ao jaburetox-2Ec. Por outro lado, os resultados também sugerem que fragmentos de urease com massa acima de 14 kDa, diferentes do jaburetox, possam estar contribuindo para a atividade inseticida de sementes germinadas a partir do 4º dia.

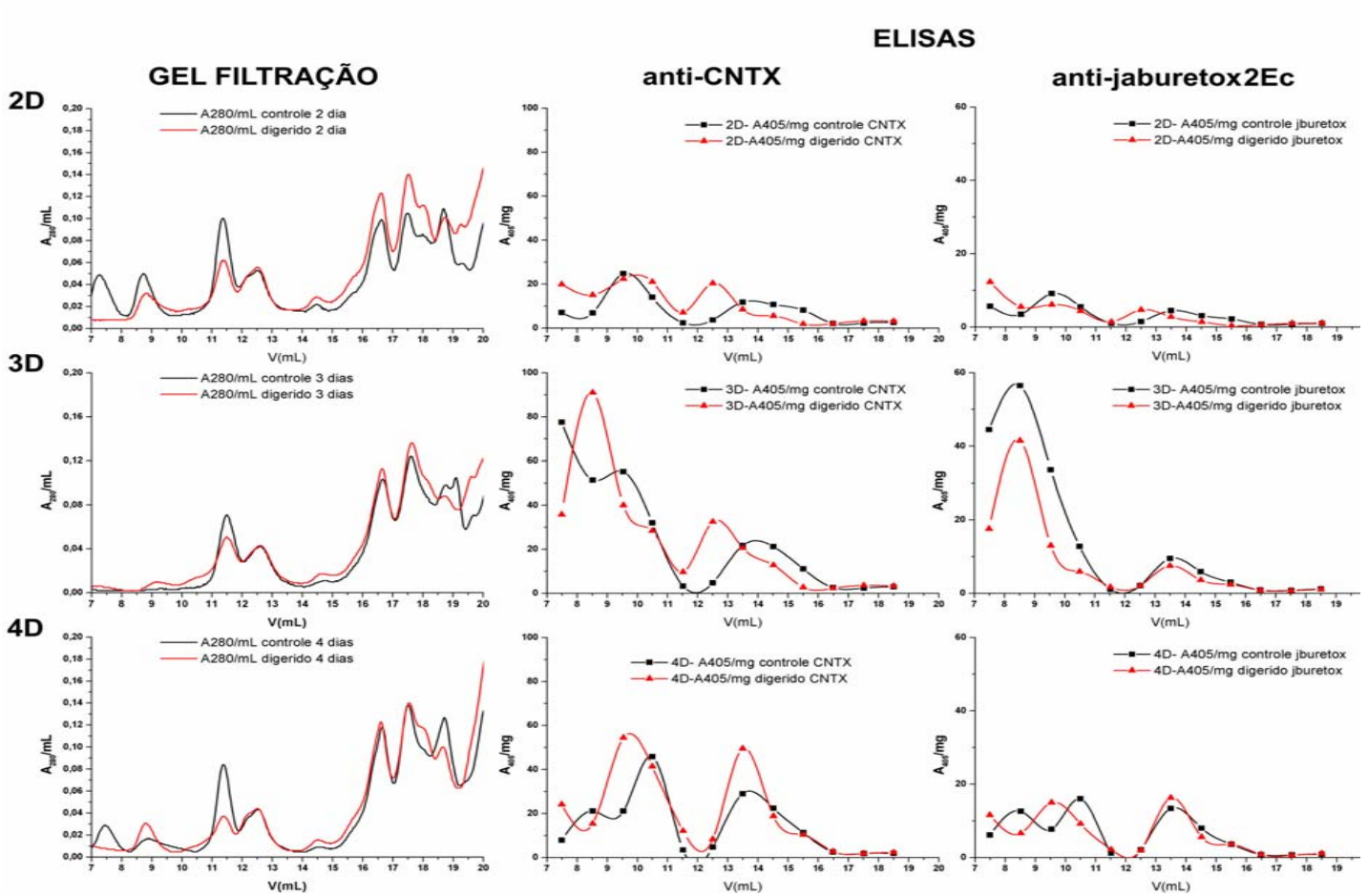

Figura 10: Perfis cromatográficos em coluna Superdex® 75 HR 10/30 e análise por Elisa dos extratos de sementes germinadas, submetidos ou não à auto-digestão em pH 4,0. Os painéis superiores, do meio e inferiores correspondem a extratos de sementes de 2, 3 e 4 dias pós embebição, respectivamente. Na coluna GEL FILTRAÇÃO, eixo y absorbância em 280 nm; linha preta: extrato de sementes germinadas, com pH reduzido à 4,0 antes da cromatografia; linha vermelha: extrato de sementes germinadas incubado em pH 4,0, por 18 h a 37°C. Nas colunas ANTI-CNTX e ANTI-JABURETOX: eixo y, imunorreatividade analisada por Elisa, expressa em A_{405}/mg, das frações cromatográficas da gel-filtração dos extratos não digeridos (quadrados pretos) e digeridos em pH 4.0 (quadrados vermelhos). Os anticorpos primários utilizados foram anti-CNTX (1:10.000) e anti-jaburetox (1:5,000). Eixo x de todos os gráficos representa do volume de eluição das frações na coluna Superdex 75.

5 Estudo de auto-digestão em pH 8.0

Ainda que os extratos brutos das sementes sejam predominantemente ácidas (figura 5), enzimas com atividade ótima em pH alcalinos (ver capítulo 3) estão presentes nas sementes quiescentes e germinadas. Assim, realizamos um estudo de auto digestão em pH 8,0 de forma semelhante ao feito em pH 4,0, visando identificar a contribuição dessas enzimas, compartimentalizadas ou não, para a hidrólise das ureases durante a germinação.

A figura 11 representa os resultado das cromatografias de gel filtração e dos ensaios de Elisa com as frações obtidas a partir dos extratos de sementes germinadas, submetidas ou não, a auto-digestão em pH 8,0. Observou-se que no 3º dia de germinação houve um aumento significativo de fragmentos imunorreativos para o anticorpo anti-CNTX, com massas aparentes de 54 kDa e 8 kDa, semelhante ao que foi observado para o ensaio em pH 4,0. No entanto para os extratos de sementes germinadas com 4 dias e expostas a pH 8,0, incubadas (auto-digestão) ou não, quase não se detecta mais imunorreatividade contra os anticorpos anti-CNTX, sugerindo que os fragmentos de urease detectados no 3º dia não são substratos desse tipo de atividade enzimática, ou foram previamente degradados.

Com verificado para os extratos de sementes germinadas submetidos a auto-digestão em pH 4,0, também em pH 8,0 não foram detectadas enzimas, compartimentalizadas ou não, capazes de formar fragmentos de ureases reconhecidos pelo anticorpo anti-jaburetox.

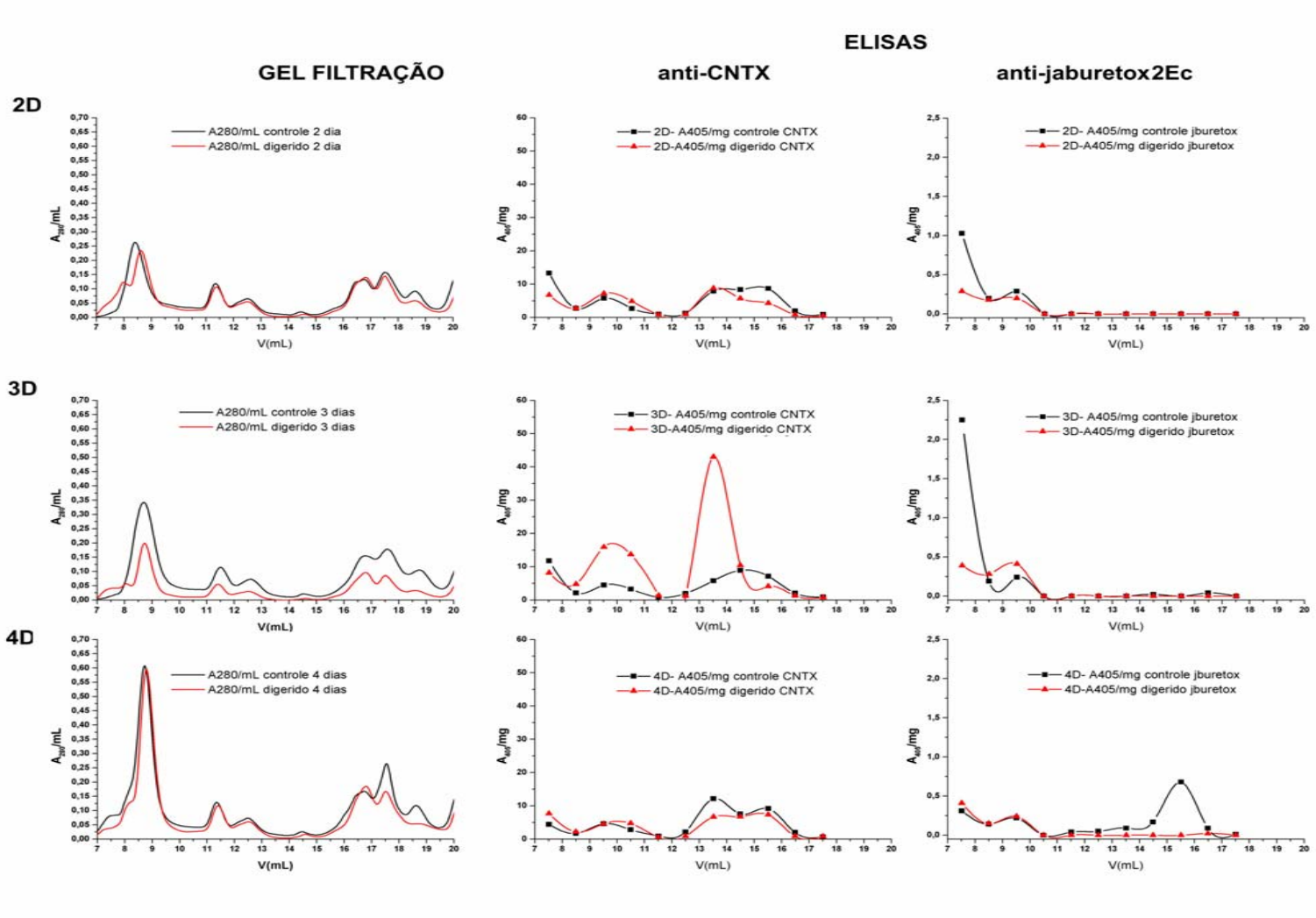

Figura 11: Perfis cromatográficos em coluna Superdex® 75 HR 10/30 e análise por Elisa dos extratos de sementes germinadas, submetidos ou não à auto-digestão em pH 8,0. Os painéis superiores, do meio e inferiores correspondem a extratos de sementes germinadas por 2, 3 e 4 dias. Na coluna GEL FILTRAÇÃO, eixo y absorbância em 280 nm; linha preta: extrato de sementes germinadas, com pH reduzido à 8,0 antes da cromatografia; linha vermelha: extrato de sementes germinadas incubado em pH 8,0, por 18 h a 37°C. Nas colunas ANTI-CNTX e ANTI-JABURETOX: eixo y, imunorreatividade analisada por Elisa, expressa em A_{405}/mg, das frações cromatográficas após gel-filtração dos extratos não digeridos (quadrados pretos) e digeridos em pH 8.0 (quadrados vermelhos). Os anticorpos primários utilizados foram anti-CNTX (1:10.000) e anti-jaburetox (1:5,000). Eixo x de todos os gráficos representa do volume de eluição das frações na coluna Superdex 75.

Capítulo 2:

Endopeptidases acídicas da

Canavalia ensiformis

A atividade enzimática das endopeptidases presentes na semente de *Canavalia ensiformis* foi acompanhada durante o processo da germinação e crescimento inicial da planta. Procuramos identificar, por métodos bioquímicos, as diferentes classes de proteases presentes e caracterizar aquelas candidatas a estarem envolvidas com a hidrólise da urease nos estágios de desenvolvimento analisados.

A procura por enzimas da classe aspártico protease foi feita inicialmente com o substrato hemoglobina. A tabela 1 mostra que em todos os extratos analisados detecta-se a atividade hemoglobinolítica de enzimas atuantes em pH 4,0 e sensíveis a pepstatina-A, características de catepsinas tipo D. A atividade hemoglobinolítica ainda está presente no cotilédone da planta com 20 dias, mas nesse estágio, a sensibilidade a pepstatina A é cerca de 40% menor, evidenciando a presença de outras proteinases capazes de hidrolisar a hemoglobina.

Tempo	Abz-AIAFFSRQ-EDDnp AE ($mRFU.min^{-1}/mg$)	Hemoglobina AE (U/mg)
1D	434,59	0,23
2D	359,94	0,17
3D	355,37	0,11
4D	218,93	0,23
5D	136,71	0,17
6D	171,53	0,23

Tabela 1: Perfil de endopeptidases ativas em pH 4,0 sob hemoglobina e Abz-AIAFFSRQ-EDDnp dos extratos de sementes de 1 a 6 dias pós embebição (1D a 6D). Os extratos foram incubados com hemoglobina (0,2g %) durante 1 h à 37°C, ou Abz-AIAFFSRQ-EDDnp (20 μM), durante 15 min, a 37°C, em meio tamponado com 100 mM NaAc pH 4,0. Os valores normalizados para proteína, são a atividade específica de das enzimas atuantes em pH 4,0, sobre cada um dos substratos. Uma unidade de atividade hemoglobinolítica é definido como a variação de 1 A_{280}/h/mg ptn. A atividade sobre o extrato fluorogênico está expressa como a variação de mili unidades de fluorescência por minuto, por mg de proteína. Experimento de uma extração representativo de resultado típico.

O *screening* enzimático em pH 4,0 com o substrato fluorogênico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp e os inibidores, a pepstatina A e a tirostatina, indicou a

presença de enzimas sensíveis aos dois inibidores em todos os extratos testados. Enquanto que a inibição por pepstatina da atividade enzimática dos extratos sob Abz-AIAFFSRQ-EDDnp tende a diminuir ao longo da germinação, observou-se o máximo de inibição por tirostatina no 4º dia pós embebição, coincidindo com o nível mínimo de inibição por pepstatina-A. Outras classes de endopeptidases capazes de hidrolisar o substrato fluorogênico e ativas em pH 4,0 estão presentes nos extratos de sementes, uma vez que quando o ensaio foi feito com pepstatina-A e tirostatina, não houve inibição completa.

	Percentual de inibição da atividade enzimática em pH 4,0			
	Substrato: Hemoglobina	Substrato: Abz-AIAFFSRQ-EDDnp		
Extrato	10 μM Pepstatina-A	10 μM Pepstatina-A	10 μM Tirostatina	10 μM Pepstatina-A + 10 μM Tirostatina
Q	91,67 ± 12,00	NT	NT	NT
1D	90,45 ± 15,91	87,14 ±12,14	69,37 ± 7,85	88,88 ± 6,58
2D	77,25 ± 16,47	89,00 ± 5,89	80,45 ± 2,80	89,84 ± 8,10
3D	84,67 ± 18,25	83,45 ± 4,69	85,17 ± 6,56	87,20 ± 2,58
4D	81,43 ± 10,71	50,03 ± 7,35	86,95 ± 7,82	85,17 ± 10,00
5D	98,02 ± 29,70	70,26 ± 6,58	84,00 ± 5,20	84,21 ± 5,68
6D	80,07 ± 16,47	63,26 ± 2,53	72,75 ± 3,25	80,73 ± 2,35
C	56,88 ± 18,06	NT	NT	NT

Tabela 2: Perfil de endopeptidases ativas em pH 4,0 sob hemoglobina e Abz-AIAFFSRQ-EDDnp dos extratos de sementes quiescentes (Q), de 1 a 6 dias pós embebição (1D a 6D) e de cotilédones (C) de plantas de 20 dias. Os extratos (100) μg foram incubados com hemoglobina (0,2 g %) durante 1 h à 37ºC, ou Abz-AIAFFSRQ-EDDnp (20 μM), durante 5 min, a 37ºC, em meio tamponado com 100 mM NaAc pH 4,0. Os inibidores foram pré-incubados com os extratos durante 10 min à temperatura ambiente, antes do início da reação. Os valores são médias de percentuais de inibição por pepstatina-A, tirostatina ou combinação dos dois inibidores, em relação aos respectivos controles na ausência de inibidores, de 5 experimentos. Para mais detalhes dos ensaios enzimáticos, consultar a seção da metodologia, item 4.1 e 4.2. NT: não testado.

Uma enzima sensível à pepstatina-A foi purificada a partir de sementes quiescentes, e uma enzima sensível à tirostatina foi purificada a partir de sementes germinadas de 4 dias. Essas purificações e a caracterização das proteínas purificadas serão descritas mais adiante nesse capítulo, nos itens 1 e 2.

A procura por enzimas das classes serino proteases (tipo tripsina) e cisteíno proteases foi feita com o substrato cromogênico DL-BAPNA, em pH 5,6. A combinação do agente redutor DTT, e dos inibidores E-64 e benzamidina, foi usada para detectar a atividade de cisteíno endopeptidases, sem a interferência de enzimas serínicas, presentes nas sementes quiescente e germinantes da *C. ensiformis*, e que também são capazes de hidrolisar o substrato DL-BAPNA.

A tabela 3 mostra que não foi possível detectar, pelos métodos usados, a atividade de enzimas tipo cisteíno proteases, que pudessem ser ativadas por DTT ou inibidas por E-64. A forte inibição dos extratos observada para benzamidina sugeriu a presença de serino proteases tipo tripsina durante todo o processo de germinação e em fases do desenvolvimento inicial da planta. O isolamento e caracterização dessas enzimas estão apresentados no capítulo 3 dessa tese.

Extratos	Atividade residual sobre DL-BAPNA em pH 5,6				
	Inibidores/ativador testados				
	DTT	E-64	BZ	DTT+E-64	BZ + E-64
Q	94	95	0	82	0
1D	84	85	0	89	0
2D	97	124	0	106	0
3D	90	82	0	93	0
4D	85	84	0	90	0
5D	93	97	0	93	0
6D	103	126	0	94	0
C	93	84	0	91	0

Tabela 3: Ensaios sobre DL-BAPNA dos extratos brutos de diferentes tempos de germinação da *C. ensiformis*. Os valores são médias de percentuais de atividade residual em relação ao respectivo controle de 5 experimentos. As amostras (100 μg) foram incubadas com 1,0 mM de DL-BAPNA, em 200 μL de meio tamponado com 100 mM NaAc pH 5,6. Inibidores ou ativador foram pré-incubados com as amostras à temperatura ambiente por 20 min antes da adição de substrato. A hidrólise foi acompanhada a A_{405}, por 30 min à 37^{o} C com leituras à cada 12 s. Inibidores (concentração final): E-64 (10 μM); BZ: benzamidina (10 mM). DTT: ditiotreitol, um ativador de cisteíno proteases (5 mM), sendo adicionado sempre antes dos demais, quando combinado. Ensaio típico de pelo menos 5 experimentos.

6 Purificação de uma enzima sensível à pepstatina-A e à tirostatina presente em sementes germinantes de *C. ensiformis*

Ao longo do processo de germinação da *C. ensiformis*, foi possível observar o aumento da atividade de proteases ácidas, atuantes em pH 4,0, sobre a hemoglobina (Tabela 1), e sobre o peptídeo fluorogênico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp, ambos descritos como bons substratos para enzimas da classe aspártico protease (Pimenta *et al.*, 2001). Como dito no Capítulo 1, item 1, as atividades enzimáticas sofreram pequenas variações ao longo da geminação, particularmente para a enzima sensível à tirostatina, cuja presença pode ser detectado nos extratos de sementes apenas em uma estreita janela de tempo. Como mostra a figura 12, ensaios com o substrato Abz-AIAFFSRQ-EDDnp em pH 4,0, observamos que entre o 3^{o} e 5^{o} dia pós-embebição os extratos de sementes apresentam um máximo de inibição por tirostatina e um mínimo de inibição por pepstatina-A.

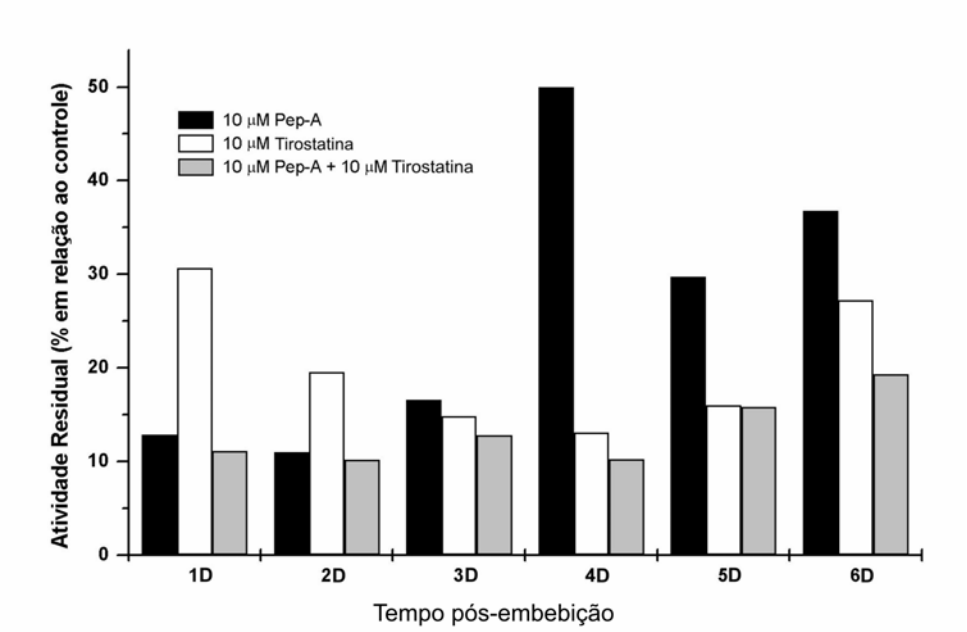

Figura 12: Atividade enzimática dos extratos germinados (EB) por diferentes tempos. Para o ensaio, foram utilizado 20 μM de Abz-AIAFFSRQ-EDDnp, em um volume reacional de 100 μL, tamponado com 100 mM NaAc pH 4,0. A reação foi monitorada em um fluorímetro de microplacas M2e, (Molecular Devices®) com leituras dos poços a cada 12 s, a 37°C, durante 40 min. Os valores utilizados, para fins de cálculo, estão abaixo de 20% do total dos 20 μM de substrato hidrolisado. Foram utilizadas 100 μg de extrato bruto por ensaio. A atividade está expressa como percentual de atividade residual, em relação ao controle. Figura representativa de diversos experimentos realizados.

Diversas tentativas de obter-se a enzima sensível à tirostatina foram feitas ao longo do trabalho, de forma que os dados de purificação são de uma única partida, enquanto que os dados de estudo de germinação são representativos de várias tentativas, inclusive àquela utilizada para a purificação.

A purificação da enzima sensível à tirostatina foi feita a partir de extratos de sementes germinadas de 4 dias pós embebição(EB-4D). Uma amostra de EB-4D (equivalente a 126 mg de proteína) foi aplicada em uma coluna de troca catiônica HiTrapSP HP® (2 x 5 mL), equilibrada com 20 mM NaPB pH 6,0. As enzimas capazes de hidrolisar o substrato fluorogênico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp não

interagiram com a resina, de modo que a atividade foi recuperada na fração não retida. O material não retido foi dialisado contra 20 mM NaAc pH 5,6, preparando-o para a próxima etapa. Nesta etapa a atividade sobre Abz-AIAFFSRQ-EDDnp foi inibida em 46% por tirostatina.

Seguindo a purificação, o material não retido (83 mg de proteína) na HiTrapSP HP® foi submetido à cromatografia de troca aniônica em coluna Source Q®, equilibrada com 20 mM de NaAc, pH 5,6, e eluída com gradiente contínuo de NaCl de 0 a 1 M no tampão de equilíbrio. A atividade sobre o substrato fluorogênico foi eluída em um pico único com 300 mM NaCl. Esse material foi dialisado contra 20 mM NaAc, pH 4,0 e aplicado em uma coluna MonoQ® equilibrada no mesmo tampão de diálise. As proteínas retidas na MonoQ® nesta condição, foram eluídas com gradiente contínuo de NaCl, de 0 – 0,5 M, em 5 mL. A figura 13 ilustra o perfil de eluição obtido na coluna MonoQ®, em que a atividade sobre o substrato fluorogênico foi recuperada entre 300 mM e 400 mM de NaCl.

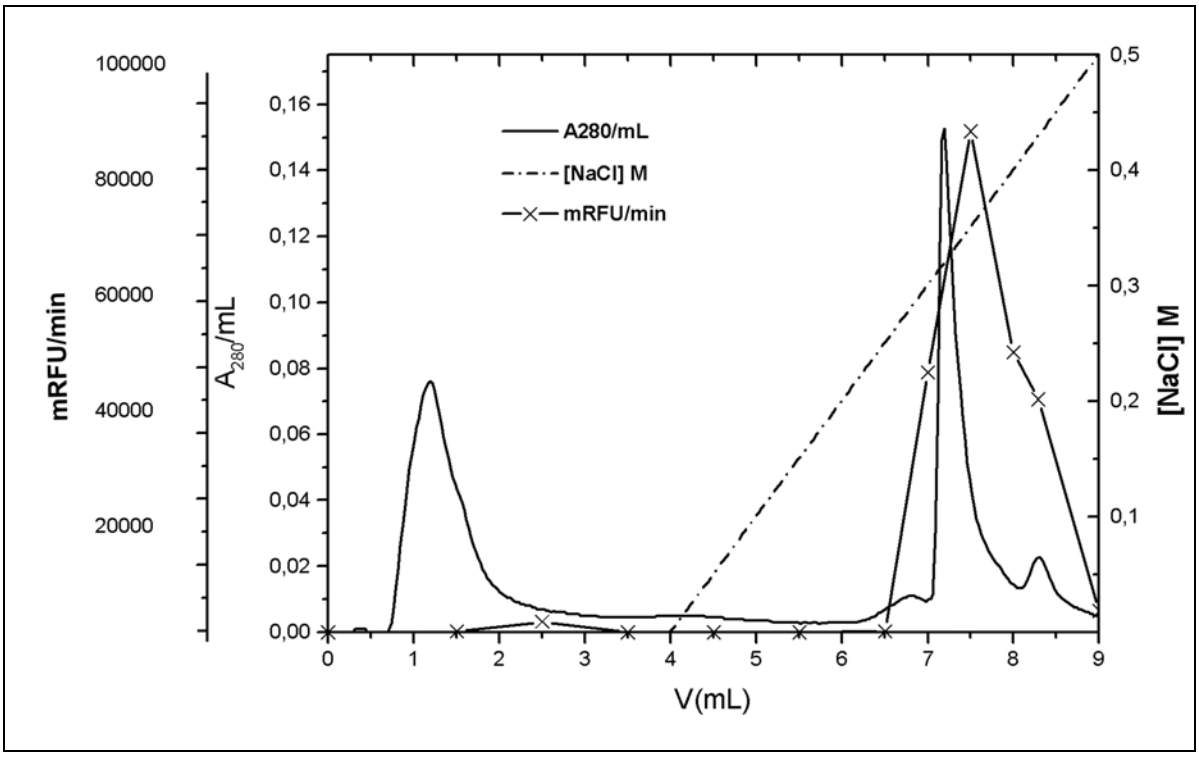

Figura 13: Perfil de eluição na cromatografia coluna MonoQ® da enzima sensível à tirostatina presente em EB-4D de *C. ensiformis*. Foram aplicados 0,88 mg de proteína na coluna, provenientes da etapa anterior em Source Q®. A eluição foi feita com um gradiente contínuo de NaCl (0 – 0 ,5 M), em tampão NaAc 20 mM pH 4,0. Linha cheia: absorbância em 280nm; linha tracejada: gradiente de cloreto de sódio; linha-cruz-linha: atividade enzimática das frações sobre Abz-AIAFFSRQ-EDDnp (10 μM) a 37°C, expresso em miliunidades relativas de fluorescência por min (mRFU/min).

Foi recuperado cerca de 90 μg da proteína purificada (1 mL com 0,09 A_{280}/mL, concentrado em Centricon® de 3 kDa de corte). Não foi possível obter-se os parâmetros cinéticos para o pool da MonoQ®, pois a enzima apresentou-se extremamente instável após esta etapa de purificação. O SDS-PAGE 12% da figura 14 mostra a proteína purificada, com uma massa calculada em 23 kDa.

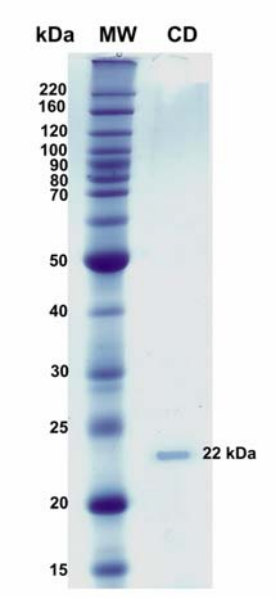

Figura 14: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, desnaturante não redutor, da enzima sensível à tirostatina de *C. ensiformis* após a coluna MonoQ® (CD). Cerca de 5 μg de enzima foram aplicadas no gel. MW, padrão de massa BenchMark® Protein Ladder, Invitrogen. A coloração foi feita com Coommasie Blue coloidal. A massa molecular foi calculada com o uso do software Un-Scan-it®.

A tabela 4 indica que a enzima sensível à tirostatina foi purificada 27.587 vezes. A segunda cromatografia de troca iônica, com redução do pH para 4,0, foi essencial para o alto índice de purificação obtido. O rendimento da purificação, que estava em 12% na etapa anterior, aumenta para 1.738 % nessa etapa, evidenciando um processo de ativação da enzima. O mecanismo dessa ativação não foi estudado nesse trabalho, podendo ser decorrente da remoção de algum inibidor da enzima nessa etapa, ou então por um processo de ativação de zimogênio, freqüente entre as aspártico proteases. No caso das sedolisinas, que são sensíveis à tirostatina, elas sofrem auto-hidrólise, quando incubadas em pHs baixos (3 e 4). Esta auto-hidrólise é revertida quando a tirostatina é adicionada no meio, como demonstrado por Oda *et al.* (1994)

Etapa	A_{280}/mL	mL total de proteína	mg total de proteína	RFU total ($x10^3$)	AE (RFU/mg) ($x10^3$)	X (em relação ao início)
EB-4D	5,76	22	126,72	83	0,7	1
NR-SP	1,94	43	83,42	107	1,3	1,8
SourceQ® pH 5,6	0,443	2	0,886	12	13,2	18
MonoQ® pH 4,0	0,09	1	0,09	1.738	19.311	27.587

Tabela 4: Purificação da enzima sensível à tirostatina, presente em sementes de *C. ensiformis* de 4 dias pós embebição. Todos os ensaios foram feitos com o substrato Abz-AIAFFSRQ-EDDnp em pH 4,0 a 37º C.

A fração contendo a enzima sensível à tirostatina foi inibida por ambos inibidores, pepstatina-A e tirostatina, até a segunda etapa de purificação. A inibição por tirostatina foi à ordem de 77 % e por pepstatina-A à ordem de 95% (dado não mostrado).

6.1 Determinação do ponto de hidrólise do substrato Abz-AIAFFSRQ-EDDNp

Após incubação prolongada com a enzima sensível à tirostatina, visando a hidrólise total do substrato, os produtos da reação foram analisados por espectrometria de massa (LC-ESI-MS), conforme descrito na metodologia, item 7.1. Através da determinação de massas dos fragmentos gerados na hidrólise do substrato por enzimas tipo aspártico protease, como a catepsina D (Pimenta *et al.*, 2001), concluiu-se que tanto a enzima de *C. ensiformis*, como a catepsina D controle, formam um fragmento de 745,7325 g/mol que corresponde à porção FSRQ-EDDnp do substrato testado, indicando que o ponto de hidrólise foi entre as duas fenilalaninas internas da seqüência, conforme a figura 15. Não foi possível

observar no espectrômetro o fragmento Abz-AIAF-, contendo o fluoróforo Abz, provavelmente por não ter sido ionizado nas condições da análise.

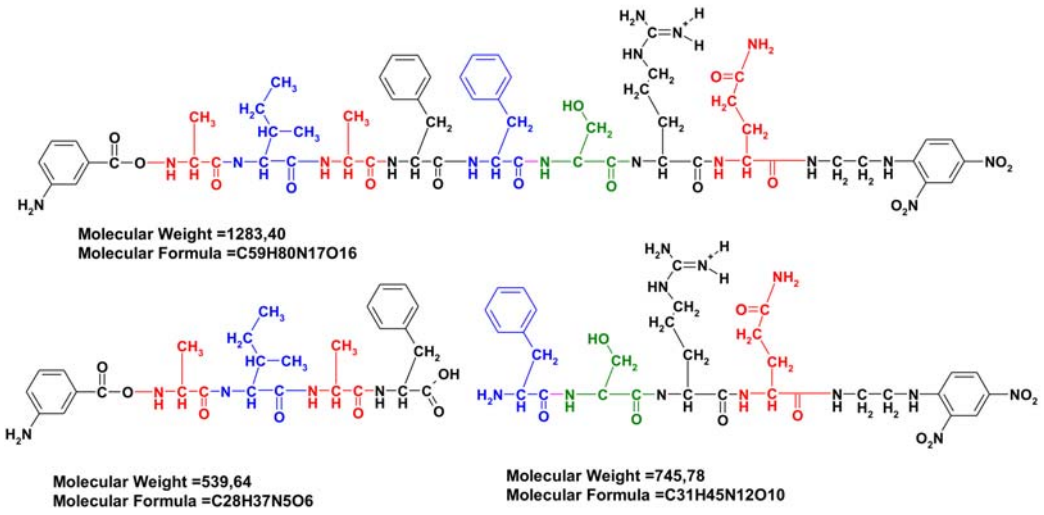

Figura 15: Estrutura do peptídeo fluorogênico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp. O fluoróforo Abz (esquerda N-terminal), e o seqüestrante de fluorescência EDDnp (direita, C-terminal), estão representados em preto. Os aminoácidos da seqüência estão indicados em cores. Em cima está o peptídeo intacto, e em baixo, estão os fragmentos formados quando ocorre hidrólise entre as fenilalaninas internas da seqüência.

6.2 Seqüenciamento de peptídeos internos da enzima oriundos de hidrólise tríptica e seqüenciamento N-terminal

Um total de 16 peptídeos trípticos obtidos de uma banda de gel contendo a enzima sensível à tirostatina purificada foram submetidos a seqüenciamentos por espectrometria de massas (MS/MS). Para detalhes da metodologia, ver item 7. Os fragmentos seqüenciados estão abaixo listados, bem como as possíveis variações de cada um, indicadas por cores diferentes. A letra B indica o ponto de hidrólise da tripsina (preferencialmente resíduos de Lys, K).

Uma análise foi feita utilizando os algoritmos do site http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html, especialmente desenvolvido para análises de peptídeos oriundos de seqüenciamentos por espectrometria de massas. Nesta análise todos os peptídeos foram utilizados, bem como as suas variações, não considerando o *"gap"* existente entre os fragmentos.

Fragmento 1	BXXEAVETEEGPXXX BXXEAVETEEPGXXX BXXEAVEETEGPXXX BXXEAVEETEPGXXX	*
Fragmento 2	BXXYEXXNGR BXXYEXXGNR	
Fragmento 3	BXXPRYTK BXXPGVYTK BXXPVGYTK	
Fragmento 4	BXXYEKLAEXR BXXYEQLAEXR	
Fragmento 5	BXXTREPXXPV BXXTREPXXVP	
Fragmento 6	BXXTGVEPXXVP BXXTVGEPXXVP	
Fragmento 7	BXXEESNYELEGK	
Fragmento 8	BXXEVEEETAPK BXXEVEEETPAK	*
Fragmento 9	BRHELQLXXR BHRELQLXXR	
Fragmento 10	BMTTSYXXVLK BTMTSYXXVLK	
Fragmento 11	BXXSLNSR	
Fragmento 12	BXXDAFFSRGXB	
Fragmento 13	BXXPRYTK	
Fragmento 14	BXXPGVYTK BXXPVGYTK	
Fragmento 15	BXXXAFFXXER	
Fragmento 16	BXXASMPXB BXXASNNXB	

Os alinhamentos mais significativos consideraram os fragmentos 1 e 8 obtidos por MS/MS, indicando similiriedade da enzima sensível a tirostatina com duas proteínas

vegetais, ligadoras de cálcio e presente em vacúolos, ambas de função desconhecida, uma de *Arabidopsis thaliana* e outra de *Raphanus sativus* (rabanete):

AY086900: ***Arabidopsis thaliana*** clone 29227 mRNA, complete sequence, "unknown function": F1 e F8: Fragmentos de seqüenciamentos por espectrometria de massas. Arabi: seqüência da proteína de *Arabidopsis*.

```
Score = 46 (24.6 bits),
Identities = 6/11 (54%), Positives = 7/11 (63%)

F1:          BXXEVEEETPA
             +  E EEE PA
Arabi:   128 KKPEAEEEKPA 138


Score = 39 (21.1 bits)
Identities = 6/7 (85%), Positives = 6/7 (85%)

F1:          VEETEGP
             VEETE P
Arabi:    57 VEETEKP 63


Score = 37 (20.1 bits)
Identities = 5/6 (83%), Positives = 5/6 (83%)


F1:          AVETEE
             AVE EE
Arabi:    24 AVESEE 29


Score = 33 (18.2 bits)
Identities = 4/5 (80%), Positives = 5/5 (100%)

F1:           VEETE
             +EETE
Arabi:    64 IEETE 68
```

Sobrepondo as similaridades encontradas na seqüência completa da proteína temos:

```
         10          20          30          40          50          60
MATVEVEQVT PVAAENIEVP PPKAVESEEV TTVSESLPAP VTESQAPVEV TTKDLVVEET

         70          80          90         100         110         120
EKPIEETEEA QVETPEVVEI KKDEEAPVET PVVVEDESKT EEVVEAKKEE EVEEKKTEEA

        130         140         150
PVVVEEEKKP EAEEEKPAVE ASVTAPVEKA DE
```

Os resíduos idênticos estão em azul. Os resíduos de Lys reconhecidos pela tripsina para gerar os respectivos peptídeos analisados por MS/MS estão enquadrados. No ExPASy Proteomics Server (http://ca.expasy.org), em “ProtParam”, a massa da proteína foi calculada em 27110,3 com ponto isoelétrico teórico de 4.12.

Os mesmos tipos de análises foram feito com a proteína de rabanete, onde F1 e F8 são os fragmentos do sequenciamento por espectrometria de massas, e RABANE é a seqüência da proteína de rabanete.

```
 Score = 29
Identities: 5/7(71.4%)

           10
F1     VEETEGP
       V ETE P
RABANE VTETETP
            50

Score=28
Identities: 5/7(71.4%)

F1         EAVEETE
           E VEET
RABANE 104 EEVEETK 110

Score=28
Identities: 5/7(71.4%)
```

```
F1          EAVEETE
            E VEET
RABANE 132 EEVEETK 139

Score= 38
Identities: 6/6(100.0%)


F8          EEETPA
            EEETPA
RABANE 162 EEETPA 168

Score= 33
Identities: 6/8(75.0%


F8          VEEETPAK
            VEEET A
RABANE 202 VEEETKAE 209




Sore=32
Identities: 5/5(100.0%)


F8          EETPA
            EETPA
RABANE 206 EETPA 210
```

dbj|BAA99394.1| vacuolar calcium binding protein [*Raphanus sativus*]

```
        10          20          30          40          50          60
MATADVEQVT PAAAEHVEVT PPKTVAPEET VAAAVVADSA PAPVTETETP VKETEETKTE

        70          80          90         100         110         120
TEEIKKEEEA PVEVTTKDLP VEEAPAAVEE ESKTEEVVEP KKEEEVEETK TEETPAVVEE

       130         140         150         160         170         180
ESKTEEVVEP KKEEEVEETK TEETPAVVEE ESKAEDVVEP KKEEETPAVV EEESKTEEVV

       190         200         210         220         230         240
EPKKEEEAPV VVEEETKAEE EVKKTEETPA VVEEEKKPEA EEEEKTTEVA AVQAAAAPAE

     248
VAVEKADE
```

A massa da proteína foi calculada em 18448.9 com ponto isoelétrico de 4.09.

Comparando as duas proteínas vacuolares ligadoras de cálcio, de *A. thaliana* (A.t.) e de *R. sativus* (R.s.), observa-se que não há correspondência entre as regiões de alinhamento com os fragmentos da enzima de *C. ensiformis* nessas moléculas.

```
A.T.     1 MATVEVEQVTPVAAENIEVPPPKAVESEEV--VTTVSESLPAPVTES---   44
           |||.:||||||.|||::||.|||.|..||   ...|::|.||||||:
R.S.     1 MATADVEQVTPAAAEHVEVTPPKTVAPEETVAAAVVADSAPAPVTETETP   50

A.T.    45 ------------------QAPVEVTTKDLVVEE----------TEKPIEE   66
                             :||||||||||.|||          ||:.:|.
R.S.    51 VKETEETKTETEEIKKEEEAPVEVTTKDLPVEEAPAAVEEESKTEEVVEP   100

A.T.    67 TEEAQVE----------------TPEVVEIKKD--------EEAPV----   88
           .:|.:||                |.||||.||:        ||.|.
R.S.   101 KKEEEVEETKTEETPAVVEEESKTEEVVEPKKEEEVEETKTEETPAVVEE   150

A.T.    89 --------------ETPVVVEDESKTEEVVEAKKEEE----VEE------   114
                         |||.|||:||||||||||.|||||     |||
R.S.   151 ESKAEDVVEPKKEEETPAVVEEESKTEEVVEPKKEEEAPVVVEEETKAEE   200

A.T.   115 --KKTEEAPVVVEEEKKPEAEEEKPAVEA----SVTAP----VEKADE     152
             |||||.|.|||||||||||||:...|.    :..||    ||||||
R.S.   201 EVKKTEETPAVVEEEKKPEAEEEEKTTEVAAVQAAAAPAEVAVEKADE     248
```

Os peptídeos seqüenciados por MS/MS ainda deram similariedade com partes da seqüência interna de uma zinco metaloprotease de *Streptococcus pneumoniae*, que apresenta uma cadeia polipeptídica de 1969 resíduos:

```
Sbjct  241 VESKSEEKVAVKPESQPSDKPAEESKVEQAGEPVAPREDEKAPVEPEKQPEAPEEEKA 298

Sbjct  299 VEETPKQEDTQPEVVETKDEAANQPVEEPKVETPAVEKQTEPTEEPKVEQVGEPVAPR 356
```

O N-terminal da enzima de *C. ensiformis* sensível à tirostatina foi determinado por degradação de Edman a partir de uma banda de gel transferida para PVDF, como descrito na metodologia, item 8. Uma seqüência de 14 resíduos foi obtida:

S L N E P A I M L R M V A E.

Essa seqüência foi submetida aos algoritmos de bancos de dados do BLAST (PDB e non-reduntant sequence proteins-NR) para alinhamento com seqüências de outras proteínas. Similaridades significativas foram encontradas com enzimas proteolíticas, sendo que as mais relevantes estão listadas abaixo:

Meprin_Alpha, - Meprins are multidomain extracellular metalloproteases capable of cleaving growth factors

CD Length: 167, **Pct. Aligned:** 4.790419, **Bit Score:** 16.500802, **E-value:** 570

```
Query      4 EPAIMLRM 11
cd03783   87 DPDVRLRM 94
```

cd02420,Peptidase_C39D,A sub-family of peptidase family C39 (cisteíno-protease)

CD Length: 125, **Pct. Aligned:** 10.4, **Bit Score:** 14.843094, **E-value:** 1814

```
Query      2 LNEPAIMLRMVAE 14
cd02420   99 LNDPATGRRTVSL 111
```

pfam05579, Peptidase_S32, Equine arteritis virus serine endopeptidase S32

CD Length: 426, **Pct. Aligned:** 3.051643, **Bit Score:** 14.107777, **E-value:** 3028

```
Query        2 LNE--PAIMLRMV 12
pfam05579  216 LNEilPKVLVRLV 228
```

Chain-A E-coli aminopeptidase (pdb|1GYT|A)

```
Query  7    IMLRMVAE  14
Sbjct  303  VM-RMVAE  309
```

Methionine Aminopeptidase (E.C.3.4.11.18)(pdb1mat)

```
Query  5    PAIM---------------LRMV  12
Sbjct  117  PTIMGERLCRITQESLYLALRMV  139
```

Sumarizando os resultados de alinhamento, destaca-se a similaridade com metaloproteínas e metaloproteases, tanto do N-terminal como de fragmentos internos da enzima de *C. ensiformis* sensível à tirostatina.

7 Purificação parcial de uma enzima tipo aspártico-protease por cromatografia de afinidade por Pepstatina-A agarose

Uma amostra de extrato bruto de semente quiescente (EB-Q) contendo 229 mg de proteína em tampão NaAc 50 mM, 500 mM NaCl, pH 4,0, foi aplicada em 10 mL de resina Pepstatina-A agarose. Uma atividade hemoglobinolítica foi eluída da resina com 50 mM TRIS-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0, sendo as frações coletadas imediatamente ajustadas para conter 50 mM NaAc, pH 5,6. O material ativo, 8 mL com 0,11 A_{280}/mL, dialisado contra NaAc 50 mM pH 4,3, foi submetido a uma troca catiônica em HiTrap SP HP® (2 x 5mL), equilibrada em pH 4,3. Quatro picos foram obtidos (figura 16A): não retido P1, um pequeno pico eluído no início do gradiente (P2), e picos P3 e P4, eluídos entre 400 e 600 mM, analisados por SDS-PAGE (Fig. 16B).

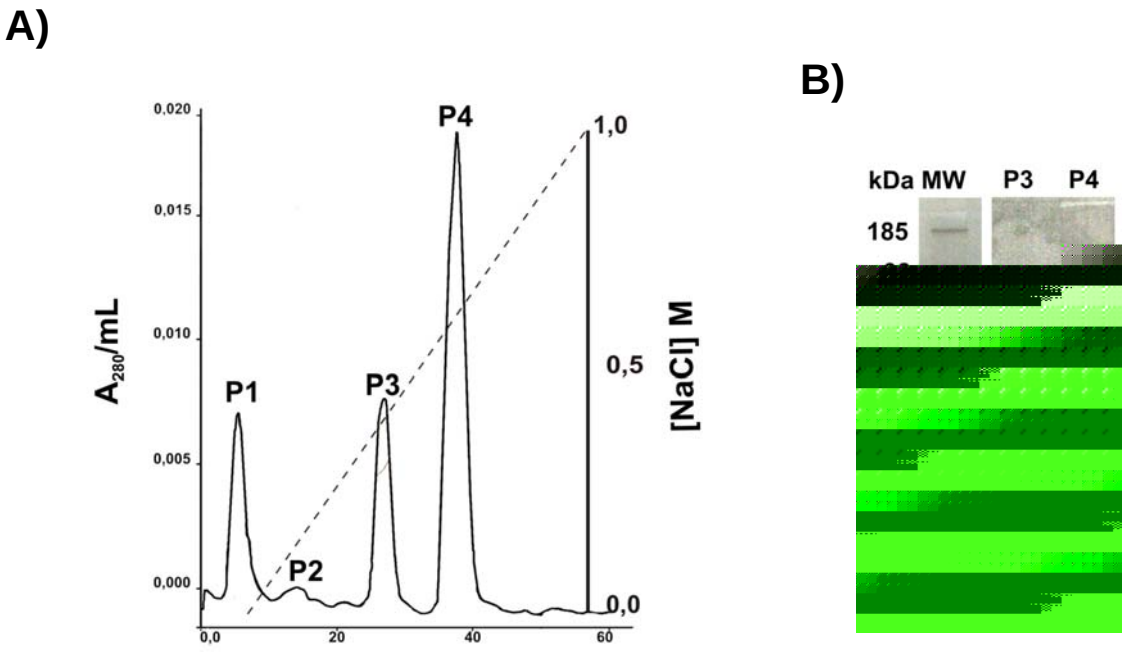

Figura 16: Purificação de uma aspártico endopeptidase de sementes quiescentes de ***C. ensiformis***. A cromatografia de troca iônica em HiTrapSP do pool eluído da cromatografia

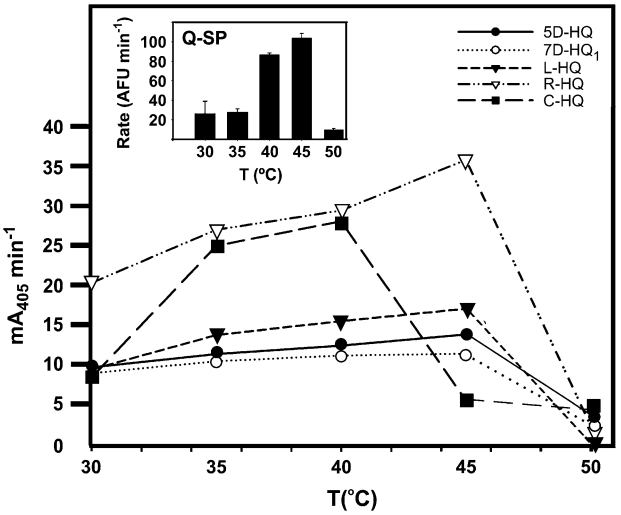

Fig. 6. Optimum temperature assay. The inset bar graph shows the optimum temperature assay performed with Q-SP in the presence of 10 μM CBZ-Arg-Arg-AMC. HQ fractions assayed with 0.625 mM of DL-BApNA are shown as a line graph. In both cases, samples (50 μl) were pre-incubated for 10 min at the desired temperature in 100 mM TRIS-HCl at pH 8.0, before addition of substrate, and the assays were carried out for 10 min. Samples tested were: 5D-HQ (closed circles); 7D-HQ_1 (open circles); L-HQ (closed triangles); R-HQ (open triangles); C-HQ (closed squares). Representative results are shown.

of inhibition of Q-SP by PMSF. As described for most plant serine proteinases (Antao and Malcata, 2005), Q-SP was not inhibited by the serpin SBTI. Some trypsin-like enzymes need a calcium ion to maintain their stability, although the presence of this metal is not necessary for catalysis. The chelating agent 1,10-orthophenanthroline partially inhibited Q-SP, suggesting the participation of a divalent metal cation in maintaining its structure.

As compared with cucumisin-like proteinases which show affinity in the millimolar range for hydrophobic residues (Antao and Malcata, 2005), Q-SP displays high affinity for arginine in the P1 position, as indicated by the K_M in the low micromolar range (Fig. 2). In addition, arginine in the P2 subsite is important for positioning the substrate in the active cleft, demonstrated by the higher affinity of the enzyme for Z-Arg-Arg-MCA than for DL-BApNA. Although differing in optimal pH and molecular mass, Q-SP resembles KLSP protease from common bean (*P. vulgaris*), which also displays micromolar affinity for substrates with Arg residues in P1 and P2 subsites (Popovic *et al*., 2002). Apparently, Q-SP shows only narrow specificity for protein substrates as it did not hydrolyse bovine serum albumin, haemoglobin, or some proteins found in *C. ensiformis* seeds, such as urease, concanavalin-A, or canavalin, the main storage protein of jack bean seeds (Sammour *et al*., 1984).

Apparently, Q-SP is a protein different from the enzyme previously described in jack bean seeds by Oshikawa *et al*. (2000). That enzyme was shown to have its optimal pH 9.0 (pH 7–8 for Q-SP, being inactive at pH 9.0), optimal temperature 60 °C (45 °C for Q-SP), molecular mass of 41 kDa (33 kDa for monomeric Q-SP), with no reported tendency for oligomerization, higher thermal stability (50% residual activity after 1 h at 50 °C versus 5% for Q-SP after 20 min at 50 °C), higher sensitivity to inhibition by benzamidine [46% residual activity (1 mM) versus 37% (10 mM) for Q-SP] and by zinc chloride [0% residual activity (1 mM) versus 90% for Q-SP], and lower sensitivity to inhibition by leupeptin [17% residual activity (60 μM) versus 10% (10 μM) for Q-SP] (Oshikawa *et al*., 2000). The enzyme isolated by Oshikawa's group, which did not hydrolyse casein, lysozyme, or insulin B, was not tested upon proteins from *C. ensiformis* seeds.

With the aim of investigating the fate of the Q-SP enzyme during early stages of *C. ensiformis* development, the same purification protocol was applied to identify BSE in seeds at 5 d and 7 d after imbibition. These enzymes might also be serine proteinases, although they were not unambiguously identified as such in this study. A new enzyme is synthesized on the 7th day and is seen as a second active peak in the anion exchange chromatography (Fig. 4B). This is a critical moment of the developmental process when several nutrients have already been consumed (Muntz *et al*., 2001) and new enzymes might be necessary to accomplish functions different from those performed by maternal enzymes stored in the seed during earlier stages of development (Schlereth *et al*., 2000; Muntz *et al*., 2001; Grudkowska and Zagdanska, 2004). BSEs were also found in roots (R-HQ), leaves (L-HQ), and cotyledons (C-HQ) of 24-d-developed plants. Although no activity was recovered after C-HQ gel filtration, two peaks were seen at the same elution volumes of the active peaks obtained for gel-filtered Q-SP (Fig. 5A). However, SDS-PAGE of Q-SP and C-HQ indicated different molecular masses for the monomeric state of these enzymes (28 kDa and 40 kDa, respectively). That these two proteins are not the same was also indicated by their behaviour in the ion exchange chromatography. The enzyme derived from quiescent seeds (Q-HQ) eluted with 350 mM NaCl (Fig. 1), whereas the more charged fraction isolated from cotyledons of 24-d-developed plants (C-HQ) was eluted with 450 mM (Fig. 5A). The second peak of activity present in seeds 7 d after imbibition (7D-HQ_2), also eluted with 450 mM, is most likely to be the same enzyme (C-HQ) that was isolated from cotyledons of 24-d-developed plants. Although C-HQ and R-HQ eluted in the same ionic strength (450 mM NaCl), they are clearly different proteins as indicated by their thermal stability at 45 °C (Fig. 6). On the other hand, BSE from leaves (L-HQ) paralleled the behaviour of the enzymes present in quiescent (Q-SP) and 7 d seedlings (7D-HQ_1) regarding the elution with 350 mM NaCl in the ion exchange step, and in its similar optimal temperature and thermal stability. These facts most likely indicate different members of an

alkaline serine protease family and a developmentally regulated expression of the members of the corresponding gene family. At this point, expression of the same gene in different organs cannot be excluded. Thus L-HQ may represent a developmental regulation of the quiescent enzyme gene with expression in dry seeds and leaf tissues. Q-SP shared with the apparently newly synthesized enzymes R-HQ and C-HQ the optimal pH 8.0, the affinity for Arg residues, inhibition by benzamidine, and no sensitivity to SBTI or PMSF.

The physiological role of Q-SP and other BSEs found in the developing *C. ensiformis* plants cannot be assigned yet. It is known that seed storage protein breakdown takes place in acidic vacuoles and is mediated by acidic proteases. Although subcellular localization of Q-SP was not performed in this work, this alkaline protease was incapable of degrading the main seed storage protein canavalin as well as other proteins endogenous to the seed. Thus a putative role of this enzyme in protein mobilization can be ruled out. In conclusion, Q-SP and other members of this alkaline protease family might participate in some specific limited proteolysis event(s) yet to be characterized.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to Dr Douglas Luster (Foreign Disease-Weed Science Research Unit, USDA, Frederick, MD, USA) for the use of the USDA greenhouse facility and for all the help in conducting this study. The authors are also thankful to Mr Jerry Alexandratos (Macromolecular Crystallography Laboratory, NCI, Frederick, MD, USA) for the mass-spectrometry measurements and other help during this project. This project was supported in part by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil), by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), and by the Intramural Research Program of the NIH, National Cancer Institute, Center for Cancer Research.

References

Abe Y, Shirane K, Yokosawa H, Matsushita H, Mitta M, Kato I, Ishii S. 1993. Asparaginyl endopeptidase of jack bean-seeds: purification, characterization, and high utility in protein-sequence analysis. *Journal of Biological Chemistry* **268,** 3525–3529.

Antao CM, Malcata FX. 2005. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry* **43,** 637–650.

Arima K, Yonezawa H, Uchikoba T, Shimada M, Kaneda M. 2000. Cleavage specificity of cucumisin, a serine protease, with synthetic substrates. *Phytochemistry* **54,** 451–454.

Barret AJ, Rawlings ND, Woessner JF. 1998. Trypsin. In: Barret AJ, Rawlings ND, Woessner JF, eds. *Handbook of proteolytic enzymes*. London: Academic Press, 12–21.

Bewley JD, Black M. 1986. Seeds: germination, structure and composition. In: Bewley JD, Black M, eds. *Seeds: physiology of development and germination*. New York, NY: Plenum Press, 1–25.

Boyd PM, Barnaby N, Tan-Wilson A, Wilson KA. 2002. Cleavage specificity of the subtilisin-like protease C1 from soybean. *Biochimica et Biophysica Acta* **1596,** 269–282.

Carlini CR, Grossi-de-Sá MF. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties: a review on their potentialities as bio-insecticides. *Toxicon* **40,** 1515–1539.

Carlini CR, Guimarães JA. 1981. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon* **19,** 667–675.

Carrington DM, Auffret A, Hanke DE. 1985. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin-A. *Nature* **313,** 64–67.

Famiani F, Walker RP, Tecsi L, Chen ZH, Proietti P, Leegood RC. 2000. An immunohistochemical study of the compartmentation of metabolism during the development of grape (*Vitis vinifera* L.) berries. *Journal of Experimental Botany* **51,** 675–683.

Ferreira-DaSilva CT, Gombarovits MEC, Masuda H, Oliveira CM, Carlini CR. 2000. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **44,** 162–171.

Follmer C, Barcellos GBS, Zingali RB, Machado OLT, Alves EW, Barja-Fidalgo C, Guimaraes JA, Carlini CR. 2001. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochemical Journal* **360,** 217–224.

Fontes W, Sousa MV, Aragao JB, Morhy L. 1997. Determination of the amino acid sequence of the plant cytolysin enterolobin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **347,** 201–207.

Gettins PG. 2002. Serpin structure, mechanism, and function. *Chemical Reviews* **102,** 4751–4804.

Grudkowska M, Zagdanska B. 2004. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica* **51,** 609–624.

Gruis D, Schulze J, Jung R. 2004. Storage protein accumulation in the absence of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases. *The Plant Cell* **16,** 270–290.

Kaneda M, Tominaga N. 1975. Isolation and characterization of a proteinase from sarcocarp of melon fruit. *Journal of Biochemistry* **78,** 1287–1296.

Kourteva I, Sleigh RW, Hjerten S. 1987. Assay for enzyme inhibition: detection of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin. *Analytical Biochemistry* **162,** 345–349.

Laura R, Robison DJ, Bing DH. 1980. (*p*-Amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride, an irreversible inhibitor of serine proteases. *Biochemistry* **19,** 4859–4864.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193,** 265–275.

Muntz K, Belozersky MA, Dunaevsky YE, Schlereth A, Tiedemann J. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany* **52,** 1741–1752.

Oshikawa K, Aoki K, Yoshino Y, Terada S. 2000. Purification and characterization of a basic amino acid-specific peptidase from seeds of jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **64,** 2186–2192.

Polgar L. 2005. The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62,** 2161–2172.

Popovic T, Puizdar V, Brzin J. 2002. A novel subtilase from common bean leaves. *FEBS Letters* **530,** 163–168.

Sammour KH, Gatehouse JA, Gilroy J, Boulter D. 1984. The homology of the major storage protein of jack bean (*Canavalia ensiformis*) to pea vicilin and its separation from α-mannosidase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **161,** 61–70.

Schlereth A, Becker C, Horstmann C, Tiedemann J, Muntz K. 2000. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* **51,** 1423–1433.

Sentandreu MA, Aubry L, Ouali A. 2003. Purification of bovine cathepsin B: proteomic characterization of the different forms and production of specific antibodies. *Biochemistry and Cell Biology* **81,** 317–326.

Shaw E. 1988. Peptidyl sulfonium salts: a new class of proteinase inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* **263,** 2768–2772.

Sheoran IS, Olson DJ, Ross AR, Sawhney VK. 2005. Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. *Proteomics* **5,** 3752–3764.

Siezen RJ, Leunissen JAM. 1997. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Science* **6,** 501–523.

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

Sumner JB. 1926. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *Journal of Biological Chemistry* **69,** 435–441.

Sumner JB, Howell SF. 1936. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *Journal of Bacteriology* **32,** 227–237.

TanWilson AL, Liu XW, Chen RY, Qi XQ, Wilson KA. 1996. An acidic amino acid-specific protease from germinating soybeans. *Phytochemistry* **42,** 313–319.

Tiedemann J, Schlereth A, Muntz K. 2001. Differential tissue-specific expression of cysteine proteinases forms the basis for the fine-tuned mobilization of storage globulin during and after germination in legume seeds. *Planta* **212,** 728–738.

Uchikoba T, Yonezawa H, Kaneda M. 1995. Cleavage specificity of cucumisin, a plant serine-protease. *Journal of Biochemistry* **117,** 1126–1130.

2 Estudos comparativos entre as enzimas Q-SP e C-SP

Visando melhor caracterizar as enzimas Q-SP (serino protease de sementes quiescentes), e C-SP (serino protease de cotilédones), foram feitos estudos de especificidade para substratos peptídicos fluorogênicos com variações nas posições P1 e P2, e também com o substrato Abz-AIAFFSRQ-EDDnp. Foram também analisadas as especificidades das duas enzimas para os substratos protéicos hemoglobina, caseína e albumina bovina.

3 Resultados

A tabela 6 mostra que as enzimas Q-SP e C-SP são muito semelhantes na afinidade pelos substratos testados. Não foram observadas diferenças significativas quanto à especificidade das enzimas pelos resíduos ocupando as posições P1 ou P2.

Não foi possível determinar eficiência catalítica, pois o grau de pureza das enzimas, apesar de alto, não foi suficiente para esta análise.

Não ocorreu hidrólise do substrato Abz-AIAFFSRQ-EDDnp por nenhuma das duas enzimas. Este substrato foi testado por conter uma arginina na sua seqüência, que poderia ser hidrolisado por alguma das enzimas e, além disso, para averiguar se a enzima Q-SP poderia ser um interferente na purificação das enzimas ácidicas presentes na semente quiescente ou germinantes, que atuam sobre esse substrato.

Substrato Testado	Valores de *KM* (uM)	
	Q-SP	C-SP
CBZ-RR-MCA	0,38	0,54
Z-FR-MCA	0,79	0,78
D-Pro-FR-MCA	0,25	0,31
D-Pro-FF-MCA	0,59	0,78
Abz-AIAFFSRQ-EDDnp	NH	NH

Tabela 6: Valores de *KM* de Q-SP e C-SP, expressos em μM. Foi feita uma cinética por adição, conforme descrito na metodologia, item 13.1. NH: não hidrolisou. Valores médios de 3 análises por substrato.

Uma importante diferença entre as enzimas foi detectada no ensaio de degradação de substratos macromoleculares: a C-SP hidrolisou completamente as duas bandas de caseína, com massas de 41 kDa e 32 kDa, enquanto a Q-SP não foi capaz de hidrolisar este substrato (figura 17. Canaletas 5 e 6).

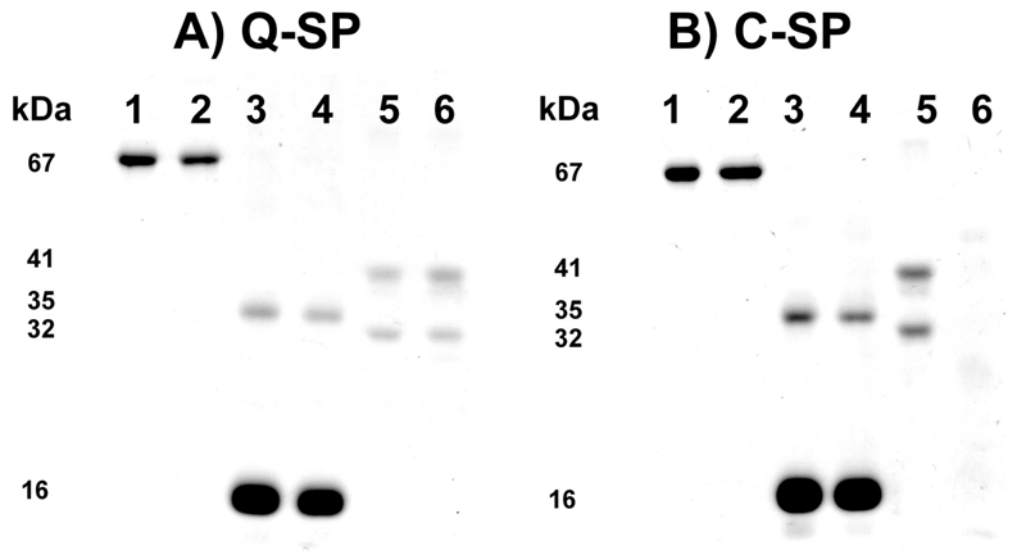

Figura 17: Hidrólise de substratos protéicos pelas enzimas Q-SP (em A) e C-SP (em B). Gel de poliacrilamida 12%. Canaleta 1, 3 e 5: albumina bovina, hemoglobina e caseína não incubadas com as enzimas. Canaletas 2, 4 e 6: albumina bovina, hemoglobina e caseína incubadas com as enzimas Q-SP(A) e C-SP(B). Incubação em pH 8 por 16 h, a 37^{o}C.

Ensaios enzimáticos com azocaseína e caseína medindo-se a formação de peptídeos TCA-solúveis demonstraram, entretanto, que as duas enzimas são capazes

de hidrolisar a caseína. Nesse ensaio a C-SP mostrou-se também mais eficiente para a hidrólise de caseína, como pode ser visto na figura 18.

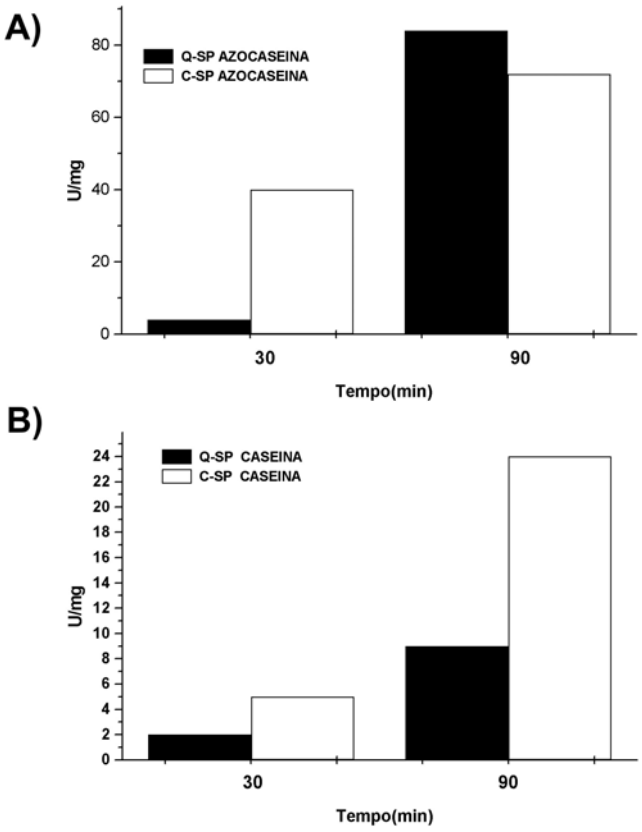

Figura 18:Hidrólise de azocaseína (A), e caseína (B), por enzimas Q-SP (barras pretas), e C-SP (barras brancas). O tempo decorrido foi de 30 min e 90 min, a 37^{o}C. Resultados expressos na forma de atividade específica (U/mg).

Discussão

O objetivo maior deste trabalho foi estudar o processo de germinação e de crescimento inicial da *Canavalia ensiformis,* procurando entender a mobilização da urease durante este período. Os estudos da presença da urease nos extratos de sementes germinadas e cotilédones residuais da planta de 20 dias, quer através de Western blot (Fig.9B) como do acompanhamento da atividade ureolítica (Fig.8), demostraram que a urease é mobilizada de forma diferencial durante a germinação, não sendo degradada de forma extensiva, como observado para a canavalina, a principal proteína de reserva (Fig.9B). O mesmo fenômeno foi observado para a lectina inseticida concanavalina A (Fig.9C). Esses achados reforçam a hipótese de envolvimento dessas proteínas no mecanismo de defesa da planta contra insetos fitófagos, nos estágios iniciais de desenvolvimento.

O acompanhamento da mobilização das ureases nesse trabalho não distinguiu as isoformas da proteína, uma vez que anticorpos monoclonais anti-urease e policlonais anti-canatoxina reconhecem igualmente a urease e canatoxina (Follmer *et al.,* 2001). Ambas isoformas apresentam atividade inseticida semelhante para o inseto *D. peruvianus* (Follmer *et al.,* 2004). Como a urease é mais abundante e de maior atividade ureolítica (Follmer *et al.,* 2001), as bandas de proteína visualizados nos estudos de Western blot e as medidas de atividade enzimática nos extratos brutos certamente refletiram mais a presença dessa isoforma.

Como caracterizado para o inseto *Rhodnius prolixus* (Hemíptera) e em outros insetos com enzimas digestivas acídicas (tipo catepsina B e D), como o *D. peruvianus,* a canatoxina/urease é hidrolisada por estas proteinases resultando na

formação de um peptídeo tóxico, responsável pelo efeito inseticida da proteína (Ferreira-DaSilva *et al.,* 2000; Staniscuaski *et al.,* 2005). Nesse trabalho, procuramos identificar se endopeptidases ácidicas presentes na *C. ensiformis* poderiam formar fragmentos tóxicos de urease durante a germinação e até o 20º dia do crescimento inicial da planta, como forma de defesa da planta contra insetos predadores.

Os bioensaios com o *D. peruvianus* demonstraram a alta toxicidade do extrato contendo moléculas maiores do que 14 kDa, obtidos da semente/planta crescida por 7 dias, sendo este equiparável ao efeito registrado para o extrato de semente quiescente. Além da presença da urease intacta ainda remanescente, podem ter contribuído para o efeito inseticida observado a lectina tóxica concanavalina-A, bem como outros tipos de proteínas inseticidas conhecidos em sementes, como inibidores de proteinases e de amilases, cuja presença na *C. ensiformis* ainda não foi investigada. Peptídeos derivados de urease, maiores que 14 kDa, detectados por anticorpos anti-canatoxina e anti-jaburetox, também podem ter contribuído para o efeito inseticida do extrato dialisado da planta no 7º dia de desenvolvimento. Por outro lado, utilizando o anticorpo anti-jaburetox em dot blot de extratos ultra-filtrados, rico em peptídeos entre 3 kDa e 14 kDa, e para o Elisa de frações da gel-filtração de extratos de sementes germinadas, ficou claro que não ocorre na planta a formação de fragmentos derivados da urease equivalentes ao jaburetox, contrastando com o peptídeo formado a partir da urease por catepsinas digestivas nos insetos suspectpíveis.

Em planta, a urease é uma enzima citoplasmática (Segal *et al*., 1966; Murray & Knox, 1977). Para ser hidrolisada, a proteína precisa ser transportada para uma organela, como o lisossomo, para ter acesso às enzimas digestivas ácidas ali presentes. Para responder a questão, se a urease estaria sendo preservada por não existirem na semente enzimas capazes de hidrolisá-la antes do 3º - 4º dia de germinação, ou se estas estariam presentes, mas sem acesso à urease por estarem em compartimentos subcelulares distintos, foram realizados os experimentos de auto-digestão. Na incubação dos extratos em pH 4,0 seguida de análise por gel filtração e Elisa, verificamos degradação da urease no 3º e 4º dias (Fig 10), quando ainda não se observa mobilização da proteína *in planta* (Fig. 9B), mostrando que existem proteinases ácidas capazes de hidrolisar a urease em algum compartimento sub-celular (Fig. 9). Ainda que os extratos não tamponados sejam acídicos nos estágios iniciais de desenvolvimento da plântula (Fig. 5), o ensaio de autodigestão indicou a presença de proteinases capazes de clivar ureases em pH 8,0 (Fig. 11) no 3º dia de desenvolvimento da semente. A aparente ausência dessa(s) enzimas no 4º dia de germinação pode refletir o consumo total da urease endógena do extrato, com a formação de peptídeos muito pequenos, não detectados no Elisa.

Além da banda de 90 kDa representando a subunidade intacta da urease, a presença de fragmentos da urease com cerca de 40 e 30 kDa pré-formados *in planta* foi observada por Western blot nas sementes quiescentes e até o 5º dia de desenvolvimento. Esse achado sugere um contínuo "*turnover*" das ureases ou mesmo representar degradação de moléculas com enovelamento inadequado, por

exemplo, for falta de níquel. A hidrólise da urease pode ser evento em cascata, requerendo a ação seqüencial de mais de uma enzima. Enzimas atuantes em pHs mais altos, como as serino endopeptidases, poderiam atuar liberando fragmentos solúveis encaminhados para organelas tipo lisossomo, para serem hidrolisados à fragmentos menores.

Endopeptidases de diversas classes já foram descritas em sementes de leguminosas e são atuantes nos estágios iniciais de desenvolvimento das plantas (Mutlu *et al.,* 1999; Terp *et al.,* 2000; Zhang & Jones, 1996; Zhang *et al.,* 2006). Esse estudo revelou que a *C. ensiformis* não é diferente, sendo que uma diversidade de atividades endopeptidásicas foi detectada tanto na semente quiescente como após a germinação, e nos tecidos da planta jovem. Até agora, poucos são os relatos na literatura de enzimas proteolíticas da *C. ensiformis*. As proteinases dessa planta mais bem caracterizadas na literatura até o momento são uma asparaginil endopeptidase de 37 kDa com características de uma cisteíno proteinase (Abe *et al.,* 1993; Carrington *et al.,* 1985) e uma serino proteinase tipo tripsina isolada da semente quiescente por (Oshikawa *et al.,* 2000).

Nesse trabalho, isolamos uma segunda endopeptidase serínica de semente quiescente, que revelou caracterísiticas diferenciadas em relação à enzima descrita pelo grupo de Oshikawa, principalmente massa molecular, temperatura e pH ótimos, e estabilidade térmica (Demartini *et al.,* 2007, capítulo 3). Além dessa, outras duas enzimas pertencentes a classes distintas foram purificadas até a homogeneidade nessa tese, sendo que a enzima sensível à tirostatina parece ser

inédita no reino vegetal, já que até o momento não há descrição de enzima desta família, as sedolisinas, em plantas.

Inicialmente, concentramo-nos na busca de proteinases acídicas na *C. ensiformis*, em função da abundância desse tipo de enzima em sementes segundo a literatura, e pela observação do carácter dos extratos de sementes não tamponados. Os estudos iniciais utilizaram os substratos protéicos hemoglobina e azocaseína na procura de endopeptidases aspárticas e cisteínicas, respectivamente. No entanto, o conteúdo elevado de proteínas nos extratos brutos, mesmo dialisado, produz valores de branco elevados para peptídeos ácido-solúveis resultantes da ação enzimática, dificultando a quantificação das enzimas e as tentativas iniciais de purificação. O uso do peptídeo fluorogênico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp foi fundamental para facilitar o acompanhamento das purificações e as análises das atividades enzimáticas. Esse substrato foi especialmente desenvolvido para aspártico endopepetidases, tipo catepsina D, que clivam a molécula entre as duas fenilalaninas (Pimenta *et al.*, 2001), mas por possuir uma seqüência de 8 aminoácidos e resultar em fluorescência quando qualquer ligação peptídica entre eles é clivada, revelou-se um substrato adequado para avaliar outras classes de enzima.

Um achado interessante nos estudos iniciais foi que, quando extratos brutos de diferentes dias de germinação eram ensaiados em pH ácidos sobre o peptídeo Abz-AIAFFSRQ-EDDnp na presença de pepstatina-A, a forte inibição observada para extratos de sementes quiescentes diminuía ao longo da germinação, chegando a

desaparecer entre o 3º e 5º dias para alguns lotes de sementes. Este fenômeno abriu a possibilidade de estarmos detectando a presença de uma sedolisina, ou serino-carboxil endopeptidase, uma nova família de enzimas recém descritas.

A primeira enzima dessa família foi isolada de *Pseudomonas* sp. 101 por (Oda *et al.*, 1987), tendo sido caracterizada como uma enzima ativa em pHs ácidos e insensível à pepstatina-A. Como comentado na Introdução, as sedolisinas formaram uma nova família na chave de classificação de endopeptidases: a família S2, grupo das serino-endopeptidases similares à subtilisina (Wlodawer *et al.*, 2001a). As sedolisinas acomodam até 8 aminoácidos na sua fenda catalítica e, também são capazes de hidrolisar entre fenilalaninas internas na seqüência (Wlodawer *et al.*, 2003). Através de contato feito com o Dr. Kohei Oda (Kyoto Institute of Technology, Japão), obtivemos uma amostra de tirostatina, descrito como um inibidor específico de sedolisinas (Wlodawer *et al.*, 2001b). Como mostrado na tabela 1 e na figura 12, a redução da inibição por pepstatina-A ao longo da germinação ocorreu concomitante com uma aumento da inibição por tirostatina, atingindo inibições máximas entre o 3º e o 5º dia.

Partindo de extratos de sementes germinadas por 4 dias, tivemos êxito na obtenção de uma enzima cuja atividade sobre Abz-AIAFFSRQ-EDDnp era inibida em 95% por tirostatina e 77 % por pepstatina A, na segunda etapa de purificação. As frações da enzima altamente purificada infelizmente não puderam ser testadas com tirostatina, pois a quantidade de material recuperado foi baixa e decidimos priorizar os seqüenciamentos.

A redução do pH feita entre as corridas na coluna SourceQ® e MonoQ® mostrou-se imprescindível para o êxito da purificação da enzima tirostatina-sensível. O alto grau de purificação e a evidência da retirada de um inibidor na última etapa de purificação são dados bastante animadores, uma vez que não são conhecidos inibidores protéicos de sedolisinas. A comparação dos pontos de hidrólise do mesmo substrato por catepsina D padrão e pelo a enzima sensível à tirostatina evidenciou que ambas hidrolisaram o peptídeo Abz-AIAFFSRQ-EDDnp entre as duas fenilalaninas.

A enzima tirostatina-sensível foi parcialmente seqüenciada no seu N-terminal (14 resíduos) e internamente, a partir de peptídeos trípticos analisados por espectrometria de massas. Os 16 fragmentos internos seqüenciados por MS/MS revelaram 3 a 4 peptídeos que alinham com duas proteínas vegetais vacuolares ligadoras de cálcio, de função desconhecida, presentes uma em *Arabidopsis thaliana* (Alexandrov *et al.*, 2006) e a outra em *Raphanus sativus* (Yuasa & Maeshima, 2001). Interessantemente, essas proteínas apresentam resíduos de Lys colocados nas posições adequadas para a liberação de peptídicos trípticos semelhantes aos identificados para a enzima tirostatina-sensível, além de apresentarem massas moleculares (17 e 28 kDa) e pontos isoelétricos em torno de 4,0. O seqüenciamento N-terminal revelou similaridade com metaloproteinases de diversos organismos. De uma maneira geral, a homologia encontrada foi bastante baixa, sugerindo que a enzima tirostina-sensível da *C. ensiformis* é uma molécula nova, não apresentando semelhanças com outras proteínas depositadas nos bancos

de dados consultados. Nesse contexto é importante salientar que as sedolisinas já caracterizadas não apresentam similariedades significativas de suas seqüências primárias, sequer em torno dos resíduos catalíticos, como ilustrou a Fig. 3, apresentada na Introdução.

A purificação parcial de uma aspártico endopeptidase de sementes quiescentes foi feita por cromatografia em pepstatina-A imobilizada, como descrito para outras enzimas dessa classe. A fração retida na coluna de afinidade foi 100% inibida por pepstatina A, e não foi afetada por tirostatina A, comportamento esperado de uma aspártico proteinase típica. Foram separados 4 picos distintos de proteínas por troca iônica, a partir do material retido na coluna de pepstatina A. O prosseguimento da purificação não foi possível pela instabilidade e pequena quantidade de material obtido após a troca iônica. Após análise por SDS-PAGE, uma banda apresentando 12 kDa correspondente à fração protéica mais positivamente carregada (pico 4 na coluna HiTrap SP) que se ligou à pepstatina-A teve o seu N-terminal seqüenciado (11 resíduos), não revelando similaridade significativa com outras proteínas conhecidas.

Não tivemos sucesso na busca por cisteíno endopeptidases nos extratos de sementes quiescentes ou germinadas de *C. ensiformis*. Esse fato é surpreendente, em se considerando a vasta literatura sobre a presença dessas enzimas em plantas. Uma hipótese a ser testada é que a planta tenha altos níveis de fitocistatinas (Arai *et* al., 2002), inibidores protéicos de cisteíno proteinases, e que a presença das enzimas nos extratos brutos seja mascarada pela atividade inibitória dessas moléculas.

Por outro lado, caracterizamos várias atividades de enzimas da classe serino endopeptidases na *C. ensiformis*, diferentes daquela anteriormente descrita por Oshikawa *et al.* (2000)**.** Estes estudos resultaram no artigo do capítulo 3.

Nele, duas atividades enzimáticas tipo serino endopeptidase foram totalmente purificadas: uma enzima presente em sementes quiescentes (Q-SP), e outra presente no cotilédone residual (C-SP) da planta jovem. As duas enzimas apresentaram diferenças significativas quando à carga elétrica, massa molecular e tendência à formação de oligômeros, mas são bastante semelhantes quando à hidrólise dos substratos. Testadas com substratos di- e tri-peptídicos fluorogênicos, não houve diferença nos valores de K_M obtidos, mostrando que as duas enzimas parecem ter a mesma preferência de resíduos de aminoácidos nas posições P1 e P2. A diferença mais importante entre elas foi a capacidade da C-SP em hidrolisar a caseína, que não foi observada para a Q-SP, que também se mostrou incapaz de hidrolisar proteínas endógenas da semente, como urease, concanavalina A ou canavalina. Nesse contexto, é interessante relembrar que a mobilização da urease durante a germinação só é verificada em períodos mais tardios, que coincidem com a substituição da Q-SP pela C-SP. Estudos de imunohistoquímica podem ajudar a localização destas proteínas nos diferentes tecidos da *C. ensiformis*, bem como a investigação de quais são os substratos endógenos dessas enzimas.

Conclusões

1- A compartimentalização subcelular das enzimas atuantes sobre a urease /canatoxina pode ser responsável pela mobilização diferencial da proteína durante a germinação da *Canavalia ensiformis*; as ureases, entretanto, são hidrolisadas por enzimas da planta atuantes em pHs ácidos e básicos, quando ensaiados *in vitro*;

2- Os bioensaios com o *D. peruvianus* demonstraram a alta toxicidade do extrato de sementes, contendo moléculas maiores do que 14 kDa , no 7o dia de germinação . No entanto, não encontramos evidências da formação de fragmentos equivalentes ao peptídeo jaburetox, liberado pela hidrólise da urease por enzimas digestivas de insetos susceptíveis

3- Novas serino endopeptidases da *Canavalia ensiformis* foram caracterizadas: uma serino endopeptidase de sementes quiescentes, cuja atividade é encontrada ao longo de todo o crescimento inicial da planta e uma serino endopeptidase isolada de cotilédones de 20 dias ; essas enzimas demonstraram várias semelhanças quanto à susceptibilidade à inibidores e afinidade por substratos pequenos, e diferenças na massa molecular, carga eletrica, estabilidade térmica e no reconhecimento de substratos protéicos;

4- Uma nova enzima ácida sensível à tirostatina foi identificada, apresentando ponto de hidrólise no substrato Abz-AIAFFSRQ-EDDnp idêntico àquele da catepsina D; essa enzima apresenta similaridade na seqüência primária com metalo-enzimas e proteínas ligadoras de cálcio , que são propriedades também de Sedolisinas .

Referências Bibliográficas

Abe Y, Shirane K, Yokosawa H, Matsushita H, Mitta M, Kato I, Ishii S. 1993. Asparaginyl endopeptidase of jack bean-seeds - Purification, characterization, and high utility in protein-sequence analysis. *Journal of Biological Chemistry* 268, 3525-3529.

Alexandrov NN, Troukhan ME, Brover VV, Tatarinova T, Flavell RB, Feldmann KA. 2006. Features of Arabidopsis genes and genome discovered using full-length cDNAs. *Plant Molecular Biology* 60, 69-85.

Antao CM & Malcata FX. 2005. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 637-650.

Arai S, Matsumoto I, Emori Y, Abe K. 2002. Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6612-6617.

Barcellos GBS, Almeida LM, Moreira RA, Cavada BS, Deoliveira JTA, Carlini CR. 1993. Canatoxin-cross-reactive, concanavalin-A-cross-reactive and canavalin-cross-reactive materials during maturation of *Canavalia brasiliensis* (Mart) Seeds. *Planta* 189, 397-402.

Barrett AJ. 1977. *Cathepsin D and other carboxyl proteinases*. In: Barrett AJ, ed. *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues.* Amsterdam.:North-Holland Biomed. Press, 209-248.

Barrett AJ & Dingle JT. 1972. The inhibition of tissue acid proteinases by pepstatin. *Biochemical Journal* 439-441.

Barrett AJ, Kembhavi AA, Brown MA, Kirschke H, Knight CG, Tamai M, Hanada K. 1982. L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochemical Journal* 201, 189-198.

Becker-Ritt, A. B. ; Martinelli, A. H. S. ; Mitidieri, S. ; Feder, V. ; Wassermann, G. E.; Santi, L.; Vainstein, M. H.; Oliveira, J. T. A.; Fiuza L.M.; Pasquali, G.; Carlini, C. R. 2007. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon* (no prelo).

Bewly JD & Black M. 1986. Seeds: germination structure and composition. In: *Seeds, Physiology of Development and Germination.* 1-27.

Bollag D. M., Rozycki, M. D., Edelstein, J. S. Protein Methods. Wiley-Liss Press. 1996.

Carlini CR, Barcellos GBS, Baeta-Neves ADV, Guimaraes JA. 1988. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin-A among proteins of leguminous seeds. *Phytochemistry* 27, 25-30.

Carlini CR, Gomes C, Guimaraes JA, Markus RP, Sato H, Trolin G. 1984. Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 54, 161-166.

Carlini CR & Grossi-de-Sa MF. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1515-1539.

Carlini CR & Guimaraes JA. 1981. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon* 19, 667-675.

Carlini CR, Oliveira AE, Azambuja P, Xavier-Filho J, Wells MA. 1997. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect like enzymes. *Journal of Economical Entomology* 90, 340-348.

Carlini CR & Udedibie AB. 1997. Comparative effects of processing methods on hemagglutinating and antitryptic activities of *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 4372-4377.

Carrington DM, Auffret A, Hanke DE. 1985. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin-a. *Nature* 313, 64-67.

Cunningham BA, Wang JL, Pflumm MN, Edelman GM. 1972. Isolation and proteolytic cleavage of the intact subunit of concanavalin A. *Biochemistry* 11, 3233-3239.

Demartini, D. R.; Oliveira, T. F.; Juliano Neto, L.; Juliano, M. A.; Wlodawer, A.; Carlini, C. R. 2005. Proteinases and mobilization of the entomotoxic protein Canatoxin, during germination of *Canavalia ensiformis* seeds. In: *The Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists*, 2005, Seattle, WA. Final Program - The Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists p. 197.

Demartini, D. R.; Pias, L.; Carlini, C. R. 2001. Acidic Proteinases in Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) seeds. *Mobilization of Canatoxin and other proteins during germination*. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG. XXX Reunião Anual-Programa e Resumos, 2001. v. U. p. 43.

Deval C, Bechet D, Obled A, Ferrara M. 1990. Purification and Properties of Different isoforms of bovine cathepsin-B. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire* 68, 822-826.

Dixon NE, Gazzola C, Blakeley RL, Zerner B. 1975. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Letter: A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *Journal of the American Chemical Society* 97**,** 4131-4133.

Fazili KM & Qasim MA. 1986. Purification and some properties of buffalo liver cathepsin B. *Journal of Biochemistry* 293-299.

Ferreira-DaSilva CT, Gombarovits MEC, Masuda H, Oliveira CM, Carlini CR. 2000. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect -like enzymes. *Archives Insect Biochemistry and Biophysics* 44, 162-171.

Follmer C, Barcellos GBS, Zingali RB, Machado OLT, Alves EW, Barja-Fidalgo C, Guimaraes JA, Carlini CR. 2001. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochemical Journal* 360, 217-224.

Follmer C, Real-Guerra R, Wasserman GE, Olivera-Severo D, Carlini CR. 2004. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *European Journal of Biochemistry* 271, 1357-1363.

Fusek M, Baudys M, Metcalf P. 1992. Purification and crystallization of human cathepsin-D. *Journal of Molecular Biology* 226, 555-557.

GarciaCarreno FL & Deltoro MAN. 1997. Classification of proteases without tears. *Biochemical Education* 25, 161-167.

Gershkovich AA and Kholodovych VV. 1996. Fluorogenic substrates for proteases based on intramolecular fluorescence energy transfer (IFETS). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 33, 135-162.

Gruis DF, Selinger DA, Curran JM, Jung R .2002. Redundant proteolytic mechanisms process seed storage proteins in the absence of seed-type members of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases. *Plant Cell* 14, 2863-2882.

Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. 1997. An aspartic endopeptidase is involved in the breakdown of propeptides of storage proteins in protein-storage vacuoles of plants. *European Journal of Biochemistry* 246, 133-141.

Jiang L, Phillips TE, Hamm CA, Drozdowicz YM, Rea PA, Maeshima M, Rogers SW, Rogers JC. 2001. The protein storage vacuole: a unique compound organelle. *The Journal of Cell Biology* 155, 991-1002.

Juliano L, Chagas JR, Hirata IY, Carmona E, Sucupira M, Oliveira ES, Oliveira EB, Camargo ACM. 1990. A selective assay for endooligopeptidase a based on the cleavage of fluorogenic substrate structurally related to enkephalin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 173, 647-652.

Kawada A, Hara K, Morimoto K, Hiruma M, Ishibashi A. 1995. Rat Epidermal cathepsin-B - Purification and Characterization of Proteolytic Properties Toward

Filaggrin and Synthetic Substrates. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 27, 175-183.

Kembhavi AA, Buttle DJ, Knight CG, Barrett AJ. 1993. The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303, 208-213.

King TP. 1995. *Lectin cytochemistry and intestinal epithelial cell biology.* In: Pusztai A and Bardocz S, ed. *Lectins - Biomedical Perspectives.* London UK.:Taylor & Francis, 183-210.

Kumar P, Sreerama YN, Gowda LR. 2002. Formation of Bowman-Birk inhibitors during the germination of horsegram (*Dolichos biflorus*). *Phytochemistry* 60, 581-588.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Mobley HL & Hausinger RP. 1989. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological reviews* 53, 85-108.

Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol.Rev.* 59, 451-480.

Mulinari, F.; Freitas-Silva, M. A.; 2004. Grossi-de-Sá, M.F.; Moraes, M. G.; Kurtenbach, E.; Carlini, C. R. . Toxina Praguicida, Construção Gênica e Método de Controle de Pragas. Depósito em 08/04/2004, no INPI-S, com o número 001120/RS.

Muntz K, Belozersky MA, Dunaevsky YE, Schlereth A, Tiedemann J. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany* 52, 1741-1752.

Murray DR & Knox RB. 1977. Immunofluorescent localization of urease in the cotyledons of jack bean, *Canavalia ensiformis*. *Journal of Cell Science*. 26:9-18.

Mutlu A, Chen X, Reddy SM, Gal S. 1999. The aspartic proteinase is expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds and localized in the protein bodies. *Seed Science Research* 9, 75-84.

Nduwimana J, Guenet L, Dorval I, Blayau M, Le Gall JY, Le Treut A. 1995. Proteases. *Annales de Biologie Clinique* 53, 251-264.

Oda K, Nakatani H, Dunn BM. 1992. Substrate-Specificity and Kinetic-Properties of Pepstatin-Insensitive Carboxyl Proteinase from *Pseudomonas* sp No-101. *Biochimica et Biophysica Acta* 1120, 208-214.

Oda K, Sugitani M, Fukuhara K, Murao S. 1987. Purification and properties of a pepstatin-insensitive carboxyl proteinase from a gram-negative bacterium. *Biochimica et biophysica acta* 923, 463-469.

Oda K, Takahashi T, Tokuda Y, Shibano Y, Takahashi S. 1994. Cloning, nucleotide sequence, and expression of an isovaleryl pepstatin-insensitive carboxyl proteinase gene from *Pseudomonas* sp. 101. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 26518-26524.

Oliveira AEA, Sales MP, Machado OLT, Fernandes KVS, Xavier J. 1999. The toxicity of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) cotyledon and seed coat proteins to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 92, 249-255.

Oshikawa K, Aoki K, Yoshino Y, Terada S. 2000. Purification and characterization of a basic amino acid-specific peptidase from seeds of jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 64, 2186-2192.

Pimenta DC, Oliveira A, Juliano MA, Juliano L. 2001. Substrate specificity of human cathepsin D using internally quenched fluorescent peptides derived from reactive site loop of kallistatin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1544, 113-122.

Polacco JC & Holland MA. 1993. Roles of urease in plant cells. *International Review of Cytology* 145, 65-103.

Rawlings ND & Barrett AJ. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal* 290, 205-218.

Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ. 2006. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Rresearch* 34, D270-D272.

Reichard U, Lechenne B, Asif AR, Streit F, Grouzmann E, Jousson O, Monod M. 2006. Sedolisins, a new class of secreted proteases from *Aspergillus fumigatus* with endoprotease or tripeptidyl-peptidase activity at acidic pHs. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1739-1748.

Rosenthal GA & Dahlman DL. 1986. L-canavanine and protein synthesis in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 14-18.

Sakuta C, Oda A, Konishi M, Yamakawa S, Kamada H, Satoh S. 2001. Cysteine proteinase gene expression in the endosperm of germinating carrot seeds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 65, 2243-2248.

Schernthaner JP, Fabijanski SF, Arnison PG, Racicot M, Robert LS. 2003. Control of seed germination in transgenic plants based on the segregation of a two-component genetic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6855-6859.

Sehgal PP & Naylor AW. 1966. Purification and properties of urease derived from hydrated seeds of jack bean Canavalia ensiformis (L) DC. *Plant Physiology* 567, 41 – 44.

Sirko A & Brodzik R. 2000. Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica* 47, 1189-1195.

Staniscuaski F, Ferreira-DaSilva CT, Mulinari F, Pires-Alves M, Carlini CR. 2005. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45, 753-760.

Sumner JB. 1926. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *The Journal of Biological Chemistry* 69**,** 435-441.

Sumner JB and Howell SF. 1936. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *Journal of Bacteriology* 32, 227-237.

Sutoh K, Kato H, Minamikawa T. 1999. Identification and possible roles of three types of endopeptidase from germinated wheat seeds. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 700-707.

Terp N, Thomsen KK, Svendsen I, Davy A, Simpson DJ. 2000. Purification and characterization of hordolisin, a subtilisin-like serine endoprotease from barley. *Journal of Plant Physiology* 156, 468-476.

Terra WR & Ferreira C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartimentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109B, 1-62.

Tiedemann J, Schlereth A, Muntz K. 2001. Differential tissue-specific expression of cysteine proteinases forms the basis for the fine-tuned mobilization of storage globulin during and after germination in legume seeds. *Planta* 212, 728-738.

Tomazetto, G. Mulinari, F. Stanisçuaski, F. Settembrini, B. P. Carlini, C. R. Ayub, M. A. Z. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant E. coli encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007 (no prelo).

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 1992, 145-149.

Udedibie ABI & Carlini CR.1998. Questions and answers to edibility problem of the *Canavalia ensiformis* seeds - A review. *Animal Feed Science and Technology* 74, 95-106.

Vargas, R. E., Leon, A., Escobar, A. *Canavalia ensiformis* (L.) D. Production, procesamiento e utilización en alimentación animal. 1976.

Vasconcelos IM, Trentim A, Guimaraes JA, Carlini CR. 1994. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 312, 357-366.

Vonclausbruch UC & Tschesche H. 1988. Cathepsin-D from human-leukocytes - purification by affinity-chromatography and properties of the enzyme. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 369, 683-691.

Weatherburn MW. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 39, 971-974.

Wlodawer A, Li M, Dauter Z, Gustchina A, Uchida K, Oyama H, Dunn BM, Oda K. 2001a. Carboxyl proteinase from *Pseudomonas* defines a novel family of subtilisin-like enzymes. *Nature Structural Biology* 8, 442-446.

Wlodawer A, Li M, Gustchina A, Dauter Z, Uchida K, Oyama H, Goldfarb NE, Dunn BM, Oda K. 2001b. Inhibitor complexes of the *Pseudomonas* serine-carboxyl proteinase. *Biochemistry* 40, 15602-15611.

Wlodawer A, Li M, Gustchina A, Oyama H, Dunn BM, Oda K .2003. Structural and enzymatic properties of the sedolisin family of serine-carboxyl peptidases. *Acta Biochimica Polonica* 50, 81-102.

Yuasa K and Maeshima M. 2001. Organ specificity of a vacuolar Ca^{+2}-binding protein RVCaB in radish and its expression under Ca^{+2}-deficient conditions. *Plant Molecular Biology*. 47, 633-640.

Zerner B. 1991. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, Urease. *Bioorganic Chemistry* 19, 116-131.

Zhang NY & Jones BL. 1996. Purification and partial characterization of a 31-kDa cysteine endopeptidase from germinated barley. *Planta* 199, 565-572.

Zhang XC, Shao HL, Wang JX, Zhao XF. 2006. Purification and characterisation of an inhibitor of a cathepsin B-like proteinase from sunflower seed. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 21, 433-439.

Anexo 1 – CURRICULUM VITAE

(DEMARTINI, D.R.)

1- DADOS PESSOAIS

Nome: Diogo Ribeiro Demartini
Nascimento: 04/11/1976 - Porto Alegre/RS – Brasil
Endereço profissional: Laboratório de Proteína Tóxicas. Av. Bento Gonçalves 9500. Prédio 43422. Sala 204. CEP: 9150-970. Porto Alegre, RS.

2- FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2004 – em andamento: Doutorado em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
1996 - 2002 : Graduação em Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

3- FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2000 – 2000: Extensão Universitária em Métodos Experimentais Em Bioquímica. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
2001 – 2001: Extensão Universitária em Tópicos em Imununologia e Manipulação de Animais de Laboratório

4- ESTÁGIOS

4.1- Laboratório de Proteínas Tóxicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1999-2000: PIBIC-CNPq – Purificação e caracterização de proteases envolvidas no processamento da canatoxina;
2000-2001: PIBIC-CNPq – Purificação e caracterização de proteases envolvidas no processamento da canatoxina ao longo da germinação;
2001-2002: FAPERGS - Purificação e caracterização de proteases envolvidas no processamento da canatoxina ao longo da germinação;

4.2 Estágio Curricular Faculdade de Farmácia, Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS. 2002.

4.3 Macromolecular Crystallography Laboratory

Agosto 2004- Agosto 2005: – National Cancer Institute at Frederick - NCI-FREDERICK. Estágio de doutorado Sanduiche PDEE-CAPES, sob orientação do Dr. Alexander Wlodawer. Purificação e caracterização de proteases presentes na *Canavalia ensiformis.*

5- PRÊMIOS E TÍTULOS

2001: Destaque-XIII Salão de Iniciação Científica, Propesq- Universidade Federal do Rio Grande do Sul

6- Artigos completos publicados em periódicos

DEMARTINI, D. R., WLODAWER, A., CARLINI, Célia R. A comparative study of the expression of serine proteinases in quiescent seeds and in developing *Canavalia ensiformis* plants. Journal of Experimental Botany (Online). , v.Dec, p.1 - 12, 2006.

7- COMUNICAÇÕES E RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS OU PERIÓDICOS (RESUMO)

1. DEMARTINI, D. R., OLIVEIRA, T. F., JULIANO NETO, L., JULIANO, M. A., WLODAWER, A., CARLINI, Célia R. Proteinases and mobilization of the entomotoxic protein Canatoxin, during germination of *Canavalia ensiformis* seeds. In: The Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists, 2005, Seattle, WA. Final Program - The Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists. , 2005. p.197 -

2. DEMARTINI, D. R., OLIVEIRA, T. F., CARLINI, Célia R
Mobilização da Canatoxina por Proteases Endógenas e Formação de Peptídeos Entomotóxicos Durante a Germinação da *Canavalia ensiformis*(feijão-de-porco). In: 8 Simpósio de Controle Biológico, 2003, São Pedro. 8 Simpósio de Controle Biológico - Livro de Resumos - Programa Oficial. , 2003. p.163 - 163

3. DEMARTINI, D. R., OLIVEIRA, T. F., CARLINI, Célia R
Mobilizaton of Canatoxin by Endogenous Proteinases and Formation of Insecticidal Peptides during Gemination of Jack Bean(Canavalia ensifomis) Seeds. In: XXXII Reunião Anual da SBBq, 2003, Caxambu, MG. XXXII Reunião Anual Programa e Resumos. , 2003. p.50 - 50

4. DEMARTINI, D. R., CARLINI, Célia R
Proteases Ácidas em Sementes de *Canavalia ensiformis*. Mobilização da Canatoxina e Outras Pproteínas Durante a Germinação. In: 54 REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 2002, GOIÂNIA.
54 REUNIÃO ANUAL DA SBPC-PROGRAMAS E RESUMOS. , 2002. p.31 - 31

5. DEMARTINI, D. R., PIAS, L., CARLINI, Célia R
Acidic Porteinases in Jack Bean(*Canavalia ensiformis*) seeds. Mobilization of Canatoxin and other proteins during germination In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2001, Caxambu, MG. XXX Reunião Anual-Programa e Resumos. , 2001. v.U. p.43 -

6. DEMARTINI, D. R.Proteases Ácidas em Sementes de *Canavalia ensiformis*. Mobilização da Canatoxina e Outras Pproteínas Durante a Germinação. In: XIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2001, PORTO ALEGRE. CD-ROM XIII SIC X FIC. , 2001.

7. DEMARTINI, D. R., CARLINI, Célia R Acidic Proteinases in(*Canavalia ensiformis*) Seeds. In: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2000, Caxambu. Livro de Resumos da XXIX SBBQ. , 2000. v.29. p.134

8. DEMARTINI, D. R., CARLINI, Célia R. Proteinases Ácidas em Sementes de *Canavalia ensiformis* In: XII Salão de Iniciação Científica, 2000, Porto Alegre., 2000.

9. DEMARTINI, D. R., CARLINI, Célia R. Presença de Enzimas Sensíveis à Pepstatina-A e E-64 em Sementes de *Canavalia ensiformis*. In: XI Salão de Iniciação Cinetífica, 1999, Porto Alegre. XI Salão de Iniciação Científica - CD Rom. , 1999.

10. DEMARTINI, D. R., FERREIRA-SILVA, C. T., CARLINI, Célia R. Presence of E-64 and Pepstatin-A Sensitive-enzymes in Jackbean(*Canavalia ensiformis*) Seeds. In: XXVIII Reunião Anula da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Bilogia molecular, 1999, Caxambu. Livro de Resumos da XXVIII SBBQ. , 1999. v.28. p.32.

8- PRODUÇÃO TÉCNICA- TRABALHOS TÉCNICOS

DEMARTINI, D. R., SEIXAS, L. M. J. Home-Page da Faculdade de Farmácia: Manutenção e Ampliação, 1997

9- ORIENTAÇÕES E SUPERVISÕES CONCLUÍDAS- INICIAÇÃO CIENTÍFICA

1. Ticiana Fettermann Oliveira. Sedolisina de *Canavalia ensiformis*:caracterização estrutural, bioquímica e fisiológica. 2002. Iniciação científica (Ciencias Biológicas) - Pontificia Univercidade Catolica do Rio Grande do Sul