

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUIMICA**

Valquiria Broll

Estudos proteômicos da semente de *Canavalia ensiformis*

Porto Alegre, 2011.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUIMICA**

Valquiria Broll

**Estudos proteômicos da semente de
*Canavalia ensiformis***

Trabalho de conclusão apresentado
junto à atividade de ensino “Trabalho de
Conclusão de Curso – QUI” do Curso de
Química, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em Química

Orientadora:

Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato – IQ

Co-orientador(es):

**Profa. Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini
– Depto Biofísica/IB e CBIOT**

Dr. Diogo Ribeiro Demartini – CBIOT

Porto Alegre, 2011

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biofísica/IB e no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), no período de janeiro de 2011 a 25 de junho de 2011.

Agradecimentos

Agradeço às minhas orientadoras, Dra. Tânia Mara Pizzolatto e Dra. Célia R. Carlini por todas oportunidades, pelo aprendizado, ensinamentos que nunca faltaram, e confiança em meu trabalho, e por todo incentivo a meu crescimento profissional.

A meu co-orientador, Dr. Diogo Ribeiro Demartini, que sempre esteve presente, acompanhando e me ensinando dia-a-dia. Sempre acreditando no meu trabalho. Agradeço pelos ensinamentos, paciência, companheirismo e amizade que nunca faltaram.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, bolsa de pesquisa de iniciação tecnológica.

Aos professores Dra. Marilene Vainstein, Dr. Arthur Fett Neto e Dr. Carlos Termignoni por disponibilizarem seus laboratórios e equipamentos, para que este trabalho fosse realizado.

Aos colegas do Laboratório de Proteínas Tóxicas (LAPROTOX), pela amizade e por estarem sempre dispostos a discutir e ensinar, e ao Doutorando Rodrigo Braun.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas, UNIPROTE, e à técnica Jozi Estanislau, pelo auxílio e companheirismo.

Ao Professor Dennis Russowsky, por ter me orientado como iniciação científica ao longo de dois anos, sempre me apoiando, e me dando liberdade de pensamento e execução dos trabalhos em laboratório, aguçando meu senso crítico e desenvoltura.

Aos Drs. Antônio Pinto e Deiber Severo, que sempre estiveram disponíveis para discutir, e esclarecer dúvidas.

A meus amigos, Fran, Alinne, Harry, Felipe, Diego, Dessa, Gui, Vêro, pela amizade incondicional, ao Giuseppe por me aturar mesmo nos piores dias. Agradeço a todos meus amigos por me darem suporte quando eu mais precisei.

Obrigada.

Índice

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades.....	X
Resumo	XII
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVO GERAL.....	14
2.1 Objetivos específicos	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Canavalia ensiformis.....	15
3.1.1 Toxicidade.....	16
3.1.2 Papel fisiológico da Urease/Canatoxina na Canavalia ensiformis.....	16
3.1.3 Efeito entomotóxico e mecanismos de ação da urease/canatoxina.....	17
3.2 Germinação.....	18
3.3 Imunoglobulina G (IgG).....	20
3.4 Proteômica.....	21
3.4.1 Ionização por <i>electrospray</i>	24
3.4.2 Analisadores de massas.....	25
3.4.3 Descrição do equipamento utilizado para proteômica	28
3.5 Pré-fracionamento de amostras.....	28
4 METODOLOGIA.....	29
4.1 Plantas e germinação.....	29
4.2 Extração.....	30
4.2.1 Extração com Tris-Fenol.....	30
4.2.2 Extração com Tris-HCl	31
4.3 Ensaio enzimáticos para endopeptidases acídicas tipo catepsina-D.....	31
4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	32
4.5 Ensaio imunoquímico	33
4.5.1 Dot Blot.....	33
4.5.2 Western Blot.....	34

4.5.3 ELISA- ensaio imunoenzimático	34
4.6 Produção do anticorpo anticanavalina	35
4.7 Cromatografia líquida de afinidade para purificação da IgG	37
4.8 Separação de proteínas abundantes	38
4.8.1 Cromatografia de afinidade por Sephadex G-100®	38
4.8.2 Imunoprecipitação.....	39
4.8.3 Cromatografia de imunoafinidade.....	40
4.9 Hidrólise trípica.....	40
4.10 Pre-fracionamento dos extratos digeridos.....	43
4.10.1 Cromatografia de troca catiônica.....	43
4.10.2 Cromatografia de fase reversa	44
4.11 Análises por espectrometria de massas	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Extração com e sem Fenol	45
5.1.1 Rendimento da extração e malha do gel de poliacrilamida.....	45
5.1.2 Remoção de proteínas abundantes - cromatografia de afinidade por Sephadex G100®	
46	
5.1.3 Extrato de sementes quiescentes e germinadas.....	47
5.1.4 Extratos a serem analisados	49
5.2 Retirada de proteínas abundantes.....	50
5.2.1 Remoção da Concanavalina-A (Con-A)	50
5.2.2 Remoção da Canavalina.....	52
5.3 Hidrólise trípica.....	59
5.4 Pré-fracionamento dos extratos digeridos.....	60
5.5 Considerações gerais.....	62
6 CONCLUSÕES	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

Índice de figuras

Figura 1: Representação da molécula de uma imunoglobulina (anticorpo).....	20
Figura 2: Esquema geral de um espectrômetro de massas e seus principais componentes.	23
Figura 3: Ionização por electrospray.....	24
Figura 4: Representação esquemática da fonte de <i>electrospray</i>	25
Figura 5: Desenho esquemático de um detector quadrupolo (Q).....	26
Figura 6: Desenho esquemático de um analisador por tempo de vôle (TOF).....	27
Figura 7: Desenho esquemático de um reflectron.	28
Figura 8: Esquema da polimerização da acrilamida e da N,N'-metilenobisacrilamida para formar o gel de acrilamida.....	33
Figura 9: Fluxograma de amostras submetidas a tripsinização e posteriormente pré-fracionadas.....	42
Figura 10: SDS-PAGE para comparação dos extratos obtidos com Tris 20 mM pH 7,5 (Ext 1) e com Tris/Fenol (Ext 2) onde diferentes concentrações de poliacrilamida foram avaliadas. PM: padrão de massa.	46
Figura 11: SDS-PAGE 12,5 % para comparação da remoção da con-A nas extrações com e sem fenol do extrato EBQ.	47
Figura 12: Sementes e plântulas de <i>C. ensiformis</i> nos diferentes estágios de desenvolvimento estudados (lado esquerdo) e a concentração de proteínas nos extratos correspondentes (lado direito).	48
Figura 13: A) SDS-PAGE dos extratos brutos, EBQ (Extrato bruto quiescente), EB3 (Extrato bruto em 3 dias de desenvolvimento), EB4 (Extrato bruto em 4 dias de desenvolvimento) e EB5 (Extrato bruto em 5 dias de desenvolvimento). B) Western Blot as mesmas frações analisadas em A.	49
Figura 14: SDS-PAGE das frações analisadas por cromatografia de afinidade em Sephadex G100.	51
Figura 15: Titulação do antígeno (canavalina) com diferentes diluições do anticorpo.	53
Figura 16: Dot Blot para a determinação do título do soro obtido, o qual contém o anticorpo anticanavalina a ser utilizado em análises posteriores.	54
Figura 17: Cromatografia de afinidade em HiTrap G-protein - sepharose..	55
Figura 18: <i>Dot blot</i> para determinação do título da IgG purificada a ser utilizado.....	56

Figura 19: <i>Western Blot</i> para comparação entre os extratos, e avaliação da eficiência na retirada da proteína de reserva.....	56
Figura 20: SDS-PAGE e Western blot para analisar a retirada a canavalina dos extratos..	57
Figura 21: Cromatograma obtido para a purificação da canavalina.....	59
Figura 22: Fluxograma dos extratos obtidos a partir de sementes quiescentes e sementes em 5 dias de desenvolvimento.....	60
Figura 23: Cromatografia líquida de troca catiônica forte..	61
Figura 24: Cromatograma da amostra NRG (Extrato de semente quiescente, não retido na cromatografia de imunoafinidade).....	62

Índice de tabelas

Tabela 1: Parâmetros de escolha do animal para a produção do anticorpo anticanavalina.	35
Tabela 2: Comparação entre os métodos de extração utilizados, com relação ao rendimento de proteína extraída utilizando dois processos de extração.....	45
Tabela 3: Tabela de dados da cromatografia de afinidade com a resina Sephadex G100...	51
Tabela 4: Tabela de acompanhamento de resposta do anticorpo.	52
Tabela 5: Proteínas identificadas por MS/MS, a partir das análises das bandas 1 e 2 excisadas do gel da figura 20.....	58

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades

° C	Graus Celsius
g	Gramma
h	Hora
Hz	Hertz
kDa	Kilodalton
Kg	Quilograma
L	Litro
M	Molar (mol/L)
mg	Miligrama
min	Minuto
s	Segundo
mL	Mililitro
mL	Microlitro
mM	Milimolar
mM	micromolL ⁻¹
MW	Peso molecular
DL	Dose letal
HPLC-2D	Cromatografia bi-dimensional (2D) , sistema HPLC Bioalliance TM
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
IgG	Imunoglobulina G
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas em tandem
MS	Espectrometria de massas
NBT	Cloreto de p-nitro azul de tetrazólio
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pH	Potencial iônico de hidrogênio
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TFA	Ácido trifluoracético
FA	Ácido fosfórico
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano HCl salina

Tween 20	Polioxietilenosorbitano
TTBS	Tris(hidroximetil)aminometano HCl salina 20mM pH 7,5 com Cloreto de sódio 150mM e Tween 20
Abz	Ácido ortoaminobenzóico
EDDnp	Etilenodinitrodiamino
Con-A	Concanavalina A
CNTX	Canatoxina
Pepcanatox	Peptídeo tóxico derivado da Canatoxina
JBU	Jack Bean Urease – Urease de <i>Canavalia ensiformis</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotrietol
EBQ	Extrato bruto quiescente
EB1	Extrato Bruto de sementes com 1 dia de germinação
EB2	Extrato Bruto de sementes com 2 dia de germinação
EB3	Extrato Bruto de sementes com 3 dia de germinação
EB4	Extrato Bruto de sementes com 4 dia de germinação
EB5	Extrato Bruto de sementes com 5 dia de germinação

Resumo

As sementes da leguminosa *Canavalia ensiformis* contém isoformas da enzima urease. Estas isoformas possuem atividade independente da atividade ureolítica, como a toxicidade para insetos de diferentes ordens. Esta toxicidade está relacionada à hidrólise das isoformas de urease por peptidases acídicas, tipo aspártico e cisteíno peptidases, com consequente liberação de um peptídeo entomotóxico.

As sementes foram extraídas em tampão Tris(hidroximetil)aminometano - HCl (Tris-HCl) 20 mM pH 7,5. Em seguida foi feita a retirada da proteína concanavalina-A (Con-A), uma lectina abundante nas sementes e presente nos extratos, através de cromatografia de afinidade por Sephadex G-100[®]. A remoção da principal proteína de reserva, a canavalina, foi avaliada com diferentes abordagens de imunoprecipitação.

Na espectrometria de massas, os peptídeos são separados em um sistema nanoACQUITY UltraPerformance LCT^M. Após a ionização (modo positivo), os íons gerados são analisados em um espectrômetro Q-TOF MicroTM, e a identificação das proteínas, a partir dos espectros coletados no MS² para cada ponto são posteriormente analisados.

1 INTRODUÇÃO

As sementes da leguminosa *Canavalia ensiformis*, popularmente conhecida por “feijão de porco”, apresentam excelentes características agronômicas, chegando a ser produzidos até 5,4 toneladas de sementes por hectare. Em cada quilo de semente são encontrados 300 g de proteínas e 600 g de carboidratos. Esta semente é fonte de várias proteínas de interesse, entre elas estão as isoformas da enzima urease (CARLINI & POLACCO, 2008). Estas isoformas possuem atividade tóxica para insetos de diferentes ordens. Devido a isso, estas isoformas apresentam a potencialidade de serem utilizadas como bioinseticidas, e para fins diagnósticos (KROEGFELT.A.P. et al., 2005).

A toxicidade a insetos da *jack bean urease* (JBU), e das outras isoformas menos abundantes, está relacionada à presença de um peptídeo entomotóxico contido na sequência de aminoácidos. A hidrólise da JBU é feita no intestino dos insetos vulneráveis, através da ação de enzimas proteolíticas tipo aspártico e cisteíno peptidases (CARLINI & GROSSI-DE-SA, 2002; FERREIRA-DASILVA et al., 2000; FOLLMER et al., 2004b; PIOVESAN et al., 2008). As enzimas destas classes estão presentes no sistema digestivo de alguns insetos vulneráveis aos efeitos da proteína. Em paralelo ao estudo das enzimas digestivas nos intestinos de insetos que clivam a canatoxina e liberam o peptídeo tóxico, ainda se investiga a presença destas classes de enzimas nas sementes e plântulas de *C. ensiformis*.

A espectrometria de massas é uma das metodologias mais utilizadas na identificação de proteínas de organismos inteiros, organelas, tecidos, etc. Uma das abordagens que utiliza a espectrometria de massas como uma ferramenta fundamental são os estudos proteômicos. A partir de amostras complexas, pode-se obter grande entendimento de funções celulares (AEBERSOLD & MANN, 2003).

2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo a caracterização proteômica da *Canavalia ensiformis*, em dois momentos de desenvolvimento da planta.

2.1 Objetivos específicos

- Produzir extratos a partir de sementes quiescentes e em diferentes estágios de desenvolvimento.
- Separar dos extratos, proteínas abundantes – Concanavalina A e Canavalina.
- Pré-fracionar todas amostras obtidas, após digestão com enzimas proteolíticas, por cromatografia líquida em HPLC.
- Analisar as amostras por espectrometria de massas e compilar os dados obtidos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Canavalia ensiformis*

A *Canavalia ensiformis* (popularmente conhecida por “feijão de porco”, ou jack bean) possui aproximadamente 300 g de proteínas e 600 g de carboidratos por quilo de semente, chegando a produzir até 5,4 toneladas de sementes por hectare (UDEDIBIE & CARLINI, 1998), demonstrando excelentes características agronômicas. A *C. ensiformis* é fonte de várias proteínas de interesse como a urease (SUMNER, 1926), a canatoxina (CARLINI & GUIMARAES, 1981), a lectina concanavalina A (SUMNER & HOWELL, 1936), e inibidores de tripsina (CARLINI & GROSSI-DE-SA, 2002). A planta apresenta também uma grande resistência a ataque de insetos.

A urease majoritária de *Canavalia ensiformis* (JBU) foi a primeira enzima a ser cristalizada por Sumner em 1926, e este trabalho lhe rendeu o prêmio Nobel de química em 1946. As ureases são conhecidas por catalisarem a reação de hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono (FOLLMER et al., 2004a). A JBU tem sua cadeia polipeptídica constituída por 840 aminoácidos (Aa) e tem massa molecular de 90 kDa. A forma mínima enzimaticamente ativa da JBU em solução é a de um trímero com 270 kDa, e sua conformação nativa mais provável é de um hexâmero, de 540 kDa (ZERNER, 1991).

A JBU possui dois átomos de níquel no seu sitio ativo, cada qual coordenado por dois resíduos de histidina (FOLLMER & CARLINI, 2005).

As ureases são amplamente distribuídas em bactérias, fungos e plantas (BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010; SIRKO & BRODZIK, 2000), sendo que as diferenças mais evidentes entre elas ocorrem em suas estruturas quaternárias. Enquanto que ureases vegetais e fúngicas são trímeros ou hexâmeros de apenas um tipo de subunidade (MOBLEY et al., 1995), as ureases bacterianas são multímeros complexos, formados por dois ou três tipos de subunidades (MOBLEY et al., 1995; BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010; HA et al., 2001).

Apesar da abundância das ureases em plantas, ainda não há muitas informações sobre sua função no vegetal. Sua principal função pode estar relacionada à reciclagem de nitrogênio (SIRKO & BRODZIK, 2000; SIRKO & BRODZIK, 2000), mesmo que a uréia, seu principal metabólito, não seja abundante em plantas (POLACCO & HOLLAND, 1993).

3.1.1 Toxicidade

Em 1981, Carlini & Guimarães isolaram uma proteína tóxica, que quando aplicada intraperitonealmente ($DL_{50} = 0,5 - 2,0$ mg/kg) em camundongos e ratos, provoca convulsão e morte. Essa proteína foi chamada de canatoxina (CNTX) (CARLINI et al., 1984). Mais tarde foi demonstrado que a CNTX é uma isoforma da urease JBU, e que possui cerca de 30-40 % da atividade ureásica, quando comparada com a JBU (CARLINI & GROSSI-DE-SA, 2002; FOLLMER et al., 2001).

A CNTX também é uma metaloenzima, com um íon de Zn^{2+} e um de Ni^{2+} em cada subunidade e sua conformação protéica apresenta-se na forma de dímero, com 95 kDa (FOLLMER et al., 2001).

3.1.2 Papel fisiológico da Urease/Canatoxina na *Canavalia ensiformis*

A partir dos baixos índices de atividade ureolítica da CNTX, postulou-se que esta proteína teria uma participação nos processos de defesa da planta (POLACCO & HOLLAND, 1993). O processo de maturação das sementes é um momento bastante crítico no desenvolvimento da planta, devido à vulnerabilidade frente aos predadores. Com o intuito de determinar o papel fisiológico das ureases de algumas plantas, foram realizados ensaios de imunoreatividade, utilizando anticorpos policlonais anticinatoxina. Em diversas leguminosas, a presença de proteínas imunorreativas contra o anticorpo foi observada, sugerindo que estas proteínas estão amplamente distribuídas nas leguminosas e podem apresentar um importante papel fisiológico na planta (CARLINI et al., 1988).

Com os dados obtidos por Barcellos e colaboradores, em que os níveis de canatoxina aumentam progressivamente durante a maturação da *Canavalia brasiliensis* (BARCELLOS et al., 1993), foi investigado o efeito tóxico em alguns insetos de interesse econômico (pragas) e sanitário (vetores) (OLIVEIRA et al., 1999). Quando testada em fungos selecionados, tanto a CNTX como a JBU inibiram o crescimento de hifas de vários fungos filamentosos, sendo alguns deles fitopatogênicos (BECKER-RITT et al., 2007). Quando administrada via oral em insetos como o percevejo verde da soja (*Nezara viridula*), o caruncho do feijão de corda (*Callosobruchus maculatus*), o percevejo manchador do algodão (*Dysdercus peruvianus*) e o barbeiro (*Rhodnius prolixus*) (STANISCUASKI et al., 2005), o efeito tóxico da CNTX foi observado. Entretanto, ao ser ingerida por outro grupo

de insetos, como as lagartas Mandaruvá-do-fumo (*Manduca sexta*) e a Lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*), o gafanhoto *Schistocerca americana*, moscas (*Drosophila melanogaster*) e mosquitos (*Aedes aegypti*), não foi possível verificar atividade tóxica (CARLINI et al., 1997).

3.1.3 Efeito entomotóxico e mecanismos de ação da urease/canatoxina

A CNTX apresenta efeito secretagogo, induzindo exocitose em vários tipos de células de mamíferos como plaquetas, macrófagos, neutrófilos e mastócitos (CARLINI et al., 1985; BARJAFIDALGO et al., 1991a; BARJAFIDALGO et al., 1991b; GRASSIKASSISSE & RIBEIRODASILVA, 1992), sendo também capaz de alterar os fluxos e os níveis intracelulares de Ca^{2+} (ALVES et al., 1992; GHAZALEH et al., 1997). Estudos *in vivo*, realizados em ratos e camundongos, demonstraram que a canatoxina induziu bradicardia, hipertensão e hipotermia, que ocorrem antes do fenômeno de convulsão, que é característico da sua ação tóxica. A CNTX também é ativa se administrada por via intravenosa, intramuscular e subcutânea. Entretanto, quando administrada oralmente, não apresenta letalidade, provavelmente devido à instabilidade em meio ácido (BARJAFIDALGO et al., 1991b; FERREIRA-DASILVA et al., 2000; FERREIRA-DASILVA et al., 2000; FERREIRA-DASILVA et al., 2000).

Assim como os testes em ratos e camundongos, diferentes insetos foram alimentados com CNTX. Em alguns deles foi possível detectar o efeito entomotóxico, o que indica uma relação entre as enzimas digestivas dos insetos e a atividade entomotóxica da CNTX, corroborando a hipótese de que esta proteína possa desempenhar um papel defensivo na planta (CARLINI et al., 1997; FERREIRA-DASILVA et al., 2000). Nos insetos que apresentaram suscetibilidade à CNTX, o trato digestório é ácido e as enzimas proteolíticas presentes são do tipo catepsinas B e D (subclasses das enzimas proteolíticas, que são hidrolases). Estas enzimas hidrolizam a CNTX e liberam uma série de peptídeos. Entre eles há um que é o responsável pela atividade tóxica (FERREIRA-DASILVA et al., 2000). Os insetos que apresentaram resistência à enzima possuem seu trato digestório básico, com enzimas proteolíticas do tipo tripsina. Estas enzimas são capazes de hidrolisar a CNTX ou JBU, mas não ocorre a formação do peptídeo tóxico (CARLINI & GROSSI-DE-SA, 2002; TERRA & FERREIRA, 1994).

3.2 Germinação

Como regra geral, o processo de germinação é iniciado pela absorção de água pelas sementes (BEWLY J.D. & BLACK M., 1986). Já o término do processo é determinado por muitos critérios, podendo ser morfológicos ou até mesmo moleculares (HIRAIWA et al., 1997; SCHERNTHANER et al., 2003). Se determinado como padrão os critérios morfológicos, a germinação termina quando há o rompimento da testa da semente pela radícula (MUNTZ et al., 2001; TIEDEMANN et al., 2001).

As sementes, durante o período de germinação, utilizam fontes endógenas para obter energia para seu desenvolvimento, tais como: lipídeos, carboidratos e proteínas. De acordo com Gruis e colaboradores, o nitrogênio extraído de proteínas de reserva é essencial para o desenvolvimento da planta neste e em demais estágios (GRUIS et al., 2002). Grande parte das sementes tem seu corpo protéico dividido em três regiões: matriz, cristalóide (proteínas insolúveis em água e tampões, onde se encontram as proteínas de reserva da planta) e globulóide (estruturas monocristalinas e globulares, onde encontram-se os cristais de ácido fítico) (JIANG et al., 2001).

Os processos de germinação e maturação das sementes envolvem diversas famílias de enzimas, que se encontram subcelularmente compartimentalizadas. Entre estas enzimas, as peptidases acídicas (classe das aspártico e cisteíno peptidases), são extremamente importantes durante este processo (HIRAIWA et al., 1997; SUTOH et al., 1999; TIEDEMANN et al., 2001). De acordo com Muntz e colaboradores, cisteíno peptidases parecem ser as responsáveis pela mobilização de proteínas endógenas nas sementes de dicotiledôneas e o acúmulo de proteínas de reserva se daria durante a fase intermediária e final do processo de maturação. Ainda ocorre um depósito de proteínas de reserva nos corpos protéicos, que são oriundos do retículo endoplasmático. Durante este período, essas proteínas estão protegidas de ataques de peptidases endógenas (MUNTZ et al., 2001).

Substâncias de reserva se mobilizam em tempos e locais diferenciados da planta, não ocorrendo simultaneamente em todas as células, pois nesta etapa há uma variada população enzimática atuando em diferentes partes da planta nascente (TIEDEMANN et al., 2001). Os precursores enzimáticos têm sua síntese no retículo endoplasmático, sendo

transportados para o interior dos corpos protéicos, e só após a ativação destas enzimas é que ocorre a hidrólise de proteínas endógenas.

As peptidases têm uma especificidade bastante acentuada quanto ao substrato a ser hidrolisado, bem como em relação aos tecidos, órgãos e até mesmo com relação ao estágio de desenvolvimento em que deve ocorrer sua expressão. De acordo com Sutoh, três situações devem ser consideradas para que uma endopeptidase esteja envolvida no processo de degradação de proteínas de reserva de uma semente (SUTOH et al., 1999):

1- Enzima e substrato, ambos devem ser encontrados no interior de corpos protéicos;

2- Em ensaios *in vitro*, a enzima deve agir sobre o substrato, degradado ou não;

3- Os tempos de ensaios *in vitro* e *in vivo* devem corresponder;

Em sementes quiescentes ou germinadas, diversas atividades proteolíticas podem ser detectadas. Durante a germinação, é possível verificar variação da atividade peptidásica associada à degradação de substratos protéicos. Tem-se como exemplo, a *Vicia sativa L.*, que em 7 dias de germinação é possível detectar o aumento de três tipos diferentes de atividades peptidásicas atuando em diferentes substratos no interior dos corpos protéicos (MUNTZ et al., 2001; TIEDEMANN et al., 2001) com um posterior decréscimo desta atividade (SUTOH et al., 1999). Esse decréscimo da atividade se dá por mudanças que ocorrem nas enzimas presentes na semente germinante e/ou na plântula. As enzimas seriam das mesmas famílias das anteriores, apenas com afinidade por substratos diferentes, podendo também, estar localizadas em diferentes tecidos ou em locais subcelulares distintos, se comparados os períodos pré e pós germinação (TIEDEMANN et al., 2001).

Os mecanismos que controlam a expressão das peptidases envolvidas no processo de degradação de proteínas endógenas em sementes são:

- aparecimento de peptidases novas, sintetizadas de novo, ou ativadas a partir de zimogênios inativos;

- inibidores de peptidases presentes, ou a síntese destes, durante a germinação (KUMAR et al., 2002; DEMARTINI et al., 2007);

- inibidores de cisteíno e aspártico peptidases foram já descritos em plantas, e estes podem atuar nos mecanismos de defesa das sementes contra insetos predadores, que em seu trato digestório possuam enzimas proteolíticas do tipo cisteíno peptidases.

distintas, caracterizando as imunoglobulinas como do tipo IgM, IgD, IgG, IgE, e IgA, respectivamente. Cada classe de imunoglobulinas apresenta propriedades biológicas distintas, complementares a suas habilidades de interação com antígenos.

A IgG tem massa molecular em torno de 150 kDa, e proporciona a principal imunidade baseada em anticorpos contra os patógenos que invadem o corpo.

Anticorpos são a base das técnicas de imunquímica, sendo bastante utilizados em ensaios de imunoprecipitação, ou para detecção de proteínas por *Western blotting* ([ANON], 2005) (esta metodologia está descrita no item 4.6). Desta forma, estratégias de imunoprecipitação podem ser usada para purificar proteínas, remover contaminantes, analisar interação entre proteínas, ou até mesmo para uma simples extração de proteínas abundantes com fins proteômicos (FALSONE et al., 2008).

Anticorpos constituem uma ferramenta essencial em pesquisa e diagnóstico. No caso de uso em pesquisa, os anticorpos são utilizados para fins de rastreamento de purificação, remoção de proteínas imunorreativas, sendo estas contaminantes ou não, etc., e para cada objetivo, se faz uso de um anticorpo, podendo ser monoclonal, policlonal, produzido de forma recombinante ou não. Geralmente os anticorpos monoclonais são mais úteis para a purificação e análise de epítomos na superfície de proteínas nativas e de outras formas ocultas de epítomos em proteínas desnaturadas. Os anticorpos policlonais são extremamente usados em *Western blotting* e purificação de proteínas, enquanto que os anticorpos recombinantes são mais largamente utilizados para estudo de células xenogênicas (células para transplantes terapêuticos) em um modelo experimental do mesmo idiótipo (região determinante de complementaridade (CDR) entre o antígeno e as imunoglobulinas), como parte de um anticorpo monoclonal quimérico (anticorpo com regiões de origem animal distintas) .

3.4 Proteômica

Em 1993, foi proposto por Mark Wilkins e Keith Williams o termo “proteoma”, que se refere à identificação sistemática do complexo de proteínas total do genoma (BLACKSTOCK & WEIR, 1999; LOPEZ, 1999); este termo também faz referência a um conjunto de proteínas que está sendo expresso num dado momento da vida celular de um

organismo (ABBOTT, 1999). Por “expressão” de proteína entende-se que a proteína foi codificada a partir de uma sequência de nucleotídeos do DNA.

O objetivo da proteômica é estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína e mecanismos regulatórios (BLACKSTOCK & WEIR, 1999), utilizando as ferramentas de espectrometria de massas que evoluíram a tal ponto que possibilitaram estas análises.

Anteriormente, para se obter informações sobre uma proteína, era necessário isolá-la de todas as outras presentes na mesma amostra, a ponto de ser analisada individualmente. Em alguns estudos, contaminantes são aceitáveis, desde que não interfiram na análise a ser feita. Com as análises por abordagens proteômicas, diversas respostas podem ser obtidas sem que uma purificação total seja necessária, inclusive o estado fisiológico de uma proteína pode ser obtido de forma independente da atividade biológica da proteína individual, pois um conjunto de proteínas é identificado e pode ser correlacionado com vias metabólicas (LOTTSPREICH, 1999).

A análise de proteoma é realizada a partir de dois princípios básicos:

- A) separação de proteínas (gel 2D) e/ou peptídeos (cromatografia uni e bidimensional);
- B) identificação dos peptídeos ionizados.

A partir das técnicas disponíveis atualmente, as mais utilizadas são a eletroforese bidimensional (JOUBERT et al., 2000) e a cromatografia líquida uni e bidimensional (DELAHUNTY & YATES, 2005; MAYNARD et al., 2004; RAO et al., 2009; ZHANG et al., 2010).

A eletroforese bidimensional separa as proteínas inicialmente por focalização isoeletrica e posteriormente por massa molecular (OFARRELL, 1982), já a cromatografia multidimensional, consiste na separação de peptídeos, pela utilização de cromatografia em várias colunas, são geralmente utilizados uma troca iônica como primeira dimensão e uma fase reversa posteriormente, como meios de separação (MAYNARD et al., 2004). Pode-se constatar que a capacidade de processamento de grandes volumes de informações e as técnicas analíticas de alta resolução disponíveis, permitem um estudo extremamente amplo de um organismo.

Em 2002, John B. Fenn e Koichi Tanaka foram contemplados com o Nobel de Química pelo desenvolvimento dos métodos brandos de ionização, o *Electrospray*

ionization (ESI) e por *Soft Laser Desorption* (SLD). A partir destes métodos mais brandos de ionização, foi possível a análise de macromoléculas (neste caso, proteínas e peptídeos), pois os modos de ionização mantinham os fragmentos principais intactos. (MANN et al., 1989; FENN et al., 1989; TANAKA et al., 1988).

A ionização por *electrospray* é branda e facilmente acoplável a técnicas de cromatografia líquida como HPLC, μ HPLC, UPLC e eletroforese capilar; tornando este sistema útil para a maioria das classes de compostos.

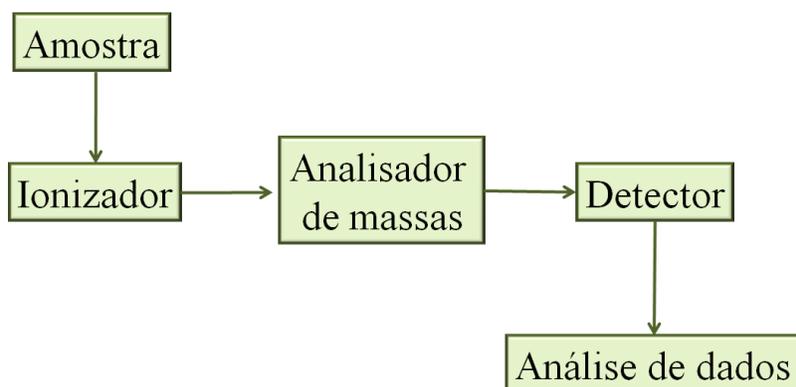


Figura 2: Esquema geral de um espectrômetro de massas e seus principais componentes.

Os espectrômetros de massas são compostos por três unidades básicas: o sistema de ionização, analisador de massas e detector (Figura 2). O sistema de ionização mais utilizada para fins proteômicos é o *Electrospray* (ESI). A combinação dos sistemas de ionização com os diferentes tipos de analisadores de massas disponíveis tem possibilitado o avanço significativo na área de proteômica. Por exemplo, a *Dessorção Neutra por Ionização Electrospray Extrativa* (ND-EESI) acoplada a analisadores quadrupolo e de tempo de voo (TOF), permite análise de tecidos vivos (CHEN et al., 2007); a ionização por *electrospray* acoplada a um espectrômetro de massas com analisador de mobilidade iônica permite avaliar mudanças metabólicas (HENDERSON et al., 1999; JAFARI et al., 2011; KAPLAN et al., 2009).

3.4.1 Ionização por *electrospray*

O princípio do sistema de ionização por *electrospray* é a nebulização de gotículas de uma solução. Ao evaporar o solvente formam-se os íons moleculares de simples ou múltiplas cargas. A ionização pode ser feita no modo positivo, formando adutos protonados e no modo negativo, formando adutos desprotonados, conforme mostrado na figura 3.

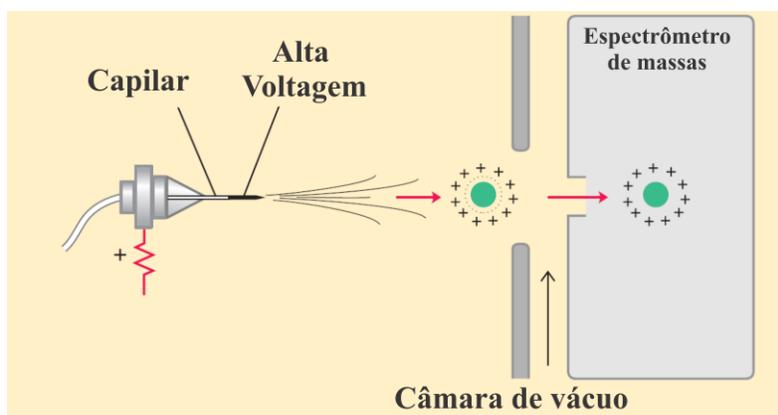


Figura 3: Ionização por *electrospray*. Figura adaptada de (LEHNINGHER A.L. et al., 2006).

No modo positivo, aplica-se um potencial positivo à solução, fazendo com que os íons positivos se afastem para regiões menos positiva, em direção ao contra-eletrodo (figura 4), possibilitando o enriquecimento de íons positivos na ponta do capilar.

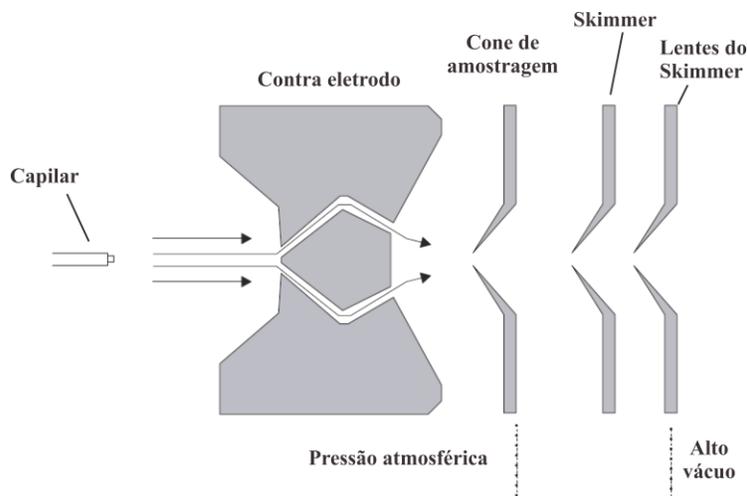


Figura 4: Representação esquemática da fonte de *electrospray*. Figura adaptada de (MORAES & DO LAGO, 2003)

O aumento na densidade de carga deforma a gota, presente na ponta do capilar, fazendo com que a mesma ganhe a forma de um cone – cone de Taylor. Pequenas gotas são liberadas quando a tensão superficial é rompida, devido à alta densidade de carga e o consequente aumento na repulsão entre os íons.

Após a liberação das gotas, estas percorrem o caminho entre o capilar e o contra eletrodo (figura 4), onde sofrem dessolvatação. Conforme a gota perde solvente, a densidade de carga aumenta, até que as forças de repulsão vencem a tensão superficial e as gotículas são projetadas.

3.4.2 Analisadores de massas

Com relação aos analisadores de massas, os mais utilizados são: quadrupolo (Q), *ion trap* (IT), de tempo de voo (TOF, do inglês Time of Flight), sector magnético, entre outros. Nos instrumentos utilizados em proteômica, a combinação entre quadrupolo e tempo de voo, tem sido amplamente utilizado, pois o sistema de quadrupolo permite isolar os íons em função de sua razão massa/carga (m/z) e enviá-los para a câmara de colisão, enquanto que o TOF analisa os íons, gerados na câmara de colisão, fornecendo a massa exata destes.

3.4.2.1 Analisador quadrupolo (Q)

O sistema de quadrupolo funciona com quatro barras, duas positivas e duas negativas alternadas. A trajetória dos íons que passam através destas barras é alterada constantemente, devido à alta voltagem que o sistema é submetido, conforme demonstrado na figura 5.

Para uma dada condição de corrente e voltagem, somente íons com uma determinada razão m/z (íons ressonantes) seguirão direcionados para diante e não ressonantes serão desviados para fora.

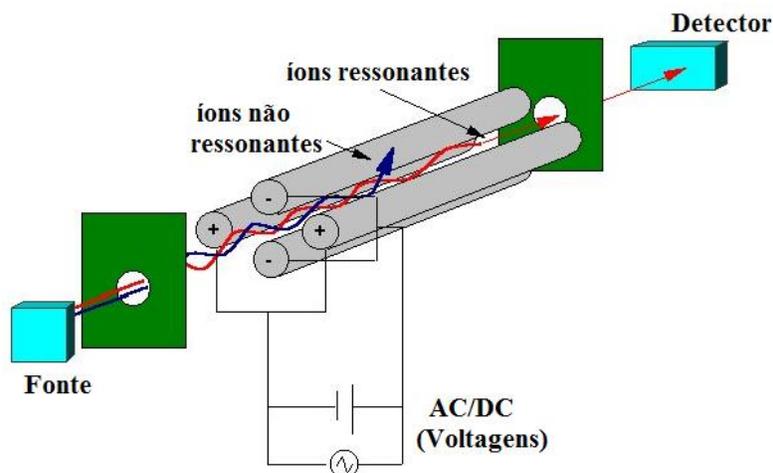


Figura 5: Desenho esquemático de um detector quadrupolo (Q). Figura adaptada de (GUSTAVO SOUZA, 2011).

O espectro de massas é obtido variando-se gradualmente a corrente e voltagem para selecionar todos os íons presentes e enviá-los para a câmara de colisão.

3.4.2.2 Analisador de tempo de voo (TOF)

No analisador por tempo de voo (TOF – figura 6), os íons são acelerados até um tubo de voo sob vácuo. Os íons se movem dentro do tubo em direção ao detector, com uma velocidade proporcional à sua razão m/z . O TOF é afetado pela energia inicial dos íons antes de serem acelerados devido a aplicação de voltagem, e assim adquirem velocidades proporcionais à sua razão m/z .

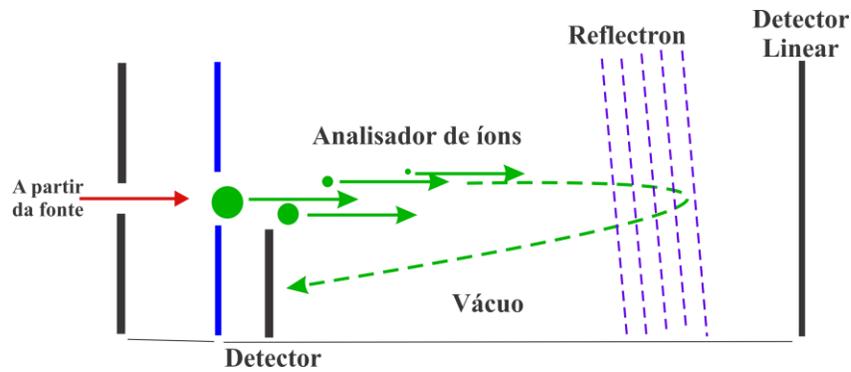


Figura 6: Desenho esquemático de um analisador por tempo de voo (TOF).
 Figura adaptada de (GUSTAVO SOUZA, 2011).

Se o detector ficasse na posição externa do tubo, haveria uma pequena diferença na trajetória dos íons que não seria apenas devida à razão m/z do mesmos. Este comportamento é devido a diferença de velocidade entre os íons de tamanhos distintos. A fim de corrigir estes pequenos desvios de trajetória, o detector é colocado na mesma extremidade da entrada dos íons, e na extremidade oposta encontra-se o reflectron, que consiste de uma sucessão de anéis cerâmicos e metálicos que se comportam como um espelho eletrostático (MACCHIONE E.L.A. et al., 2005). Com isso os íons que atingem o reflectron são obrigados a fazer uma trajetória curva e são direcionados para o detector posicionado no outro extremo do tubo. Desta forma a trajetória dos íons é corrigida para que as diferenças de tempo de voo sejam apenas devido às diferenças de m/z (figura 7).

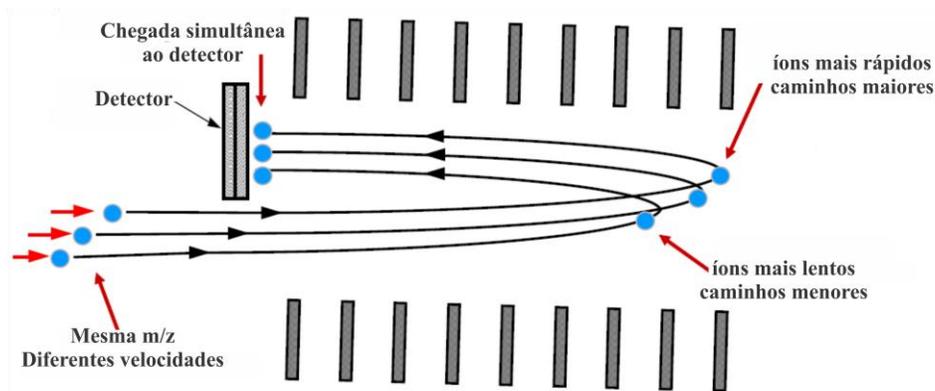


Figura 7: Desenho esquemático de um reflectron. Figura adaptada do (GUSTAVO SOUZA, 2011).

A inclusão do reflectron aumenta o caminho óptico que os íons percorrem, aumentando o tempo de voo e conseqüentemente aumentando ainda mais a resolução do sistema.

3.4.3 Descrição do equipamento utilizado para proteômica

O equipamento disponível é um nano-UPLC-Q-TOF-MS (cromatógrafo líquido de ultra alta pressão, com fluxo de nanomilitros acoplado a um espectrômetro de massas em tandem híbrido com analisadores de quadrupolo e de tempo de voo) é equipado com ionizador por *electrospray*, com os analisadores quadrupolo (Q) e tempo de voo (TOF) em série, proporcionando maior poder de resolução.

O detector é um MCP (Multiplicadores de elétrons compactos de alto ganho) que consiste em placas com cerca de 10.000.000 canais de mesmo diâmetro de poro (aproximadamente 10 microns).

3.5 Pré-fracionamento de amostras

O método de pré-fracionamento de amostra mais utilizado para estudos proteômicos é o gel de poliacrilamida para eletroforese, uni ou bidimensional. Nesta técnica, ocorre a separação de proteínas, visando a diminuição da complexidade das

amostras a serem digeridas e analisadas por espectrometria de massas (DELAHUNTY & YATES, 2005).

Mesmo separando proteínas abundantes dos extratos, ainda pode haver supressão de íons nas análises por espectrometria de massas, o que deve ser evitado. Antes de serem analisadas por espectrometria de massas, as amostras precisam passar por um processo de digestão de suas proteínas, por peptidases específicas (tripsina, quimotripsina). Desta forma, são produzidas centenas, até milhares de peptídeos por proteína. Não são todos os espectrômetros que têm o poder de resolução de analisar uma amostra tão complexa, sobrecarregando o aparelho e causando uma redução no número de identificações (GILAR et al., 2005). Para resolver o problema acima, uma das estratégias é fazer uso da cromatografia líquida bidimensional (HPLC-2D) (GILAR et al., 2005).

Podem ser feitas diferentes cromatografias para separação de peptídeos. Geralmente se faz uso da cromatografia de troca catiônica forte como uma separação primária, esta resina é produzida por sulfonação, tendo como grupo funcional o ácido sulfônico (SO_3H), apresentando-se ionizável em ampla faixa de pH, e como um complemento perfeito desta, uma técnica de separação secundária, a cromatografia em fase reversa, que tem a capacidade de remoção de sais e também uma compatibilidade direta com o ESI-Q-TOF-MS/MS (PENG et al., 2003).

4 METODOLOGIA

Neste capítulo serão descritas as metodologias utilizadas para a execução do trabalho.

4.1 Plantas e germinação

As sementes de *Canavalia ensiformis* utilizadas neste trabalho foram adquiridas do fornecedor Casa Agrodora, São Paulo, SP, Brasil. Estas sementes foram enterradas superficialmente em potes médios (de aproximadamente 20 cm de diâmetro e 15 cm de altura), com terra preta comum, em grupos de 20 sementes por pote. A germinação das sementes foi feita a 25 °C sob luz artificial (fotoperíodo de 14h/8h claro/escuro). Os potes foram regados diariamente, com aproximadamente 10 mL/pote de água.

Após os períodos de desenvolvimento (de 3 até 5 dias) os cotilédones foram recolhidos e exaustivamente lavados com água destilada para remoção de qualquer resíduo de terra, e em seguida, liofilizados.

4.2 Extração

Foram utilizados dois métodos de extração das proteínas nas sementes. Uma extração aquosa branda e outra visando uma extração mais rica apenas em proteínas.

4.2.1 Extração com Tris-Fenol

A extração com Tris-Fenol faz uso de duas soluções: solução 1 - solução aquosa de Tris(hidroximetil)aminometano - HCl (Tris-HCl) 100 mM pH 8,80, β -mercaptoetanol 10 mM, ácido diaminoetanotetraacético (EDTA) 10 mM e sacarose 900 mM. A solução 2 é uma solução comercial de Fenol-clorofórmio.

As sementes foram moídas em moinho analítico, e a farinha obtida, misturada sob agitação com 5 mL de tampão (mistura 1:1 das soluções 1 e 2). O material foi mantido sob agitação constante por 1 h a 4 °C e a seguir foi filtrado e centrifugado a 23.000 x g por 30 min. Separadas as fases, adicionou-se mais 2,5 mL da mistura das soluções 1 e 2 à fase aquosa e agitou-se vigorosamente por alguns minutos. Em seguida, o material foi centrifugado novamente e a fase aquosa foi utilizada. Misturou-se à fase aquosa recuperada, uma solução de acetato de amônio 100 mM em metanol (AmAc-ME), em um volume correspondente a 5 x o volume de fase aquosa recuperada. Esta mistura foi incubada por 16 h a 4 °C. Após a incubação, o sistema foi novamente centrifugado e o *pellet* recuperado foi lavado três vezes, uma com 100 mM de AmAc-ME e mais duas com acetona 80 % e metanol 70 %, respectivamente. Após as etapas concluídas, o *pellet* foi ressuspensão em 25 mM de Tris – HCl pH 7,5.

O conteúdo protéico das amostras durante todo o processo de purificação, foi avaliado por medida de absorbância a 280 nm (GLASEL, 1995), e em paralelo, a fim de corroborar os dados obtidos por análise espectrofotométrica, foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976), sendo a proteína padrão, a albumina sérica bovina (BSA).

As leituras de absorvância foram realizadas em SpectraMax M3[®] (Molecular Devices - Sunnyvale, California, Estados Unidos), em comprimento de onda de leitura de 595 nm.

4.2.2 Extração com Tris-HCl

As sementes liofilizadas foram moídas em moinho analítico, e a farinha obtida, incubada sob agitação em uma proporção massa:volume de 1:5 do tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 pelo período de 2 horas a 4 °C.

Ao final do período de incubação, a mistura foi filtrada e submetida à centrifugação 14.000 x g durante 40 min a 4 °C e o sobrenadante foi separado. Este material é designado como extrato bruto (EBQ, EB1, EB2, EB3, EB4 e EB5; Q-quiescente e 1-5 dias de germinação). O conteúdo protéico das amostras foi analisado da mesma forma que descrito anteriormente para a extração em Tris-Fenol.

4.3 Ensaios enzimáticos para endopeptidases acídicas tipo catepsina-D

Nestes ensaios, foram realizados utilizando-se o substrato fluorogênico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp. Este substrato possui na porção C-terminal o ácido aminobenzóico (Abz), que atua como sistema fluorescente. Na porção N-terminal, encontra-se um sequestrante da fluorescência emitida, o N-2,4(dinitrofenil)etilenodiamino (EDDnp). A seqüência AIAFFSRQ de aminoácidos é clivada por aspártico endopeptidases, em especial, catepsinas D, entre as duas fenilalaninas (F) (JULIANO et al., 1990; PIMENTA et al., 2001; NASCIMENTO-SILVA et al., 2008). Uma vez hidrolisado em qualquer uma das ligações peptídicas do substrato, detecta-se fluorescência diversas ordens de grandeza acima da fluorescência basal (JULIANO et al., 1990; GERSHKOVICH & KHOLODOVYCH, 1996).

Os ensaios foram realizados em placas negras, totalmente opacas, de 96 poços, com volume final de reação de 100 µL. A concentração de substrato utilizada foi de 40 µM. As amostras utilizadas foram os extratos brutos obtidos na extração descrita no item 7.3, ou seja, em Tris-HCl (EBQ, EB1, EB2, EB3, EB4 e EB5), que foram incubadas em meio tamponado com Acetato de sódio (NaAc) 100 mM pH 4,0, na presença e ausência de inibidores enzimáticos específicos. Quando inibidores foram utilizados, estes foram

incubados por 10 min antes do início da reação, iniciada com a adição do substrato. A reação foi monitorada a 37 °C por até 60 min.

As leituras da emissão de fluorescência, para análise cinética, foram realizadas em SpectraMax M3[®], utilizando o software SoftMax 5.4.1 com intervalo máximo de leitura entre os poços, de 20 s. Os comprimentos de onda utilizados foram: $\lambda_{\text{excitação}} = 320 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 430 \text{ nm}$.

Todas as amostras foram ensaiadas com os mesmos volumes (25 μL) sendo posteriormente normalizadas as quantidades de proteína. As velocidades das reações foram expressas em mRFU/min (mRFU: mili-unidades relativas de fluorescência).

4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A partir da polimerização da acrilamida com N,N'-metilenobisacrilamida (figura 6) é feito um gel, que tem sua porosidade regulada pela concentração de poliacrilamida. As concentrações utilizadas foram 10, 12,5 e 15% de acrilamida, com espessura de 0,75 mm, e na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS, além de desnaturar a proteína, confere carga negativa à mesma. Desta forma a mobilidade eletroforética destas proteínas torna-se diretamente proporcional ao logaritmo das suas massas (LAEMMLI, 1970). Os géis foram corados com Coomassie Blue coloidal (BOLLAG D.M. et al., 1996).

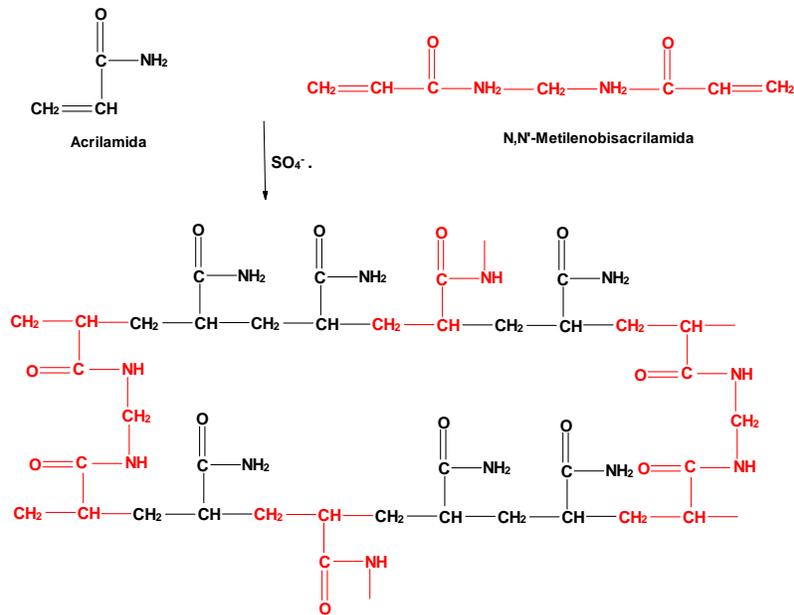


Figura 8: Esquema da polimerização da acrilamida e da N,N'-metilenobisacrilamida para formar o gel de acrilamida. (VOET & VOET, 2006). Em vermelho estão as porções onde o precursor é o N,N'-Metilenobisacrilamida e em preto, as porções que tem como precursor a acrilamida.

4.5 Ensaios imunoquímicos

4.5.1 Dot Blot

Para os ensaios de *Dot Blot*, foram feitas diluições seriadas, nas quantidades de 1 μg , 30 ng, 10 ng e 3 ng, de diferentes proteínas especialmente selecionadas: urease de *C. ensiformis*; BSA; Con-A e canavalina. O material foi aplicado diretamente em uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,45 μm (GE Healthcare, Amersham Biosciences Little Chalfont, England), em 5 aplicações de 1 μL cada. Após a secagem das aplicações, a membrana foi bloqueada com uma solução de bloqueio, contendo: 5 % de caseína (m/v), 0,05 % de polioxietilensorbitano (v/v, Tween 20[®]), 10 mM de Tris-HCl e por fim 137 mM de NaCl pH 7,5 (TTBS-caseína).

Após transcorridas duas horas sob suave agitação, a membrana foi lavada 3 vezes, com aproximadamente 40 mL de solução de bloqueio durante 5 min. Em seguida, a membrana foi incubada na solução TTBS-caseína, contendo o anticorpo primário anticavalina. Duas diluições do anticorpo primário foram preparadas (1:10.000 e

1:30.000). A próxima etapa foi a incubação da membrana com o anticorpo secundário diluído 10.000 vezes (acoplado à enzima fosfatase alcalina). Entre as incubações, 3 lavagens de TTBS-caseína (40 mL por 5 min) foram feitas. As incubações com os anticorpos foram de duas horas.

Novamente, ao término da última incubação a membrana foi lavada com TBS–caseína para a retirada do excesso de anticorpo secundário. Fez-se uma última lavagem com a solução na ausência da caseína e do detergente. A revelação das proteínas imunorreativas foi realizada incubando-se a membrana na solução de revelação da fosfatase alcalina (0,75 mM de nitroblue tetrazolium (NBT) e 30 mM de 5-bromo-4-cloro-indoil-fosfato (BCIP), tamponados em 10 mM de MgCl₂, e 20 mM de Tris-HCl pH 9,2) . São adicionados à membrana 30 mL da solução de revelação e mantidas em contato até o desenvolvimento da cor desejada.

4.5.2 Western Blot

Foram feitos SDS-PAGE em duplicada. Um para comparação de massas (corado com Coomassie Blue) e outro eletrotransferido para uma membrana de nitrocelulose. O sistema usado, tanto para o SDS-PAGE quanto para o *Western blot*, foi PowerPac HC da Bio-Rad conforme manual. Usou-se uma amperagem de 300 mA por 1 hora de transferência, assim que transferidas as proteínas do SDS-PAGE para a membrana, segue-se o mesmo procedimento que descrito anteriormente (7.5.1).

4.5.3 ELISA- ensaio imunoenzimático

Em microplacas de 96 poços (Nunc – Immuno™ Plate, MaxiSorp™ Surface), foram imobilizados 50 µL dos antígenos (canavalina e BSA), diluídos por diluição seriada e incubados por 2 h, à temperatura ambiente e sob leve agitação. Finalizada a imobilização, as placas são lavadas com TTBS-caseína, 3 vezes, por 5 min. Em todas as etapas a seguir, o volume aplicado foi de 50 µL por poço.

Após as lavagens a solução TTBS-caseína (0,5% caseína) foi adicionada para bloquear as regiões que ficaram livres nos poços, e o bloqueio foi feito por 2 h. Ao término

do bloqueio, a placa foi novamente lavada, 3 vezes por 5 min com a mesma solução de bloqueio.

O anticorpo primário, diluído (diluições apresentadas nos resultados) na mesma solução de TTBS-caseína, foi acrescentado na placa, seguindo-se incubação de 1 h. Uma nova lavagem antecede à aplicação do anticorpo secundário (anticorpo 1:10,000 em TTBS-caseína, incubação de 1 h). A última lavagem após a aplicação do anticorpo secundário, é feita 3 vezes por 5 min cada e com TBS.

A identificação da reação antígeno/anticorpo foi feita utilizando uma solução de revelação (*p*-nitrofenilfosfato 1 mg/mL em 50 mM de borato de sódio e 5 mM de MgCl₂). A solução foi adicionada aos poços e, após 60 min a 37 °C, o *p*-nitrofenil liberado foi analisado em leitor de microplacas SpectraMax M3[®], com leitura em 405 nm.

A curva-padrão que contém o antígeno foi analisada contra uma curva padrão de BSA, ambas nas mesmas condições.

4.6 Produção do anticorpo anticanavalina

O primeiro passo para a produção de um anticorpo é a escolha do animal em que será inoculado o antígeno; para tal são levados em consideração inúmeros fatores: características de resposta do anticorpo, a quantidade de anticorpos necessários para efetuar as análises, a disponibilidade do modelo animal, a idade e o sexo do modelo animal, e também a facilidade na coleta do sangue.

Tabela 1 - Parâmetros de escolha do animal para a produção do anticorpo anticanavalina. Material adaptado de (LEENAARS & HENDRIKSEN, 2005).

Animal	Idade	Volume de sangue
Camundongo	6 semanas	0,3 mL
Rato	6 semanas	2 mL
Coelho	3 meses	15 mL
Cabra	6-7 meses	150-400 mL
Ovelha	7-9 meses	200-600 mL

No presente trabalho, foi escolhido coelho, raça Nova Zelândia branco, devido ao volume de sangue máximo extraído ser o bastante para a execução do trabalho.

O anticorpo anticanavalina foi produzido com a injeção do antígeno (canavalina) no hospedeiro dando início a uma resposta imune que resulta na proliferação e diferenciação de células B (Linfócitos B) em células plasmáticas secretoras de anticorpos.

Para a preparação do antígeno (canavalina (BARCELLOS et al., 1993)), 150 µg de proteínas foram resolvidas por uma eletroforese conforme descrito no item 7.4. A banda de gel contendo a proteína isolada foi descorada com uma solução contendo 50 mM de bicarbonato de amônio e 40 % de acetonitrila (ACN) em água ultra pura e então desidratada com ACN 100 %, e em seguida o segmento de gel contendo a proteína descorada e desidratada, foi liofilizado.

O antígeno precisa ser emulsionado para a sua aplicação no coelho. A emulsão é produzida com 200 µL de Tris-HCl 20 mM pH 7,5 que é usado para reidratar o gel que contém a amostra, e 200 µL de Adjuvante Completo de Freund[®] (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). O adjuvante de Freund é utilizado para aumentar o título, pois pela formação de uma emulsão com o antígeno em solução aquosa, faz com que a mesma seja liberada aos poucos no organismo do hospedeiro (TOUGH & SPRENT, 2003; LEENAARS & HENDRIKSEN, 2005). Além disso o Adjuvante de Freund contém um preparado de membranas bacterianas que visa a estimular a resposta imune do hospedeiro. O material foi misturado tanto quanto necessário até obter a emulsão em condições satisfatórias. O volume final da emulsão foi aplicado no dorso do coelho, por injeção intradérmica, em 20 *spots* distintos, 20 µL/*spot*, aproximadamente.

A fim de obter uma resposta imunológica maior, faz-se necessário novas aplicações do antígeno no hospedeiro (BYNOE et al., 2005). Isto permite a produção de anticorpos de maior afinidade da classe IgG. Foram feitos dois reforços, ambos com 150 µg de antígeno, preparados como descritos acima. Entretanto, nesta etapa, o antígeno foi eletroeluído da sua respectiva banda em sistema PowerPac HC (Bio-Rad – Hercules, California, Estados Unidos) conforme instruções do fabricante. Após, as amostras foram dialisadas contra Tris-HCl 20 mM pH 7,5 para a retirada do detergente, e então liofilizadas e congeladas para serem usadas.

Para a injeção, o material é ressuspenso em 100 µL de Tris-HCl 20 mM pH 7,5 e 100 µL de Adjuvante de Freund® incompleto (sem o preparado de membranas bacterianas). Neste caso, a injeção é intramuscular, na pata traseira, 100 µL/pata.

Para o acompanhamento do título da IgG imune, por ELISA, conforme descrito no item 4.7, retirou-se alíquotas de 2 mL de sangue da orelha do animal, com a utilização dos seguintes materiais: 1 agulha 0,8 x 25 mm, um tubo Falcon™ de 15 mL, e solução de citrato de sódio 0,313 %.

Após os reforços, e tendo em vista a confirmação do aumento de título, foi feita a sangria do animal. Foi feita uma coleta de 10 mL de sangue pela orelha (igual às anteriores para o teste do ELISA). Em seguida, foi feita punção cardíaca de onde extraiu-se 45 mL e o material utilizado foi: 1 agulha 1,2 x 40 mm, 2 seringas de 30 mL, ambas com citrato de sódio 0,313 %.

O volume total de 55 mL foi recolhido e centrifugado a 200 x g por 15 min. O plasma foi isolado e a ele adicionado 10 mM de cloreto de cálcio para a coagulação. A reação durou 72 h para permitir a retração do coágulo formado, que foi retirado do meio obtendo-se o soro bruto, em um volume total de 33 mL.

O soro bruto obtido foi centrifugado a 12,000 x g por 30 min e o sobrenadante contendo o anticorpo anticanavalina foi separado e rotulado.

A fim de definir o título a ser usado do anticorpo, realizou-se um *Dot Blot*.

4.7 Cromatografia líquida de afinidade para purificação da IgG

Para fins de imunoprecipitação é indicado fazer uma purificação do soro, pois neste há muitas outras proteínas podendo causar reação cruzada com as outras proteínas presentes. A purificação das imunoglobulinas G do soro imune do coelho foi feita por cromatografia de afinidade com a proteína G Sepharose (HiTrap™ Protein G HP Columns-GE Lifesciences), devido à sua afinidade por imunoglobulinas extraídas de coelhos. Foi escolhida a proteína G imobilizada em matriz de Sepharose, esta tem maior afinidade para IgG de coelho e mínima de ligação à albumina, o que resulta em cromatografias mais eficientes e de maior rendimento.

A cromatografia foi feita em um sistema cromatográfico Äkta Purifier (GE-Lifesciences – Fairfield, Estados Unidos). A coluna foi equilibrada em fosfato de sódio (NaPB) 20 mM pH 7,0. Em seguida, o soro contendo a IgG foi aplicado até saturação da coluna. A coluna foi lavada com 10 mL de NaPB 20 mM pH 7,0. A eluição do material foi feita com ácido aminoacético (glicina) 100 mM, em pH 2,70. Para esta etapa, foram necessários 5 volumes de coluna para a eluição total do anticorpo retido na coluna. Imediatamente após o anticorpo ser eluído, foi adicionado Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 para neutralizar o material e evitar desnaturação do anticorpo.

4.8 Separação de proteínas abundantes

4.8.1 Cromatografia de afinidade por Sephadex G-100[®]

A Sephadex G100[®] é composta por uma matriz de dextrana porosa, comumente usada em cromatografia líquida de gel filtração, para purificação de proteínas globulares de 4 a 150 kDa. A lectina convanavalina-A (Con-A) apresenta massa molecular de 25,5 kDa (REEKE JR. et al., 2011), presente nos extratos de sementes da *Canavalia ensiformis*, apresentando máximos de concentração durante o estágio de maturação da semente (BARCELLOS et al., 1993). Apresenta afinidade por resíduos de D-glicose e D-manose, e liga-se especificamente nos grupo dextrana do Sephadex-G100. Esta proteína é extremamente abundante nos extratos de sementes quiescente (EBQ), até 4, 5 dias de desenvolvimento (EB4, EB5). Desta forma, ao submeter o extrato de proteínas totais à resina, apenas a Con-A fica retida e pode ser recuperada posteriormente.

A cromatografia é realizada na forma de *batch*, com a resina acamada em funil de vidro sinterizado, grau G2. Previamente foi definida a proporção de 3:1 (3 mL de resina / grama de semente de *C. ensiformis*) para a adsorção. A resina, equilibrada com Tris-HCl 20 mM pH 7,5, e colocada em um Becker em banho de gelo, foi misturada à amostra, previamente preparada nas mesmas condições de equilíbrio, e a mistura foi submetida à suave agitação por 16 h a 4 °C. Em seguida, a mistura foi transferida para o funil de vidro para acomodação da resina. As frações foram coletadas em tubos cônicos de 15 mL, e o conteúdo proteico foi monitorado através da absorbância a 280 nm. O material não retido na resina foi recuperado, e a resina exaustivamente lavada até a estabilização da leitura das

frações em 280 nm. A eluição do material retido (Con-A) foi feita com 85 mL de ácido clorídrico (HCl) 10 mM, recolhendo-se as frações sobre volume suficiente de Tris-HCl 1.5 M pH 8,0 para imediata neutralização do eluato.

4.8.2 Imunoprecipitação

A imunoprecipitação é uma técnica de imun química bastante utilizada em purificação de proteínas. Foram feitas duas diferentes técnicas de imunoprecipitação: a primeira foi com a utilização de proteína A agarose; a segunda foi feita de forma bastante semelhante a um *Western Blot*.

O procedimento utilizado foi semelhante ao descrito por (DEMARTINI et al., 2011). Um volume de 100 µL da resina Proteína A Agarose (Sigma - Saint Louis, MO, USA) foi equilibrada em PBS (20 mM NaPB + 150 mM NaCl pH 7,5) e posta em contato com o extrato de interesse sob agitação branda a 4 °C por 16 h, para retirada dos ligantes inespecíficos à proteína A. A mistura foi centrifugada a 720 x g por 10 min e o sobrenadante foi reservado a 4 °C.

Paralelamente, outros 100 µL de resina foram postos em contato com 100 µL de IgG purificada (para a imobilização da mesma), também sob agitação branda, a 4 °C e 16 h. Após centrifugação a 200 x g por 5 min, retirou-se o excesso da solução de IgG do *pellet*, e o sobrenadante reservado anteriormente foi posto em contato com a resina IgG-proteína A (*pellet*), por 16 h a 4 °C.

Ao final da etapa descrita, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante, representando a fração do extrato que não é reconhecido pela IgG anticanavalina, foi reservado a 4 °C. Após três lavagens da resina com 3 x o seu volume de tampão de equilíbrio, a eluição foi feita com tampão de corrida de eletroforese (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 19 %, azul de bromofenol 0,05 g/100 mL e SDS 4 %), acrescido de 10 mM de ditioneitol (DTT). A separação do eluido foi feita por centrifugação a 720 x g por 10 min e o sobrenadante foi separado e analisado por *Western Blot*.

4.8.3 Cromatografia de imunoafinidade

A coluna HiTrap™ Protein G HP (GE Healthcare) foi usada para imobilizar a IgG presente no soro obtido, e em seguida, extrair a canavalina dos extratos pela ligação entre anticorpo-antígeno.

A cromatografia foi realizada com bomba peristáltica e a coluna foi equilibrada com PBS (20 mL). O soro contendo a IgG foi aplicado à coluna e a IgG anticavalina ficou retido na resina. Após lavagem com PBS, aplicou-se o extrato proteico de interesse, permitindo-se que a canavalina presente no extrato pudesse se ligar ao anticorpo preso à resina. Após mais uma lavagem exaustiva da coluna com PBS, procedeu-se a eluição do material com glicina 100 mM, pH 2,70. Novamente o eluído foi imediatamente neutralizado a pH 7,5, usando Tris-HCl 1.5 M pH 8,8. Esta cromatografia foi repetida por reaplicação dos eluatos até que fosse possível verificar uma retirada representativa de canavalina.

4.9 Hidrólise triptica

Os extratos obtidos de acordo com o fluxograma disposto na figura 9 foram submetidos à hidrólise com tripsina modificada, grau sequenciamento (V511 - Promega). Esta enzima hidrolisa no lado C-terminal de resíduos de lisinas e argininas. Desta forma a especificidade conferida é de grande valia para estudos proteômicos. As digestões das amostras foram, em grande parte, realizadas em solução e as soluções estoque foram preparadas em 100 mM de bicarbonato de amônio. As seguir descreve-se o procedimento empregado:

1. Aliquotas dos extratos correspondente à 100 µg e 500 µg de proteínas foram solubilizadas em 100 mM de bicarbonato de amônio (BA);
2. Aos extratos tamponados, adicionou-se 50 mM ditionotrieto (DTT), concentração final. Este material foi mantido de 30 a 60 min a 56 °C, para a total redução das pontes dissulfeto presentes nas amostras proteicas;
3. Após a redução, as pontes dissulfeto rompidas foram alquiladas adicionando-se 50 mM iodoacetamida (IAA), concentração final. Este material permaneceu a temperatura ambiente e no escuro por um tempo de 30 a 60 min.

4. Devido ao excesso de IAA adicionado à amostra, adicionou-se uma quantidade de DTT equivalente a 10 % da usada na etapa de redução, e esta segunda redução foi feita 30 min novamente à temperatura ambiente.
5. Com as etapas acima concluídas fez-se a hidrólise trípica do material. A enzima foi ressuspensa em 50 mM de BA, e utilizada na proporção de 1:50 (enzima:substrato). A digestão foi de 16 h a 37 °C. A enzima utilizada neste trabalho foi a tripsina extraída de pâncreas suíno, com pureza grau sequenciamento.
6. Após a digestão do material, foi realizada uma dessalinização das soluções usando cartuchos de dessalinização OASIS™ (OASIS™ HLB – Waters, Milford, Estados Unidos), seguindo as especificações técnicas.
7. Cada amostra tripsinizada foi liofilizada ao final do processo, e seguiu para as etapas posteriores.



Figura 9: Fluxograma de amostras submetidas a tripsinização e posteriormente pré-fracionadas. A) Extratos obtidos de sementes quiescentes (EBQ – Extrato bruto quiescente, NRS100 – Material não retido da Sephadex G-100, EIS100 – Material eluído da Sephadex G-100, NRG – Material não retido da cromatografia de imunoafinidade e EIG – material eluído da cromatografia de imunoafinidade.); B) Extratos obtidos a partir de sementes com 5 dias de desenvolvimento (EB5 – Extrato bruto com 5 dias de desenvolvimento, NR5_SG100 – Material não retido na Sephadex G-100 e EI5_SG100 – Material eluído da Sephadex G-100).

A hidrólise trípica de amostras extraídas de SDS-PAGE, seguem um protocolo bastante similar ao descrito acima, como pode ser visto abaixo:

1. Cortam-se as bandas desejadas do gel de eletroforese.
2. Os fragmentos de gel excisados são descorados com uma solução de 50 mM de bicarbonato de amônio + ACN. São feitas, pelo menos, 3 lavagens, e estas são desprezadas.
3. Após o descoramento, os géis são desidratados com 100 % de ACN, por 5 min, no mínimo, o gel deverá ficar branco, opaco e reduzir de tamanho.
4. A ACN é descartada, e os géis são liofilizados, por 15 min.
5. Adiciona-se a solução de redução (10 mM de DTT + 50 mM de bicarbonato de amônio). Esta etapa deve ser feita a 56 °C, no escuro por 60 min.
6. A solução é desprezada, e adicionada uma solução de alquilação (10 mM de IAA + 50 mM de bicarbonato de amônio). Etapa executada a temperatura ambiente, por 60 min e no escuro.

7. Desprezar a solução e novamente desidratar os fragmentos de gel com ACN 100 %. Repetir o passo 5.
8. Adicionar a solução de tripsina, preparar, e reagir nas mesmas condições que descrita para digestão em solução.
9. Após a digestão, os peptídeos em solução são recuperados. A solução é adicionada a um tubo eppendorf[®] novo. O material é liofilizado.
10. Após a liofilização, o material é guardado a -20 ou - 80 ° C.

4.10 Pre-fracionamento dos extratos digeridos

Os peptídeos trípticos gerados na etapa da digestão nas diferentes amostras analisadas, foram submetidas à uma etapa de pré-fracionamento em sistema HPLC. As cromatografias foram monitoradas com um detector de UV - SPD-20A (Shimadzu, Inc., Kyoto, Japão), em comprimento de onda de 214 nm. Duas estratégias foram utilizadas: primeiramente fazer uma cromatografia de troca catiônica, com a coluna BioSuite SP[™] 10 µL CXC (Waters, Milford, Estados Unidos); a segunda, foi uma fase reversa em C18, com a coluna SIM-pack CLC-ODS, (Shimadzu, Inc., Kyoto, Japan).

4.10.1 Cromatografia de troca catiônica

O equilíbrio da resina foi feito com o tampão A (0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA) + 5 % de ACN TFA em água). A amostra foi aplicada em 25 µL e a coluna lavada com 13,3 mL (3 volumes da coluna utilizada) de tampão A. A eluição foi feita em gradiente descontínuo de sal. Dois sais foram utilizados, em duas tentativas de pré-fracionamento por troca catiônica forte: o cloreto de sódio e o acetato de amônio. O gradiente descontínuo foi composto por 2 mM, 70 mM, 140 mM e 200 mM de sal, em etapas de 40 min, com fluxo da cromatografia em 0,3 mL/min.

Ao final do gradiente, uma última eluição com 1 M de sal é feita, para retirada de peptídeos fortemente retidos na coluna.

4.10.2 Cromatografia de fase reversa

A cromatografia de fase reversa foi feita em coluna SIM-pack CLC-ODS (C18). O equilíbrio da coluna foi feito com 0,1 % de TFA em água ultra pura. A amostra, após digestão trípica, foi aplicada na coluna seguida de lavagem exaustiva. A eluição foi feita com gradiente de acetonitrila (ACN), de 0 a 60% de ACN em 18 min e de 60 a 100% de ACN em 4 min. O fluxo usado foi de 1 mL/min.

Após a digestão do material, não é necessária a etapa de dessalinização da amostras com OASIS[®] previamente à cromatografia de fase reversa.

4.11 Análises por espectrometria de massas

Para a identificação das proteínas presentes nas amostras, o material previamente preparado foi submetido à cromatografia líquida de ultra-performance acoplada à análise por espectrometria e massas em tandem (UPLC-MS/MS). Os peptídeos foram fracionados em um sistema nanoAcquity UltraPerformance LC[®] (UPLC[®], Waters, Milford, United States), em uma corrida de 30 min. O gradiente de acetonitrila foi de 5 % à 60 % (em 0.1% de ácido fórmico) em 20 min, e feito em uma coluna C-18 (75 µm ID). Os peptídeos eluídos foram ionizados por eletrospray e os íons detectados em um espectrômetro dotado de quadrupolo e tempo de voo como analisadores Q-TOF Micro[™] (Micromass, Waters, Milford, United States).

Os dados foram adquiridos no modo DDA (data dependent mode). Peptídeos dotados de cargas +2, +3 e +4 foram selecionados e submetidos à análise por MS/MS. O fluxo usado foi de 600 nL/min e as voltagens do cone e do capilar foram de 3.5 kV e 100 V, respectivamente.

Os dados coletados (.raw), foram processados no software Mascot Distiller e gerados os arquivos Mascot General File (.mgf). Estes arquivos, .mgf foram utilizados para a busca contra o banco de dados de proteínas não redundantes disponível no National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>, Bethesda, MD, USA).

A restrição "viridiplantae" no campo organismo foi utilizada em algumas buscas. A faixa de tolerância foi de 0.8 kDa. Os dados foram processados utilizando o software

Mascot Deamon, que trabalha com os algoritmos do Mascot para busca contra o banco de dados.

5 RESULTADOS

5.1 Extração com e sem Fenol

Nesta etapa do trabalho, o objetivo foi otimizar o processo de extração de proteínas a partir de sementes quiescentes e com 5 dias de desenvolvimento.

5.1.1 Rendimento da extração e malha do gel de poliacrilamida

As proteínas presentes nas sementes quiescentes de *Canavalia ensiformis* foram extraídas em meio aquoso. Duas extrações foram realizadas, uma em tampão Tris(hidroximetil)aminometano - HCl (Tris-HCl) 20 mM pH 7,50, denominada **Ext-1**, e outra usando uma mistura de Tris/Fenol (USB 75829), visando uma maior limpeza do material, cujo nome dado foi **Ext-2**. O rendimento em relação à concentração de proteínas está apresentado na tabela 2.

Tabela 2: Comparação entre os métodos de extração utilizados, com relação ao rendimento de proteína extraída utilizando dois processos de extração.

Método de extração		Rendimento (mg/mL de proteína)
Extração 1 - Ext-1	Tris 20 mM pH 7,5	8,54
Extração 2 - Ext-2	Tris/Fenol	2,58

As proteínas contidas nos extratos Ext-1 e Ext-2 foram analisadas por SDS-PAGE para avaliar o rendimento e a porcentagem de poliacrilamida no gel que traria a melhor resolução às proteínas em solução. Estes dados estão apresentados na figura 10.

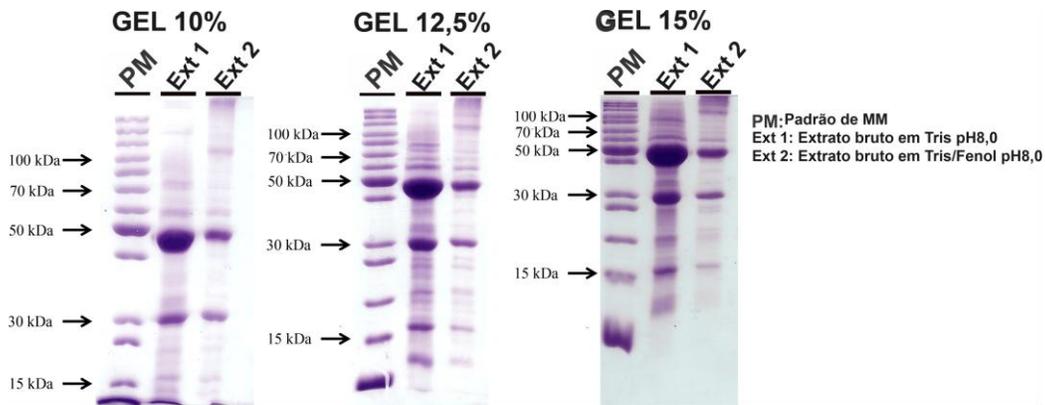


Figura 10: SDS-PAGE para comparação dos extratos obtidos com Tris 20 mM pH 7,5 (Ext 1) e com Tris/Fenol (Ext 2) onde diferentes concentrações de poliacrilamida foram avaliadas. PM: padrão de massa.

O gel com concentração 12,5 % apresentou melhor distribuição das proteínas analisadas, desde massas mais altas (250 kDa), até massas bem baixas (<15 kDa). Desta forma esta concentração de poliacrilamida foi a escolhida para os géis subseqüentes.

5.1.2 Remoção de proteínas abundantes - cromatografia de afinidade por Sephadex G100[®]

Após a extração das proteínas presentes na semente quiescente, partiu-se para a etapa de pré-fracionamento da amostra. Esta etapa, de descomplexação do material, é essencial para que o número de proteínas identificadas seja consideravelmente maior quando os materiais forem analisados por LC-MS/MS. Inicialmente, o objetivo foi a retirada de uma das proteínas de reserva da planta, que é facilmente extraída nas condições analisadas, a concanavalina A (Con-A).

A Con-A é uma proteína presente em grandes quantidades na semente de *C. ensiformis* e, para sua retirada dos extratos Ext-1 e Ext-2 de sementes quiescentes, utilizou-se a cromatografia de afinidade com a resina Sephadex G100[®]. Os perfis eletroforéticos das etapas cromatográficas estão apresenado na figura 11.

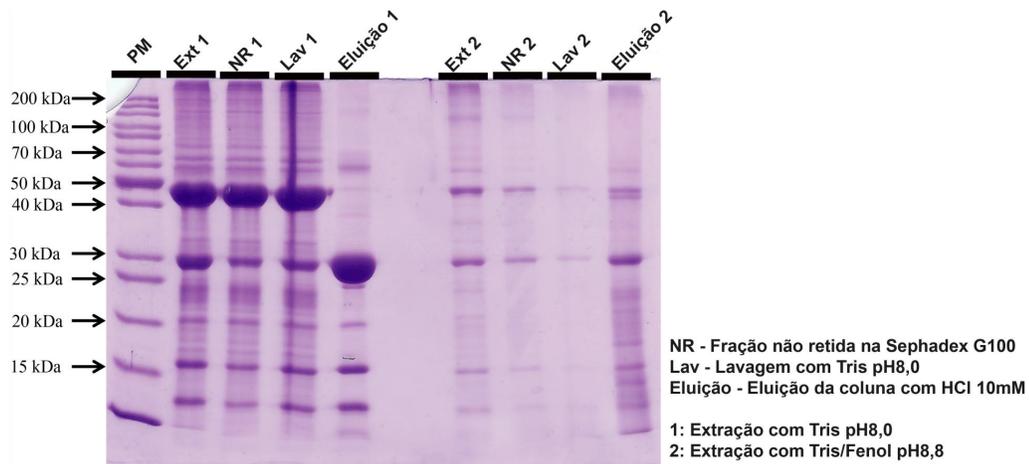


Figura 11: SDS-PAGE 12,5 % para comparação da remoção da con-A nas extrações com e sem fenol do extrato EBQ. PM: padrão de massa.

Ao comparar as frações extraídas pela cromatografia de afinidade por Sephadex G100[®] (Figura 11), conclui-se que a extração em fenol dificultou a retirada da Con-A da amostra de partida, provavelmente por que o fenol deve ter desnaturado parcialmente a lectina impedindo sua ligação à resina. Além disto, uma menor quantidade de proteínas foi extraída (Tabela 2), mesmo que o material seja de uma melhor qualidade. Desta forma, optou-se pela extração somente com o Tris-HCl 20 mM pH 7,5.

5.1.3 Extrato de sementes quiescentes e germinadas

Cerca de 20 sementes foram germinadas, com períodos de desenvolvimento de 3, 4 e 5 dias. Após este período, foram retirados todos os cotilédones, congelados em nitrogênio líquido e em seguida, secos por liofilização. As sementes quiescentes foram moídas e gerada uma farinha que foi extraída em tampão Tris 20 mM pH 7,5, seguindo o protocolo descrito no item 4.2. O mesmo foi feito com o material germinado (geração da farinha e extração). As concentrações obtidas bem como o aspecto das plantas estão apresentados na figura 12.



Extrato Bruto Quiescente (EBQ)

$A_{280} = 44,70 \text{ mg/mL}$



Extrato Bruto Germinado por 3 dias
(EB3)

$A_{280} = 32,80 \text{ mg/mL}$



Extrato Bruto Germinado por 4 dias
(EB4)

$A_{280} = 50 \text{ mg/mL}$



Extrato Bruto Germinado por 5 dias
(EB5)

$A_{280} = 60 \text{ mg/mL}$

Figura 12: Sementes e plântulas de *C. ensiformis* nos diferentes estágios de desenvolvimento estudados (lado esquerdo) e a concentração de proteínas nos extratos correspondentes (lado direito).

Com os extratos brutos prontos, fez-se um gel de poliacrilamida (12,5 %) a fim de visualizar o perfil protéico de cada um destes. Paralelamente a isto, foi feito um Western Blot (descrito no item 4.5.2), para a visualização de proteínas imunorreativas ao anticorpo anticanavalina (figura 13).

Observou-se-se que a concentração de Con-A, no decorrer do tempo de desenvolvimento da semente, permanece relativamente constante. Entretanto, houve uma alteração nos níveis de canavalina entre o 3º e 5º dias de desenvolvimento, com níveis mínimos no 4º dia. A imunorreatividade do anticorpo anticanavalina demonstrou que subprodutos desta proteína de massa ao redor de 23 kDa formados no 3º e 4º dias, não foram mais detectados no 5º dia.

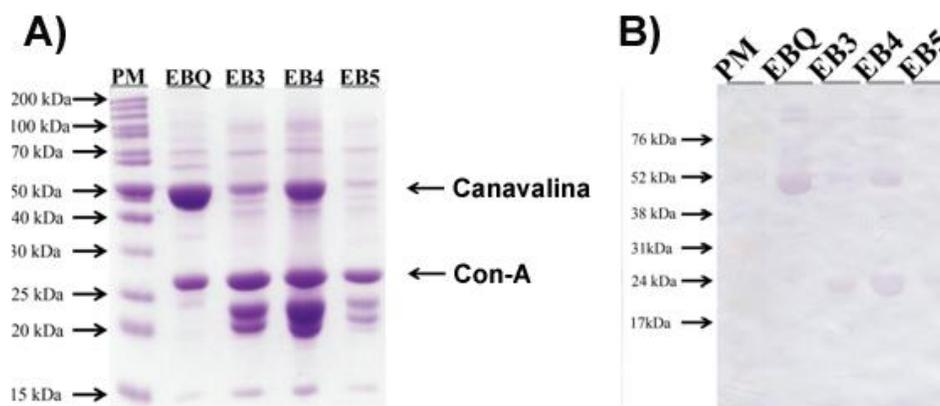


Figura 13: A) SDS-PAGE dos extratos brutos, EBQ (Extrato bruto quiescente), EB3 (Extrato bruto em 3 dias de desenvolvimento), EB4 (Extrato bruto em 4 dias de desenvolvimento) e EB5 (Extrato bruto em 5 dias de desenvolvimento). B) Western Blot as mesmas frações analisadas em A. Anticorpo primário anticanavalina: 1:30,000. Anticorpo secundário: 1:10,000. Em cada canaleta foram adicionados 20 µg.

5.1.4 Extratos a serem analisados

A partir do extratos produzidos (EBQ, EB3, EB4 e EB5), foram determinados apenas dois pontos para serem analisados, o EBQ, por ser controle do ponto zero, onde não há qualquer desenvolvimento na planta e o EB5, quando extensiva mobilização de proteínas já ocorreu mas a JBU ainda está bem preservada (DEMARTINI et al., 2010).

Adicionalmente, o critério de escolha do extrato em desenvolvimento também envolveu a combinação dos três fatores a seguir, todos analisados por atividade enzimática (DEMARTINI, 2007):

- a) a atividade máxima sobre o substrato fluorogênico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp (preferencial para aspártico peptidases);
- b) a inibição mínima por pepstatina-A (inibidor de aspártico peptidases);
- c) inibição máxima por tirostatina, um inibidor de enzimas tipo sedolisinas. Existem evidências da presença destas enzimas durante o desenvolvimento inicial da *C. ensiformis*.

Outro fator importante para a escolha do extrato de semente em desenvolvimento está na quantidade de canavalina presente em cada um. Como pôde ser verificado na figura 13, o EB5 é o que apresentou menor concentração de canavalina e que melhor atendeu aos requisitos para a atividade peptidásica. Desta forma, este foi o extrato escolhido para as análises posteriores.

5.2 Retirada de proteínas abundantes

5.2.1 Remoção da Concanavalina-A (Con-A)

A remoção da Con-A dos dois extratos usados (EBQ e EB5), foi feita por cromatografia de afinidade, com a resina Sephadex G100 (item 4.10.1). As quantidades aplicadas e recuperadas nos dois extratos estão apresentados na tabela 3. O perfil eletroforético das frações obtidas nas cromatografias estão apresentados na figura 14.

As frações não-retidas foram denominadas NRSG100 e NR5_SG100, para os extratos de sementes quiescentes e de 5 dias de desenvolvimento, respectivamente. As frações eluídas foram denominadas de EISG100 e EI5_SG100 para os extratos de sementes quiescentes e de 5 dias de desenvolvimento, respectivamente.

Tabela 3: Tabela de dados da cromatografia de afinidade com a resina Sephadex G100. Os extratos analisados foram o EBQ e EB5D.

Material aplicado		Proteína recuperada						
Extrato	mg de proteína	Fração não retida (NR)			Fração eluída (El)			
		Concentração (mg/mL)	Volume (mL)	Massa (mg)	Concentração (mg/mL)	Volume (mL)	Massa (mg)	%
EBQ	223,5	2,55	43,00	109,98	0,029	85,4	19,56	8,8
EB5	780,0	12,90	50,00	645,00	2,47	21,00	49,99	6,5

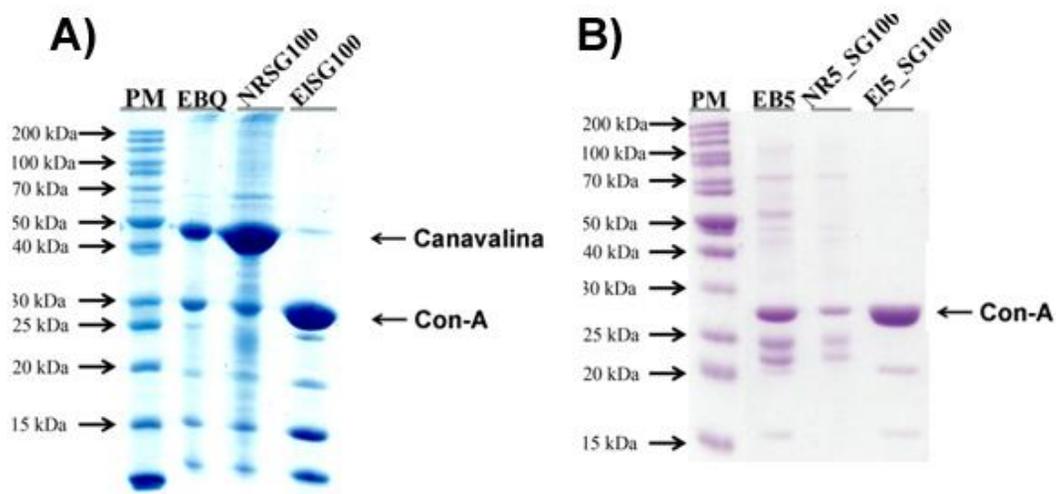


Figura 14: SDS-PAGE das frações analisadas por cromatografia de afinidade em Sephadex G100. A) Cromatografia do extrato bruto de sementes quiescentes (EBQ). B) cromatografia do extrato bruto de sementes germinadas por 5 dias (EB5D). NRS G100 e NR5_SG100: frações não-retidas, quiescente e 5 dias, respectivamente. EIS G100 e E15_SG100: frações eluídas, quiescente e 5 dias, respectivamente. Foram aplicadas cerca de 10 µg de proteínas por poço em A e B.

Em ambos extratos, observou-se remoção significativa da Con-A. A partir da definição desta etapa, foi dada sequencia para a retirada da canavalina da fração NRS100. As demais frações foram reservadas para posterior uso.

5.2.2 Remoção da Canavalina

Para a remoção da canavalina, a abordagem utilizada foi um experimento de imunoprecipitação. Com este experimento a proteína seria removida do extrato de interesse, gerando uma nova fração a ser analisada separadamente.

Para isso ser possível, foi produzido *in house* um pool de anticorpos anticanavalina. O acompanhamento da produção do anticorpo foi feito por ensaio imunoenzimático (ELISA, item 4.5.3), através da análise do soro do coelho imunizado em intervalos pré-definidos de tempo (tabela 4).

Tabela 4: Tabela de acompanhamento de resposta do anticorpo.

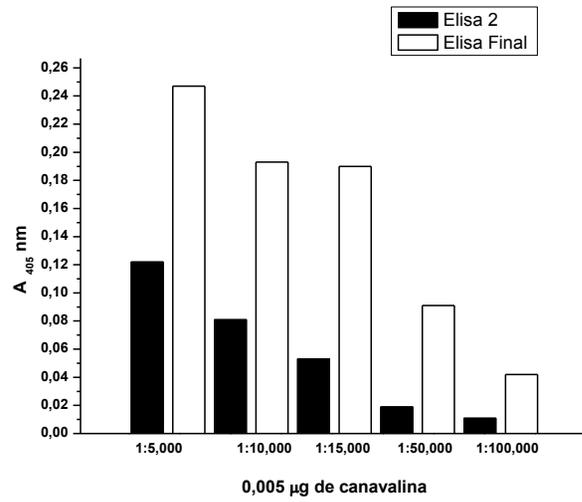
µg proteína	Leitura A _{405 nm}									
	1:5.000		1:10.000		1:15.000		1:50.000		1:100.00	
	Elisa 2	Elisa Final	Elisa 2	Elisa Final	Elisa 2	Elisa Final	Elisa 2	Elisa Final	Elisa 2	Elisa Final
0	0	0	0,	0	0	0	0	0	0	0
0,005	0,122	0,247	0,081	0,193	0,053	0,190	0,019	0,091	0,011	0,042
0,05	0,213	0,357	0,155	0,316	0,120	0,215	0,036	0,107	0,005	0,053
0,25	0,234	0,330	0,171	0,353	0,127	0,381	0,047	0,127	0,03	0,061
0,5	0,262	0,391	0,188	0,423	0,146	0,318	0,048	0,159	0,023	0,058

Elisa 2 – Ensaio executado 20 dias após a inoculação do antígeno (5 dias após o primeiro reforço do antígeno).

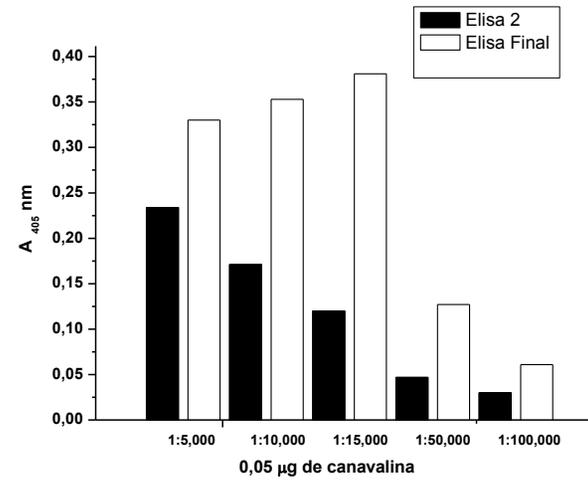
Elisa Final – Ensaio executado 34 dias após a inoculação do antígeno (2 dias após o segundo reforço do antígeno e 2 dias antes a punção cardíaca).

Quando comparados os títulos dos ensaios feitos 20 dias após a inoculação do antígeno, com o ensaio feito posteriormente, com 34 dias passados a aplicação do antígeno, tem-se um aumento no título, não sendo necessário reforço adicional. O anticorpo também se mostrou capaz de reconhecer pequenas quantidades de canavalina em diluições entre 1:15.000 e 1:50.000 (Figura 15, ítem a).

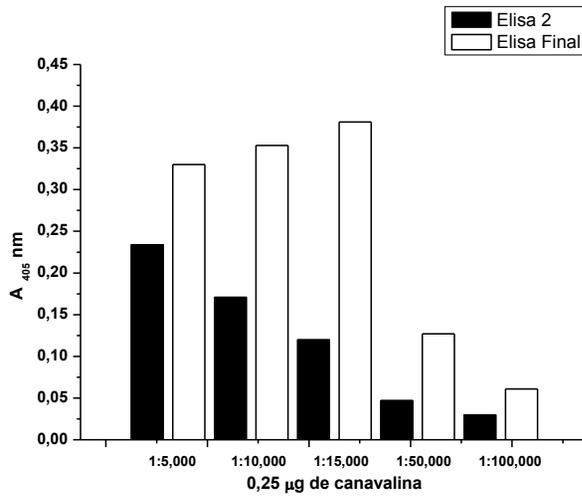
a)



b)



c)



d)

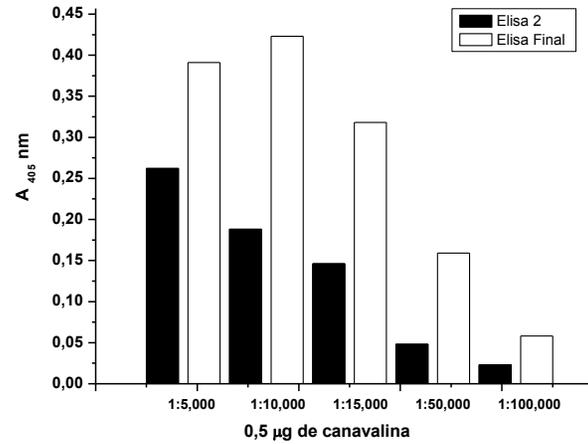


Figura 15: Titulação do antígeno (canavalina) com diferentes diluições do anticorpo.

Desta forma, foi feita a sangria final do animal, sendo extraídos 33 mL de soro através de punção cardíaca (item 4.6).

O soro obtido (preparado conforme item 4.6) foi primeiramente analisado por *Dot Blot* para estimar a diluição a ser usada nos ensaios imunológicos, e nos ensaios de imunoprecipitação.

Com os dados apresentados na figura 16, definiu-se que a diluição a ser adotada seria de 1:30,000. Nesta diluição, já é possível o reconhecimento do antígeno pelo anticorpo. Valores de massa na ordem de nanogramas de canavalina são reconhecidas, e a resposta cruzada para a urease foi reduzida nesta diluição.

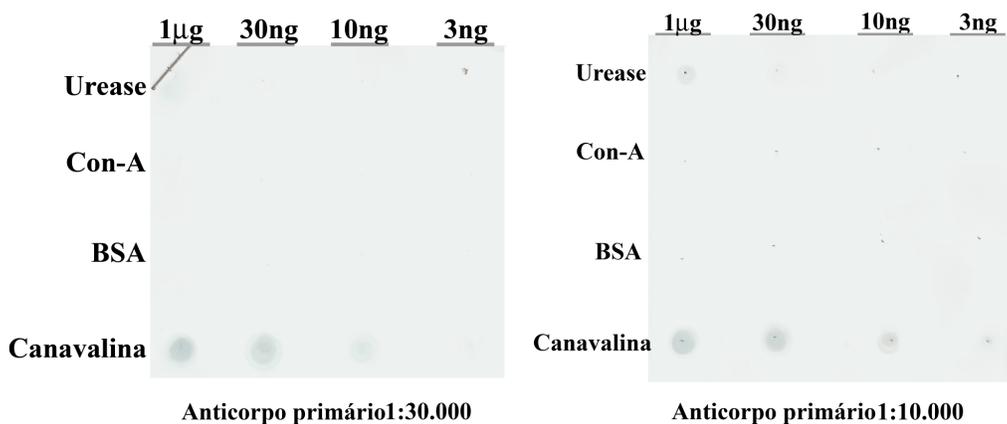


Figura 16: Dot Blot para a determinação do título do soro obtido, o qual contém o anticorpo anticanavalina a ser utilizado em análises posteriores. A) diluição 1:10,000 do anticorpo primário; B) diluição 1:30,000 do anticorpo primário

Para fins de imunoprecipitação, o indicado é fazer uma purificação da IgG presente no soro. Esta purificação foi feita por cromatografia de afinidade com a resina proteína G Sepharose, que apresenta grande afinidade por imunoglobulinas de coelhos, conforme descrito no item 4.6. Para a purificação, o soro é previamente dialisado contra o tampão de equilíbrio (5 mL, mesmo volume aplicado na cromatografia). A figura 17 apresenta o perfil cromatográfico representativo desta purificação, onde o início da eluição do anticorpo adsorvido foi feita por choque de pH, usando glicina 20 mM pH 2,70.

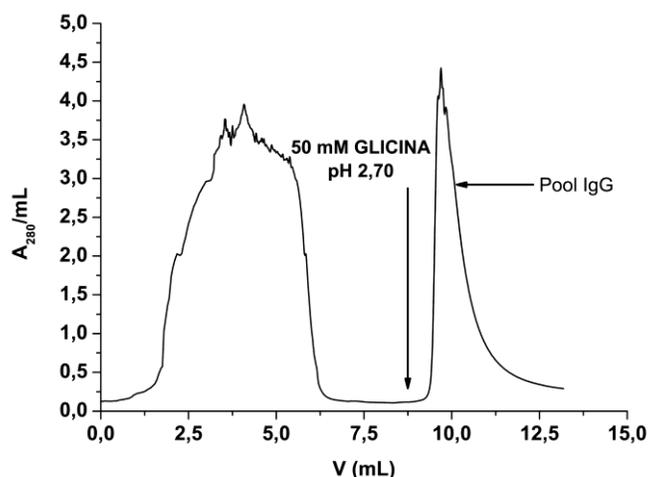


Figura 17: Cromatografia de afinidade em HiTrap G-protein - sepharose. A coluna (1 mL) foi equilibrada com NaPB (fosfato de sódio) 20 mM pH 7,0. A seta vertical indica o início da eluição. O pool de IgG eluído está indicado pela seta horizontal.

Uma vez obtida a IgG purificada, o título do anticorpo foi novamente determinado por Dot Blot. Os resultados estão apresentados na figura 18.

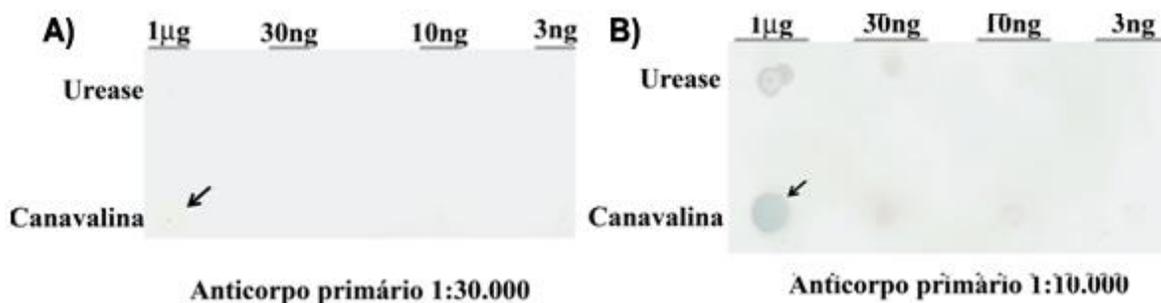


Figura 18: Dot blot para determinação do título da IgG purificada a ser utilizado. A) diluição 1:30,000 do anticorpo primário; B) diluição 1:10,000 do anticorpo primário.

Como visto na figura 18, o dois títulos foram testados: 1:30,000 e 1:10,000. No caso de 1:30,000 a diluição foi excessiva e no caso de 1:10,000, ainda havia reação cruzada com a urease JBU. Desta forma a diluição 1:15,000 foi utilizada para os ensaios de imunoprecipitação.

5.2.2.1 Imunoprecipitação com o uso de Proteína A agarose

A escolha da resina Protein-A Agarose (82492 – Sigma - Saint Louis, MO, USA), foi a primeira estratégia utilizada para a retirada da canavalina do extrato das sementes. A imunoprecipitação foi feita conforme 4.8.2, e os resultados foram analisados por Western Blot. O extrato analisado foi o NRSG100 (material não retido da cromatografia de afinidade por Sephadex G100).



Figura 19: *Western Blot* para comparação entre os extratos, e avaliação da eficiência na retirada da proteína de reserva. **PM:** padrão de massa molecular; **EBQ:** extrato bruto de sementes quiescentes; **NRSG100:** fração não retida da cromatografia de afinidade em Sephadex G100; **EISG100:** fração eluída da cromatografia de afinidade em Sephadex G100; **NR IgG:** fração não-retida da etapa de imunoprecipitação em Protein-A Agarose; **El IgG:** fração eluída da etapa de imunoprecipitação em Protein-A Agarose; **Lig. In.:** ligação inespecífica do extrato à Protein-A Agarose (detalhado em 4.8.2).

No *Western Blot* mostrado acima, verifica-se que ainda há canavalina na porção não retida da imunoprecipitação, e também abre uma discussão sobre porque a banda que aparece no extrato eluído está acima da posição que deveria aparecer a canavalina. Para tentar responder a esta pergunta, fez-se um gel de eletroforese e um *western blot*, e junto com o material imunoprecipitado, foi adicionada a IgG purificada com diferentes quantidades de agente redutor DTT.

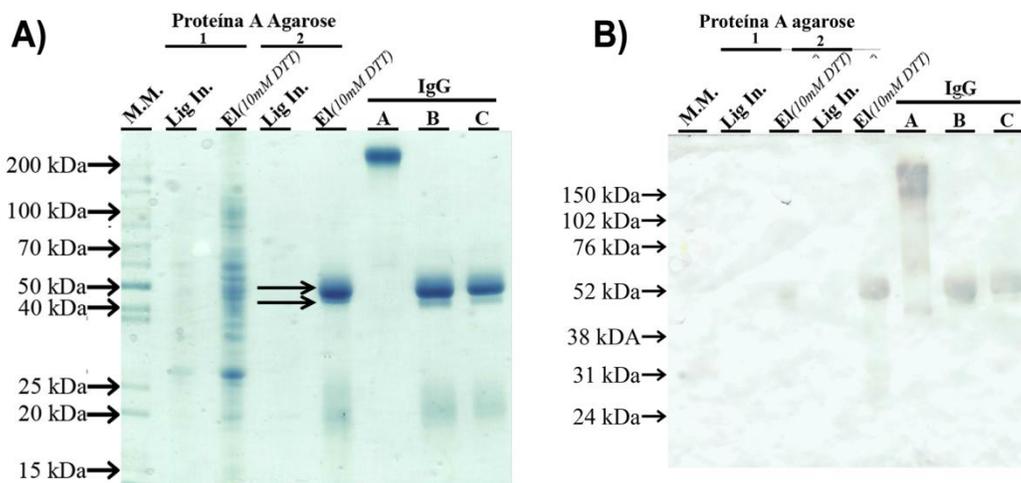


Figura 20: SDS-PAGE e Western blot para analisar a retirada a canavalina dos extratos. A e B) **MM** – Padrão de massa molecular; **Lig In.** – Fração que contém a ligação inespecífica entre o extrato e a proteína A agarose; **EI** – Material eluído da co-imunoprecipitação; **A** – Fração da IgG purificada e preparada em tampão de corrida de eletroforese com SDS; **B** - Fração da IgG purificada e preparada em tampão de corrida de eletroforese com SDS e 10 mM de DTT e **C** - Fração da IgG purificada e preparada em tampão de análise de eletroforese com SDS e 50 mM de DTT.

A eletroforese e *Western Blot* da figura 20 mostraram que a IgG estava se soltando da resina. Devido às massas próximas da subunidade da IgG e da canavalina (50 kDa e 48 kDa), as duas bandas intensas indicadas na figura 20 A (seta) foram excisadas do gel e submetidas à digestão por tripsina *in gel*.

A tabela 5 apresenta os resultados obtidos na análise por espectrometria de massas (item 4.11). A análise destes resultados permitiu verificar que a canavalina estava sendo retirada do extrato de interesse, mas a co-eluição da IgG estava mascarando os resultados, não sendo possível atribuição adequada. Desta forma optou-se por outra estratégia para a remoção da canavalina.

Tabela 5: Proteínas identificadas por MS/MS, a partir das análises das bandas 1 e 2 excisadas do gel da figura 20. As proteínas estão identificadas de acordo com a anotação do (PubMed, Maio de 2011). A busca foi feita contra o banco de dados de proteínas não redundantes. Não foi feito qualquer restrição ao organismo de busca. A ferramenta de busca usada foi Mascot (Mascot Server 2.3 – Windows – março 2010). Ortólogos não estão sendo mostrados, apenas as proteínas distintas de maior escore. RuBisCO: ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit precursor; IgG: immunoglobulin gama.

Seta na figura 20	Proteína	Código de Acesso (PubMed)	Cobertura de sequência (%)	Mascot Score	Organismo	Massa (Da)
Acima	IgG I Constant region	89242507	27	398	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	35914
	Canavalin	18007	18	240	<i>Canavalia gladiata</i>	50389
Abaixo	RuBisCO small subunit precursor	1079736	12	107	<i>Glycine max</i>	20252

5.2.2.2 Cromatografia líquida de imunoafinidade

Com o objetivo de remover a canavalina do extrato de interesse (NRSG100), outra abordagem foi utilizada. Optou-se por uma cromatografia líquida de imunoafinidade, com a resina Protein G Sepharose (HiTrap™ Protein G HP Columns- GE Lifesciences), anteriormente utilizada para a purificação da IgG do soro. De acordo com o descrito no item 4.8.3, a eluição foi gradual, pois o objetivo era de eliminar as proteínas que interagissem como o anticorpo, e posteriormente elimina-lo. A figura 21 mostra o perfil representativo desta cromatografia, que precisou ser repedita pelo menos 8 vezes para se ter uma quantidade expressiva de canavalina retirada do extrato.

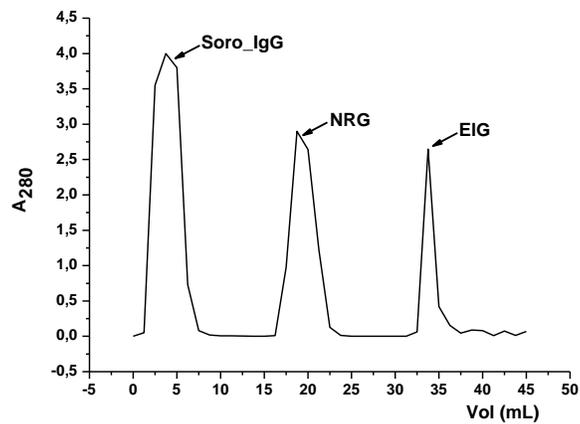


Figura 21: Cromatograma obtido para a purificação da canavalina.

Apesar das várias tentativas as abordagens de imunoprecipitação não atenderam eficientemente o objetivo proposto. Portanto, novas alternativas foram adotadas para atingir este objetivo.

5.3 Hidrólise triptica

As amostras obtidas por pré-fracionamento, dispostas no fluxograma da figura 22 foram digeridas por tripsina conforme detalhado no item 4.9.

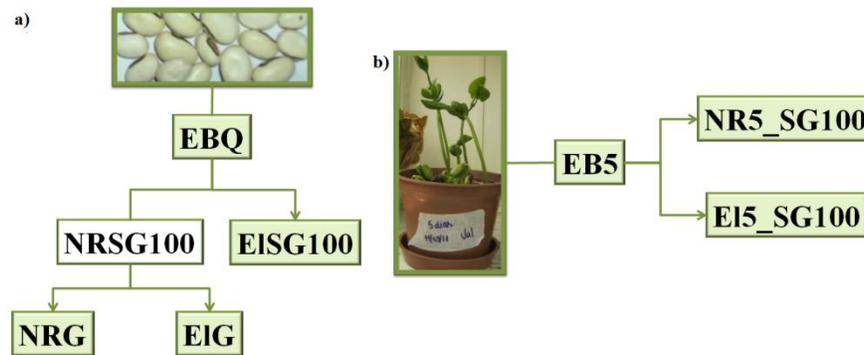


Figura 22: Fluxograma dos extratos obtidos a partir de sementes quiescentes e sementes em 5 dias de desenvolvimento. A) Extratos obtidos a partir de sementes quiescentes (**EBQ** – Extrato bruto quiescente; **NRS100** – Material não retido da Sephadex G-100; **EIS100** – Material eluído da Sephadex G-100; **NRG** – Material não retido da cromatografia de imunoafinidade e **EIG** – material eluído da cromatografia de imunoafinidade); b) Extratos obtidos a partir de sementes com 5 dias de desenvolvimento (**EB5** – Extrato bruto com 5 dias de desenvolvimento; **NR5_SG100** – Material não retido na Sephadex G-100 e **EI5_SG100** – Material eluído da Sephadex G-100).

5.4 Pré-fracionamento dos extratos digeridos

Com a etapa de digestão efetuada, os materiais foram pré-fracionados por cromatografia líquida.

Duas tentativas foram feitas: a primeira foi uma cromatografia de troca catiônica forte, usando gradientes descontínuos. Dois sais foram utilizados separadamente para a eluição: cloreto de sódio e acetato de amônio. Em ambos os casos, o perfil cromatográfico não se mostrou satisfatório, com poucos picos (peptídeos) nas eluições. Os perfis cromatográficos estão apresentados na figura 23.

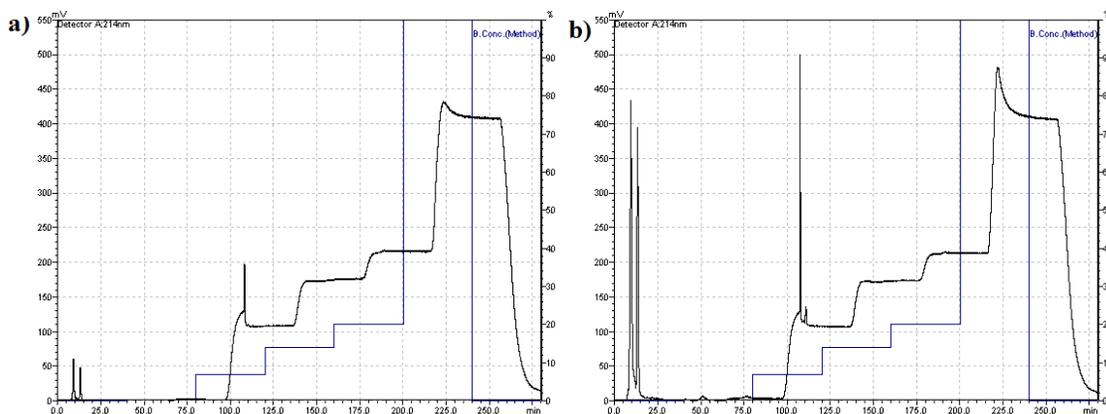


Figura 23: Cromatografia líquida de troca catiônica forte. a) cromatograma do branco; b) amostra NRG tripsinizada. Leitura monitorada em 280 nm. Gradiente de fase móvel: 2 mM, 70 mM, 140M e 200 mM e 1M acetato de amônio. Amostra: NRG tripsinizado com 100 μ g de proteína.

Entre os cromatogramas mostrados na figura 23, a diferença está apenas na intensidade dos picos. A estratégia foi então modificada e ao invés de fazer uma cromatografia de troca iônica, fez-se uma cromatografia de fase reversa, usando gradiente contínuo de acetonitrila. A figura 24 apresenta o cromatograma.

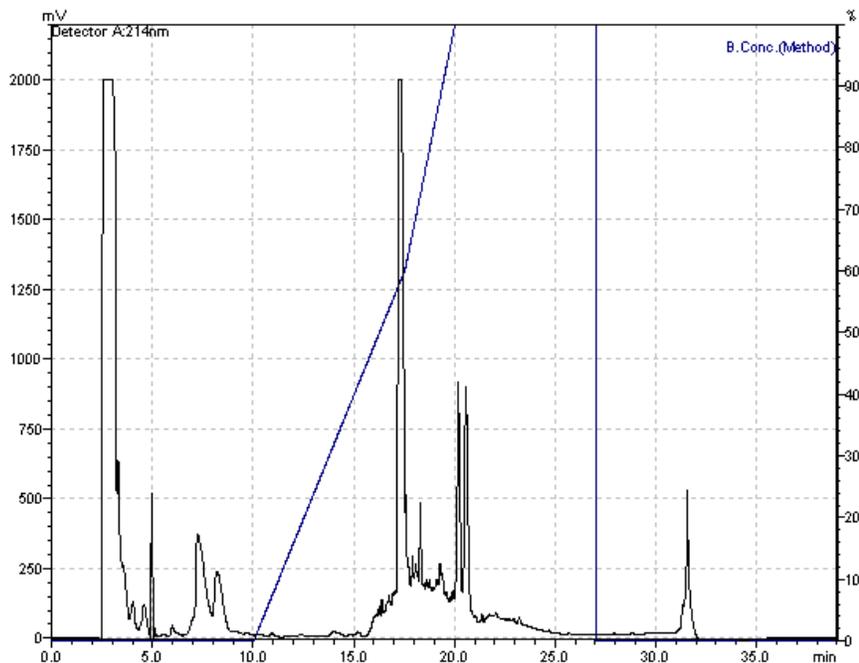


Figura 24: Cromatograma da amostra NRG (Extrato de semente quiescente, não retido na cromatografia de imunoafinidade). A coluna:SIM-pack CLC-ODS (C18), com leitura em 280 nm. Gradiente de ACN, de 0 a 60 % em 18 min e de 60 a 100% em 4 min. Amostra: 100 µg de proteína.

Os dados obtidos pela cromatografia de fase reversa apresentada na figura 24 mostraram maior separação de peptídeos com a resina utilizada. As frações coletadas serão analisadas por LC-MS/MS.

5.5 Considerações gerais

O objetivo do presente trabalho foi o estudo em média escala do proteoma das sementes quiescentes e em desenvolvimento da leguminosa *Canavalia ensiformis*. Dois estágios de desenvolvimento foram intencionalmente escolhidos para o estudo:

1. As sementes quiescentes por conterem as três isoformas de urease até então conhecidas: urease clássica (SUMNER, 1926), a canatoxina (CARLINI & GUIMARAES, 1981) e a JBUREII-b (Mulinari et al, submetido).
2. O estágio de desenvolvimento de 3, 4 ou 5 dias, refere-se às evidências de enzimas tipo sedolisinas que podem estar presentes nestas sementes .

Recentemente, um estudo proteômico das sementes e plantulas foi realizado (DEMARTINI et al., 2011). Neste estudo, foi demonstrado que até o 5º dia de desenvolvimento da planta, o peptídeo entomotóxico contido na sequência da enzima urease está ainda protegido, apesar de a urease ter sido processada de alguma forma. Estes dados foram obtidos por análises de imunoprecipitação associada à espectrometria de massas, e as proteínas quantificadas por contagem espectral livre de marcação (DEMARTINI et al., 2011). Entretanto, a abundância das proteínas de reserva nos extratos analisados foi um limitante para que um número maior de proteínas pudesse ter sido identificado.

A fim de otimizar as condições de pré-fracionamento dos extratos analisados, diferentes estratégias foram avaliadas. A extração com Tris-fenol é bastante utilizada para extração de proteínas com fins de análise proteômica. Isto porque esta extração remove com bastante eficiência açúcares livres, lipídeos, moléculas menores como alcalóides, terpenos, entre outras. Desta forma, o *pellet* final obtido é basicamente protéico. Entretanto, existem etapas de lavagens agressivas, com acetona. Estas lavagens promovem uma intensa desidratação do meio, o que dificulta a ressuspensão do *pellet* final obtido. Como demonstrado na tabela 2 e figuras 10 e 11, a extração feita com Tris-Fenol mostrou-se eficiente entretanto, o rendimento foi consideravelmente mais baixo, e a cromatografia de afinidade por Sephadex G100 (remoção da Con-A), parece ter sido afetada. Desta forma, optou-se por uma extração aquosa e branda em Tris-HCl 20 mM pH 7,5. Nestas condições, as isoformas de urease mantiveram-se preservadas nos extratos, mesmo que a sua atividade enzimática não fosse levada em conta nestas condições.

Para a remoção das proteínas abundantes dos extratos, a Con-A e a canavalina, duas estratégias foram alçadas. A remoção da Con-A foi realizada através de cromatografia de afinidade utilizando a resina Sephadex G100 (ou G50). Isto porque a Con-A é uma lectina e tem afinidade pela matriz da resina Sephadex G100 (dextrans). Desta forma a resina que é comumente utilizada em cromatografia de gel filtração, passou a ser usada como resina de afinidade.

A figura 13 apresenta as eletroforeses realizadas com os pools obtidos das cromatografias de afinidade por Sephadex G100, feitas com os extratos EBQ e EB5. Como

pôde ser observado a cromatografia removeu eficientemente a Con-A dos extratos, gerando uma fração que será analisada separadamente.

A estratégia adotada para a próxima etapa foi a de remover a canavalina por métodos imunológicos, a partir da fração não retida da cromatografia em Sephadex G100. Para isso, um anticorpo policlonal foi desenvolvido e caracterizado para os experimentos (Figuras 15-18 e Tabela 4). Na primeira tentativa de remoção da canavalina dos extratos, através da imunoprecipitação com o uso da Protein-A Agarose, o rendimento não foi satisfatório. Ao analisar os extratos por SDS-PAGE, foi possível verificar uma banda na região entre 45 e 50 kDa, mas nessa região estão as massas tanto da cadeia pesada da IgG, quanto da canavalina, e como a eluição do material continha DTT, ficou a dúvida se estava sendo eluída apenas a canavalina, esta mais a IgG, ou apenas a IgG. A fim de verificar esta questão realizou-se um *Western blot*, verificando-se que a IgG tem suas pontes dissulfeto rompidas com 10 mM de DTT, mas ainda restava dúvidas se a canavalina também estava sendo eluída. Para sanar as dúvidas, as bandas eluídas neste ensaio foram analisadas por espectrometria de massas, o que confirmou que, além de o anticorpo estar retendo a canavalina, estava ocorrendo co-eluição da IgG ligada à resina. Ambas as proteínas foram identificadas com alta confiabilidade, cobertura e contagens (Tabela 5). Interessantemente, a subunidade menor da RuBisCO parece interagir de alguma maneira com a canavalina, ou com o anticorpo analisado. Recentemente, Demartini e colaboradores demonstraram a forte interação entre o anticorpo antiurease (anti-JBU) e proteínas de plastídeos, com altas contagens espectrais e coberturas de sequências para as proteínas imunoprecipitadas (DEMARTINI et al., 2011). Sabe-se que anticorpos anticavalina, concavalina A e mesmo antiurease promovem reação cruzada entre os seus antígenos, dependendo da titulação utilizada (CARLINI et al., 1988). Desta forma é possível que haja uma interação ainda não conhecida com uma destas três proteínas com proteínas de plastídeos.

A partir destes dados, constatou-se que o poder antigênico do anticorpo pode não ser o suficiente para a interação e outro problema é que a quantidade de canavalina nas sementes é extremamente alta, requerendo altas quantidades de anticorpo para os ensaios.

Optou-se por uma segunda estratégia com relação a retirada da canavalina, adsorvendo-se o anticorpo à resina Proteína G Sepharose, e em seguida passando-se o extrato pela resina contendo o anticorpo retido. Desta forma, a idéia foi uma eluição branda

do antígeno ligado ao anticorpo, sem desligar o anticorpo da resina. Conforme mostrado na figura 21, a estratégia atingiu seu objetivo, mas novamente, esbarrou-se na altíssima quantidade de canavalina nos extratos. O problema ainda foi agravado pelo fato de que a massa da cadeia pesada possui 50 kDa, e a canavalina 48 kDa (TZU-PING KO et al., 1993), sendo muito difícil a separação em uma eletroforese convencional 1D ou em uma cromatografia de gel filtração.

Apesar disso, optou-se por não fazer o experimento de imunoprecipitação, pois o custo-benefício não estava sendo satisfatório, provavelmente devido às altas taxas de canavalina nos extratos.

A próxima etapa foi o pré-fracionamento dos extratos obtidos para fins de espectrometria de massas. A idéia inicial foi uma cromatografia bidimensional, onde a primeira dimensão foi uma troca catiônica forte e a segunda seria uma cromatografia de fase reversa, de cada fração eluída da troca catiônica. Diferentes sais para a eluição foram avaliados (cloreto de sódio e o acetato de amônio, figura 23, acetato de amônio somente). Os peptídeos parecem não terem sido retidos eficientemente na resina de troca catiônica. Isto pode ocorrer por diversas razões: mesmo em condições ácidas, os peptídeos em solução estão modificados de alguma forma que interferem na cromatografia (fosfatados, por exemplo). As condições de equilíbrio avaliadas não foram eficientes para o material em questão; a quantidade aplicada foi muito baixa, limitando a detecção; peptídeos podem ter ficado aderidos aos microtubos de centrífuga.

Como última etapa de fracionamento, partiu-se direto para a cromatografia de fase reversa tradicional, com eluição em gradiente contínuo de acetonitrila. Esta cromatografia foi realizada imediatamente antes do término da realização deste trabalho, e no momento, as corridas no espectrômetro de massas estão sendo realizadas.

6 CONCLUSÕES

As principais conclusões resultantes do trabalho realizado até o momento, são:

- verificou-se que as extrações com Tris/Fenol não foram adequadas para os fins almejados;
- proteínas de reserva na planta tem períodos de maior e menor expressão no decorrer do desenvolvimento das sementes;

- as estratégias adotadas até o momento são promissoras como técnicas de pré-fracionamento. O impedimento maior parece ser a altíssima quantidade de canavalina nos extratos, o que dificultou as etapas de imunoprecipitação planejadas;
- o fracionamento inicial avaliado parece não ter sido adequado, visto que, análises iniciais no espectrômetro de massa mostram a identificação de diversas proteínas, mas com pouca cobertura e baixos escores (dados em processamento).

Como perspectivas futuras para a continuidade deste trabalho tem-se:

- continuidade da otimização do processo de pré-fracionamento, com o uso de cromatografia de troca catiônica forte, seguida de fase reversa. O sistema utilizado será o AllianceBio (Waters), cromatografia bidimensional on line;
- alteração das condições cromatográficas a tal ponto que não seja necessária a etapa de pré-fracionamento para a canavalina.

Os resultados apresentados neste trabalho contribuirão futuramente nos estudos sobre a biologia da *Canavalia ensiformis*, uma vez que obtivemos dados importantes para a otimização das etapas para extração das proteínas abundantes, e condições para as cromatografias de pré-fracionamento das amostras a serem analisadas por espectrometria de massas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS ABUL K. & LICHTMAN ANDREW H. *Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system*. Second. 2004.
2. ABBOTT, A. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature*, 402, 6763, 715-20, Dec.1999.
3. AEBERSOLD, R. & MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422, 6928, 198-207, Mar.2003.
4. ALVES, E. W.; FERREIRA, A. T. D.; FERREIRA, C. T. D.; CARLINI, C. R. Effects of Canatoxin on the Ca²⁺ Atpase of Sarcoplasmic-Reticulum Membranes. *Toxicon*, 30, 11, 1411-8, Nov.1992.
5. BALASUBRAMANIAN, A & PONNURAJ, K. Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from its First Crystal to Molecular Structure. *Journal of Molecular Biology*, 400, 3, 274-83, July2010.
6. BARCELLOS, G. B. S.; ALMEIDA, L. M.; MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S.; DEOLIVEIRA, J. T. A.; CARLINI, C. R. Canatoxin-Cross-Reactive, Concanavalin-A-Cross-Reactive and Canavalin-Cross-Reactive Materials During Maturation of *Canavalia-Brasiliensis* (Mart) Seeds. *Planta*, 189, 3, 397-402, Mar.1993.
7. BARJAFIDALGO, C.; GUIMARAES, J. A.; CARLINI, C. R. Canatoxin, A Plant Protein, Induces Insulin Release from Isolated Pancreatic-Islets. *Endocrinology*, 128, 2, 675-9, Feb.1991a.
8. BARJAFIDALGO, C.; GUIMARAES, J. A.; CARLINI, C. R. Lipoxygenase-Mediated Secretory Effect of Canatoxin, the Toxic Protein from *Canavalia Ensiformis* Seeds. *Toxicon*, 29, 4-5, 453-9, 1991b.
9. 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. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon*, 50, 7, 971-83, Dec.2007.
10. BEWLY J.D. & BLACK M. *Seeds, Physiology of Development and Germination*. 2 ° Ed. New York: Plenum Press, 1986.
11. BLACKSTOCK, W. P. & WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology*, 17, 3, 121-7, Mar.1999.

12. BOLLAG D.M.; ROZYCKI M.D.; EDELSTEIN S.J. *Protein Methods*. 2° Ed. United States of America: 1996.
13. BRADFORD, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 1-2, 248-54, 1976.
14. BYNOE, M. S.; VIRET, C.; FLAVELL, R. A.; JANEWAY, C. A. T cells from epicutaneously immunized mice are prone to T cell receptor revision. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 8, 2898-903, Feb.2005.
15. CARLINI, C. R.; BARCELLOS, G. B. S.; BAETANEVES, A. D. V.; GUIMARAES, J. A. Immunoreactivity for Canatoxin and Concanavalin-A Among Proteins of Leguminous Seeds. *Phytochemistry*, 27, 1, 25-30, 1988.
16. CARLINI, C. R.; GOMES, C.; GUIMARAES, J. A.; MARKUS, R. P.; SATO, H.; TROLIN, G. Central Nervous Effects of the Convulsant Protein Canatoxin. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 54, 3, 161-6, 1984.
17. CARLINI, C. R. & GROSSI-DE-SA, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40, 11, 1515-39, Nov.2002.
18. CARLINI, C. R. & GUIMARAES, J. A. Isolation and Characterization of A Toxic Protein from *Canavalia Ensiformis* (Jack Bean) Seeds, Distinct from Concanavalin-A. *Toxicon*, 19, 5, 667-&, 1981.
19. CARLINI, C. R.; GUIMARAES, J. A.; RIBEIRO, J. M. C. Platelet-Release Reaction and Aggregation Induced by Canatoxin, A Convulsant Protein - Evidence for the Involvement of the Platelet Lipoxygenase Pathway. *British Journal of Pharmacology*, 84, 2, 551-60, 1985.
20. CARLINI, C. R.; OLIVEIRA, A. E. A.; AZAMBUJA, P.; XAVIER, J.; WELLS, M. A. Biological effects of canatoxin in different insect models: Evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *Journal of Economic Entomology*, 90, 2, 340-8, Apr.1997.
21. CARLINI, C. R. & POLACCO, J. C. Toxic properties of urease. *Crop Science*, 48, 5, 1665-72, Sept.2008.
22. CHEN, H. W.; WORTMANN, A.; ZENOBI, R. Neutral desorption sampling coupled to extractive electrospray ionization mass spectrometry for rapid differentiation of bilosamples by metabolomic fingerprinting. *Journal of Mass Spectrometry*, 42, 9, 1123-35, Sept.2007.

23. DELAHUNTY, C. & YATES, J. R. Protein identification using 2D-LC-MS/MS. *Methods*, 35, 3, 248-55, Mar.2005.
24. DEMARTINI, D. R. Endopeptidases da *Canavalia ensiformis*: Um estudo da germinação e estágios iniciais da planta. 2007.
25. DEMARTINI, D. R.; CARLINI, C. R.; THELEN, J. J. Global and targeted proteomics in developing jack bean (*Canavalia ensiformis*) seedlings: an investigation of urease isoforms mobilization in early stages of development. *Plant Molecular Biology*, 75, 1-2, 53-65, Jan.2011.
26. DEMARTINI, D. R.; WLODAWER, A.; CARLINI, C. R. A comparative study of the expression of serine proteinases in quiescent seeds and in developing *Canavalia ensiformis* plants. *Journal of Experimental Botany*, 58, 3, 521-32, Feb.2007.
27. FALSONE, S. F.; GESSLBAUER, B.; KUNGL, A. J. Coimmunoprecipitation and proteomic analyses. *Methods in Molecular Biology*, 439, 291-308, 2008.
28. FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*, 246, 4926, 64-71, Oct.1989.
29. FERREIRA-DASILVA, C. T.; GOMBAROVITS, M. E. C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, C. M.; CARLINI, C. R. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect Cathepsin-like enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44, 4, 162-71, Aug.2000.
30. FOLLMER, C.; BARCELLOS, G. B. S.; ZINGALI, R. B.; MACHADO, O. L. T.; ALVES, E. W.; BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARAES, J. A.; CARLINI, C. R. 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, 217-24, Nov.2001.
31. FOLLMER, C. & CARLINI, C. R. Effect of chemical modification of histidines on the copper-induced oligomerization of jack bean urease (EC 3.5.1.5). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 435, 1, 15-20, Mar.2005.
32. FOLLMER, C.; REAL-GUERRA, R.; WASSERMAN, G. E.; OLIVERA-SEVERO, D.; CARLINI, C. R. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases - Biological effects unrelated to ureolytic activity. *European Journal of Biochemistry*, 271, 7, 1357-63, Apr.2004a.
33. FOLLMER, C.; WASSERMANN, G. E.; CARLINI, C. R. Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Science*, 167, 2, 241-6, Aug.2004b.

34. GERSHKOVICH, A. & KHOLODOVYCH, V. V. Fluorogenic substrates for proteases based on intramolecular fluorescence energy transfer (IFETS). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 33, 3, 135-62, Dec.1996.
35. GHAZALEH, F. A.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; GOMBAROVITS, M. E. C.; CARLINI, C. R. Stimulation of calcium influx and platelet activation by canatoxin: Methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339, 2, 362-7, Mar.1997.
36. GILAR, M.; OLIVOVA, P.; DALY, A. E.; GEBLER, J. C. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. *Journal of Separation Science*, 28, 14, 1694-703, Sept.2005.
37. GLASEL, J. A. Validity of Nucleic-Acid Purities Monitored by 260Nm 280Nm Absorbency Ratios. *Biotechniques*, 18, 1, 62-3, Jan.1995.
38. GRASSIKASSISSE, D. M. & RIBEIRODASILVA, G. Canatoxin Triggers Histamine-Secretion from Rat Peritoneal Mast-Cells. *Agents and Actions*, 37, 3-4, 204-9, Nov.1992.
39. GRUIS, D.; SELINGER, D. A.; CURRAN, J. M.; JUNG, R. 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, 11, 2863-82, Nov.2002.
40. GUSTAVO SOUZA. Curso de Espectrometria de Massas para Proteínas. Apostila, 2011.
41. HA, N. C.; OH, S. T.; SUNG, J. Y.; CHA, K. A.; LEE, M. H.; OH, B. H. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature Structural Biology*, 8, 6, 505-9, June2001.
42. HENDERSON, S. C.; VALENTINE, S. J.; COUNTERMAN, A. E.; CLEMMER, D. E. ESI/ion trap/ion mobility/time-of-flight mass spectrometry for rapid and sensitive analysis of biomolecular mixtures. *Analytical Chemistry*, 71, 2, 291-301, Jan.1999.
43. HIRAIWA, N.; KONDO, M.; NISHIMURA, M.; HARANISHIMURA, I. An aspartic endopeptidase is involved in the breakdown of propeptides of storage proteins in protein-storage vacuoles of plants. *European Journal of Biochemistry*, 246, 1, 133-41, May1997.
44. JAFARI, M. T.; REZAEI, B.; JAVAHERI, M. A new method based on electrospray ionisation ion mobility spectrometry (ESI-IMS) for simultaneous

determination of caffeine and theophylline. *Food Chemistry*, 126, 4, 1964-70, June2011.

45. JIANG, L. W.; PHILLIPS, T. E.; HAMM, C. A.; DROZDOWICZ, Y. M.; REA, P. A.; MAESHIMA, M.; ROGERS, S. W.; ROGERS, J. C. The protein storage vacuole: a unique compound organelle. *Journal of Cell Biology*, 155, 6, 991-1002, Dec.2001.
46. JOUBERT, R.; BRIGNON, P.; LEHMANN, C.; MONRIBOT, C.; GENDRE, F.; BOUCHERIE, H. Two-dimensional gel analysis of the proteome of lager brewing yeasts. *Yeast*, 16, 6, 511-22, Apr.2000.
47. JULIANO, L.; CHAGAS, J. R.; HIRATA, I. Y.; CARMONA, E.; SUCUPIRA, M.; OLIVEIRA, E. S.; OLIVEIRA, E. B.; CAMARGO, A. C. M. A Selective Assay for Endooligopeptidase A Based on the Cleavage of Fluorogenic Substrate Structurally Related to Enkephalin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173, 2, 647-52, Dec.1990.
48. KAPLAN, K.; DWIVEDI, P.; DAVIDSON, S.; YANG, Q.; TSO, P.; SIEMS, W.; HILL, H. H. Monitoring Dynamic Changes in Lymph Metabolome of Fasting and Fed Rats by Electrospray Ionization-Ion Mobility Mass Spectrometry (ESI-IMMS). *Analytical Chemistry*, 81, 19, 7944-53, Oct.2009.
49. KROEGFELT.A.P.; LEHOURS P.; MÉGRAUD F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter - Supplement*, 10, 5-13, 2005.
50. KUMAR, P.; SREERAMA, Y. N.; GOWDA, L. R. Formation of Bowman-Birk inhibitors during the germination of horsegram (*Dolichos biflorus*). *Phytochemistry*, 60, 6, 581-8, July2002.
51. LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 227, 5259, 680-&, 1970.
52. LEENAARS, M. & HENDRIKSEN, C. F. M. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies evaluation and recommendations. *Ilar Journal*, 46, 3, 269-79, 2005.
53. LEHNINGER A.L.; NELSON D.L.; COX M.M. *Principles of Biochemmistry*. 4^o Ed. Servier, 2006.
54. LOPEZ, M. F. Proteome analysis I. Gene products are where the biological action is. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 722, 1-2, 191-202, Feb.1999.

55. LOTTSPREICH, F. Proteome analysis: A pathway to the functional analysis of proteins. *Angewandte Chemie-International Edition*, 38, 17, 2477-92, 1999.
56. MACCHIONE E.L.A.; KOIDE K.; HIRATA J.H.; LENZI B.R.; PEREIRA J.A.M.; SALEM VASCONCELOS S.; DIETZSCH O. Um espectrômetro de massas por tempo de vó com reflectron. *Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo*, 24, 1, 31-5, 2005.
57. MANN, M.; MENG, C. K.; FENN, J. B. Interpreting Mass-Spectra of Multiply Charged Ions. *Analytical Chemistry*, 61, 15, 1702-8, Aug.1989.
58. MAYNARD, D. M.; MASUDA, J.; YANG, X. Y.; KOWALAK, J. A.; MARKEY, S. P. Characterizing complex peptide mixtures using a multi-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry system: *Saccharomyces cerevisiae* as a model system. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 810, 1, 69-76, Oct.2004.
59. MOBLEY, H. L. T.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular-Biology of Microbial Ureases. *Microbiological Reviews*, 59, 3, 451-80, Sept.1995.
60. MORAES, M. C. B. & DO LAGO, C. L. Electrospray ionization mass spectrometry applied to study inorganic and organo-metallic species. *Quimica Nova*, 26, 4, 556-63, July2003.
61. MUNTZ, K.; BELOZERSKY, M. A.; DUNAIEVSKY, Y. E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*, 52, 362, 1741-52, Sept.2001.
62. NASCIMENTO-SILVA, M. C. L.; LEAL, A. T.; DAFFRE, S.; JULIANO, L.; VAZ, I. D.; PAIVA-SILVA, G. D.; OLIVEIRA, P. L.; SORGINE, M. H. F. BYC, an atypical aspartic endopeptidase from *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus eggs. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 149, 4, 599-607, Apr.2008.
63. OFARRELL, P. H. Citation Classic - High-Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *Current Contents/Life Sciences*, 51, 18, 1982.
64. OLIVEIRA, A. E. A.; SALES, M. P.; MACHADO, O. L. T.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER, J. The toxicity of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) cotyledon and seed coat proteins to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 92, 3, 249-55, Sept.1999.
65. PENG, J. M.; ELIAS, J. E.; THOREEN, C. C.; LICKLIDER, L. J.; GYGI, S. P. Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass

spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: The yeast proteome. *Journal of Proteome Research*, 2, 1, 43-50, Jan.2003.

66. PIMENTA, D. C.; OLIVEIRA, A.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. Substrate specificity of human cathepsin D using internally quenched fluorescent peptides derived from reactive site loop of kallistatin. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1544, 1-2, 113-22, Jan.2001.
67. PIOVESAN, A. R.; STANISCUASKI, F.; MARCO-SALVADORI, J.; REAL-GUERRA, R.; DEFFERRARI, M. S.; CARLINI, C. R. Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: Role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 11, 1023-32, Nov.2008.
68. POLACCO, J. C. & HOLLAND, M. A. Roles of Urease in Plant-Cells. *International Review of Cytology - A Survey of Cell Biology, Vol 145*, 145, 65-103, 1993.
69. PORTER, R. R. Hydrolysis of Rabbit Gamma-Globulin and Antibodies with Crystalline Papain. *Biochemical Journal*, 73, 119-26, 1959.
70. PORTER, R. R. Structure of Antibodies. *Scientific American*, 217, 4, 81-&, 1967.
71. PORTER, R. R. & PRESS, E. M. Immunochemistry. *Annual Review of Biochemistry*, 31, 625-&, 1962.
72. RAO, R. N.; VALI, R. M.; SHINDE, D. D. On-line 2D-LC-ESI/MS/MS determination of rifaximin in rat serum. *Biomedical Chromatography*, 23, 11, 1145-50, Nov.2009.
73. REEKE JR.; BECKER G.N.; CUNNINGHEM B.A.; WANG J.L.; YAHARA I.; EDELMAR G.M. Structure and function of concanavalin A. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 55, 13-33, 2011.
74. SCHERNTHANER, J. P.; FABIJANSKI, S. F.; ARNISON, P. G.; RACICOT, M.; ROBERT, L. S. 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, 11, 6855-9, May2003.
75. SIRKO, A. & BRODZIK, R. Plant ureases: Roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica*, 47, 4, 1189-95, 2000.
76. STANISCUASKI, F.; FERREIRA-DASILVA, C. T.; MULINARI, F.; PIRES-ALVES, M.; CARLINI, C. R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton

stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera : Pyrrhocoridae). *Toxicon*, 45, 6, 753-60, May2005.

77. SUMNER, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *The Journal of Biological Chemistry*, 69, 435-41, 1926.
78. SUMNER, J. B. & HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the Jack Bean with concanavalin A. *Journal of Bacteriology*, 32, 227-37, 1936.
79. SUTOH, K.; KATO, H.; MINAMIKAWA, T. Identification and possible roles of three types of endopeptidase from germinated wheat seeds. *Journal of Biochemistry*, 126, 4, 700-7, Oct.1999.
80. TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T.; MATSUO, T. Protein and polymer analysis up to m/z 100,00 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2, 151-3, 1988.
81. TERRA, W. R. & FERREIRA, C. Insect Digestive Enzymes - Properties, Compartmentalization and Function. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 109, 1, 1-62, Sept.1994.
82. TIEDEMANN, J.; SCHLERETH, A.; MUNTZ, K. 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, 5-6, 728-38, Apr.2001.
83. TOUGH, D. F. & SPRENT, J. *Immunologic memory, in fundamental immunology*. 5thEd. Philadelphia: 2003.
84. TZU-PING KO; JOSEPH D.N.; MCPHERSON A. The Three-Dimensional Structure of Conavalin from Jack Bean (*Canavalia ensiformis*). *Plant Physiology*, 101, 729-44, 1993.
85. UDEDIBIE, A. B. I. & CARLINI, C. R. Questions and answers to edibility problem of the *Canavalia ensiformis* seeds - A review. *Animal Feed Science and Technology*, 74, 2, 95-106, Aug.1998.
86. VOET, D. & VOET, J. G. *Bioquímica*. 3^o Ed. Artmed, 2006.
87. ZERNER, B. Recent Advances in the Chemistry of An Old Enzyme, Urease. *Bioorganic Chemistry*, 19, 1, 116-31, Mar.1991.
88. ZHANG, J. A.; LANHAM, K. A.; PETERSON, R. E.; HEIDEMAN, W.; LI, L. J. Characterization of the adult zebrafish cardiac proteome using online pH gradient strong cation exchange-RP 2D LC coupled with ESI MS/MS. *Journal of Separation Science*, 33, 10, 1462-71, May2010.

89. [ANON]. Identification of associated proteins by coimmunoprecipitation. *Nature Methods*, 2, 6, 475-6, June2005.