

024

EVOLUÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DURANTE A GERMINAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA PROTEASE ÁCIDA INSENSÍVEL À PEPSTATINA-A, EM SEMENTES DE CANAVALLIA ENSIFORMIS. UMA NOVA CLASSE DE ENZIMAS ATÉ ENTÃO NÃO DESCRITA EM SEMENTES. Ticiane Fettermann de Oliveira, Diogo Ribeiro Demartini, Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini (orient.) (Biofísica, Instituto de Biociências, UFRGS).

As sementes da leguminosa *Canavalia ensiformis*, popularmente conhecida por “feijão-de-porco” contém a canatoxina, uma proteína inseticida, e são ricas em proteases acídicas, que podem estar envolvidas na mobilização desta proteína e formação de seus peptídeos entomotóxicos. A evolução temporal desse processo durante a germinação das sementes foi analisada neste estudo, através de medidas da atividade proteolítica de sementes quiescentes e germinadas durante 1, 3 e 4 dias. Extratos das sementes (em NaPB 10mM pH 6.0) foram preparados para análises. A mobilização da canatoxina ao longo da germinação foi analisada verificando a presença da proteína e fragmentos nos extratos por dot blot e Western blot, usando anticorpos policlonais anti-canatoxina. Os extratos também foram ensaiados para a atividade proteolítica sobre o substrato fluorogênico Abz-AIAFFSQR-EDDnp (20uM) em pH 3.0, na ausência e na presença de diferentes inibidores enzimáticos. Os extratos de sementes quiescentes, 1, 3 e 4 dias de germinação foram submetidos à cromatografia de troca iônica em resina CM-Sepharose. Com o extrato de 3 dias, foi possível observar a presença de uma atividade em pH 3.0, sobre o substrato fluorogênico, no material não retido, e que não foi mais inibido pela Pepstatina-A(20uM), mas sim pela tirostatina (20nM), inibidor de serino-carboxil proteases. A atividade recuperada no material não retido foi submetida a uma cromatografia de gel filtração em coluna Superdex 75 HR 10/30, que resultou em um único pico de atividade com massa molecular estimada em 32 kDa, não sendo inibido pela pepstatina-A, mas inibido pela tirostatina. Observamos que a canatoxina é preservada até o 3o dia de germinação, contrastando com o restante das proteínas da semente. Nossos dados indicam a presença de uma serino-carboxil protease uma classe de enzimas até então não descrita em vegetais, provavelmente presentes em sementes germinantes de *Canavalia ensiformis*. Os dados sugerem que essa enzima participa da mobilização de proteínas de reserva da semente, como da canatoxina. CAPES, CNPq, FAPERGS e PRONEX.