SECRETÁRIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

Instituto de Biologia

CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA ASPARAGINASE DE SEMENTE IMATURA DE ERVILHA (*PISUM SATIVUM* L.)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Liliane Ramos Chaga e aprovada pela Comissão Julgadora.
07/08/97

CAMPINAS – SP

1997

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE IBC
N.º CHAMADA:
T/Unicamp
C346c
V. Ex.
TOMBO BC/ 30377
PROC. 281/97
C D
PREÇO R$ 11,00
DATA 22/05/97
N.º CPD

CM-00098086-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Chagas, Eliana Pereira

C346c Caracterizacão e purificacão da enzima asparaginase de semente imatura de ervilha (Pisum sativum L.). -- Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador: Ladaslav Sodek.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Asparaginase. 2. Ervilha - Semente. 3. Enzimas - Purificacão. 4. Imunoglobulinas. I. Sodek, Ladaslav. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

ELIANA PEREIRA CHAGAS

CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA ASPARAGINASE DE SEMENTE IMATURA DE ERVILHA (*PISUM SATIVUM* L.)

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ladaslav Sodek

Universidade Estadual de Campinas
Campinas - SP

1997

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

LOCAL E DATA:

Campinas, 07 de março de 1997.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. LADASLAV SODEK _____
assinatura

Prof. Dr. PAULO MAZAFFERA _____
assinatura

Prof. Dr. JORGE VEGA _____
assinatura

Prof. Dr. LUIZ GONZAGA SANTORO _____
assinatura

Prof. Dr. HIROSHI AOYAMA _____
assinatura

SUPLENTES:

Prof. Dr. ANTÔNIO C. N. MAGALHÃES _____
assinatura

Prof. Dra. MARLENE SCHIAVINATTO _____
assinatura

Ao meu Pedro

Aos meus pais, Aécio e Irene

Aos meus irmãos e à toda a minha família

"Penso, logo existo".

René Descartes (1596-1650)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço ao Prof. Ladaslav Sodek pela oportunidade, orientação e auxílio neste trabalho e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Gostaria de agradecer também ao Prof. Santoro por ter tirado as fotografias aqui apresentadas e aos demais professores da pré-banca pelas sugestões e críticas; à Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas, pelo fornecimento das sementes de ervilha; ao CPQBA por ter emprestado e cuidado dos coelhos na produção dos anticorpos e ao Departamento de Bioquímica pela utilização de equipamentos de laboratório.

Agradeço também ao Leandro que me ensinou pequenos grandes "truques" para se trabalhar com a asparaginase.

Agradeço enormemente aos meus amigos e grandes companheiros de todos os dias: Angela, Salete, Kátia, Marluci, Cláudinha, Giulio, Elenira, Marcos, Jurandi, Julieta, Rommel, Mário, Cristininha, Sandra, Suzana, Dirce, Ana Paula e Andréa, pela força, apoio, compreensão, alegrias e risadas e pelo que há de maravilhoso em cada um deles: *a amizade.*

E especialmente agradeço aos meus pais pelas sugestões, estímulo e paciência, pelo amor e tudo aquilo que me ensinaram pra toda vida.

E ao meu maridão Pedro, "por tudo".

Gente, Obrigada! Valeu!

Índice

Abreviaturas viii

Resumo x

Summary xi

Introdução 1

Objetivos 13

Material e Métodos 14

Material 14

Métodos 14

Extração da ASNase 14

Ensaio Enzimático 15

Ensaio Semi-Quantitativo 17

Teste de Dependência ao Íon K^+ 17

Atividade da ASNase em Presença de Ca^{2+} 18

Purificação da ASNase 19

HPEC - Cromatografia Eletroforética de Alta Eficiência 21
Sephacryl S-200 22
Sistema de FPLC - Mono-Q 23
Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 24
Não-desnaturante 24
Desnaturante 25
Preparo das Amostras 26
TLC - Cromatografia de Camada Delgada 27
Cinética Enzimática 28
Focalização Isoelétrica 29
Dosagem de Proteínas 29
Produção de Anticorpos 30
Imunização de Animais 30
Reação de ELISA 30
Purificação de Imunoglobulinas 33
Eletrotransferência de Proteínas 34
Membrana de Nitrocelulose e Reação com o Anticorpo 34
Imunoensaio com Anticorpo Retirado da Membrana de Nitrocelulose . 36

Resultados **38**

Atividade Enzimática da ASNase e a Influência dos Íons K^+ e Ca^{2+} 38
Purificação da ASNase 42
Caracterização Eletroforética 46

Focalização Isoelétrica 53
Cinética Enzimática 57
Reações Imunoquímicas 59
Eletrotransferência de Proteínas e Reações com Anticorpo 59

Discussão **69**

Dependência ao Íon K^+ 69
Influência do Íon Ca^{2+} 71
Atividade Enzimática e Purificação da ASNase 74
Caracterização Eletroforética 75
Focalização Isoelétrica 77
Cinética Enzimática 78
Reações Imunoquímicas 80
Considerações Finais 85

Conclusões **87**

Referências **88**

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucléico
ARN	Ácido ribonucléico
ASNase	L-Asparaginase
BCIP	Bromo-cloro-indolil fosfato
BSA	Bovine sorum albumin
	Albumina de soro bovino
CAPS	Ácido 1-propanosulfônico-3-ciclohexilamino
DTT	Ditiotreitol
EB	Extrato bruto
EGTA	Ácido etileno glicol-bis(β-aminoetil éter) N-N-N'-N'-tetracético
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
	Ensaio de imunoadsorção com enzima conjugada
GAD	Glutamato decarboxilase
GDH	Glutamato desidrogenase
GOGAT	Glutamina oxoglutarato amida transferase ou
	Glutamato sintase
GS	Glutamina sintetase
FPLC	Fast performance liquid chromatography
	Cromatografia liquida de rápida resolução
HPEC	High performance electrophoresis chromatography
	Cromatografia eletroforética de alta eficiência
HPLC	High performance liquid chromatography
	Cromatografia líquida de alta eficiência
NBT	Nitroblue tetrazólio
	Azul de nitrotetrazólio
OPD	*o*-Fenil-N-diamina-dihidrocloreto

PBS	Phosphate buffer saline
	Tampão fosfato salino
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoreto
PVDF	Membrana de diofluorito polivinilideno
SDS	Sodium dodecyl sulfate
	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante com SDS
TBS	Tris buffer sodium
	Tampão tris sódio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina
TLC	Thin-layer chromatography
	Cromatografia de camada delgada
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano

Resumo

A asparaginase (ASNase-EC 3.5.1.1.) de semente imatura de ervilha (*Pisum sativum* L.) var. Bolero foi purificada e caracterizada.

A ASNase foi dependente de K^+ para sua ativação e a presença de íons Ca^{2+} nos tampões de extração e purificaçcão permitiu uma maior recuperação da atividade da enzima. O Ca^{2+} pode auxiliar na manutenção da estrutura ativa da enzima. A ASNase apresentou duas isoformas, eluídas separadamente em cromatografia de exclusão. A primeira de 200.000 g/mol com atividade mais baixa e a segunda, com 69.000 g/mol, com a maior atividade, sendo portanto, a principal forma da enzima. A ASNase apresentou *pI* de 4,5 a 5 e K_m de 2,4 mM para Asn. A enzima foi inibida competitivamente por Gly e Asp, e os resultados indicaram que o Asp seria liberado na reação após o NH_4^+. Através das reações imunológicas, foi observado que anticorpo produzido contra a ASNase de semente de ervilha reconheceu bandas na mesma posição que a ASNase de ervilha em extratos de sementes de outras espécies: *Crotalaria juncea, C. paulina* (ambas dependentes de K^+) e *C. zanzibarica* (independente). A ASNase de ervilha também apresentou reação cruzada com anticorpos produzidos contra ASNase de *C. juncea* e *Lupinus polyphyllus* (independente de K^+), sugerindo alguma homologia entre as moléculas, e também que a parte da molécula que determina dependência ao K^+ não coincide com aquela reconhecida pelo anticorpo.

Summary

Asparaginase (ASNase-EC 3.5.1.1) from immature seed of *Pisum sativum* L. cv. Bolero was characterized and purified.

ASNase from pea seed was dependent upon the presence of K^+ for activity and the presence of Ca^{2+} in the extraction buffers pertmitted a higher recovery of activity. The Ca^{2+} ions could assist the active ASNase structure. The enzyme showed two active isoforms, eluted separately from exclusion chromatography. The first isoform (200.000 g/mol) presented lower activity and the second (69.000 g/mol) with the highest activity, was the main form. This enzyme showed a *pI* near to 4,5-5 and a K_m of 2,4 mM for Asn. Gly and Asp were competitive inhibitors of the enzyme. Asp would appear to be released from the enzyme after NH_4^+. Western blot analysis demonstrated the presence of bands coinciding with the ASNase from pea seed in seed extract from other species: *Crotalaria juncea, Crotalaria paulina* (K^+-dependent) and *Crotalaria zanzibarica* (K^+-independent). ASNase from pea seed showed a cross-reaction with antibodies against ASNase from *Crotalaria juncea* and *Lupinus polyphyllus* (K^+-independent), suggesting a similarity between the enzymes, and that the part of the molecule involved in the K^+ dependency is not coincident with that recognized by the antibody.

Introdução

A família Leguminosae (Papilionoideae) compreende mais de 600 gêneros que reúnem mais de 13.000 espécies espalhadas em todo mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. São bastante utilizadas sob diferentes aspectos: madeiras, forrageiras, resinas, substâncias farmacológicas e principalmente na alimentação, já que são ricas em proteínas, óleos e carbohidratos [JOLY, 1991].

As leguminosas são bastante estudadas quanto ao metabolismo de N (nitrogênio), principalmente, devido à capacidade que apresentam de fixar N_2 atmosférico. O N é o nutriente mais limitante para o crescimento vegetal, principalmente na agricultura [MENGEL & KIRKBY, 1979].

As plantas absorvem N do solo na forma inorgânica, como NO_3^- ou NH_4^+. Na ausência de uma provisão adequada de N no solo, algumas leguminosas podem formar associações simbióticas com organismos procariotos especializados (*Rhizobium*) que fixam o N_2 atmosférico e podem fornecê-lo à planta sob forma de $NH_4{}^+$. Através desta simbiose, quando ocorre a formação de um nódulo, a planta pode obter quase todo o N utilizado no seu desenvolvimento. Em troca, a planta fornece ao microrganismo fotoassimilados que vão garantir seu crescimento e o funcionamento do nódulo formado. Todo o metabolismo do N na planta é separado espacialmente dentro da célula e, desta forma, pode-se controlar o sistema de utilização de reservas [SCHUBERT, 1986, ANDERSON & BEARDALL, 1991].

O NH_4^+ é o primeiro produto estável da fixação de N_2. O NH_4^+ é excretado pela bactéria no citoplasma da célula hospedeira, onde é assimilado pelas atividades combinadas das enzimas GS e GOGAT. O NH_4^+ é primeiro incorporado como amina

pelo Glu, que se transforma em Gln e depois, é transferido para o carbono-2 do oxoglutarato (um cetoácido, produto da fragmentação de carboidratos). Através destas reações, são produzidas duas moléculas de Glu, que podem ser utilizadas na formação de aminoácidos (via transaminação), na síntese de proteínas ou na formação de outras moléculas que carregam N na sua estrutura [SCHUBERT, 1986].

Uma vez que o N é um nutriente móvel, ele é translocado das raízes via xilema simultâneamente como NO_3^- e N orgânico para diversas partes da planta, inclusive pode mover-se a partir de órgãos senescentes para regiões em desenvolvimento [ATKINS *et al*, 1983, HUPPE & TURPIN, 1994].

A maioria dos aminoácidos que chega do xilema (principalmente as amidas Asn e Gln) proveniente da raiz, pode ser transferida diretamente para o floema ou então, atingem folhas maduras sendo reexportados pelo floema. Desse modo, estes compostos contribuirão com o requerimento de N de folhas em desenvolvimento, ápices vegetativos, estruturas em frutificação, sementes imaturas e outros drenos de N. Porém, como estes drenos representam áreas de superfícies pequenas, ainda com baixas taxas de transpiração, dependerão principalmente do N transportado via floema, sendo a Asn responsável por 40-50% de todos os aminoácidos que chegam nestes locais. Assim sendo, o floema é a principal via de fornecimento de N [ATKINS *et al*, 1975, URQUHART & JOY, 1982].

Ao atingir o dreno, o N é metabolizado pela ação de várias enzimas e os produtos utilizados na síntese de outros compostos, ou podem ser ainda armazenados por um tempo mais longo, geralmente na forma de proteínas. Após este período mais longo, o N tem que ser mobilizado para ser novamente reutilizado [MIFLIN & LEA, 1977, SCHUBERT, 1986]. No caso da semente ainda imatura, os solutos são transportados através do tegumento da semente para alimentar o embrião. Conforme ocorre o amadurecimento da semente, o embrião adquire a capacidade de metabolizar certos compostos [SCHUBERT, 1986].

As plantas utilizam um número limitado de compostos transportadores de N, e dependendo da espécie, este transporte do N orgânico pode ser feito na forma de ureídeos (alantoína e ácido alantóico), na forma de amidas (Asn, Arg, Gln), citru-

lina e, mais raramente, 4-metilenoglutamina, ou seja, substâncias que praticamente não sofrem interconversão metabólica nos vasos condutores. Ureídeos ou amidas fornecem todos os requerimentos de N aos drenos para síntese de todos os outros compostos aminados [TA *et al*, 1985, PEOPLES *et al*, 1985].

Os ureídeos estão presentes principalmente em leguminosas tropicais, especificamente na tribo Phaseolae. São compostos derivados de purinas e menos solúveis em água que as aminas. Porém, temperaturas mais altas aumentam a solubilidade dos ureídeos. Sendo assim, como nos trópicos há temperatura mais elevada e ocorre maior taxa de transpiração pelas plantas, o transporte dos ureídeos é facilitado em relação à locais onde a disponibilidade de água e a temperatura são baixas, como em países de clima temperado. Os ureídeos são compostos mais eficientes na forma de transporte de N, já que podem carregar mais N em relação à C que as moléculas de amidas [SCHUBERT, 1986]. As enzimas do metabolismo de ureídeos estão primeiramente presentes na casca da semente e mais tarde ocorrem no embrião. Contudo, a capacidade do embrião em utilizar ureídeos para seu crescimento é limitada devido à exportação restrita de ureídeos do tegumento e as diferentes atividades apresentadas pelas enzimas degradadoras destes compostos no embrião, em diferentes fases de desenvolvimento da semente. Os ureídeos são catabolizados em amidas no tegumento e então estas são repassadas ao embrião [PEOPLES *et al*, 1985].

O transporte de ureídeos é mais intenso quando a planta está dependendo da fixação simbiótica como fonte de N. Quando há N externo como suprimento na forma de NO_3^-, os aminoácidos passam a ser a principal forma de transporte [McCLURE *et al*, 1980].

As amidas transportam menos N em relação à C em sua molécula em relação aos ureídeos e são transportadas principalmente na forma de Asn e Gln. [SPRENT, 1980, SCHUBERT, 1986]. Entretanto, o transporte de N na forma de amidas é mais vantajoso para plantas de ambientes temperados ou áridos, pois são mais estáveis e mais solúveis em água. Além disso, o custo de síntese deste aminoácido para o transporte é um dos mais econômicos em termos energéticos (ATP) para a planta [SCHUBERT, 1986, HUPPE & TURPIN, 1994]. O catabolismo de amidas (prin-

cipalmente Asn) é restrito ao tegumento da semente quando a mesma está imatura, mas conforme a semente vai se desenvolvendo, o embrião adquire a capacidade de degradá-las [SCHUBERT, 1986].

As leguminosas das Tribos Trifolieae, Genisteae e Viciae transportam preferencialmente amidas e no caso da ervilha (tribo Viciae), o transporte é feito principalmente na forma de Asn [BAUER *et al*, 1977a, BAUER *et al*, 1977b , PEOPLES *et al*, 1985]. A Asn foi o primeiro aminoácido a ser detectado em plantas (especificamente em *Aspargus sativus*) [VAUQUELIN & ROBIQUET, 1806]. Em muitas leguminosas, é o principal composto nitrogenado exportado pelo xilema e um importante constituinte do grupo de N solúvel acumulado em estruturas vegetativas durante estágios de pré-florescimento do ciclo de crescimento [PATE, 1971, citado por ATKINS *et al*, 1975]. Em *Lupinus* (tremoço), por exemplo, cerca de 60-70% do N no xilema, 92% no floema e 56% no nódulo, estão sob a forma de Asn, apesar de somente 7 a 10% dos resíduos das proteínas serem este aminoácido [ATKINS *et al*, 1975, MIFLIN & LEA, 1977, PATE *et al*, 1981].

Em ervilha, até cerca de 90% de N pode se apresentar sob a forma de Asn no xilema, e em folhas maduras, 98% do N foi recuperado na forma de Asn e 88% na forma de Gln, em experimentos com aplicação de Asn e Gln como traçadores, marcados com L-[U-^{14}C] [URQUHART & JOY, 1982]. A Asn é o principal contribuinte nitrogenado da seiva do xilema também em *Vicia, Trifolium, Medicago, Lotus, Vigna, Phaseolus, Casuarina, Myrica* e *Aspargus* [SIECIECHOWICZ *et al*, 1988a, SELLTEDT & ATKINS, 1991, DAVIES & KING, 1993, HURST & CLARK, 1993] e também nos tecidos de *Sphagnum fallax*, uma espécie de briófita [HEESCHEN *et al*, 1996]. Estudos têm demonstrado que a síntese de proteínas de reserva em cultura de cotilédones de leguminosas *in vitro* pode ser suportada se Asn é fornecida como única fonte de N. O tecido é capaz de sintetizar todos os outros aminoácidos a partir de Asn [LEA *et al*, 1979, HAGA & SODEK, 1987].

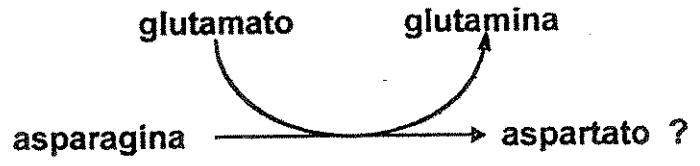
O N requerido para a síntese desse aminoácido pode ser obtido a partir da redução do NO_3^-, da fixação do N ou do catabolismo de proteínas [LEA & FOWDEN, 1975].

Foram sugeridas três rotas possíveis para a síntese de Asn [SIECIECHOWICZ *et*

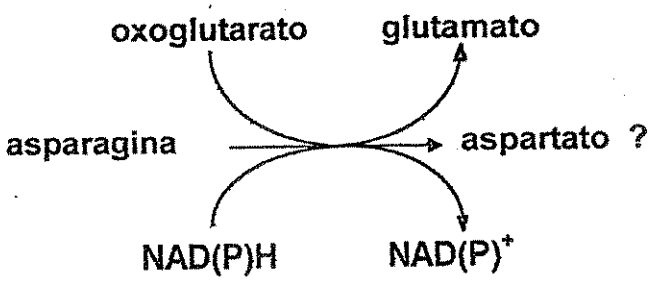
al, 1988a]. A primeira envolve a síntese de Asn a partir de ácido 2-oxosuccinâmico (β-amida do ácido oxaloacético) e um doador de grupo amino adequado (ácido α-aminobutírico, alantoína, glutamina ou norvalina) na reação reversa da enzima asparagina oxoácido transaminase. Esta enzima foi encontrada em concentrações muito baixas em folhas de ervilha e é de importância fisiológica questionável em plantas [IRELAND & JOY, 1983b]. A segunda envolve a incorporação de cianeto e Cys em β-cianoalanina através da β-cianoalanina sintase, cujo produto é então hidrolisado pela β-cianoalanina hidrolase, formando Asn. Entretanto, as maiores fontes de cianeto são os glicosídeos cianogênicos que ocorrem em um número limitado de espécies e esta enzima é considerada importante somente no mecanismo de detoxificação de cianeto [SIECIECHOWICZ *et al*, 1988a]. A terceira via e a mais provável é a da produção direta de Asn a partir de Asp. Esta reação é mediada pela Asn-sintetase e envolve uma transferência dependente de ATP do grupo amida da Gln (em alguns casos NH_4^+) para Asp, em presença de Mg^{2+}, produzindo Asn, Glu, AMP e PPi [SIECIECHOWICZ *et al*, 1988a].

A Asn, todavia, é rapida e extensivamente catabolizada, em órgãos em desenvolvimento, no caule e em órgãos reprodutivos [ATKINS *et al*, 1975, SCHUBERT, 1986]. Até o presente momento, foram propostas quatro vias possíveis de transformação da Asn [SIECIECHOWICZ *et al*, 1988a].

A primeira envolve a transferência do grupo amida da Asn para Glu, formando Gln, numa reação inversa à da Asn sintetase:

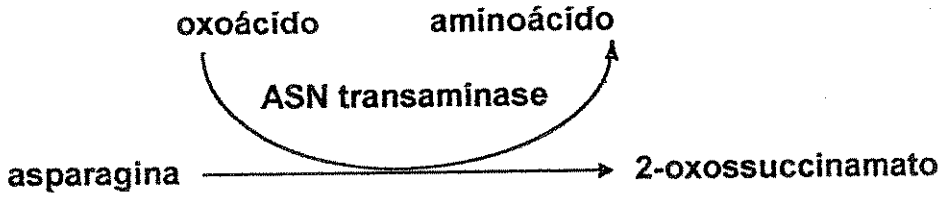


A segunda implica na transamidação redutiva da Asn com 2-oxoglutarato, analogamente à GOGAT, com oxidação de NAD(P)H:



Contudo, as enzimas destas duas primeiras propostas não foram isoladas.

A terceira, envolve a asparagina aminotransferase (Asn:piruvato transaminase, Asn aminotransferase (GOT)), presente em vagens e principalmente em folhas, detectada em soja [STREETER, 1977], ervilha [IRELAND & JOY, 1983a] e tremoço [ATKINS *et al*, 1983]. Essa enzima transfere o N α-amino da Asn para um 2-oxoácido, numa transaminação, formando 2-oxosuccinamato que por sua vez é reduzido a ácido hidroxisuccinâmico [BAUER *et al*, 1977b, LLOYD & JOY, 1978], IRELAND & JOY, 1983a]:



Esta enzima também é denominada serina:glioxilato aminotransferase e tem um importante papel nas folhas, na medida em que torna possível a entrada do N amino da Asn no ciclo fotorrespiratório, através da transaminação do glioxilato

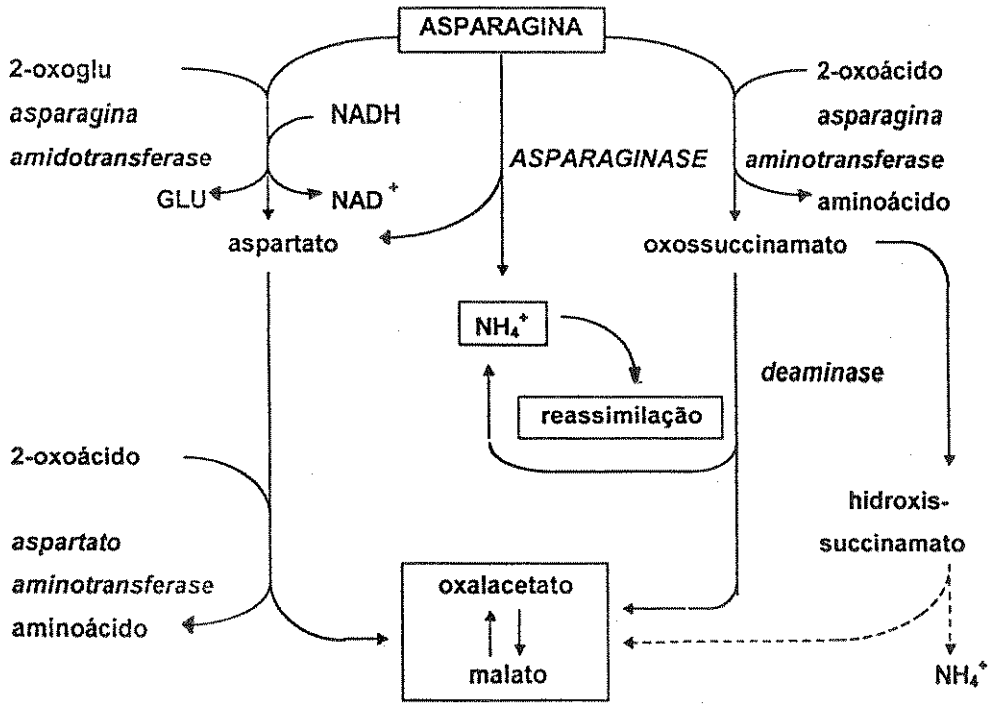
no peroxissomo, onde a enzima está localizada, permitindo a formação de Gly e Ser [REHFIELD & TOLBERT, 1972, STREETER, 1977, TA *et al*, 1985]. A enzima apresenta baixo K_m para Asn na folha e sua atividade se mantém ao longo do desenvolvimento neste órgão [IRELAND & JOY, 1981]. Sua atividade também sofre influência de alguns compostos como ATP e certos íons como Ca^{2+} e Cl^-, e também da luz, dado que apresenta atividade máxima nas primeiras horas do dia [SIECIECHOWICZ *et al*, 1988a].

A quarta e a mais bem caracterizada até o momento, é a via da asparaginase (L-asparaginase-amido-hidrolase, E.C. 3.5.1.1., ASNase). Esta é uma enzima amplamente distribuída em animais, microrganismos e em tecidos vegetais. Além disso, tem recebido há bastante tempo uma considerável atenção devido à sua atividade antineoplástica [COONEY & HANDSCHUMACHER, 1970 , KOIZUMI & FUJIMOTO, 1994].

Em plantas, esta enzima foi inicialmente encontrada em sementes em desenvolvimento de *Lupinus albus* [ATKINS *et al*, 1975].

A ASNase já foi detectada em raízes, nódulos, folhas, flores e principalmente em sementes em desenvolvimento [STREETER, 1977 , LEA *et al*, 1978, CHANG & FARNDEN, 1981, SIECIECHOWICZ & IRELAND, 1989a].

A ASNase, localizada no citosol da célula, remove o N amida da Asn, formando Asp e NH_4^+ e liberando N requerido para a síntese de outros aminoácidos [SIECIECHOWICZ *et al.* 1985], como mostra o esquema seguinte:



O Asp é extensivamente metabolizado para produzir uma variedade de compostos que podem ser retidos ou exportados no floema na forma de outros aminoácidos, já que não é trocado entre o xilema e o floema [ATKINS *et al*, 1975 , FARNDEN, 1981].

O NH_4^+ formado pela ação da ASNase pode ser parcialmente assimilado de novo pelo tegumento da semente pela GDH. Parte deste NH_4^+ pode ser passado para o endosperma. Contudo, no endosperma e no embrião, a principal via de assimilação de NH_4^+ é a da GS/GOGAT, separada espacialmente da via da GDH [MIFLIN & LEA, 1976, RATAJCZAK, 1986]. A atividade da ASNase nos tecidos da casca da semente parece ser ainda altamente responsável pela geração de NH_4^+ que é liberado para o líquido do saco embrionário [MURRAY & KENNEDY, 1980, HOSTALÁCIO *et al*, 1985]. A ASNase parece sofrer um certo grau de inibição quando há excesso de NH_4^+ no meio [IRELAND & JOY, 1983a, SIECIECHOWICZ *et al*, 1985]. Com a senescência, pode haver um aumento da concentração de NH_4^+ dentro da planta, como se houvesse uma inibição da GS. A volatilização de NH_3 ocorre então, quando a concentração deste composto nas cavidades estomáticas ultrapassa a concentração no ambiente atmosférico [FARQUHAR *et al*, 1980, OLSEN *et al*, 1995].

A ASNase mostrou ser específica para seu substrato, não atuando sobre Gln, por exemplo [STREETER, 1977, IRELAND & JOY, 1981, TONIN & SODEK, 1990]. A enzima apresenta um K_m para Asn em folhas ($\sim$ 8 - 10 mM) mais elevado em relação ao encontrado em tecidos de semente ($\sim$ 3,2 mM) [LEA *et al*, 1978, SODEK *et al*, 1980].

A ASNase apresenta-se basicamente em duas formas: uma dependente de K^+ e outra independente deste íon [SODEK *et al*, 1980]. SODEK *et al* (1980) isolaram a segunda forma da enzima que requeria íons K^+ para sua atividade, sendo encontrados altos níveis de atividade da enzima na testa de cotilédones em amadurecimento de ervilha. Até então, a ASNase vinha sendo estudada sem adição de K^+ durante o processo de extração, e portanto, só se conhecia a forma independente deste íon. Com isso, a ASNase deixou de ser detectada em muitas espécies.

Esta forma da enzima, dependente de K^+, também foi encontrada em espécies

como *Vicia faba, Phaseolus vulgaris, Phaseolus multiflorus, Zea mays, Hordeum vulgare* [MISRA & OAKS, 1980, SODEK *et al*, 1980], *Lupinus sp.* [LEA *et al*, 1984], *Crotalaria sp.* [VITORIA, 1994], *Triticum aestivum* [PEETERS & LAERE, 1992], *Psophocarpus tetragonolobus* [CHAPLEO & HALL, 1989], e ainda em *Arabidopsis thaliana* [CASADO *et al*, 1995], e parece ser menos estável que a forma independente de K^+.

As duas formas de ASNase podem ocorrer dentro de um mesmo genêro [LEA *et al*, 1978, SODEK *et al*, 1980]. Trabalhando com *Lupinus arboreus* e *Lupinus angustifolius*, CHANG & FARNDEN (1981) encontraram ainda, as duas formas da enzima dentro da mesma espécie, porém em órgãos diferentes. A proporção entre as 2 formas depende da espécie de planta, dos órgãos e do estágio de desenvolvimento [SODEK & LEA, 1993].

Outros íons como Rb^+, Na^+ e NH_4^+ são capazes de promover atividade a um nível significativo ao substituírem o K^+ [SUELTER. 1970, LEA *et al*, 1978 , SODEK *et al*, 1980]. O íon Ca^{2+} também influenciou na atividade da enzima quando a ASNase de folhas de ervilha foi extraída na presença de Ca^{2+}, não houve efeito sobre o K_m, mas a V_{max} e a atividade da enzima dobraram [SIECIECHOWICZ & IRELAND, 1989a] .

Outros íons ou compostos podem inibir a atividade da ASNase como Gln, em cultura de cotilédones [TONIN & SODEK, 1990] e metionina sulfoximina, que inibe GS e interfere no transporte de elétrons da fotossíntese, que por sua vez pode afetar a atividade da enzima [SIECIECHOWICZ *et al*, 1989].

A ASNase pode estar sujeita à regulação por fatores externos ou internos da planta, já que sua atividade varia nas folhas e na semente durante o desenvolvimento das mesmas [HOSTALÁCIO *et al*, 1985, SIECIECHOWICZ & JOY, 1989, LOUGH *et al*, 1992a].

ATKINS *et al* (1983) verificaram que a atividade *in vitro* da ASNase foi superior àquela da Asn aminotransferase durante o início da expansão foliar, mas, quando a folha já está completamente expandida, a atividade da Asn aminotransferase foi extremamente superior àquela da ASNase. Isto indicou que a Asn aminotransferase,

neste caso, é a principal via de utilização da Asn [IRELAND & JOY, 1981].

Desse modo, Asn em folhas é metabolizada em dois compartimentos subcelulares distintos: quando a folha é jovem e as enzimas ativas, a ASNase produzirá Asp e NH_4^+ no citosol, enquanto a transaminação no peroxissomo pela Asn aminotransferase produzirá 2-oxo-succinamato e Gly ou Ala. Em folhas maduras, o metabolismo da Asn se restringe ao peroxissomo [IRELAND & JOY, 1983a].

A energia luminosa também interfere na atividade da ASNase, uma vez que a enzima de folhas jovens de ervilha apresentou um aumento de atividade durante um período de luz, seguido de um decréscimo na atividade enzimática durante um período de escuro [SIECIECHOWICZ *et al*, 1988b]. Este fenômeno também foi observado em briófitas (*Sphagnum fallax*) [HEESCHEN *et al*, 1996]. Isso indica que estes processos são dependentes de luz porém, não são mediados por fitocromo [SIECIECHOWICZ *et al*, 1988b]. Calmodulina, fatores solúveis presentes em extratos de folhas, fotoperíodo, diferentes concentrações ou ausência de K^+ subcelular, modificações pós-traducionais como fosforilações e desfosforilações e mecanismos de associação à membrana também não foram responsáveis pelas variações na atividade da enzima [SIECIECHOWICZ *et al*, 1988b, SIECIECHOWICZ *et al*, 1988c, SIECIECHOWICZ & IRELAND, 1989a].

Estudos usando inibidores de transcrição e tradução indicaram que ARNm e síntese protéica foram necessários para que houvesse um aumento na atividade da ASNase, assim como a degradação proteolítica dessa enzima decorreria num decréscimo de sua atividade [SIECIECHOWICZ *et al*, 1985 , SIECIECHOWICZ *et al*, 1988b, SIECIECHOWICZ *et al*, 1988c].

Desse modo, em presença de luz, a ASNase de folha de ervilha é sintetizada e juntamente com o aumento de sua estabilidade na atividade, proporcionado pelos produtos do transporte de elétrons da fotossíntese, há um aumento líquido de sua atividade. No escuro, a síntese e a estabilidade da enzima declinam, e acoplado com a degradação da mesma por proteólise, há o decréscimo da atividade enzimática [SIECIECHOWICZ *et al*, 1985, SIECIECHOWICZ & IRELAND, 1989b].

Na semente em desenvolvimento, a ASNase apresenta atividade máxima durante

a fase de mais intenso acúmulo de reservas, quando o cotilédone necessita de grande quantidade de aminoácidos para síntese de proteínas de reserva [HOSTALÁCIO *et al*, 1985]. A atividade da ASNase decresce conforme se dá o amadurecimento dos órgãos [ATKINS *et al*, 1983, LEA *et al*, 1984, SIECIECHOWICZ *et al*, 1985].

Entretanto, apesar de um considerável número de trabalhos, a regulação da atividade da ASNase não está bem esclarecida.

A ASNase de outros organismos também apresentou variações na sua atividade, promovidas por autofosforilação e síntese protéica por exemplo em *Leptosphaeria michotti* [JEREBZOF & JEREBZOF-QUINTIN, 1983, JEREBZOF-QUINTIN & JEREBZOF, 1986] e cinética alostérica em *Saccharomyces cerevisae* [DUNLOP *et al*, 1978]. Fungos, leveduras e bactérias também mostram aumento da atividade enzimática resultante da síntese *de novo* de ASNase, em resposta à uma depleção de N [WIAME *et al*, 1985] e também dependente de processos que envolvem luz [PAUL & COOKSEY, 1981].

A atividade da ASNase em cotilédones em desenvolvimento é muito superior àquelas de raízes e folhas e por isso tem sido um órgão bastante utilizado na caracterização desta enzima [SODEK *et al*, 1980, CHANG & FARNDEN, 1981 , IRELAND & JOY, 1981, LEA *et al*, 1984, SODEK & LEA, 1993]. Muitos métodos são utilizados para extrair, separar, isolar e purificar proteínas. Basicamente, tem-se utilizado os mesmos processos para extração e purificação da enzima ASNase: técnicas cromatográficas, eletroforéticas, reações enzimáticas e imunoquímicas e produção de anticorpos, e recentemente técnicas de biologia molecular [LEA *et al*, 1978, SIECIECHOWICZ *et al*, 1985, SODEK & LEA, 1993, CASADO *et al*, 1995].

A purificação de proteínas é importante para que se possa compreender melhor como e onde são formadas, suas funções, estruturas e características, tanto à nível celular como molecular, auxiliando ainda em estudos taxonômicos e evolutivos e em estudos de caracterização, produção de anticorpos e o desenvolvimento de sondas de oligonucleotídeos para serem empregados no isolamento de genes.

A ASNase independente de K^+ foi bastante caracterizada em diferentes espécies de tremoço. Entretanto, parece haver uma variabilidade em certas características da

molécula mesmo dentro do mesmo genêro, ou mesmo se tratando da mesma isoforma [LEA *et al*, 1978, CHANG & FARNDEN, 1981, LEA *et al*, 1984 , DICKSON *et al*, 1992, SODEK & LEA, 1993, VINCZE *et al*, 1994, AGUIAR, 1995].

Esta variabilidade também tem ocorrido na forma dependente de K^+ [SODEK & LEA, 1993, AGUIAR, 1995], que ainda encerra aspectos desconhecidos, e outros a serem melhor caracterizados e definidos.

Devido à importância da ASNase como uma enzima chave no metabolismo do N, resolveu-se estudar alguns aspectos ainda não muito bem esclarecidos na forma dependente de K^+ em plantas de ervilha *Pisum sativum* L., uma das principais culturas agrícolas de zonas temperadas do mundo [SMART, 1990]. O material escolhido foi a semente imatura desta planta que é um sistema ideal para avaliar possíveis diferenças existentes na molécula da ASNase, que podem influenciar diretamente no metabolismo dos tecidos da semente.

Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- caracterizar e purificar a ASNase dependente de K^+ de semente imatura de ervilha *Pisum sativum* L. e
- realizar estudos imunológicos comparativos entre a enzima desta espécie e as enzimas dependentes ou não de K^+ de outras espécies vegetais.

Material e Métodos

Material

A leguminosa utilizada neste estudo foi a variedade Bolero de ervilha *Pisum sativum* L., que foi cultivada em canteiros durante os invernos de 1993, 1994 e 1995, a partir de sementes fornecidas pela Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Frutos com sementes imaturas foram colhidos por volta de 15 dias após o início da ântese, antes do crescimento dos cotilédones, e quando ainda na fase de "endosperma líquido" [SODEK *et al*, 1980, HOSTALÁCIO *et al*, 1985]. Este líquido foi retirado da semente e o tegumento foi congelado para ser utilizado em todas as investigações. O mesmo procedimento foi adotado quando foram utilizadas sementes imaturas de *Crotalaria juncea, C. zanzibarica, C. paulina* e *C. anagiroides.*

Métodos

Extração da ASNase

A extração da ASNase foi feita em almofariz previamente gelado (4 °C) com tampão Tris-HCl 50 mM pH=8, contendo 50 mM de KCl, 10% de glicerol, 160 μM de $CaCl_2$ e 1 mM de DTT e PMSF [1], na proporção de 5 mL de tampão para cada grama de massa fresca. O extrato foi centrifugado a 12.000 x g por 20 min em centrífuga

[1] PMSF somente foi utilizado durante a extração para proteger a enzima da atuação de proteinases

refrigerada (4 °C). O sobrenadante desta fração foi denominado extrato bruto (**EB**) e duas alíquotas do mesmo foram retiradas: uma para dosagem de proteínas e a outra para dessalinização em coluna de Sephadex G-25 (1 x 8 cm), equilibrada anteriormente com tampão de extração [SODEK & LEA, 1993]. A atividade da ASNase foi avaliada a partir desta fração eluída.

Ensaio Enzimático

No teste de atividade enzimática foi utilizada Asn purificada em coluna Dowex-1 (acetato) [MIFLIN & LEA, 1975] e foi feito em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL através da determinação da produção de NH_4^+, de acordo com SODEK & LEA (1993). Foram necessários:

- Tampão Tris-HCl pH=8
- Asn 30 mM em Tris-HCl 50 mM pH=8
- solução de $(NH_4)_2SO_4$ 0,5 mM
- H_2SO_4 18 M (concentrado)
- K_2CO_3 50%
- Solução de fenol - 2,5 mL de fenol + 12,5 mg de $Na_2[Fe(CN)_5NO].2H_2O$ (nitroprussiato de sódio) em 250 mL de H_2O
- Solução de hipoclorito de sódio - 1,25 g de NaOH + 5,3 g de Na_2HPO_4 anidro + 2,5 mL de NaHOCl 5% em 250 mL de H_2O
- NaOH 2 M - deve ser previamente titulado. Coloca-se num Eppendorf, 500 μL de água deionizada, uma gota de verde de bromocresol 0,1% em etanol e uma gota de 5 μL de H_2SO_4 18 M na tampa do Eppendorf. O tubo foi agitado e o NaOH 2 M foi sendo adicionado. O ponto de viragem deve estar em torno de 75 μL de NaOH 2 M para cada 5 μL do ácido.

O ensaio consistiu de 50 μL de Asn 30 mM, 50 μL do tampão Tris-HCl 50 mM pH=8 e 50 μL do extrato, num volume total de 150 μL. A mistura foi encubada em banho-maria a 35 °C por 1 h.

Após a uma hora de encubação, a reação foi interrompida com 500 μL de K_2CO_3 50% e os tubos foram cobertos por uma outra tampa de Eppendorf contendo uma gota de 5 μL de H_2SO_4.

Foram feitos também dois tipos de controle e um padrão de NH_4^+. O primeiro controle foi uma duplicata deste primeiro ensaio que foi denominada de "tempo zero". O segundo foi um branco controle, com 50 μL de Asn 30 mM e 100 μL de tampão, e o padrão de NH_4^+ foi feito com 50 μL de Asn 30 mM, 50 μL de tampão e 50 μL da solução de $(NH_4)_2SO_4$.

O tempo zero, o branco e o padrão tiveram as reações imediatamente interrompidas com 500 μL de K_2CO_3 50%. Os tubos foram agitados e imediatamente cobertos com uma outra tampa de Eppendorf, contendo uma gota de 5 μL de H_2SO_4, do mesmo modo que o anterior. Todos os tubos foram deixados à temperatura ambiente por uma noite.

A formação de NH_3 devido à ação da enzima sobre a Asn foi determinada pelo método do hipoclorito [McCULLOUGH, 1967], após difusão da NH_3 proveniente do ensaio. Durante esse período, a NH_3 liberada pela solução passa para a gota de ácido suspensa na tampa do tubo, formando $(NH_4)_2SO_4$. Após a difusão, a tampa foi removida e fixada num segundo tubo Eppendorf, contendo 500 μL da solução de fenol. Após misturar os componentes, o tubo foi aberto e adicionado 100 μL de NaOH 2 M tornando o meio alcalino. O tubo foi imediatamente agitado e 500 μL da solução alcalina de hipoclorito foi adicionada e o tubo agitado. Os tubos foram então, colocados em banho-maria a 37 °C por 45 min, para desenvolvimento de cor (azul). As amostras foram monitoradas em espectrofotômetro a 630 nm, utilizando-se o branco como controle no aparelho.

A atividade foi calculada a partir da diferença de leitura entre o ensaio encubado e o denominado tempo zero, e transformada em μmol NH_4^+/(h.mL), através da leitura da solução padrão de NH_4^+.

Ensaio Semi-Quantitativo

Durante o processo de purificação, principalmente para agilizar a localização da enzima nas frações coletadas após cromatografia, foi utilizado um ensaio semi-quantitativo, ou seja, sem o controle "tempo zero".

Teste de Dependência ao Íon K^+

A ASNase foi extraída conforme já descrito, e 2 mL do extrato foram passados em colunas de Sephadex G-25, sendo uma equilibrada com tampão de extração contendo KCl 50 mM e uma outra, com o mesmo tampão, mas sem KCl. Os extratos obtidos foram utilizados em três tipos de ensaios, representados como se segue:

A	Asn 30 mM	50 μL
	Tris-HCl 50 mM pH=8	50 μL
	Extrato (G-25 **com** KCl)	50 μL
B	Asn 30 mM	50 μL
	Tris-HCl 50 mM pH=8	50 μL
	Extrato (G-25 **sem** KCl)	50 μL
C	Asn 30 mM	50 μL
	KCl 150 mM	50 μL
	Extrato (G-25 **sem** KCl)	50 μL

Os ensaios para o teste com o íon foram feitos em duplicata, sendo um deles colocado em banho-maria a 35 °C por 1 h e o "tempo zero", o padrão com NH_4^+ e o branco foram imediatamente interrompidos com 500 μL de K_2CO_3 50%, procedendo-se a partir daí do mesmo modo como já descrito.

Atividade da ASNase em Presença de Ca^{2+}

Foram feitas duas extrações independentes, uma utilizando o tampão de extração já mencionado e uma outra, usando o mesmo tampão, porém contendo $CaCl_2$ 160 μM. [CHANG & FARNDEN, 1981, SIECIECHOWICZ *et al*, 1988c]. Após a centrifugação, os extratos com e sem $CaCl_2$ foram aplicados em colunas de Sephadex G-25 previamente equilibradas com tampão de extração com e sem $CaCl_2$, respectivamente. Os extratos obtidos foram utilizados nos seguintes ensaios:

Com Ca^{2+}	Asn 30 mM	50 μL
	Tris-HCl 50 mM pH=8	50 μL
	Extrato (G-25 **com** $CaCl_2$)	50 μL
Sem Ca^{2+}	Asn 30 mM	50 μL
	Tris-HCl 50 mM pH=8	50 μL
	Extrato (G-25 **sem** $CaCl_2$)	50 μL

A solucão de Tris-HCl 50 mM pH=8, colocada no ensaio, também foi substituída por uma solução de $CaCl_2$ para uma concentração final de 160 μM, para verificar se a enzima recuperava a atividade após o $CaCl_2$ ser eliminado em cromatografia de Sephadex G-25.

Estes ensaios foram feitos em duplicata, sendo um deles encubado em banho-maria a 35 °C por 1 h, e o "tempo zero", o branco e o padrão de NH_4^+ tiveram a reação imediatamente interrompida com 500 μL de K_2CO_3 50%, procedendo-se a partir daí conforme já descrito.

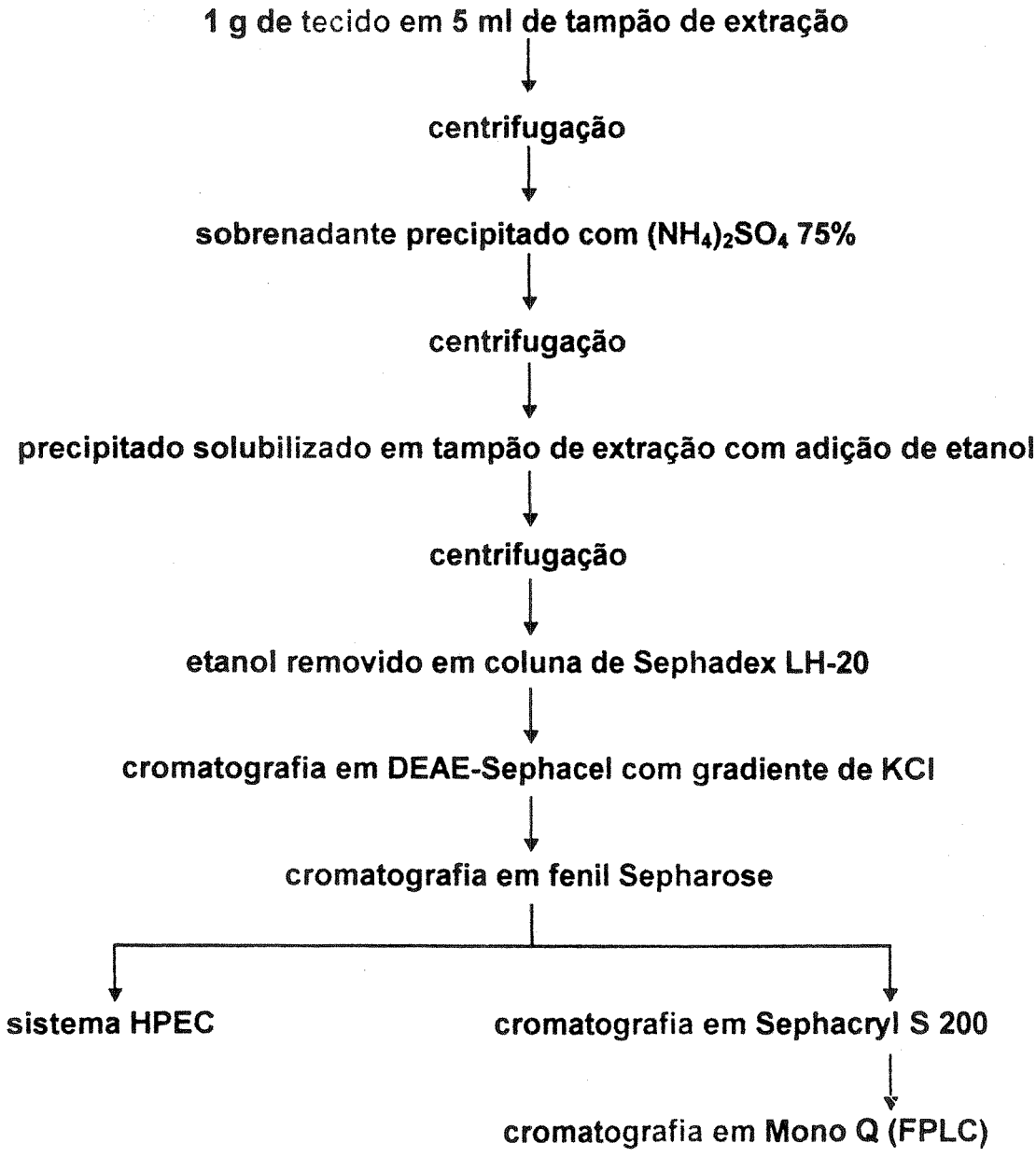
A atividade da ASNase foi verificada em presença de $CaCl_2$ e EGTA (quelante específico deste íon). EGTA foi colocado no ensaio final para uma concentração final de 1,6 mM. Após trinta minutos de pré-encubação do extrato com EGTA, a atividade da ASNase destes extratos foi verificada como já descrito.

Outras concentrações de $CaCl_2$ também foram testadas da mesma maneira na extração e purificação da ASNase: 5 e 1 mM, comparando sempre com o processo

na ausência deste íon. A enzima foi extraída na concentração maior de Ca^{2+} (5 mM) e após cromatografia de fenil Sepharose, a enzima foi eluída em Sephadex G-25 de modo que a concentração do íon fosse dimimuída para àquelas desejadas (1 mM, 160 μM e ausente).

Purificação da ASNase

Todo o procedimento foi realizado entre 0 e 5 °C, baseado em SODEK & LEA (1993), de acordo com o esquema seguinte.



Após a extração da enzima, o sobrenadante foi tratado com $(NH_4)_2SO_4$ para 75% de saturação. O material foi centrifugado a 12.000 x g por 15 min e as proteínas precipitadas solubilizadas em tampão de extração. Em seguida, foi adicionado etanol gelado, sob leve agitação, na proporção de 1,5 mL para cada mL de tampão (também para precipitação de proteínas). Nestas condições, a enzima não sofre desnaturação nem precipitação [SODEK *et al*, 1980]. O material foi deixado em freezer por uma noite e centrifugado a 5.000 x g durante 20 min.

O etanol foi removido através de uma coluna de Sephadex LH-20 (lipohidrofílica, 9 x 2,8 cm) (LH-20), equilibrada com tampão de extração. Da fração eluída foram retiradas alíquotas para dosagem de proteínas, aplicação em gel de eletroforese não-desnaturante e determinação da atividade da ASNase após dessalinização em coluna de Sephadex G-25.

O restante foi aplicado numa coluna de troca iônica de DEAE-Sephacel (5,3 x 1,3 cm) (DEAE), equilibrada com tampão de extração. Após aplicação da amostra, as proteínas não adsorvidas foram eluídas com 15 mL de tampão de extração sob um fluxo de 1 mL/min. Em seguida, foi feito um gradiente de KCl, empregando um sistema de dois reservatórios interligados, um contendo 45 mL de tampão de extração com KCl 50 mM e o outro, 45 mL de tampão de extração com KCl 350 mM. Foram coletadas 60 frações de 1,5 mL. As frações com maior atividade enzimática foram reunidas e foram retiradas alíquotas para dosagem de proteínas, aplicação em eletroforese desnaturante e não-desnaturante e determinação da atividade enzimática. Foi adicionado, então, para cada mL de amostra restante, 100 mg de KCl, elevando a concentração desse sal para 1,55 M.

Esta fração foi aplicada em uma coluna de interação hidrofóbica, fenil Sepharose (4,9 x 1,3 cm) (fenil-S), previamente equilibrada com tampão de extração contendo KCl 1,5 M. O material não adsorvido foi lavado com 15 mL deste mesmo tampão num fluxo de 0,8 mL/min. Em seguida, a coluna foi eluída com tampão de extração, contendo KCl 50 mM e foram coletadas 20 frações de 1,5 mL. As frações que apresentaram maior atividade enzimática foram reunidas e alíquotas foram retiradas para dosagem de proteínas, aplicação em eletroforese desnaturante e não-desnaturante e

determinação da atividade da enzima.

A fração com atividade enzimática eluída da fenil Sepharose foi aplicada em sistema de HPEC, em coluna de Sephacryl S-200 e em coluna de Mono-Q, em sistema de FPLC, conforme o caso.

HPEC - Cromatografia Eletroforética de Alta Eficiência

Por esta técnica, o princípio de separação de proteínas é o mesmo da eletroforese. Contudo, além de serem separadas, são eluídas e coletadas em seguida.

As frações com maior atividade enzimática, provenientes da coluna de fenil Sepharose, foram agrupadas e dessalinizadas em coluna de Sephadex G-25, utilizando-se tampão de extração. Na amostra, foi colocado azul de bromofenol como indicador de corrida eletroforética.

No aparelho de HPEC, modelo 230A (Applied Biosystems), foi utilizado gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante, em coluna de vidro de 2,5 x 50 mm, a 5 °C de refrigeração. Todos os reagentes utilizados nesta cromatografia foram preparados de acordo com as instruções no manual do fabricante (User Bulletin, nº 7; Dez, 1990).

O tampão de eletrodo superior foi Tris 25 mM + Gly 192 mM pH=8,8 e o inferior foi Tris-HCl 25 mM pH=8,3, ambos mantidos em gelo, com fluxo entre 1,5 a 2,5 mL/min. O tampão de eluição foi Tris-HCl 50 mM pH=8,3 com DTT 1 mM, com fluxo de 18 μL/min.

Antes da aplicação da amostra, foi realizada uma pré-corrida para remoção de material contaminante, detectável em UV (substâncias derivadas da degradação de poliacrilamida). O detector de UV foi ajustado para 280 nm e a sensibilidade para 1 AUFS. Foi feito um gradiente de corrente, onde nos primeiros trinta minutos, a variação foi de 0,2 a 0,8 mA e no restante, permaneceu fixa em 0,8 mA até a obtenção do pico correspondente à liberação destes compostos.

Após a pré-corrida, o volume máximo permitido de amostra, 90 μL, foi aplicado. Nos primeiros 10 min, foi feito um gradiente de corrente de 0,4 à 0,8 mA e posteriormente permaneceu a 0,8 mA. Após a saída do corante, por volta de 60 min, foram coletadas frações de 60 μL a cada 4 min. Os Eppendorfs coletores continham

100 μL de solução de Asn 30 mM (em tampão de extração) para que a reação enzimática pudesse ocorrer de imediato. Neste caso, o tempo de encubação foi 24 h à temperatura ambiente.

A partir da mesma fração, uma segunda separação foi feita em seguida, do mesmo modo. Contudo, as frações coletadas foram submetidas à gel de eletroforese não-desnaturante 10%, para que se pudesse relacionar a banda protéica com a atividade da enzima.

Sephacryl S-200

Uma coluna de exclusão de Sephacryl S-200 Pharmacia (83,2 x 2,6 cm)(S-200) foi empacotada e calibrada de acordo com as instruções do fabricante.

A coluna foi mantida a 5 °C e os padrões (Sigma ou Pharmacia) utilizados para calibração foram catalase (232.000 g/mol), β-amilase (200.000 g/mol), álcool desidrogenase (150.000 g/mol), albumina de soro bovino (67.000 g/mol), anidrase carbônica (29.000 g/mol) quimotripsinogênio A (25.000 g/mol), ribonuclease A (13.700 g/mol) e citocromo C (12.000 g/mol). Azul de dextrano (2.000.000 g/mol-Sigma) foi usado na determinação do volume de vazio. A calibração foi feita em duas etapas: primeiro, utilizando-se somente o azul de dextrano e depois, o grupo das proteínas. Foi mantido um fluxo de 0,7 mL/min e foram coletadas frações de 3,7 mL.

Foram aplicados 5,5 mL da fração proveniente da fenil Sepharose na coluna de Sephacryl S-200, previamente equilibrada com tampão de extração filtrado e desgasado. Após a saída de 110 mL, volume coletado antes da eluição do azul de dextrano, foram coletadas 60 frações de 3,7 mL, num fluxo de 0,7 mL/min. Foi avaliada a atividade enzimática em todas as frações. Daquelas que apresentaram maior atividade enzimática, alíquotas foram retiradas e analisadas separadamente em gel de poliacrilamida não-desnaturante. O restante foi reunido, as proteínas dosadas e então, aplicado em coluna de Mono-Q.

Os valores das massas molares (M) das enzimas foram inferidos a partir do volume de eluição das mesmas em relação ao volume de vazio, e comparado aos volumes de

eluição dos padrões também em relação ao volume de vazio, utilizando equações de regressão linear e plotando-se o logarítimo das massas molares com volume de eluição das amostras.

Sistema de FPLC - Mono-Q

Amostras entre 5 e 10 mL obtidas após cromatografia em Sephacryl S-200 com atividade enzimática foram aplicadas numa coluna de troca iônica, Mono-Q HR-5/5 FPLC (Pharmacia)(Mono-Q), utilizando um sistema de HPLC, com duas bombas LKB mod. 2150, controladas por um gerador de gradiente mod. 2152 (Pharmacia). A coluna foi previamente lavada com tampão de extração e eluída à temperatura ambiente com fluxo de 1 mL/min, utilizando um gradiente formado por tampão de extração com KCl 50 mM (A) e tampão de extração contendo KCl 350 mM (B), baseado em SODEK & LEA (1993). Ambos foram filtrados através de membrana de 0,25 μm (Millipore), desgasados e mantidos em gelo. O gradiente foi estabelecido como se segue:

Intervalo de tempo	% B	
min	inicial	final
0 - 5	0	0
5 - 25	0	100
25 - 30	100	100

Foram coletadas trinta frações de 1 mL das quais foi testada a atividade enzimática e retiradas alíquotas que foram analisadas separadamente em gel de eletroforese desnaturante e não-desnaturante. As frações com maior atividade foram reunidas e as proteínas e a atividade da enzima foram dosadas.

Foram determinadas também, as atividades de material eluído durante a aplicação da amostra e durante a lavagem de material não adsorvido nas colunas de DEAE-Sephacel, fenil Sepharose e Mono-Q.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Esta técnica permite a separação de amostras protéicas de acordo com as diferentes massas e cargas presentes na molécula através de sua migração em um gel submetido a um campo elétrico.

Todas as eletroforeses foram realizadas usando o sistema de mini-gel (83 x 102 x 1,5 mm - Hoefer Sci. Inst.), baseado no método descrito por LAEMMLI (1970), sob condições não-desnaturante e desnaturante.

Não-desnaturante

A concentração de acrilamida utilizada foi de 10% e dois géis foram preparados como se segue:

- A = Tampão do gel de resolução: Tris-HCl 3 M pH=8,8 (concentração final = 0,750 M)
- B = Tampão do gel de empacotamento : Tris HCl 0,5 M pH=6,8 (concentração final = 0,139 M)
- C = Solução de acrilamida 40% = 38,9 g de acrilamida + 1,1 g de bis-acrilamida em 100 mL H_2O dest.
- D = Tampão de corrida: Tris 25 mM + Gly 192 mM pH=8,3

Gel de Resolução 10%		Gel de Empacotamento 4%	
Reagente	Volume (mL)	Reagente	Volume (mL)
C	5	C	1
A	5	B	2,5
H_2O dest.	10	H_2O dest.	5,5
TEMED	0,038	TEMED	0,020
$(NH_4)_2S_2O_8$ 10%	0,050	$(NH_4)_2S_2O_8$ 10%	0,100

O gel de resolução foi desgasado antes de se adicionar o catalisador e o polimerizador para auxiliar no processo de polimerização.

Quando a atividade da ASNase foi determinada, após eletroforese não-desnaturante, as condições neste sistema foram levemente alteradas: foi adicionado KCl para uma concentração final de 20 mM, tanto no gel (solução de KCl 40 mM em substituição à H_2O dest.) como também no tampão de corrida, porém, somente no eletrodo inferior (ânodo).

Desnaturante

A concentração de acrilamida utilizada foi de 13% e o gel foi preparado como se segue:

- A = Solução de acrilamida: 34 g de acrilamida + 0,3 g de bis-acrilamida em 100 mL de H_2O dest.
- B = Solução de acrilamida: 7,5 g de acrilamida + 0,11 g de bis-acrilamida em 25 mL de H_2O dest.
- C = Tampão do gel de resolução: Tris-HCl 1 M pH=8,8 (concentração final 0,38 M)
- D = Tampão do gel de empacotamento : Tris HCl 1 M pH=6,8 (concentração final 0,126 M)
- E = Tampão de corrida: Tris-Gly 0,025 mM pH=8,3

Gel de Resolução 13%		Gel de Empacotamento 4%	
Reagente	Volume (mL)	Reagente	Volume (mL)
A	9,6	B	2,0
H_2O dest.	5,4	H_2O dest.	6,5
C	9,6	D	1,3
SDS 10%	0,3	SDS 10%	0,1
TEMED	0,1	TEMED	0,1
$(NH_4)_2S_2O_8$ 10%	0,075	$(NH_4)_2S_2O_8$ 10%	0,1

O gel de resolução foi desgasado antes de se adicionar o SDS, o catalisador e o polimerizador, para auxiliar no processo de polimerização.

Preparo das Amostras

As amostras foram provenientes das várias etapas de extração e purificação da ASNase.

No sistema não-desnaturante, às amostras e aos padrões, somente foi adicionado sacarose. No sistema desnaturante, foram adicionados 2% de SDS e 2,5% de β-mercaptoetanol tanto para as amostras como para os padrões. Em seguida, foram submetidos à 100 °C por 10 min e depois, colocado sacarose. Foram aplicados sempre 40 μL de amostra em cada orifício do gel.

Os padrões (Pharmacia) utilizados na determinação das massas molares (M) das proteínas, através de equação de regressão linear, foram: BSA (67.000 g/mol), ovoalbumina (43.000 g/mol), quimotripsinogênio A (25.000 g/mol) e ribonuclease A (13.700 g/mol), preparados em tampão Na_2PO_4-NaH_2PO_4 0,01 M pH=7, na concentração de 0,01 mg proteína/mL de tampão e sempre aplicados 20 μL da mistura padrão em cada orifído do gel.

Azul de bromofenol 0,001% foi diluído em tampão de corrida a aplicado na parte superior do gel, sendo usado como frente. A eletroforese foi realizada a 15 °C no sistema desnaturante e a 10 °C no sistema não-desnaturante, ambos a 25 mA para cada gel, até que a frente do corante atingisse a extremidade inferior do gel.

As proteínas foram reveladas e fixadas no gel através do método de coloração com prata de OAKLEY (1980).

No caso de se proceder a uma eletrotransferência, foram corridos dois géis idênticos, sendo um revelado com prata e o outro submetido à eletrotransferência.

Para a secagem dos géis, estes foram embebidos numa solução de 50% de metanol contendo 3% de glicerol, por 15 a 30 min e colocados para secar em placas de vidro, envoltos em papel celofane.

TLC - Cromatografia de Camada Delgada

Este procedimento permite a determinação qualitativa da atividade da ASNase através da formação de Asp, que se separa da Asn [SODEK & LEA, 1993].

Após a eletroforese, a placa de vidro frontal foi removida e o gel preso à placa de alumínio foi mantido em gelo. As duas linhas laterais do gel, onde correram as proteínas, foram cortadas em forma de pente, em fatias de 2 mm (para teste de atividade enzimática), de modo que as fatias pudessem ser marcadas exatamente com as bandas protéicas e a atividade da enzima. As fatias foram ainda cortadas em pequenos cubos e imediatamente colocadas em Eppendorfs de 1,5 mL, em gelo, contendo 100 μL de Asn 30 mM em Tris-HCl pH=8 e 100 μL de Tris-HCl pH=8. Após 1 h em banho de gelo para difusão da enzima para o meio de reação, os tubos foram encubados à temperatura ambiente por uma noite. Em seguida, uma alíquota de 75 μL de cada tubo foi removida e misturada com 2 μL de uma solução de $(NH_4)_2SO_4$ 20%. Alíquotas de 15 μL foram aplicadas em placas de cromatografia de celulose-sílica na proporção massa/massa de 10:4, usando fenol-H_2O como solvente de corrida, na proporção massa/volume de 4:1. Os aminoácidos foram revelados com ninidrina (0,5% em acetona). A presença de uma mancha de Asp, indicou a atividade da ASNase. Somente após o gel ter sido denticulado, ele foi corado com prata, conforme já descrito.

Cinética Enzimática

A enzima foi extraída e purificada até a etapa da coluna de fenil Sepharose. As frações com maior atividade foram agrupadas e utilizadas nos ensaios seguintes:

Controle			
Volume (μL)			Concentração final
Asn 30 mM	Tris-HCl pH=8	Extrato	Asn (mM)
50	50	50	10
25	75	50	5
12,5	87,5	50	2,5
6,5	93,5	50	1,3

Este ensaio foi realizado para determinação do K_m da ASNase para Asn, utilizando-se o modelo de Michaelis-Menten e a transformação de Lineweaver-Burk.

A atividade da ASNase também foi testada em presença de dois prováveis inibidores, Gly e Asp, ambos na concentração de 15 mM em Tris-HCl pH=8 em diferentes concentrações de substrato (10; 5; 2,5 e 1,3 mM):

Em presença de inibidor				
Volume (μL)				Concentração final
Asn 30 mM	Gly ou Asp 75 mM	Tris-HCl pH=8	Extrato	Asn (mM)
50	30	20	50	10
25	30	45	50	5
12,5	30	57,5	50	2,5
6,5	30	63,5	50	1,3

O tipo de inibição e o K_I foram determinados pela transformação de Lineweaver-Burk, através das tangentes dos ângulos formados pelas retas.

Os ensaios enzimáticos foram conduzidos como já descrito.

Focalização Isoelétrica

Para determinação do *pI* da ASNase, foi usado o sistema Rotofor Cell (BioRad), que tem por princípio a separação de compostos de acordo com o *pI* de cada um num gradiente de *pH*. O sistema mantém a atividade de uma enzima, já que as proteínas estão em solução na sua conformação nativa.

Amostras de ASNase provenientes do EB precipitado com $(NH_4)_2SO_4$ e eluída em G-25; da coluna de LH-20 e da coluna de fenil Sepharose foram aplicadas neste sistema. Utilizou-se sempre 11 mL de amostra para volume total de 55 mL de H_2O deionizada contendo 10% de glicerol e 1% de anfolinas 40% (*pH* 3 a 10 - BioRad). Desse modo, a concentração de KCl passou a ser 10 mM e de Ca^{2+} 32 μM. A corrida foi feita a 2 °C, durante 2 h, com corrente máxima de 100 mA e tensão máxima de 15 W. Após a corrida, amostras de 2 mL foram coletadas de uma só vez conforme o sistema coletor do aparelho, sob vácuo, em tubos de ensaio. O *pH* e a atividade de cada fração foram verificados através de fita graduada (Merck) com quatro indicadores diferentes de *pH* e do teste enzimático para ASNase, já descrito.

As frações provenientes da focalização foram aplicadas em eletroforese não-desnaturante para identificação das bandas e para verificar o grau de purificação obtido pelo Rotofor. Os géis foram corados com prata.

Dosagem de Proteínas

As proteínas das frações solúveis provenientes das várias etapas de purificação foram quantificadas de acordo com o método de BRADFORD (1976), utilizando-se BSA (Sigma) como padrão, dentro de um intervalo de 1,5 a 10 μg de proteína padrão, e 300 μL de amostra para 3 mL do reagente. Os resultados foram obtidos através de equação de regressão linear.

Produção de Anticorpos

Imunização de Animais

Após a purificação da ASNase na coluna de Mono-Q (FPLC), a enzima foi dialisada contra água deionizada e a seguir liofilizada. Este material foi solubilizado em tampão PBS 0,15 M (8 g de NaCl + 0,2 g de KCl + 0,2 g de KH_2PO_4 1,15 g de Na_2HPO_4 anidro), no momento em que foi feita a imunização dos animais [HAMES & RICKWOOD, 1990]. Foram utilizados três coelhos de raça Nova Zelândia.

Um mesmo volume de enzima solubilizada e de adjuvante foi usado para imunização. Um dos animais foi usado como controle e nele foi aplicado somente a solução tampão em adjuvante, e foi denominado "não-imunizado" (NI). O segundo coelho foi imunizado com o polipeptídeo de 85.000 g/mol, verificado em gel de eletroforese não-desnaturante corado com prata. No terceiro animal foram aplicadas frações que continham basicamente a enzima principal, todavia, contendo traços daquela de 85.000 g/mol. A primeira admininstração do antígeno foi intramuscular e com adjuvante completo de Freund (Sigma).

Após três semanas foi feito o primeiro reforço e na sétima semana, o segundo, sendo que em ambos os casos, a administração do antígeno foi subcutânea e foi utilizado adjuvante incompleto de Freund (Sigma).

Na quarta e oitava semanas, foi coletado sangue das orelhas dos animais. Após uma hora, à temperatura ambiente para formar o coágulo, o sangue ficou sob temperatura de 4 °C por uma noite e então, centrifugado a 12.000 x g por 15 min e o soro retirado com pipeta Pasteur. Este soro foi testado em ELISA para verificar o nível de titulação de anticorpos.

Reação de ELISA

Esta técnica consiste numa reação entre antígeno e anticorpo quando um destes está adsorvido à uma placa de poliestireno ou polivinil, sendo bastante sensível e

utilizada na detecção e quantificação de antígenos e anticorpos [VAZ, 1989]. Neste trabalho foi utilizado o método indireto, no qual o antígeno é que está adsorvido à placa. Acrescenta-se então, a solução que supostamente contêm anticorpos contra o antígeno (primeiro anticorpo). Um anti-anticorpo ligado à uma enzima (segundo anticorpo) é adicionado à placa e coloca-se o substrato da enzima. Haverá a formação de um produto colorido que pode ser lido em espectrofotômetro. A variação de cor é proporcional à quantidade de anticorpo adsorvido na placa, por sua vez proporcional à concentração na solução. No caso da peroxidase, esta reage com seus substratos, H_2O_2 e OPD, formando um complexo que, na presença de um doador de elétrons (revelador), forma um composto colorido.

A reação é desenvolvida em placas com uma série de pocinhos onde são colocados os reagentes [JOHNSTONE & THORPE, 1987].

Os reagentes utilizados neste ensaio foram:

a- Tampão $NaHCO_3$-Na_2CO_3 0,2 M pH=9,6 contendo 0,2% de NaN_3

b- Tampão PBS 0,15 M pH=7,2 contendo 0,05% de Tween (v/v)

c- Solução de BSA 1% em PBS/Tween

d- H_2SO_4 2 M

e- Um tablete de 30 mg de OPD dissolvido, antes do uso, em 3 mL de metanol e, antes de completar para 100 mL de H_2O destilada, deve ser acrescentado 100 μL de H_2O_2 30% para concentração final de 0,03%.

Foi utilizada como antígeno, ASNase extraída de semente imatura de ervilha após a primeira centrifugação. A quantidade de proteínas foi determinada e foram preparados dois extratos, um contendo 1 μg de proteína/mL e outro, com 100 μg de proteína/mL de extrato.

A placa de ELISA foi montada de acordo com o esquema a seguir.

	1	2	3	4	5 puro	6 10^{-1}	7 10^{-2}	8 10^{-3}	9 10^{-4}	10 10^{-5}	11 10^{-6}	12 10^{-7}	[prot.] (μg/mL)
A													1
B													100
C													1
D													100
E													1
F													1
G													100
H													100

As colunas 1, 2, 3 e 4 são controles e as demais contêm o primeiro anticorpo nas diluições indicadas.

Na coluna 1 não foram colocados o antígeno, o primeiro e o segundo anticorpos.

Na coluna 2 não foi colocado o antígeno.

Na coluna 3 não foi colocado o primeiro anticorpo.

Na coluna 4 não foi colocado o segundo anticorpo.

Nas linhas A e B foi colocado anticorpo pré-imune.

Nas linhas C e D foi colocado anticorpo contra o polipeptídeo de 85.000 g/mol.

Nas linhas E, F, G e H foi colocado anticorpo contra a proteína de 69.000 g/mol.

A placa foi coberta com parafilme e permaneceu a 4 °C por uma noite. Em seguida, foi lavada com água para remover toda proteína não ligada à superfície dos pocinhos e foram colocados 200 μL de PBS/Tween/BSA em cada orifício, para saturar os sítios de ligação, durante 1 h à temperatura ambiente. A placa foi lavada com água e foram colocados 200 μL do soro dos coelhos, primeiro anticorpo (não-imunizado, anticorpo contra a proteína de 85.000 g/mol e a ASNase), diluído 1:1.000 e encubado durante 1 h.

A placa foi lavada com água e colocados 200 μL do segundo anticorpo (anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase - Sigma) em PBS/Tween em 1:2.000 v/v por 90 min. A placa foi lavada com água e a seguir, foram colocados 200 μL

de substrato para peroxidase, OPD/H_2O_2, em cada poço e encubado à temperatura ambiente por 20-30 min para desenvolvimento da cor. A reação foi interrompida com 50 μL H_2SO_4 2 M. A placa foi lida em leitora de placa de ELISA a 492 nm.

Purificação de Imunoglobulinas

Após verificar a titulação no teste de ELISA, as imunoglobulinas do soro foram purificadas, baseado em HAMES & RICKWOOD (1990). Primeiro, a fração IgG do soro foi precipitada com $(NH_4)_2SO_4$ para uma saturação de 50%. Este material foi centrifugado a 35.000 x g por 15 min e o precipitado ressuspendido com tampão PBS e dialisado contra este mesmo tampão por 24 h, para retirar o $(NH_4)_2SO_4$.

Em seguida, a fração IgG foi aplicada numa coluna de afinidade de Proteína-A Sepharose, que está ligada covalentemente numa matriz insolúvel. As IgG de coelho têm alta afinidade por esta proteína e ficam retidas na coluna. Esta afinidade pode ser afetada por *pH*, temperatura e força iônica. A amostra é aplicada num meio de neutro a levemente alcalino, para efetivar a ligação entre o anticorpo e a matriz através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Força iônica e *pH* baixos rompem estas ligações [WESELAKE & JAIN, 1992].

Foi utilizada uma coluna de Proteína-A Sepharose (9,7 x 1,2 cm - Pharmacia), previamente equilibrada com tampão PBS. Foram coletadas frações de 3,2 mL num fluxo constante de 1 mL/min. A amostra foi aplicada com este mesmo tampão e após a lavagem e a saída do pico de proteínas, monitorado em espectrofotômetro a 280 nm, o tampão PBS foi trocado por Gly-HCl 0,1 M *pH*=2,5. Após a saída de outro pico em 280 nm, as frações contendo as imunoglobulinas, eluídas com Gly, foram reunidas. Em seguida, a coluna foi novamente equilibrada com tampão PBS e as frações protéicas eluídas com este tampão (primeiro pico a 280 nm) foram novamente aplicadas na coluna, e o mesmo procedimento foi feito para recuperar imunoglobulinas possivelmente não adsorvidas na primeira vez em que foi eluída a amostra. Todas as frações com imunoglobulinas foram reunidas e o *pH* foi elevado para 7,3 com Tris 2 M. Foram separadas em aliquotas de 200 μL e congeladas para serem utilizadas em testes imunoquímicos.

Eletrotransferência de Proteínas

Membrana de Nitrocelulose e Reação com o Anticorpo

Neste método, as proteínas são transferidas de um gel de eletroforese para uma matriz de nitrocelulose, onde são ligadas e imobilizadas através de ligações do tipo não-covalentes e interações hidrofóbicas, e onde estão prontamente acessíveis [TOWBIN *et al*, 1979, HAMES & RICKWOOD, 1990].

Após a eletroforese, um dos géis foi corado com prata e o outro, mergulhado em tampão de corrida contendo 20% de metanol, sem SDS por no mínimo 30 min. Nesta mesma solução também foram colocados 18 pedaços de papel de filtro tipo Watman nº 3 e a membrana de celulose, previamente cortados do tamanho do gel. No aparelho de transferência (sistema Multiphor II - Pharmacia), foi montado um "sanduíche" com: 9 pedaços de papel + membrana de nitrocelulose + gel + 9 pedaços de papel, de acordo com as instruções do fabricante. A transferência procedeu a 0,8 mA/cm^2 por 3 h.

Após a transferência, o gel foi corado com prata e a membrana foi colocada em TBS (Tris 10 mM + NaCl 0,9% pH=7,5), a 4 °C por uma noite. No outro dia, a membrana foi tratada como se segue:

- mergulhada em TBS contendo 3% de leite em pó desnatado por 1 h (solução bloqueadora).
- lavada com TBS contendo Tween 20 0,1% (3 x 10 min).
- encubada por 2 h com o anticorpo produzido, diluído 1:400 no caso de *Crotalaria juncea* e de *Crotalaria zanzibarica*[2], 1:500 para *Lupinus polyphyllus* [3] e 1:50 para todos os anticorpos produzidos contra as proteínas da semente de ervilha (NI, contra a banda de 85.000 g/mol e a ASNase).
- lavada com TBS contendo Tween 20 0,1% (3 x 10 min).

[2]Ambos produzidos por AGUIAR, 1995

[3]Produzidos por SODEK & LEA, 1993)

- encubada por 1 h com anticorpo anti IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma A9915) 1:15.000 em TBS 100 mM contendo Tween 0,1% e $MgCl_2$ 5 mM pH=9,5.

- lavada com o mesmo tampão anterior sem o anticorpo (3 x 10 min).

- encubada com o substrato para fosfatase: para isso, foi preparado 50 mg de NBT/mL em dimetilformamida 70% (A), 25 mg de BCIP/mL em dimetilformamida 50% (B) e Tris-HCl 100 mM contendo NaCl 100 mM e $MgCl_2$ 5 mM pH=9,5 (C). A membrana foi encubada numa solução de 25 mL de C, contendo 165 μL de A e 165 μL de B.

- após a revelação, foi lavada e armazenada em água a 4 °C no escuro.

Se o anticorpo reconhecer o antígeno, o anticorpo fica retido nas bandas que o contêm. O segundo anticorpo reconhece o anticorpo produzido e forma-se uma banda colorida, pois a fosfatase converte o substrato solúvel num precipitado roxo que marca o sítio de ligação do anticorpo. O sistema com fosfatase é mais sensível que a peroxidase quando usada com BCIP e NBT [HAMES & RICKWOOD, 1990].

Nesta técnica, foram utilizados como antígeno o EB de semente imatura, de folhas e de raízes de ervilha, ASNase parcialmente purificada (fenil Sepharose) de semente de ervilha, EB de *Crotalaria juncea e C. paulina* (ambas dependentes de K^+) e EB de *Crotalaria anagiroides e C. zanzibarica* (ambas independentes de K^+) para a reação com os anticorpos, de acordo com as combinações a seguir (x, indica que foi feita a reação).

Antígeno	Anticorpo					
Extrato	NI erv.	85.000	ASNase erv.	C. juncea	C. zanzibarica	L. polyph.
sem. erv.	x	x	x			x
folha erv.			x			
raiz erv.			x			
DEAE				x	x	
fenil-S	x	x	x			x
C. juncea			x			
C. zanzibarica			x			
C. anagiroides			x			
C. paulina			x			

Imunoensaio com Anticorpo Retirado da Membrana de Nitrocelulose

Nesta técnica, adaptada de BUCKERIDGE & REID (1994), o anticorpo é purificado por afinidade na medida em a imunoglobulina da solução policlonal reconhece especificamente um tipo de antígeno na membrana de nitrocelulose e daí é retirado. É então, colocado para encubar com uma outra parte da membrana para que ocorra uma reação altamente específica com o antígeno.

Após a eletrotransferência de proteínas, a membrana foi dividida em três partes: a primeira parte foi revelada com a solução de anticorpos policlonais conforme já descrito, para visualização e identificação das bandas. Na segunda parte da membrana, a banda correspondente à proteína de interesse foi recortada e tratada com solução bloqueadora por 1 h e em seguida, lavada com tampão TBS/Tween (3 x 10 min) e colocada em solução de anticorpo cru (sem diluir) por uma noite. Em seguida, foi lavada com TBS/Tween (3 x 10 min) e colocada em 5 mL de Gly 0,1 M pH=2,5 para que o anticorpo específico que foi ligado à proteína de interesse pudesse

ser desligado da membrana. O *pH* foi ajustado para 7 com NaOH 0,2 M.

A terceira parte da membrana de nitrocelulose foi então tratada com solução bloqueadora por 1 h e lavada em seguida com TBS/Tween (3 x 10 min). Esta parte foi colocada nos 5 mL da solução de anticorpo específico preparada anteriormente por uma noite. Posteriormente, a terceira parte da membrana foi lavada com TBS/Tween por (3 x 10 min), tratada com o segundo anticorpo conjugado e revelada como já descrito.

Todos os dados apresentados neste trabalho foram resultados de pelo menos três repetições.

Resultados

Grandes quantidades de semente imatura de ervilha foram colhidas quando ainda na fase de endosperma líquido, e desse modo, houve alguma variação no conteúdo de proteínas e na atividade da enzima durante os processos de extração e purificação. Desse modo, os resultados apresentados são os mais representativos dentre os obtidos em cada experimento.

Atividade Enzimática da ASNase e a Influência dos Íons K^+ e Ca^{2+}

A atividade total do EB foi em torno de 7,0 μmoles NH_4^+/(h.g de semente) (δ=2,2, n=6) e a atividade específica por volta de 0,98 μmoles NH_4^+/(h.mg proteína) (δ=0,34, n=6).

A ASNase somente foi ativa quando na presença de K^+. Quando na ausência do mesmo, a atividade da enzima foi bastante reduzida, praticamente perdendo-a por completo. O efeito do íon K^+ foi reversível sobre a atividade da enzima. Quando este íon foi eliminado em cromatografia de Sephadex G-25, a ASNase, extraída em presença deste íon, recuperou sua atividade quando K^+ foi recolocado (50 mM) no meio de ensaio (tabela 1).

Durante a extração e também no ensaio, o íon Ca^{2+} não teve efeito sobre a ASNase, após ter sido eliminado em cromatografia de Sephadex G-25 (tabela 2).

Tabela 1: **Efeito do íon K^+ na atividade da ASNase.** Atividade expressa em μmoles de NH_4^+/(h.mL de extrato). Extração em presença de K^+, com eliminação posterior ou não em cromatografia Sephadex G-25.

Cromatografia com K^+	Cromatografia sem K^+	
ensaio com K^+	ensaio com K^+	ensaio sem K^+
0,644	1,028	0,092

Tabela 2: **Efeito do íon Ca^{2+} na atividade específica da ASNase.** Atividade expressa em μmoles de NH_4^+/(h.mL de extrato). Extração da enzima em presença e ausência deste íon.

Etapa	Extração com Ca^{2+}		Extração sem Ca^{2+}	
	ensaio com Ca^{2+}	ensaio sem Ca^{2+}	ensaio com Ca^{2+}	ensaio sem Ca^{2+}
EB	1,66	2,20	1,75	1,80

Quando EGTA, um quelante específico de íon Ca^{2+}, foi adicionado ao meio do ensaio (concentração final 1,6 mM), nenhuma alteração na atividade da ASNase foi verificada (dados não mostrados).

O efeito do íon Ca^{2+} pôde ser observado numa etapa mais adiantada de purificação (fenil Sepharose). Uma atividade mais alta pôde ser recuperada quando a purificação foi realizada em presença de Ca^{2+} (160 μM), quando comparada com a purificação realizada na ausência deste íon (tabela 3).

Devido à instabilidade da enzima, outras concentrações de Ca^{2+} também foram testadas. A enzima foi extraída com Ca^{2+} (5 mM) e os extratos foram purificados até fenil Sepharose, quando então, foi feita a troca (coluna Sephadex G-25) para as outras concentrações de Ca^{2+}: 1 mM, 160 μM e para o controle (ausência de Ca^{2+}). A tabela 4 mostra que a concentração ideal de Ca^{2+}, onde pôde-se obter atividade máxima para ASNase, foi de 160 μM, embora na concentração de 1 mM, também a enzima tenha mantido alta atividade, sugerindo que neste intervalo não se sucederiam maiores mudanças. Quando este íon está ausente, a atividade é bem menor, o que também ocorreu quando havia um "excesso" de Ca^{2+}.

A partir destes resultados, todas as extrações e purificações foram realizadas na presença de Ca^{2+} (160 μM).

Não houve diferença de mobilidade da ASNase ou outras alterações possíveis de serem detectadas em eletroforese, quando a enzima foi extraída e purificada na presença e ausência de Ca^{2+} (dados não mostrados).

Tabela 3: **Efeito da presença de Ca^{2+} sobre atividade da ASNase de semente de ervilha.** Atividade expressa em μmoles de NH_4^+/(h.mL de extrato). Extratos eluídos de fenil Sepharose provenientes de purificações realizadas na presença (160 μM) e ausência deste íon.

Etapa	Atividade específica da ASNase	
fenil S	Ca^{2+} ausente	Ca^{2+} presente
	84,0	172,6

Tabela 4: **Efeito de diferentes concentrações de Ca^{2+} na atividade da ASNase de semente de ervilha.** Atividade expressa em μmoles de NH_4^+/(h.mL de extrato). Extratos de enzima purificada em presença de Ca^{2+} (5 mM) até fenil Sepharose e submetida à cromatografia em Sephadex G-25 para se alterar a concentração do íon.

$[Ca^{2+}]$ mM	Atividade específica da ASNase μmoles NH_4^+/(h.mg de proteína)
0	2,84
0,16	77,46
1,0	68,0
5,0	25,9

Purificação da ASNase

A semente de ervilha apresentou pouca quantidade de pigmentos e compostos fenólicos, eliminados logo no início da extração, facilitando as etapas seguintes de purificação. Com os sistemas utilizados, pôde-se determinar a atividade da ASNase por até 10 dias, ou mesmo quando submetida à congelamento a - 20 °C por um mês. Entretanto, nestas duas situações a atividade já estava abaixo de 20%.

A quantidade adequada de semente para se obter uma purificação ideal, adaptada às capacidades das colunas cromatográficas e dos ensaios foi de 20 g. Abaixo deste valor, a diluição do extrato tornava-se muito alta e recuperava-se baixa atividade enzimática, e acima de 20 g, as colunas usadas não separavam as proteínas adequadamente.

Tabela 5: **Purificação da ASNase dependente de K^+ de semente de *Pisum sativum*.**

Etapa	Vol. total mL	Proteína mg/mL	Ativ. esp. μmol/(h.mg prot.)	Fator de purificação	Recuperação ativ. x 100
EB	**100**	**1,909**	**1,0**	**1**	**100**
LH-20	**21**	**0,262**	**10,1**	**10**	**30**
DEAE	**20**	**0,040**	**65,6**	**65**	**27**
fenil-S	**6**	**0,031**	**115,3**	**115**	**11**
S-200	**3,7**	**0,010**	**425,0**	**425**	**8**
Mono-Q	**1**	**0,001**	**1328,0**	**1328**	**1**

Na tabela 5 estão resumidos os dados referentes às principais etapas de purificação de ASNase. Partindo do EB, pôde-se obter um grau de purificação de mais de 1000 vezes. Entre o EB e a passagem pela coluna de LH-20, o extrato foi tratado com $(NH_4)_2SO_4$ e em seguida, com etanol. A precipitação com este sal permitiu uma redução no volume do extrato e uma precipitação seletiva de proteínas para puri-

ficação da ASNase. O tratamento com etanol resultou na precipitação de proteínas sob condições que permitiram à enzima permanecer solúvel e ativa. Após remoção do etanol em cromatografia de Sephadex LH-20, foi constatada uma purificação em torno de 10 vezes.

Durante as etapas seguintes, envolvendo cromatografias de DEAE-Sephacel e fenil Sepharose, praticamente todas as proteínas contaminantes foram eliminadas. Porém, o maior nível de purificação ocorreu nas cromatografias de Sephacryl e Mono-Q. Uma vez purificada, a enzima tornou-se mais estável, apesar da atividade recuperada ter sido bastante reduzida ($\sim$ 1% da atividade inicial).

Como uma das etapas finais de purificação, foi realizada uma cromatografia em sistema de HPEC. Entretanto, não foram possíveis de se obter dados de purificação devido aos volumes muito baixos procedentes desta etapa (60 μl), pois era preciso usar todo o volume do extrato para dosagem da atividade enzimática.

As figuras 1 a 4 mostram os perfis de eluição da ASNase em diferentes etapas de purificação. Em cromatografia de DEAE-Sephacel, a ASNase foi eluída por um gradiente de KCl (50-350 mM) e a figura 1 apresenta a eluição da enzima e das proteínas não adsorvidas e eliminadas nesta etapa. A ASNase foi eluída entre uma concentração de KCl de 125 e 225 mM, em um pico. A purificação alcançada nesta etapa foi em torno de 60 vezes (tabela 5). Outros pequenos picos de "atividade enzimática" foram desconsiderados e atribuídos ao fato de se ter usado um ensaio semi-quantitativo, isto é, sem o tempo zero.

Em cromatografia de fenil Sepharose, a ASNase também foi eluída em um pico, bastante concentrada, e a figura 2 mostra a eluição da enzima e das proteínas não adsorvidas e eliminadas nesta etapa. A maior parte da proteína saiu da coluna antes da troca do tampão contendo 50 mM de KCl. A purificação atingida foi de mais de 100 vezes (tabela 5).

Em cromatografia eletroforética em HPEC, foram obtidos 2 picos muito pequenos de atividade enzimática (dados não apresentados). Resultado semelhante foi obtido em cromatografia de Sephacryl S-200, porém, com picos bem mais altos para identificação das frações com atividade enzimática. Em cromatografia de Sephacryl, foram

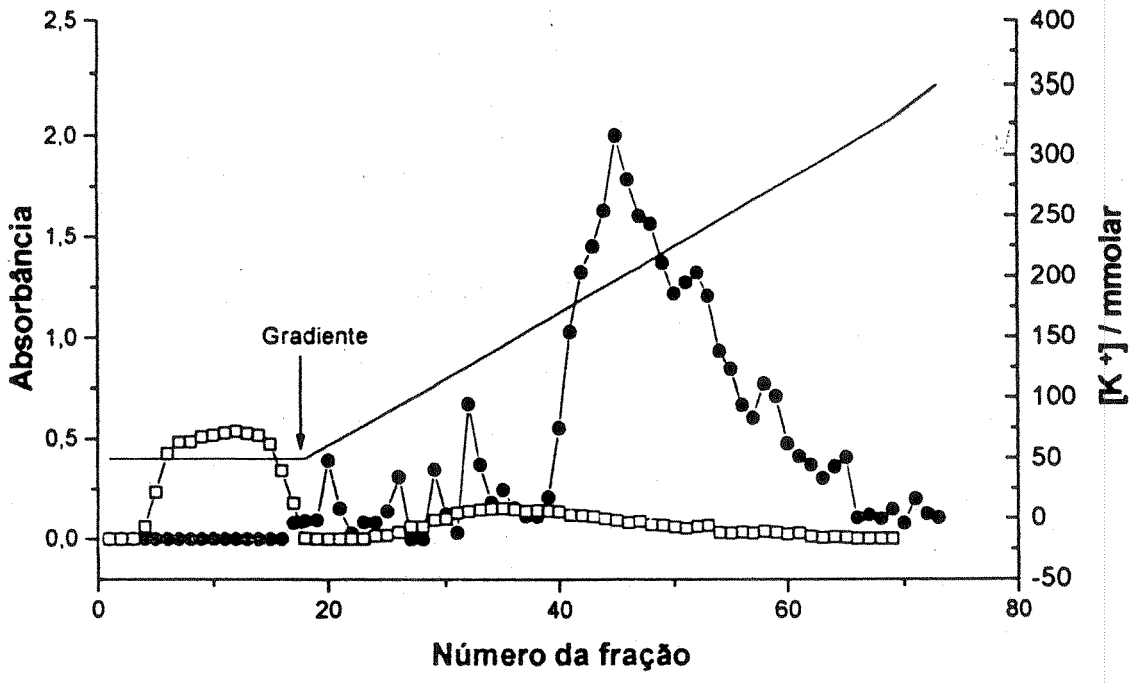


Figura 1: **Purificação da ASNase de semente de *Pisum sativum*: etapa de cromatografia em coluna de DEAE-Sephacel.** As proteínas foram eluídas com um gradiente de KCl entre 50 e 350 mM. A atividade da ASNase (•) é dada pela absorbância a 630 nm, após ensaio semi-quantitativo, e a quantidade de proteínas (□) pela absorbância a 595 nm, após adição do reagente de Bradford. A linha contínua corresponde ao gradiente de KCl.

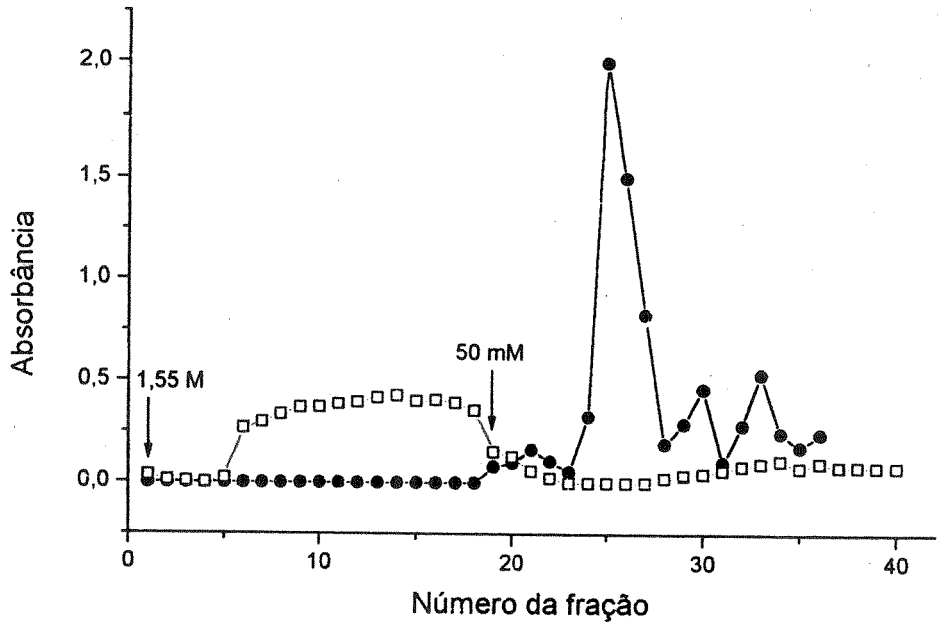


Figura 2: **Purificação da ASNase de semente de *Pisum sativum*: etapa de cromatografia em coluna de fenil Sepharose.** A atividade da ASNase (•) é dada pela absorbância a 630 nm, após ensaio semi-quantitativo, e a quantidade de proteínas (□), pela absorbância a 595 nm, após adição do reagente de Bradford. As setas indicam as concentrações de KCl usadas nos tampões de eluição. Os valores de absorbância a 595 nm foram multiplicados 5 vezes para que a curva pudesse ser destacada.

obtidos 2 picos bem definidos de atividade enzimática (fig. 3). O primeiro corresponde à porção com atividade mais baixa, recolhida em duas frações de 3,7 mL, e o segundo foi o que mostrou a maior atividade de ASNase, sendo portanto, a porção onde está a principal forma da enzima, recolhida em 10 frações. Esta etapa permitiu atingir uma purificação em torno de 400 vezes (tabela 5).

A figura 4 apresenta o perfil de eluição da ASNase em cromatografia em Mono-Q. A enzima foi eluída em poucas frações, num pico bastante estreito. Este sistema permitiu alcançar uma purificação de mais de 1.000 vezes (tabela 5).

Caracterização Eletroforética

Durante o processo de purificação, alíquotas foram retiradas em cada etapa e submetidas à eletroforese em sistema não-desnaturante. A figura 5 mostra os perfis de proteínas obtidos desde o EB até a purificação em fenil Sepharose.

A cromatografia em sistema de HPEC revelou em eletroforese não-desnaturante o mesmo perfil obtido que a fração da enzima eluída em Sephacryl S-200 (dados não mostrados).

A figura 6 mostra a determinação da massa molar das proteínas obtidas nos dois picos de atividade, observados durante a purificação em coluna Sephacryl S-200. O primeiro pico correspondeu a 200.000 g/mol e o segundo de 56 a 100.000 g/mol.

A figura 7 mostra a eletroforese não-desnaturante das frações correspondentes a estes picos. Observa-se que nas frações do primeiro pico, com menor atividade, predominou uma proteína de aproximadamente 200.000 g/mol e naquelas do segundo pico, duas proteínas, uma de 85.000 g/mol, e outra com 69.000 g/mol.

O principal pico de atividade enzimática da Sephacryl S-200 correspondeu à banda de 69.000 g/mol em eletroforese. Este resultado também foi obtido em cromatografia de camada delgada cuja atividade foi verificada com a eluição desta banda do gel (fig. 8). Esta cromatografia também indicou que a banda de 85.000 g/mol não exibia atividade enzimática de ASNase.

A cromatografia em Mono-Q permitiu a separação entre as bandas de 85.000 e

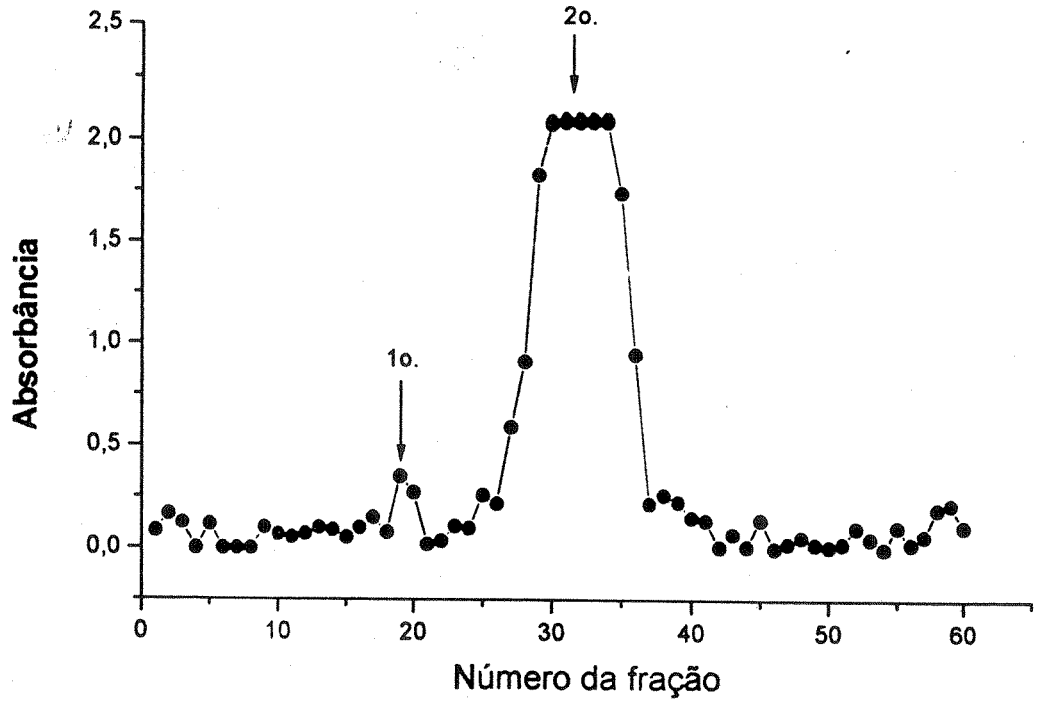


Figura 3: **Purificação da ASNase de semente de *Pisum sativum*: etapa de cromatografia em coluna de Sephacryl S-200.** A atividade da enzima (•) é dada pela absorbância a 630 nm, após ensaio semi-quantitativo. As setas indicam os picos de atividade de ASNase. A fração zero corresponde a 110,0 mL, o volume de cada fração a 3,70 mL e o volume de vazio a 167,35 mL.

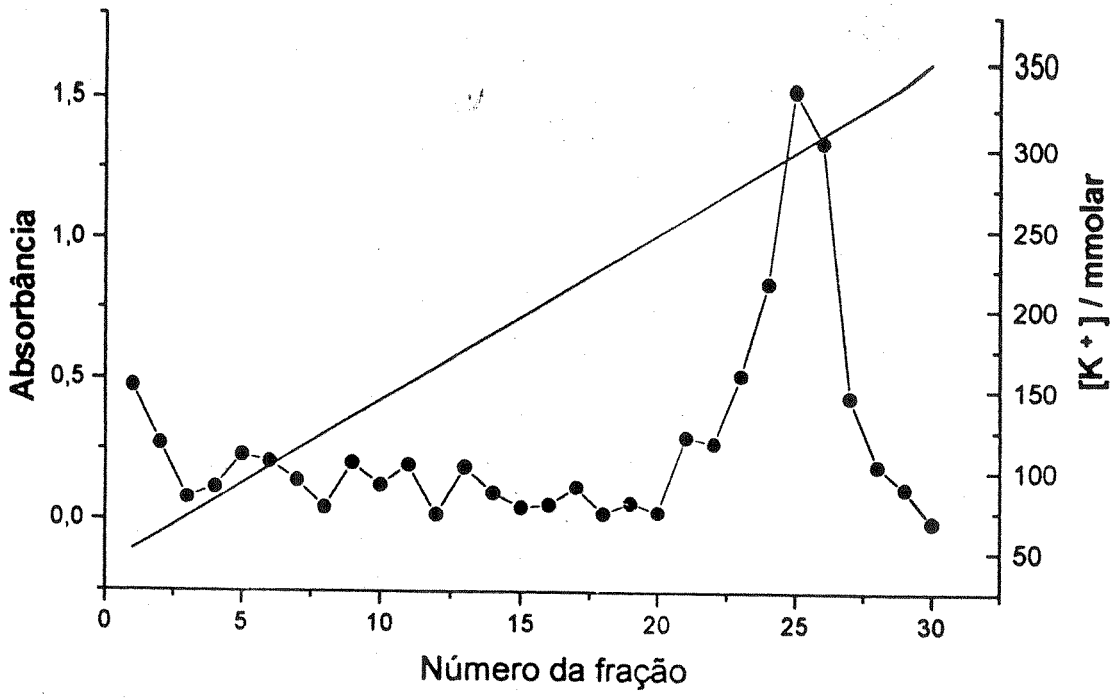


Figura 4: **Purificação da ASNase de semente de *Pisum sativum*: etapa de cromatografia em coluna de Mono-Q HR 5/5.** A enzima foi eluída utilizando um gradiente de KCl entre 50 e 350 mM. A atividade da ASNase (•) é dada pela absorbância a 630 nm, após ensaio semi-quantitativo. A linha contínua representa o gradiente de KCl.

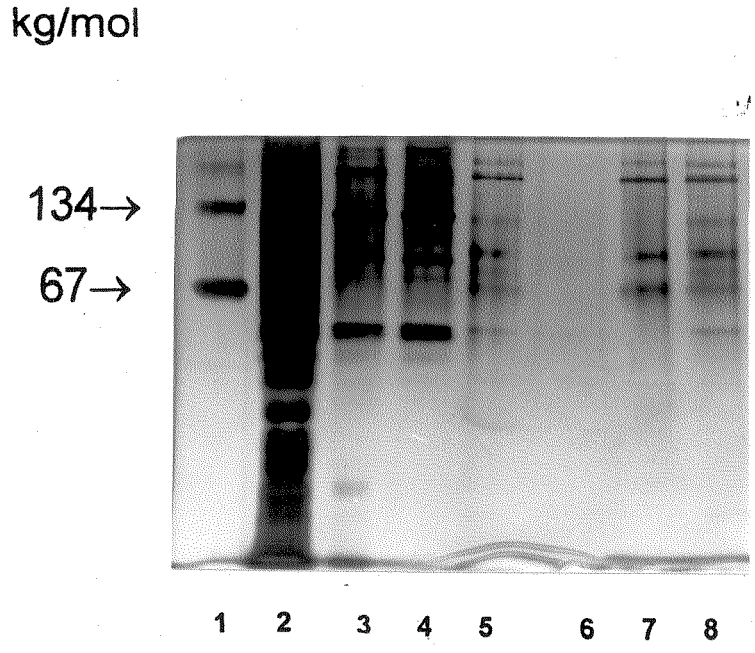


Figura 5: **Eletroforese não-desnaturante de extratos após diversas fases de purificação da ASNase de semente de** *Pisum sativum.* Gel corado com prata. 1- BSA (0,01 mg/mL), monômero (67 kg/mol) e dímero (134 kg/mol), 2- EB de semente, 3- Fração da LH-20, 4- Proteínas não adsorvidas em DEAE-Sephacel, 5 e 8- Frações com maior atividade eluídas da DEAE-Sephacel, 6- Proteínas não adsorvidas em fenil Sepharose e 7- Frações com maior atividade eluídas da fenil Sepharose.

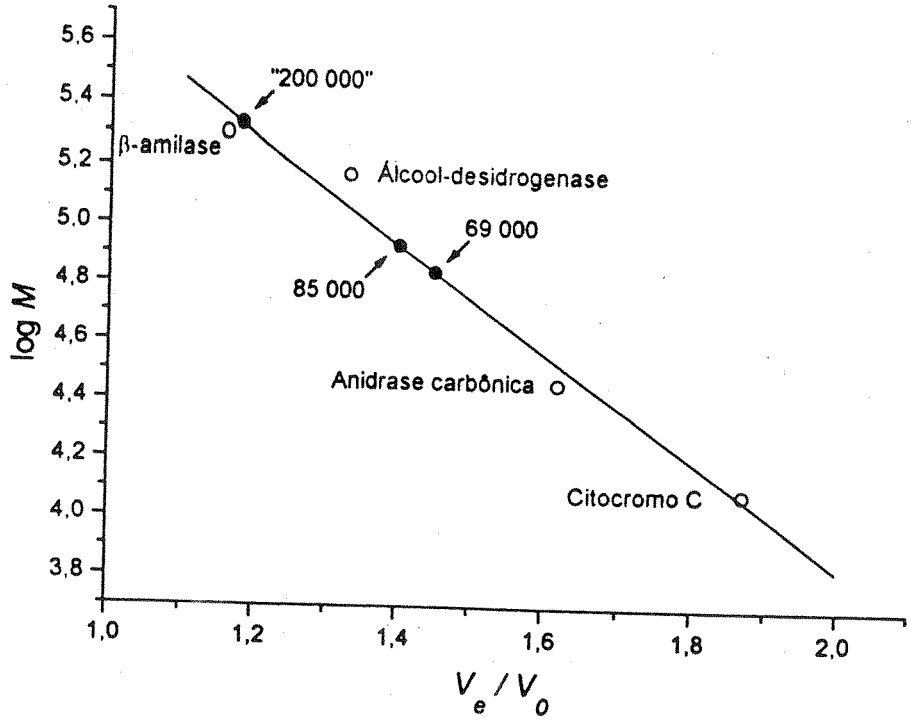


Figura 6: **Determinação da massa molar da ASNase de semente de *Pisum sativum* através de cromatografia em Sephadex S-200.** A massa molar das proteínas de 200.000 g/mol e de 85.000 g/mol, eluídas em fenil Sepharose, também foram determinadas desse modo. (o) Padrões: β-amilase (200.000 g/mol), Álcool desidrogenase (150.000 g/mol), Anidrase carbônica (29.000 g/mol) e Citocromo C (12.000 g/mol). (•) Posição da ASNase e das outras duas proteínas.

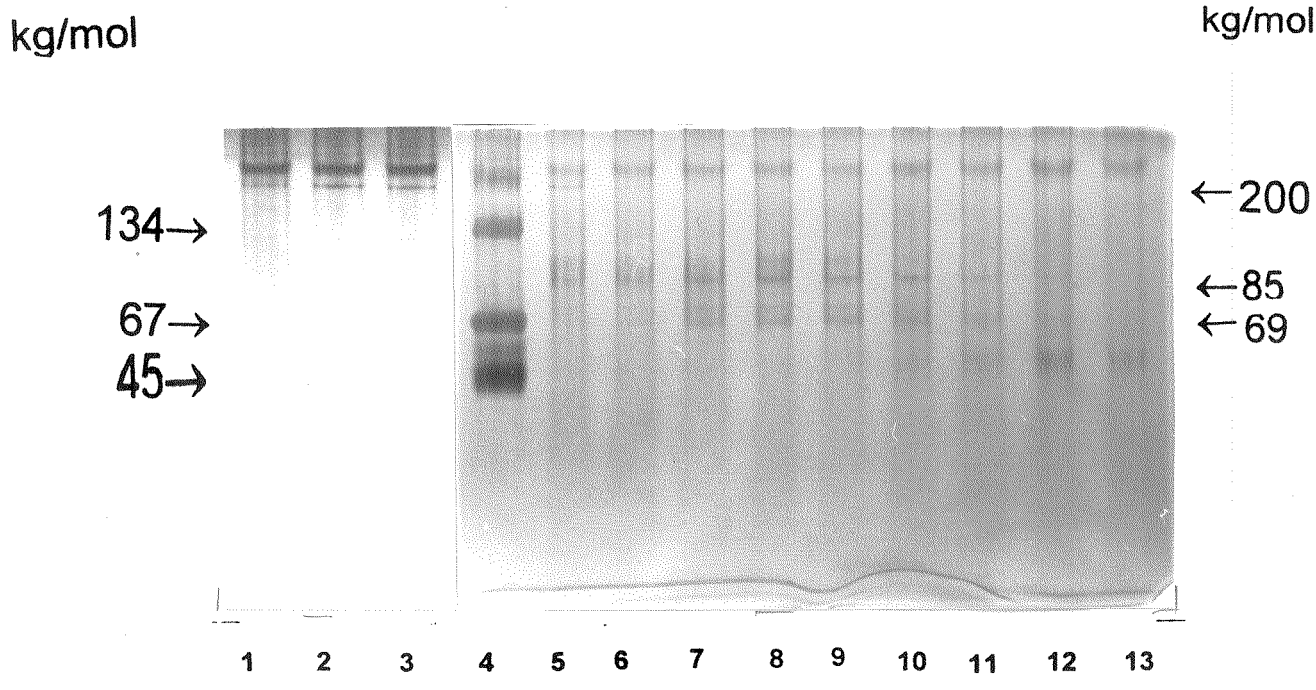


Figura 7: **Caracterização eletroforética de ASNase de semente de *Pisum sativum*, após cromatografia em S-200.** Eletroforese não-desnaturante das frações contidas nos dois picos com atividade de ASNase. 1,2 e 3- Primeiro pico, com atividade enzimática baixa, apresentando a banda de 200.000 g/mol: corresponde às frações 19 a 21 da fig.3. 4- BSA, dímero (134 kg/mol) e monômero (67 kg/mol) e ovoalbumina (45 kg/mol). 5 a 13- Segundo pico, com a principal atividade enzimática, onde se encontraram as bandas de 85.000 e 69.000 g/mol que eluem juntas. Corresponde às frações 29 à 38 da fig.3. A fração 33 não foi introduzida no gel.

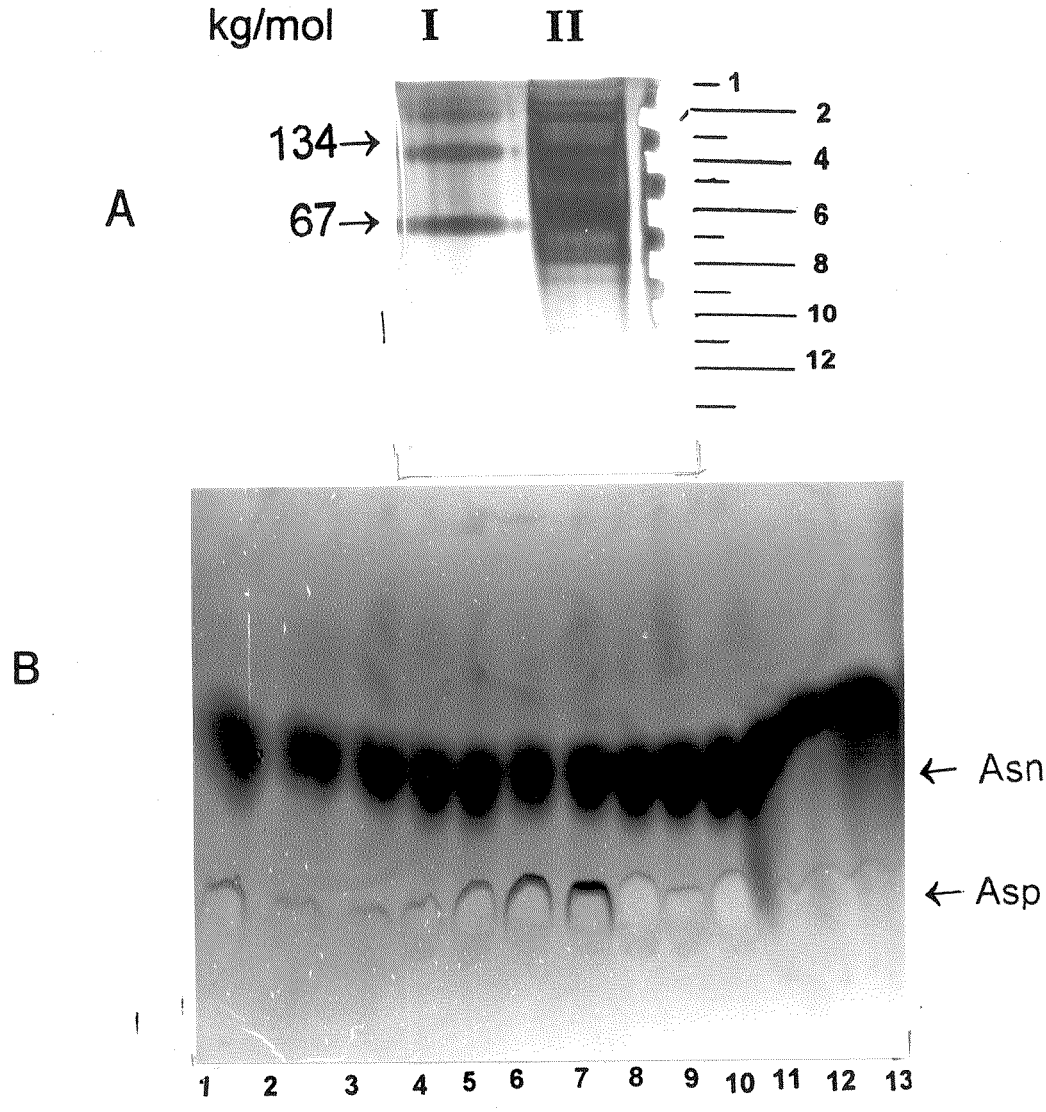


Figura 8: **Caracterização da mobilidade eletroforética de ASNase de semente de *Pisum sativum*.** A= Eletroforese não-desnaturante do material eluído em fenil Sepharose (II). I - BSA, dímero (134 kg/mol) e monômero (67 kg/mol). Proteínas coradas com prata após o gel ter sido denticulado. Os pedaços de gel cortados foram submetidos ao ensaio de determinação de atividade da enzima. Os números de cada dente correspondem às frações na placa de cromatografia de camada delgada (B). Placa revelada com ninidrina. Manchas superiores mais intensas- Asn e manchas inferiores em forma de arco - Asp formado pela ação da enzima.

69.000 g/mol (fig. 9) que eluíram no mesmo pico de atividade em Sephacryl (segundo pico - fig. 7).

As frações provenientes das algumas etapas de purificação (DEAE-Sephacel e fenil Sepharose) e da etapa que apresentou as bandas puras de 85.000 e 69.000 g/mol separadas (Mono-Q), foram submetidas à eletroforese desnaturante. No gel contendo SDS, a principal banda da ASNase, de 69.000 g/mol, não pareceu se dissociar em subunidades menores permanecendo apenas com uma subunidade. Porém, a banda de 85.000 g/mol dissociou-se em subunidades menores em torno de 18.000 g/mol (fig. 10).

Focalização Isoelétrica

O sistema de Rotofor formou um gradiente de *pH* e separou isoeletricamente as proteínas aplicadas. Entretanto, quando foi utilizado o EB, muitas proteínas correram junto com a ASNase e, na análise eletroforética das frações provenientes do Rotofor não houve boa definição das bandas. No Rotofor, a concentração de K^+ foi diminuída para 10 mM e a atividade da ASNase foi reduzida, porém, pôde ser determinada.

Quando foram utilizadas frações provenientes de cromatografia de LH-20, a determinação da atividade ficou bastante reduzida. Contudo, o perfil eletroforético das bandas tornou-se definido (dados não mostrados). Quando foram usadas frações provenientes da cromatografia de fenil Sepharose, não foi possível observar as bandas protéicas em gel, nem dosar a atividade da ASNase devido à baixa concentração de K^+ no sistema Rotofor. A enzima mais purificada, com a falta deste íon, perdeu sua capacidade de ativação e se desestabilizou durante a focalização.

Desse modo, a determinação do *pI* da enzima foi feita utilizando o EB e cada fração foi submetida à eletroforese não-desnaturante. A figura 11 mostra a relação entre o perfil eletroforético de cada fração do Rotofor obtida com aplicação do EB (B) e a atividade da ASNase encontrada em cada uma ao longo do gradiente de *pH* (A - 1º pico). O *pI* determinado para a enzima foi em torno de 4,5 a 5. A presença de grande

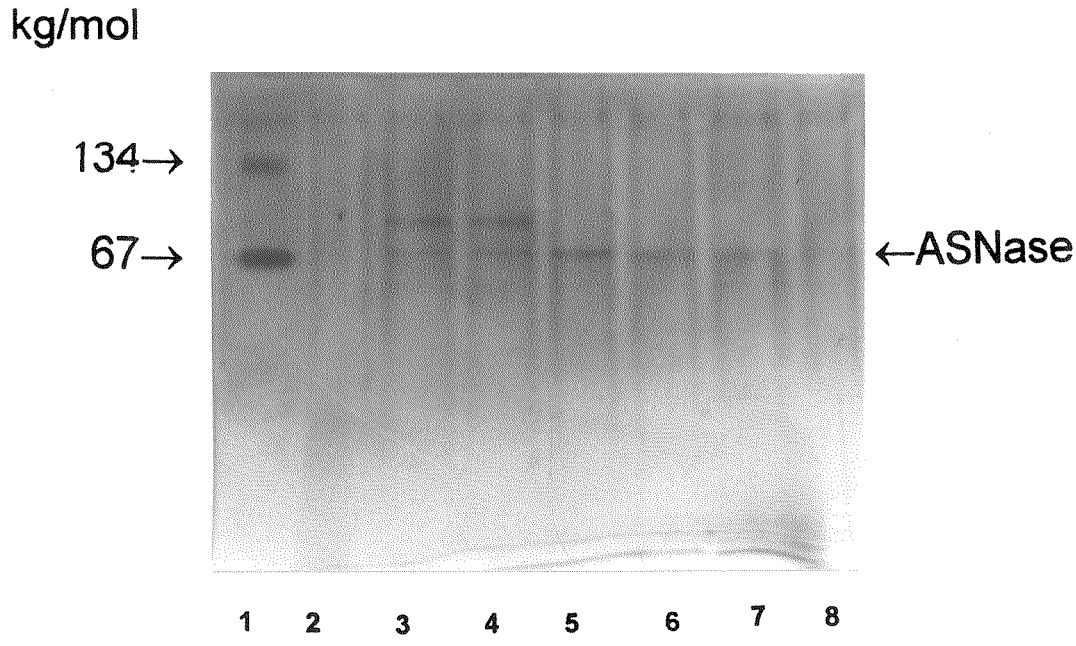


Figura 9: **Caracterização eletroforética de ASNase de semente de *Pisum sativum*, após purificação por cromatografia em Mono-Q.** 2 a 8- Frações do pico com atividade enzimática da coluna de Mono-Q, correspondente às frações 22 a 28 da fig. 4. As maiores atividades foram obtidas nas frações de 5 a 8. As proteínas foram coradas com prata. 1- BSA, dímero (134 kg/mol) e monômero (67 kg/mol).

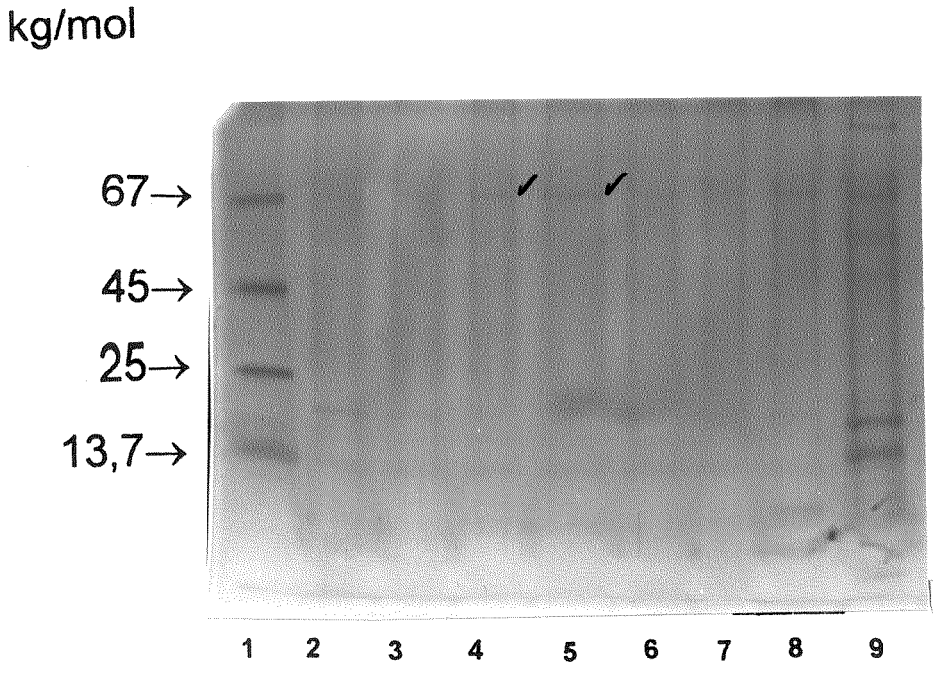


Figura 10: **Caracterização de subunidades de ASNase de semente de *Pisum sativum*, através de eletroforese desnaturante.** As frações de ASNase analisadas são provenientes de algumas etapas de purificação. 1- Padrões: BSA- 67 kg/mol, Ovoalbumina - 45 kg/mol, Quimotripsinogênio A - 25 kg/mol, Ribonuclease A - 13,7 kg/mol. 2 a 7- Frações separadas do pico eluído em Mono-Q com alta atividade enzimática. 2 e 3- Banda isolada de 85 kg/mol (frações 3 e 4 da fig. 9). 4 a 7- Banda isolada de 69 kg/mol (frações 5 e 6 da fig. 9). 8-Fração de DEAE-Sephacel. 9- Fração de fenil Sepharose. A seta na foto indica a subunidade da ASNase.

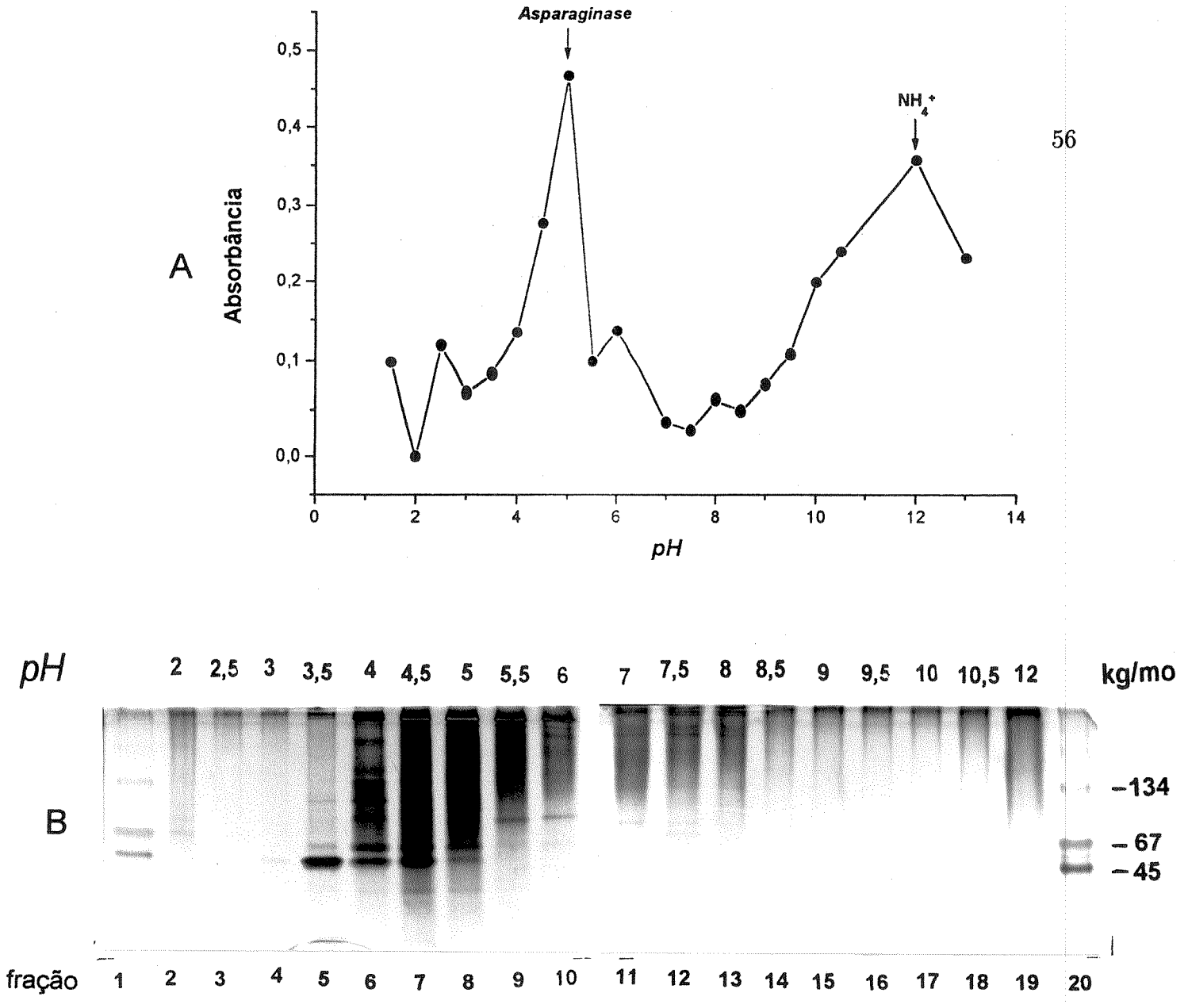


Figura 11: **A= Focalização isoelétrica em sistema Rotofor de ASNase de semente de *Pisum sativum*.** A atividade da ASNase (•) de cada fração é dada pela absorbância a 630 nm, após ensaio semi-quantitativo em função do gradiente de *pH* formado. A seta indica a fração onde foi encontrada a maior atividade da enzima. **B= Análise eletroforética das frações provenientes da focalização isoelétrica.** 1 e 20- BSA, dímero (134 kg/mol) e monômero (67 kg/mol) e Ovoalbumina (45 kg/mol). 2 a 19- Sequência de frações protéicas obtidas ao longo do gradiente de *pH* (2 a 12). 8- Fração onde foi encontrada a maior atividade enzimática correspondente ao *pH* de 4,5 a 5.

quantidade de proteína nesta região impossibilitou uma melhor definição das bandas de proteína obtidas nesta fração. A figura 11-A também apresenta um segundo pico que corresponde aos íons NH_4^+ provenientes do EB que foram separados no sistema Rotofor.

Cinética Enzimática

ASNase de EB e parcialmente purificada (fenil Sepharose) de semente imatura de ervilha foram utilizadas para determinação do K_m e para testes com possíveis inibidores (Gly e Asp). A ASNase apresentou cinética do tipo Michaelis-Menten que foi transformada no modelo de Lineweaver-Burk, mostrando um K_m aparente de 2,4 mM para Asn (fig. 12).

A ASNase foi inibida competitivamente por Gly e Asp, presentes na concentração de 15 mM (fig. 12). Através das tangentes dos ângulos formados pelas retas obtidas pela transformação de Lineweaver-Burk, foram determinados o K_i de 7,7 para Gly 15 mM e de 11,0 mM para Asp 15 mM.

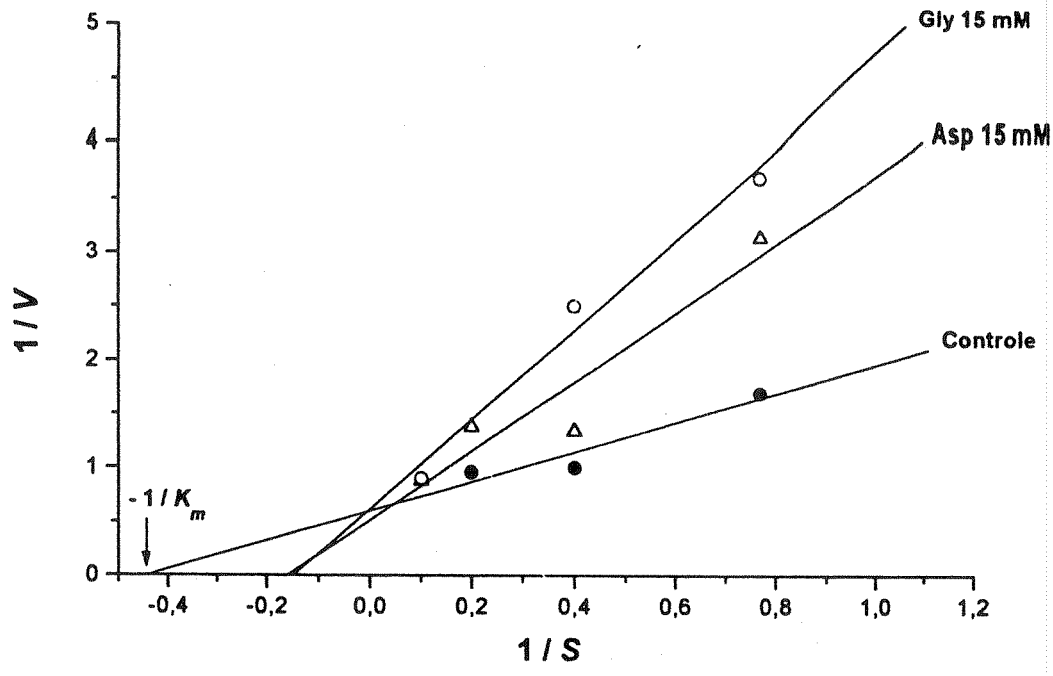


Figura 12: **Estudo cinético da ASNase de semente de** *Pisum sativum.* Gráfico tipo Lineweaver-Burk, na presença e ausência dos inibidores competitivos Gly e Asp. •- controle, △- em presença de Asp 15 mM, o- em presença de Gly 15 mM. O eixo Y está deslocado à esquerda. V= velocidade da reação, S= concentração do substrato (mM).

Reações Imunoquímicas

Ensaios imunoquímicos foram realizados para se determinar especificidade do anticorpo e posteriormente, o grau de homogeneidade entre ASNases de semente de diferentes espécies.

Os anticorpos foram obtidos a partir de extratos purificados contendo ASNase. Através de análises eletroforéticas, verificou-se que o melhor grau de purificação da enzima foi obtido após cromatografia em Mono-Q (tabela 5). Estas frações foram reunidas para a obtenção de anticorpo. Entretanto, tais frações apresentavam durante a eletroforese, além da própria ASNase, uma outra banda, de 85.000 g/mol, que poderia inviabilizar a obtenção de um anticorpo específico para ASNase. Tendo em vista que algumas frações provenientes da cromatografia em Mono-Q apresentavam a banda de 85.000 g/mol pura, elas foram usadas para a obtenção de anticorpo específico desta proteína, para servir como "controle" do anticorpo para ASNase.

Desta forma foram usados três soros para a obtenção de anticorpos neste trabalho: soro do animal não-imunizado, imunizado com a proteína de 85.000 g/mol e imunizado com a fração da ASNase.

Inicialmente, através do teste de ELISA, utilizando EB de semente de ervilha como fonte de antígenos e os soros dos três animais, foi verificado que o sistema imunológico dos mesmos estava produzindo anticorpos contra os antígenos administrados. Após este teste, os anticorpos foram purificados para uso nas análises de eletrotransferência de proteínas e reações imunológicas.

Eletrotransferência de Proteínas e Reações com Anticorpo

Para verificar a especificidade dos anticorpos purificados foi realizada a eletrotransferência, após eletroforese não-desnaturante, de extratos brutos e extratos parcialmente purificados (até fenil Sepharose), seguido por testes imunoquímicos com os anticorpos.

O anticorpo controle (não-imunizado) reconheceu fracamente no EB, uma banda na posição da banda de 200.000 g/mol e duas superiores a esta (fig. 13-A) e ainda outras duas bandas, uma correndo paralelamente ao dímero de BSA (134.000 g/mol) e a outra abaixo deste em torno de 100.000 g/mol e muito fracamente uma banda na posição da ASNase (69.000 g/mol)(fig. 13-A). Nenhuma reação ocorreu quando foi usada ASNase parcialmente purificada (fenil Sepharose) (fig. 13-B).

O anticorpo obtido contra a banda de 85.000 g/mol reconheceu principalmente cinco bandas quando foi usado EB e uma quando foi utilizado extrato de ASNase parcialmente purificada (fenil Sepharose) (fig. 14). Dentre as cinco bandas identificadas no EB, três foram as mesmas vistas no controle (200.000 g/mol e as duas superiores a esta), e portanto consideradas não específicas. As demais foram uma não bem definida e bastante fraca de aproximadamente 85.000 g/mol e a ASNase (69.000 g/mol), que foi a que apresentou reação mais forte. A única banda identificada quando o antígeno foi o extrato da fenil Sepharose foi a ASNase, porém a reação foi bastante fraca (fig. 14-B).

O anticorpo produzido contra ASNase reconheceu basicamente seis bandas quando o antígeno foi o EB e duas, quando foi extrato de ASNase de ervilha parcialmente purificado (fenil Sepharose) (fig. 15). Dentre as seis bandas identificadas pelo anticorpo, estão a de 200.000 g/mol, duas em torno de 85.000 g/mol, a própria ASNase, uma entre 69 e 45.000 g/mol e uma outra em torno de 45.000 g/mol. As duas de 85.000 g/mol, a ASNase e a de 45.000 g/mol foram aquelas que mostraram reações mais fortes e definidas (fig. 15-A). Quando foi usado extrato de fenil Sepharose, as proteínas reconhecidas, foram a de 85.000 g/mol (mais fracamente porém, algumas vezes mais forte) e a própria ASNase (fig. 15-B).

Tendo em vista que o anticorpo reagiu com proteínas não só na posição da ASNase mas, também em três outras posições (duas em torno de 85.000 g/mol e outra com 45.000 g/mol), foram realizados outros ensaios imunológicos visando determinar se as bandas adicionais significavam anticorpo pouco específico (ASNase não purificada suficientemente) ou outras formas da ASNase (anticorpo específico). Para este fim, o anticorpo foi purificado por afinidade usando a própria membrana do ensaio imu-

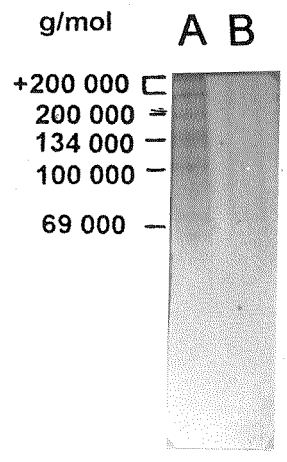


Figura 13: **Eletrotransferência de proteínas a partir de gel de eletroforese não-desnaturante: anticorpo controle (não-imunizado) usado como sonda.** (A) EB e (B) ASNase parcialmente purificada (fenil Sepharose) de semente de *Pisum sativum*.

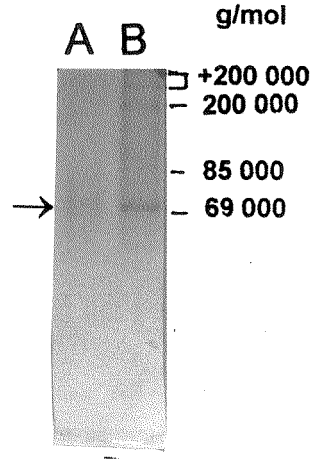


Figura 14: **Eletrotransferência de proteínas a partir de gel de eletroforese não-desnaturante: anticorpo produzido contra a proteína de 85.000 g/mol usado como sonda.** (A) ASNase parcialmente purificada (fenil Sepharose) e (B) EB de semente de *Pisum sativum*. A fraca reação positiva para ASNase em A está indicada com a seta.

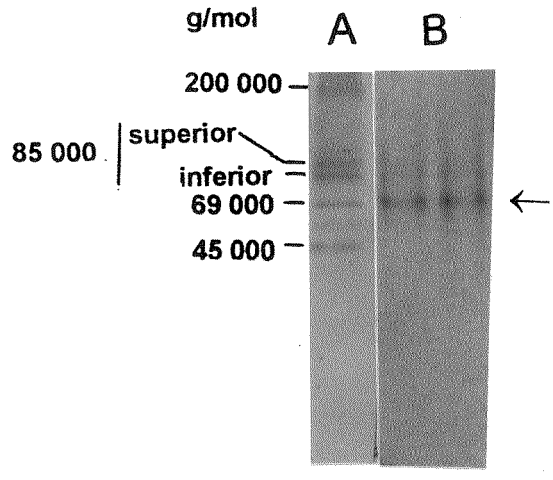


Figura 15: **Eletrotransferência de proteínas a partir de eletroforese não-desnaturante: anticorpo produzido contra ASNase usado como sonda.** (A) EB e (B) ASNase parcialmente purificada (fenil Sepharose) de semente de *Pisum sativum*. A seta indica a ASNase em B.

noquímico (já descrito), isolando-se as quatro bandas com os anticorpos ligados às mesmas. Estas quatro bandas foram reconhecidas pelos anticorpos contra ASNase e foram recortadas para que o anticorpo ligado à cada uma delas fosse desligado da membrana e utilizado numa outra reação imunoquímica, numa outra parte da membrana, tendo como antígeno EB de ervilha (fig. 16).

A superior em torno de 85.000 g/mol reagiu basicamente com ela mesma mas, reconheceu a outra com a massa próxima a ela, com igual intensidade e fracamente a de 45.000 g/mol . A inferior de 85.000 g/mol também reagiu basicamente com ela mas, também reconheceu a superior com a massa próxima a ela, a ASNase e a de 45.000 g/mol, todos fracamente. A ASNase apresentou reação positiva contra ela mesma mas, também com aquela de 85.000 g/mol (mais fraca) e a de 45.000 g/mol (intensidade semelhante a da ASNase) (melhor visualizado na fig. 18). Em geral, os anticorpos específicos de cada banda promoveram reações um pouco mais fortes na posição correspondente a cada uma do que em relação às demais.

Entretanto, o anticorpo específico contra a 45.000 g/mol foi aquele que reagiu fortemente só com a própria proteína, mostrando uma só banda. Interessante ressaltar que este polipeptídeo não foi visualizado em gel de eletroforese corado com prata, quando o material foi analisado para produção de anticorpo.

Os anticorpos policlonais contra ASNase, purificados por afinidade, também foram testados contra extratos de raiz e folhas de ervilha e algumas espécies de *Crotalaria*. Quando o EB de raiz foi usado como antígeno, o anticorpo de ASNase reconheceu muito fracamente (relativo ao controle com EB de semente de ervilha) uma banda em torno de 69.000 g/mol (fig. 17). Quando o EB foi de folhas, houve uma identificação fraca, porém mais nítida em relação à raiz, com a proteína de 69.000 g/mol e também com a de 85.000 g/mol, reconhecendo ainda uma outra proteína com menor mobilidade eletroforética (maior massa molar).

Quando foi usado extrato de semente de espécies de *Crotalaria* como antígeno e anticorpo contra ASNase de semente de ervilha, houve reação com algumas bandas (fig. 18). *C. juncea* (dependente de K^+) apresentou uma banda com a mesma mobilidade eletroforética que a ervilha (69.000 g/mol) e uma bastante fraca em

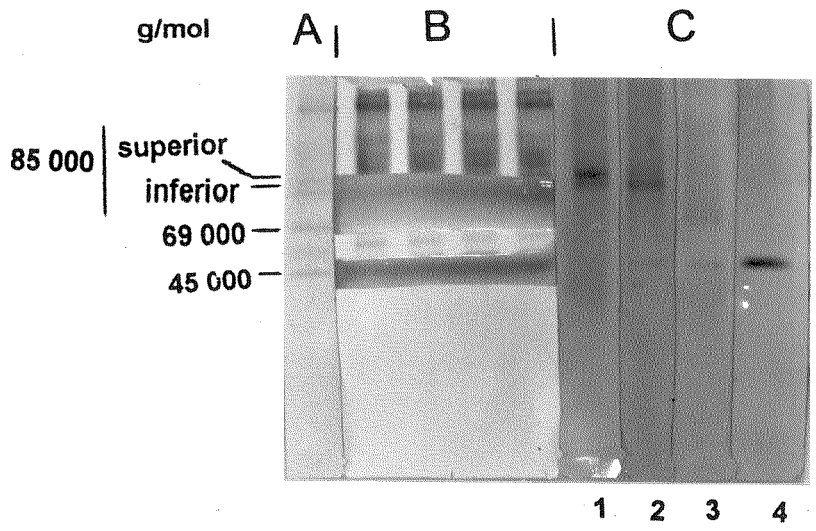


Figura 16: **Eletrotransferência de proteínas a partir de gel de eletroforese não-desnaturante de EB de semente de** *Pisum sativum.* A= Perfil do EB de semente de ervilha revelado com anticorpo contra ASNase. B= Parte da membrana de onde foram recortadas as bandas correspondentes assinaladas em A. As faixas foram recortadas após eletrotransferência e tratamento com anticorpo contra a ASNase. As outras partes da membrana foram reveladas normalmente, enquanto que os anticorpos ligados às faixas recortadas foram dissociados para reutilização na parte C da membrana. C= Reações do EB de semente de ervilha com (1)- Anticorpo ligado à banda de 85.000 g/mol (superior), (2)- Anticorpo ligado à banda de 85.000 g/mol (inferior). (3)- Anticorpo ligado à banda de 69.000 g/mol (ASNase) e (4)- Anticorpo ligado à banda de 45.000 g/mol.

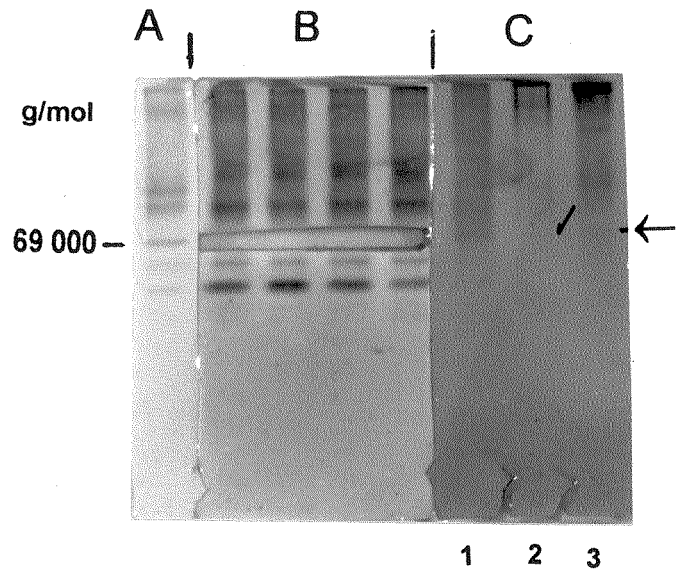


Figura 17: **Eletrotransferência de proteínas a partir de gel de eletroforese não-desnaturante de EB em C, de semente (1), de raiz (2), de folha (3) de** *Pisum sativum*. Membrana revelada por reação imunoquímica, usando como sonda o anticorpo produzido contra ASNase de semente de ervilha. A= Perfil do EB de semente de ervilha. O anticorpo foi purificado por afinidade conforme mostra a parte B. B= EB de semente de ervilha de onde foi cortado o pedaço de membrana de nitrocelulose com bandas de 69.000 g/mol e os anticorpos ligados especificamente à ela. A seta indica a posição da ASNase de ervilha, reconhecida na mesma posição em folha e raiz, porém nesta com menor intensidade.

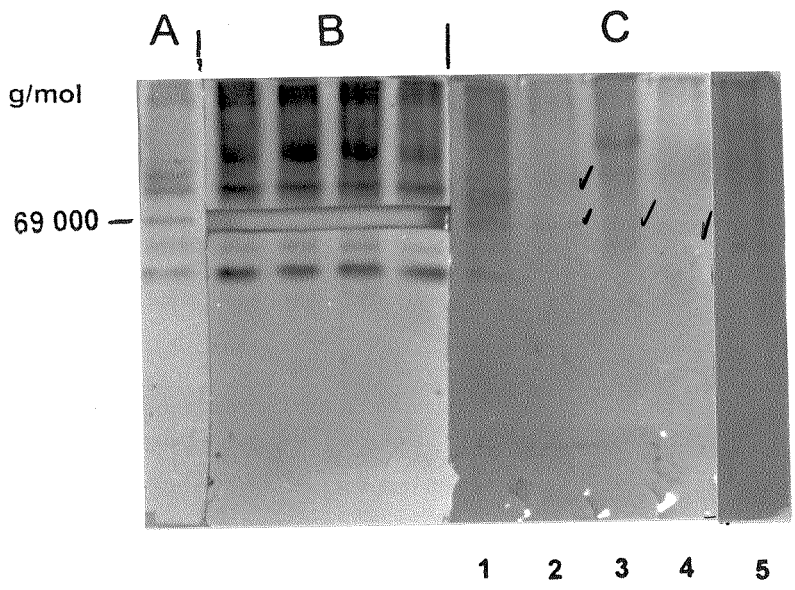


Figura 18: **Eletrotransferência de proteínas a partir de gel de eletroforese não-desnaturante de EB em C, de semente de *Pisum sativum* (1), *C. juncea* (2), *C. zanzibarica* (3), *C. paulina* (4) e *C. anagiroides* (5).** Membrana revelada por reação imunoquímica, usando como sonda o anticorpo produzido contra ASNase de semente de ervilha. A= Perfil do EB de semente de ervilha. O anticorpo foi purificado por afinidade conforme mostra a parte B. B= EB de semente de ervilha de onde foi cortado o pedaço de membrana de nitrocelulose com bandas de 69.000 g/mol e os anticorpos ligados especificamente à ela. A seta na foto indica a posição da banda de 69.000 g/mol identificada em *C. juncea, C. zanzibarica e C. paulina*, ausente em *C. anagiroides*, e da banda de 85.000 g/mol, em *C. juncea.*

torno de 85.000 g/mol. *Crotalaria zanzibarica* (independente) e *C. paulina* (dependente) também mostraram fracamente uma banda não definida na posição de 69.000 g/mol mas, outras também foram reconhecidas, com mobilidade entre o dímero e o monômero de BSA. *C. anagiroides* (independente de K^+) apresentou uma reação muito fraca com uma banda entre 69.000 e 45.000 g/mol, mas não com a banda na mesma posição que a ASNase de ervilha.

Teste com anticorpo específico retirado da membrana também foi feito, utilizando EB de *C. juncea* como antígeno (fig. 19). As quatro principais bandas do EB de semente de ervilha reconhecidas pelo anticorpo de ASNase dessa espécie foram recortadas e os anticorpos ligados à cada uma reagiram separadamente com EB de semente de *C. juncea*, transferido para membrana de nitrocelulose. Os anticorpos específicos para as duas proteínas de 85.000 g/mol reagiram com bandas na mesma posição em *C. juncea* e os anticorpos ligados especificamente à de 85.000 g/mol (inferior) reconheceram ainda, uma banda na posição da ASNase. Os anticorpos específicos para ASNase reconheceram uma banda na mesma posição da enzima (69.000 g/mol). Somente os anticorpos ligados à última banda (45.000 g/mol) não identificaram qualquer proteína em *C. juncea* (reação negativa).

Quando o antígeno foi ASNase de semente de ervilha parcialmente purificada (DEAE-Sephacel) e o anticorpo foi contra a ASNase de *C. juncea*, a mesma banda de 69.000 g/mol também foi identificada. Quando o anticorpo foi contra a ASNase de *C. zanzibarica*, nenhuma banda foi visualizada, talvez porque o anticorpo estivesse mais diluído e houvesse menor concentração de proteínas para que ocorresse a reação (dados não mostrados).

Quando o anticorpo foi contra a ASNase de *L. polyphyllus* e o antígeno, EB de semente de ervilha, houve reação com duas bandas, uma com mobilidade próxima ao dímero de BSA e a outra, abaixo do monômero, entre 69.000 e 45.000 g/mol. Uma reação bastante fraca ocorreu em torno de 85.000 g/mol. Quando o antígeno foi extrato de semente de ervilha proveniente da fenil Sepharose, houve reação com uma só banda que mostrou a mesma mobilidade da ASNase de ervilha (69.000 g/mol) (fig. 20).

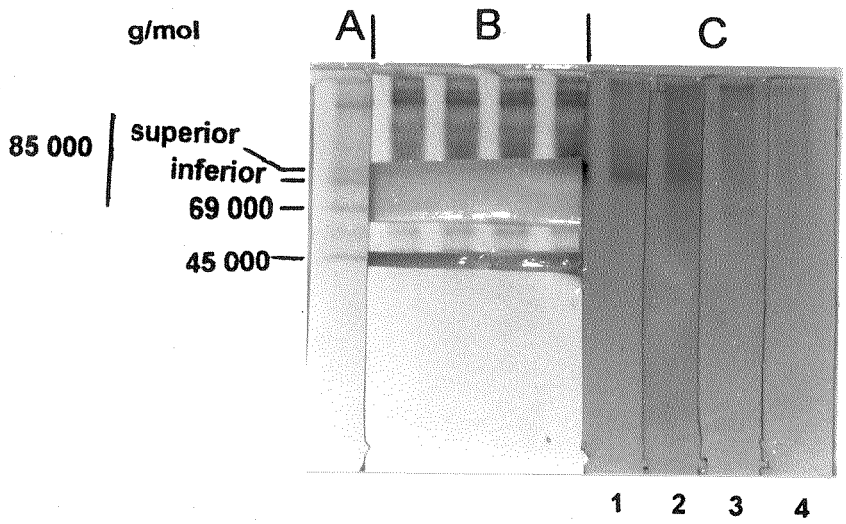


Figura 19: **Eletrotransferência de proteínas a partir** de gel de **eletroforese não-desnaturante de EB de ASNase de semente de** *Pisum sativum* **(A e B) e de semente de** *C. juncea* **(C).** A= Perfil do EB de semente de ervilha revelado usando anticorpo contra ASNase como sonda. B= Parte da membrana tratada com anticorpo contra ASNase e cujos anticorpos específicos de cada banda, assinaladas em A, foram dissociados da membrana para reutilização em C. C= Reações com (1)- Anticorpo ligado à banda de 85.000 g/mol (superior), (2)- Anticorpo ligado à banda de 85.000 g/mol (inferior), (3)- Anticorpo ligado à banda de 69.000 g/mol (ASNase), (4)- Anticorpo ligado à banda de 45.000 g/mol.

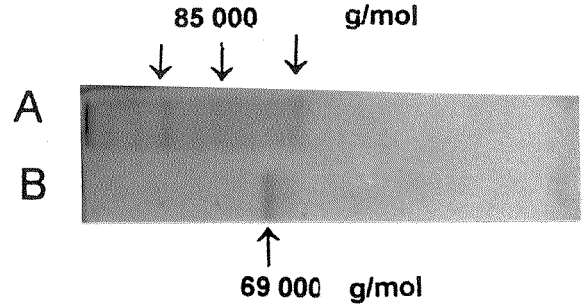


Figura 20: **Eletrotransferência de proteínas a partir de eletroforese não-desnaturante: anticorpo contra ASNase de** *Lupinus polyphyllus* **usado como sonda.** (A) EB e (B) ASNase parcialmente purificada (fenil Sepharose) de semente de *Pisum sativum*. As setas indicam as duas bandas melhor identificadas no EB, aquela de 85.000 g/mol e a ASNase (69.000 g/mol), em B.

Discussão

Dependência ao Íon K^+

A interação de cátions monovalentes com enzimas forma um complexo ternário consistente com a mudança conformacional da proteína e a saturação hiperbólica para ativação catiônica, exercendo um papel importante na manutenção de uma conformação protéica específica, necessária para a eficiência catalítica ótima. Além disso, a ativação por cátions monovalentes é também conservada no seu sentido evolutivo. O padrão de ativação de uma enzima em que a fosforilação de um grupo carbonil ou ânion enolato, as eliminações, resultando num tautômero ceto-enol e outras reações em que o tautômero ou o tautômero em potencial podem ser considerados como um intermediário na sequência hipotética de eventos entre reagentes e produtos, torna-a candidata à ativação por cátions monovalentes [SUELTER, 1970]. E este tipo de reação pode vir a ser estimulado por K^+.

A hidrólise da Asn promovida pela ASNase é um exemplo deste modelo [SUELTER, 1970, SODEK, 1980].

O íon K^+ tem uma participação especial numa ampla gama de processos, incluindo a síntese de proteínas e amido [SUELTER, 1970]. É o principal constituinte inorgânico do citosol, e o contrabalanceador dominante para o excesso de cargas negativas de ácidos nucléicos e proteínas [MAATHUIS & SANDERS, 1996]. A deficiência de K^+ nos organismos pode provocar acúmulo de aminoácidos, proteínas, carboidratos solúveis e redutores; impede-se a síntese de glicogênio, amido e proteínas, processos de importância econômica primária na produção de alimentos; retarda-se

a utilização de substratos respiratórios e diminui-se a fosforilação oxidativa e fotofosforilação e acoplamento ribossômicos. Existem três tipos de mecanismos nos quais o K^+ é responsável pela ativação das enzimas. Pode contribuir para o perfeito funcionamento das enzimas, integrando suas subunidades e estabilizando a estrutura da apoenzima, facilitando a formação da enzima ativa a partir de sua ligação com o cofator [EVANS & WILDES, 1971] e induzir uma mudança conformacional na enzima, necessária para sua atividade catalítica, formando uma ponte entre a mesma e o intermediário ceto-enólico da reação [EVANS & WILDES, 1971, SODEK *et al*, 1980]. Na presença de K^+, a enzima poderá existir uma mistura equilibrada de monômeros, dímeros e trímeros [EVANS & WILDES, 1971].

Quando o íon se liga à enzima, ele perde a esfera de hidratação que fica ao seu redor, podendo alterar a conformação da mesma. Entretanto, estas alterações não são detectadas através de ultracentrifugação ou pela mobilidade eletroforética. A especifidade do íon para ativação é determinada pela energia de interação sítio-íon e a energia livre de hidratação de cátions univalentes [EVANS & WILDES, 1971].

Os resultados mostraram que na ausência de K^+, a ASNase não apresentou atividade, o que indica que o cátion é necessário para a manutenção da enzima no que diz respeito à sua atividade catalítica, o que ocorreu também com outras espécies vegetais [SODEK *et al*, 1980, RATAJCZAK, 1986, CHAPLEO & HALL, 1989]. O efeito do K^+ está associado à um efeito ativador e estabilizador, desde que na ausência deste íon, a enzima teve sua atividade diminuída, indicando uma mudança estrutural, que pode ser revertida ao se adicionar K^+ novamente ao meio de ensaio. Este efeito de recuperação da atividade quando recoloca-se K^+, observado em semente, também ocorreu com ASNase de folha de ervilha [SIECIECHOWICZ & IRELAND, 1989a]. Em feijão alado, a ausência deste íon reduziu a atividade da ASNase de folhas, raízes primárias e tecidos do fruto em 95% em 15 minutos a 30 °C e não foi recuperada após adição de KCl [CHAPLEO & HALL, 1989]. O K^+ não necessariamente está relacionado com o sítio ativo [SUELTER, 1970, EVANS & WILDES, 1971].

Outros íons, como o Rb^+ e o NH_4^+, geralmente, podem substituir o íon K^+

[SUELTER, 1970]. Geralmente, enzimas ativadas por K^+ não o são por Li^+ ou Na^+ [SUELTER, 1970, SODEK *et al*, 1980]. Porém, no caso da ASNase dependente de K^+ de semente de ervilha, Na^+ e Rb^+ foram capazes de produzir atividade à nível significativo ($\sim$ 30%). Numa menor extensão, o Na^+ pôde substituir o K^+ na capacidade de evitar desnaturação com o calor, já que este íon protege a enzima da inativação térmica [EVANS & WILDES, 1971, SODEK *et al*, 1980].

A forma da enzima pode variar em espécies e variedades dentro de um mesmo gênero. LEA *et al* (1984) analisaram 29 variedades de *Lupinus albus* e destas, apenas uma, Lupini Bean, apresentou enzima independente de K^+, enquanto que das 30 variedades analisadas de *Lupinus mutabilis*, metade mostrou ser dependente e a outra metade independente do íon.

Ainda é desconhecido o mecanismo de ativação da ASNase pelo K^+. Uma comparação à nível molecular entre as duas formas dependentes e independentes do K^+ pode ajudar a esclarecer esta questão.

Influência do Íon Ca^{2+}

O íon Ca^{2+} também é fundamental em muitas atividades celulares em tecidos vegetais. Ele pode atuar como segundo mensageiro na síntese de celulose, na atividade de várias enzimas e regulando compostos em diferentes vias metabólicas [ANDERSON & BEARDALL, 1991].

O nível de íons Ca^{2+} livres no citoplasma é normalmente mantido em torno de 10^{-7} M. As ATPases bombeiam o íon através da membrana plasmática para o exterior da célula ou para o interior do lúmem do retículo endoplasmático ou outras organelas que armazenam Ca^{2+}. Pequenas mudanças quantitativas causam um aumento de 10 a 100 vezes na concentração, desencadeando muitas respostas celulares [MUTO, 1992, BUSH, 1993].

Uma pequena proteína de 148 aminoácidos, a calmodulina, presente em todas as células de eucariotos, media muitos efeitos celulares promovidos pelo Ca^{2+}, formando um complexo que envolve quatro íons. Este complexo também ativa várias

proteínas quinases, que fosforilam proteínas alvo e assim alteram suas atividades, e também atua sobre ATPases e níveis celulares de NAD^+ e $NADP^+$ [MUTO, 1992, SNEDDEN *et al*, 1995].

Entretanto, são poucas as enzimas cujas atividades são conhecidas ser influenciadas diretamente por Ca^{2+}. Alguns exemplos são: GDH, NADH-desidrogenase mitocondrial externa, 1-3-β-D-glucano sintase, frutose 1-6-bifosfatase, glutamato-decarboxilase e sedoheptulose 1,6-bifosfatase de cloroplasto [MUTO, 1992, SNEDDEN *et al*, 1995].

Os resultados mostraram que no EB e nos extratos após a etapa em cromatografia em LH-20 de ASNase de semente de ervilha extraídos na presença de Ca^{2+} não foram verificados aumento de atividade da enzima, quando comparados com a extração realizada na ausência deste íon. Provavelmente, isto se deve ao Ca^{2+} proveniente das células do tecido, suficiente para manutenção da atividade da enzima ou para que alterações na mesma não pudessem ser notadas nestas fases.

Entretanto, foi na etapa mais adiantada de purificação (fenil Sepharose) que o efeito deste íon pôde ser observado sobre a atividade da enzima. Pôde-se recuperar maior atividade enzimática, quando a purificação até esta etapa foi feita na presença de Ca^{2+} (160 μM) (tabela 3).

No outro experimento, com extratos provenientes também da etapa de fenil Sepharose, quando foi feita a troca da concentração de Ca^{2+} (foram mantidas concentrações de 5 mM, 1 mM, 160 μM e zero) dos extratos de ASNase parcialmente purificados através de cromatografia em G-25, a atividade da enzima foi reduzida, após extração com Ca^{2+} 5 mM (tabela 4). Das diferentes concentrações de Ca^{2+} testadas, aquela em que foi possível recuperar maior atividade foi 160 μM e desse modo, foi a concentração adotada para todas as purificações.

Entretanto, esta concentração varia para outras enzimas. Por exemplo, para obtenção de atividade máxima de GDH, é preciso somente 1 μM [SODEK *et al*, 1980] e se satura entre 50 e 100 μM [SNEDDEN *et al*, 1995]. A partir de 160 μM, a atividade da enzima se mantem a mesma até 1 mM, quando então começa a declinar. Possivelmente, isto pode ser devido à concentração de Ca^{2+} elevada, visto o nível

deste íon mantido na célula. O Ca^{2+} passaria então, a não mais a auxiliar na estabilidade da ASNase mas, a interferir, como um "inibidor" na atividade da enzima, saturando-a, como ocorre com GAD [SNEDDEN *et al*, 1995].

SIECIECHOWICZ *et al* (1988c) e SIECIECHOWICZ & IRELAND (1989a) observaram que quando a ASNase de folha de ervilha foi extraída na presença de Ca^{2+} 1 mM, houve um aumento na atividade, a V_{max} dobrou, mas seu K_m aparente não foi alterado. Estes efeitos sugeriram que a calmodulina poderia estar envolvida na modificação da atividade da ASNase. No entanto, inibidores da ação da calmodulina não diminuiram a atividade da enzima, indicando que essa proteína não estava modulando a atividade da ASNase [SIECIECHOWICZ *et al*, 1988c]. A estimulação por Ca^{2+} mesmo na ausência de calmodulina pode ser interpretada também como um processo independente desta proteína. A calmodulina poderia estar ligada à enzima e não ser removida durante o processo de purificação [SNEDDEN *et al*, 1995].

No entanto, isso parece pouco provável no caso da ASNase de semente imatura de ervilha já que a atividade não foi recuperada quando Ca^{2+} foi recolocado no meio de ensaio com EB e na etapa de fenil Sepharose sem este íon (neste último caso, após extração e purificação com Ca^{2+} 160 μM, dados não mostrados), e EGTA também não teve efeito sobre a atividade da enzima quando Ca^{2+} estava presente no meio de ensaio. LEA *et al* (1978) também observaram que Ca^{2+} 35 mM, quando recolocado nos ensaios, não promoveu aumento de atividade de ASNase em semente de *Lupinus polyphyllus*.

Entretanto, os resultados sugerem que este íon influencia na atividade enzimática da ASNase durante a purificação. Como o K^+ é o íon mais importante para a atividade da enzima e com o Ca^{2+}, pôde-se recuperar uma atividade maior durante a purificação, sugere-se que o Ca^{2+} esteja envolvido na estabilidade molecular, e desse modo, auxiliando mais indiretamente na manutenção da atividade durante um processo em que a enzima tende a sofrer alterações moleculares e deixar de ser ativa.

Atividade Enzimática e Purificação da ASNase

Na testa da semente imatura de ervilha, a ASNase apresenta atividade máxima antes do aumento de proteínas. No cotilédone, a enzima apresenta atividade máxima quando há máxima produção de proteínas, em torno de 15 a 20 dias depois da ântese [SODEK *et al*, 1980]. Tendo em vista a quantidade menor de proteínas e atividade enzimática maior na testa da semente, este material foi escolhido para realizar a purificação da ASNase. Desta forma, este material estaria de um certo modo mais concentrado com esta proteína.

A ASNase de semente de ervilha foi purificada mais de 1.000 vezes e mostrou uma atividade específica de aproximadamente 22 μmoles/(min.mg de proteína), um pouco maior que à encontrada por SODEK & LEA (1993) ($\sim$ 18 μmoles/(min.mg prot.)), utilizando o mesmo processo e a mesma espécie vegetal, provavelmente devido à melhores condições de purificação.

A ASNase de ervilha apresentou atividade específica no EB maior que a de enzimas independente de K^+ de semente de *Lupinus arboreus* [LOUGH *et al*, 1992a], *Lupinus polyphyllus* [LEA *et al*, 1978] e *Crotalaria zanzibarica* [AGUIAR, 1995] e também superior às dependentes de K^+, *C. juncea e C. paulina* [AGUIAR, 1995]. Quando purificada, também foi superior à todas estas espécies.

A ASNase de ervilha foi mais instável que a enzima de *L. polyphyllus*, independente de K^+ [LEA *et al*, 1978, SODEK & LEA, 1993] e mais estável que *Crotalaria juncea e C. paulina*, dependentes de K^+ e *C. zanzibarica*, independente de K^+ [AGUIAR, 1995].

Entretanto, parece que as enzimas dependentes de K^+ tendem a ser mais instáveis e apresentarem atividade enzimática específica maior que aquelas independentes de K^+ [LEA *et al*, 1984, SODEK & LEA, 1993].

A ASNase de ervilha foi eluída em um só pico em cromatografia de DEAE-Sephacel e fenil Sepharose como também ocorreu com *C. juncea, C. paulina e C. zanzibarica* [AGUIAR, 1995].

Entretanto, quando a enzima foi cromatografada em Sephacryl S-200, mostrou

dois picos com atividade enzimática (fig. 3), sugerindo duas isoformas de ASNase. Isto também foi observado em *C. juncea* e *C. paulina* (dependentes de K^+) diferente de *C. zanzibarica* que apresentou um só pico neste mesmo tipo de cromatografia [AGUIAR, 1995]. Confirmação das duas isoenzimas foi obtida após eletroforese em gel de poliacrilamida, onde duas bandas com atividade de ASNase foram encontradas (fig. 7).

LOUGH *et al* (1992a) também identificaram mais de uma forma enzimática para ASNase de semente de *L. arboreus*. Após cromatografia em fenil-Superose FPLC, esses autores observaram três isoformas da enzima que foram denominadas A, B e C. No entanto, nada comparável a estas isoformas foi encontrado em ervilha.

A cromatografia em Sephacryl passou a ser uma alternativa para o sistema de HPEC (dados não apresentados), quando exatamente os mesmos resultados foram obtidos na purificação de ASNase de semente de ervilha. Além disso, a cromatografia em Sephacryl S-200 foi melhor para purificação da ASNase de semente de ervilha em relação ao sistema de HPEC, na medida em que pôde-se aplicar um volume muito maior na coluna de S-200 e coletar uma fração também maior, permitindo dosagem de proteínas e da atividade enzimática.

Caracterização Eletroforética

A massa molar da principal forma da ASNase de semente imatura de ervilha (69.000 g/mol) foi a mesma encontrada por SODEK *et al* (1980) e foi maior em relação à encontrada em folhas (58.000 g/mol). Contudo, foi menor que aquelas encontradas em *Lupinus sp* (72.000 - 75.000 g/mol), independente de K^+ [CHANG & FARNDEN, 1981, SODEK & LEA, 1993]. SODEK *et al* (1993) determinaram a massa molar da enzima de semente imatura de ervilha em 61.000 g/mol em Sephacryl S-200, menor que a previamente encontrada anteriormente pelos mesmos autores através de gradiente de sacarose (68.300 g/mol) [SODEK *et al*, 1980].

A ASNase de ervilha também mostrou uma outra isoforma com atividade enzimática com massa em torno de 200.000 g/mol, eluída no primeiro pico da croma-

tografia da coluna de Sephacryl S-200.

Segundo AGUIAR (1995), as ASNases de *C. juncea* e *C. paulina*, ambas dependentes de K^+, também apresentaram duas isoformas ativas, eluídas em dois picos em cromatografia de Sephacryl, sendo uma com massa em torno de 600.000 g/mol e a principal isoforma com massa de 100.000 g/mol, diferindo de *C. zanzibarica* (independente), que mostrou uma isoforma também de 100.000 g/mol. HEESCHEN *et al* (1996) também identificou duas isoformas de ASNase em *Sphagnum fallax*, com massa em torno de 126.000 g/mol.

Em eletroforese não-desnaturante, a principal isoforma da ASNase de ervilha também foi verificada na banda de 69.000 g/mol. Entretanto, para *C. juncea*, a principal isoforma foi uma banda de 85.000 g/mol [AGUIAR, 1995].

Parece que as formas da ASNase na sua estrutura nativa tendem a variar entre 60.000 e 100.000 g/mol, independentemente da ligação com o íon K^+.

Em eletroforese não-desnaturante, a ASNase de semente de ervilha não apresentou agregação da estrutura da molécula, nem a enzima encontrada em folha dessa espécie [SIECIECHOWCZ & IRELAND, 1989a], ou nas outras espécies de *Lupinus* [CHANG & FARNDEN, 1981, LOUGH *et al*, 1992a, SODEK & LEZ, 1993] e com *C. zanzibarica* [AGUIAR, 1995]. Entretanto, estudos preliminares realizados por LEA *et al* (1978), utilizando "Ultrogel 34", foi verificado que a enzima pode sofrer agregação na sua estrutura molecular, o que foi observado em *C. juncea* em até seis níveis [AGUIAR, 1995].

A ASNase de ervilha, quando submetida à desnaturação e eletroforese denaturante, apresentou uma única banda de 69.000 g/mol, sendo constituída desse modo, de uma subunidade. LEA *et al* (1978) sugerem que a incapacidade de sais de Hg e *p*-cloromercuribenzoato de inibirem a enzima indica que resíduos de Cys não estão presentes e nem próximos do sítio ativo da ASNase e portanto, não há pontes dissulfeto.

A enzima de *Lupinus polyphyllus*, que apresenta massa de 71.000 g/mol em Sephacryl S-200, é constituída por duas subunidades de 35-36.000 g/mol mais um polipeptídeo de 21.000 g/mol [LEA *et al*, 1978, SODEK & LEA, 1993]. Em espécies de

Lupinus, bandas presentes em géis desnaturantes em torno de 14-19.000 g/mol foram derivadas da enzima por proteólise [LOUGH *et al*, 1992a, SODEK & LEA, 1993]. Estas bandas seriam decorrentes das subunidades de 35-36.000 g/mol, formadoras da proteína de 71.000 g/mol [LOUGH *et al*, 1992b].

Em semente imatura de *L. arboreus* e *L. angustifolius*, duas bandas de intensidade igual coincidentes com a atividade enzimática, não se separaram no pico obtido por filtração em gel (75.000 g/mol). Este pico quando analisado em eletroforese desnaturante mostrou ser constituído de subunidades com massa de 14.000 e de 15.500 g/mol [CHANG & FARNDEN, 1981]. Em eletroforese desnaturante, *C. juncea* e *C. zanzibarica* também se dissociaram em subunidades menores em torno de 25.000 g/mol [AGUIAR, 1995]. A ASNase de *Sphagnum fallax* (126.000 g/mol), em eletroforese desnaturante, também mostrou ser formada por subunidades em torno de 34.500 g/mol, sendo portanto tetramérica [HEESCHEN *et al*, 1996]. Desse modo, as ASNases dessas espécies também seriam formadas por mais de uma subunidade.

A massa molar da aminotransferase, enzima que também utiliza Asn como substrato, está em torno de 100.000 g/mol, podendo também apresentar variações, dependentes da espécie [IRELAND & JOY, 1983b]. Animais e microrganismos apresentam ASNase com massa ao redor de 130.000 ± 20.000 g/mol, portanto, superior à enzima de vegetais [WRISTON & YELLIN, 1973 citado por CHANG & FARNDEN, 1981].

Focalização Isoelétrica

O sistema de Rotofor não pôde ser aproveitado para purificar a enzima ou mesmo separar bandas protéicas que não puderam ser separadas nas colunas cromatográficas.

Usando extrato bruto, foi possível dosar a atividade da enzima, após focalização no sistema Rotofor, pois apesar da concentração de K^+ ser de 10 mM, havia ainda íons NH_4^+ que auxiliam parcialmente a manutenção da atividade da ASNase substituindo o K^+ [SUELTER, 1970, SODEK *et al*, 1980], durante a focalização.

Entretanto, foi preciso ser feita uma alta diluição da amostra para que esta pudesse ser aplicada no Rotofor (o aparelho não permite uma concentração de sal acima de 10 mM), e mesmo concentrando a enzima isoeletricamente, não foi possível detectar atividade ou bandas protéicas no gel em frações mais purificadas. Nestas, praticamente não há mais íons NH_4^+ (eliminado em cromatografia) e como a concentração de K^+ foi bastante reduzida, a atividade que poderia ser parcialmente mantida por estes íons, é perdida.

O *pI* determinado para ASNase em torno de 4,5-5 é próximo do valor estimado por CASADO *et al* (1995), ~ 5,2, calculado através da clonagem do gene da ASNase de *Arabidopsis thaliana* e também às duas isoformas encontradas em *L. arboreus* (4,4 a 4,6), determinado através de focalização isoelétrica em gel [LOUGH *et al* (1992a)].

Cinética Enzimática

O K_m aparente da ASNase obtido para Asn de semente imatura de ervilha foi de 2,4 mM, semelhante ao encontrado por SIECIECHOWICZ & IRELAND (1989) para a ASNase de folha em presença de glicerol, e por CHAPLEO & HALL (1989) em semente de feijão alado (*Psophocarpus tetragonolobus*). Porém, foi um pouco inferior aos encontrados por SODEK *et al* (1980) (3,2 e 3,7 mM para cotilédone e testa, respectivamente) e por IRELAND & JOY (1981) (3 mM) em semente de ervilha.

O K_m da ASNase para Asn de ponta de raiz, de nódulo em desenvolvimento e de extrato de semente variou entre 6 e 8 mM em *Lupinus angustifolius* [CHANG & FARNDEN, 1981] e foi 12,2 mM para *L. polyphyllus* [ATKINS *et al*, 1975], ambas independentes de K^+. Para *L. albus*, foi de 10 mM (dependente de K^+). Porém, neste último caso, os autores não deixaram claro se utilizaram K^+ nos tampões de extração. Neste caso, a enzima é dependente de K^+ e talvez a ausência do íon possa ter interferido na medida do K_m, pois os dados sugerem que as enzimas dependentes de K^+ tendem a apresentar valores de K_m para a Asn inferiores àqueles de enzimas independentes.

O K_m de ASNase para Asn foi estimado em 4,9 μM em nódulos de soja, no bacterióide, semelhante ao K_m encontrado para a enzima de várias espécies de bactérias [STREETER, 1977].

As ASNases de animais e microrganismos apresentam K_m bem inferiores àquelas de vegetais, variando entre 10^{-3} e 10^{-2}, ou seja, possuem uma afinidade para Asn bem superior que a enzima de vegetais. Daí, o insucesso destas últimas nas atividades de controle de células tumorais [WRISTON & YELLIN, 1973 citado por CHANG & FARNDEN, 1981]. CHANG & FARNDEN (1981) estimaram um valor de 30 mM de Asn presentes nas células de semente de *Lupinus albus*, o que permitiria à ASNase, com alto K_m, trabalhar eficientemente.

Os produtos da reação catalisada pela ASNase, Asp e NH_4^+, podem promover uma pequena redução na utilização de Asn, indicando um efeito de retroinibição pelos produtos. Asp e NH_4^+ inibiram a ASNase em 33% da atividade a 6 mM e 6% a 10 mM, respectivamente [SODEK *et al*, 1980].

Foi observado que a ASNase foi inibida competitivamente por Gly e Asp, ou seja, esses dois aminoácidos competem com o substrato pelo mesmo sítio ativo da enzima. Como o Asp é um dos produtos de ação da enzima, sugere-se que este aminoácido seja provavelmente liberado por último, ou seja, seria o produto formado após o NH_4^+. Isto pode ser reforçado pelos resultados obtidos por BAUER *et al* (1977a), em experimentos com NO_3^- marcado com ^{15}N, utilizando folhas de ervilha, observaram que NH_4^+ era o composto mais rapidamente marcado em períodos de luz, e que poderia ser proveniente da redução do NO_3^- ou da quebra da Asn, já que não fora encontrado no xilema. A ação do NH_4^+ sobre a enzima não pôde ser verificada devido ao método utilizado para determinação da atividade enzimática.

Gly também foi um inibidor competitivo de ASNase em semente de *L. arboreus*, apresentando K_I de 5,2 mM [CHANG & FARNDEN, 1981]. Em sementes de 39 dias de *L. arboreus*, após a ântese, estes mesmos autores estimaram a concentração de Gly como sendo em torno de 3 mM e de Asn ao redor de 21 mM, e valendo-se também da localização da ASNase e das enzimas envolvidas na assimilação do NH_4^+ produzido pela ASNase, concluiram que a inibição (competitiva) promovida pela

Gly, provavelmente não interfere em nenhum efeito fenológico.

Reações Imunoquímicas

Nos testes imunoquímicos realizados, usando ASNase parcialmente purificada foi verificado que é difícil, quando não impossível a visualização ou identificação de reações com o anticorpo, o que fez com que fosse utilizado preferencialmente o EB.

O anticorpo produzido contra a proteína de 85.000 g/mol reagiu, no EB, muito fracamente com a própria banda e apresentou uma reação mais forte com a banda da ASNase (69.000 g/mol). A única banda identificada quando o antígeno foi o extrato de ASNase proveniente da fenil Sepharose foi a ASNase. A banda com massa molar de 85.000 g/mol parece estar relacionada com ASNase, pois apresentou alguma homologia, já que anticorpos produzidos contra ela reconheceram a enzima de 69.000 g/mol, mesmo muito fracamente quando a ASNase estava parcialmente purificada. Neste caso, pode ser que a ASNase seja mais antigênica que a proteína de 85.000 g/mol, provocando uma reação "mais intensa" que com a própria banda de 85.000 g/mol.

Dentre os anticorpos produzidos, somente aquele contra ASNase de semente de ervilha reconheceu a enzima parcialmente purificada numa reação mais pronunciada. Entretanto, os anticorpos poderiam estar numa concentração baixa, visto a necessidade de se diluí-los muito pouco para se obter uma reação visível, aliado também à baixa concentração de proteínas no extrato parcialmente purificado, ficando abaixo ou muito próximo do limite de sensibilidade deste método.

Além disso, anticorpos policlonais podem variar sua reatividade com o antígeno. Diferenças em reatividade podem ocorrer a partir de um animal imunizado para outro e variações podem ocorrer entre diferentes sangrias no mesmo animal [EISEN & SISKIND, 1964]. Anticorpos policlonais produzidos em dois animais diferentes, usando o mesmo antígeno, podem variar consideravelmente sua afinidade e especificidade para diferentes partes do antígeno [MURPHY *et al*, 1976].

Os resultados obtidos com os anticorpos produzidos contra a ASNase e utilizando

EB de semente de ervilha como antígeno, sugerem que as bandas identificadas pelos anticorpos apresentam certo grau de homologia com a própria ASNase, dado que o anticorpo contra ASNase purificado por afinidade apresentou reação cruzada com as duas bandas em torno de 85.000 g/mol, a própria ASNase e aquela em torno de 45.000 g/mol (fig. 17 e 18). Essas bandas poderiam ser fragmentos da enzima que sofre alguma degradação durante os processos de extração e purificação ou durante o processo de amadurecimento da semente, ou mesmo, fragmentos precursores da ASNase; ou poderiam ser ainda formas inativas da enzima.

Quando anticorpos específicos "purificados por afinidade" contra a proteína de 45.000 g/mol foram retirados da membrana, eles somente reagiram com a própria proteína. Ela poderia ser um fator "contaminante" não visível em gel de eletroforese corado com prata mas, que teria relação com a enzima de ervilha. Porém os resultados sugerem que esta proteína seria antigênica o suficiente para que o sistema imunológico do animal pudesse ser sensibilizado para produzir anticorpo contra a mesma. Assim sendo, quando foi feita a reação com anticorpos específicos para esta proteína retirados da membrana, a reação de identificação com ela mesma seria tão forte e com as demais tão fraca que não seria possível visualizar estas últimas. A ASNase não sendo tão antigênica como esta proteína, reage do mesmo modo. Entretanto, como a reação dos anticorpos contra a enzima reconhecendo ela própria não foi tão forte, pôde-se visualizar outras reações de identificação. Modificações químicas no anticorpo imobilizado também podem promover uma redução de sua atividade pelo antígeno [WESELAKE & JAIN, 1992].

Oa anticorpos purificados por afinidade ligados à banda de 45.000 g/mol também poderiam não ter reconhecido a ASNase devido à uma mudança estrutural da enzima. A ASNase ao ser "cortada", liberaria o fragmento de 45.000 g/mol. Este sofreria uma mudança estrutural, permitindo que epitopos que estavam antes inacessíveis ao anticorpo, pudessem ficar agora expostos, o que resultaria numa reação mais intensa com o próprio fragmento.

Os anticorpos produzidos contra ASNase purificada de semente imatura de ervilha reconheceram bandas na mesma posição (69.000 g/mol) em folhas e raízes de

ervilha. Nas folhas houve uma reação bem mais evidente do que nas raízes, o que seria esperado já que a presença da enzima já foi bastante documentada neste órgão. A banda não ficou bem definida (difusa) porém, se localiza numa região onde se encontraria a de folhas (58.000 g/mol) [SIECIECHOWICZ *et al*, 1985, SIECIECHOWICZ *et al*, 1988b, SIECIECHOWICZ & IRELAND, 1989a]. A banda de 85.000 g/mol também foi identificada, sugerindo novamente que ela tem alguma relação com a ASNase. Entretanto, a reação de identificação com EB de raízes foi mais fraca, muito provavelmente porque neste órgão em ervilha há pouca atividade de ASNase [IRELAND & JOY, 1981]. Reação fraca também ocorreu com anticorpos produzidos contra ASNase de testa de semente de *Lupinus polyphyllus*, quando houve identificação com enzimas de folhas e cotilédones e não houve com raízes e nódulos [SODEK & LEA, 1993].

LEA *et al* (1978) também não obtiveram reação cruzada em raízes, caules ou folhas de *L. polyphyllus* com anticorpo produzido contra semente desta mesma espécie. LOUGH *et al* (1992b) também não identificaram ASNase em raízes ou nódulos de *L. angustifolius*, o que foi confirmado pela incapacidade de detectar ARNm codificado da enzima nestes órgãos.

Comparando as características da ASNase de semente de ervilha, dependente de K^+, com *C. juncea, C. zanzibarica* e *C. paulina*, foi observado que somente *C. juncea* apresentou "agregação" na molécula da enzima [AGUIAR, 1995]. O EB de *C. paulina* apresentou uma reação de identificação com anticorpo contra ASNase de ervilha, na mesma posição que a enzima de ervilha (69.000 g/mol) [AGUIAR, 1995], o mesmo ocorrendo quando anticorpo de *L. polyphyllus* foi usado em presença da enzima parcialmente purificada de ervilha, coerente com dados de literatura [SODEK & LEA, 1993]. Esta banda na posição da ASNase de ervilha também foi identificada em EB de *C. juncea* com anticorpo contra ASNase de ervilha, diferente do observado por AGUIAR (1995), onde a posição mais intensa foi na banda de 85.000 g/mol. Contudo, esta última proteína também foi identificada por anticorpo contra ASNase de semente de ervilha, ainda que numa reação menos intensa tanto em EB de *C. juncea* como em *C. zanzibarica*.

Desse modo, os resultados mostraram que o anticorpo para a enzima dependente de K^+ reconheceu a outra forma da enzima, a independente de K^+, o que também foi observado por AGUIAR (1995). Isto sugere que a parte relacionada à dependência ao K^+, não seria o determinante antigênico essencial para produção de anticorpo, mas outros fragmentos da molécula com um certo grau de homologia "conservada" apresentariam antigenicidade suficiente para produção de imunoglobulina. Ou seja, a porção da molécula que determina a dependência ao K^+ não coincidiria com aquela reconhecida pelo anticorpo.

Portanto, em diferentes espécies ou gêneros, quando a reação cruzada pôde ser visualizada somente com o extrato bruto e provavelmente, neste caso, a homologia é menor entre as moléculas, a parte da enzima que seria responsável pela dependência ao K^+ poderia estar localizada numa outra parte da molécula, para a qual foi produzido anticorpo e este pôde reconhecê-la.

Além disso, é bem conhecido que existe uma conservação da sequência homóloga numa árvore filogenética. Sendo assim, uma preparação de um anticorpo policlonal particular pode ser capaz de reconhecer um número de epitopos de várias espécies. Ademais, as forças de interação nos complexos antígeno-anticorpo dessas reações cruzadas podem ser consideravelmente mais fracas que para o complexo envolvendo o antígeno original [WESELAKE & JAIN, 1992].

Entretanto, se as duas regiões são coincidentes, então as isoformas dependente e a independente são imunologicamente distintas. Esta situação foi verificada por outros autores [CHANG & FARNDEN, 1981, LEA *et al*, 1984, SODEK & LEA, 1993], que trabalhando dentro do gênero do tremoço (*Lupinus*) e com ervilha, sugeriram que ambas não dividiriam os mesmos epitopos e portanto, seriam codificadas por genes diferentes.

Porém, os resultados obtidos indicam que as duas formas da enzima não são completamente distintas imunologicamente. LOUGH *et al* (1992b), trabalhando com eletrotransferência de ADN de ASNase de semente de *L. arboreus*, verificaram que a enzima seria um produto de um único gene ou de diferentes membros de uma multifamília de genes que seriam altamente conservados. Assim, se a ASNase é resultante

de uma cópia de um único gene, então, as isoformas seriam provavelmente, variantes resultantes de modificações pós-tradução. E desse modo, muitos fragmentos de molécula seriam homólogos permitindo a identificação entre as duas isoformas.

Porém, esta situação complexa ainda não está esclarecida, uma vez que estes últimos autores não conseguiram hibridizar o ADNc de ASNase de semente de *L. arboreus* com ARN de ASNase das raízes e que o gene para a enzima dependente de K^+ ainda não foi isolado.

ASNases de microrganismos não mostram reações cruzadas com a enzima de vegetais, indicando ausência de homologia entre as mesmas. Alguns autores observaram que ASNases de *L. albus, L. polyphyllus* e *Pisum sativum* não apresentaram reações cruzadas com a enzima de *Erwinia carotovora* [LEA *et al*, 1984]. A ASNase de *L. arboreus* também não exibe reações cruzadas com *Erwinia chrysanthemi, Bacillus subtilis* ou com *Eschericia coli* [LOUGH *et al*, 1992b].

Porém, a ASNase de semente de *L. arboreus* apresentou 23% de identidade com glicoasparaginases humana, determinada através de sequênciamento dos aminoácidos. Estas enzimas estão presentes nos lisossomos e clivam ligações N-acetil glicosamina-Asn que unem oligossacarídeos a peptídeos de glicoproteínas ligadas por Asn. As ASNases vegetais são citosólicas e embora haja certa especificidade pelo substrato dessas enzimas, não se sabe se elas podem hidrolisar a ligação de N-acetil glicosamina-Asn [LOUGH *et al*, 1992b]. A ASNase vegetal tende a mostrar especificidade de substrato, diferindo das ASNases de animais e microrganismos que também podem hidrolisar Gln [LEA *et al*, 1978 ,WRISTON & YELLIN, 1973 citado por CHANG & FARNDEN, 1981]. A enzima vegetal se ligaria somente a compostos com 4 carbonos [CHANG & FARNDEN, 1981].

Outras enzimas de plantas como Asn sintetase também apresentam grande homologia com enzimas humanas [DAVIES & KING, 1993].

Considerações Finais

Sequências de aminoácidos que mantêm a homologia na enzima, como aquelas regulatórias 5' do gene para ASNase em semente de *L. angustifolius* (independente de K^+), começam a ser investigadas para se identificar a especificidade de tecidos e a relação com sequências de regulação da enzima durante o desenvolvimento da semente [LOUGH *et al*, 1992b].

A regulação da atividade e o controle de síntese e degradação da ASNase vegetal ainda não está esclarecido. A regulação da ASNase em *L. angustifolius* durante a formação de nódulos em raízes maduras se dá à nível de transcrição do ARN da enzima através da formação de um complexo ADN-proteína (ainda desconhecida), correlacionada com um declínio da atividade da ASNase. Esta proteína também se associa com sequências específicas próximas ao sítio inicial de transcrição do promotor do gene da L-ASNase durante este processo. Não está claro se essa proteína é sintetizada *de novo* ou é constitutiva e então, modificada ou ativada para conferir capacidade de ligação ao ADN [VINCZE *et al*, 1994]. Sequências adicionais de atuação *cis* também podem estar envolvidas no controle do nível de expressão do gene de ASNase em nódulos [LOUGH *et al*, 1992b].

Experimentos com cultura de cotilédone de soja mostraram um aumento da atividade enzimática da ASNase não decorrente de uma única fonte de N. Isto sugeriu que a enzima não seria controlada por um influxo de seu substrato específico durante o desenvolvimento dos cotilédones, não sofrendo indução pelo seu substrato [TONIN & SODEK, 1990].

A velocidade e a flexibilidade fornecida pelo mecanismos de controle de pós-transcrição, tradução, pós-tradução e regulação da atividade enzimática podem ser particularmente importantes para as plantas, já que as mesmas apresentam vida séssil; elas devem se adaptar rapidamente às condições de mudanças às quais não podem fugir [SULLIVAN & GREEN, 1993]. Consequentemente, as propriedades cinéticas das enzimas, os mecanismos regulatórios e a compartimentalização em organelas têm um papel importante no controle de acesso à Asn para as enzimas

apropriadas [IRELAND & JOY, 1981].

A existência de uma grande variabilidade no sistema da ASNase vegetal e a insistência em estudá-la pode trazer mais esclarecimentos sobre suas características e sua atuação dentro da planta para que, futuramente possa ser possível a concepção de um modelo mais genérico para esta enzima.

Conclusões

1. A ASNase de ervilha é dependente de K^+ para exercer sua atividade. O íon Ca^{2+} parece auxiliar mais indiretamnete na manutenção da estrutura ativa da ASNase.

2. A testa da semente de ervilha possui duas isoformas da enzima ASNase, uma em torno de 200.000 g/mol e a principal de 69.000 g/mol. A isoforma principal não se dissociou em subunidades.

3. A ASNase apresentou K_m de 2,4 mM para Asn. O Asp, produto da reação, agiu como inibidor competitivo, e portanto seria liberado da enzima depois do NH_4^+ na sequência da reação.

4. A enzima apresentou *pI* entre 4,5 e 5.

5. Anticorpo produzido contra ASNase de semente de ervilha dependente de K^+ apresentou reações imunológicas cruzadas com outras bandas presentes nos extratos enzimáticos, sugerindo a presença de isoformas ou de fragmentos da enzima (ativos ou não). Reações cruzadas também ocorreram com enzimas dependentes e independentes de K^+ de outras espécies vegetais. Estes resultados sugerem um certo grau de homologia entre as isoformas dependente e independente de K^+.

Referências

AGUIAR, L.F. 1995. Estudo molecular e imunoquímico da asparaginase de *Crotalaria*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil. Tese de Doutorado.

ANDERSON, J.W.& BEARDALL, J. 1991. Other light-coupled assimilatory and reductive machanisms. IN: Molecular activities of plant cells. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 230-241.

ATKINS, C.A., PATE, J.S., SHARKEY, P.J. 1975. Asparagine metabolism-key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. *Plant Physiol.* 56: 807-812.

ATKINS, C.A., PATE, J.S., PEOPLES, M.B., JOY, K. W. 1983. Amino acid transport and metobolism in relation to the nitrogen economy of a legume leaf. *Plant Physiol.* 71: 841-848.

BAUER, A., JOY, K.W., URQUHART, A.A. 1977a. Amino acid metabolism of pea leaves - labeling studies on utilization of amides. *Plant Physiol.* 59:920-24.

BAUER, A., URQUHART, A.A., JOY, K.W. 1977b. Amino acid metabolism of pea leaves - diurnal changes and amino acid synthesis from ^{15}N-nitrate. *Plant Physiol.* 59:915-19.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

BUCKERIDGE, M.S. & REID, J.S. 1994. Purification and properties of a novel β-galactosidase or exo-(1-4)-β-D-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. *Planta* 192(4):502-511.

BUSH, D.S. 1993. Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol.* 103(1): 7-13.

CASADO, A., CABALLERO, J.L., FRANCO, A.R., CÁRDENAS, J., GRANT. M.R., MUÑOZ-BLANCO, J. 1995. Molecular cloning of the gene encoding the L-asparaginase gene of *Arabidopsis thaliana. Plant Physiol.* 108: 1321-1322.

CHANG, K.S. & FARNDEN, J.F. 1981. Purification and properties of asparaginase from *Lupinus arboreus* and *Lupinus angustifolius. Arch. Biochem. Biophys.* 208(1): 49-58.

CHAPLEO, S. & HALL, J.L. 1989. Effects of apllied nitrogen upon aspects of nitrogen metabolism and transport in developing nodulated winged bean plants. *Physiol. Plant.* 77: 359-368.

COONEY, D.A. & HANDSCHUMACHER, R.E. 1970. L-Asparaginase and L-Asn metabolism. *Ann. Rev. Pharmacol.* 10: 421-440.

DAVIES, K.M. & KING, G.A. 1993. Isolation and characterization of a cDNA clone for a harvest-induced asparagine synthetase from *Aspargus officinalis* L. *Plant Physiol.* 102: 1337-1340.

DICKSON, J.M.J.J., VINCZE, E., GRANT, M.R., SMITH, L.A., ROBDER, K.A., FARNDEN, K.J.F., REYNOLDS, P.H.S. 1992. Molecular cloning of the gene encoding developing seed L-asparaginase from *Lupinus angustifolius. Plant Mol. Biol.* 20: 333-336.

DUNLOP, P.C., MEYER, D.B., ROON, R.J. 1978. Characterization of two forms of asparaginase in *Saccharomyces cerevisae. J. Biol. Chem.* 253: 1297-1303.

EVANS, H.J. & WILDES, R. A. 1971. Potassium and its role in enzyme activation. International Potash Institute. Pub. Int. Potash Inst. CH-300. Berne, Switzerland. pp.13-39.

EISEN, H.N. & SISKIND, G.W. 1964. Variation in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry* 3: 996-1008.

FARQUHAR, G.D., FIRTH, P.M., WETSELLAR, R., WEIR, B. 1980. On the gaseous exchange of ammonia between leaves and the environment: Determination of the ammonia compensation point. *Plant Physiol.* 66: 710-714.

HAGA, K.I. & SODEK, L. 1987. Utilization of nitrogen sources by immature soybean cotyledons in culture. *Ann. Bot.* 59: 597-601.

HAMES, B.D. & RICKWOOD, D. 1990. Gel electrophoresis of proteins - a pratical approach. IRL Press, Oxford University Press, New York, 384p.

HEESCHEN, V., MATLOK, J., SCHRADER, S. & RUDOLPH, H. 1996. Asparagine catabolism in bryophytes: purification and characterization of two L-asparaginase isoforms from *Sphagnum fallax. Physiol. Plant.* 97: 402-410

HOSTALÁCIO, S., SODEK, L., VALIO, I.F.M. 1985. Atividade de alantoinase e asparaginase nas diferentes partes da semente de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Rev. Bras. Bot.* 8:81-85.

HUPPE, H.C. & TURPIN, D. H. 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 577-607.

HURST, P.L. & CLARK, C.J. 1993. Postharvest changes in ammonium, amino acids and enzymes of amino acid metabolism in aspargus spear tips. *J. Sci. Food Agric.* 63: 465-471.

IRELAND, R.J. & JOY, K.W. 1981. Two routes for asparagine metabolism in *Pisum sativum* L. *Planta* 151: 289-293.

IRELAND, R.J. & JOY, K.W. 1983a. Subcellular localization of asparaginase and asparagine aminotransferase in *Pisum sativum* leaves. *Plant Physiol.* 72: 1127-29.

IRELAND, R.J. & JOY, K.W. 1983b. Purification and properties of an Asn aminotransferase from *Pisum sativum* leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 223(1): 291-296.

JEREBZOF, S. & JEREBZOF-QUINTIN, S. 1983. Control of enzyme activity rhythms in *Leptosphaeria michotti. Physiol. Veg.* 21: 233-245.

JEREBZOF-QUINTIN, S. & JEREBZOF, S. 1986. Reversible self-phosphorylation of asparaginase complex in *Leptosphaeria michotti*; characterization of associated protein kinase and protein phosphatase activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 140: 1135-1142.

JOLY, A. B. 1991. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. Companhia Editora Nacional, Brasil. 777p.

JOHNSTONE, A. & THORPE, R. 1987. Immunochemistry in practice. Blackwell Science Publications, 2ª ed. Oxford, England. 300p.

KOIZUMI, S. & FUJIMOTO, T. 1994. Improvement in treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: A 10-year study by The Children's Cancer and Leukemia Study Group. *Int. J. Hematol.* 59(2): 99-112.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

LEA, P.J. & FOWDEN, L. 1975. Asparagine metabolism in higher plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 168: 3-14.

LEA, P.J., FOWDEN, L., MIFLIN, B.J. 1978. The purification and properties of asparaginase from *Lupinus* species. *Phytochemistry* 17: 217-222.

LEA, P.J., HUGHES, J.S., MIFLIN, B.J. 1979. Glutamine- and asparagine-dependent protein synthesis in maturing legume cotyledons cultured *in vitro J. Exp. Bot.* 30(116): 529-537.

LEA, P.J., FESTENSTEIN, G. N., HUGHES, J.S., MIFLIN, B.I. 1984. An immunological and enzymological survey of asparaginase in seeds of *Lupinus. Phytochemistry.* 23(3): 511-514.

LLOYD, H.D.H. & JOY, K.W. 1978. 2-Hydroxysuccinamic acid: a product of asparagine metabolism in plants. *Biochem. Biophys. Reserch Comm.* 81(1): 186-192.

LOUGH,T.J., CHANG, K-S., CARNE, A., MONK, B.C., REYNOLDS, P.H., FARNDEN, K.J.F. 1992a. L-asparaginase from developing seeds of *Lupinus arboreus. Phytochemistry.* 31(5): 1519-1527.

LOUGH, T.J., REDDINGTON, B.D., GRANT, M.R., HILL, D.F., REYNOLDS, P.H.S., FARNDEN, K.J.F. 1992b. The isolation and characterization of a cDNA clone enconding L-asparaginase from developing seeds of lupin (*Lupinus arboreus*). *Plant Mol. Biol.* 19: 391-399.

MAATHUIS, F.J.M. & SANDERS, D. 1996. Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiol. Plant.* 96: 158-68.

McCLURE, P., ISRAEL, W.D., VOLK, R.J. 1980. Evaluation of the relative ureide content of xylem sap as an indicator of N_2 fixation in soybenas. *Plant Physiol.* 66: 720-25.

McCULLOUGH, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin. Chem. Acta* 17: 297-304.

MENGEL, K. & KIRKBY, E.A. 1979. Principles of plant nutrition. International Potash Institute, Switzerland, second edition, 592p.

MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. 1975. Glutamine and Asparagine as nitrogen donors for reductant-dependent glutamate synthesis in pea roots. *Biochem. J.* 149: 403-409.

MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry.* 15: 873-885.

MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. 1977. Amino acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 299-329.

MISRA, S. & OAKS, A. 1980. A spectrophotometric assay for asparaginase obtained from corn (*Zea mays*) endosperm tissue. *Can. J. Bot.* 58: 2481-2483.

MURPHY, R.F., IMAM, A., HUGHES, A.E., McGUCKEN, M.J., BUCHANAN, K.D., CONLON, J.M. e ELMORE, D.T. 1976. Avoidance of strongly chaotropic eluents for immunoaffinity chromatography by chemical modification of immobilized ligand. *Biochem. Biophys. Acta* 420: 87-96.

MURRAY, O.R. & KENNEDY, I.R. 1980. Changes in activities of enzymes of nitrogen metabolism in seedcoats and cotyledons during embryo development in pea seeds. *Plant Physiol.* 66: 782-786.

MUTO, S. 1992. Intracellular Ca^{2+} messenger system in plants. *Int. Rev. Cytol.* 142: 305-345.

OAKLEY, B.R., KIRSCH, D.R., MORRIS, N.P. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrilamide gels. *Anal Biochem.* 105(2) : 361-63.

OLSEN, C., MATTSSON, M., SCHJOERRING, K. 1995. Ammonia volatilization in relation to nitrogen nutrition of young *Brassica napus* plants growing with controlled nitrogen supply. *J. Plant Physiol.* 147: 306-312.

PATE, J.S., ATKINS, C.A., HERRIDGE, D.F., LAYZELL, D.B. 1981. Synthesis, storage and utilization of amino compounds in the white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Physiol.* 67: 37-42.

SIECIECHOWICZ, K.A., IRELAND, R. J., JOY, K.W. 1985. Diurnal variation of asparaginase in developing pea leaves. *Phytochemistry.* 77: 506-508.

SIECIECHOWICZ, K.A., JOY, K.W., IRELAND, R. J. 1988a. The metabolism of asparagine in plants. *Phytochemistry* 27(3): 663-671.

SIECIECHOWICZ, K.A., JOY, K.W., IRELAND, R. J. 1988b. Diurnal changes in asparaginase activity in pea leaves I. The requeriment for light for increased activity. *Phytochemistry* 39(203): 695-706.

SIECIECHOWICZ, K.A., IRELAND, R. J., JOY, K.W. 1988c. Diurnal changes in asparaginase activity in pea leaves II- Regulation of activity. *Phytochemistry* 39(203): 707-721.

SIECIECHOWICZ, K.A., JOY, K.W., IRELAND, R. J. 1989. Effect of methionine sulfoximine on asparaginase activity and ammonium levels in pea leaves. *Plant Physiol.* 189: 192-96.

SMART, J. 1990. Grain legumes. Evolution and genetic resources. Cambridge University Press, Cambridge. 379p.

SNEDDEN, W.A., ARAZI, T., FROMM, H., SHELP, B.J. 1995. Calcium/calmodulim activation of soybean glutamate decarboxylase. *Plant Physiol.* 108: 543-549.

SODEK, L. & LEA, P.J. 1993. Asparaginase from the testa of developing lupin and pea seeds. *Phytochemistry.* 34(1): 51-56.

SODEK, L., LEA, P.J., MIFLIN, B. 1980. Distribution and properties of potassium-dependent asparaginase isolated from developing seeds of *Pisum sativum* and other plants. *Plant Physiol.* 65: 22-26.

SPRENT, J.I. 1980. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. *Plant Cell Environ.* 3: 35-43.

STREETER, J.G.. 1977. Asparaginase and asparagine transaminase in soybean leaves and root nodules. *Plant Physiol.* 60: 235-239.

SUELTER, C.H. 1970. Enzymes activated by monovalent cations. *Science* 168: 789-795.

SULLIVAN, M.L. & GREEN, P.J. 1993. Post-transcriptional regulation of nuclear-encoded genes in higher plants: the roles of mRNA stability and translation. *Plant Mol. Biol.* 23:1091-1104.

TA, T.C., JOY, K.W., IRELAND, R.J. 1985. Role of Asn in the photorespiratory nitrogen metabolism of pea leaves. *Plant Physiol.* 78: 334-337.

TONIN, G. S. & SODEK, L. 1990. Asparaginase, allantoinase and glutamine synthetase activities in soybean cotyledons grown *in vitro*. *Phytochemistry* 29(9): 2829-2831.

TOWBIN, H., STAEHLIN, T., GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and sample application. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4.

URQUHART, A.A. & JOY, K.W. 1982. Transport, metabolism and redistribution of xylem-borne aminoacids in developing pea shoots. *Plant Physiol.* 69: 1226-32.

VAUQUELIN, M. & ROBIQUET, M. 1806. The discovery of a new plant principle in *Aspargus sativus*. *Ann. Chim.* 57: 88-93.

VAZ, C.A.C. 1989. Interação antígeno-anticorpo *in vitro*. IN: Imunologia Básica. V.L.G. Calich e C.A.C. Vaz (Eds.) Artes Médicas, São Paulo. pp.123-176.

VINCZE, E., REEVES, J.M., LAMPING, E., FARNDEN, K.J.F., REYNOLDS, P.H.S. 1994. Repression of the L-asparaginase gene during nodule development in *Lupinus angustifolius*. *Plant Mol. Biol.* 26: 303-311.

VITÓRIA, A.P. 1994. Propriedades da asparaginase e determinação de compostos nitrogenados em algumas espécies do gênero *Crotalaria*. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil. Tese de Mestrado.

WESELAKE, R.J. & JAIN, J.C. 1992. Strategies in the purification of plant proteins. *Physiol. Plant.* 84: 301-309.

WIAME, J.M., GRENSON, M., ARST, H.N. 1985. Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.* 26: 1-88.