

IDENTIFICAÇÃO / CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADE FOSFATASE EM EXTRATOS FOLIARES DE *Ricinus communis* E ANÁLISE PROTEÔMICA EM RESPOSTA A INJÚRIA MECÂNICA

Souza, T.F., Soares, A.M.S., Giuli J. A. e Machado, O. L. T.- Laboratório de Química em Função de Proteínas e Peptídeos – (LQFPP/CBB/UENF) - Campos dos Goytacazes/RJ. souzatf@yahoo.com.br; alexandrasoares@yahoo.com.br; jucelia@uenf.br; olga@uenf.br

RESUMO

As plantas possuem um sistema químico eficiente e complexo para se defenderem contra ataques de insetos e patógenos. Neste trabalho estudamos as modificações no perfil de algumas (proteínas) do extrato foliar e o comportamento de enzimas com atividade fosfatásica de plantas de *R. communis* submetidas à injúria mecânica. O perfil protéico dos extratos foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida, sistemas uni e bidimensionais. Nossos resultados indicaram que, após análises por eletroforese bidimensional, 10 proteínas tiveram seus níveis modificados por injúria mecânica. Para o acompanhamento da atividade fosfatásica avaliamos esta atividade tanto em extrato bruto como em gel após separação por eletroforese. Detectamos a presença de uma fosfatase ativa em meio ácido com pico de atividade 30 após injúria e uma fosfatase ativa em meio alcalino com picos de atividade a partir de 6 horas de tratamento. A análise de atividade em gel mostrou uma fosfatase ativa em meio ácido com migração de $\mu=19.6\%$ (duas subunidades 38 kDa e 68 kDa) e outra ativa em meio alcalino com $\mu=56.4\%$ (23 kDa). Além disso, na parte mais superior do gel foi detectada uma provável terceira atividade fosfatásica em meio alcalino.

INTRODUÇÃO As plantas possuem um sistema químico eficiente e complexo para se defenderem contra ataques de insetos e patógenos. Em resposta a um determinado tipo de estresse, ocorre uma transdução de sinal, via mecanismos de fosforilação e desfosforilação de proteínas quinases, para ativar genes de defesa. Na continuação do processo de transdução, proteínas, tais como fosfolipases, são ativadas permitindo a liberação de ácido linolênico a partir da quebra de fosfolipídios de membrana. O ácido linolênico é o precursor do metil jasmonato e do ácido jasmônico que é regulador do crescimento em vegetais. Esta molécula está envolvida na indução de resposta sistêmica, e na ativação de genes de defesa. (Ryan e Pearce, 1998). Estudos recentes de resposta de plantas a diversos tipos de estresse revelam a importância de proteínas de fosforilação e desfosforilação em vias de sinalização ativadas por eliciadores e sinais de estresse abióticos. O sinal é percebido na membrana plasmática por um receptor que ativa uma proteína quinase (MAPK). A via MAPK leva a expressão de genes e desencadeia outros processos celulares. Várias proteínas fosfatases serina/treonina (PPases) (PP1, PP2A e PP2C) e proteínas fosfatases tirosinas (PTPases) podem inativar a MAPK e retornar a via ao nível basal. Fosforilação reversível pode então ter um papel importante na regulação de vias de sinalização ativadas por estresse (Luan, 1998). Nosso trabalho visa caracterizar fosfatases que possam estar envolvidas com processo de sinalização bem como caracterizar proteínas cujos níveis tenham

sido alterados pela injúria e assim contribuir para o entendimento do processo de sinalização /defesa em plantas.

MATERIAL E METODOLOGIA

Eletroforese bidimensional: Os procedimentos para realização da eletroforese bidimensional foram feitos de acordo com o método descrito por O'Farrell 1975 [Para se determinar a massa molecular e o ponto isoelétrico dessas proteínas as imagens dos géis foram analisadas utilizando um software de análise proteômica. Nesse programa os "spots" de interesse em cada gel são marcados e logo após são inseridas escalas de massa molecular e ponto isoelétrico. Feito isso, o programa faz uma sobreposição das imagens usando uma delas como referência e ao final gera-se uma tabela com massa e pI calculados de cada spot e outra com as diferenças em termos de volume entre "spots" correspondentes nas duas imagens.] **Determinação da atividade fosfatásica em gel:** A atividade fosfatásica foi determinada em gel após separação das proteínas do extrato foliar por eletroforese em condições não desnaturante. Para detecção de atividade fosfatásica em meio alcalino, o gel foi cortado em pedaços de 0.3 cm de cima para baixo. Foram gerados 26 pedaços de gel onde cada um foi colocado em um tubo numerado. Em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 acrescido de 40 mg de p-nitrofenilfosfato para cada 100 mL de tampão. Os tubos foram incubados a 37°C durante aproximadamente 12 horas e, logo após, a leitura das atividades foi feita a 410 nm. Um gel espelho foi preparado nas mesmas condições para que depois da identificação do local de atividade fosfatásica no gel cortados em pedaços, a mesma região fosse cortada para extração e determinação da massa molecular. Para detecção de atividade fosfatásica em meio ácido, um outro gel preparado nas mesmas condições, agora não cortado, foi incubado com tampão Tris-HCl 50 mM, ATP 3mM, CaCl₂ 20mM, pH 5,0, durante aproximadamente 5 horas. A distância de migração das bandas reveladas pela formação de precipitado de fosfato de cálcio, foi medida para identificação das mesmas em um outro gel espelho corado com coomassie.

Isolamento das proteínas com atividade fosfatásica em meio ácido e alcalino: As bandas referentes as atividades fosfatásicas foram eletroeluidas com um eletroeluidor da Bio Rad. Para a eletroeluição foi usado um tampão bicarbonato de amônio (3,95 g de bicarbonato de amônio em 1000 mL de água). As condições de eletroeluição empregadas foram de 40 mA de corrente (8 mA para cada amostra eluída), com duração de 5 horas. Após o término da eletroeluição as amostras foram secadas usando uma centrífuga a vácuo. Para determinação da massa molecular as proteínas foram analisadas por eletroforese unidimensional em gel de poliácridamida (12%) na presença de SDS [5]. Após a corrida as bandas foram reveladas utilizando a revelação por prata descrita por (Blum et al., 1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise do perfil protéico por eletroforese bidimensional: A figura 1 mostra os géis de extratos foliares de plantas controle e submetidas à injúria mecânica por 1, 6 e 24 horas. Para as plantas tratadas por 1 e 6 horas oito proteínas marcadas (1 a 8) tiveram mudanças significativas em seus níveis. As proteínas 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 8 tiveram seus níveis diminuídos, enquanto que a proteína 5 teve seus níveis aumentados após o tratamento. A proteína 9 (planta tratada por 1 hora) e proteína 10 (planta 6 horas) tiveram seus níveis aumentados. Nos géis controle e ferida 24 horas as proteínas 1, 2, 3 e 5 tiveram seus níveis diminuídos após ferida enquanto que a proteína 4 teve seus níveis aumentados. As demais modificações observadas anteriormente não foram detectadas. Algumas proteínas (círculo a) na faixa de massa molecular entre 63-71 kDa e pl entre 4-5, tiveram seus níveis diminuídos. Outro conjunto de proteínas (círculo c) com massa molecular abaixo de 15 kDa e com pl entre 3-4, tiveram seus níveis aumentados. O círculo b mostra um "spot" que teve seu nível ligeiramente reduzido e apresenta massa abaixo de 14 kDa e pl em torno de 7.8. As proteínas do círculo b e c voltaram ao nível do controle em 24 horas, e as do círculo a continuaram diminuídas. A tabela 1 apresenta um resumo de algumas características das dez proteínas selecionadas.

Determinação de atividade fosfatásica em gel: Identificamos duas regiões do gel com atividade fosfatásica, em meio alcalino, utilizando PNPP como substrato. Uma delas próxima ao topo do gel (tubos 1,2 e 3, figura 2) e outra com aproximadamente 50% de migração (tubo 19, figura 2). Ao investigarmos a atividade fosfatásica, em meio ácido, utilizando ATP como substrato, detectamos também duas atividades após precipitação de fosfato de cálcio sobre o gel (figura 3). Neste caso, detectamos uma banda com migração (μ) de 16,9% e outra com $\mu= 56,4\%$. A banda de $\mu= 16,9\%$ não teria correspondência com as bandas referentes à fosfatases alcalinas detectada no experimento anterior. Já a banda com $\mu= 56,4\%$ pode ser a mesma detectada no ensaio feito com pedaços de gel. Acreditamos que banda de $\mu= 16,9\%$ possa ser atribuída a uma fosfatase ativa em meio ácido. Estas proteínas foram isoladas por eletroeluição das bandas após eletroforese nativa.

Determinação de massa molecular por SDS-PAGE: As proteínas referente às fosfatases de $\mu= 16,9\%$ e $\mu= 56,4\%$, foram analisadas em gel SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970). A proteína com de $\mu= 16,9\%$ apresentou duas bandas, uma com Massa molecular de 68 kDa e a outra com massa molecular de 38 kDa. A proteína com e $\mu= 56,4\%$, apresentou uma banda com massa molecular de 23 kDa .

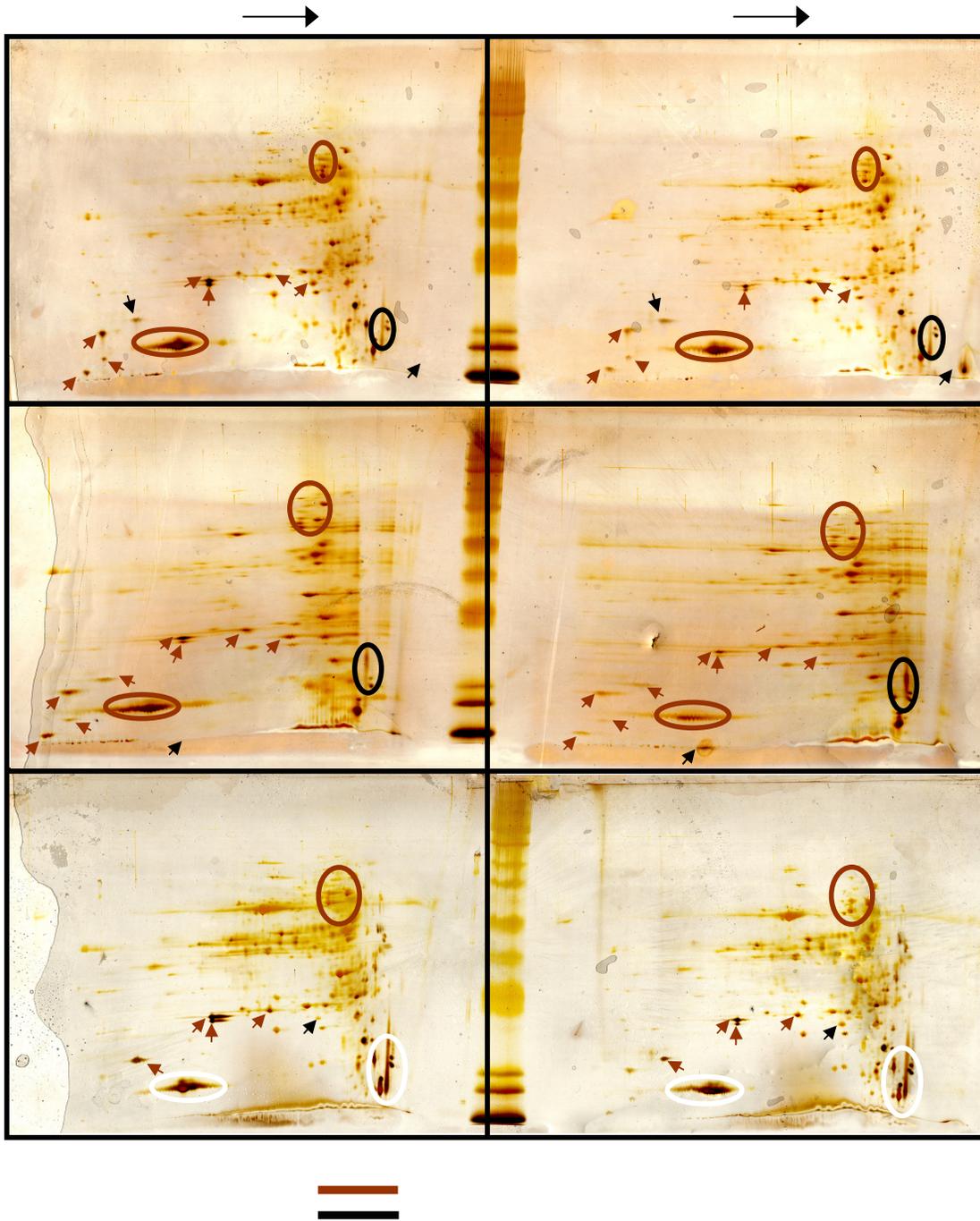


Figura 1: Géis revelados por prata. **A, C e E:** extrato de plantas controle; **B, D e F:** 1, 6 e 24 horas após ferida, respectivamente. As setas e os círculos indicam, de acordo com a legenda, as proteínas que tiveram variações em seus níveis. Os círculos em branco indicam níveis constantes.

Tabela 1. Características químicas das proteínas cujos níveis foram modificados por injúria mecânica.

Proteína	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Massa molecular (kDa)	21,5	20,6	22,8	21,1	14,3	<14	<14	<14	<14	<14
Ponto Isoelétrico (pI)	7,1	7,1	5,9	5,1	8,6	9,3	9,3	9,7	3,1	7,3

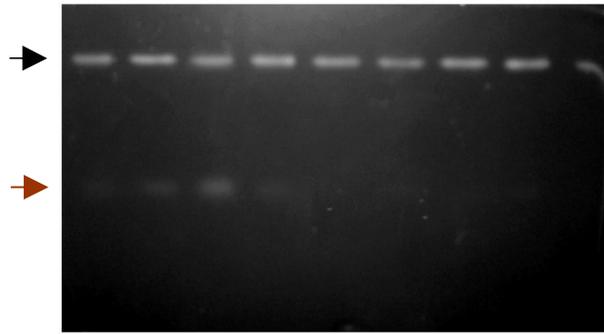
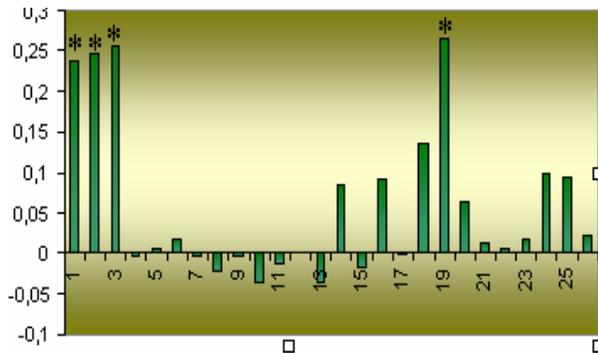


Figura 2: Ensaio de atividade fosfatásica em pedaços de géis nativos. 1- tubo n°1 onde foi colocado um pedaço de gel da parte mais superior; Cada número se refere à numeração feita nos tubos. O gel foi cortado de uma para baixo a cada 0,3 cm. Os asteriscos (*) se referem aos tubos onde tiveram maiores atividades (tubo 1, 2, 3 e 19). O ensaio foi feito com tampão alcalino (pH 8,0).

Figura 3: Gel de poliacrilamida sem SDS (nativo) 12%. O gel foi incubado com tampão acetato, pH 5,0, contendo ATP como substrato. As setas indicam, de acordo com a legenda, regiões com atividades fosfatases. Foram aplicadas 200 mg de proteínas em cada poço.

CONCLUSÕES

Os resultados mostram que a maioria das proteínas é consumida após a injúria, com exceção da proteína 1 que está aumentada em 24 horas e a 5 que está aumentada em 1 hora. Além disso, a proteína 9 só aparece aumentada em 1 hora e a 10 só aparece aumentada em 6 horas. Foram identificadas proteínas com atividade fosfatásica tanto em meio ácido como em meio alcalino. Aquelas, identificadas por precipitação em gel, foram isoladas e parcialmente caracterizadas. Acreditamos que alguma destas possa estar envolvida no processo de sinalização em plantas de *R. communis*.

REFERÊNCIAS

Blum, H., Bier, H. and Gross, H. J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

Laemmli, U. K.. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

Luan, S. Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 271-275, 1998.

O' Farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

Ryan, C. A and Pearce, G. (1998). Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 14: 1-17.