

ANGELICA NAKAMURA

Mecanismos de Fosforilação e Defosforilação ao
Longo da Germinação de Sementes de Ervilha
(*Pisum sativum*) e suas Implicações nas
Propriedades Funcionais

Dissertação submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Mestre em Nutrição

Programa de Pós Graduação em Nutrição
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

2003

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Mecanismos de Fosforilação e Defosforilação ao
Longo da Germinação de Sementes de Ervilha (*Pisum
sativum*) e suas Implicações nas Propriedades Funcionais

ANGELICA NAKAMURA

Orientadora: Eliane Fialho de Oliveira

Dissertação submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Mestre em Nutrição

Programa de Pós Graduação em Nutrição
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

2003

Mecanismos de fosforilação e defosforilação ao longo da germinação de sementes de ervilha (*Pisum sativum*) e suas implicações nas propriedades funcionais

Angelica Nakamura

Dissertação submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Nutrição

Aprovada por:

Prof^a. Eliane Fialho de Oliveira
Prof. Adjunto do Departamento de Nutrição Básica e Experimental / INJC / UFRJ
Orientadora

Prof^a. Adriana da Silva Hemerly
Prof. Adjunto do Departamento de Bioquímica Médica / ICB / UFRJ

Prof. Ednildo de Alcântara Machado
Prof. Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / UFRJ

Prof^a. Cristiana Pedrosa Melo Porto
Prof. Adjunto do Departamento de Nutrição Básica e Experimental / INJC / UFRJ

Prof. Luis Maurício Trambaioli da Rocha e Lima
Prof. Adjunto do Departamento de Medicamentos / FF / UFRJ
Revisor e Suplente

Rio de Janeiro
2003

Ficha catalográfica

Nakamura, Angelica

Mecanismos de fosforilação e defosforilação ao longo da germinação de sementes de ervilha (*Pisum sativum*) e suas implicações nas propriedades funcionais. Angelica Nakamura. Rio de Janeiro - 2003.

xv, 115

Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2003.

Orientador: Eliane Fialho de Oliveira

1. *Pisum sativum*. 2. germinação. 3. propriedades funcionais. – Teses. I. Fialho, Eliane (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição Josué de Castro. III. Título.

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Nutrição

II. Título

Este trabalho foi realizado através do Acordo de Cooperação Técnica entre o Instituto de Nutrição Josué de Castro e o Departamento de Bioquímica Médica do Instituto de Ciências Biomédicas, ambos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sendo desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Insetos do Departamento de Bioquímica Médica, ICB/UFRJ e Laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos do Departamento de Nutrição Básica e Experimental, INJC/UFRJ, sob orientação da professora Eliane Fialho e na vigência de auxílios concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT III e PADCT IV), Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB-ALV), International Foundation for Science (IFS) Stockholm, Sweden e CAPES.

*Dedico esta tese aos meus pais
Shoji e Neide*

Agradecimentos

À minha amiga e orientadora Lili, por ter me ensinado tanto e por ter me cobrado tão pouco. Por ter acreditado em mim e me incentivado em todos os momentos. Pela forma corajosa com que encara a vida, e principalmente por me ensinar diariamente o seu *nada me aborrece*.

Ao Masuda, por ter me acolhido em seu laboratório, pela forma como nos mostra o que é a ciência e por nos presentear diariamente com sua imensa sabedoria e seu bom humor. Muito obrigada!

Ao Marcus pelo apoio nas horas mais difíceis, pela paciência em ensinar apesar da escassez do seu tempo e por estar apostando em mim.

À Fabiana por toda sua competência, prestatividade e responsabilidade. Pela sua amizade, por cuidar com todo carinho das minhas ervilhas (elas até voltaram a crescer!) e por ter me ajudado tanto nos experimentos finais desta tese.

À Renatinha por estar sempre pronta para ajudar, por sua paciência naqueles experimentos intermináveis. Por toda sua determinação, carinho e por trazer sempre alegria ao ambiente.

À Raquel por todo esse tempo em que caminhamos juntas, dividindo tantas coisas, boas e ruins, pelos papos e pelo constante apoio.

Ao Alan pelas inúmeras dúvidas solucionadas, por ter me acolhido em sua bancada durante a obra do lab, pelos conselhos, pelos papos no fim do dia e sobre tudo, pela amizade.

Ao Vagner e à Cíntia por me ajudarem a aprender com suas dúvidas e por terem sempre uma palavra de apoio e incentivo, principalmente nos momentos mais tensos.

À Lílian e à Helo pela dedicação com que cuidam do lab e de todos nós, por tornarem nosso dia a dia mais fácil e o ambiente mais agradável.

À Denise por toda sua amizade, prestatividade, senso de humor, e pelos papos na volta pra casa.

À Rachelzinha, porque também é muito bom vê-la pelos corredores.

Às *Spice* Chris, Clarinha e Adriana, por agitarem o lab.

À Aninha, à Pati e ao Adriano pelo apoio e pelo carinho.

Ao Rafael, ao Daniel e à Eve que sempre me ajudam com aquelas questões básicas sobre fosforilações, géis, extrações de lipídeos, etc.

À todos do lab, Lize, Natália, Renata, André, Paula, Giselle, Petter, Luciano, Emerson, Paulinha, Luciana, Patrícia, Aline, Flávia, Júnior e Litiane, pelo agradável convívio, pelos papos na hora do almoço, pelos biscoitos no fim da tarde, pelas risadas, etc.

Ao Mário, à Katia, à Geórgia e ao Horácio por terem gentilmente me aturado, mesmo que involuntariamente, durante esses quatro anos. Pela convivência, pelos ensinamentos e pelos papos de fim de tarde.

Ao pessoal do Lab Pedro, que hoje já são tantos que eu nem me atrevo a tentar escrever o nome de todos, com certeza esqueceria alguém.

Ao Júlio e ao Zé Roberto, meus primeiros orientadores, por terem me apresentado de forma tão paciente aos artigos científicos, às pipetas automáticas e tudo mais que hoje faz parte do meu dia-a-dia.

À Chana e à Alessandra por me ajudarem a solucionar os mistérios da vicilina.

À Renata (da pós) por resolver os "poucos" problemas com o meu registro, pelo bom humor de sempre e por estar ajudando tanto nessa nova fase do Programa de Pós.

A todos os meus amigos, que sempre me apoiaram, em especial à Fernanda (Abadio) por me compreender tão bem, me ouvir, me dar bons conselhos, por compartilhar comigo algumas angústias e por nos divertirmos no final.

Aos meus pais por terem me criado de forma tão digna, por terem se esforçado tanto pela minha educação e me dado todo o apoio e estrutura necessários para que eu chegasse até aqui, e por me *mimarem* até hoje!

Ao meu irmão Gilberto por me dar total apoio e por abrir mão de tantas coisas.

À Fernanda e ao Gabriel por terem trazido tanta alegria à nossa casa.

Ao Davi, meu amor, por cuidar de mim, por estar sempre disposto a me ajudar no que for preciso, por todos os finais de semana em que me *escoltou* no Fundão e principalmente por me fazer feliz.

Agradeço a Deus por sua forte presença em minha vida e por permitir todas as conquistas que tive até hoje.

Resumo

Recentemente, o interesse nas proteínas de reserva de sementes tem aumentado devido as suas aplicações na indústria de alimentos e biotecnologia. Sabe-se que o consumo de sementes pela população como fonte de proteínas tem aumentado, especialmente as leguminosas, por apresentarem um maior conteúdo protéico comparado com os cereais. A vicilina é a segunda proteína de reserva da ervilha (*Pisum sativum*), correspondendo a cerca de 15% - 35% do conteúdo total de proteína na semente madura. Nesta tese, estudamos as modificações pós traducionais da vicilina, durante o processo da germinação e suas possíveis implicações nas propriedades funcionais desempenhadas por esta proteína. O primeiro conjunto de resultados demonstrou as atividades de cinases e fosfatases ao longo da germinação de sementes de ervilha (*Pisum sativum*). A atividade fosfatásica foi medida utilizando *p*-nitrofenilfosfato como substrato e verificamos que a atividade é maior no embrião comparada com o cotilédone e ocorre um aumento de cerca de 9 vezes ao longo da germinação. É uma enzima que possui pH ótimo entre 5,0 e 6,0 e é fortemente inibida por vanadato de sódio, molibdato de amônio, fluoreto de sódio, fosfato e sulfato de zinco. Nos ensaios da atividade cinase, utilizou-se substratos endógenos para a fosforilação cuja reação era disparada com ATP-P³². As características enzimáticas gerais obtidas neste estudo apontam para uma fosfatase do tipo tirosina fosfatase e uma proteína cinase do tipo caseína cinase II (CK II). A indústria de alimentos possui um grande interesse nas propriedades funcionais desempenhadas pelas proteínas de reserva de leguminosas. Uma das principais modificações que aumentam as propriedades funcionais é a fosforilação química. A vicilina foi purificada por precipitação por sulfato de amônio, e fosforilada quimicamente por diferentes concentrações de trimetafosfato de sódio (0,5%, 1%, 2%, 3%, 4% e 10%), resultando na modificação das propriedades hidrofílicas, através do aumento da solubilidade, bem como nas propriedades interfásicas caracterizada pelo aumento na capacidade de estabilizar emulsão. Além disso, verificamos a capacidade da modificação na estrutura da vicilina por

espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular, não apresentando modificações significativas. Esses resultados indicam que a fosforilação química é um método eficiente para alterar as propriedades físico-químicas desempenhadas pela vicilina, ainda que sem aparentes mudanças em sua estrutura secundária e terciária.

Abstract

Recently, the interest in seed proteins has increased because of their applications in the food and biotechnology industries. It is well known that the consumption of seeds as a source of protein has increased, especially legume ones which have higher protein concentration than cereal seeds. In this thesis we studied the major posttranslational modifications of vicilin during seed germination and possible implications in functional properties described for this protein. The first set of results to make evident kinases and phosphatases activities during *Pisum sativum* germination. The phosphatase activity was measured using pNPP as substrate. The phosphatase is elevated nine times during germination and the major activity was attributed to embryos compared to cotyledons. It is an enzyme with acid optimum pH between 5.0 to 6.0 units and is strongly inhibited by sodium vanadate, ammonium molybdate, sodium fluoride, Pi and Zn. Endogenous substrates were utilized for kinase activity and the reactions were initiated by addition of ^{32}P -ATP. In this study, the major enzymatic characteristics, showed for tyrosine phosphatase with double specificity characteristics and casein kinase II protein kinase (CK II). The food industry has taken it into consideration, so it has been interested in using the functional properties of legume storage proteins. One of the methods which aim to do it is the chemical phosphorylation. Vicilin is the secondary storage protein fraction of *Pisum sativum*, corresponding to ca. 15% - 35% of the total protein content of the mature seeds. This protein when purified by ammonium sulphate precipitation showed able to be chemically phosphorylated by different concentrations of sodium trimetaphosphate (0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% and 10%), resulting in hydrophilic properties modifications, through improve solubility and emulsion properties. In this way, we investigate the capacity of modifications in protein structure by fluorescence and dichroism circular methods. These results indicated that chemical phosphorylation is an efficient method for controlled modification of the physicochemical properties of vicilin.

Abreviações

ATP - adenosina trifosfato
ATP-³²P - adenosina trifosfato marcada radioativamente com fósforo 32
CDPK - proteína quinase dependente de cálcio
CK II - proteína quinase caseína quinase II
C-terminal - Carboxi terminal
Bis - 2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)-maleimide
DMSO - Dimetil sulfóxido
DNA - Ácido desoxiribonucléico
DTT - Ditioneitol
E-64 - Trans- epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano
ECL - método de intensificação de quimioluminescência pelo luminol
EDTA - Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA - Ensaio imunológico imunoabsorvente ligado a enzima
GTP - guanosina trifosfato
H-89 - N-[2-((*p*-Bromocinnamyl)amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide
KN-93 - 2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine
LY 294002 - 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one
ML-7 - (5-Iodonaphthalene-1-sulfonyl)homopiperazine
PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonila
p-NP – *p*-nitrofenol
p-NPP - *p*-nitrofenilfosfato
PP1 - Proteína fosfatase do tipo 1
PP2A - Proteína fosfatase do tipo 2A
PP2B - Proteína fosfatase do tipo 2B
PP2C - Proteína fosfatase do tipo 2C
PPases - Proteínas fosfatases
PTPases - Proteína tirosina fosfatases
r.p.m. - Rotações por minuto
RNA - Ácido ribonucléico
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
STMP - Trimetafosfato de sódio
TBB – 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol
TBS - Tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,2 NaCl 0,15 M
TCA - Ácido tricloroacético
TLC - Cromatografia em camada fina
Tris - Tris (hidroximetil) aminometano

Índice

1 - Introdução

1.1 - As sementes	1
1.2 - A ervilha	2
1.3 - O processo da germinação	4
1.4 – Proteases	8
1.5 - Fosforilação e Defosforilação de proteínas	9
1.5.1 - Proteínas cinases	11
1.5.2 – Fosforilação química de proteínas	14
1.5.3 - Proteínas fosfatases	15
1.6 - Proteínas de reserva	19
1.7 - Propriedades funcionais das proteínas de reserva	23

2 – Objetivos

2.1 - Objetivo Geral	27
2.2 - Objetivos específicos	27

3 - Material e Métodos

3.1 – Reagentes	28
3.2 – Sementes	29
3.3 – Germinação	29
3.4 - Preparação dos homogenatos totais	30
3.5 - Purificação da vicilina	30
3.6 - Dosagem de proteína	32
3.7 - Extração de lipídeos e análise por cromatografia de camada fina ..	32
3.8 - Dosagem de fosfato covalentemente ligado	33

3.9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	34
3.10 - Western Blotting	35
3.11 - Atividade fosfatásica	37
3.12 - Atividade cinásica	42
3.13 - Fosforilação da vicilina purificada com trimetafosfato de sódio – STMP	43
3.14 - Propriedades físico-químicas da vicilina fosforilada	44
3.15 - Análise da estrutura da vicilina por dicroísmo circular	45
3.16 - Análise da estrutura da vicilina por fluorescência	46
4 - Resultados	
4.1 – Parte I: Perfil bioquímico do homogenatos de embriões de sementes de ervilha ao longo da germinação	47
4.2 – Parte II: Identificação e caracterização de atividades cinásica e fosfatásica presentes em embriões de sementes de ervilha	56
4.3 – Parte III: Alteração das propriedades funcionais da ervilha através de fosforilação química	76
5 – Discussão	86
6 - Referências bibliográficas	97

1 - Introdução

1.1 - As sementes

As sementes possuem um importante papel na alimentação mundial por serem fontes de carboidratos e proteínas. Sabe-se que cerca de 70 % de todo o consumo alimentar humano é fornecido por sementes de cereais e leguminosas e que esses grãos representam 50 % do total de proteínas ingeridas (ESKEN, 1990).

Podemos dividir as plantas com sementes em dois grandes grupos: as angiospermas e as gimnospermas. As angiospermas se desenvolvem a partir de um óvulo fertilizado e consistem basicamente de um embrião protegido. As sementes produzidas podem ser classificadas em monocotiledôneas ou dicotiledôneas. As monocotiledôneas são chamadas de cereais e podemos citar como exemplos o arroz, o trigo, a cevada, o milho, a aveia, etc. As dicotiledôneas são as leguminosas, e alguns exemplos são: ervilha, feijão, soja, grão-de-bico, lentilha, etc. (MAYER, 1963).

As leguminosas são culturas típicas de clima tropical e subtropical. Apresentam cerca de 20 a 30% do seu peso em proteínas, das quais aproximadamente 80% são proteínas de reserva (REYES-MORENO, 1993). Os carboidratos totais das leguminosas podem variar de 24 % em *Psophocarpus tetragonolobus*, a 68% em feijão fradinho (*Vigna sinensis*) (RATNAYAKE, 2001). Apresentam várias vitaminas e minerais essenciais e constituem, juntamente com raízes, cereais e tubérculos, uma importante fonte alimentar na América Latina (REYES-MORENO, 1993). As principais culturas de

leguminosas no mundo são, em ordem, a soja, o amendoim, feijões secos e a ervilha (ALONSO, 2001).

1.2 - A ervilha

A ervilha é uma leguminosa de origem imprecisa. Há relatos de que sua origem seja no Oriente Médio, desde o nordeste da Índia até o Afeganistão. Outros demonstram que ela surgiu na Etiópia, no nordeste da África. Conhecida como alimento desde épocas muito remotas, a ervilha foi consumida em forma de grãos secos – inteiros ou moídos – por muito tempo. Só a partir do século XVIII é que a ervilha verde, recém-colhida, passou a ser usada na alimentação humana (GIORDANO, 1993).

A ervilha é cultivada em regiões de clima temperado. Em geral, nos países de clima tropical, ela é plantada em locais de maior altitude. Temperaturas entre 13°C e 18°C são ideais para seu cultivo, acima dos 27°C a produção é bastante prejudicada, especialmente na época do florescimento. A variedade “Mikado” é a mais plantada no Brasil Central. Apresenta peso de aproximadamente 160 g por milheiro e não é tão suscetível ao descoloramento quanto outras variedades. Pode ser plantada em solos de média fertilidade e seu ciclo vegetativo (do plantio à colheita) é em torno de 110 dias (GIORDANO, 1993).

Nas sementes de ervilha, os carboidratos são estocados principalmente na forma de amido e representam aproximadamente 52% da massa total da semente, constituindo-se assim na principal reserva deste nutriente. Os

lipídeos ficam estocados principalmente sob a forma de lipídeos neutros e representam cerca de 6% das reservas da semente enquanto as proteínas representam cerca de 25% da massa total das sementes de ervilha (BEWLEY, 1985).

Consumida tanto na forma de semente verde (imatura) como na forma seca (semente madura), a ervilha é uma fonte potencialmente rica em carboidratos e proteínas. No entanto, o valor nutritivo da semente crua é relativamente baixo. Isso pode ser atribuído à baixa digestibilidade das suas proteínas, deficiência de aminoácidos sulfurados e presença de fatores antinutricionais, tais como: ácido fítico; taninos; polifenóis; inibidores de tripsina, quimotripsina e α -amilase (ALONSO, 1998), que causam um distúrbio no processo metabólico do indivíduo que consome, reduzindo sua habilidade de efetivamente utilizar os nutrientes (ALONSO, 2001).

A deficiência de aminoácidos sulfurados pode ser resolvida pela simples utilização de misturas envolvendo leguminosas e cereais, que por sua vez apresentam carência em lisina. Desta forma, um complementa o outro e as deficiências isoladas são resolvidas. Podemos citar como uma mistura protéica de hábito alimentar do brasileiro o arroz (cereal) com o feijão (leguminosa).

Com relação aos fatores antinutricionais, estes podem ser inativados ou controlados por processos apropriados antes do consumo. Isso pode envolver congelamento, enlatamento, desidratação, molho, cocção, torrefação, germinação, moagem e fermentação (ALONSO, 2001).

1.3 - O processo de germinação

A semente é o resultado da fertilização do óvulo pelo pólen e desempenha funções importantes durante o primeiro estágio de desenvolvimento de uma nova planta, enquanto ela ainda não é capaz de usar a luz como fonte de energia. As sementes passam por três estágios distintos: desenvolvimento, dormência e germinação. Para prover os nutrientes necessários durante a germinação, reservas são processadas e estocadas nas sementes em desenvolvimento, e são preservadas durante a dormência de forma a permitir sua utilização quando necessário (GATEHOUSE, 1984).

As sementes apresentam numerosas reservas nutricionais que serão importantes para suprir as necessidades do embrião no momento do seu crescimento. Tais reservas, em sua maioria, encontram-se na forma de polímeros que serão mobilizados através de hidrólise durante a germinação (ADAMEK-SWIERCZYNSKA, 2002).

A germinação é uma sequência de eventos fisiológicos influenciada por fatores externos (ambientais) e internos (dormência, inibidores e promotores da germinação) na qual cada fator pode atuar por si ou em interação com os demais. É definida como a emergência das estruturas essenciais do embrião, manifestando a sua capacidade de dar origem a uma nova planta, sob condições ambientais favoráveis. A germinação é disparada por um processo denominado embebição, que consiste na imersão da semente em água. A

viabilidade e a capacidade germinativa das sementes são bastante variáveis entre as diferentes espécies (BEWLEY, 1997).

A maioria das sementes maduras é extremamente seca, contendo normalmente 5 a 20% do seu peso total em água. Deste modo, a germinação não é possível até que a semente absorva a água necessária para disparar as atividades metabólicas relacionadas a este processo. As sementes apresentam enzimas que são ativadas e outras sintetizadas para a hidrólise e utilização dos nutrientes de reserva acumulados nas células durante o período de formação da semente. As mesmas células que inicialmente sintetizavam imensas quantidades de reservas, no momento da germinação invertem completamente seus processos metabólicos, passando agora a degradar as reservas (RAVEN, 1992).

A germinação inicia-se mergulhando a semente seca em água e termina com o início do alongamento do eixo embrionário, usualmente a radícula (BEWLEY, 1997). A entrada de água na semente, processo denominado de embebição, é controlada principalmente pela permeabilidade da casca, disponibilidade de água e composição química das proteínas de reserva. Com a reidratação dos tecidos ocorre intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas, como ativação de enzimas, síntese de RNA e de proteínas que resultam no fornecimento de energia e nutrientes necessário para a retomada de crescimento por parte do eixo embrionário. Estes eventos estão intimamente relacionados com o término da germinação e o preparo para o desenvolvimento (EHRENSHAFT, 1990; BOTHA, 1992; SALON, 1988). O processo de germinação das sementes envolve a ativação de reações

bioquímicas que encontravam-se quiescentes na semente seca. Esta ativação está associada a uma mudança do desenvolvimento da semente para o crescimento do embrião regulado bioquimicamente. Enzimas proteolíticas desempenham um importante papel nessa mudança por pelo menos duas razões. Primeiro, as enzimas anabólicas que são requisitadas durante a formação da semente não serão mais necessárias nessa nova etapa. Segundo, algumas proteínas da semente podem sofrer danos durante o estágio seco e deverão ser removidas por hidrólise. Além disso, sabe-se que as sementes contêm quantidades significantes de inibidores de protease de caráter protéico, que devem ser degradados por proteases específicas antes do início da germinação (YANG, 1991).

A síntese das duas proteínas de reserva majoritárias da ervilha, a legumina e a vicilina, e sua estocagem nos corpúsculos protéicos dos cotilédones em desenvolvimento são bem conhecidas a nível bioquímico e genético. No entanto, a degradação e o mecanismo de controle da proteólise, processos vitais para a germinação e o estabelecimento da nova planta, não estão elucidados. Em outras leguminosas, está claro que esse processo envolve uma seleção de enzimas proteolíticas, algumas das quais já existem na semente seca enquanto outras são sintetizadas *de novo* durante a germinação e secretadas para os corpúsculos protéicos (JONES, 1996).

1.4 - Proteases

As sementes secas das plantas superiores apresentam várias atividades hidrolíticas de funções ainda desconhecidas. A atividade proteolítica das sementes secas tende a ser pequena quando comparada com o elevado aumento da atividade durante e após a germinação (YANG, 1991).

Uma das principais classes de atividade proteolítica encontrada em sementes é a classe das carboxipeptidases. São classificadas como carboxipeptidases todas as exopeptidases que degradam os polipeptídeos a partir da porção C-terminal. As carboxipeptidases de sementes estão localizadas nos corpúsculos protéicos das dicotiledôneas e no endosperma dos cereais em germinação (JONES, 1996). De uma forma geral, existem três características comuns a essa classe de enzimas: a presença de uma serina no sítio ativo, que vai estar envolvida no mecanismo de catálise; pH ótimo na faixa de 4 a 6 e baixa especificidade apresentada para diversos substratos. O peso molecular das carboxipeptidases de sementes varia amplamente, bem como o padrão de mudança de atividade ao longo da germinação. Enquanto há um aumento de atividade ao longo da germinação em feijão comum, soja, mamona, milho, trigo e cevada, no arroz essa atividade diminui ao longo da germinação. Em ervilha, o nível de carboxipeptidase parece ser constante (JONES, 1996).

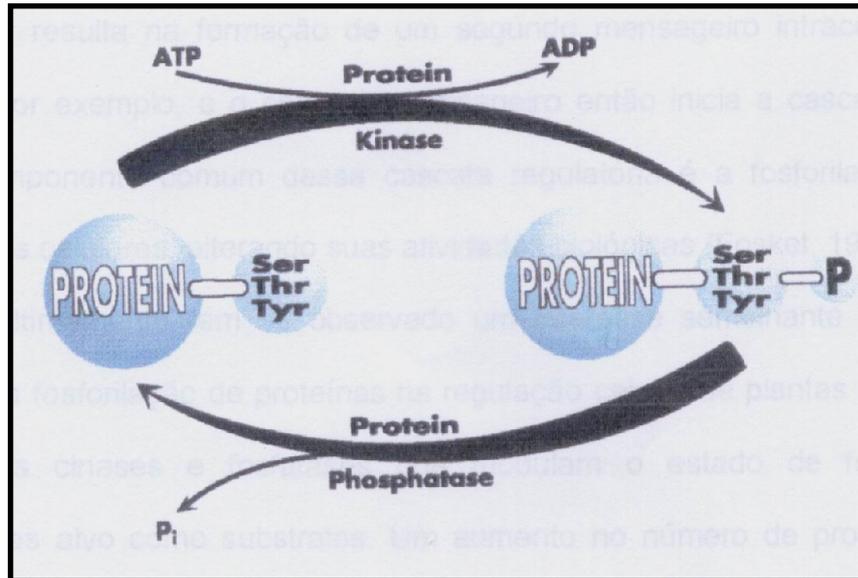
Em 1991, Yang e Malek identificaram pela primeira vez em plantas um complexo proteolítico de alto peso molecular (400 kDa) isolado de sementes secas de ervilha. Tal complexo apresenta analogia ao proteossoma de células

de mamíferos, cuja função ainda não é completamente esclarecida, mas sugere-se uma ligação com o *turnover* de proteínas danificadas por estresse. A presença de uma partícula similar em sementes de plantas, uma das estruturas de maior tolerância ao estresse ambiental pode dar suporte a essa hipótese (YANG, 1991).

1.5 - Fosforilação e defosforilação de proteínas

A fosforilação reversível de proteínas catalisada por enzimas é um dos mecanismos de regulação mais comuns pelo qual as células eucarióticas modulam a função de muitas enzimas, as quais podem desempenhar importante papel na germinação do embrião (BRUSA, 1994).

O estado de fosforilação das proteínas é regulado pelas atividades opostas de proteínas cinases e fosfatases (**esquema 1**). A fosforilação de proteínas eucarióticas ocorre predominantemente em resíduos de serina e treonina (97%) e em menor extensão em resíduos de tirosina (SMITH, 1996).



Esquema 1 – Processo de fosforilação catalisado pelas proteínas cinases, adicionando um grupamento fosfato em resíduos de serina, treonina ou tirosina, e proteínas fosfatases catalisando a reação inversa, isto é, retirando grupamentos fosfato desses resíduos.

Retirado de : <http://www.calbiochem.com>

Esse mecanismo representa um processo crucial na transdução de um sinal extracelular para o interior da célula e na resposta a este sinal. De uma forma geral, esses processos em células vegetais parecem ser bastante similares aos que ocorrem em células animais. As diferenças estão provavelmente relacionadas às várias funções biológicas. Nas células animais, altamente especializadas, alguns processos são extremamente rápidos e envolvem uma massiva fosforilação em resíduos de serina e treonina (TROJANEK, 1996).

Em plantas, muitas células de indivíduos maduros continuam não-especializadas, permitindo uma considerável capacidade de regeneração. A regulação do crescimento celular em plantas parece ser controlado pela fosforilação de proteínas (TROJANEK, 1996).

1.5.1 - Proteínas cinases

Um grande número de proteínas cinases já foram identificadas e caracterizadas em plantas superiores. Em muitos casos, a mesma enzima está presente em diferentes tecidos da mesma planta, mas também existem casos em que uma determinada enzima é característica de um tecido específico. Em termos de localização, as proteínas cinases já foram descritas em raízes, brotos, botões, plúmulas e folhas maduras e em várias frações subcelulares: núcleo, citosol, membranas, ribossomos e mitocôndria (CHIATANTE, 1991).

As proteínas cinases transferem o fosfato de um nucleotídeo para a hidroxila dos resíduos de serina, treonina ou tirosina de um substrato protéico, tornando-os fosforilados (SOMMERCORN, 1988). Consistem de uma família de enzimas composta por mais de 200 membros que diferem em peso molecular, estrutura de subunidades, mecanismo de ativação e mesmo especificidade de substrato (TAYLOR, 1989 e HANKS, 1995). Além disso, essas enzimas podem ser classificadas de acordo com o tipo de resíduo fosforilado (serina, treonina ou tirosina) e tipo de regulador da sua atividade (SOMMERCORN, 1988).

Em mamíferos, sabe-se que a variação nos níveis de fosforilação é responsável por regular mecanismos de divisão celular. Em plantas superiores, as proteínas cinases parecem sofrer variações de atividade durante a proliferação celular. Já é descrito que a variação no padrão de fosforilação de proteínas da cromatina pode estar relacionada com modificações na sua estrutura durante a germinação (CHIATANTE, 1991).

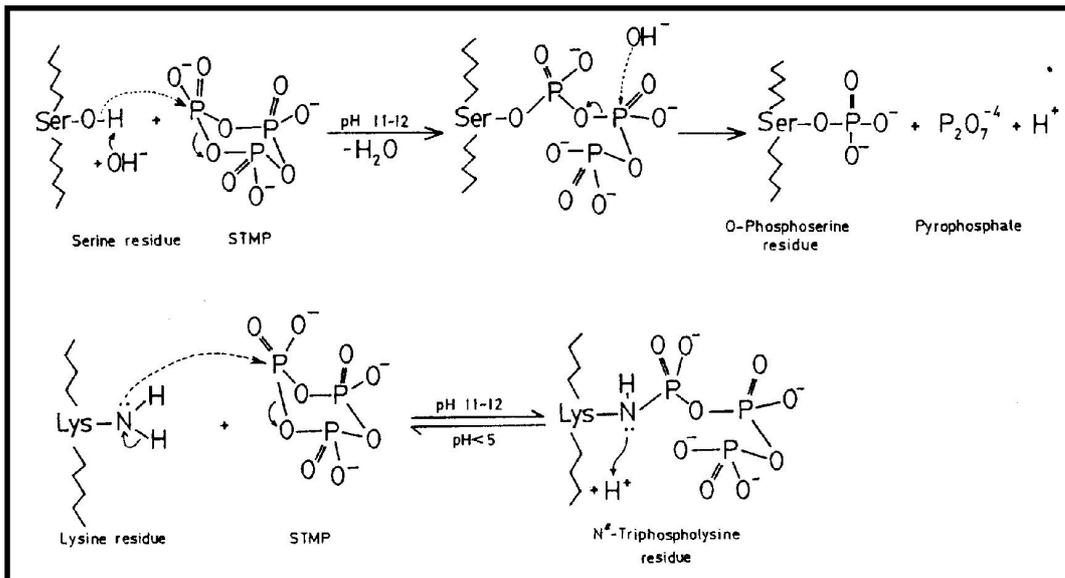
Uma proteína cinase amplamente conhecida e caracterizada é a proteína cinase dependente de cálcio (CDPK – do inglês, "calcium dependent protein kinase") de soja. Esta enzima contém um domínio catalítico similar à cinase dependente de calmodulina animal, um domínio auto-inibitório na região de junção e um domínio de ligação de cálcio na região tipo calmodulina. A distribuição de calmodulina e da CDPK no reino vegetal sugere um papel multifuncional das proteínas ligadoras de cálcio na transdução de sinal em plantas (TROJANEK, 1996).

Em ervilha, já foi descrita uma proteína cinase do tipo caseína cinase II (CK II) extraída de núcleos das células das extremidades das raízes durante a germinação (BRUSA, 1994). A caseína-cinase tipo II é uma enzima multifuncional, independente de cálcio e nucleotídeo, que fosforila especificamente resíduos de serina e treonina. Evidências mostram que a CK II desempenha importante papel em uma grande variedade de processos, como mitose, crescimento celular, transdução de sinal, transcrição e tradução de RNAm. Por apresentar funções tão diversas, os substratos fisiológicos propostos para a CK II são também bastante variados. Inclui-se pelo menos oito enzimas metabólicas diferentes, proteínas do citoesqueleto, fatores de transcrição, calmodulina e proteínas nucleares do tipo lamina (ZHANG, 1993). Seu melhor substrato é a caseína e tanto ATP como GTP servem como doadores de fosfato. A atividade é inibida por concentrações nanomolares de heparina (HATHAWAY, 1980) e ativada por componentes polibásicos, principalmente esperminas (CHAUDHRY, 1989).

1.5.2 – Fosforilação química de proteínas

A fosforilação química pode ser utilizada para alterar as propriedades funcionais das proteínas presentes nos alimentos. Esse método de modificação de proteínas pode ser realizado tanto com oxicloreto de fósforo (POCl_3) como com o trimetafosfato de sódio (STMP – do inglês, "sodium trimetaphosphate"). Estudos comparativos das vantagens e desvantagens de cada reagente indicaram que o STMP era o reagente mais apropriado, pois além de apresentar um custo inferior, o emprego do STMP é mais indicado para o setor alimentício (SGARBIERI, 1996).

A reação de fosforilação de proteínas por STMP ocorre em meio fortemente alcalino (pH 11-12) e temperatura por volta dos 30°C (SUNG, 1983) e o fosfato é inserido predominantemente em resíduos de serina ou em menor proporção em resíduos de lisina. De acordo com o mecanismo proposto, o resíduo de serina é fosforilado em seu grupamento hidroxila, ao mesmo tempo em que há liberação de quantidade equimolar de pirofosfato. No caso da lisina, há a formação do derivado N-trifosfolisina, sendo a reação reversível em pHs ligeiramente baixos (pH < 5) sem a formação de pirofosfato (**esquema 2**) (SGARBIERI, 1996 e SUNG, 1983).



Esquema 2 – Mecanismo de fosforilação por STMP (SUNG, 1983)

1.5.3- Proteínas fosfatases

As proteínas fosfatases são enzimas capazes de remover grupamentos fosfato da cadeia lateral de fosfoaminoácidos, podendo ser classificadas em fosfatases ácidas e fosfatases alcalinas de acordo com sua faixa ótima de pH, além da classificação pela especificidade de substrato em serina/treonina fosfatases ou tirosina fosfatases.

As proteínas fosfatases (PPases) catalisam especificamente a defosforilação de fosfoserina e fosfotreonina em substratos protéicos. Essas enzimas são tradicionalmente classificadas em quatro subgrupos (PP1, PP2A, PP2B e PP2C) baseada em suas propriedades bioquímicas e farmacológicas :

PP1 e PP2A são inibidas por ácido ocadáico, PP2B é Ca^{+2} /calmodulina dependente e PP2C necessita de Mg^{+2} para sua atividade. A maioria das PPases são compostas de mais de uma subunidade catalítica ou regulatória. Enzimas dessa família apresentam uma grande similaridade de seqüência (exceto PP2C), sendo no entanto significativamente diferentes das tirosina fosfatases (LUAN, 1998 e SHENOLIKAR, 1994).

O mecanismo catalítico utilizado pelas PPases se dá pelo ataque direto de uma molécula de água ao centro possuidor do fósforo no substrato, sem transferência do fosfato para a enzima (EGLOFF, 1995).

Estudos bioquímicos e genéticos em plantas mostram o envolvimento das atividades fosfatásicas da PP1 e/ou PP2 em diferentes processos celulares (SMITH, 1996). PP1 e PP2A parecem estar envolvidas no mecanismo de sinalização por ácido abscísico para o fechamento dos estômatos, através da regulação de canais iônicos (WARD, 1995 e PEI, 1997). Análises genéticas em plantas mutantes de *Arabidopsis*, insensíveis ao ácido abscísico, foram feitas e dentre os vários genes mutados essenciais ao seu mecanismo de sinalização, dois são de proteínas fosfatases. A mudança fenotípica mais dramática observada nesses mutantes é encontrada em estômatos, que têm seus poros permanentemente abertos na presença do ácido abscísico (LEUNG, 1994). Além disso, PP1 e PP2A estão presentes em uma variedade de extratos de plantas como trigo, ervilha, cenoura, e outras (MACKINTOSH, 1991).

A fosforilação em resíduos de tirosina de proteínas intracelulares é um importante mecanismo regulatório envolvido em processos como crescimento, proliferação e diferenciação celular. Todas as proteínas do tipo tirosina

fosfatases (PTPases) apresentam um domínio catalítico conservado, que consiste em uma cisteína e uma arginina separadas por cinco aminoácidos. O resíduo de cisteína do sítio catalítico está envolvido com a formação de um intermediário fosfoenzima (LUAN, 1998).

Essas fosfatases podem ser identificadas bioquimicamente pela sua sensibilidade ao vanadato, insensibilidade ao ácido ocadáico, por não necessitarem de íons para sua atividade catalítica e perda total dessa atividade quando ocorre uma mutação em seu sítio ativo, com a troca da cisteína por uma serina. Todas essas fosfatases parecem ter preferência por peptídeos contendo fosfotirosina, embora algumas tenham especificidade dupla, também hidrolisando fosfoserina e fosfotreonina (FAUMAN, 1996).

Com base na função, estrutura e sequência, essas fosfatases podem ser agrupadas em três famílias principais: as tirosina fosfatases específicas, as tirosina fosfatases de especificidade dupla e as tirosina fosfatases de baixo peso molecular (FAUMAN, 1996).

Embora proteínas fosforiladas em tirosina estejam presentes em células de plantas em níveis maiores do que os achados em células animais e atividades de tirosina cinase e fosfatase tenham sido demonstradas em diferentes sementes, seus papéis fisiológicos ainda não estão esclarecidos, existindo apenas suposições sobre possíveis papéis destas enzimas nos mecanismos de diferenciação celular (DUFF, 1994).

Em 1998, Guo e colaboradores descreveram uma fosfatase citossólica de plúmulas de ervilha com propriedades semelhantes às de PTPases animais. A enzima defosforila fosfoproteínas com alta especificidade para fosfotirosina

em comparação com fosfoserina/fosfotreonina. A enzima é modulada por íons, vanadato e molibdato de uma maneira similar ao modo como as PTPases são afetadas por esses agentes. A atividade é totalmente bloqueada por 100 μM de molibdato ou vanadato e não é significativamente alterada por íons como Ca^{+2} , Mg^{+2} ou Mn^{+2} . No entanto, essa enzima é notavelmente diferente das PTPases em um importante aspecto: sua atividade não foi afetada por óxido de fenilarsina e ácido iodoacético, dois agentes alquilantes que interagem com o resíduo de cisteína essencial do sítio ativo das PTPases que é necessário para a reação catalítica. Esse resultado sugere a possibilidade de que a atividade PTPase da fosfatase de ervilha tenha um mecanismo catalítico diferente do mecanismo das PTPases animais.

1.6 - Proteínas de reserva

As proteínas de reserva são sintetizadas na semente em desenvolvimento e ficam estocadas nos corpúsculos protéicos durante todo o estágio seco da semente.

O desenvolvimento das sementes de ervilha é marcado por vários estágios fisiológicos distintos. Esses estágios cobrem desde a fertilização do óvulo até a presença de um embrião desenvolvido, seguido pela diferenciação dos tecidos do embrião para formar o eixo embrionário e os cotilédones. A divisão celular no embrião cessa após a diferenciação, e o crescimento

subsequente se dá por expansão celular. Até a diferenciação, ocorre pequeno aumento em tamanho ou peso, e após, há um rápido acúmulo de reservas nutricionais, que continua até o estágio final de maturação e desidratação da semente (GATEHOUSE, 1982).

De acordo com a classificação proposta por Osborne (1898), as proteínas de sementes podem ser divididas em quatro classes, de acordo com a solubilidade:

- albuminas – solúveis em água e meio neutro
- globulinas – solúveis em soluções salinas e água
- glutelinas – solúveis em soluções ácidas e alcalinas
- prolaminas – solúveis em soluções alcoólicas

As proteínas de reserva de sementes de ervilha são globulinas e podem ser separadas em duas frações majoritárias chamadas legumina e vicilina. A legumina é usualmente a fração maior, quantitativamente, mas suas proporções dependem da variedade da semente (GATEHOUSE, 1981).

Legumina e vicilina diferem entre si pelo peso molecular, coeficiente de sedimentação e pela composição de subunidades. Ambas são compostas por diversas subunidades não idênticas (LYCETT, 1983 e PATEL, 1994). A legumina é menos solúvel que a vicilina em soluções salinas e apenas a vicilina coagula a 95°C, enquanto a legumina não coagula nesta temperaturas (DERBYSHIRE, 1976).

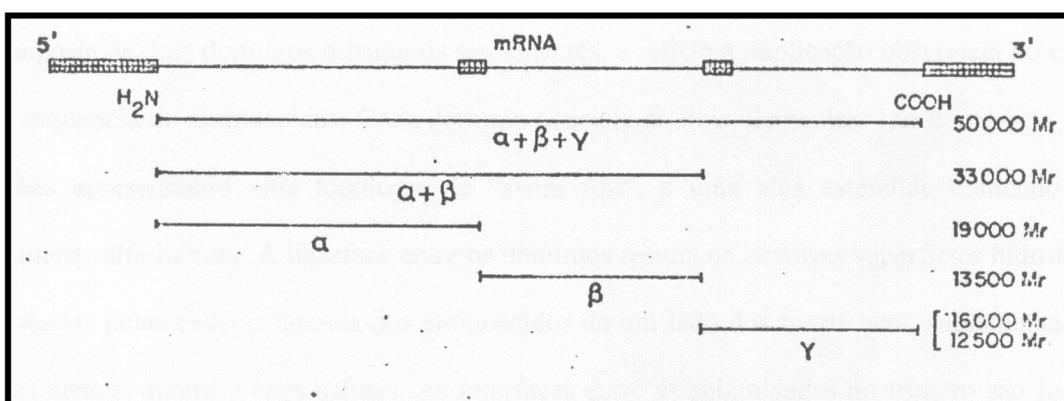
A molécula de legumina isolada possui seis pares de subunidades mantidos juntos por ligação covalente em uma estrutura de peso molecular de 360 kDa. Cada par de subunidades consiste de uma subunidade acídica, de

peso molecular aproximado de 40 kDa e uma subunidade básica de aproximadamente 20 kDa de peso molecular ligadas por uma ou mais pontes dissulfeto (GATEHOUSE, 1980).

A vicilina de ervilha apresenta um coeficiente de sedimentação 7S, com peso molecular de aproximadamente 150 kDa, e subunidades com cerca de 50 kDa. Algumas dessas subunidades contêm quebras na cadeia polipeptídica causadas por proteólise específica pós-traducional (GATEHOUSE, 1982). Quando analisada por eletroforese em gel de poliácridamida sob condições desnaturantes, a vicilina apresenta polipeptídeos majoritários de 50 kDa, 33 kDa, 31 kDa e polipeptídeos minoritários de 19 kDa, 16 kDa, 13,5 kDa e 12,5 kDa (GATEHOUSE, 1984). No retículo endoplasmático rugoso, ocorre também a glicosilação da proteína, que afeta cerca de 0,5 a 1,4 % da vicilina total, sendo particularmente notável o fato de que a subunidade de 12,5 kDa glicosilada passa a apresentar um peso molecular aparente de 16 kDa. Os açúcares constituintes da proteína glicosilada são glicosamina e manose, estando ligados a resíduos de asparagina da proteína (PERNOLLET, 1983). A vicilina passa por três tipos de modificações pós-traducionais: assim que a proteína atravessa a membrana do retículo endoplasmático rugoso, ocorre a remoção da sequência líder; em seguida, algumas de suas subunidades podem ser glicosiladas; finalmente, algumas são proteolisadas e clivadas. A clivagem proteolítica pode permitir o empacotamento adequado da vicilina nos corpúsculos protéicos da semente, permitindo ainda uma mobilização mais rápida de aminoácidos na germinação. A proteólise não altera o peso molecular da proteína em condições não desnaturantes, porque os polipeptídeos

resultantes se mantêm associados por forças de natureza não-covalente (GATEHOUSE, 1982).

A elucidação da sequência de aminoácidos da vicilina mostrou que os polipeptídeos menores do que 50 kDa apresentam grande homologia entre si e, de fato, se originam de um precursor de 50 kDa. Assim, podemos dizer, de forma simplificada, que o modelo estrutural da molécula de vicilina é um trímero. O **esquema 3**, proposto por Gatehouse e colaboradores em 1984, apresenta a estrutura da vicilina, composta por três grupos de polipeptídeos: α (19 kDa), β (13,5 kDa) e γ (12,5 ou 16 kDa na forma glicosilada). A forma não proteolisada (50 kDa) se apresenta como a soma $\alpha + \beta + \gamma$, e os pesos intermediários se originam da proteólise incompleta da molécula precursora ($\alpha + \beta = 33$ kDa e $\beta + \gamma = 31$ kDa). Sugere-se ainda que a vicilina seja sintetizada a partir de uma família de genes, com base na descoberta de diversos cDNAs codificantes para polipeptídeos da vicilina (CROY, 1982; LYCETT, 1983 e SPENCER, 1983).



Esquema 3 – Derivação dos polipeptídeos constituintes da vicilina a partir do precursor de 50 kDa (GATEHOUSE, 1984)

1.7 - Propriedades funcionais das proteínas

As propriedades funcionais têm sido definidas como qualquer propriedade de um alimento ou componente de um alimento, excetuando-se as nutricionais, que influencie a sua aceitação e utilização. A somatória das propriedades funcionais de um alimento ou ingrediente alimentício é referida como "funcionalidade" e o "valor funcional" como uma característica de funcionalidade de um produto ou ingrediente alimentício que aumente a sua aceitação e utilização (SGARBIERI, 1996).

Os métodos para a medida de várias propriedades funcionais são ainda bastante empíricos, não existindo uma padronização dos procedimentos, o que dificulta muito a comparação de dados que vêm sendo obtidos nessa área. A classificação dessas propriedades é igualmente complexa, sendo difícil uma classificação que seja coerente e universal. Uma propriedade funcional poderá ser a expressão de uma ou mais propriedades físicas e químicas das proteínas. Uma classificação bastante racional das propriedades funcionais foi proposta por Pour-El (1981), como segue:

- hidrofílicas – depende da afinidade da proteína pela água (solubilidade, capacidade de hidratação e retenção de água)

- interfásicas – depende da capacidade das moléculas de proteína se unirem e formarem uma película entre duas fases imiscíveis (emulsificação, formação de espuma)
- intermoleculares – depende da habilidade da proteína de formar ligações cruzadas entre suas próprias moléculas ou com outros componentes do alimento (formação de fibras de proteínas, geleificação, formação de massa visco-elástica)
- reológicas – propriedades que dependem de características físico-químicas específicas das proteínas (viscosidade)
- sensoriais – são propriedades que se manifestam através dos órgãos dos sentidos, por isso, também chamadas de propriedades sensoriais (textura, cor, gosto, aroma)

A solubilidade é uma propriedade físico-química fundamental das proteínas, também classificada como uma propriedade funcional pela importância que exerce sobre a funcionalidade das proteínas nos alimentos. Depende de vários fatores como: peso molecular e conformação das moléculas; densidade e distribuição das cargas elétricas, que por sua vez é influenciada pelo pH, natureza e concentração de íons ou força iônica e temperatura.

Emulsão pode ser definida como uma mistura de dois líquidos imiscíveis, um dos quais é disperso na forma de glóbulos no outro. O que torna uma emulsão estável é a presença de um agente emulsificante, o qual diminui a tensão superficial existente entre as duas fases e permite a formação da emulsão com um nível mais baixo de energia. A principal característica de um agente emulsificante é a de possuir na mesma molécula partes hidrofílicas e

partes hidrofóbicas, o que permite a formação de uma camada entre as duas fases, separando-as (SGARBIERI, 1996).

Muitas proteínas são utilizadas pela indústria de alimentos no intuito de melhorar suas propriedades funcionais, mais do que aumentar o seu valor nutritivo. As proteínas de sementes, em especial as leguminosas, são consideradas proteínas de fácil obtenção e baixo custo, porém costumam apresentar baixa funcionalidade também. Nesse sentido, vários esforços têm sido feitos para modificar essas proteínas e aumentar o valor funcional. Tais modificações dizem respeito a alterações intencionais nas propriedades físico-químicas das proteínas através de agentes químicos, enzimáticos ou físicos, e incluem sulfonação, deaminação alcalina, carboximetilação, succinilação e alquilação (SUNG, 1983). Outras técnicas também estão sendo aplicadas, como: fosforilação enzimática (CAMPBELL, 1992); fosforilação química (SUNG, 1983); glicosilação (BANIEL, 1992 e PEDROSA, 1997); hidrólise alcalina (KRISTINSSON, 2000); acilação (JOHNSON, 1983 e EISELE, 1981); e acetilação (EL-ADAWY, 2000).

2 – Objetivos

2.1 – Objetivos Gerais

Estudar o perfil bioquímico da semente de ervilha ao longo da germinação, bem como atividades enzimáticas envolvidas nos mecanismos de fosforilação/defosforilação de proteínas e verificar se modificações pós traducionais alteram as propriedades funcionais da vicilina.

2.2 – Objetivos específicos

2.1.1 - Analisar o perfil bioquímico dos embriões de sementes de ervilha ao longo da germinação com relação ao conteúdo total de proteína, lipídeos neutros, fosfolipídeos e fosfato.

2.1.2 - Identificar e caracterizar cineticamente as principais atividades cinásicas e fosfatásicas presentes em embriões de sementes de ervilha.

2.1.3- Purificar e fosforilar quimicamente a vicilina com trimetafosfato de sódio

2.1.4 - Caracterizar alterações na estrutura e nas propriedades hidrofílicas como solubilidade e propriedades interfásicas como capacidade de estabilizar emulsão, desempenhadas pela vicilina purificada e fosforilada quimicamente.

III - Material e métodos

3.1 – Reagentes

EDTA, ATP, padrões de peso molecular para gel de poliacrilamida, tris, glicina, acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, DMSO, resina Sephadex G-50, DTT, p-NPP, levamizole, tetramizole, orto-vanadato de sódio, acetato de sódio e reagente de Folin foram obtidos da SIGMA FINE CHEMICALS (St. Louis, MO, USA). Fluoreto de sódio, tartarato duplo de sódio e potássio e acetona obtidos da REAGEN. Anticorpo policlonal contra fosfoserina, anticorpo secundário e padrão de peso molecular para western blotting obtidos da SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. ATP-³²P e kit ECL obtidos da AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. Etanol, metanol, clorofórmio, ácido acético, hexano e éter etílico obtidos da MERCK. Os demais reagentes utilizados foram de pureza analítica.

3.2 – Sementes

As sementes secas de ervilhas, *Pisum sativum* L. cultivar MIKADO, foram fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Brasília.

3.3 – Germinação

As sementes secas eram lavadas em água corrente por aproximadamente 5 minutos, mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio 15% (v/v) sob agitação constante por mais 5 minutos e lavadas novamente com água corrente por 10 minutos. As sementes eram então embebidas em água deionizada por 16-18 horas, no escuro a temperatura ambiente (20 a 25°C). Após este período elas eram dispostas sobre algodão coberto com papel de filtro úmido e mantidas no escuro para germinar. Após os tempos determinados (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias após o término da embebição) grupos de sementes tinham seus embriões retirados com auxílio de pinças e o material era imediatamente pesado em balança analítica, tinha seu comprimento medido com régua milimetrada e então era congelado a -20°C até o momento da sua utilização.

3.4 - Preparação dos homogenatos totais

10 eixos embrionários dos diferentes dias após a embebição (0 até 7 dias) eram descongelados, homogeneizados com 0,5 a 0,8 mL de solução 0,15M de NaCl com ajuda de potter plástico e congelados por 3 a 4 horas em freezer a -20°C . Após esse período, os homogenatos eram descongelados, centrifugados três vezes por 10 minutos à 12000 g, recolhendo-se os sobrenadantes nas sucessivas centrifugações. O sobrenadante resultante da última centrifugação é considerado o homogenato total (HT).

3.5 - Purificação da Vicilina

A vicilina foi obtida de acordo com protocolo descrito por Pedrosa e Ferreira, 1994, da forma descrita a seguir: as sementes secas de ervilha eram trituradas em moinho Retsch ZM 1 (H. Jungens and Co., Bremen) utilizando-se peneira metálica com poro de 0,5 mm. A farinha resultante era delipidada com acetona P.A. em 5 ciclos de extração, a temperatura ambiente, na proporção de 1 grama de farinha para 10 ml de acetona. Em cada ciclo, a acetona era adicionada sobre a farinha e após 30 minutos sob agitação manual deixava-se o material decantar, desprezando-se o sobrenadante. Após a total evaporação do solvente, a farinha delipidada era então incubada por 1 hora sob agitação

constante a 4°C em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,5 contendo NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, leupeptina 0,5 µg/ml, PMSF 2 µg/ml, inibidor de tripsina de soja 0,05 µg/ml e pepstatina A 0,07 µg/ml , na proporção de 1 grama de farinha para 10 ml de tampão. Este material era então centrifugado por 30 minutos a 7000 rpm (rotor Sorval SS34) entre 12 e 16°C. O sobrenadante era recolhido e precipitado por sulfato de amônio a 40% de saturação, sofrendo nova centrifugação nas mesmas condições citadas acima. O sobrenadante era novamente recolhido e precipitado por sulfato de amônio a 75 % de saturação. Após nova centrifugação o sobrenadante era recolhido e precipitado por sulfato de amônio a 99 % de saturação. Centrifugava-se uma última vez e recolhia-se o precipitado, que era ressuspendido em tampão tris-HCl 10 mM pH 10 e dialisado em membrana com poro de 4 a 6 kDa, a 4°C por 48 horas, contra o mesmo tampão.

3.6 - Dosagem de proteína

As dosagens de proteína foram realizadas seguindo-se o protocolo descrito por Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina para a curva padrão nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 30 mg%.

3.7 – Extração de lipídeos e análise por cromatografia de camada fina

Os lipídeos totais dos homogenatos brutos foram extraídos segundo Bligh and Dyer (1959). As amostras contendo 1 mg de proteína total foram delipidadas em tubos de vidro com fundo cônico pela adição de uma mistura de clorofórmio:metanol:água (1:2:0,8 v:v:v) em um volume final de 3,8 mL, considerando-se o volume da amostra dentro do volume de água. Após 2 horas de extração a temperatura ambiente com agitação em intervalos de 5 minutos, a mistura foi centrifugada em uma centrífuga clínica por 10 minutos a 3000 g e o sobrenadante contendo os lipídeos foi separado da fração glicoprotéica que sofreu nova extração nas mesmas condições, agora por 1 hora. Aos sobrenadantes das duas extrações juntos acrescentou-se 5 mL de clorofórmio e 5 mL de água. Após vigorosa agitação, o material foi centrifugado por 15 minutos a 3000 g, separando-se em duas fases: orgânica e inorgânica. A fase orgânica (parte inferior) foi removida com auxílio de seringa de vidro com agulha longa, seca sob atmosfera de nitrogênio em banho seco a 37°C e

ressuspensa em 0,1 mL de clorofórmio puro. Os lipídeos eram então analisados por cromatografia em camada fina (TLC – do inglês, "thin layer chromatography") na qual as amostras eram aplicadas em uma placa de sílica. Para identificação dos fosfolipídeos utilizou-se a solução de Horwitz e Perlman (1977) contendo água: ácido acético: metanol: acetona: clorofórmio (16 : 24 : 26 : 30 : 80, v:v:v:v) e para identificação de lipídeos neutros seguiu-se o protocolo descrito por Kawooya e Law (1988) no qual utiliza-se uma mistura de hexano: éter etílico: ácido acético (60 : 40 : 1, v:v:v). Após corrida em cuba de vidro fechada, as placas foram secas e coradas com vapor de iodo sublimado ou queimadas em estufa a 150°C após imersão em solução 10% CuSO₄ e 8% H₃PO₄.

3.8 – Dosagem de fosfato covalentemente ligado

Após extração de lipídeos, as frações glicoprotéicas foram utilizadas para análise do conteúdo de fosfato covalentemente ligado. As amostras foram mineralizadas a 300°C por 3 horas na presença de 300 µl de ácido perclórico (HClO₄) 72% (v/v) no aparelho de microkdjehal com sistema de refluxo e após este tempo as amostras foram evaporadas. Após o resfriamento das mostras, adicionou-se 500 µl da solução de Fiske-Subarrow (1925). As amostras eram então lidas em espectrofotometro a 675 nm.

3.9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de SDS foram realizadas empregando-se o sistema descrito por Laemmli (1970). Foram utilizados géis de 10% de concentração, exceto quando especificado outro valor, e as corridas eram feitas em câmara fria (4°C) utilizando-se corrente constante de 20 mA. Após as corridas os géis eram corados com 0,03% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R, 46% metanol (v/v) e 9% ácido acético (v/v) por 20 a 30 minutos e descorados com uma solução de 5% metanol (v/v) e 7,5% ácido acético (v/v).

3.10 – "Western Blotting"

Após SDS-PAGE (10%), as proteínas foram eletrotransferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose. A eletrotransferência foi realizada em tampão Tris-glicina 25 mM e metanol 20% (v/v), pH 8,3 a 180-200 mA por 90 minutos a 4 °C (TOWBIN, 1979). A transferência foi monitorada corando-se a membrana com vermelho de Ponceau 0,5% (p/v) em TCA 10% (p/v) por 10 minutos. Posteriormente, a membrana foi descorada por lavagem com Tris-HCl 0,01 M pH 7,6 contendo 0,15 M de NaCl (TBS). A membrana totalmente

descorada, foi então bloqueada com Tris-HCl 0,01 M pH 7,6 contendo 0,15 M NaCl e 2% albumina sérica bovina fração V (Calbiochem) e 0,005% de Tween 20 (TBS-Tween-Albumina) por 18 horas a 4 °C. Após esse tempo, o tampão de bloqueio foi desprezado e a membrana incubada com anticorpo primário por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação constante. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-Tween-Albumina e incubada por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação constante com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído na solução de bloqueio. A membrana foi então lavada 3 vezes com intervalos de 5 minutos para cada lavagem com TBS-Tween-Albumina, 2 vezes com TBS-Tween e 1 vez com TBS. Por fim, o complexo antígeno-anticorpo foi revelado através do método de intensificação de quimioluminescência pelo luminol (ECL). O método ECL consiste basicamente na oxidação do luminol, reação catalisada pela peroxidase em presença de peróxido de hidrogênio. Intensificadores químicos sustentam a emissão de luz do luminol que imprime as bandas correspondentes às proteínas em filmes autoradiográficos. Pedacos do filme Kodak X-OMAT foram expostos por diferentes tempos, revelados e fixados adequadamente em câmara escura. Para reutilizarmos a mesma membrana com um outro anticorpo primário, utilizamos um tampão de descarregamento contendo tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 - 2% de SDS e 100 mM de 2-mercaptoetanol (CAMPOS, 1999). Quanto ao procedimento experimental, primeiro a membrana era lavada 5 vezes com TBS-Tween por 1 a 2 minutos cada lavagem. Em seguida, adicionava-se 25 mL do tampão de descarregamento e incubava-se por 30 minutos a 56°C. O tampão era trocado e deixava-se mais 30 minutos na

mesma temperatura. A membrana era então lavada 3 vezes com TBS-Tween e 2 vezes com TBS, 1 a 2 minutos cada lavagem. Antes da membrana ser bloqueada novamente, ela era corada com Ponceau, descorada com TBS e revelada com o sistema de ECL para verificarmos se o descarregamento ocorreu da forma desejada. A membrana era então bloqueada com TBS-Tween-albumina e seguia-se o protocolo descrito acima utilizando os outros anticorpos.

3.11 – Atividade fosfatásica

As medidas de atividade fosfatásica foram realizadas de acordo com protocolo descrito por Fialho (2002), com os homogenatos de embriões normatizados pela quantidade de proteína total, sempre acompanhados de um ponto sem adição de proteína (branco). Os ensaios foram realizados em placas de ELISA, com um volume final de reação de 150 μ L. As reações eram disparadas com a adição de pNPP e paralisadas com 20 μ L de NaOH 1 M. A liberação de *p*-nitrofenol (*p*-NP) era determinada pela leitura da absorbância a 405 nm em um leitor de ELISA (Thermomax Machine, Molecular Devices).

3.11.1 – Atividade *pNPP*ásica no eixo embrionário e o cotilédone

Os cotilédones dissecados das sementes em desenvolvimento nos tempos determinados (0, 1, 3 e 5 dias após a embebição) foram homogeneizados em solução salina (0,15 M NaCl) com auxílio de graal e pistilo de vidro, sofrendo três centrifugações consecutivas a 12000 g, recolhendo-se sempre o sobrenadante. O sobrenadante resultante da última centrifugação foi submetido a dosagem de proteína pelo método de Bradford (1976). Os ensaios de atividade enzimática foram realizados a 37°C por 60 minutos em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 com 2 mM de pNPP utilizando 1,5 µg de proteína total. A atividade enzimática foi expressa em nmol de pNP liberado x mg de proteína total⁻¹ x min⁻¹, utilizando-se o coeficiente de extinção molar 1,75 x 10⁴ M⁻¹ x cm⁻¹ (Sheng e Charbonneau, 1993).

3.11.2 – Medida de atividade pNPPásica no eixo embrionário

Os homogenatos de embriões (HTs) contendo 1,5 µg de proteína total foram ensaiados por 60 minutos a 37°C em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 e pNPP 2 mM. Após a paralisação da reação, a leitura foi feita a 405 nm e a atividade expressa como nmol de pNP liberado x mg de proteína⁻¹ x min⁻¹.

3.11.3 – Determinação do pH ótimo da atividade *pNPP*ásica dos embriões de sementes de ervilha

O pH ótimo da atividade fosfatásica foi determinado com o uso de 1,5 µg de proteína total dos HTs. Os diferentes pHs foram obtidos utilizando-se uma mistura de tampões contendo acetato de sódio, citrato de sódio, tris e glicina, cada um na concentração de 0,1 M, variando de 2,0 a 10,0 ajustados com HCl ou NaOH. Os ensaios foram realizados a 37°C por 60 minutos na presença de 2 mM de pNPP. A reação foi paralisada com a adição de NaOH e a leitura foi feita a 405 nm. A atividade foi expressa como nmol de pNP liberado x mg de proteína⁻¹ x min⁻¹.

3.11.4 – Variação da quantidade de proteína total na atividade *pNPP*ásica

A quantidade ideal de proteína total para os ensaios foi determinada variando a quantidade de 0,5 µg até 5 µg de proteína total, incubando por 60 minutos a 37°C em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 e 2mM pNPP. A reação foi paralisada com a adição de NaOH e a leitura foi feita a 405 nm. A atividade foi expressa como nmol de pNP liberado x mg de proteína⁻¹ x min⁻¹.

3.11.5 – Curva de concentração de *pNPP*

Os HTs contendo 1,5 µg de proteína total foram incubados em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 por 60 minutos a 37°C com concentrações crescentes de pNPP (0.5, 1.5, 5, 7, 10 e 20 mM). A reação foi paralisada com a adição de NaOH e a leitura foi feita a 405 nm. A atividade foi expressa como nmol de pNP liberado x mg de proteína⁻¹ x min⁻¹.

3.11.6 – Curso temporal da atividade *pNPP*ásica

Os HTs contendo 1,5 µg de proteína total foram incubados a 37 °C em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 e 2 mM de pNPP. Nos tempos determinados (0, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 360 minutos) alíquotas eram retiradas e adicionava-se NaOH para paralisar a reação. A liberação de pNP foi monitorada pela absorbância a 405 nm e a atividade expressa em nmol de pNP liberado x mg de proteína⁻¹.

3.11.7 – Ensaio de inativação térmica da fosfatase

Para o ensaio de inativação por desnaturação térmica, o HT de 5 dias após embebição (1,5 µg de proteína total) foi pré-incubado a 0, 28, 37, 55 ou 80°C por 60 minutos e então teve sua atividade ensaiada em tampão acetato

de sódio 0,1 M pH 5,5 com 2 mM de pNPP por 60 minutos a 37 °C. A reação foi paralisada com a adição de NaOH e a liberação de pNP foi monitorada pela absorbância a 405 nm com a atividade sendo expressa em nmol de pNP liberado x mg de proteína⁻¹ x min⁻¹. Para analisar o curso temporal da inativação térmica a 55 e 80°C o HT foi submetido a pré-incubação nestas temperaturas por tempos determinados (0, 5, 10, 15, 20, 30, 60 e 90 minutos) e sendo submetidos ao mesmo ensaio anterior para verificar a atividade pNPPásica.

3.11.8 – Uso de efetores de fosfatase na atividade pNPPásica

A fim de obtermos uma caracterização bioquímica da atividade pNPPásica utilizamos HT de 5 dias após embebição em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5, 2 mM de pNPP e 1,5 µg de proteína total, adicionando-se ao meio de reação os seguintes efetores: DTT, citrato de sódio, molibdato de amônio, fluoreto de sódio, tartarato duplo de sódio e potássio, vanadato de sódio, levamizol, tetramizol, MgCl₂ e CaCl₂. Após 60 minutos de incubação a 37°C a reação foi paralisada com NaOH e submetida a leitura da densidade óptica a 405 nm. A atividade foi expressa em nmol de pNP liberado x mg de proteína⁻¹ x min⁻¹.

3.12 – Atividade cinásica

Os HTs (500 mg de proteína total) foram ensaiados para atividade enzimática segundo Silva-Neto e Oliveira (1993). A atividade é medida em meio contendo 50 mM tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 1 mM NaN₃. A reação era disparada com a adição de 100 µM de γ³²P-ATP (atividade específica de 1000 cpm / pmol de ATP) em um volume final de 300 µL, incubando por 60 minutos a 37 °C. Ao final da reação, duplicatas de 0,040 mL de cada amostra eram retiradas e pipetadas em papéis Whatmann 3 MM previamente carregados com 3 mM de ATP não radioativo e imediatamente mergulhados em uma sequência de soluções de precipitação por 15 minutos cada com agitação manual periódica, utilizando 10 mL de solução para cada papel (TCA 15%, TCA 10%, TCA 10%, todos com 5 mM de NaH₂PO₄ e a última lavagem com etanol 70%) Todas as lavagens eram realizadas em banho de gelo. A radioatividade era estimada por cintilação líquida. Logo após a retirada das alíquotas para precipitação com TCA, adicionava-se tampão de amostra com SDS (62 mM tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 5% 2-mercaptoetanol e azul de bromofenol) ao restante da amostra para paralisar a reação e analisá-las em SDS-PAGE seguido de autoradiografia.

3.13 – Fosforilação da vicilina purificada com trimetafosfato de sódio - STMP

A vicilina purificada era fosforilada incubando-se 25 mg de proteína total em 5 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 10 com o mesmo volume de uma solução de trimetafosfato de sódio (STMP) 4% em tampão borato 200 mM pH 11, por 3 horas a 37°C. Após esse tempo, o material era dialisado contra tampão Tris-HCl 10 mM pH 10 por 48 horas, a 4°C, e congelado a -20°C até o momento da utilização.

3.14 – Propriedades físico-químicas da vicilina fosforilada

3.14.1 – Solubilidade

A solubilidade foi determinada misturando-se 600 µL de solução de vicilina fosforilada ou controle (não fosforilada) em tris 10 mM pH 10 (1mg/mL) a diferentes pHs (variando de 1 a 12). Após 30 minutos a temperatura ambiente (20 a 25°C), as amostras eram centrifugadas e o sobrenadante era submetido a leitura em espectrofotômetro a 280 nm.

Os diferentes pHs foram obtidos utilizando-se uma mistura de tampões contendo acetato de sódio, citrato de sódio, tris e glicina, cada um na concentração de 0,1 M, variando de 1,0 a 12,0 ajustados com HCl ou NaOH.

3.14.2 – Estabilidade da emulsão

A vicilina fosforilada com STMP e o controle (não fosforilada) eram misturados com n-dodecano na proporção de 2 mL de n-dodecano para 6 mL da solução de vicilina 1 mg/mL em tampão Tris-HCl 10 mM pH 10. Essa mistura era submetida a um homogeneizador Politron PT 10 por 30 segundos a 20.000 rpm. A mistura era então imediatamente transferida para um tubo de vidro de fundo cônico graduado e o volume de separação da fase aquosa era medido nos tempos determinados.

3.15 – Análise da estrutura da vicilina fosforilada por STMP por dicroísmo circular

O espectro de dicroísmo circular foi medido utilizando-se um espectropolarímetro JASCO J-715 com cubeta de 2,0 mm, varrendo-se de 205 a 310 nm, com resposta de 8 segundos, sensibilidade de 100 mdeg e velocidade de 50 nm/min. As amostras fosforilada e controle (não fosforilada)

utilizadas apresentavam concentração de 1 mg/mL e o branco foi obtido utilizando-se o tampão no qual está a vicilina (tris 10 mM pH10).

3.16 – Análise da estrutura da vicilina fosforilada por fluorescência

As amostras contendo 1 mg/ml de vicilina fosforilada com STMP e controle (não fosforilada) em tampão tris 10 mM pH 10, foram submetidas a excitação a 280 nm e varredura de emissão na região de 300 a 380 nm (slit = 5), em espectrofotômetro Gary Eclipse Varian. O branco foi obtido utilizando-se o tampão no qual a vicilina está dissolvida.

4 - Resultados

4.1 – Parte I: Perfil bioquímico dos homogenatos de embriões de sementes de ervilha ao longo da germinação

Sabe-se que o processo de germinação das sementes inicia-se com a imersão da semente em água, e que a viabilidade e capacidade de germinar é bastante variável entre as diferentes espécies e mesmo entre os diferentes cultivares de uma mesma espécie. Para podermos ter um controle sobre o estágio de desenvolvimento da semente/planta, monitoramos o seu crescimento através da medida do seu comprimento, dividido em duas partes: radícula e caulículo (**figura 1A**) e do seu peso (**figura 1B**).

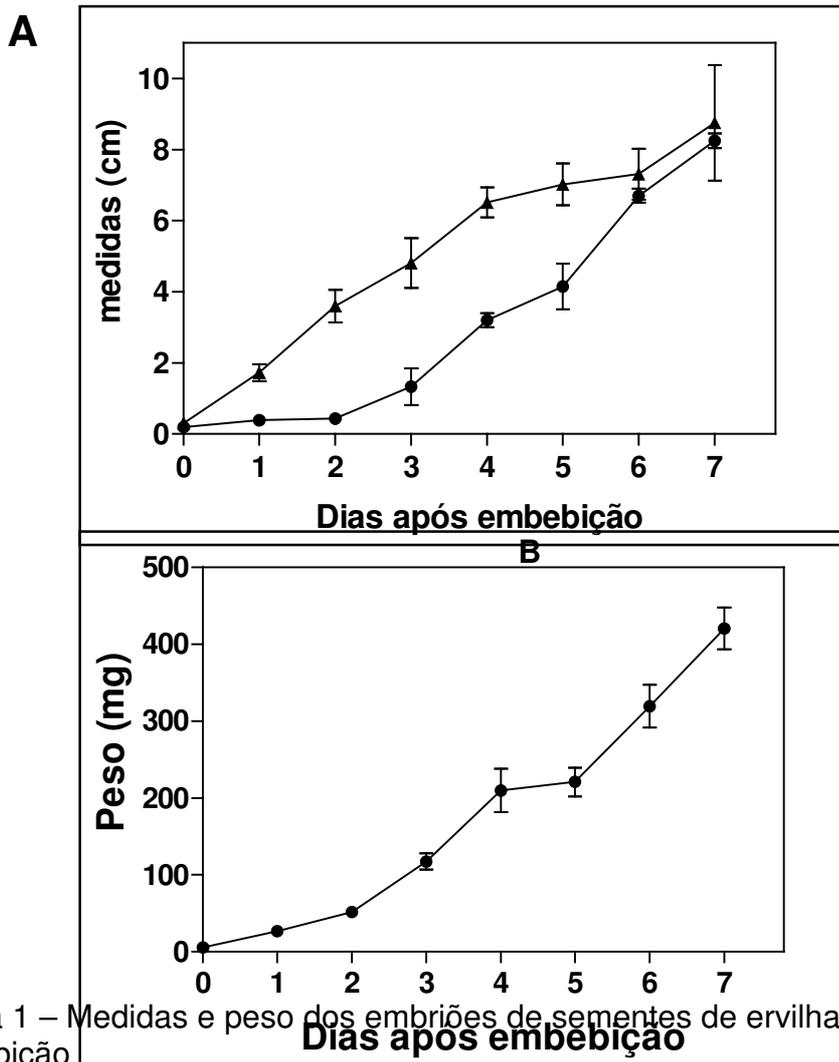


Figura 1 – Medidas e peso dos embriões de sementes de ervilha após a embebição

Para a tomada dos pesos e medidas, foram utilizados 20 embriões de cada dia, em três germinações diferentes, sendo pesados imediatamente após a coleta em balança analítica e então medidos com régua milimetrada. Em A (▲) radícula e (●) caulículo, em B (●) eixo embrionário inteiro.

A fim de estimar as variações na quantidade total de proteína presente nos embriões durante os sete dias que se seguem à embebição, embriões de 0 até 7 dias foram homogeneizados em solução salina, centrifugados e então tiveram o conteúdo de proteína do sobrenadante determinado pelo método de Bradford (1976). Podemos observar na **figura 2A** que a quantidade de proteína por embrião aumenta cerca de 4,5 vezes do dia 0 até o dia 7. Porém, levando-se em consideração que o peso total do embrião aumenta cerca de 76 vezes nesse mesmo período, percebemos na realidade uma diminuição da quantidade de proteína em relação ao peso total do embrião (**figura 2B**).

A **figura 3** mostra o perfil eletroforético, em gel de poliacrilamida na presença de SDS, dos homogenatos totais ao longo dos sete dias após a embebição das sementes. Podemos observar que há uma banda de alto peso molecular que aparece a partir do segundo dia, enquanto uma outra de peso um pouco menor desaparece. No entanto, não há uma drástica alteração no perfil protéico ao longo desses sete dias.

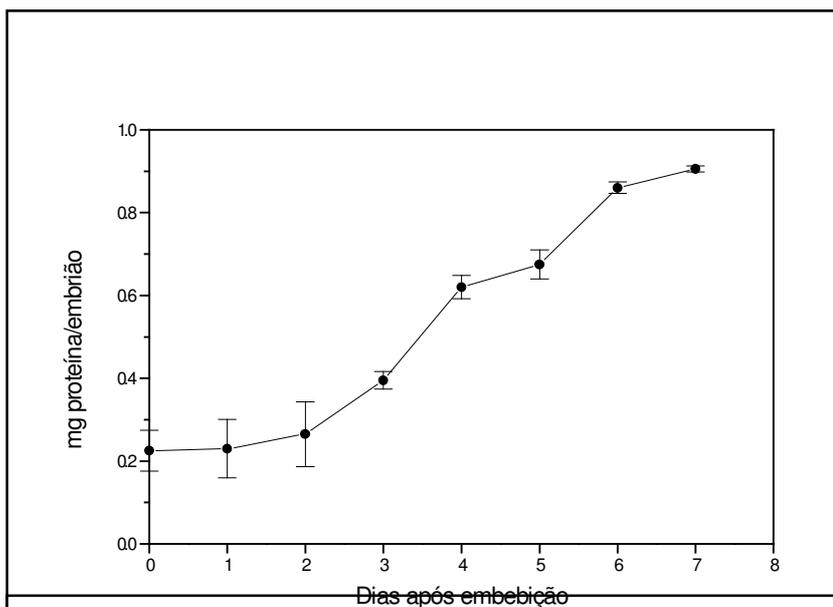
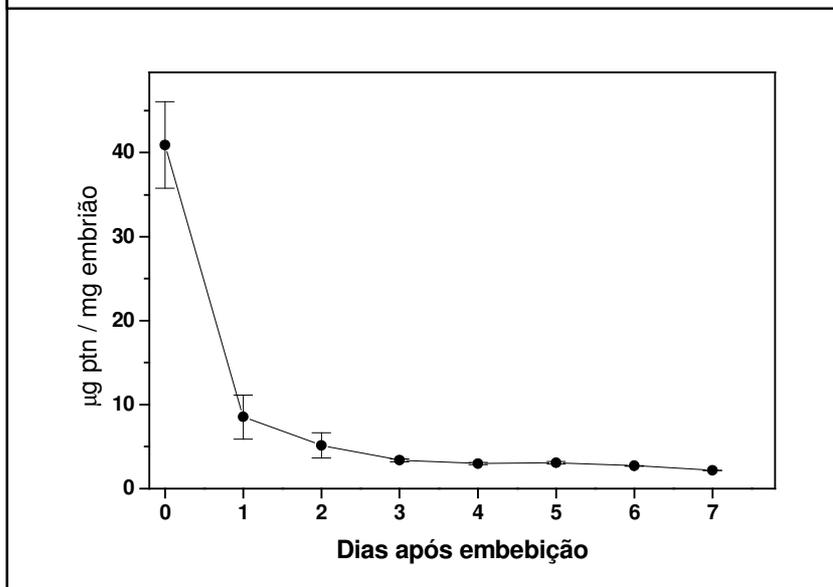
A**B**

Figura 2 – Conteúdo de proteína presente nos homogenatos totais de embriões de sementes de ervilha ao longo da germinação

Os homogenatos totais de embriões de sementes de ervilha foram obtidos homogeneizando-se os embriões em solução salina, seguido de centrifugação e recolhimento do sobrenadante. A dosagem foi realizada utilizando-se o método descrito por Bradford (1976).

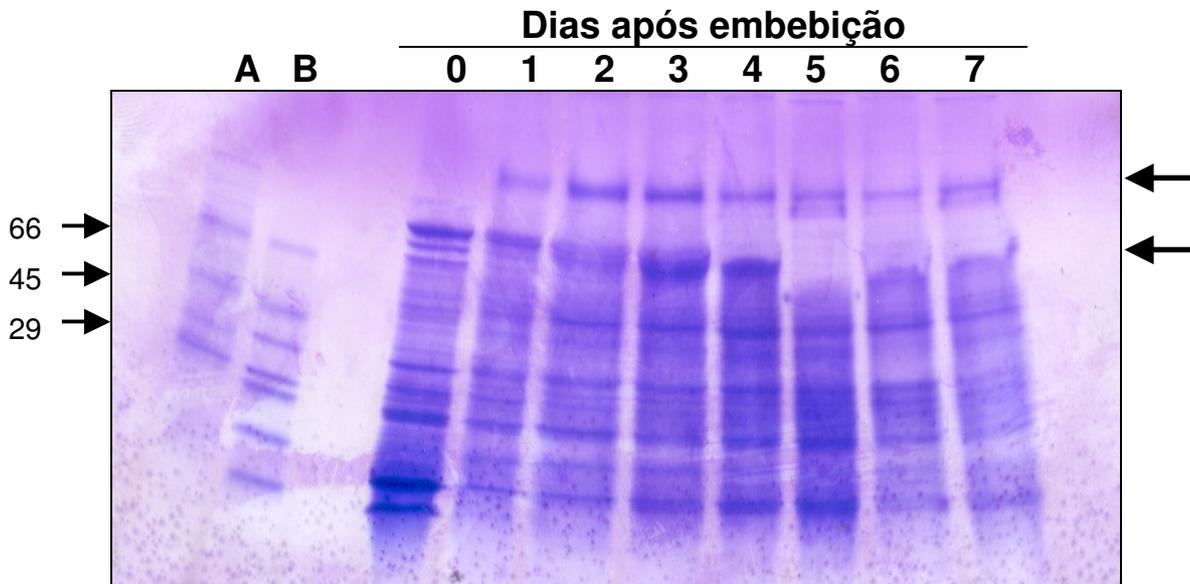


Figura 3 – Perfil eletroforético dos homogenatos totais de embriões ao longo da germinação

Homogenatos totais de embriões de sementes de ervilha de diferentes dias após a embebição (0,05 mg de proteína) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (gradiente de 10 a 22%) na presença de SDS. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie Blue R. Padrões de peso: A) miosina 205 kDa; β -galactosidase 116 kDa; fosforilase B 97,4 kDa; albumina bovina 66 kDa; ovoalbumina 45 kDa; anidrase carbônica 29 kDa. B) albumina bovina 66 kDa; ovoalbumina 45 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 36 kDa; anidrase carbônica 29 kDa; tripsinogênio 24 kDa; SBTI 20,1 kDa; lactoalbumina 14,2 kDa.

A análise de lipídeos ao longo da germinação foi feita por cromatografia em camada fina (TLC) após extração de lipídeos dos homogenatos totais pelo método de Bligh e Dyer (1959). Podemos observar na **figura 4** que os lipídeos neutros são predominantes em relação aos fosfolipídeos. Notamos também que há uma maior quantidade de lipídeos, tanto neutros como fosfolipídeos, no dia 0 em comparação aos dias subseqüentes. O lipídeo neutro predominante é a trioleína e o fosfolipídeo majoritário é a fosfatidilcolina. Observamos ainda que não alteração no perfil lipídico ao longo da germinação.

O conteúdo de fosfato ligado covalentemente à fração protéica foi obtido pelo método de Fiske e Subbarow (1925) após extração de lipídeos e mineralização da amostra. Observa-se que há uma queda no conteúdo de fosfato ligado ao longo da germinação (**figura 5**).

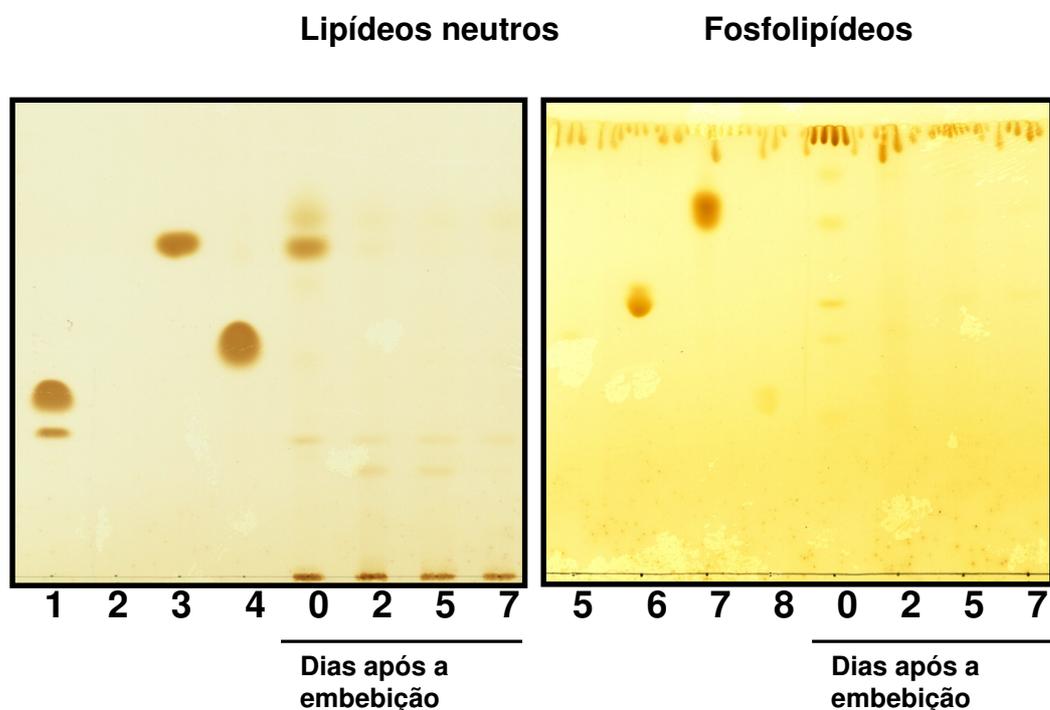


Figura 4 – Análise de lipídeos em homogenatos totais ao longo da germinação

Após extração de lipídeos, as amostras foram aplicadas em placa de sílica e o sistema de solventes utilizado para a separação dos lipídeos foi: em A) lipídeos neutros - hexano: éter etílico:ácido acético (60:40:1, v/v/v); em B) fosfolipídeos - metanol:água:clorofórmio:acetona:ácido acético (26:16:80:30:24, v/v/v/v/v) 1: dioleína; 2: monooleil; 3: trioleína; 4: ácido oléico; 5: fosfatidilinositol; 6: fosfatidilcolina; 7: fosfatidiletanolamina; 8: lisofosfatidilcolina.

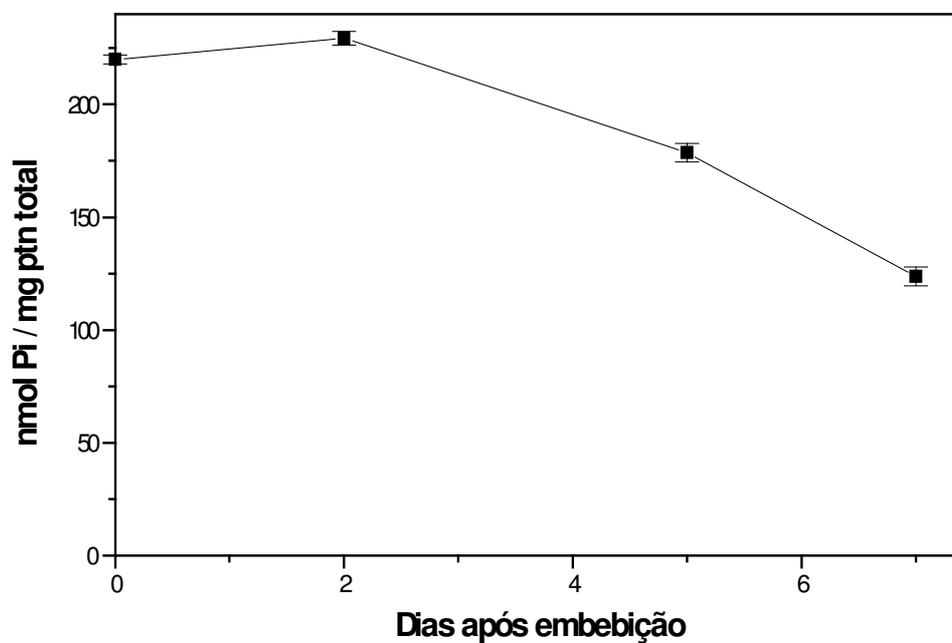


Figura 5 – Conteúdo de fosfato covalentemente ligado em homogenatos totais ao longo da germinação

Os homogenatos totais de dias 0, 2, 5 e 7 sofreram extração longa de lipídeos e mineralização com ácido perclórico a 300°C por 3 horas e após resfriamento, tiveram seu conteúdo de fosfato dosado pelo método de Fiske-Subbarow.

Conclusões da parte I

- Há uma diminuição do conteúdo total de proteína nos homogenatos de embriões do dia 0 ao dia 7 em relação ao peso do embrião
- Os lipídeos neutros são predominantes em relação aos fosfolipídeos, havendo uma maior quantidade de ambos no dia 0
- O conteúdo de fosfato covalentemente ligado à fração glicoprotéica dos homogenatos diminui ao longo da germinação

4.2 – Parte II: Identificação e caracterização de atividades fosfatásica e cinásica presentes em embriões de sementes de ervilha

Como ocorre uma diminuição do conteúdo de fosfato ligado ao longo dos dias que se seguem à embebição, resolvemos estudar a presença de atividades fosfatásica e cinásica nesses homogenatos.

Para o estudo da atividade fosfatásica, utilizamos o p-nitrofenilfosfato (pNPP) como substrato sintético.

Ao medir a atividade pNPPásica em homogenatos de embriões e de cotilédones ao longo dos sete dias que se seguem à embebição, verificamos que nos embriões a atividade é muito mais elevada do que nos cotilédones, e que essa atividade aumenta cerca de 7 vezes do dia 0 até o dia 2, mantendo-se elevada até o dia 7, como pode ser observado na **figura 6**.

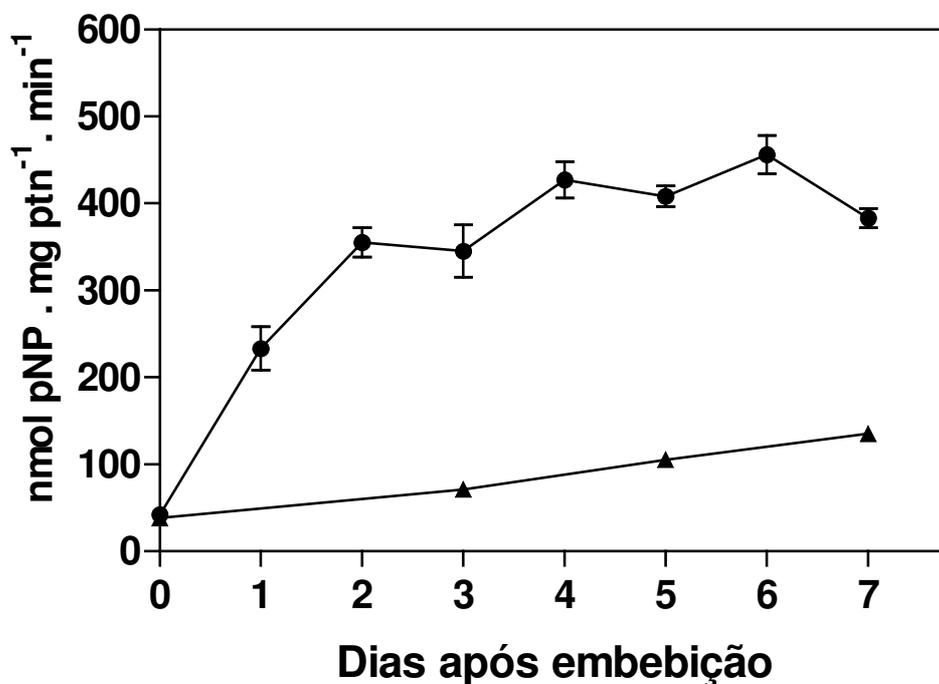


Figura 6 – Atividade *p*NPPásica nos homogenatos de embriões e cotilédones de sementes de ervilha ao longo da germinação

Embriões de dias 0 até 7 e cotilédones dos dias 0, 3, 5 e 7 após a embebição foram homogeneizados em solução salina e 1,5 μ g de proteína total foram ensaiados para atividade *p*NPPásica utilizando-se 2 mM de *p*NPP como substrato em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 por 60 minutos a 37°C. As reações foram paralisadas com adição de 20 μ L de NaOH 1 N e a quantidade de *p*-nitrofenol (*p*-NP) liberado foi determinada através de leitura a 405 nm. (●) embriões e (▲) cotilédones.

Passamos então a caracterização dessa atividade p NPPásica nos homogenatos de embriões de sementes de ervilha ao longo da germinação.

Inicialmente, foi verificado o pH ótimo para a atividade enzimática, a concentração ideal de proteína para que a leitura final ficasse numa faixa de densidade ótica confiável e experimentos para a determinação de características cinéticas da atividade p NPPásica, como curva de concentração de substrato e curso temporal. Esse conjunto inicial de dados nos mostra que o pH ótimo para a atividade enzimática está em torno de 5,5 (**figura 7**) e que a concentração ideal de proteína total para a medida dessa atividade está entre 1 e 2 μ g (**figura 8**), pois assim temos uma densidade ótica na faixa ideal de leitura.

Quanto às características cinéticas, podemos concluir que a reação atinge saturação entre 1,5 e 5 μ M de p NPP (**figura 9**) e que a reação apresenta-se linear até 90 minutos (**figura 10**).

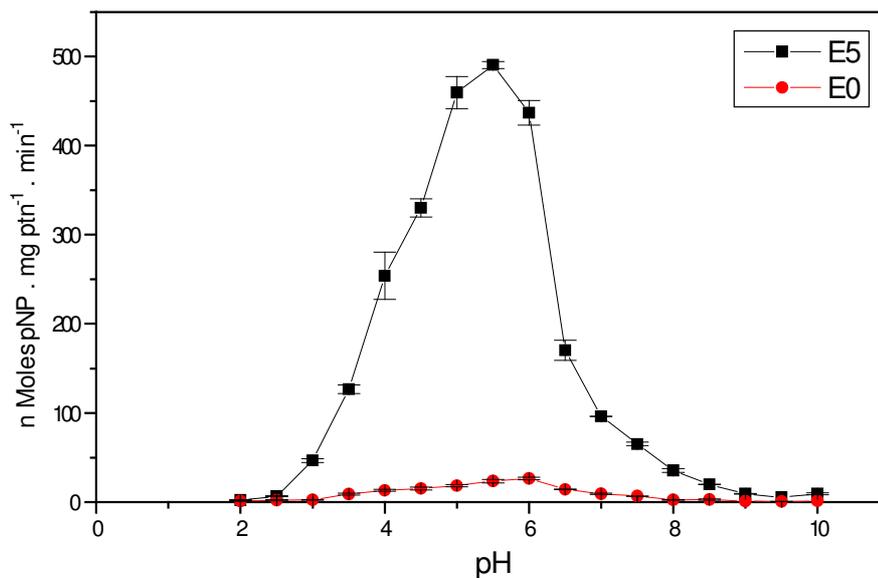


Figura 7 – Curva de pH da atividade pNPPásica

Homogenatos de embriões de dia 0 (■) e 5 (●) (1,5 µg de proteína) foram ensaiados para atividade pNPPásica utilizando-se uma mistura de tampões composta por acetato de sódio, citrato de sódio, tris e glicina, todos 0,1 M, variando o pH de 2 a 10. A reação ocorreu em meio contendo 2mM de pNPP durante 60 minutos a 37°C. As reações foram paralisadas com 0,13 N de NaOH.

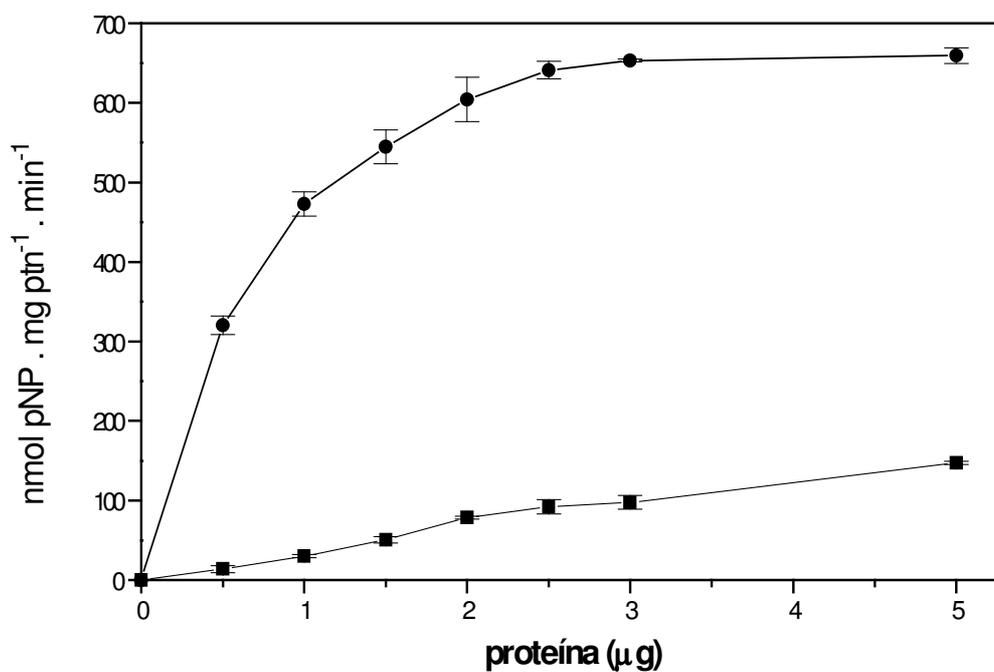


Figura 8 – Determinação da concentração ideal de proteína no meio de reação

Homogenatos dos dias 0 (■) e 5 (●) em concentrações de proteínas variadas foram ensaiados para atividade pNPPásica em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 e 2mM de pNPP. Após 60 minutos a 37°C as reações foram paralisadas com 0,13 N de NaOH.

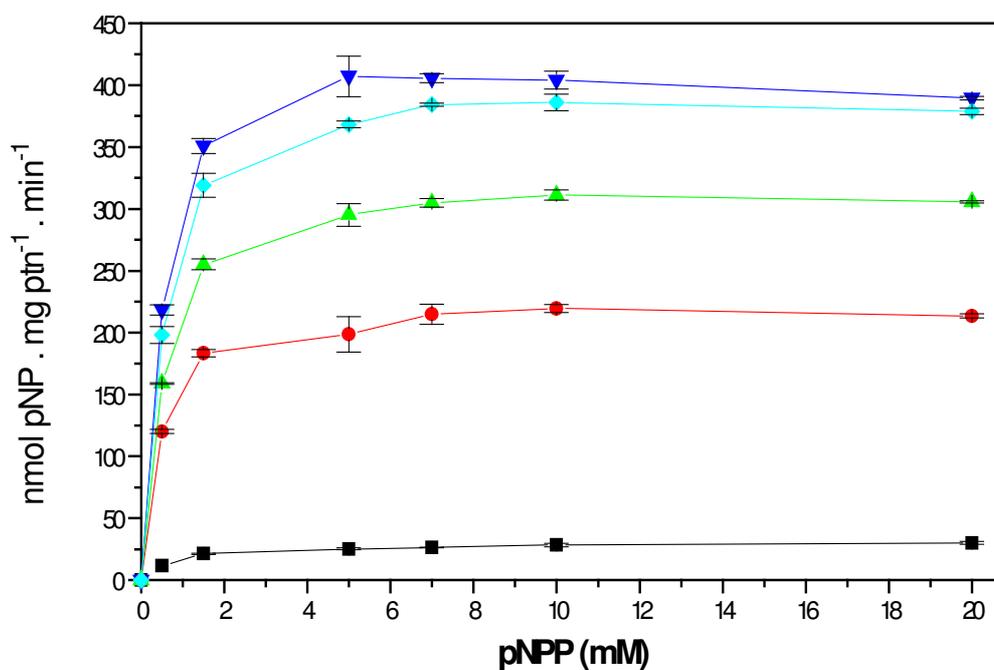


Figura 9 – Curva de concentração de pNPP

Homogenatos dos dias 0 (■), 1 (●), 3 (▲), 5 (▼) e 7 (◆) foram ensaiados para atividade pNPPásica em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 e concentrações crescentes de pNPP (0,5; 1,5; 5; 7; 10 e 20 mM). Após 60 minutos a 37°C as reações foram paralisadas com 0,13 N de NaOH

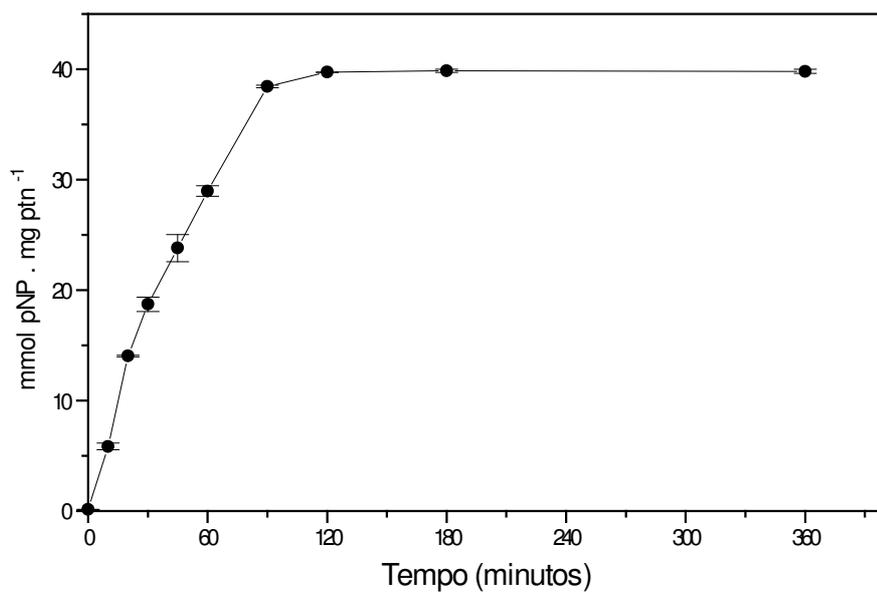


Figura 10 – Curso temporal da atividade *p*NPPásica

Homogenato do dia 5 foi ensaiado para atividade *p*NPPásica em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 e 2mM de *p*NPP. Após os tempos determinados a 37°C as reações foram paralisadas com 0,13 N de NaOH.

Por já terem sido descritas algumas fosfatases de sementes termoresistentes (Ferreira, 1998), resolvemos verificar a atividade pNPPásica dos embriões de sementes de ervilha após tratamento em diferentes temperaturas. Na **figura 11** observamos que a pré-incubação nas temperaturas 0 °C, 28 °C e 37 °C, não altera a atividade da enzima. Porém, verificamos que com 30 minutos de pré-incubação a 55°C a atividade é reduzida em aproximadamente 80% e com 90 minutos a atividade é praticamente abolida, enquanto na pré-incubação a 80°C, a atividade já é praticamente nula após 10 minutos.

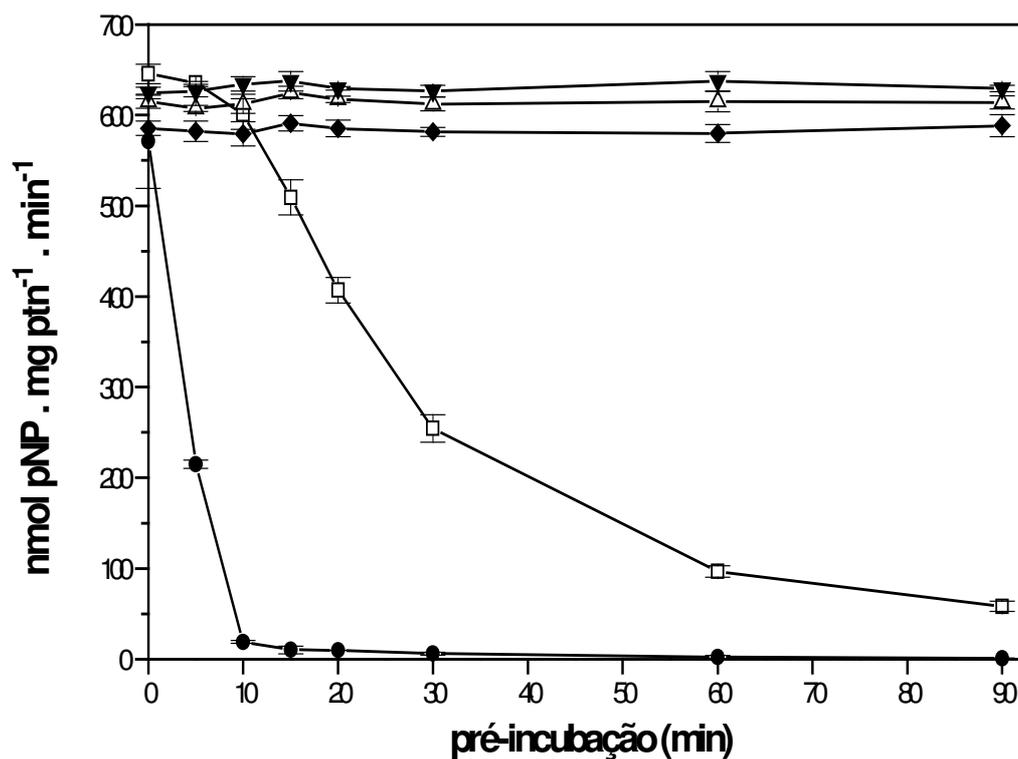


Figura 11 – Inativação térmica da atividade pNPPásica

Homogenato do dia 5 foi pré-incubado em diferentes temperaturas e depois ensaiado para atividade pNPPásica em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 e 2mM de pNPP. Após 60 minutos a 37°C as reações foram paralisadas com 0,13 N de NaOH. 0°C (▼), 28°C (△), 37°C (◆), 55°C (□) e 80°C (●).

A fim de determinarmos o tipo de fosfatase ácida presente nos embriões de sementes de ervilha ao longo da germinação, ensaiamos a atividade pNPPásica na presença de vários moduladores clássicos de fosfatases, conforme é demonstrado na **tabela 1**.

Com o uso de inibidores da atividade de serina/treonina fosfatases, como ácido ocadáico, levamizol, tetramizol e citrato de sódio, não há uma modificação relevante na atividade enzimática. DTT, um forte agente redutor, também não foi capaz de modular a atividade da enzima, no entanto, vanadato, um clássico inibidor de proteínas tirosina fosfatase, foi capaz de inibir totalmente a enzima em uma concentração de 0,5 mM.

Como vanadato de sódio, molibdato de amônio, fluoreto de sódio, Pi, e sulfato de zinco apresentaram os maiores percentuais de inibição, fizemos curva de concentração de cada um deles. Na **figura 12**, podemos observar que o IC₅₀ para molibdato de amônio é de 50 nM, para vanadato de sódio é de 50 nM e para sulfato de zinco é de 100 µM. Quando realizamos a curva de concentração de fluoreto de sódio e de fosfato (**figura 13**), inibidores de fosfatases em geral, vemos que o IC₅₀ para NaF é de 4 mM e para fosfato é de 50 mM.

Tabela 1 – Efeito de moduladores de atividade fosfatásica na atividade pNPPásica de homogenatos de embriões

Moduladores	% de atividade ± desvio padrão
Controle	100 %
Pi (50 mM)	65 % ± 4,2
Fluoreto de sódio (10 mM)	34 % ± 2,6
Vanadato de sódio (0,1 mM)	32 % ± 3,4
Molibdato de amônio (0,1 mM)	12 % ± 4,9
Sulfato de zinco (0,1 mM)	54 % ± 4,7
PCMB (0,01 mM)	98 % ± 4,6
PCMB (1 mM)	87 % ± 6,8
Tartarato de Na ⁺ /K ⁺ (260 mM)	111 % ± 7,1
DTT (10 mM)	96 % ± 4,3
Citrato de sódio (5 mM)	77 % ± 8,6
Levamisole (1 mM)	94 % ± 5,2
Levamisole (10 mM)	101 % ± 4,3
Tetramizole (1 mM)	103 % ± 2,9
Tetramizole (10 mM)	107 % ± 6,2
Ácido Okadáico (10 mM)	102 % ± 5,7
EDTA (5 mM)	96 % ± 3,5
EDTA (10 mM)	87 % ± 7,3

Homogenatos de dia 5 foram ensaiados para atividade pNPPásica em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 e 2mM de pNPP, na presença de moduladores de fosfatase. Após 60 minutos a 37°C as reações foram paralisadas com 0,13 N de NaOH.

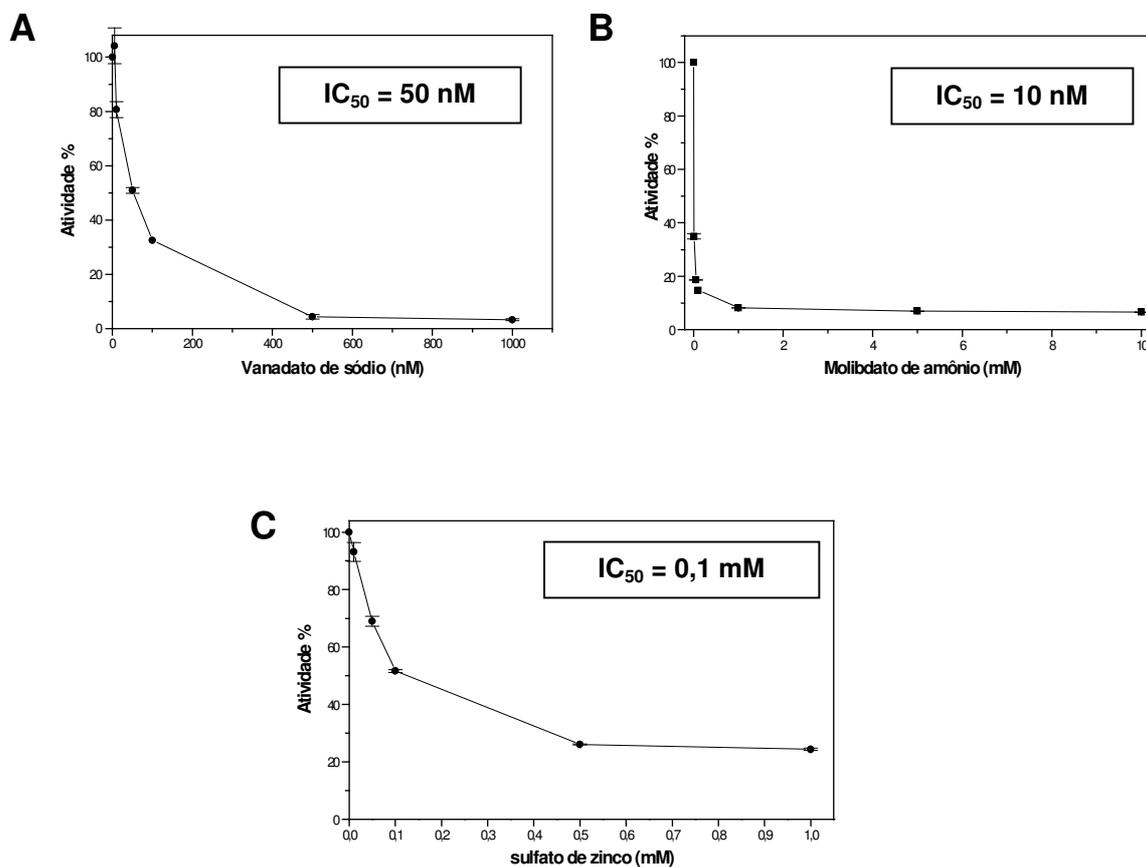


Figura 12 – Curvas de concentração de molibdato de amônio, vanadato de sódio e sulfato de zinco na atividade pNPPásica

Homogenato do dia 5 foi ensaiado para atividade pNPPásica em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 e 2mM de pNPP, na presença de concentrações crescentes de vanadato de sódio (A) ou molibdato de amônio (B) ou sulfato de zinco (C). Após 60 minutos a 37°C as reações foram paralisadas com 0,13 N de NaOH.

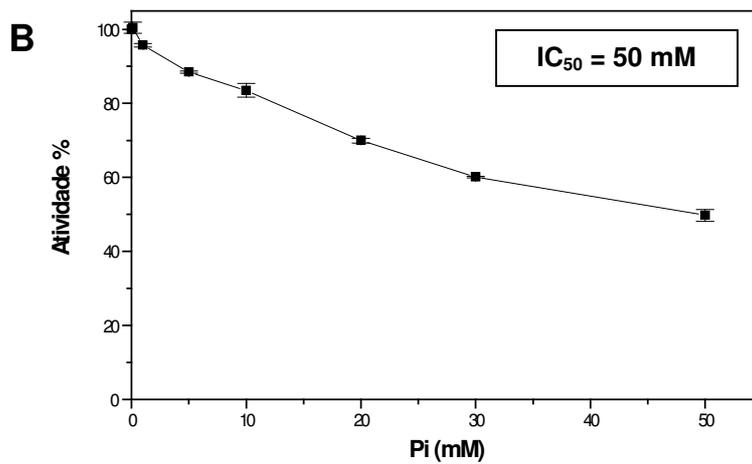
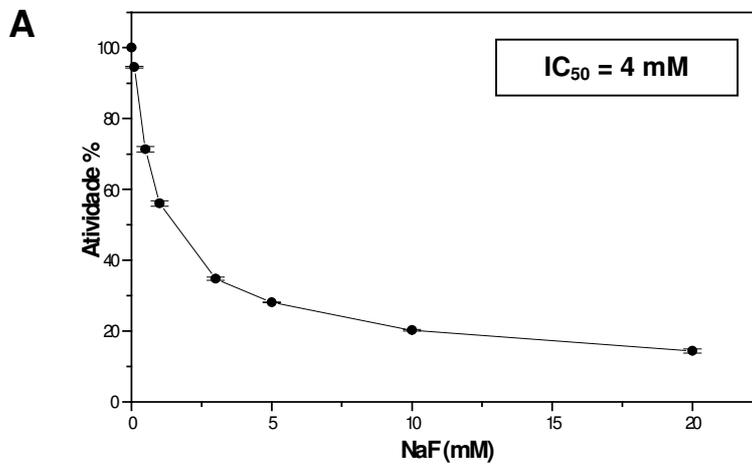
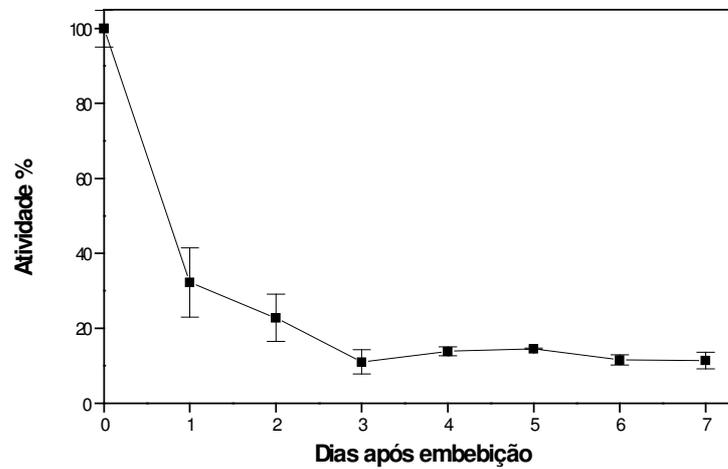
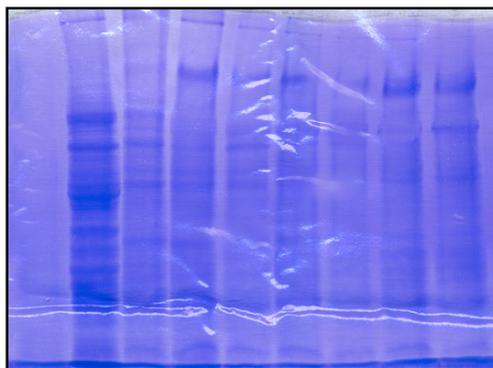


Figura 13 – Curvas de concentração de fluoreto de sódio e de fosfato na atividade pNPPásica

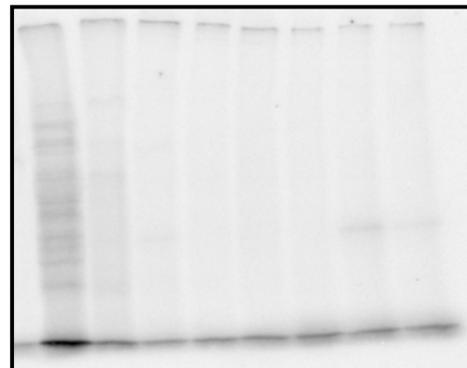
Homogenato do dia 5 foi ensaiado para atividade pNPPásica em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 e 2mM de pNPP, na presença de concentrações crescentes de fluoreto de sódio (A) ou Pi (B). Após 60 minutos a 37°C as reações foram paralisadas com 0,13 N de NaOH.

Como já foi demonstrado em alguns trabalhos, há um grande número de proteínas cinase identificadas e caracterizadas em plantas superiores, de uma forma geral, relacionadas a mecanismos de sinalização celular. Desta forma, resolvemos investigar no embrião, local de intensa atividade metabólica, a presença de atividade(s) cinásica(s).

Após obtermos os homogenatos totais, estes foram incubados por 1 hora a 37°C em meio de reação específico para atividade cinásica, e as reações foram disparadas com ATP marcado radioativamente. Ao final da reação, alíquotas foram precipitadas em papel de filtro e submetidas a cintilação líquida a fim de determinar a quantidade de fosfato radioativo incorporado às proteínas do HT (**figura 14A**). Paralelamente, outra alíquota da mesma amostra foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% na presença de SDS (**figura 14B**), e após o gel ser corado e seco, foi exposto a um filme autoradiográfico (**figura 14C**). Podemos observar que no dia 0 existe uma grande atividade de cinásica, que diminui drasticamente já no primeiro dia e se mantém baixa até o sétimo dia.

A**B**

0 1 2 3 4 5 6 7
dias após a embebição

C

0 1 2 3 4 5 6 7
dias após a embebição

Figura 14 – Atividade de proteína cinase em homogenatos de embriões ao longo da germinação

Os homogenatos dos dias 0 até 7, contendo 1 mg de proteína total foram incubados em meio específico para atividade cinásica na presença de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, por 1 hora a 37°C. A reação foi paralisada precipitando-se alíquotas em TCA e submetendo-as à cintilação líquida (**A**) ou a um gel de poliacrilamida 10% na presença de SDS (**B**) autoradiografado (**C**).

A fim de caracterizar qual o tipo de atividade cinásica está presente no homogenato de embriões de dia zero, utilizamos inibidores para tipos específicos de proteínas cinase, em concentrações iguais ao K_i de cada um. Podemos observar por cintilação líquida (**figura 15**) que há uma discreta inibição por KN-93 ($K_i=370$ nM), inibidor de camlodulina cinase e por LY294002, inibidor de fosfatidilinositol 3-cinase ($K_i=1,4$ μ M).

Para verificar a presença de uma proteína cinase do tipo caseína cinase II (CK II), incubamos o homogenato de dia 0 na presença de TBB, um inibidor altamente específico para CK II, em diferentes concentrações e observamos por cintilação líquida (**figura 16A**) e por autoradiografia (**figura 16C**) uma expressiva inibição da atividade cinásica.

Submetemos então os homogenatos de embriões de dias 0, 2, 5 e 7 a um *western blotting* com o uso de anticorpo contra a subunidade catalítica da caseína cinase II. Podemos observar na **figura 17 A**, a presença de uma única banda apenas no homogenato de dia 0. Nos dias subsequentes não há a presença da enzima, condizente com os dados de fosforilação *in vitro*. A mesma membrana foi descarregada e utilizada para um *western blotting* anti fosfoserina. Como podemos ver na **figura 17 B**, o nível deste fosfoaminoácido diminui ao longo da germinação.

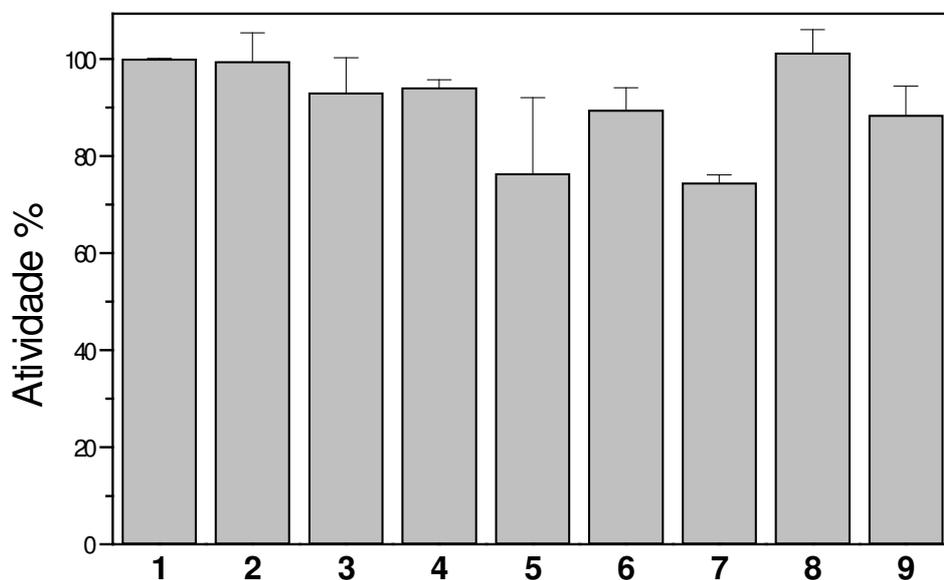


Figura 15 – Efeito de inibidores de cinase na atividade endógena de homogenatos de embriões do dia 0

O homogenato de dia 0, contendo 1 mg de proteína total foi incubado em meio específico para atividade quinásica na presença de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP e diversos inibidores por 1 hora a 37°C. A reação foi paralisada precipitando-se uma alíquota em TCA e submetendo-a à cintilação líquida. 1: controle; 2: DMSO; 3: Bys-Tyrphostin; 4: ML-7; 5: KN-93; 6: Bis; 7: LY294002; 8: ácido okadáico; 9: H-89.

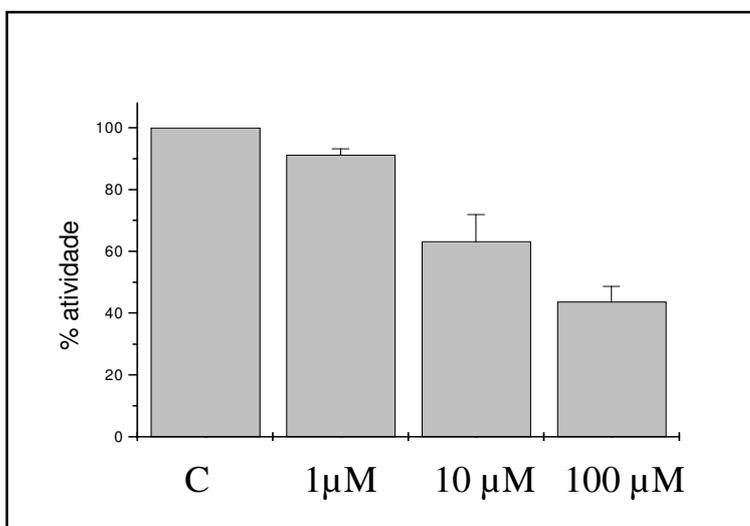
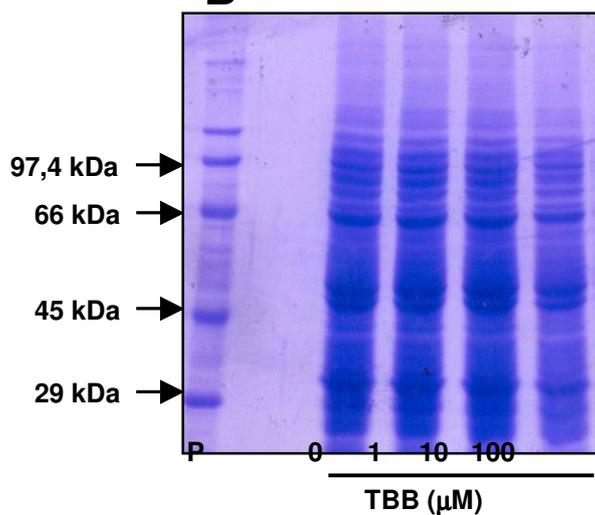
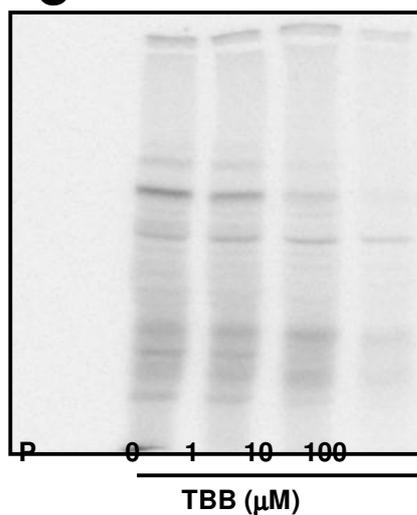
A**B****C**

Figura 16 – Efeito de TBB na atividade endógena de homogenato de embriões do dia 0

O homogenato de dia 0, contendo 1 mg de proteína total foi incubado em meio específico para atividade cinásica na presença de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP e diferentes concentrações de TBB por 1 hora a 37°C. **A)** cintilação líquida; **B)** eletroforese em gel de poliacrilamida 10%; **C)** autoradiografia.

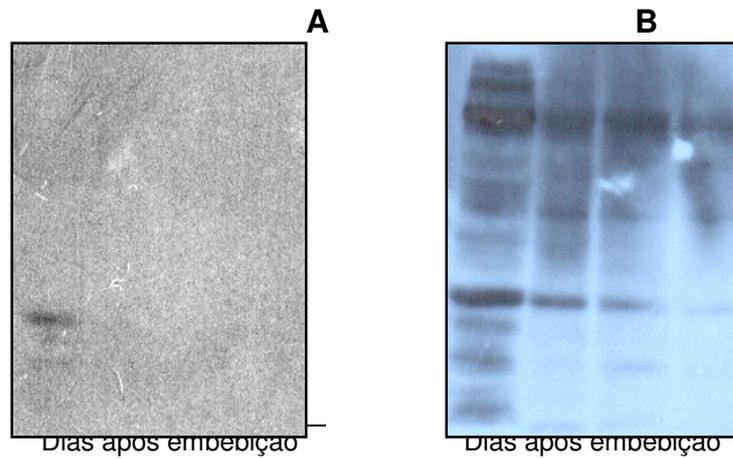


Figura 17 - Western Blotting de diferentes dias da germinação, utilizando anticorpos para caseína quinase II (CKII) e fosfoserina

Homogenatos de embriões (dias 0, 2, 5 e 7) foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% na presença de SDS. Ao final da corrida, as proteínas foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose que foi incubada em **(A)** com anticorpo anti CK II. A mesma membrana foi descarregada, bloqueada e reagida com anticorpo anti fosfoserina **(B)**. O sistema foi revelado pelo sistema de ECL.

Conclusões da parte II

- Há um aumento da atividade pNPPásica ao longo dos 7 dias que se seguem à embebição
- De acordo com os parâmetros estudados, essa atividade foi caracterizada como uma fosfatase ácida com atividade de tirosina fosfatase
- Há uma atividade quinásica que diminui ao longo dos 7 dias que se seguem à embebição
- Essa atividade é inibida por TBB, inibidor específico de CK II
- Western blotting anti CK II revela uma única banda no dia 0

4.3 – Parte III: Alteração das propriedades funcionais da vicilina através de fosforilação química

A vicilina de sementes secas de ervilha foi obtida através de precipitação por sulfato de amônio da farinha desengordurada. Como podemos ver na **figura 18**, a vicilina apresenta várias subunidades.

A fosforilação química com STMP ocorre preferencialmente em resíduos de serina. Na **figura 19**, podemos observar um discreto aumento nos níveis de fosfoserina, pois a própria vicilina já é bastante fosforilada, o que pode fazer com que o método não seja sensível o bastante.

Vicilina fosforilada com diferentes concentrações de STMP e vicilina não fosforilada (controle) foram submetidas a uma coluna de troca iônica (mono Q) acoplada a um sistema de HPLC. Na **figura 20** temos o perfil de eluição das vicilinas perante um gradiente de NaCl e podemos observar que conforme aumentamos a concentração de STMP durante a fosforilação, maior é o tempo de retenção da proteína na coluna.

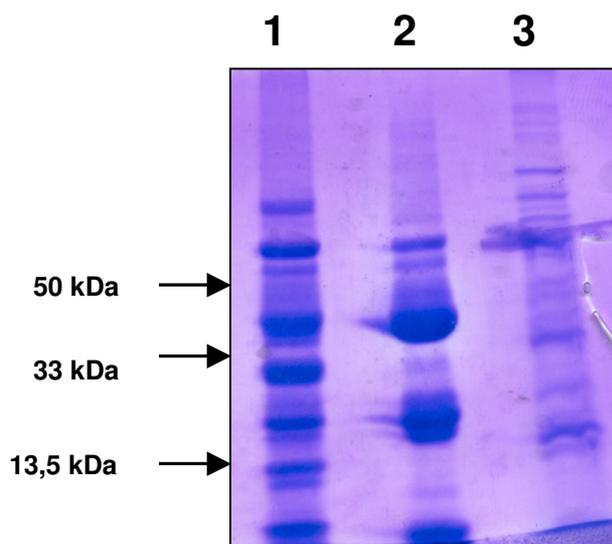


Figura 18 – Eletroforese de vicilina purificada

As sementes secas de ervilha foram moídas e a farinha resultante foi delipidada com acetona, ressuspensa em tampão tris e sofreu precipitação por sulfato de amônio (40, 75 e 99%). 1: farinha delipidada; 2: vicilina; 3: padrões de peso.

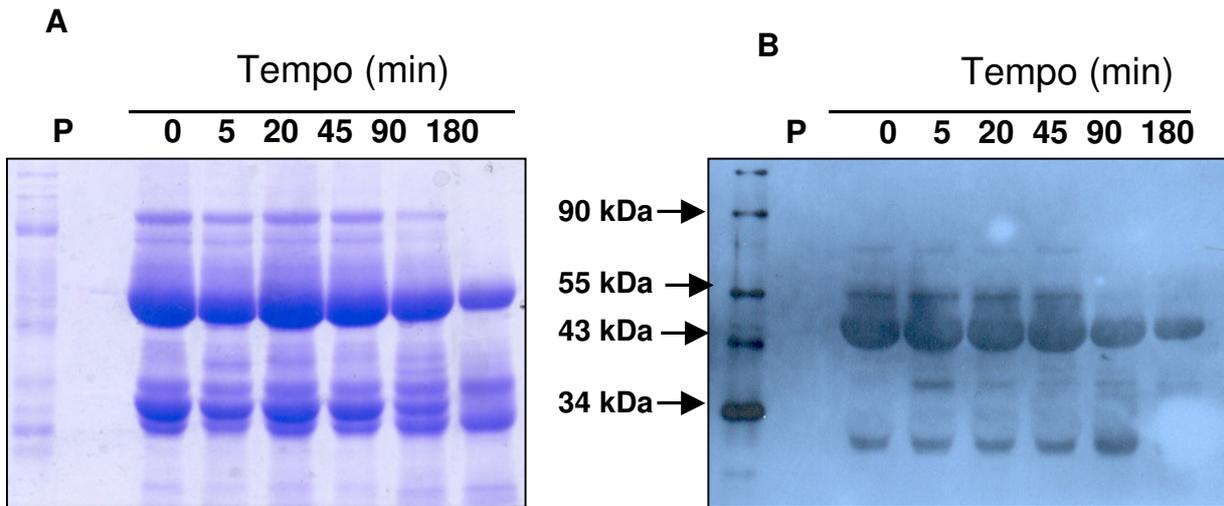
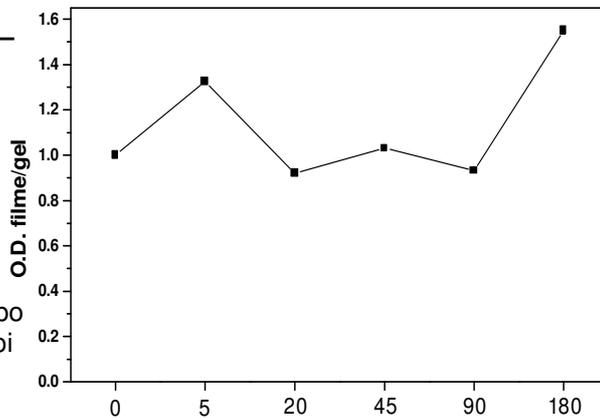
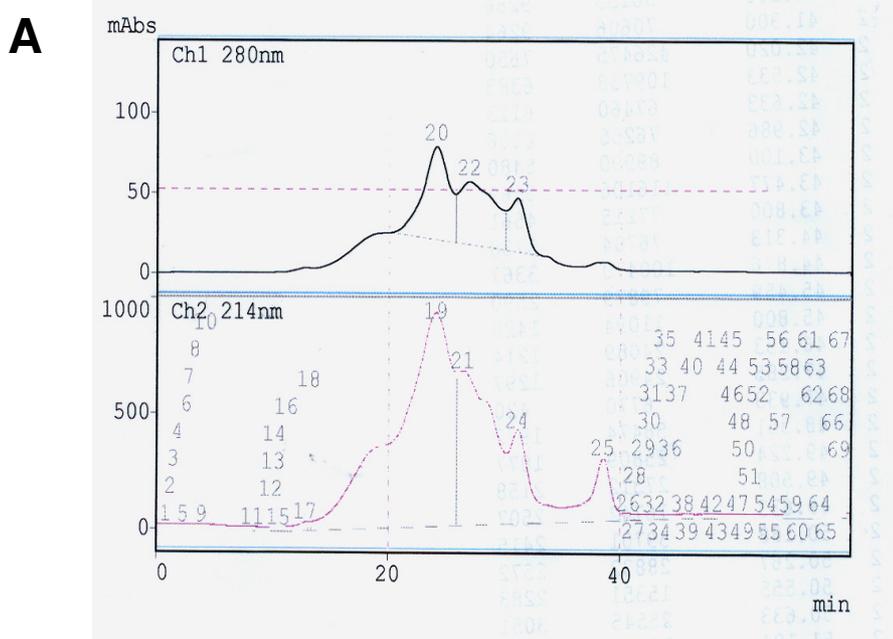


Figura 19
Blotting
vicilina

A
 STMP por submetida a poliacrilamida (A), sendo membrana de com anticorpo sistema foi Densitometria peso molecular.



Eletroforese e Western antifososerina de fosforilada com STMP
 vicilina fosforilada com diferentes tempos foi eletroforese em gel de 10% na presença de SDS transferido para nitrocelulose e incubado anti fososerina. O revelado por ECL (B). blot/gel (C) P: padrão de



B

	Controle	Fosforilado com 1% STMP	Fosforilado com 4% STMP	Fosforilado com 10% STMP
Tempo médio de eluição (minutos)	27,388	29,014	29,992	30,054

Figura 20 – Perfil de eluição da vicilina na coluna Mono Q

Após fosforilação com STMP, 1 mg de vicilina foi aplicado à coluna Mono Q acoplada a um sistema de HPLC. A eluição foi feita com um gradiente de NaCl variando de 0 a 1M, começando aos 10 minutos. Em A) perfil típico de eluição e em B) tempo médio de eluição.

Através do espectro de emissão de fluorescência da vicilina (**figura 21**) e de dicroísmo circular (**figura 22**) podemos observar, após a fosforilação química, que não há alteração aparente em sua estrutura terciária e secundária, respectivamente.

A solubilidade da vicilina é muito baixa em pHs próximos de 4-5. A fosforilação química com STMP foi capaz de melhorar sua solubilidade nessa faixa, principalmente em concentrações acima de 1% (**figura 23**).

A capacidade de estabilizar a emulsão também foi melhorada com a fosforilação química da vicilina, com todas as concentrações de STMP utilizadas (**figura 24**).

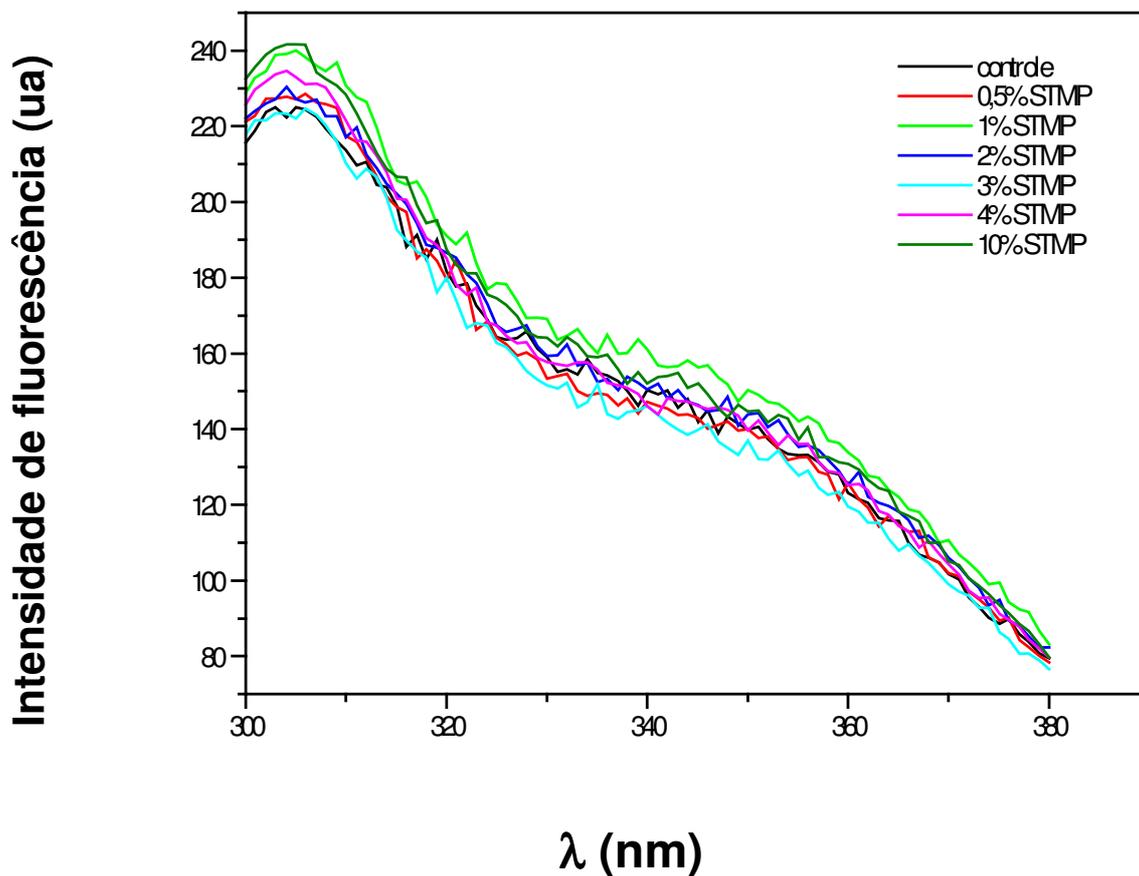


Figura 21 –Espectro de emissão de fluorescência de vicilina não fosforilada e fosforilada com STMP em diferentes concentrações

Soluções de vicilina (1 mg/ml) não fosforilada ou fosforilada em diferentes concentrações de STMP foram utilizadas para obtenção do espectro de emissão de fluorescência, utilizando-se um espectrofotômetro Gary Eclipse Varian, na região de 300 a 380 nm, com excitação a 280 nm.

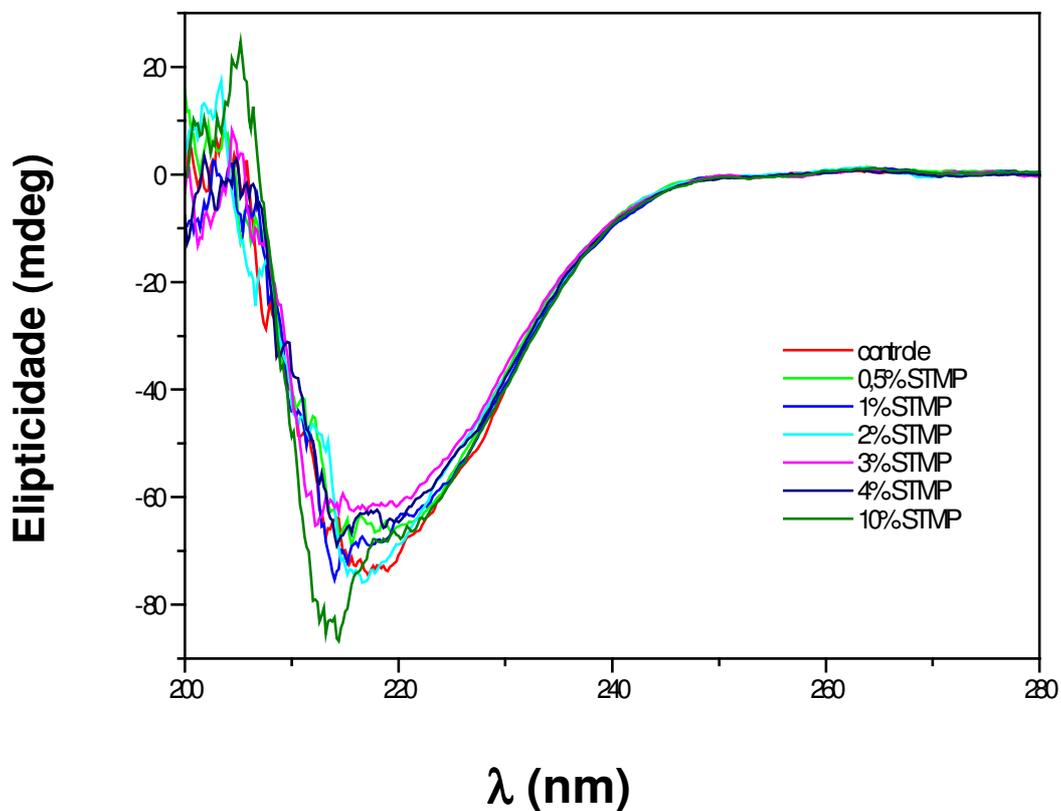


Figura 22 – Espectro de dicroísmo circular (CD) de vicilina não fosforilada ou fosforilada com STMP em diferentes concentrações

O espectro de dicroísmo circular foi obtido em espectropolarímetro JASCO J-715 em cubeta de 2,0 mm utilizando-se soluções de vicilina (1 mg/ml) não fosforilada ou fosforilada com diferentes concentrações de STMP e dialisadas em tampão tris 10 mM pH 10.

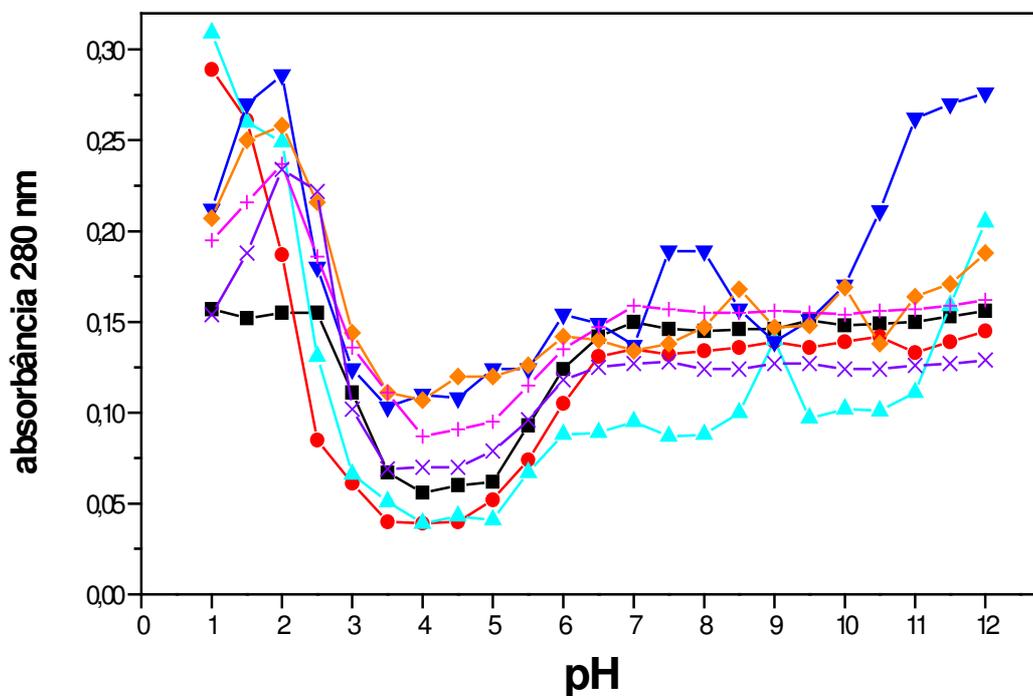


Figura 23 – Solubilidade da vicilina não fosforilada ou fosforilada com diferentes concentrações de STMP

Solução de vicilina (1mg/ml) fosforilada com diferentes concentrações de STMP foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente em diferentes pHs (1 a 12) utilizando-se uma mistura de tampões. Após centrifugação, os sobrenadantes foram lidos a 280 nm, conforme descrito em material e métodos. (■) controle, (●) 0,5% STMP, (▲) 1% STMP, (▼) 2% STMP, (◆) 3% STMP, (⊕) 4% STMP, (⊗) 10% STMP.

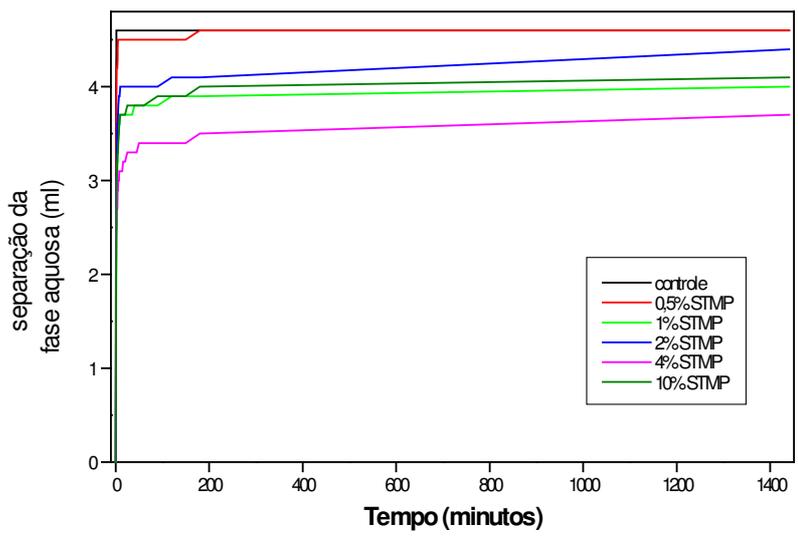
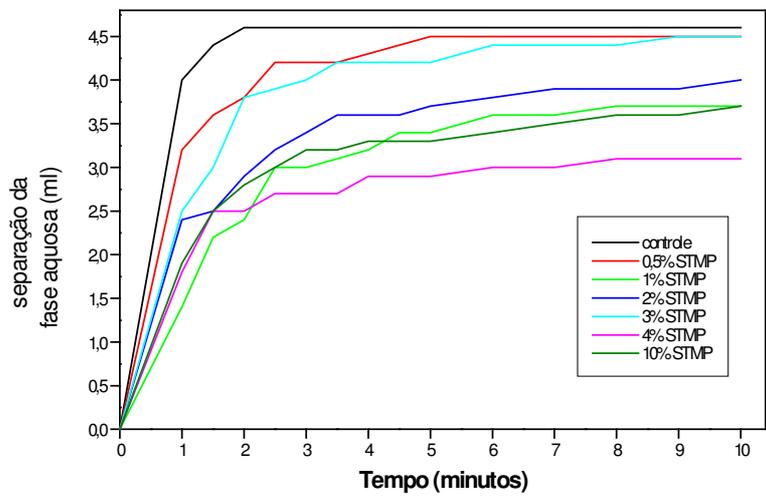


Figura 24: Cinética de desestabilização de emulsão com vicilina não fosforilada ou fosforilada com STMP

2 ml de n-dodecano foram adicionados a 6 ml de solução de vicilina (1mg/ml) e a emulsão foi formada com uso de Politron PT 10 por 30 segundos a 20.000 rpm. A emulsão foi transferida para tubo graduado e a separação da fase aquosa foi medida em diferentes tempos, conforme descrito em material e métodos.

Conclusões da parte III

A fosforilação com trimetafosfato de sódio:

- Altera o perfil de eluição da vicilina em cromatografia líquida de troca iônica e o seu conteúdo de fosfoserina
- Aumenta a solubilidade da vicilina em pH ácido
- Aumenta a sua capacidade de estabilizar emulsão

5 - Discussão

Durante o seu desenvolvimento, as sementes estocam nutrientes que serão importantes para suprir as necessidades do embrião no momento do seu crescimento. Tais nutrientes encontram-se, em sua maioria, na forma de polímeros que serão hidrolisados durante a germinação. As proteínas são estocadas em organelas chamadas corpúsculos protéicos e em ervilha, as proteínas de reserva majoritárias são as globulinas legumina e vicilina (JONES, 1996 e GATEHOUSE, 1982).

A hidrólise de proteínas em seus aminoácidos constituintes requer a atuação de uma classe de enzimas chamadas de proteinases. Estas enzimas podem atuar causando a hidrólise total das proteínas em aminoácidos ou produzindo pequenos polipeptídeos que posteriormente serão degradados pela ação de outras hidrolases. As proteinases podem ser classificadas em relação à forma pela qual hidrolisam seus substratos em três tipos: endopeptidases, aminopeptidases ou carboxipeptidases. As endopeptidases clivam ligações peptídicas internas, gerando polipeptídeos menores. As aminopeptidases clivam seqüencialmente o aminoácido final do N-terminal e as carboxipeptidases atuam no C-terminal (JONES, 1996).

Os aminoácidos liberados podem ser reutilizados para a síntese de novas proteínas ou podem sofrer deaminação para fornecer esqueletos de carbono para a respiração oxidativa. A deaminação produz amônia, que é

fixada em glutamina ou asparagina, prevenindo assim o alcance de níveis tóxicos.

Em leguminosas, os cotilédones das sementes secas (maduras) apresentam baixa atividade proteolítica, que aumenta após o início da germinação. Basha e Beevers (1975) demonstraram que em ervilha essa atividade apresenta um expressivo aumento após alguns dias do início da embebição associado à mobilização das proteínas de reserva majoritárias.

O processo hidrolítico parece ocorrer em duas fases. Na primeira, há a modificação das subunidades de alto peso molecular dos polipeptídeos de reserva e na segunda ocorre a quebra em aminoácidos e polipeptídeos menores. A maioria das proteínas de reserva das sementes está estocada em uma forma insolúvel, e para torná-las completamente suscetíveis à hidrólise elas precisam sofrer uma modificação inicial. Um mecanismo para que isso ocorra é o ataque endopeptídico, que fornece grandes, porém mais solúveis, componentes prontos para serem degradados e levados aos tecidos anabólicos no embrião. Observamos nesta dissertação que, ao longo dos sete dias que se seguem à embebição, há um aumento na quantidade de proteína por embrião (figura 2A).

Os lipídeos ficam estocados principalmente na forma de triglicerídeos, que são hidrolisados inicialmente pela ação de lipases, enzimas que catalisam a clivagem hidrolítica das ligações éster gerando glicerol e ácidos graxos livres. Esses produtos podem ser utilizados para sintetizar novas gorduras ou lipídeos de membranas, porém sua maior parte é convertida em hexose e finalmente a sacarose por uma seqüência de reações. A sacarose é levada ao eixo

embrionário, onde será utilizada principalmente para obtenção de energia, via glicólise, ou para síntese de parede celular. Nos cotilédones das leguminosas, os lipídeos neutros representam a forma majoritária de estocagem (BEWLEY, 1985) e como podemos ver na primeira parte deste trabalho, eles também são predominantes nos embriões em crescimento (**figura 4**).

Ao final do desenvolvimento, as sementes passam por um processo de desidratação, atingindo a maturidade e entrando em dormência, estágio no qual cessam as atividades metabólicas.

Com a entrada de água na semente seca, suas atividades metabólicas são retomadas de forma intensa, havendo a mobilização e degradação das reservas estocadas nos cotilédones e seu transporte e utilização pelos tecidos anabólicos do embrião em crescimento. Essas reservas são utilizadas tanto para produção de energia como para eventos sintéticos e essa demanda diminui quando a planta emerge do solo e se torna fotossinteticamente ativa (autotrófica).

O processo de fosforilação/defosforilação de proteínas é tido como um dos principais mecanismos de regulação celular em organismos superiores. Em ervilha, por exemplo, a fosforilação de fatores de ligação de DNA parece estar envolvida na regulação da transcrição gênica, e em muitas plantas superiores, várias enzimas metabólicas-chaves têm sua atividade alterada de acordo com o seu estado de fosforilação (GUO, 1995).

Observamos, ainda na primeira parte desta dissertação, que os níveis de fosfato ligado covalentemente à fração glicoprotéica dos homogenatos totais de embriões diminui cerca de 40% ao longo dos 7 dias que se seguem à

embebição (**figura 5**), sugerindo a presença de atividade(s) fosfatásica(s) nesses homogenatos.

Na literatura, já está descrita a existência de uma atividade fosfatase ácida associada à germinação de sementes e que essa atividade tende a aumentar ao longo da germinação. Esse aumento na atividade fosfatásica já foi descrito em diferentes tecidos de mono e dicotiledôneas.

O aumento da atividade fosfatásica foi demonstrado nos cotilédones de várias sementes, como papoula (CHUNG, 1992), soja (ULLAH, 1988), girassol (PARK, 1986), *Vigna sinensis* (BISWAS, 1991 e 1996), tremoços (OLCZAK, 1997), milho (ROSSI, 1981) e *Lupinus albus* (ZHENG, 1995). A atividade fosfatásica também aumenta no eixo embrionário de sementes de algodão (BHARGAVA, 1983 e 1987), milho (JAGIELLO, 1992) e *Vigna radiata* (KUNDU, 1990).

Ao ensaiarmos homogenatos de embriões e de cotilédones de sementes de ervilha para atividade fosfatásica utilizando como substrato o p-nitrofenilfosfato, notamos que essa atividade é maior nos homogenatos de embriões em relação aos de cotilédones e que ela aumenta ao longo dos sete dias que se seguem à embebição (**figura 6**), estando de acordo com o que já foi descrito na literatura para outras sementes.

Existem diversos tipos de fosfatases e estas podem ser classificadas em fosfatases ácidas ou fosfatases alcalinas, de acordo com sua faixa ótima de pH, ou ainda de acordo com a especificidade pelo substrato. Passamos então a caracterizar essa atividade e vimos se tratar de uma fosfatase ácida, pois seu pH ideal está entre 5 e 6 (**figura 7**).

Em 1998, Guo e colaboradores caracterizaram uma fosfatase citosólica de plúmulas de ervilha com atividade de proteína tirosina fosfatase. Essa enzima apresentou pH ótimo entre 4,5 e 6,5 quando pNPP foi utilizado como substrato, e pH em torno de 7 quando foi utilizado um substrato protéico sintético marcado radioativamente. Seu peso molecular foi estimado em 42 kDa através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e em 60 kDa quando submetida a cromatografia líquida em coluna de filtração em gel.

Como já foi descrito em sementes a presença de fosfatases termorresistentes (FERREIRA, 1998), pré-incubamos os homogenatos de embriões em temperaturas elevadas e após medirmos a atividade pNPPásica, vimos que esta diminui após o tratamento, sugerindo que a fosfatase ácida aqui caracterizada não é termorresistente a temperaturas acima de 55°C (**figura 11**).

A fim de caracterizar qual tipo de atividade fosfatásica está presente nos homogenatos de embriões, utilizamos diversos moduladores de atividade fosfatásica (**tabela 1**) e observamos que essa enzima é fortemente inibida por molibdato de amônio ($IC_{50} \cong 0,010 \mu M$), vanadato de sódio ($IC_{50} \cong 0,050 \mu M$) e sulfato de zinco ($IC_{50} \cong 100 \mu M$), conhecidos inibidores de tirosina fosfatase (TONKS, 1988; GELLATLY, 1994; FAUMAN, 1996; ZAPATA, 1998; ROTENBERGE, 1987). A fosfatase citosólica de plúmulas de ervilha descrita por Guo (1998) também é capaz de ser inibida por concentrações micromolares de molibdato de amônio e vanadato de sódio.

A atividade enzimática aqui descrita também foi inibida por fluoreto de sódio ($IC_{50} \cong 50 mM$), um agente nucleofílico, e por fosfato ($IC_{50} \cong 50 mM$),

inibidores de fosfatases em geral (VIÑALS, 1993). Inibidores de fosfatases alcalinas como levamizol e tetramizol (BELLE, 1972) não alteraram a atividade da enzima, assim como tartarato duplo de sódio e potássio, usual inibidor de fosfatases lisosomais secretadas (ARAÚJO, 1976; VIHKO, 1993 e EK-RYLANDER, 1997). O ácido ocadáico, um inibidor de serina/treonina fosfatases também não foi capaz de modular a atividade da enzima.

Apesar da aparente ausência de uma atividade serina/treonina fosfatase, notamos a diminuição nos níveis de fosfoserina nos homogenatos ao longo dos sete dias que se seguem à embebição (**figura 17**). Em 1994, Evans e colaboradores, isolaram uma seqüência a partir de uma biblioteca de cDNA de embrião de ervilha em desenvolvimento (8 dias após o florescimento) codificando um peptídeo com alta homologia à subunidade regulatória de uma fosfatase do tipo PP2A, que hidrolisa fosfato de resíduos de serina e treonina. Como essa classe de enzima apresenta atividade em pH neutro, é possível que fisiologicamente ela esteja presente, porém não pode ser determinada nas reações aqui descritas em função do pH.

Iniciamos o estudo de atividade(s) cinásica(s) nos homogenatos de embriões do dia zero até o dia sete após a embebição. Observamos que ocorre uma diminuição na atividade cinásica do dia zero ao dia um, e esta se mantém baixa até o sétimo dia após a embebição (**figura 14**).

A atividade cinásica foi ensaiada na presença de vários inibidores e o único que apresentou uma inibição expressiva foi o TBB (**figura 16**), um inibidor altamente específico para CK II com $K_i = 0,9 \mu\text{M}$ (SARNO, 2001).

A caseína cinase II possui estrutura oligomérica, apresentando duas subunidades catalíticas (α e α') e duas subunidades regulatórias β . Clonagem e sequenciamento de cDNAs de diferentes espécies têm revelado um alto grau de conservação de suas subunidades. O peso molecular de suas subunidades varia de 37 a 44 kDa (α) e 24 a 28 kDa (β) (GRANKOWSKY, 1991; LIN, 1991; FILHOL, 1991; JAKOBI, 1992; ISSINGER, 1992).

A CK II é uma serina/treonina proteína cinase multifuncional, amplamente distribuída dentro das células e se encontra em diversos organismos, tais como: leveduras (PADMANABHA, 1987 e 1990), fungos (KUDLICKI, 1978) e células animais (HATHAWAY, 1979 e ROSE, 1981). Já foi descrita também em diversas plantas como milho (NIEFIND, 1998) e araucária (MACHADO, 2002), além da própria ervilha, onde sua atividade foi localizada em núcleos de células da extremidade da raiz (BRUSA, 1994).

Utilizamos um anticorpo contra a subunidade catalítica da CK II em homogenatos de diferentes dias após a embebição e observamos a marcação de uma única banda, de baixo peso molecular, apenas no homogenato do dia zero (**figura 17**). Esse dado corrobora com os dados anteriores, de que existe atividade CK II e que esta é maior no dia zero, sugerindo uma maior atividade pela maior quantidade de enzima e não por modulação enzimática.

Na terceira parte deste trabalho, procuramos estudar se o estado de fosforilação da vicilina, influencia nas suas propriedades funcionais, pois atualmente, as características físico-químicas das proteínas de reserva de sementes de leguminosas têm despertado grande interesse biotecnológico e na indústria alimentar, uma vez que há a possibilidade dessas proteínas

servirem como ingredientes funcionais, atuando como agentes emulsificantes, espumantes, etc. A aplicabilidade das propriedades funcionais possivelmente diminui a densidade calórica e de gordura de alguns alimentos, contribuindo dessa forma para o desenvolvimento de produtos alimentícios alternativos. Essas proteínas podem também servir como uma fonte protéica de baixo custo, servindo para suplementar a alimentação, principalmente da população de baixa renda.

Para realizar esse estudo, purificamos a vicilina a partir das sementes secas de ervilha através do fracionamento das proteínas por precipitação por sulfato de amônio. A vicilina foi fosforilada quimicamente com o uso de trimetafosfato de sódio (STMP), um agente que já é utilizado pela indústria alimentícia como aditivo químico. Essa fosforilação foi monitorada através do uso de anticorpo antifosfoserina e do tempo de eluição em cromatografia líquida de troca iônica em coluna do tipo MonoQ. Observamos que a quantidade de fosfoserina presente na vicilina aumenta após o tratamento com STMP (**figura 19**) e que o tempo médio de eluição da vicilina aumenta de 27,4 minutos no controle para 30,1 minutos na proteína fosforilada com 10% de STMP (**figura 20**), indicando uma maior interação da proteína com a resina, característica de aumento de carga negativa associada à proteína.

Através de estudos de espectroscopia de emissão de fluorescência (**figura 21**) e dicroísmo circular (**figura 22**) observamos não haver uma aparente alteração na estrutura secundária e terciária da vicilina, assim como foi observado por Pedrosa (2000) que a neoglicosilação da vicilina também não leva a alterações em sua estrutura.

Ao estudarmos as propriedades funcionais da vicilina fosforilada quimicamente, observamos que a solubilidade é aumentada na faixa de pH entre 3 e 5 (**figura 23**), região crítica na qual a vicilina tende a precipitar. A capacidade de estabilizar emulsão também foi estudada e observamos, através do volume de separação da fase aquosa, que a vicilina fosforilada mantém a emulsão estável por mais tempo (**figura 24**). O aumento da solubilidade e da capacidade de estabilizar emulsões permite que se ampliem as possibilidades de utilização dessa proteína na indústria alimentícia.

Assim, demonstramos nessa dissertação que o processo de germinação leva a profundas modificações nos aspectos metabólicos das sementes de ervilha, assim como ocorre em outros organismos filogeneticamente próximos. Ademais, apresentamos um potencial emprego da vicilina em indústria de alimentos por suas características físico-químicas aqui destacadas.

6 - Referências Bibliográficas

ADAMEK-SWIERCZYNSKA, S.; KOZIK, A. **Multiple thiamine-binding proteins of legume seeds. Thiamine-binding vicilin of *Vicia faba* versus thiamine-binding albumin of *Pisum sativum*.** Plant Physiol. Biochem. 40, 735-741, 2002.

ALONSO, R.; ORÚE, E.; MARZO, F. **Effects of extrusion and conventional processing methods on protein and antinutritional factor contents in pea seeds.** Food Chemistry 63, 505-512, 1998.

ALONSO, R.; GRANT, G.; MARZO, F. **Thermal treatment improves nutritional quality of pea seeds (*Pisum sativum*) without reducing their hypocholesterolemic properties.** Nutritional Research 21, 1067-1077, 2001.

ARAÚJO, P. S.; MIES, V.; MIRANDA, O. **Subcellular distribution of low and higher molecular weight acid phosphatases.** Biochim. Biophys. Acta 452, 121-130, 1976.

BANIEL, A.; CAER, D.; COLAS, B.; *et al.* **Functional properties of glycosylated derivatives of the 11S storage protein from pea (*Pisum sativum* L.).** J. Agric. Food Chem. 40, 200-205, 1992.

BASHA, S. M. M.; BEEVERS, L. **Proteolysis in pea cotyledons.** *Planta* 124, 77-87, 1975.

BELLE, H. V. **Kinetics and inhibition of alkaline phosphatases from canine tissues.** *Biochim. Biophys. Acta* 289, 158-168, 1972.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds physiology development and germination.** Penum Press, N.Y., 1985.

BEWLEY, J. D. **Seed germination and dormancy.** *The Plant Cell* 9, 1055-1066, 1997.

BHARGAVA, R. E SACHAR, R.C. **Chloramphenicol stimulates acid phosphatase activity in germinating cotton (*Gossypium hirsutum*) embryos.** *Biocem. J.* 212, 73-77, 1983.

BHARGAVA, R. E SACHAR, R.C. **Induction of acid phosphatase in cotton seedlings: enzyme purification, subunit structure and kinetic properties.** *Phytochemistry* 26:5, 1293-1297, 1987.

BISWAS, T.K; CUNDIFF, C. **Multiples forms of acid phosphatase in germinating seeds of *Vigna sinensis*.** *Phytochemistry* 30:7, 2119-2125, 1991.

BISWAS, T.K.; PROMO, M.; BISWAS, B. **Purification of acid phosphatase I from germinating seeds of *Vigna sinensis*.** *Phytochemistry* 41:6, 1457-1458, 1996.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917, 1959.

BOTHA, F. C.; POTGIETER, G. P.; BOTHA, A. M. **Respiratory metabolism and gene expression during seed germination.** J. Plant Growth Regul. 11, 211-224, 1992.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry 72, 248-257, 1976.

BRUSA, P.; NANNARIELLO, L.; SPARVOLI, E. **Nuclear casein-kinase II type activity in pea root tip cells during germination.** Plant Science 102, 31-40, 1994.

CAMPBELL, N. F.; SHIH, F. F.; MARSHALL, W. E. **Enzymatic phosphorylation of soy protein isolate for improved functional properties.** J. Agric. Food Chem. 40, 403-406, 1992.

CAMPOS, C. B. L. **Transdução de sinais de proliferação e morte celular na retina em desenvolvimento: um estudo experimental das vias das MAPKs, PI3K e cAMP.** Tese de doutorado defendida pelo Instituto de Biofísica, CCS, UFRJ, 1999.

CHAUDHRY, P. S.; CASILLAS, E. R. **Casein kinase II activity and polyamine-stimulated protein phosphorylation of cytosolic and plasma membrane proteins in bovine sperm.** Archives of Biochemistry and Biophysics 278, 98-106, 1989.

CHIATANTE, D.; BRUSA, P.; LEVI, M. *et al.* **Phosphorylation of proteins and proliferation in root meristems of pea (*Pisum sativum*).** Plant Science 75, 39-46, 1991.

CHUNG, R. P-T.; POLYA, G.M. **Copurification and characterisation of poppy seed phosphatase and phosphoprotein phosphatase activities.** Plant science 84, 153-162, 1992.

CROY, R. R. D.; LYCETT, G. W.; GATEHOUSE, J. A.; *et al.* **Cloning and analysis of cDNAs encoding plant storage protein precursors.** Nature 295, 76-79, 1982.

DERBYSHIRE, D. J.; WRIGHT, D. J.; BOULTER, D. **Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds.** Phytochemistry 15, 3-24, 1976.

DUFF, S. M. G.; SARATH, G.; PLAXTON, W. C. **The role of acid phosphatases in plant phosphorous metabolism.** Physiologia Plantarum 90, 791-800, 1994.

EGLOFF, M. P.; COHEN, P. T.; REINEMER, P. *et al.* **Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate.** *Molec. Biol.* 254, 942-959, 1995.

EHRENSHAFT, M.; BRAMBI, R. **Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize.** *Plant Physiol.* 93, 295-304, 1990.

EISELE, T. A.; BREKKE, C. J. **Chemical modification and functional properties of acylated beef heart myofibrillar proteins.** *J. Food Science* 46, 1095-1102, 1981.

EK-RYLANDER, B.; BARKHEM, T.; LJUSBERG, J. *et al.* **Comparative studies of rat recombinant purple acid phosphatase and bone tartrate-resistant acid phosphatase.** *Biochem. J.* 321, 305-311, 1997.

EL-ADAWY, T. A. **Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate.** *Food Chemistry* 70, 83-91, 2000.

ESKEN, N. A. M. **Biochemistry of foods**, Second edition – Academic Press, Inc. San Diego, California, 1990.

EVANS, I. M.; FAWCETT, T.; *et al.* **A homologue of the 65 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A in early pea embryos.** *Plant Molecular Biology* 24, 689-695, 1994.

FAUMAN, E. B.; SAPER, M. A. **Structure and function of the protein tyrosine phosphatases.** *TIBS* 21, 413-417, 1996.

FERREIRA, C.V.; GRANNJEIRO, J.M.; TAGA, E.M. E AOYAMA, H. **Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatases.** *Plant Physiol. Biochem.* 36:7,487-494, 1998.

FIALHO, E.; SILVEIRA, A. B.; MASUDA, H.; *et al.* **Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 871-880, 2002.

FILHOL, O.; COCHET, C.; WEDEGAERTNER, P.; *et al.* **Coexpression of both α and β subunits is required for assembly of regulated casein kinase II.** *Biochemistry* 30, 11130-11140, 1991.

FISKE, C. H.; SUBARROW, Y. **The colorimetric determination of phosphorus.** *J. Biol. Chem.* 66, 375-381, 1925.

GATEHOUSE, J. A.; CROY, R. R. D.; BOULTER, D. **Isoelectric-focusing properties and carbohydrate content of pea (*Pisum sativum*) legumin.** *Biochem. J.* 185, 497-503, 1980.

GATEHOUSE, J. A.; CROY, R. R. D.; MORTON, H.; *et al.* **Characterisation and subunit structures of vicilin storage proteins of pea (*Pisum sativum* L).** Eur. J. Biochem.118, 627-633, 1981.

GATEHOUSE, J. A.; EVANS, I. M.; BOWN, D.; *et al.* **Control of storage-protein synthesis during seed development in pea (*Pisum sativum*).** Biochem. J. 208, 119-127, 1982.

GATEHOUSE, J. A.; LYCETT, R. R. D.; BOULTER, D. **The synthesis and structure of pea storage proteins.** CRC Crit. Ver. Plant Sci. I 4, 287-314, 1984.

GELLATLY, K. S.; MOORHEAD, G. B. G.; *et al.* **Purification and characterization of a potato tuber acid phosphatase having significant phosphotyrosine phosphatase activity.** Plant Physiol. 106, 223-232, 1994.

GIORDANO, L. B. **As culturas da ervilha e da lentilha / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças.** Coleção Plantar, v. 2, 1993.

GRANKOWSKI, N; BOLDYREFF, B.; ISSINGER, O. G. **Isolation and characterization of recombinant human CK2 subunits α and β from bacteria.** Eur. J. Biochem. 198, 25-30, 1991.

GUO, Y. L.; ROUX, S. J. **Partial purification and characterization of an enzyme from pea nuclei with protein tyrosine phosphatase activity.** Plant Physiol. 107, 167-175, 1995.

GUO, Y. L.; TERRY, M. E.; ROUX, S. J. **Characterization of a cytosolic phosphatase from pea plumules having significant protein tyrosine phosphatase activity.** Plant Physiol. Biochem. 36 (4), 269-278, 1998.

HANKS, S. K.; HUNTER, T. **The eukariotic protein kinase superfamily: kinase catalytic domain structure and classification.** FASEB J. 9, 576-596, 1995.

HATAWAY, G. M.; TRAUGH, J. A. **Cyclic nucleotiddependent protein kinases from rabbit reticulocytes – purification of casein kinases.** J. Biol. Chem. 254, 762-768, 1979.

HATHAWAY, G. M.; LUBEN, T. H.; TRAUGH, J. A. **Inhibition of casein kinase II by heparin.** J. Biol. Chem. 255, 8038-8041, 1980.

HORWITZ, J.; PERLMAN, R. L. **Phospholipid metabolism in PC 12 pheochromocytoma cell.** Methods in Enzimol. 141, 169-175, 1977.

ISSINGER, O. G.; BROCKEL, C.; BOLDYREFF, B.; *et al.* **Characterization of the α and β subunits of casein kinase 2 by far-UV CD spectroscopy.** *Biochemistry* 31, 6098-6103, 1992.

JAGIELLO, I.; DONELLA-DEANA, A.; SZCZEGIELNIAK, J.; *et al.* **Identification of protein phosphatase activities in maize seedlings.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1134, 129-136, 1992.

JAKOBI, R.; TRAUGH, J. A. **Characterization of the phosphotransferase domain of casein kinase II by site-directed mutagenesis and expression in *Escherichia coli*.** *J. Biol. Chem.* 267, 23894-23902, 1992.

JOHNSON, E. A.; BREKKE, C. J. **Functional properties of acylated pea protein isolates.** *Journal of Food Science* 48, 722-725, 1983.

JONES, C. G.; LYCETT, G. W.; TUCKER, G. A. **Protease inhibitor studies and cloning of a serine carboxypeptidase cDNA from germinating seeds of pea (*Pisum sativum*).** *Eur. J. Biochem.* 235, 574-578, 1996.

KAWOOYA, J. K.; LAW, J. H. **Role of lipophorin in lipid transport to insect egg.** *J. Biol. Chem.* 263 (18), 8748-8753, 1988.

KLIMCZAC, L.; CASHMORE, A. R. **Microheterogeneous cytosolic high-mobility group proteins from broccoli co-purify with and are phosphorylated by casein kinase II.** *Plant Physiol.* 105, 911-919, 1994.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. **Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases.** J. Agric. Food Chem. 48, 657-666, 2000.

KUNDU, P.; BANERJEE, A.C. **Multiple forms of acid phosphatase from seedling axes of *Vigna radiata*.** Phytochemistry 29:9, 2825-2828, 1990.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage t₄.** Nature 227, 680-685, 1970.

LEUNG, J. ***Arabidopsis* ABA response gene AB11: features of a calcium-modulated protein phosphatase.** Science 264, 1448-1452, 1994.

LIN, W. J.; TUAZON, P. T.; TRAUGH, J. A. **Characterization of the catalytic subunit of casein kinase II expressed in *Escherichia coli* and regulation of activity.** J. Biol. Chem. 266, 5664-5669, 1991.

LUAN, S. **Protein phosphatase and signaling cascades in higher plants.** TRENDS in Plant Science 3:7, 271-275, 1998.

LYCETT, G. W.; DELAUNEY, A. J.; GATEHOUSE, J. A.; *et al.* **The vicilin gene family of pea (*Pisum sativum* L): a complete cDNA coding sequence for preprovicilin.** Nucl. Ac. Res. 11, 2367-2380, 1983.

MACHADO, E. L.; SILVA, A. C.; SILVA, M. J.; *et al.* **Endogenous protein phosphorylation and casein kinase activity during seed development in *Araucaria angustifolia*.** *Phytochemistry* 61, 835-842, 2002.

MACKINTOSH, C.; COGGINS, J.; COHEN, P. **Plant protein phosphatases.** *Biochem. J.* 273, 733-738, 1991.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **Germination of seeds.** The Macmilan Company, New York, 1963.

NIEFIND, K.; GUERRA, B.; PINNA, L. A.; *et al.* *EMBO J.* 17, 2451-2462, 1998.

OLCZAK, M.; WATOREK, W.; MORAWIECKA, B. **Purification and characterization of acid phosphatase from yellow lupin (*Lupinus luteus*) seeds.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1641, 14-25, 1997.

OSBORNE, T. B.; CAMPBELL, G. R. **Proteins of the pea.** *J. Am. Chem. Soc.* 29, 348, 1898.

PADMANABHA, R.; GLOVER, C. V. C. **Casein kinase II of yeast contains two distinct alfa-polypeptides and an unusually large beta subunit.** *J. Biol. Chem.* 262, 1829-1835, 1987.

PADMANABHA, R.; CHEN-WU, J. L. P.; HANNA, D.; *et al.* **Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene: casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*.** Mol. Cell Biol. 10, 4089-4099, 1990.

PARK, H. C.; ETEN, R.L.V. **Purification and characterization of homogeneous sunflower seed acid phosphatase.** Phytochemistry 25:2, 351-357, 1986.

PATEL, S.; CUDNEY, R.; MCPHERSON, A. **Crystallographic characterization and molecular symmetry of edestin, a legumin from hemp.** J. Mol. Biol. 235, 361-363, 1994.

PEDROSA, C.; FERREIRA, S. T. **Deterministic pressure-induced dissociation of vicilin, the 7S storage globulin from pea seeds: Effect of pH and cosolvents on oligomer stability.** Biochemistry 33, 4046-4055, 1994.

PEDROSA, C.; TRISCIUZZI, C.; FERREIRA, S. T. **Effects of glycosylation on functional properties of vicilin, the 7S storage globulin from pea (*Pisum sativum*).** J. Agric. Food Chem. 45, 2025-2030, 1997.

PEDROSA, C.; FELICE, F. G.; TRISCIUZZI, C.; *et al.* **Selective neoglycosylation increases the structural stability of vicilin, the 7S storage globulin from pea seeds.** Archives of Biochemistry and Biophysics 382 (2), 203-210, 2000.

PEI, Z. M. **A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine-threonine kinases, CDPK.** EMBO J. 15, 6564-6574, 1997.

PERNOLLET, J. C.; MOSSÉ, J. **Structure and localization of legume and cereal seed storage proteins.** Seed Protein 7, 155-191, 1983.

RATNAYAKE, W. S.; HOOVER, R.; SHAHIDI, F.; *et al.* **Composition, molecular structure, and physicochemical properties of starches from four field pea (*Pisum sativum*) cultivars.** Food Chemistry 74, 189-202, 2001.

RAVEN, P. H.; EVVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** Quinta edição. Ed. Guanabara Koogan, 1992.

REYES-MORENO, C.; PAREDES-LÓPEZ, O. **Hard-to-cook phenomenon in common beans: A review.** CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition 33, 227, 1993.

ROSE, K. M.; BELL, L. E.; SIEFKEN, D. A.; *et al.* **A heparin-sensitive nuclear protein kinase – purification, properties and increased activity in rat hepatoma relative to liver.** J. Biol. Chem. 256, 7468-7477, 1981.

ROSSI, A.; PALMA, M.S.; LEONE, F.A.; BRIGLIADOR, M.A. **Properties of acid phosphatase from scutella of germinating maize seeds.** *Phytochemistry* 20:8, 1823-1826, 1981.

ROTENBERG, S. A.; BRAUTIGAN, D. L. **Membrane protein phosphotyrosine phosphatase from scutella of germinating maize seeds.** *Phytochemistry* 20:8, 1823-1826, 1987.

SALON, C.; RAYMOND, P.; PRADET, A. **Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germination lettuce embryos.** *J. Biol. Chem.* 263, 12278-12287, 1988.

SARNO, S.; REDDY, H.; *et al.* **Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 (casein kinase-2).** *FEBS Letters* 496, 44-48, 2001.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações.** São Paulo: Livraria Varela, 1996.

SHENG, Z.; CHARBONNEAU, H. **The baculovirus *Autophaga californica* encodes a protein tyrosine phosphatase.** *J. Biol. Chem.* 268 (7), 4728-4733, 1993.

SHENOLIKAR, S. **Protein serine/treonine phosphatases – new avenues for cell regulation.** *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 55-86, 1994.

SILVA-NETO, M. A. C.; OLIVEIRA, P. L. **Protein phosphorylation in *Rhodnius prolixus* oocytes: Identification of a type II casein kinase.** Insect Biochem. Molec. Biol. 23, 815-823, 1993.

SMITH, S. K.; WALKER, J. C. **Plant protein phosphatases.** Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 101-125, 1996.

SOMMERCORN, J.; KREBS, E.G. **Classification of protein kinases into messenger-dependent and independent kinases. The regulation of independent kinases.** Advances in post-translation modifications of proteins and aging, Plenum Publishing Corporation, 1988.

SPENCER, D.; CHANDLER, P. M.; HIGGINS, T. J. V.; *et al.* **Sequence interrelationship of the subunits of vicilin from pea seeds.** Plant Mol. Biol. 2, 259-267, 1983.

SUNG, H.; CHEN, H.; LIU, T.; *et al.* **Improvement of the functionalities of soy protein isolate through chemical phosphorylation.** Journal of Food Science 48, 716-721, 1983.

TAYLOR, S. S. **c-AMP-dependent protein kinase – model for an enzyme family.** J. Biol. Chem. 264, 8443-8446, 1989.

TONKS, N.; DILTZ, C. D.; FISCHER, E. H. **Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatase of human placenta.** J. Biol. Chem. 263, 6731-6737, 1988.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4350-4354, 1979.

TROJANEK, J.; EK, P.; SCOBLE, J. *et al.* **Phosphorylation of plant proteins and the identification of protein-tyrosine kinase activity in maize seedlings.** Eur. J. Biochem. 235, 338-344, 1996.

ULLAH, A.H.J.; GIBSON, D.M. **Purification and characterization of acid phosphatase from cotyledons of germinating soybean seeds.** Archives of Biochemistry and Biophysics 260:2, 514-520, 1988.

VIHKO, P.; KURKELA, R.; *et al.* **Rat acid phosphatase: overexpression of active, secreted enzyme by recombinant baculovirus-infected cells, molecular properties, and crystallization.** Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 799-803, 1993.

VIÑALS, F.; TESTAR, X.; *et al.* **Inhibitory effect of fluoride on insulin receptor autophosphorylation and tyrosine kinase activity.** Biochem. J. 291, 615-622, 1993.

WARD, J. M.; PEI, Z.; SCHROEDER, J. I. **Roles of ion channel in initiation of signal transduction in higher plants.** Plant Cell 7, 833-844, 1995.

YANG, J. F.; MALEK, L. **Purification of a dry pea seed proteinolytic enzyme complex.** Phytochemistry 30 (8), 2487-2491, 1991.

ZAPATA, L. C. R.; SOTOMAYOR, T. H. **Detection of tyrosine phosphatase activity in *Catharantus roseus* hairy roots.** Plant Physiol. Biochem. 36:10, 731-735, 1998.

ZHANG, S.; JIN, C.; ROUX, S. J. **Casein kinase II-type protein kinase from pea cytoplasm and its inactivation by alkaline phosphatase in vitro.** Plant Physiol. 103, 955-962, 1993.

ZHENG, Y.; DURANTI, M. **Molecular properties and thermal secretion of lupin seed acid phosphatase.** Phytochemistry 40:1, 21-22, 1995.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)