

**TIROSINA FOSFATASE ENVOLVIDA NA GERMINAÇÃO DE  
SEMENTES DE MILHO (*Zea mays*)**

**RAQUEL SENNA TELHADO**

**ORIENTADORA: Eliane Fialho de Oliveira**

**Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando  
a obtenção do grau de Mestre em Nutrição**

**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.

**Tirosina Fosfatase Envolvida na Germinação de Sementes  
de Milho (*Zea mays*)**

Tese submetida ao Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Nutrição.

Banca Examinadora:

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

Prof. Antonio Galina  
Prof. Adjunto do Departamento de Bioquímica Médica / ICB / UFRJ

Profa. Russolina Benedeta Zingali  
Prof. Adjunto do Departamento de Bioquímica Médica / ICB / UFRJ

Profa. Vera Lúcia Valente Mesquita  
Profa. Adjunta do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/ INJC / UFRJ

Prof. Marcos Henrique Ferreira Sorgine  
Prof. Adjunto do Departamento de Bioquímica Médica / ICB / UFRJ  
Revisor e Suplente

## Ficha catalográfica

Telhado, Raquel Senna

Tirosina Fosfatase Envolvida na Germinação de Sementes de Milho (*Zea mays*)/Raquel Senna Telhado. Rio de Janeiro: UFRJ/INJC, 2003

Nº de folhas xviii, 96 p.

Tese: Mestre em Nutrição – Universidade Federal do Rio de Janeiro, INJC

1. *Zea mays* 2. tirosina fosfatase 3. germinação 4. Tese

I. Tirosina Fosfatase Envolvida na Germinação de Sementes de Milho (*Zea mays*).

II. Mestre

**Este trabalho foi realizado através do acordo de cooperação técnica entre o Instituto de Nutrição e o Departamento de Bioquímica Médica do Instituto de Ciências Biomédicas, ambos da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Sendo realizado no laboratório de Bioquímica de Insetos do Departamento de Bioquímica Médica, e no laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos no Instituto de Nutrição, sob orientação da Professora Eliane Fialho de Oliveira e co-orientação do Professor Mário Alberto Cardoso da Silva Neto, e na vigência de auxílios concedidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado 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 a minha orientadora.***

***Sem o seu incentivo e amizade esse  
trabalho não teria sido realizado.***

## **Agradecimentos**

*Nasceste no lar que precisavas,  
Vestiste o corpo físico que merecias,  
Moras onde melhor Deus te proporcionou,  
de acordo com teu adiantamento.  
Possuis os recursos financeiros coerentes  
com as tuas necessidades, nem mais,  
nem menos, mas o justo para as tuas  
lutas terrenas.*

*Teu ambiente de trabalho é o que elegeste  
espontaneamente para a tua realização.  
Teus parentes, amigos são as almas que atraístes,  
com tua própria afinidade.  
Portanto, teu destino está constantemente  
sob teu controle.*

*Tu escolhes, recolhes, eleges, atraís,  
buscas, expulsas, modificas tudo aquilo  
que te rodeia a existência.  
Teus pensamentos e vontades são a chave  
de teus atos e atitudes...  
São as fontes de atração e repulsão na tua  
jornada vivência.*

*Não reclames nem te faças de vítima.  
Antes de tudo, analisa e observa.  
A mudança está em tuas mãos.  
Reprograme tua meta,*

*“Embora ninguém possa voltar atrás e”  
fazer um novo começo, qualquer um pode  
começar agora e fazer um novo fim”.*

*Francisco Xavier*

*Agradeço à Deus pela sua presença constante em minha vida.*

*À Lili, minha orientadora, pela oportunidade, confiança, incentivo e amizade.  
Durante esses quatro anos de convívio aprendi muito, desejo sinceramente, continuar  
trabalhando junto com você. **MUITO OBRIGADA!!!***

*Ao Masuda, pela acolhida em seu laboratório, pelas palavras de incentivo e pelo  
privilegio de conviver com um grande cientista.*

*Ao Mário pela confiança em ter me aceito como sua aluna de doutorado, será um  
prazer e um desafio trabalhar com você. Muito Obrigada!*

*Ao Vagner, aluno de iniciação científica que trabalha comigo, espero de alguma  
forma ter te ajudado e apesar de deixar oficialmente as nossas sementinhas de milho,  
conte sempre comigo. Obrigada pela ajuda nos experimentos finais e por bagunçar a  
minha bancada.*

*À Cíntia e a Fabiana, pelo carinho e convívio.*

*À Angélica pelos papos, por dividir as mesmas angústias em alguns momentos  
difíceis e pelo carinho. Conte sempre comigo.*

*Ao Alan, pelas conversas, discussões sobre experimentos e suas contas malucas,  
por dividirmos nossos reagentes e as invasões de bancada. É muito legal trabalhar ao  
seu lado.*



*À Giselle, pela amizade que está crescendo, através da nossa colônia de mosquitos. Obrigada pela ajuda e pelo carinho.*

*À Evelize, pelo carinho e a Denise, por estar sempre disposta a ajudar em tudo que for possível e pelo seu carinho. Esse ano estaremos motorizadas certo? (Segure-se quem puder!!)*

*A Heloísa pelas corridas no HPLC e a Lillian pelo bom humor e por tentar organizar o laboratório.*

*Ao pessoal do laboratório de Bioquímica de Insetos: Adriano (já estou considerando você membro do laboratório!), Christine, Lyn, Lize, Paula.*

*Ao pessoal do laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (GKM): Georgia, Kátia, Aline, Daniel, Flávia, Luciana, Patrícia, Luciano, Petter, Emerson e Rafael.*

*Aos membros do laboratório do Pedro, não vou citar nomes, mesmo porque não sei o nome de todos.*

*Ao Marcos pelo carinho e pela revisão desta tese.*

*Ao Prof. Ricardo Louro pela colaboração na realização das microscopias.*

*Ao Prof. Antônio Galina por nos ceder, gentilmente, as sementes.*

*Ao laboratório da Profa. Lina por todas as vezes que usei o Thermomax.*

*Às minhas amigas, Rachelzinha (agora companheira de laboratório), Fernanda (vou sentir muitas saudades de você) e a Lú, pelas eternas e inesquecíveis saídas.*

*Aos meus pais, sem o apoio e o amor de vocês seria impossível chegar até aqui. Apesar não entenderem nada do que faço, tenho certeza que se orgulham de mim.*

*À minha irmã, meu exemplo de garra, vontade e determinação, amo você demais.*

*À Dany, espero ter contribuído um pouquinho na suas escolhas acadêmicas e fazer parte dos agradecimentos da sua tese de mestrado.*

*A toda minha família (é pequena, mas barulhenta !!!)*

*Ao Denis, pelo seu amor, carinho, apoio incondicional, mesmo sem entender o que faço. Espero fazer por você, pelo menos um pouquinho de tudo que fez por mim.*

## RESUMO

Sementes são componentes vitais na dieta mundial. O embrião de sementes é equipado estrutural e fisiologicamente para desempenhar seu papel no meio ambiente e está provida com reservas alimentares para sustentar o crescimento da semente até o seu estabelecimento como um ser autotrófico. Em embriões de sementes de milho caracterizamos uma atividade fosfatásica que aumenta seis vezes ao longo de 24 horas de germinação e apresenta pH ótimo na faixa de 4,5 – 5,5. Tal atividade contra pNPP mostrou-se saturável entre 2 – 3 mM e linear até 60 minutos. Através do uso de inibidores clássicos de fosfatases, requerimento de íons para catálise e atividade contra fosfoaminoácidos, sugere-se que esta fosfatase ácida seja do tipo tirosina fosfatase. Análise de imunocitoquímica através de western blotting de homogenatos totais ao longo da germinação mostram a presença de inúmeras proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina, apresentando um polipeptídeo majoritário de 14 kDa como principal alvo da desfosforilação. O processo de purificação realizado através de precipitação por sulfato de amônio, coluna de afinidade do tipo Concanavalina A Sepharose e coluna de filtração em gel do tipo Superose 6HR, levou a identificação de uma fosfatase de massa molecular de 112 kDa e em uma purificação de cerca de 330 vezes. Em gel de poliacrilamida na presença de SDS esse material apresenta 3 polipeptídeos de massas estimadas em 70, 25 e 15 kDa. A fim de verificarmos o tipo de fosfatase eluída da coluna Superose 6HR, alguns inibidores clássicos de tirosina fosfatase foram utilizados e mostraram forte efeito inibitório sobre a fração purificada. A atividade fosfatásica foi localizada “in situ” em cortes de embriões de sementes de milho com 24 horas de germinação e

verificamos que esta atividade foi predominante nas regiões de meristema apical da raiz, coleóptilo e nas primeiras folhas, sendo inibida na presença de inibidores de tirosina fosfatases. O crescimento dos embriões nas sementes hidratadas na presença desses inibidores foi retardado, em 10 a 30%, quando comparados com o controle e conseqüentemente a atividade pNPPásica também foi menor. O conjunto desses dados mostra a participação de uma atividade tirosina fosfatásica no processo de germinação das sementes de milho.

## ABSTRACT

Seeds are a vital component of the world's diet. The embryo's seed is structurally and physiologically equipped for its role in the environment and is well provided with food reserves to sustain the growing seedling until it establishes itself as a self-sufficient, autotrophic organism. Here, we characterized in embryos of maize seeds a phosphatase activity that increased during the first 24 hours of germination, showing an optimum pH at 4.5 - 5.5, being this activity linear until 60 minutes. Using classic phosphatase inhibitors, requirement of ions and assaying the enzyme against phosphoaminoacids, we suggest that this acid phosphatase occurs as a tyrosine phosphatase. Western blotting of total homogenates during germination shows the presence of proteins phosphorylated in tyrosine residues, showing a major polypeptide of 14 kDa as the dephosphorylated target. The purification process, carried out through ammonium sulphate precipitation, affinity chromatography using Con A and molecular sieve using Superose 6HR, results in a phosphatase with a molecular mass of 112 kDa. SDS-PAGE of the purified phosphatase shows three bands of 70, 25 and 15 kDa. In the presence of tyrosine phosphatase inhibitors, the fraction with high pNpPase activity from molecular sieve was totally inhibited. To localize the phosphatase activity in embryo tissues of maize seeds with 24 h of germination, the activity was analyzed *in situ*. The highest activity was observed in the root apical meristems, coleoptile and in the first leaves, being this activity inhibited by tyrosine phosphatase inhibitors. The embryo growth of seeds soaked in the presence of these inhibitors, was delayed in 10-30% when compared with control. The pNPPase activity was smaller in these seeds soaked

with tyrosine phosphatase inhibitors. These data shows the role of this phosphatase in the germination process of maize seeds.

**Abreviações:**

ADP – Difosfato de adenosina

ATP - Trifosfato de adenosina

Con A – Concanavalina A Sepharose

DMSO – Dimetil sulfóxido

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

EGTA – Ácido etilenoglicol-bis-(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetracético

ELISA – Ensaio imunológico imunoabsorvente ligado a enzima

NaF – Fluoreto de sódio

Pi – Fosfato inorgânico

pNPP – p-nitrofenil fosfato

pNP – p-nitrofenol

PPases – Serina/treonina fosfatases

PP1 – Serina/treonina fosfatases do tipo 1

PP2A – Serina/treonina fosfatases do tipo 2A

PP2B – Serina/treonina fosfatases do tipo 2B

PP2C – Serina/treonina fosfatases do tipo 2C

PTPs – Tirosina fosfatases específicas

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

SDS – Dodecil-sulfato de sódio

SBTI – Inibidor de tripsina de soja

TBS – Tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7.2, NaCl 0.15 M

Tris – Tris (hidroximetil) – aminometano

## **ÍNDICE**

<b>I.Introdução</b>	<b>1</b>
I.1- A semente de milho	3
I.2- O processo de germinação	5
I.3- Fosforilação e desfosforilação de proteínas	9
I.4- Fosfatases	13
I.4.1- Serina/treonina fosfatases	13
I.4.2- Tirosina fosfatases	15
I.4.3- Fosfatases em sementes	19
<b>I.5- Objetivos</b>	<b>20</b>
Objetivo geral	20
Objetivo específico	20
<b>II. Material e métodos</b>	<b>21</b>
II.1- Reagentes	21
II.2- Sementes	22
II.3- Coleta dos embriões da sementes	22
II.4- Dosagem de proteína	23
II.5- Determinação do pH ótimo da atividade fosfatásica de embriões de sementes de milho com 24 horas de germinação	23
II.6- Medida de atividade pNPPásica ao longo da germinação	24
II.7- Análise cinética da fosfatase	24



II.8- Medida da atividade pNPPásica na presença de cloreto de sódio	25
II.9- Efeito de efetores de fosfatases na atividade pNPPásica	26
II.10- Ensaio de inativação térmica da fosfatase	27
II.11-Atividade fosfatásica com outros substratos	27
II.12- Determinação do <i>K<sub>i</sub></i>	28
II.13- Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	28
II.14- Western blotting	29
II.15- Purificação da fosfatase ácida presente nos embriões de sementes de milho	30
II.15.1- Precipitação com Sulfato de Amônio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	30
II.15.2- Cromatografia em coluna de afinidade do tipo Concanavalina A Sepharose	31
II.15.3- Cromatografia em coluna de filtração em gel Superose 6HR acoplada ao sistema de HPLC	32
II.16- Localização da atividade fosfatásica <i>in situ</i>	32
II.17- Efeito de inibidores de fosfatases no processo de germinação	33
II.18- Densitometria	34
<b>III.Resultados</b>	<b>35</b>
<b>III.1- PARTE 1: Identificação e caracterização de uma atividade fosfatásica presente em embriões de sementes de milho (<i>Zea mays</i>).</b>	<b>35</b>

<b>III.2-PARTE 2: Purificação da tirosina fosfatase de embriões de sementes de milho com 24 horas de germinação.</b>	<b>54</b>
<b>III.3- PARTE 3: Localização da atividade fosfatásica e possível papel desta na germinação das sementes.</b>	<b>64</b>
<b>IV.Discussão</b>	<b>75</b>
<b>V. Bibliografia</b>	<b>86</b>

## **I- INTRODUÇÃO**

O conhecimento que se tem hoje sobre as sementes teve início principalmente devido à necessidade de alimentos. Em 1850, éramos 1 bilhão de habitantes na Terra, hoje somos cerca de 6 bilhões, e a previsão é de que a população mundial aumente ainda mais até o final deste século. A perspectiva é de que a maior parte dos nascimentos irá ocorrer em países considerados do terceiro mundo, por isso a necessidade de aumentar a produção de alimentos e reduzir o crescimento demográfico são prioridades nesses países. Alguns países já criaram, inclusive, bancos de sementes (seed banks), onde diversos tipos de sementes foram congelados. Isso foi feito devido ao receio de que mudanças climáticas, práticas errôneas na agricultura e destruição do habitat gerassem diminuição ou escassez desses alimentos. Segundo Gibbons, a esperança é de que o mundo reconheça e invista no conceito de que o futuro das nações não depende apenas da diversidade econômica e social, mas também da diversidade de plantas que irão alimentar suas populações (Gibbons, 1991).

Desta forma, as sementes passaram a ser vetores tecnológicos no intuito de assegurar o aumento da oferta de alimentos, principalmente aqueles que compõem a dieta básica da população.

A semente é o resultado da fertilização do óvulo pelo pólen, e desempenha funções importantes durante o 1<sup>o</sup> estágio de desenvolvimento da nova planta, sendo equipada estrutural e fisiologicamente para desempenhar o

## ***Introdução***

papel de nutri-la até que esta se estabeleça como um ser autotrófico (Bewley, 1997). É também responsável pela perpetuação da espécie e por isso carrega toda a informação genética necessária para formação de um novo ser, além de armazenar nutrientes (proteínas, carboidratos e lipídios) necessários ao seu desenvolvimento (Murray, 1984).

As plantas com sementes compreendem dois grandes grupos: as gimnospermas e as angiospermas. Estas se desenvolvem a partir de um óvulo fertilizado e consistem basicamente de um embrião protegido. As sementes produzidas podem ser classificadas em monocotiledôneas e dicotiledôneas. Segundo Mayer e Poljakoff-Mayber em 1963, as monocotiledôneas produzem sementes com um cotilédone e dicotiledôneas com dois cotilédones. Exemplos de plantas do primeiro grupo são os cereais (milho, cavada, trigo, arroz, aveia, etc) e do segundo grupo são as leguminosas (ervilha, feijão, soja, grão de bico, lentilha e etc).

Como as sementes de plantas são uma fonte rica de carboidratos e proteínas, estas conseqüentemente desempenham um papel importante na nutrição humana. Sabe-se que cerca de 70% de todo consumo alimentar é fornecido por sementes (cereais e leguminosas) e esses grãos representam 50-70% do total de proteínas e calorias da dieta consumida diariamente (Esken, 1990).

As sementes de cereais contém cerca de 10-15% de proteínas enquanto as leguminosas contém 20-30%. As proteínas mais abundantes em ambos os tipos

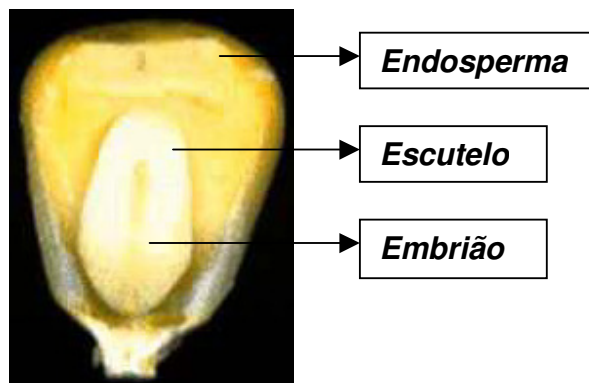
## ***Introdução***

de sementes são as proteínas de reserva, que usualmente compreendem cerca de 50-60% do total de proteínas da semente. As principais proteínas de reserva das leguminosas são as globulinas solúveis em salina. Os cereais também contêm pequenas quantidades de globulinas, mas suas principais proteínas de reserva são um grupo de polipeptídeos solúveis em álcool chamadas de prolaminas (Larkins e cols., 1993).

### ***1.1- A semente de milho.***

O milho é uma gramínea domesticada de origem mexicana, usada para produzir grãos utilizados como base de uma série de alimentos e como forragem. Devido a sua adaptabilidade e produtividade, a cultura de milho se expandiu rapidamente, pela maioria dos países do mundo sendo a terceira maior área plantada mundial, perdendo apenas para trigo e arroz. A maior parte da produção de milho ocorre nos Estados Unidos, República Popular da China e Brasil, que juntos produzem cerca de 73% da produção mundial anual de 456.2 toneladas (Magalhães, 1995).

A semente de milho é formada basicamente por três estruturas: (A) endosperma; (B) o escutelo e (C) o embrião (**Figura 1**).



**Figura 1:** Principais estruturas da semente de milho.

(retirado de : <http://www.embrapa.br>)

Nas angiospermas, a célula-ovo está contida dentro de um óvulo no interior do ovário da flor. Na fecundação, o grão de pólen depositado na superfície do estigma emite o tubo polínico, pelo qual dois gametas masculinos migram para o óvulo. Um gameta masculino fecunda a célula-ovo, enquanto o outro combina-se com outra célula no interior do óvulo para formar um tecido nutritivo especializado, o endosperma, que envolve o embrião e constitui a fonte de nutrientes para o seu desenvolvimento (Wolpert e cols., 2000).

O embrião maduro consiste de um eixo semelhante ao caule, e nas extremidades opostas encontram-se os meristemas apicais do eixo caulicular e da raiz. Os meristemas são constituídos por células meristemáticas – células capazes de divisões repetidas (Raven e cols., 1992).

## ***Introdução***

Nas monocotiledôneas, o único cotilédone, se apresenta como um órgão de reservas ou fotossintetizante, além de realizar a função de absorção. Mergulhado no endosperma, o cotilédone absorve nutrientes digeridos por atividades enzimáticas. As substâncias digeridas são então movidas por meio do cotilédone para as regiões de crescimento do embrião. Quando totalmente formado, o embrião das gramíneas possui um cotilédone maciço, o escutelo, que é inserido no endosperma. O escutelo, como os cotilédones da maioria das monocotiledôneas, atua na absorção das substâncias de reserva do endosperma (Raven e cols., 1992).

### ***1.2- O processo de germinação.***

A germinação é uma sequência de eventos fisiológicos influenciada por fatores externos (ambientais) e internos (dormência, inibidores e promotores da germinação) no 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 para dar origem a uma planta normal, sob condições ambientais favoráveis. A viabilidade e a capacidade de germinar é bastante variável entre as diferentes espécies de sementes, sendo o processo disparado pela entrada de água, além de serem necessários outros fatores ambientais como luz, oxigênio e temperatura (Bewley, 1997).

## ***Introdução***

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. As sementes apresentam enzimas que são ativadas e outras sintetizadas para a digestão e utilização dos nutrientes de reserva acumulados nas células durante o período de formação do embrião. As mesmas células que inicialmente sintetizavam imensas quantidades de reserva, no momento da germinação invertem completamente seus processos metabólicos, passando agora ao processo de degradação (Raven e cols, 1992).

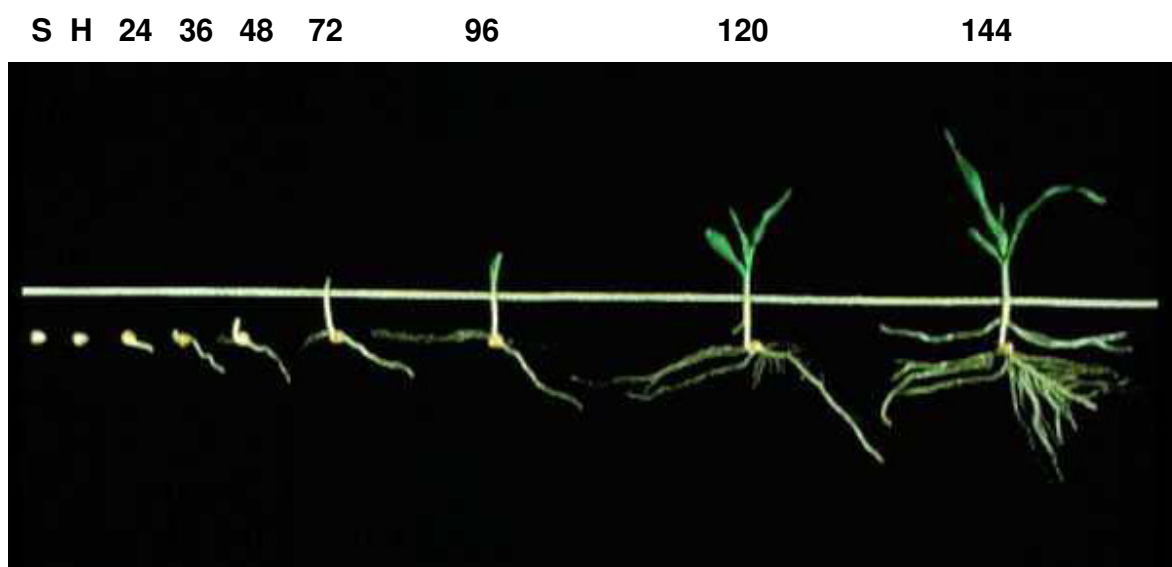
*A germinação se inicia mergulhando a semente seca em água e termina com o início do alongamento pelo eixo embrionário, usualmente a radícula (Bewley, 1997). A entrada de água na semente, processo chamado de embebição, é controlada principalmente pela permeabilidade da casca, disponibilidade de água 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 resultando no fornecimento de energia e nutrientes necessários 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 (Ehrenschaft e Brambl, 1990, Botha e cols., 1992, Salon e cols., 1988).*

A **figura 2** mostra o desenvolvimento da semente de milho desde as sementes secas, passando pelo período de embebição, as primeiras 24 horas de



### ***Introdução***

germinação (onde podemos observar a emergência do eixo embrionário representado pela radícula), seguido dos estágios de 36, 48, 72, 96, 120 e 144 horas de desenvolvimento.



**Figura 2:** Sementes de milho em diferentes estágios de desenvolvimento. Onde S: semente seca; H: semente hidratada; os números apresentados indicam as horas após a embebição.

(retirado de : <http://www.embrapa.br>)

Durante a germinação ocorrem reações catabólicas, como a mobilização e utilização das reservas, já que o embrião em desenvolvimento é totalmente dependente delas até que possua as organelas necessárias para desempenhar a fotossíntese; e reações anabólicas como o desenvolvimento celular e aparecimento de organelas.

## ***Introdução***

Os processos bioquímicos e fisiológicos da germinação das sementes são importantes no estabelecimento da planta em seu meio ambiente. Um aspecto chave nesse processo é a mobilização das reservas: proteínas, carboidratos e lipídios (Wallace e Oaks, 1997).

As proteínas de reserva do milho são um grupo de polipeptídeos solúveis em álcool chamados de zeína (Shewry and Tatham, 1990). Essas proteínas são sintetizadas no endosperma em desenvolvimento, onde elas formam corpúsculos proteicos com o retículo endoplasmático rugoso. Em gel desnaturante na presença de SDS, a zeína apresenta seis polipeptídeos com massas moleculares de 10, 14, 16, 19, 22 e 28 kDa, sendo classificada em quatro tipos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  de acordo com a composição de aminoácidos que apresenta (Shewry and Tatham, 1990). As zeínas compreendem mais da metade do conteúdo de proteínas de reserva das sementes, por isso, são os primeiros determinantes da composição de aminoácidos e do valor nutricional das sementes. Vale ressaltar que existem limitações nutricionais associadas às proteínas de reserva, tanto para as globulinas quanto para as prolaminas, devido à carência ou deficiência em um ou mais aminoácidos necessários à alimentação humana. As prolaminas dos cereais são carentes em lisina, enquanto as globulinas das leguminosas são limitadas em aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína (Larkins e cols., 1993). Uma solução simples empregada na Nutrição foi a utilização na dieta de misturas protéicas envolvendo cereais e leguminosas, tentando resolver desta forma as deficiências isoladas.

## ***Introdução***

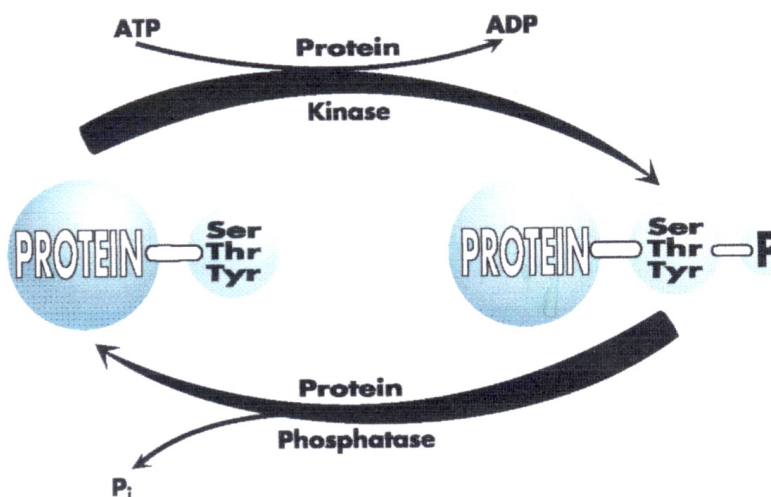
As reservas acumuladas no interior das sementes são responsáveis pela nutrição do embrião durante as suas primeiras fases de desenvolvimento. Essas reservas podem ser encontradas no endosperma no caso das monocotiledôneas (ex. milho) ou nos cotilédones, no caso das dicotilédoneas (ex. feijão). Além das proteínas, as sementes estocam polissacarídeos como o amido e também lipídios (Subbarao e cols., 1998). As proteínas do endosperma sofrem ação de proteases e endopeptidases liberando peptídeos e aminoácidos livres, como já foi demonstrado, por exemplo, em soja (Seo e cols., 2001) e milho (Wallace e Oaks, 1997). As reservas de amido sofrem ação de amilases (Subbarao e cols., 1998) e glicosidasas que estariam envolvidas na quebra dos oligosacarídeos hidrolisados primeiramente pelas amilases (Yamasaki e cols., 1996), enquanto os lipídios, quando na forma de triglicerídeos estocados nos corpúsculos lipídicos, são degradados pela ação de lipases com colaboração de fosfolipases e triacilglicerol lipases (Feussner e cols., 2001).

### ***1.3- Fosforilação e desfosforilação de proteínas.***

O processo de fosforilação e desfosforilação de proteínas tem um papel crucial na regulação de muitos eventos celulares, principalmente nos mecanismos de transdução de sinais e regulação de atividades enzimáticas em plantas e animais (Bose e Taneja, 1998; Zapata, 1998).

## Introdução

O estado de fosforilação das proteínas é regulado pelas atividades opostas de proteínas cinases e fosfatases (**Figura 3**).



**Figura 3:** 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](http://www.calbiochem.com))

A fosforilação de proteínas eucarióticas ocorre predominantemente em resíduos de serina e treonina (97%) e em menor extensão em resíduos de tirosina. Em animais, a fosforilação de proteínas tem um papel bem conhecido em diversos processos celulares como metabolismo de glicogênio, controle do ciclo celular e transdução de sinais (Smith e Walker, 1996).

## ***Introdução***

Frequentemente a ligação de alguma molécula ou hormônio ao seu receptor inicia uma cascata de mudanças celulares que constituem um caminho de transdução de sinal. Em alguns casos a ligação de um hormônio ao seu receptor resulta na formação de um segundo mensageiro intracelular, como o cálcio por exemplo, e o segundo mensageiro então inicia a cascata regulatória. Um componente comum dessa cascata regulatória é a fosforilação de várias proteínas celulares, alterando suas atividades biológicas (Fosket, 1994).

Ultimamente tem se observado um interesse semelhante em analisar o papel da fosforilação de proteínas na regulação celular de plantas e identificar as proteínas cinases e fosfatases que modulam o estado de fosforilação de moléculas alvo como substratos. Um aumento no número de proteínas cinases identificados em plantas tem sido observado nos últimos anos, onde algumas dessas enzimas teriam um papel importante no controle dos mecanismos de defesa das plantas, transdução de sinais e no metabolismo. A exemplo disso, Huber e cols em 1996, mostraram que a enzima chave no metabolismo de sacarose em milho, a sacarose sintase tipo 2, pode ser fosforilada no resíduo serina15 *in vivo*, reação que parece ter uma atividade regulatória significativa, já que as propriedades catalíticas da enzima na forma fosforilada são afetadas. Em feijão, proteínas cinases foram encontradas em tecidos de folha, cotilédone e raiz, com um aumento da atividade enzimática durante o desenvolvimento da semente refletindo em um aumento no número de polipeptídeos fosforilados (Mukhopadhyay e Singh, 1997).

## ***Introdução***

Neste mesmo trabalho, ficou demonstrado o aumento na fosforilação de proteínas do eixo embrionário. Estas cinases utilizam proteínas endógenas ou caseína como substratos e, segundo os autores, a associação destas enzimas com esses tecidos de intenso crescimento e metabolismo, sugere um possível envolvimento da fosforilação de proteínas em diferentes processos regulatórios nas diferentes fases de desenvolvimento da semente e crescimento do embrião (Mukhopadhyay e Singh, 1997).

Em comparação com o sistema animal muito pouco é conhecido sobre proteínas fosfatases de plantas e seu envolvimento no controle dos mecanismos de transdução de sinais e metabolismo (Evans e cols., 1994). Já foi demonstrado que atividades de fosfatases do tipo PP2A estão envolvidas na regulação de várias enzimas em planta como, quinato desidrogenase (Mackintosh e Cohen, 1989), sacarose-fosfato sintase (Huber e cols., 1996) e fosfoenol piruvato carboxilase (Carter e cols., 1990).

Estas enzimas são classificadas em dois grandes grupos baseados na sua especificidade pelo substrato: serina/treonina cinases e serina/treonina fosfatases, que agem em resíduos de serina e treonina; e tirosinas cinases e tirosinas fosfatases, que agem em resíduos de tirosina (Luan, 1998).

**I.4 – 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 e tirosina fosfatases, como mencionado anteriormente.

**I.4.1 – Serina/treonina fosfatases.**

As serina/treonina fosfatases (PPases) catalisam especificamente a desfosforilação 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  $\text{Ca}^{+2}$ /calmodulina dependente e PP2C necessita de  $\text{Mg}^{+2}$  para sua atividade. A maioria das PPases são compostas de mais de uma subunidade catalítica ou regulatória. Enzimas dessa família dividem uma grande similaridade de sequência (exceto PP2C), sendo no entanto significativamente diferentes tirosina fosfatases (Luan, 1998 e Shenolikar, 1994).

## ***Introdução***

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 e cols., 1995).

Estudos bioquímicos e genéticos em plantas mostram o envolvimento das atividades fosfatásicas da PP1 e/ou PP2 em diferentes processos celulares (Smith e Walker, 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 e cols., 1995; 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 nos estômatos, que tem 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. Como exemplo, em extratos de células de cenoura a PP2A se mostrou capaz de inativar a enzima citosólica quinato desidrogenase (Mackintosh e cols., 1991).

Ferreira e cols em 1998 purificaram e caracterizaram quatro isoformas de fosfatases ácidas de sementes de soja, sendo estas capazes de desfosforilar fosfoaminoácidos (fosfoserina e fosfotirosina) e açúcares fosforilados, sugerindo então, uma possível atividade fosfoproteína fosfatase e uma participação desta no



## ***Introdução***

metabolismo de açúcares. Este mesmo grupo, mostrou a atividade dessas isoformas sobre intermediários glicolíticos como substratos, sugerindo que uma das isoformas pode ter um papel importante no metabolismo de carboidrato na semente de soja, hidrolizando preferencialmente fosfoenolpiruvato, enquanto outras duas isoformas poderiam participar na via glicolítica, agindo na glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato (Ferreira e cols., 1999).

### **I.4.2 – Tirosina fosfatases.**

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 tirosina fosfatases (PTPases) dividem um domínio catalítico conservado, que consiste de uma cisteína e uma arginina separadas por cinco aminoácidos (Cx<sub>5</sub>R) – no qual 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 okadáico, por não necessitarem de íons para sua atividade catalítica e pela perda total dessa atividade, quando ocorre uma mutação em seu sítio ativo, na troca da cisteína por uma serina. Todas essas fosfatases parecem preferir peptídeos contendo

## ***Introdução***

fosfotirosina, embora algumas tenham especificidade dupla, também hidrolisando fosfoserina e fosfotreonina (Fauman e Saper, 1996). Com base na função, estrutura e sequência, essas fosfatases podem ser agrupadas em quatro famílias principais: (1) as tirosinas fosfatases específicas, (2) tirosina fosfatases de especificidade dupla e (3) as tirosina fosfatases de baixo peso molecular.

**(1)** Tirosinas fosfatases específicas (PTP): estão envolvidas em uma variedade de mecanismos de sinalização. Nos últimos anos mais de 100 PTPs tem sido sequenciadas em diversos organismos. Todas dividem um domínio catalítico de 230 aminoácidos, dos quais 71 são altamente conservados. Esta família ainda é subdividida em fosfatases do tipo receptores-like que contém um domínio transmembrana e um extracelular, e fosfatases citoplasmáticas não receptores-like que tem associados domínios alvo ou regulatórios, como os domínios SH2 ligadores de fosfotirosina, mediando a sinalização de vários receptores de fator de crescimento ativados (Fordham-Skelton e cols., 1999).

**(2)** As tirosinas fosfatases de especificidade dupla como: VH1 (vírus *vaccinia*) foi a primeira tirosina fosfatase identificada que também hidrolisava fosfoserina e fosfotreonina. A VH1, que desfosforila especificamente uma proteína viral histona-like importante para a encapsulação, é necessária para a replicação de um vírus viável. Uma fosfatase humana homóloga foi descrita, mas não se conhece sua função (Fauman e Saper, 1996).

## **Introdução**

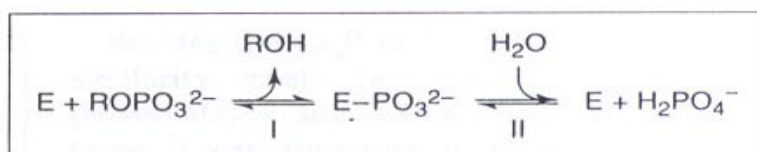
Outra tirosina fosfatase de especificidade dupla, a *cdc25* (cell-division control) foi primeiro identificada na levedura *Schizosaccharomyces pombe*. Na levedura, a *cdc25* desfosforila a tyr15 da *cdc2*, uma cinase dependente de ciclina, componente do fator que promove a maturação, isto é, direciona a célula a entrar em mitose por fosforilação de várias proteínas estruturais e regulatórias (Fauman e Saper, 1996 e Dunphy e Kumagai, 1991). A *cdc25* também é regulada por fosforilação.

**(3)** Tirosina fosfatases de baixo peso molecular: originalmente chamadas de fosfatases ácidas, tem sido encontradas em mamíferos, leveduras e bactérias. Enquanto muitas enzimas das outras famílias possuem domínios regulatórios, as fosfatases de baixo peso molecular parecem ser compostas apenas do domínio catalítico. Nenhuma função biológica específica para elas é conhecida até o momento (Fauman e Saper, 1996).

A estratégia catalítica das tirosina fosfatases utiliza a formação de um intermediário enzimático fosforilado e não requer íons metálicos para sua atividade. Nesta reação ocorre a formação de um intermediário fosforilado com a cisteína do sítio ativo, gerado pelo ataque nucleofílico do tiol da cisteína ao átomo de fósforo do substrato (Denu e cols., 1996).

## Introdução

A reação pode ser representada em dois passos (**Figura 4**): a transferência do fosfato para a enzima acompanhado pela liberação do produto desfosforilado (I) e a hidrólise do intermediário tiol-fosfato (II).



**Figura 4:** Reação de hidrólise catalisada pelas tirosinas fosfatases.

(Retirado de: Fauman e Saper, 1996)

Passo I – transferência do fosfato para a enzima e liberação do produto desfosforilado. Passo II – hidrólise do intermediário tiol-fosfato.

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

**I.4.3 – Fosfatases em sementes.**

Fosfatases ácidas vem sendo descritas durante a germinação de vários tipos de sementes como: escutelo de milho (Rossi e cols., 1981), algodão (Bhargava e Sachar, 1992), tremoços (Zheng e Duranti, 1995; Olczak e cols., 1997), soja (Ullah e Gibson, 1988), entre outras. Em geral essas atividades fosfatásicas aumentam durante a germinação, porém sua função ainda não foi elucidada. Sugere-se a participação desta classe de enzimas na mobilização de reservas de fosfato, sendo essencial para o desenvolvimento da planta (Zheng e Duranti, 1995; Biswas e cols., 1996; Duff e cols., 1994).

## **Introdução**

### **1.5 - Objetivos:**

#### **Gerais:**

Estudar atividade(s) fosfatásica(s) ao longo da germinação de embriões de sementes de milho (*Zea mays*) bem como seu possível envolvimento na germinação da semente.

#### **Específicos:**

- 1- Caracterizar bioquimicamente a(s) atividade(s) fosfatásica(s) com relação ao pH, substrato, efetores e temperatura.
- 2- Analisar a presença de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina.
- 3- Purificar esta(s) enzima(s).
- 4- Localizar *in situ* a(s) atividade(s) fosfatásica(s) e observar seu possível papel na germinação das sementes.

## Material e métodos

### II- MATERIAL E MÉTODOS:

#### II.1- Reagentes.

EDTA, EGTA, padrões de peso molecular para gel de poliacrilamida na presença de SDS, Tris, Glicina, acrilamida, TEMED, DMSO, DTT, p-NPP, Levamizole, Tetramizole, Fosfoserina, Fosfotreonina e Fosfotirosina, Fast Blue BB e  $\alpha$ -naftil fosfato foram obtidos da firma SIGMA FINE CHEMICALS (St. Louis, MO, USA). Orto-vanadato de sódio foi obtido da CALBIOCHEM (L. Jolla, CA, USA). Fluoreto de sódio e tartarato duplo de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  obtidos da Reagen. Anticorpo policlonal contra fosfotirosina foi proveniente da Santa Cruz Biotechnology. Etanol e metanol da firma MERCK. Os demais reagentes utilizados foram de pureza analítica.

## **II.2- Sementes.**

As sementes de milho (*Zea mays* L.) linhagem Pé de Boi (BR-106) – Santa Helena Sementes LTDA – foram lavadas com água sanitária, até que todo o fungicida fosse retirado e lavadas várias vezes com água corrente. Em seguida foram submetidas ao processo de embebição, que consiste na imersão em água destilada para hidratação por um período de 24 horas.

## **II.3- Coleta dos embriões das sementes.**

Após o período de hidratação as sementes foram colocadas para germinar em um recipiente forrado com algodão umedecido em água e papel de filtro, onde foram dispostas na ausência de luz por 24 horas.

Em intervalos de tempo determinados (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas de germinação), os embriões foram coletados com auxílio de pinça e congelados. Para cada ensaio experimental, estes embriões eram descongelados e homogeneizados em tampão apropriado conforme descrito posteriormente.



#### **II.4- Dosagem de proteínas.**

As dosagens de proteínas foram realizadas seguindo-se o protocolo descrito por Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina 0.1g% como padrão.

#### **II.5- Determinação do pH ótimo da atividade fosfatásica de embriões de sementes de milho com 24 horas de germinação.**

O pH ótimo da atividade fosfatásica foi determinado com o uso de homogeneizados totais de embriões coletados com 24 horas de germinação. Após homogeneização em tampão 0.1 M acetato pH 5,0, foram centrifugados por 5 minutos a 12000 g. Os diferentes pHs, foram ajustados utilizando uma mistura de tampões contendo acetato de sódio, citrato de sódio, tris e glicina, todos numa concentração de 0.1 M variando de 3,0 até 8,5 ajustados com HCl ou NaOH. Os ensaios foram realizados em placas de ELISA de 96 poços à 37 °C por 60 minutos utilizando 0.002 mg proteína total e 2 mM de *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP). A reação foi paralisada com a adição de 1:10 volumes de 1 N NaOH e a liberação do *p*-nitrofenol (*p*-NP) foi monitorada pela absorbância a 405 nm em um leitor de ELISA (Thermomax Machine, Molecular Devices).

## ***Material e métodos***

A atividade enzimática está expressa como quantidade de pNP liberado x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>, utilizando o coeficiente de extinção molar para o íon *p*-nitrofenolato (1.75x10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) a fim de determinar a atividade enzimática específica (Sheng e Charbonneau, 1993).

### **II.6- Medida de Atividade pNPPásica ao longo da germinação.**

Os embriões coletados nos diferentes horários previamente descritos foram descongelados e homogeneizados em tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5,0, centrifugados por 5 minutos a 12000 g e os sobrenadantes coletados e utilizados como fonte de enzima. Os ensaios foram realizados à 37 °C por 60 minutos utilizando o tampão acima descrito na presença de 2 mM pNPP. Após 60 minutos a reação foi paralisada com a adição de 1:10 volumes de 1 N NaOH e a placa de ELISA submetida a leitura no leitor Thermomax. A atividade enzimática está expressa como quantidade de pNP liberado x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>.

### **II.7- Análise cinética da fosfatase ácida.**

Embriões de 24 horas de germinação foram descongelados, homogeneizados em tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5,0, centrifugados por 5 minutos a 12000g e os sobrenadantes coletados e utilizados como fonte de

## ***Material e métodos***

enzima. Para a determinação da curva de concentração de pNPP e o curso temporal, os meios reacionais continham em média 0.002 mg de proteína total. Diferentes concentrações de pNPP (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 mM) foram utilizadas e a reação foi paralisada após 60 minutos. Para o curso temporal foram utilizados diferentes tempos de reação (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos) e 2 mM pNPP. Tanto para o experimento de curva de concentração de pNPP quanto para o curso temporal, as reações foram paralisadas com 1 N NaOH e as placas de ELISA foram submetidas à leitura no Thermomax. A atividade enzimática está expressa como quantidade de pNP liberado x mg ptn<sup>-1</sup>x min<sup>-1</sup> para a curva de concentração de pNPP e quantidade de pNP liberado x mg ptn<sup>-1</sup> para o curso temporal.

### **II.8- Medida da atividade pNPPásica na presença de cloreto de sódio.**

Embriões de 24 horas de germinação foram homogeneizados em tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5,0 e centrifugados por 5 minutos a 12000g e os sobrenadantes coletados e utilizados como fonte de enzima. O homogenato total teve sua atividade medida na presença de concentrações crescentes de NaCl (0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 mM).

### ***Material e métodos***

A reação foi iniciada com a adição de 2 mM pNPP e após 60 minutos a reação foi paralisada com 1 N NaOH. A atividade enzimática está expressa como quantidade de pNP liberado  $\times$  mg ptn<sup>-1</sup>  $\times$  min<sup>-1</sup>.

#### **II.9- Efeito de efetores de fosfatases na atividade pNPPásica.**

A fim de obtermos uma caracterização bioquímica da atividade pNPPásica utilizamos homogenato de embriões de 24 horas de germinação em tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5,0, 2 mM pNPP e 0.002 mg proteína total. Os efetores utilizados foram: Fluoreto de sódio (0.5, 1, 5 e 10 mM), tartarato duplo de Na<sup>+1</sup>/K<sup>+1</sup> (0.1, 1, 5 e 10 mM), levamizole (1 e 10 mM), tetramizole (1 e 10 mM), Pi (1, 5, 10 e 30 mM), o-vanadato de sódio (0.5, 1 e 2 mM), EDTA (1, 5, 7 mM), EGTA (1, 5, 7 mM), CaCl<sub>2</sub> (1, 3, 5, 10 mM), MgCl<sub>2</sub> (1, 3, 5, 10 mM), MnCl<sub>2</sub> (1, 3, 5, 10 mM), ZnCl<sub>2</sub> (0.01, 0,05, 0.1, 0.3, 1 mM) . Após incubação a 37 °C por 60 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 1:10 volumes de NaOH 1 N e a placa foi submetida a leitura em um leitor de ELISA a 405 nm. A atividade enzimática está expressa como quantidade de pNP liberado  $\times$  mg ptn<sup>-1</sup>  $\times$  min<sup>-1</sup>.

## ***Material e métodos***

### **II.10- Ensaio de inativação térmica da fosfatase.**

Para o ensaio de inativação por desnaturação térmica, o homogenato total de embriões de 24 horas de germinação (0.002 mg de proteína total) foi pré-incubado a 0, 28, 37, 56 e 80 °C em tempos determinados (0, 15, 30, 45 e 60 minutos). Após os 60 minutos de pré-incubação, todos foram ensaiados para atividade pNPPásica em tempo fixo de 60 minutos a 37 °C e 2 mM de substrato. As reações foram paralisadas com 1N NaOH e submetidas a leitura a 405 nm. A atividade enzimática está expressa como quantidade de pNP liberado  $\times \text{mg ptn}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ .

### **II.11- Atividade fosfatásica contra outros substratos.**

Embriões com 24 horas de germinação foram homogeneizados em tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5.0, centrifugados por 5 minutos a 12000g. O sobrenadante coletado foi utilizado para a medida da atividade fosfatásica contra os seguintes substratos: 2 mM fosfotreonina, 2 mM fosfoserina, 1 mM fosfotirosina e 2 mM pNPP. Após 60 minutos a 37 °C a reação foi paralisada com a adição do reagente de Fiske e a quantidade de fosfato produzida foi determinada pelo método de Fiske e Subbarow (1925) utilizando uma curva padrão de fosfato. A atividade está expressa como  $\text{nmol Pi} \times \text{mg ptn}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ .

## **Material e métodos**

### **II.12- Determinação do Ki.**

Para determinar o  $K_i$  aparente dos seguintes inibidores: NaF (0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.07, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5 mM), o-vanadato de sódio (0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.07, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5 mM) e molibdato de amônio (0.01, 0.05, 0.07, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5  $\mu$ M), homogenato total de embriões de 24 horas de germinação tiveram sua atividade pNPPásica medida na presença desses inibidores, nas concentrações acima descritas. A reação foi realizada utilizando-se 2 mM pNPP e 0.002 mg proteína total por 60 minutos a 37 °C. A reação foi paralisada com 1 N NaOH e submetida a leitura no leitor Thermomax. A atividade está expressa em nmol pNP liberado x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>.

### **II.13- Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).**

As eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de SDS foram realizadas empregando o sistema descrito por Laemmli (1970). Foram utilizados géis contendo 10% de acrilamida e nas corridas foram utilizadas correntes de 20 mA.

## ***Material e métodos***

Após as corridas os géis foram corados por prata (Bose and Taneja, 1998) ou com 0.03 % (p/v) Coomassie Brilliant Blue R, 46% metanol (v/v) e 9 % (v/v) ácido acético por 30 minutos e descorados com uma solução de 5 % (v/v) de metanol e 7.5 % (v/v) ácido acético.

### **II.14- “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 e cols., 1979) utilizando-se o sistema de transferência da Bio-Rad. A eficiência da 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 do Ponceau, 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 18 horas, o tampão de bloqueio foi desprezado e a membrana incubada com anticorpo policlonal para fosfotirosina numa diluição de 1:1000 por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a

membrana era lavada 3x com TBS-Tween-Albumina e incubada por 1 hora à temperatura ambiente com anti-IgG coelho conjugada com peroxidase diluída

#### ***Material e métodos***

1:8000 na solução de bloqueio. A membrana foi então lavada 3x por 5 minutos com TBS-Tween-Albumina, 2x com TBS-Tween e 1x 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 as proteínas em filmes autoradiográficos. O filme Kodak X-OMAT foi exposto por 90 segundos, revelado e fixado adequadamente em câmara escura.

### **II.15- Purificação da fosfatase ácida presente nos embriões de sementes de milho.**

#### **II.15.1- Precipitação com Sulfato de Amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).**

Os embriões de 24 horas de germinação foram descongelados, homogeneizados em tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5,0 contendo os seguintes inibidores de proteases: SBTI (1mg/ml) + Benzamidina (2 mM) e centrifugados a 8000 rev/min por 20 minutos. O sobrenadante foi tratado com sulfato de amônio sob agitação no gelo, para saturação a 50% e centrifugado por 30 minutos a 8000



rpm. O precipitado obtido foi ressuspenso em tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5,0. O sobrenadante foi ajustado para 70% de saturação com sulfato de amônio e

#### ***Material e métodos***

centrifugado por 30 minutos a 8000 rpm. O mesmo foi feito para saturação a 90%. Cada precipitado obtido teve sua atividade pNPPásica ensaiada na presença de tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5,0 , 2 mM pNPP e 0.002 -0.004 mg de proteína de cada precipitado por 60 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 1 N NaOH e submetida a leitura à 405 nm. A atividade enzimática está expressa como quantidade de pNP liberado  $\times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ .

#### **II.15.2- Cromatografia em coluna de afinidade do tipo Concanavalina A Sepharose.**

Os precipitados de 50 % e 70% foram agrupados e dialisados por 18 h contra tampão 0.1 M acetato pH 5,0 com 2 trocas de 1L à 4 °C. Em seguida foram concentrados em speed vac e posteriormente aplicados em uma coluna de afinidade do tipo Concanavalina A Sepharose (Pharmacia). A coluna foi previamente equilibrada com tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5,8 contendo 0.25 mM NaCl, 0.02 mM  $\text{MnCl}_2$  e 0.02 mM  $\text{CaCl}_2$  . A amostra dialisada e concentrada foi aplicada na coluna, onde permaneceu à 4 °C por 18 horas. Após esse período, para remover as proteínas não ligadas, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio até que a leitura da absorbância a 280 nm chegasse próximo de zero. A fosfatase foi eluída da coluna pelo tampão de equilíbrio contendo 0.2 M

$\alpha$ -metil manopiranosídeo e 0.2 M glicose, frações de 1ml foram coletadas. As frações com atividade foram agrupadas e dialisadas por 18 horas contra água.

#### ***Material e métodos***

#### **II.15.3- Cromatografia em coluna de filtração em gel Superose 6-HR acoplada ao sistema de HPLC.**

As frações eluídas da Concanavalina A Sepharose foram dialisadas contra água por 18 horas com 2 trocas de 1 L, concentradas em speed vac, e em seguida foram aplicadas na coluna Superose 6-HR acoplada a um aparelho de HPLC, equilibrada em tampão 0.1 M acetato pH 6,0 contendo 0.15 M NaCl. A eluição da amostra foi realizada com o mesmo tampão de equilíbrio e as frações coletadas (500  $\mu$ l) no fluxo de 0.5 ml/min foram monitoradas por sua absorção a 280 nm e ensaiadas (5 $\mu$ l de cada fração) para atividade fosfatásica, utilizando pNPP como substrato como descrito anteriormente. A massa molecular da enzima foi determinada utilizando-se padrões de peso eluídos na mesma coluna com as mesmas condições, a saber: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalase (232 kDa), albumina (67 kDa) e ovoalbumina (43 kDa).

#### **II.16- Localização da atividade fosfatásica *in situ*.**

Os estudos histoquímicos do conteúdo citoplasmático do embrião após 24 horas de germinação foram realizados em cortes a fresco. As amostras foram montadas em Tissue – Tek (O.C.T. Compound) formando um bloco. Os cortes

foram realizados no criostato (IEC CTF Microtomo- Cryostat) à temperatura de -30 °C em secções entre 12-16 µm de espessura (Flores e cols,2001).

### ***Material e métodos***

Para localização da atividade fosfatásica foi utilizado um protocolo descrito para atividade em gel de poliacrilamida (Bhargava e Sachar, 1987). Os cortes foram incubados por 60 minutos a 37 °C em três condições diferentes: (1) em tampão 0.1 M Tris-HCl pH 6.0 1mg/ml Fast Blue BB, (2) tampão 0.1 M Tris-HCl pH 6.0, 1mg/ml Fast Blue BB, 0.1M  $\alpha$ -naftil fosfato, (3) tampão 0.1 M Tris-HCl pH 6.0, 1mg/ml Fast Blue BB, 0.1M  $\alpha$ -naftil fosfato e coquetel de inibidores de fosfatases contendo 0.1 mM molibdato de amônio, 0.1 mM vanadato de sódio, 1 mM fluoreto de sódio. Após o tempo de reação as lâminas foram lavadas com tampão 0.1 M Tris-HCl pH 6.0 e em seguida fotografadas com uma câmera acoplada a um microscópio óptico com um aumento de 40 X.

### **II.17 – Efeito de inibidores de fosfatases no processo de germinação.**

Sementes secas de milho foram lavadas com água sanitária, até que todo o fungicida fosse retirado e lavadas várias vezes com água corrente. Em seguida foram submetidas ao processo de embebição na presença de inibidores de tirosinas fosfatases: 1mM orto-vanadato de sódio e 1 mM molibdato de amônio. Após 24 horas de embebição, as sementes foram colocadas para germinar na

ausência desses inibidores e os embriões foram coletados nos horários determinados. Esses embriões tiveram seus tamanhos determinados através de uma régua graduada em milímetros.

**II.18 – Densitometria.**

A análise densitométrica foi realizada no filme X-OMAT revelado por ECL conforme descrito na seção western blotting. O filme foi submetido a densitometria utilizando um scanner acoplado a um Programa Imagemaster TOLLAB da Amersham Pharmacia. A porcentagem de desfosforilação do polipeptídeo de 14 kDa, principal alvo da desfosforilação, foi analisada.

### **III – RESULTADOS:**

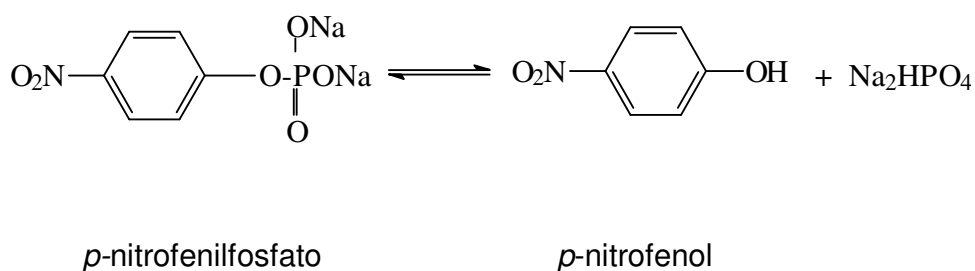
#### ***III.1 –PARTE I: Identificação e Caracterização de uma atividade fosfatásica presente em embriões de sementes de milho (Zea mays).***

Como já foi demonstrado em alguns trabalhos utilizando diferentes sementes, a atividade fosfatásica aumenta ao longo da germinação. Desta forma, resolvemos estudar a presença de atividade(s) fosfatásica(s) na germinação do embrião da semente de milho, local de intensa atividade metabólica.

Para estimar as variações da quantidade de proteína durante as 24 horas de germinação, embriões de vários horários foram homogeneizados em 1 ml e centrifugados. Esses homogeneizados tiveram seus sobrenadantes coletados e denominados homogenatos totais. Como podemos observar na **figura 5**, logo após o período de embebição o conteúdo de proteínas fica em torno de 0.5 mg/ml e após 21 horas de germinação o conteúdo proteico se apresenta em torno de 0.85 mg/ml, com variações ao longo desse período. A **figura 6** mostra o perfil eletroforético dos homogenatos totais ao longo das 24 horas de germinação. Como podemos observar nesta figura, o perfil de proteínas parece sofrer algumas alterações durante as primeiras 24 horas de germinação.

## Resultados

Em seguida fomos observar a atividade fosfatásica ao longo das 24 horas de germinação dos embriões de sementes de milho. Utilizamos para o ensaio o substrato sintético *p*-nitrofenilfosfato (pNPP). A hidrólise do fosfato do pNPP gera *p*-nitrofenol (pNP), uma substância de coloração amarelada em meio alcalino que pode ser quantificada através de sua absorvância a 405 nm. Para calcularmos a atividade enzimática, utilizamos o coeficiente de extinção molar do pNPP. A reação de hidrólise do pNPP está demonstrada a seguir:



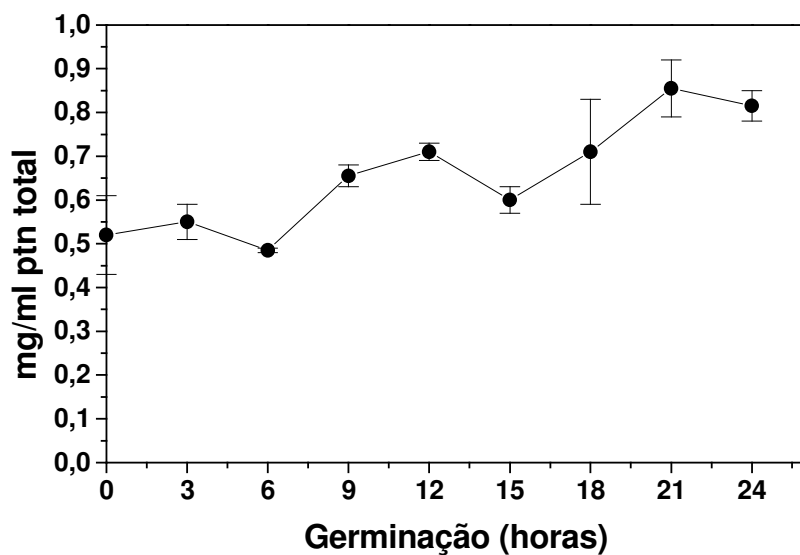
A **figura 7** mostra que os homogenatos totais dos diferentes horários de germinação, quando incubados em pH ácido são capazes de hidrolisar pNPP. Observamos que a hidrólise do pNPP vai aumentando com a germinação. O aumento total na atividade pNPPásica foi de cerca de 6 vezes após 24 horas de germinação em relação à atividade na semente hidratada (0 horas). A partir daí utilizamos o homogenato de embriões com 24 horas de germinação para caracterização cinética dessa atividade.

## **Resultados**

Experimentos para determinação de pH ótimo e características cinéticas como: curva de concentração de pNPP e curso temporal foram então realizados. O conjunto inicial dos dados nos mostra que o pH ótimo para as atividades enzimáticas está em torno de 4,5 – 5,5 (**figura 8**), e que neste sistema também encontramos atividade pNPPásica em pHs mais alcalinos como 7,0 e 7,5. Quanto as características cinéticas, podemos concluir que a reação é saturável a partir de 2 – 3 mM quando utilizamos pNPP como substrato e se apresenta linear até 60 minutos conforme demonstrato na **figura 9 A e B**.

Diferentes concentrações de cloreto de sódio foram adicionadas e a atividade pNPPásica ensaiada. Como podemos observar na **figura 10**, o aumento da força iônica não altera a atividade fosfatásica desses homogenatos totais.



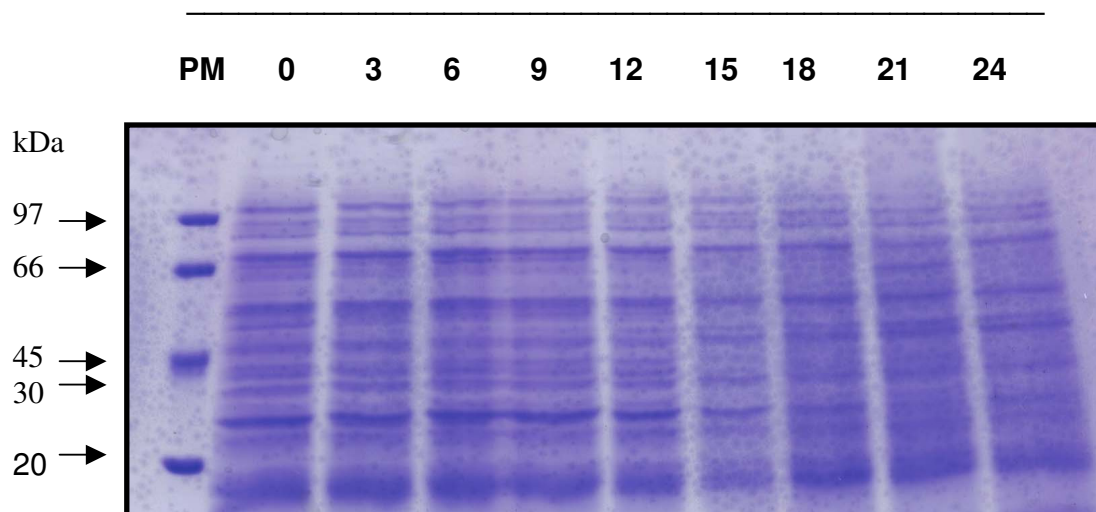


**Figura 5: Dosagem de proteína total ao longo de 24 horas de germinação de embriões de sementes de milho.**

Homogenatos totais de embriões de sementes de milho foram obtidos utilizando embriões homogeneizados em 1 ml de tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5,0. A dosagem foi realizada utilizando-se o método descrito por Bradford (1976) e albumina sérica bovina 0.1g% como padrão. O resultado representa a média  $\pm$  EP de três experimentos feitos em triplicata, com diferentes homogenatos.

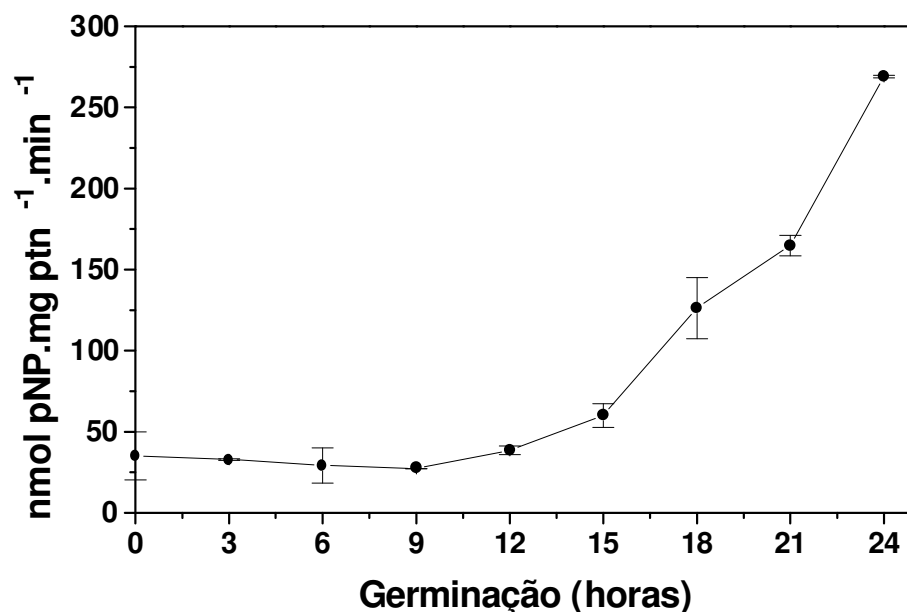
## Resultados

### Germinação



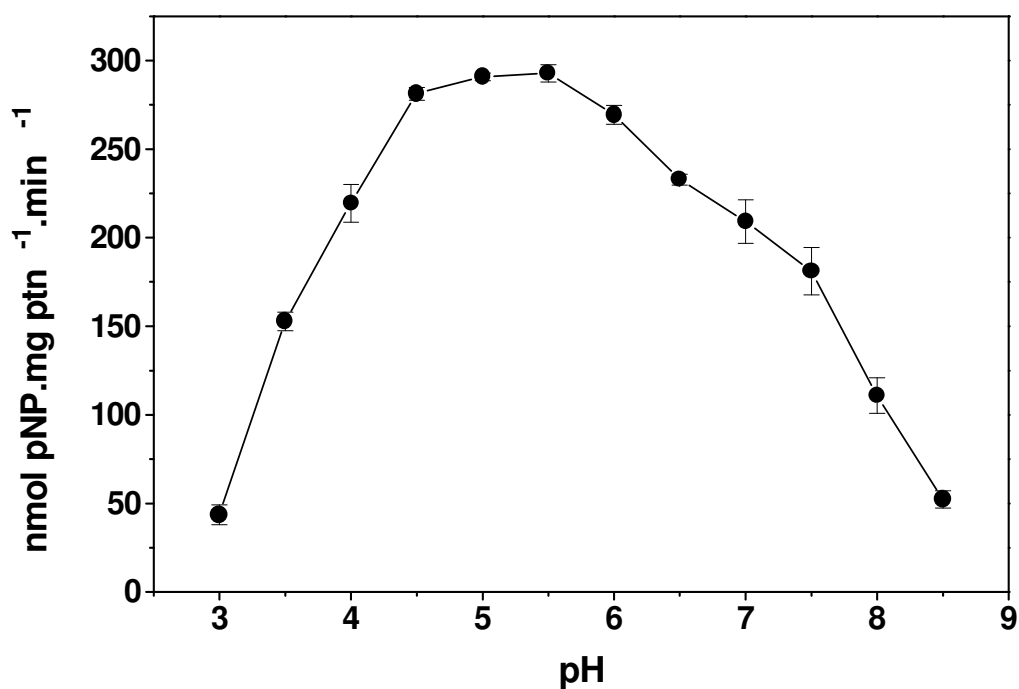
**Figura 6: Perfil eletroforético dos homogenatos totais ao longo de 24 horas de germinação.**

0.04 mg de homogenatos totais de embriões em diferentes horários ao longo de 24 horas de germinação (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas) foram adicionados de tampão de amostra com SDS e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (10%). Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie Blue e descorado. Os padrões de peso molecular utilizados foram: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e inibidor de tripsina (20 kDa).



**Figura 7: Atividade fosfatásica ácida em embriões de sementes de milho ao longo de 24 horas de germinação.**

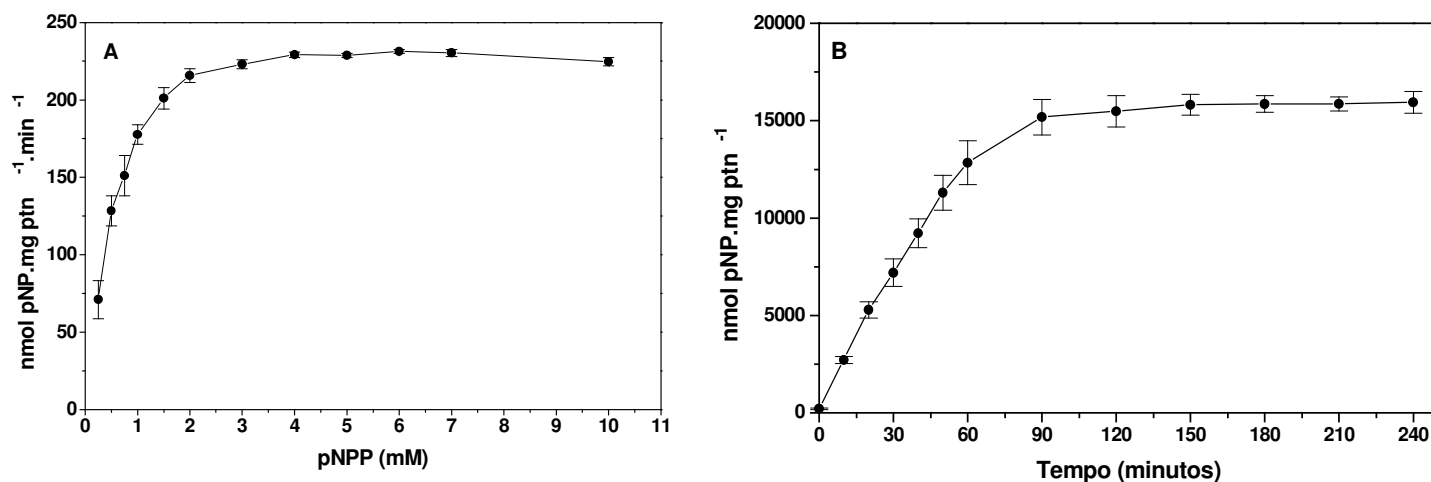
Homogenatos totais de embriões em tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5,0 foram ensaiados para atividade fosfatásica, utilizando 2 mM de p- nitrofenilfosfato como substrato sintético e 60 minutos de reação a 37 °C. A reação foi paralisada com adição de 1:10 volumes de 1 N NaOH e o p-nitrofenol livre foi determinado a 405 nm. Os resultados estão expressos em nmol pNP. mg ptn<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> e representa a média ± EP de três experimentos feitos em triplicata, com diferentes homogenatos.



**Figura 8: Curva de pH na atividade pNPÁsica.**

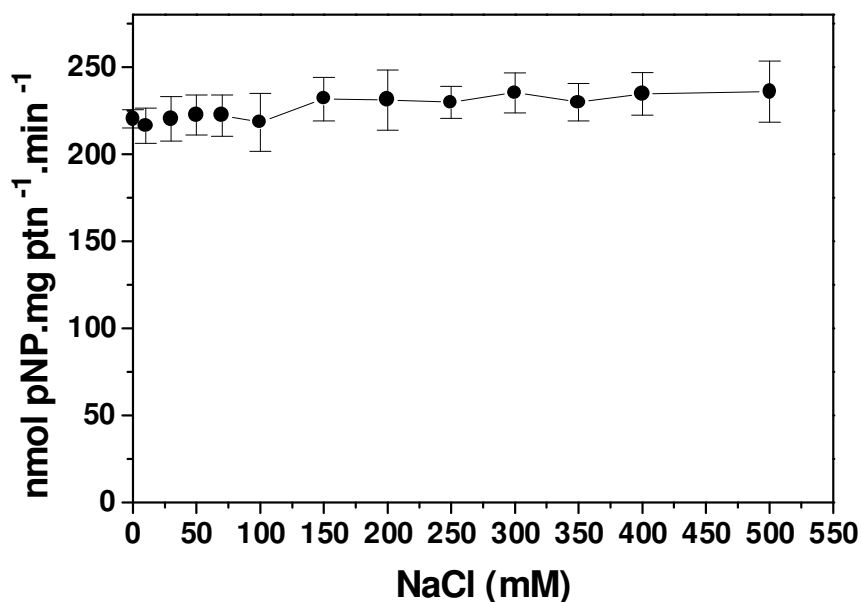
Embrões com 24 horas de germinação foram homogeneizados em tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5,0. A atividade pNPÁsica foi ensaiada em uma mistura de tampões: acetato de sódio, citrato de sódio, glicina e tris, todos 0.1 M com pHs variando de 3.0 a 8.5. A hidrólise de pNPP ocorreu em um meio reacional contendo 0.002 mg de proteína total em diferentes pHs e 2 mM pNPP. Após 60 minutos a 37 °C, as reações foram paralisadas com 1:10 volumes de 1 N NaOH. Os resultados estão expressos em nmol pNP. mg ptn<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> e a média ± EP de três experimentos feitos em triplicata, com diferentes homogenatos.

## Resultados



**Figura 9: Análises cinéticas da atividade fosfatásica ácida.**

Embriões de 24 horas de germinação foram homogeneizados em tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5.0. Para determinar a curva de concentração de pNPP (painel A) e o curso temporal (painel B) da hidrólise de pNPP, o meio continha 0.002 mg de proteína total. Diferentes concentrações de pNPP (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 mM) foram utilizadas e após 60 minutos a 37 °C, as reações foram paralisadas com 1:10 volumes de 1 N NaOH. O curso temporal foi determinado utilizando-se diferentes tempos (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos), 2 mM pNPP e as reações foram paralisadas como descrito acima. O resultado representa a média  $\pm$  EP de três experimentos feitos em triplicata, com diferentes homogenatos.



**Figura 10: Atividade fosfatásica na presença de Cloreto de sódio.**

Embriões de 24 horas de germinação foram homogeneizados em tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5.0. A atividade pNPPásica foi ensaiada na presença de concentrações crescentes de NaCl (0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 mM). A reação foi iniciada com a adição de 2 mM pNPP e após 60 minutos a reação foi paralisada com 1 N NaOH. A atividade enzimática está expressa como quantidade de pNP liberado x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>. O resultado representa a média ± EP de três experimentos feitos em triplicata, com diferentes homogenatos.

## **Resultados**

Em seguida, estudamos o efeito de inibidores clássicos de fosfatases na atividade pNPPásica, conforme demonstrado na **tabela I**. A hidrólise do pNPP é fortemente inibida por 0.5 mM de fluoreto de sódio, 0.5 mM de orto vanadato de sódio e 0.1 mM de molibdato de amônio. Este resultado sugere que tal enzima seja uma fosfatase ácida com atividade do tipo tirosina fosfatase.

Quando utilizamos moduladores da atividade de serina/treonina fosfatase e fosfatases alcalinas como: ácido ocadáico, levamisole, tetramizole e citrato de sódio não observamos modificação significativa na atividade. O agente redutor DTT não foi capaz de alterar a atividade, e o Pi, produto final da hidrólise enzimática, na concentração de 30 mM inibiu cerca de 20% a atividade. Quando utilizamos sulfato de cobre, um metal que causa inativação de tirosinas fosfatases por oxidação reversível em seu sítio ativo em concentrações milimolares, este também foi capaz de inibir a atividade em cerca de 35% e sulfato de zinco, um conhecido inibidor de tirosina fosfatases foi capaz de inibir a atividade da enzima em 50 % quando utilizamos a concentração de 1 mM. Esses resultados sugerem que a principal atividade fosfatásica ácida presente em embriões de sementes de milho com 24 horas de germinação seja do tipo tirosina fosfatase.

Tirosinas fosfatases são enzimas cuja atividade não requer a presença de íons metálicos. Utilizamos cálcio, magnésio e manganês na atividade pNPPásica de homogenatos de embriões de milho. Podemos observar na **tabela II**, que a enzima não necessita de íons para a sua atividade pNPPásica e sua atividade também não é alterada por quelantes de cálcio como EDTA e EGTA.

## **Resultados**

A **figura 11** mostra a determinação do  $K_i$  aparente dos efetores que causaram maior inibição na atividade pNPPásica. Os  $K_i$ s obtidos foram 0.025 mM vanadato de sódio, 0.075  $\mu$ M molibdato de amônio e 0.022 mM NaF.

Realizamos também um curso temporal de inativação térmica nesses homogenatos em diferentes temperaturas (**figura 12**). Este dado sugere a ocorrência de uma única atividade fosfatásica capaz de hidrolisar pNPP com atividade máxima em 37 °C. A **tabela III** mostra a atividade fosfatásica contra fosfoaminoácidos como: fosfoserina, fosfotreonina e fosfotirosina, além do pNPP. Como podemos observar, a enzima teve maior eficiência em desfosforilar fosfotirosina, visto que sua atividade foi quase duas vezes maior em relação a fosfoserina e fosfotreonina com apenas metade da concentração final de substrato utilizada para estes, que foi de 2 mM.

O conjunto dos dados apresentados até o momento nos sugere que a fosfatase ácida presente nos embriões de sementes de milho com 24 horas de germinação, apresenta uma atividade do tipo tirosina fosfatase. Por conta disso, fomos analisar a presença de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina através de western blotting com o uso de anticorpo anti fosfotirosina. Para tal, 0.04 mg proteína de homogenatos totais de embriões em diferentes horários de germinação foram submetidos à eletroforese em condições desnaturantes. Após transferência para membrana de nitrocelulose, o material foi bloqueado, incubado com anticorpo anti fosfotirosina e revelado por ECL (**figura 13 A**). Podemos observar que o anticorpo anti fosfotirosina reage com algumas proteínas, principalmente com um polipeptídeo de cerca de 14 kDa, que tem o seu nível de



## ***Resultados***

fosforilação diminuído ao longo das 24 horas de germinação, como pode ser observado por densitometria (**figura 13 B**).

## Resultados

**Tabela I: Efeito de moduladores na fosfatase ácida de embriões de sementes de milho.**

Efetores	nmol pNP.mg ptn <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	% inibição
<b>Controle</b>	221.16 ± 11.14	0
<b>NaF</b>		
0.5 mM	23.06 ± 4.12	89.6
1 mM	18.90 ± 2.51	91.6
5 mM	10.73 ± 1.44	95.1
10 mM	9.43 ± 1.84	95.7
<b>Tartarato</b>		
0.5 mM	203.5 ± 13.8	8
1 mM	214.63 ± 10.13	3
5 mM	218.36 ± 10.62	1.3
10 mM	222.66 ± 11.98	-
<b>Levamisole</b>		
1 mM	220.2 ± 13.30	-
10 mM	216.96 ± 11.20	2.0
<b>Tetramisole</b>		
1 mM	215.73 ± 12.60	2.4
10 mM	218.06 ± 9.81	1.4
<b>DTT</b>		
1 mM	233.85 ± 11.25	-
10 mM	232.55 ± 5.95	-
<b>Pi</b>		
1 mM	228.3 ± 1.00	-
5 mM	218.95 ± 7.65	1.0
10 mM	215.95 ± 10.65	2.3
30 mM	169.00 ± 5.00	23.6
<b>Vandato de sódio</b>		
0.5 mM	88.83 ± 17.42	60
1 mM	56.73 ± 14.34	74.3
2 mM	35.8 ± 9.75	83.9
<b>Molibdato de amônio</b>		
0.1 mM	19.60 ± 4.21	91.1
<b>Citrato</b>		
5 mM	239.50 ± 4.90	-
<b>CuSO<sub>4</sub></b>		
1 mM	144.8 ± 3.20	34.5

<b>Sulfato de zinco</b>		
0.01 mM	239.55 ± 6.25	-
0.05 mM	231.65 ± 12.75	-
0.1 mM	213.30 ± 9.60	3.5
0.3 mM	129.50 ± 12.10	41.6
1 mM	99.95 ± 9.05	54.8
<b>Ácido ocaidaico</b>		
10 nM	215.75 ± 19.55	2.4

Homogenizados de 24 horas de germinação foram ensaiados na presença de diversos efetores de fosfatases utilizando pNPP como substrato sintético conforme descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos em nmol pNP. mg ptn<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> e representa a média ± EP de três experimentos feitos em triplicata, com diferentes homogenatos.

## ***Resultados***

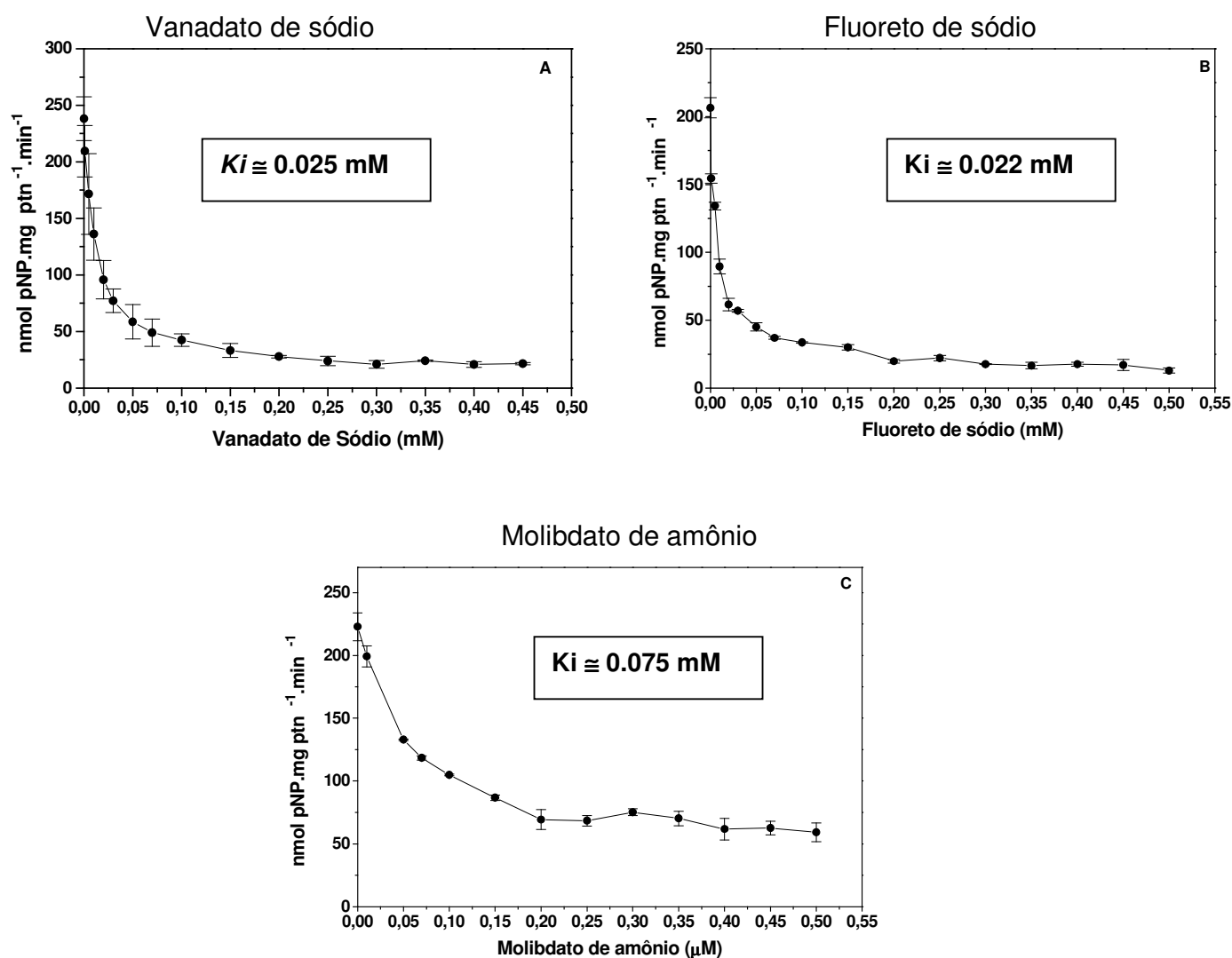
### **Tabela II**

**Efeito de íons e quelantes na fosfatase ácida de embriões de sementes de milho.**

<b>Moduladores</b>	<b>nmol pNP.mg ptn<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup></b>
<b>Controle</b>	242.16 ± 4.19
<b>Cálcio</b> 1 mM 3 mM 5mM 10 mM	242.3 ± 6.3 242.62 ± 5.29 241.96 ± 6.63 234.29 ± 3.04
<b>Magnésio</b> 1 mM 3 mM 5mM 10 mM	240 ± 2.86 241.23 ± 2.57 244.43 ± 10.43 240.28 ± 7.62
<b>Manganês</b> 1 mM 3 mM 5mM 10 mM	222.89 ± 14.5 234.86 ± 3.5 231.01 ± 2.98 232.23 ± 0.42
<b>EDTA</b> 1 mM 5mM 7 mM	237.54 ± 6.21 229.99 ± 3.33 231.22 ± 13.22
<b>EGTA</b> 1 mM 5mM 7 mM	242.98 ± 6.32 234.13 ± 6.13 239.01 ± 11.68

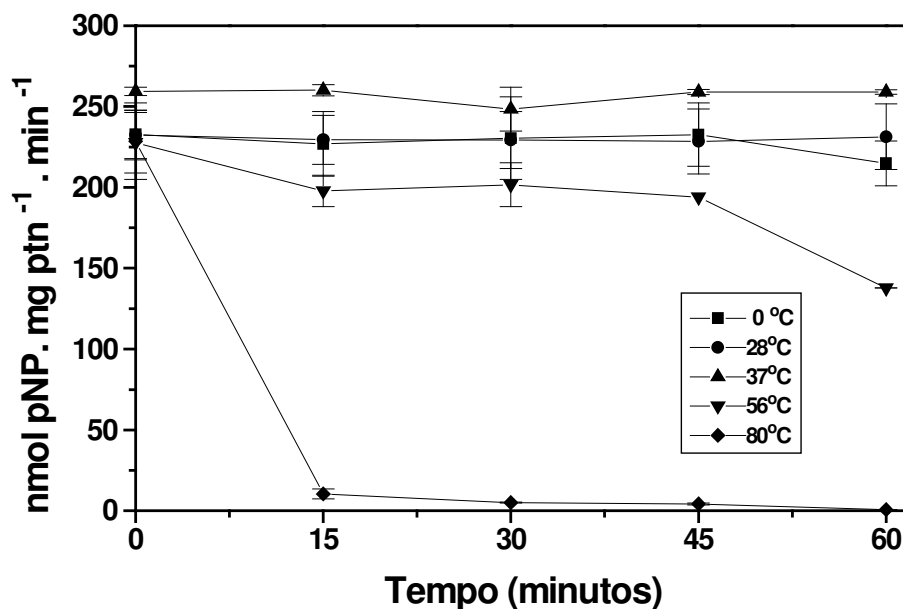
Homogenatos de 24 horas de germinação foram ensaiados na presença de íons, utilizando pNPP como substrato sintético conforme descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos em nmol pNP. mg ptn<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> e representa a média ± EP de três experimentos feitos em triplicata, com diferentes homogenatos

## Resultados



**Figura 11: Determinação do  $K_i$  aparente dos diferentes inibidores.**

A atividade pNPPásica foi ensaiada na presença de concentrações variadas dos seguintes inibidores: vanadato de sódio (A), fluoreto de sódio (B) e molibdato de amônio (C). Utilizou-se 2 mM de substrato. Após 60 minutos a 37 °C a reação foi paralisada com 1:10 volumes 1 N NaOH e submetida a leitura à 405 nm. A atividade foi expressa em  $\text{nmol pNP.mg ptn}^{-1}.\text{min}^{-1}$  e representa a média  $\pm$  EP de três experimentos feitos em triplicata, com diferentes homogenatos.



**Figura 12: Inativação térmica da atividade pNPPásica.**

Homogenato total de embrião de sementes de milho com 24 horas de germinação foi pré-incubado a 0, 28, 37, 56 e 80 °C em tempos determinados (0, 15, 30, 45 e 60 minutos). Após os 60 minutos de pré-incubação, todos foram ensaiados para atividade pNPPásica em tempo fixo de 60 minutos a 37 °C na presença de 2 mM de substrato. As reações foram paralisadas com 1:10 volumes de 1N NaOH e submetidas a leitura a 405 nm. A atividade enzimática está expressa como quantidade de pNP liberado . mg ptn<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> e é média ± EP de dois experimentos feitos em triplicata, com diferentes homogenatos.

**Tabela III**

**Atividade fosfatásica em embriões de sementes de milho com o uso de fosfoaminoácidos.**

<b>substrato</b>	<b>atividade</b> (nmol Pi . mg ptn <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> )
pNPP (2 mM)	402.93 ± 9.75
fosfotreonina (2 mM)	185.74 ± 1.53
fosfoserina (2 mM)	169.20 ± 9.12
fosfotirosina (1 mM)	289.32 ± 5.44

Homogenatos de 24 horas de germinação foram ensaiados na presença dos fosfoaminoácidos e pNPP como substrato conforme descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos em nmol pNP. mg ptn<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>e representa a média ± EP de três experimentos feitos em triplicata, com diferentes homogenatos

## ***Resultados***



**Conclusões da parte I:**

**Identificação e Caracterização de uma atividade fosfatásica presente em embriões de sementes de milho (*Zea mays*).**

- Ocorre um aumento na atividade pNPPásica ao longo da germinação das sementes de milho de cerca de 6 vezes durante as primeiras 24 horas.
- Com base na curva de pH e características cinéticas incluindo o uso de inibidores clássicos de fosfatases e a observação da necessidade de íons para catálise, a atividade pNPPásica foi caracterizada como pertencente a uma fosfatase ácida com atividade tirosina fosfatase.
- O ensaio de inativação térmica mostra a atividade fosfatásica com atividade máxima quando pré-incubada a 37 °C e perda total dessa atividade quando pré-incubada a temperatura de 80 °C.
- Quando sua atividade foi ensaiada com outros substratos, a fosfatase mostrou preferir fosfotirosina como substrato, embora também desfosforile resíduos de fosfoserina e fosfotreonina.

## ***Resultados***

- Western blotting com anticorpo antifosfotirosina mostrou a presença de algumas proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina, apresentando um polipeptídeo majoritário como alvo da desfosforilação. Além disso, a diminuição na quantidade de proteínas fosforiladas em tirosina que ocorre durante as 24 horas de germinação, é concomitante com o aumento da atividade fosfatásica.

**III.2 – PARTE II: Purificação da tirosina fosfatase de embriões de sementes de milho com 24 horas de germinação.**

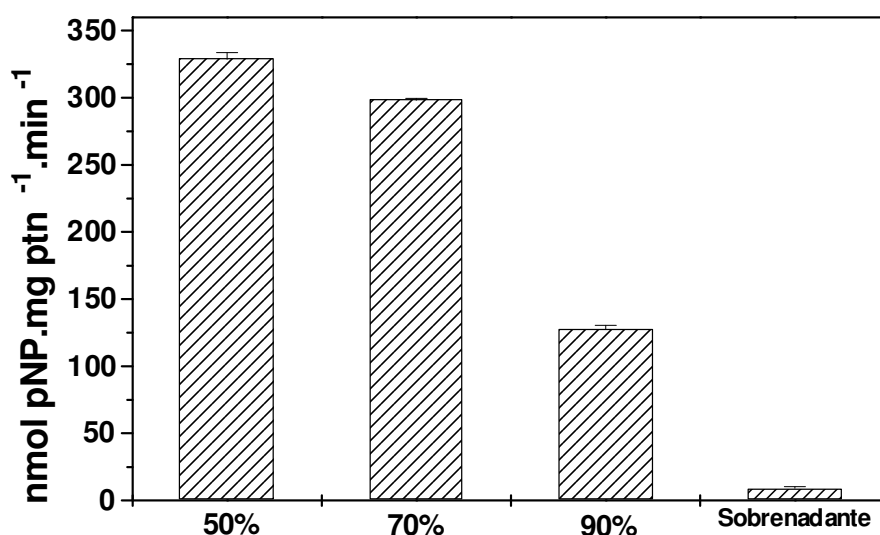
A fim de purificarmos tal enzima e estimarmos a massa molecular da fosfatase ácida, começamos o processo de purificação através do protocolo de precipitação por sulfato de amônio. Homogenatos totais de embriões com 24 horas de germinação foram centrifugados e o sobrenadante coletado foi utilizado para precipitação a 50% com sulfato de amônio. Após agitação, o material foi centrifugado por 30 minutos e o precipitado formado foi resuspenso em tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5,0. O sobrenadante coletado foi ajustado para precipitação a 70% e 90% conforme descrito em material e métodos.

Os precipitados de 50%, 70% e 90% foram ensaiados para a atividade pNPPásica. Observamos que a maior parte da atividade se encontra nos precipitados de 50 e 70% (**figura 14**). Estes foram então, agrupados e dialisados por 18 horas contra tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5,0, concentrados em speed vac e aplicados a uma coluna de afinidade do tipo Concanavalina A Sepharose. Após 18 horas a 4 °C, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio, conforme descrito em material e métodos. Como esta coluna possui afinidade por resíduos de manose e glicose, utilizamos o tampão de equilíbrio acrescido de 0.2 M glicose e 0.2 M de  $\alpha$ -metil d-manopiranosídeo para eluir as proteínas ligadas. Frações de 1ml foram coletadas e ensaiadas para atividade pNPPásica. A **figura 15** mostra o perfil de eluição da coluna a 280 nm e a atividade pNPPásica das frações.

## **Resultados**

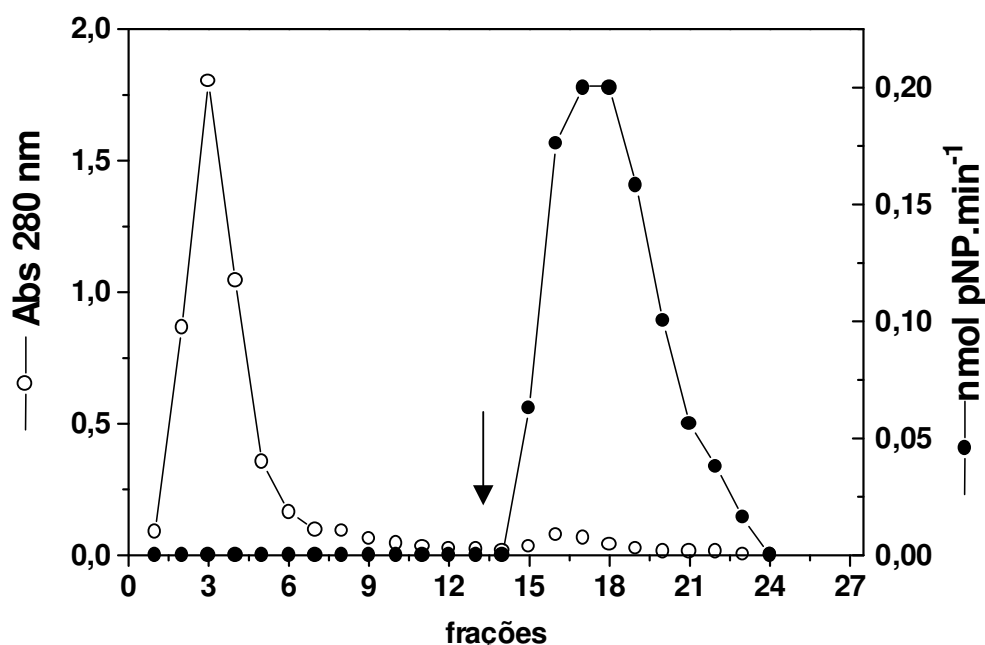
Como podemos observar, a fosfatase interage com a coluna e existe apenas uma atividade fosfatásica ácida eluída nas frações 17 e 18. Esse dado sugere que esta enzima é uma glicoproteína, já que interagiu com este tipo de coluna.

As frações com atividade foram agrupadas e dialisadas por 18 horas contra água, concentradas e aplicadas em uma coluna de filtração em gel (Superose 6 HR) acoplada a um aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (**figura 16 A**). Após a eluição as frações foram ensaiadas contra pNPP e observamos a existência de uma única atividade fosfatásica ácida eluída na fração 30 (**figura 16 B**). A massa molecular definida para essa enzima é de aproximadamente 112 kDa, estimada através do uso de padrões de peso molecular aplicados à coluna (**figura 17, seta fechada**).



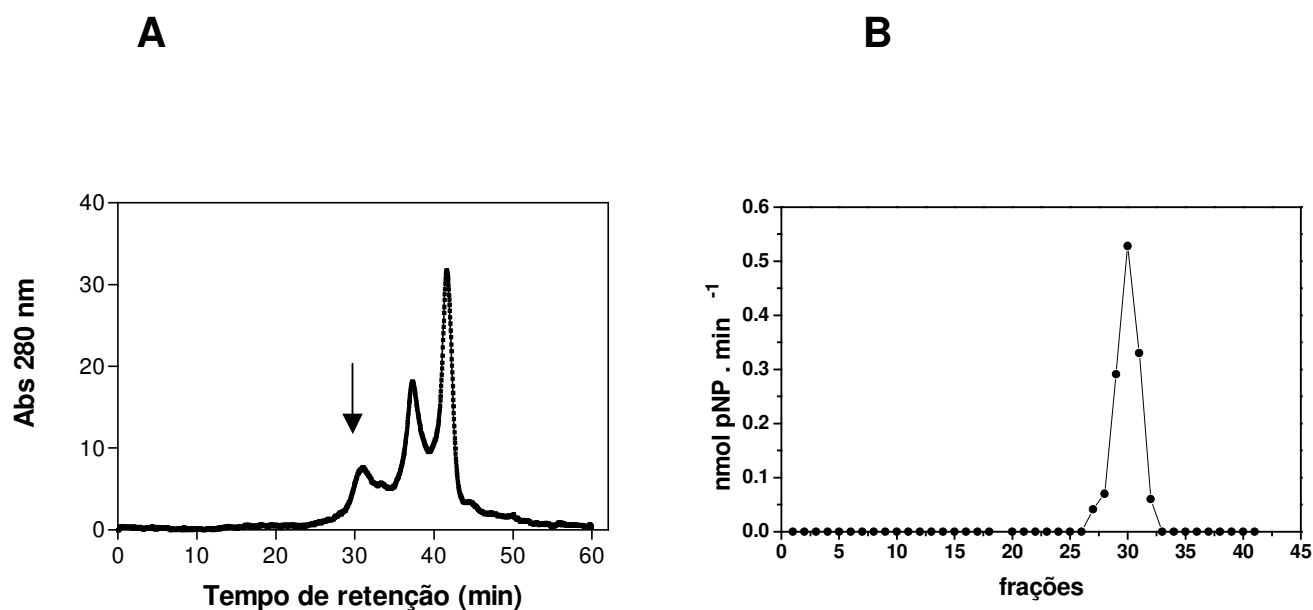
**Figura 14: Atividade pNPPásica das frações resultantes da precipitação com sulfato de amônio.**

Embriões de 24 horas de germinação foram homogeneizados, centrifugados e o sobrenadante ajustado para precipitação a 50%, 70% e 90% de sulfato de amônio. Os precipitados formados foram ressuspensos em tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5.0 e a atividade pNPPásica ensaiada. Utilizou-se 2 mM de pNPP como substrato e após 60 minutos a 37 °C a reação foi paralisada pela adição de 1:10 volumes de 1 N NaOH e submetida a leitura a 405 nm. A atividade está expressa como nmol pNP. mg ptn<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> e representa a média ± EP de dois experimentos feitos em triplicata.



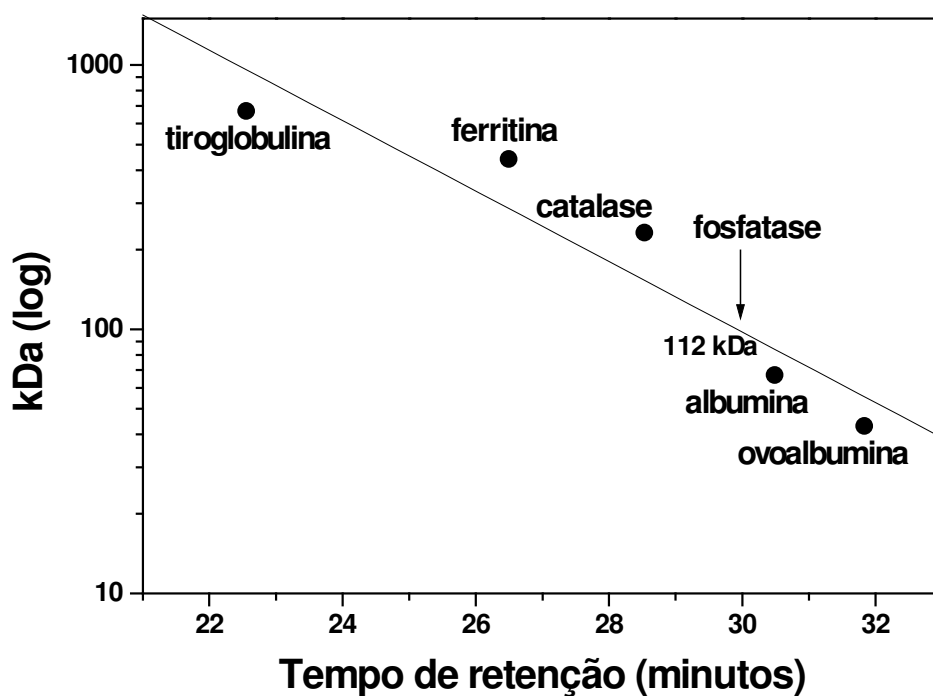
**Figura 15: Cromatografia de afinidade em coluna do tipo concanavalina A.**

Os precipitados de 50 e 70% formados no processo de precipitação por sulfato de amônio, foram agrupados, dialisados, concentrados e aplicados em uma coluna de Concanavalina A Sepharose. Frações de 1 ml foram coletadas durante a lavagem com tampão de equilíbrio e durante a eluição da coluna. A seta indica o início da eluição da coluna, na qual foi utilizado 0.2 M glicose e 0.2 M  $\alpha$ -metil d-manopiranosídeo em tampão de equilíbrio. As frações foram ensaiadas para atividade pNPPásica utilizando-se 2 mM pNPP como substrato e 2  $\mu$ l das frações. Após 60 minutos à 37 °C as reações foram paralisadas com 1:10 volumes 1 N NaOH e submetida a leitura a 405 nm. A atividade está expressa em nmol pNP. min<sup>-1</sup>.



**Figura 16: Cromatografia de filtração em gel na coluna Superose 6 HR (HPLC).**

As frações 17-18 com atividade pNPPásica eluídas da coluna Concanavalina A Sepharose foram agrupadas, dialisadas, concentradas e aplicadas em uma coluna de filtração em gel do tipo Superose 6 HR acoplada a um sistema de HPLC. O painel A mostra o perfil de eluição de proteína. O painel B mostra a atividade pNPPásica determinadas nas frações eluídas, utilizando 2 mM pNPP como substrato e 5  $\mu$ l das frações. Após 60 minutos a 37 °C a reação foi paralisada com a adição de 1:10 volumes 1 N NaOH e submetida a leitura a 405 nm. A atividade está expressa em  $\text{nmol pNP} \cdot \text{min}^{-1}$ . A seta no painel A indica a fração com maior atividade pNPPásica.



**Figura 17: Determinação da massa molecular da fosfatase de embriões de sementes de milho com 24 horas de germinação.**

Para determinação da massa molecular da fosfatase foi utilizada a fração 30 eluída da coluna de filtração em gel Superose 6 HR, que apresenta maior atividade pNPPásica. A seta indica a posição de eluição da fosfatase (fração 30) cuja massa molecular foi determinada através da comparação de seu tempo de retenção na coluna com o uso de padrões aplicados e eluídos na mesma coluna nas mesmas condições, conforme descrito em material e métodos. Os padrões utilizados foram: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalase (232 kDa), albumina (67 kDa) e ovoalbumina (43 kDa).



## **Resultados**

A fração 30 eluída da Superose 6 HR quando aplicada em gel de poliacrilamida na presença de SDS coradas pelo método de prata, e apresenta três polipeptídios (**figura 18**), com massas aproximadas de 70, 25 e 15 kDa estimados pelos padrões de peso molecular aplicados no gel.

A **tabela III** mostra os passos da purificação da fosfatase a partir do homogenato total de embriões de sementes de milho com 24 horas de germinação. Podemos observar que a fosfatase foi purificada cerca de 330 vezes com um rendimento de 69%.

A fração 30 eluída da Superose 6 HR teve sua atividade ensaiada na presença de efetores de fosfatases (**tabela IV**). Assim como a atividade fosfatásica do homogenato total dos embriões com 24 horas de germinação, os inibidores de tirosina fosfatases foram capazes de inibir a atividade pNPPásica da enzima purificada. 0.1 mM vanadato de sódio inibiu cerca de 90% da atividade, enquanto fluoreto de sódio e molibdato de amônio inibiram 77% e 100%, respectivamente.

**Tabela III**

**Purificação da fosfatase ácida com atividade tirosina fosfatásica de embriões de sementes de milho com 24 horas de germinação.**

etapa	volume (mL)	proteína total (mg)	atividade total*	atividade específica**	purificação	rendimento (%)
Extrato total	10	17.10	0.53	0.030	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	4.98	0,56	0.112	3.73	105.6
Con A	2	0.388	0.43	1.108	36.93	81.3
Superose	0.5	0.037	0.368	9.945	331.5	69.4

\* atividade expressa em nmol pNP.min<sup>-1</sup>

\*\*  $\frac{[\text{atividade total}]}{[\text{proteína total}]}$  = atividade específica expressa em nmol pNP.mg ptn<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>

**Tabela IV**

**Efeito de efetores de fosfatase na atividade pNPPásica da fração 30  
eluída da Superose 6 HR.**

<b>Efetores</b>	<b>% atividade pNPPásica</b>
Controle	100
Vanadato de sódio (0.1 mM)	7.3
Fluoreto de sódio (0.1 mM)	23.4
Molibdato de amônio (0.1 mM)	0

**Conclusões da parte II:**

**Purificação da fosfatase presente em embriões de sementes**

**de milho com 24 horas de germinação.**

- A massa estimada para esta enzima é de 112 kDa. Obtivemos uma purificação da enzima de cerca de 330 vezes utilizando os métodos a seguir: precipitação com sulfato de amônio, cromatografia em Concanavalina A Sepharose e Superose 6 HR.

- A cromatografia em coluna de afinidade do tipo Concanavalina A mostrou ser a etapa de purificação mais efetiva, para a purificação desta fosfatase. Ainda com relação a este dado, podemos caracterizar a fosfatase como sendo uma glicoproteína, já que apresentou grande interação com a coluna.

- A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das etapas da purificação, mostra que a fosfatase eluída da coluna Superose 6 HR apresenta três polipeptídeos, quando corada pelo método de prata. As massas estimadas foram de 70, 25 e 15 kDa.

- A atividade pNPPásica eluída na fração 30 da coluna Superose 6HR foi inibida por inibidores de tirosina fosfatase a saber: vanadato de sódio e molibdato de

## **Resultados**

amônio em cerca de 90 % e 100%, respectivamente. Esse dado mostra tratar-se esta enzima da mesma enzima anteriormente caracterizada em homogenato total.

### **III.3 – PARTE III: Localização da atividade fosfatásica e possível papel desta na germinação das sementes de milho.**

No intuito de localizarmos a atividade fosfatásica nos tecidos dos embriões de sementes de milho com 24 horas de germinação, cortes dos embriões foram feitos e a atividade analisada *in situ*. Utilizando  $\alpha$ -naftil fosfato como substrato e fast blue BB como corante, os cortes foram incubados a 37 °C e após 1 hora de reação foram lavados com tampão 0.1 M Tris-HCl pH 6,0 . Observamos que os cortes incubados na presença do substrato apresentam uma coloração avermelhada na região do meristema apical da raiz e na região do coleóptilo e primeiras folhas (**figura 19 A e B**). Quando o ensaio foi realizado na presença de um coquetel de inibidores de fosfatase contendo 0.1 mM vanadato de sódio, 0.1 mM molibdato de amônio e 1 mM de NaF (**figura 19 E e F**), nenhuma marcação foi observada. Na **figura 19 C e D** observamos a incubação dos cortes apenas na presença do corante, onde é possível observar uma marcação, porém diferente da apresentada quando o tecido foi incubado na presença do substrato (**figura 19 A e B**).

Em seguida fomos observar se a presença de inibidores de tirosina fosfatases no momento da embebição da semente, alteraria o processo de germinação. As sementes, após 24 horas de embebição na presença de 1mM de

vanadato de sódio ou 1 mM de molibdato de amônio, foram germinadas na ausência desses inibidores e os embriões coletados ao longo de 24 horas de germinação.

### **Resultados**

A **tabela V** mostra que os embriões tiveram o seu crescimento retardado, visto que, aqueles que foram hidratados apenas com água, medem cerca de 19 mm com 24 horas de germinação, enquanto aqueles que foram hidratados na presença dos inibidores de tirosina fosfatases, medem cerca de 13,6 mm no mesmo período de germinação. A porcentagem de crescimento variou de 70,8% - 89% em relação ao controle, sendo maior a diferença nos embriões de 18 e 24 horas de germinação. Esse dado pode ser melhor visualizado na **figura 20 A e B**, onde podemos observar que os embriões de sementes que hidrataram na presença dos inibidores, tem o seu processo de crescimento retardado de forma evidente.

A atividade pNPPásica desses embriões foi ensaiada e podemos observar na **figura 21** que a atividade em 24 horas de germinação cai em torno de 60% quando hidratada na presença de vanadato de sódio e 64% na presença de molibdato de amônio quando comparada com o controle.

**Figura 19: Atividade fosfatásica em cortes de embriões de sementes de milho com 24 horas de germinação.**

Cortes a fresco de embriões de sementes de milho com 24 horas de germinação foram analisados para atividade fosfatásica. Utilizamos  $\alpha$ -naftil fosfato como substrato e fast blue BB como corante. A atividade foi ensaiada na presença ou ausência de coquetel de inibidores de fosfatases composto por: 1 mM NaF, 0.1 mM molibdato de amônio e 0.1 mM vanadato de sódio. Os painéis **A** e **B** mostram os cortes ensaiados para atividade fosfatásica. Os painéis **C** e **D** mostram os controles, sem a presença do substrato  $\alpha$ -naftil fosfato. Os painéis **E** e **F** apresentam os cortes ensaiados para atividade fosfatásica na presença do coquetel de inibidores. As setas **I**, **II** e **III** indicam as regiões de meristema apical da raiz, coleóptilo e primeiras folhas respectivamente.

**Tabela V**

**Crescimento do embrião de sementes de milho embebidos com inibidores de tirosina fosfatases ao longo de 24 horas de germinação.**

Germinação (horas)	Água (mm) (controle) (100%)*	Vanadato (mm) (1 mM) (%)*	Molibdato (mm) (1 mM) (%)*
0	5.6 ± 0.24	4.8 ± 0.20 (85,7%)	5 ± 0.31(89.3%)
6	6.2 ± 0.20	5.2 ± 0.20 (83.9%)	5 ± 0.31 (80.6%)
12	6.4 ± 0.24	5.4 ± 0.24 (84.4%)	5.4 ± 0.24 (84.4%)
18	7.6 ± 0.24	5.6 ± 0.24 (73.7%)	5.6 ± 0.24 (73.7%)
24	19.2 ± 0.80	15 ± 1.34 (78.1%)	13.6 ± 0.81 (70.8%)

\* (%) – refere-se a porcentagem de crescimento em relação ao controle.



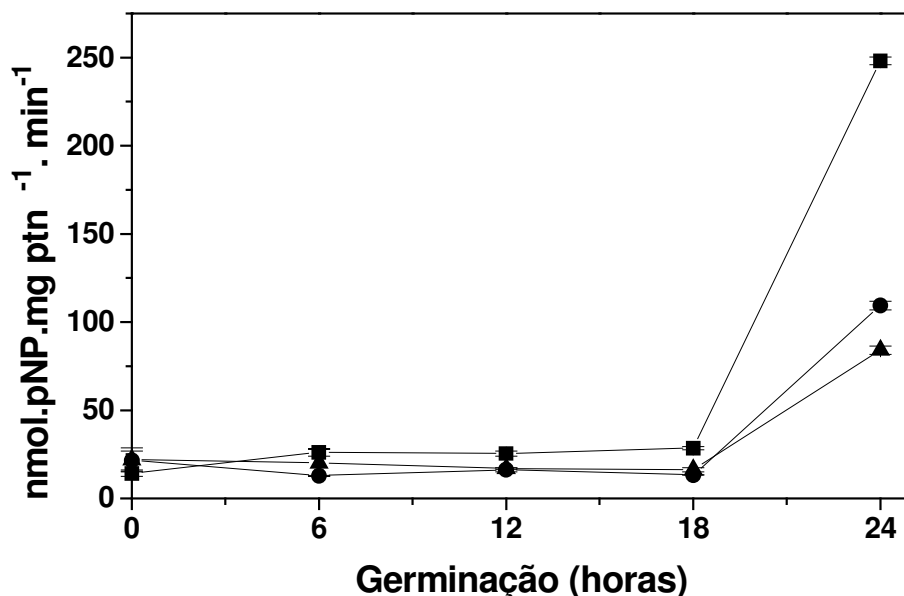


Figura 21: Atividade pNPPásica de homogenato total de embriões hidratados na presença ou ausência de inibidores de tirosina fosfatases.

Sementes de milho foram hidratadas na presença ou ausência de 1 mM de vanadato de sódio ou 1 mM de molibdato de amônio e em seguida colocadas para germinar em água. Os embriões foram coletados ao longo de 24 horas de germinação e homogeneizados em tampão 0.1 M acetato de sódio pH 5.0. A atividade pNPPásica foi ensaiada utilizando 2 mM pNPP como substrato e após 60 minutos as 37 °C as reações foram paralisadas com 1:10 volumes 1 N NaOH. A atividade está expressa em nmol pNP. mg ptn<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> e é a média ± EP de dois experimentos feitos em triplicata, com diferentes homogenatos. Os símbolos representam: —■— água, —▲— vanadato de sódio, —●— molibdato de amônio.

**Conclusões da parte III:**

**Localização da atividade fosfatásica e possível papel  
na germinação das sementes de milho.**

- Os cortes de embriões ensaiados para atividade fosfatásica "*in situ*" apresentaram uma marcação predominante nas regiões de meristema apical da raiz, coleoptilo e nas primeiras folhas, sendo esta marcação inibida quando o ensaio foi realizado na presença de inibidores de tirosina fosfatases.
- O crescimento dos embriões das sementes hidratadas na presença de inibidores de tirosina fosfatases foi retardado quando comparado com o controle.
- A atividade pNPPásica foi menor nas sementes hidratadas com inibidores de tirosina fosfatases. A hidratação na presença de vanadato de sódio inibiu cerca de 60 % da atividade, enquanto o molibdato de amônio inibiu 64%.

## **Discussão**

### **IV- DISCUSSÃO**

O sucesso da existência das plantas é totalmente dependente de como elas vão coordenar seu crescimento com as mudanças externas que as cercam. A resposta de uma planta a um estímulo do meio ambiente resulta em algumas mudanças inter e intracelulares que a levam a uma resposta final. Uma série de eventos envolvendo desde reconhecimento molecular de um estímulo do meio ambiente até uma resposta definida constituem um mecanismo de cascata de sinalização e o fenômeno inteiro é chamado de transdução de sinal. Basicamente, um estímulo primário percebido por uma célula (provavelmente através de receptores específicos) gera vários mensageiros intermediários. A natureza da resposta após a cascata de sinalização estar iniciada, depende da velocidade, sensibilidade e especificidade dos elementos envolvidos no mecanismo de transdução de sinais (Sopory e Munshi, 1998).

A amplificação e especificidade de uma resposta geralmente é mediada pela modificação do estado de fosforilação de proteínas pela ação de proteínas cinases e fosfatases. Durante as duas últimas décadas a fosforilação de proteínas vem se tornando um dos maiores mecanismos envolvidos na transdução de vários estímulos externos, mediando diversos eventos intracelulares em células eucarióticas. A fosforilação de proteínas tem sido chamada de “o cérebro de uma célula” e tem um importante papel no metabolismo da planta (Sopory e Munshi, 1998).

## ***Discussão***

A fosforilação ocorre predominantemente nos aminoácidos serina, treonina e tirosina. A fosforilação em 97% dos casos ocorre em resíduos de serina e treonina, enquanto em resíduos de tirosina ocorre apenas em taxas de 0.01 a 0.05% (Walton e Dixon, 1993).

Uma quantidade considerável de informações está disponível sobre estrutura, mecanismo de ação, função fisiológica e regulação de cinases, contudo, poucos estudos mostram evidências de que fosfatases estão envolvidas em funções essenciais nas plantas (Smith e Walker, 1996).

Em plantas, já é sabido que a atividade fosfatásica ácida aumenta com a germinação e crescimento da semente e os trabalhos sugerem que essas enzimas estejam envolvidas na mobilização de fosfato, contribuindo assim, para o crescimento do eixo embrionário (Kundu e Banerjee, 1990). Esse aumento na atividade fosfatásica já foi descrito em diferentes tecidos de mono e dicotiledôneas (Jagiello e cols., 1992). A fosfatase secretada por cultura de células de endosperma de milho, tem pH ótimo 5.5, e utilizando p-nitrofenil fosfato como substrato foi inibida por fosfato inorgânico, fluoreto e molibdato, sendo caracterizada como uma fosfatase ácida não específica (Miernyk, 1992). Também em cultura de células de soja foi demonstrada a presença de uma fosfatase ácida dependente de  $Mn^{+2}$  como cofator e pH ótimo de 5.5 (Lebansky e cols., 1991). Nos cotilédones de várias sementes o aumento da atividade fosfatásica foi demonstrado. Como exemplo podemos citar: papoula (Chung e Polya, 1992), soja

## **Discussão**

(Ullah e Gibson, 1988; Ferreira e cols., 1998), girassol (Park e Etten, 1986), *Vigna sinensis* (Biswas e Cundiff, 1991; Biswas e cols., 1996), tremoços (Olczak e cols., 1997), milho (Rossi e cols., 1981) e *Lupinus albus* (Zheng e Duranti, 1995). A atividade fosfatásica também aumenta no eixo embrionário de sementes de algodão (Bhargava e Sachar, 1983; Bhargava e Sachar, 1987), milho (Jagiello e cols., 1992) e *Vigna radiata* (Kundu e Banerjee, 1990).

Em sementes de milho, Rossi e cols. (1981) descreveram a purificação de uma atividade fosfatásica ácida presente no cotilédone das sementes com 96 horas de germinação, com pH ótimo 5.4, e massa molecular de 65 kDa que apresenta 16% de açúcares neutros na sua estrutura, não necessita de cátions para sua atividade e catalisa a hidrólise de glicose-6-fosfato. Também foram demonstradas algumas propriedades cinéticas e estruturais dessa enzima no estado de dormência e durante as primeiras 96 horas de germinação. Segundo os autores não houve evidências de síntese de novo dessa enzima ou de que modificações moleculares seriam responsáveis pelo aumento da atividade que ocorre durante a germinação da semente (Teno e cols., 1987). Jagiello e cols. (1992) identificaram três atividades de fosfatase em sementes de milho com especificidades diferentes para uma variedade de substratos fosforilados, incluindo, fosfocaseína, pNPP, fosforilase *a* e vários fosfopeptídeos contendo fosfoserina e fosfotreonina.

Nesta tese, acompanhamos a atividade de fosfatásica ácida ao longo da germinação de sementes de milho, em um período de 24 horas, visto que segundo Bewley (1997), o processo de germinação tem início com a entrada de

## **Discussão**

água na semente e está completo quando uma parte do embrião, usualmente a radícula, se estende para penetrar na estrutura que o rodeia.

Para isto resolvemos ensaiar homogenatos de embriões de milho para detectarmos uma atividade fosfatásica, usando pNPP como substrato. Observamos na figura 7 que existe um aumento de cerca de 6 vezes na atividade do homogenato de 24 horas de germinação em relação ao homogenato de 0 horas. Este dado está respaldado por trabalhos anteriores, que mostram um aumento da atividade fosfatásica durante a germinação. Mostramos também que esta enzima apresenta um pH ótimo em torno de 4.5 - 5.5 (figura 8), que hidrolisa pNPP em uma reação saturável (figura 9 A) e apresenta-se linear até 60 minutos de reação a 37 °C (figura 9 B). Sabe-se que em condições de estresse salino a atividade de fosfatases e cinases são alteradas. Em sementes de alfafa o estresse salino causado por NaCl foi capaz de aumentar a atividade cinásica, enquanto a atividade fosfatásica foi inibida (Yupasins e cols., 1994). A figura 10 mostra que a atividade fosfatásica das sementes de milho não é alterada pelo aumento da concentração de NaCl no meio reacional, o que não significa que esta atividade não seja alterada quando a semente é germinada em condições de estresse salino.

Ao estudar o efeito de moduladores na atividade fosfatásica para uma melhor caracterização do tipo de fosfatase presente (tabela I), observamos ser esta enzima fortemente inibida por vanadato de sódio ( $k_i \cong 0.025$  mM), molibdato de amônio ( $k_i \cong 0.075$   $\mu$ M) e sulfato de zinco, inibidores clássicos de tirosina fosfatases (Tonks e cols., 1988; Gellatly e cols., 1994; Fauman e Saper, 1996;

## **Discussão**

Zapata e Sotomayor, 1998; Rotenberge Brautigan, 1987), além de fluoreto de sódio ( $k_i \cong 0.022$  mM), um reagente nucleofílico que tem sido identificado como inibidor de uma variedade de enzimas como esterases, hidrolases e fosfatases (Viñals e cols., 1993). Quanto as fosfatases, o NaF possui características de ser um inibidor não competitivo e específico para hidrolases da classe EC 3.6.1.17. O  $k_i$  descrito para sementes é de 2-3  $\mu$ M e para tecidos de mamíferos é de 20  $\mu$ M (Edwards e Pearson, 1961; Guranowski, 1990). A enzima também teve sua atividade inibida em cerca de 34% pela presença de sulfato de cobre. Sabe-se que o cobre inativa a tirosina fosfatase de especificidade dupla do vírus vaccinia, além da PTP 1B, por oxidação reversível (Kim e cols., 2000). Inibidores de fosfatases alcalinas como levamisole e tetramizole (Belle, 1972) não alteraram a atividade fosfatásica do homogenato total de embriões, assim como tartarato duplo de sódio e potássio, um inibidor clássico para fosfatases lisossomais secretadas (Araújo e cols., 1976; Vihko e cols., 1993 e Ek-Rylander, 1997) também não alterou a atividade da enzima. Ácido ocadáico, um inibidor clássico de serina/treonina fosfatases, também não foi capaz de alterar a atividade da enzima, sugerindo que este homogenato total de embriões com 24 horas de germinação, não apresenta uma atividade do tipo serina/treonina fosfatase. Quando ensaiamos a atividade pNPPásica na presença de diversos íons (tabela II), nenhum deles foi capaz de induzir uma alteração significativa da mesma.

Ao analisarmos a atividade desta enzima na presença de outros substratos além do pNPP, podemos observar a sua preferência por desfosforilar fosfotirosina, apesar de desfosforilar com menor eficiência fosfoserina e fosfotreonina.

## ***Discussão***

O conjunto desses dados sugere que esta enzima apresenta características típicas de uma tirosina fosfatase.

Além disso demonstramos que homogenato total de embriões em diferentes horários de germinação apresentam proteínas fosforiladas em tirosina (figura 13) e que essa fosforilação diminui ao longo da germinação, sendo possível visualizar que, com 24 horas de germinação, o nível de fosforilação dessas proteínas diminui, em um sugestivo paralelo com o aumento da atividade da enzima caracterizada.

Fosforilação em resíduos de tirosina tem sido considerada como uma modificação específica para eucariotos que dispara eventos biológicos importantes, como: transdução de sinal, controle do crescimento, metabolismo e transformação maligna. Porém, na bactéria *Acinetobacter johnsonii*, existe uma atividade tirosina fosfatásica que é amplamente inibida por molibdato de amônio e vanadato de sódio (Grangeasse e cols., 1998). Em plantas, os níveis de proteínas fosforiladas em tirosina são maiores dos que os encontrados em células animais (Duff e cols., 1994). Sequências codificando proteínas com homologia com tirosina fosfatases tem sido identificadas em *arabidopsis*, soja e ervilha (Fordham-Skelton e cols., 1999). Em sementes de lentilha, uma tirosina fosfatase de baixo peso molecular (30 kDa) foi identificada em 48 horas de germinação. A indução dessa enzima foi inibida pelo tratamento com ciclohexamida e estimulada por reguladores do crescimento da planta como auxina e ácido giberílico. Esta enzima é ainda fortemente inibida por vanadato em concentrações  $\mu$ Molares, molibdato de amônio e pCMB. Esse trabalho mostrou pela primeira vez que a germinação induz



## ***Discussão***

uma fosfatase ácida de baixo peso molecular pertencente a família das tirosina fosfatases e que esta apresenta um papel na diferenciação e desenvolvimento celular durante a germinação da semente (Bose e Taneja, 1998).

Em raízes de *Catharanthus roseus* foi encontrada uma tirosina fosfatase na fração solúvel e particulada, sendo sua atividade inibida por vanadato de sódio e estimulada por  $\beta$ -mercaptoetanol. Além disso, concentrações crescentes de vanadato de sódio induziram o aumento na fosforilação de duas proteínas presentes na fração solúvel desta raiz (Zapata e Sotomayor, 1998). Uma fosfatase ácida de alto peso molecular purificada de batata é capaz de desfosforilar outros fosfomonoésteres como pNPP, fosfoserina, fosfoenol piruvato e ATP, apresentando maior especificidade com fosfotirosina (Gellatly e cols., 1994). Em ervilha foi parcialmente purificada e caracterizada uma enzima com atividade tirosina fosfatase, com massa molecular de 90 kDa e susceptível a inibição por baixas concentrações de vanadato e molibdato (Guo e Roux, 1995).

Todas essas tirosinas fosfatases aqui citadas, além da enzima apresentada nesta tese, tem sido caracterizadas através das similaridades de suas propriedades com as propriedades de tirosina fosfatases de mamíferos e leveduras, que parecem estar envolvidas na regulação do ciclo e desenvolvimento celular. Assim como as tirosina fosfatases de plantas, essas tirosinas fosfatases frequentemente apresentam pH ótimo ácido, são potentemente inibidas por vanadato, molibdato e zinco, e catalisam a desfosforilação de pNPP assim como de uma variedade de outros fosfomonoésteres (Walton e Dixon, 1993).

## ***Discussão***

A fosfatase encontrada em embriões de sementes de milho com 24 horas de germinação foi purificada, como mostra a tabela III. Assim como as fosfatases mostradas em sementes de trigo (Cheng e Tao, 1989), algodão (Bhargava e Sachar, 1987), tremoços (Olczak e cols., 1997), girassol (Park e Etten, 1986) e outras, ela parece ser uma glicoproteína, já que se liga em coluna de afinidade do tipo Concanavalina A (figura 15). Tal enzima apresenta uma massa molecular aproximada de 112 kDa, estimada através do uso de padrões de peso aplicados em coluna de filtração em gel (figura 18). Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS apresenta três subunidades com massas aproximadas de 70, 25 e 15 kDa foram estimadas pelo uso de padrões de massa aplicados no mesmo gel de poliacrilamida. Além disso, a atividade fosfatásica da enzima eluída da fração 30 da Superose 6 HR, foi inibida por inibidores clássicos de tirosina fosfatases (tabela IV). Esse dado mostra que a enzima purificada se trata da mesma fosfatase caracterizada em homogenato total de embriões de sementes de milho.

O desenvolvimento das plantas, comparado com os animais, é influenciado muito mais pelo meio ambiente no qual elas crescem, sugerindo que as plantas tem mecanismos que retransmitem sinais do meio ambiente para controlar a divisão celular e com isso o crescimento da planta. A maior parte da atividade divisional nas plantas está localizada em pequenos grupos de células, chamados de meristemas, que estão sempre presentes no embrião e estão ativos durante a maior parte do ciclo de vida da planta (Boer e Murray, 2000). Como já é descrito que tirosina fosfatases estão envolvidas em sinalização, crescimento e diferenciação da célula e ciclo celular (Fauman e Saper, 1996), fomos observar se

## ***Discussão***

a fosfatase de embriões de milho poderia estar envolvida no processo da germinação, envolvendo o crescimento do embrião. Para isso decidimos investigar a localização da atividade fosfatásica em cortes de embrião com 24 horas de germinação.

A atividade fosfatásica foi ensaiada *in situ* na ausência ou presença de inibidores de fosfatases. A marcação foi intensa na região dos meristemas apical da raiz, coleótilo e das primeiras folhas (figura 19), locais estes de intensa atividade celular. Em feijão uma fosfatase ácida foi localizada apenas na parede celular de duas das três fileiras periféricas de células do cotilédone e sua atividade não foi detectada no embrião. A esta enzima foi proposto um papel na mobilização de fosfato orgânico durante a germinação, baseado no perfil de hidrólise dos substratos testados (preferindo ATP e pirofosfato) e em sua localização (Cashikar e cols., 1997). Chiatani e cols. (1991) demonstraram que o padrão de fosforilação de proteínas nucleares do meristema da raiz de ervilha é diferente em proteínas nucleares purificadas de raiz em estado quiescente ou em proliferação do meristema. Segundo os autores isto mostra que a variação da fosforilação dessas proteínas deve estar relacionada com o estado de proliferação e diferenciação da célula.

Em ovos de *Xenopus* foi demonstrado que várias proteínas tem o seu padrão de fosforilação alterado pela fertilização do ovo, e que ao tratá-los com um inibidor de tirosina fosfatase (Vanadato 1 mM) antes da fertilização, a ativação do ovo induzida pela fertilização foi inibida. O tratamento destes ovos com inibidores de tirosinas cinases também inibiram esta ativação. Os autores sugerem

## ***Discussão***

que a fosforilação e a desfosforilação de proteínas em tirosina, tem um papel importante na ativação do ovo induzida pelo esperma (Sato e cols., 1998). Como a germinação das sementes tem início com a entrada de água, adicionamos a esse processo de embebição inibidores de tirosina fosfatases para observarmos se o crescimento do embrião seria afetado, assim como a atividade da enzima.

Como podemos observar as sementes tratadas com vanadato de sódio e molibdato de amônio apresentaram seus embriões com o crescimento retardado como mostra a tabela de germinação (tabela V). A atividade da enzima também foi menor nos embriões das sementes tratadas pelos inibidores de tirosina fosfatases (figura 21). No controle sem inibidores a atividade está em torno de 250 nmol pNP.mg ptn<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>, enquanto nas sementes tratadas com vanadato de sódio e molibdato de amônio a atividade ficou em torno de 100 e 90 nmol pNP.mg ptn<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> respectivamente. Estes dados sugerem que o estado de fosforilação de proteínas do embrião é um fator importante no processo de germinação.

Intensas atividades metabólicas ocorrem durante a embriogênese e o desenvolvimento da semente. Após atingir a maturidade, as sementes passam por um processo de desidratação e entram em dormência quando todas as atividades metabólicas cessam. O subsequente início da germinação dispara o resurgimento de atividades anabólicas no embrião em crescimento, enquanto os cotilédones das sementes em germinação passam por uma reversão drástica de suas atividades, levando a mobilização e degradação de reservas antes estocadas.

## ***Discussão***

A associação de proteínas fosfatases e cinases com esses tecidos indicam metabolismo e crescimento ativo, sugerindo o possível envolvimento de fosforilação de proteínas em diferentes processos regulatórios nas várias fases da semente (Mukhopadhyay e Singh, 1997).

**V. BIBLIOGRAFIA**

Araujo, P.S.; Mies, V. and Miranda, O. (1976) Subcellular distribution of low-and higher-molecular-weight acid phosphatases. **Biochimica et Biophysica Acta** **452**, 121-130.

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

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

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

Bhargava, R. and Sachar, R.C. (1987) Induction of acid phosphatase in cotton seedlings: enzyme purification, subunit structure and kinetic properties. **Phytochemistry** **26:5**, 1293-1297.

Biswas, T.K and Cundiff, C. (1991) Multiples forms of acid phosphatase in germinating seeds of *Vigna sinensis*. **Phytochemistry** **30:7**, 2119-2125.

Biswas, T.K.; Promo, M. and Biswas, B. (1996) Purification of acid phosphatase I from germinating seeds of *Vigna sinensis*. **Phytochemistry** **41:6**, 1457-1458.

Boer, B.G.W. and Murray, J.A.H. (2000) Triggering the cell cycle in plants. **Trens in Cell Biology** **10**, 245-249.

## **Bibliografia**

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

Bose, S.K. and Taneja, V. (1998) Induction of a germination specific, low molecular weight, acid phosphatase isozyme with specific phosphotyrosine phosphatase activity in lentil (*Lens esculenta*) seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **250**, 629-634.

Bradford, M.M. (1976) 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.

Carter, P.J.; Nimmo, H.G.; Fenson, C.A. and Wilkins, M.B. (1990) *Bryophyllum fedtschenkoi* protein phosphatase type-2A can dephosphorylate phosphoenolpyruvate carboxylate. **FEBS Lett.** **263**, 233-236.

Cashikar, A. G.; Kumaresan, R. and Rao, M. (1997) Biochemical characterization and subcellular localization of the red kidney purple acid phosphatase. **Plant Physiol.** **114**, 907-915.

Cheng, H. and Tao, M. (1989) Purification and characterization of a phosphotyrosyl-protein phosphatase from wheat seedlings. **Biochimica et Biophysica Acta** **998**, 271-276.

Chiatani, D.; Brusa, P. Levi, M. and Sparvoli, E. (1991) Phosphorylation of nuclear proteins and proliferation in root meristems of pea (*Pisum sativum*). **Plant Science** **75**, 39-46.

### ***Bibliografia***

Chung, R. P-T. and Polya, G.M. (1992) Copurification and characterisation of poppy seed phosphatase and phosphoprotein phosphatase activities. **Plant Science** **84**, 153-162.

Denu, M.J.; Lohse, D.L.; Vijayalakshimi, J.; Saper, M.A. and Dixon, E. (1996) Visualization of intermediate and transition state structures in protein tyrosine phosphatase catalysis. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.** **93**, 2493-2498.

Duff, S.M.G.; Sarath, G. and Plaxton, W.C. (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. **Physiologia Plantarum** **90**, 791-800.

Dunphy, W. G. and Kumagai, A. (1991) The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. **Cell** **67**, 189-196.

Edwards, J.O. and Pearson, R.G. (1961) The factors determining nucleophilic reactivities.

Egloff, M.P.; Cohen, P.T.; Reinemer, P. and Bradford, D. (1995) Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. **Molec. Biol.** **254**, 942-959.

Ek-Rylander, B.; Barkhem, T.; Ljusberg, J.; Öhman, L.; Anderson, K.K. and Andeson, G. (1997) Comparative studies of rat recombinant purple acid phosphatase and bone tartrate-resistant acid phosphatase. **Biochem. J.** **321**, 305-311.

Ehrenschaft, M. and Brambl, R. (1990) Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. **Plant Physiol.** **93**, 295-304.



## **Bibliografia**

Esken, N.A.M. (1990) Biochemistry of foods, Second edition – academic Press, Inc. San Diego, California.

Evans, M.; Fawcett, T.; Bouter, D. and Fordham-Skelton, P. (1994) A homologue of the 65 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A in early pea (*Pisum sativum* L.) embryos. **Plant Molecular Biology** **24**, 689-695.

Fauman, E.B. and Saper, M.A. (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. **TIBS** **21**, 413-417.

Ferreira, C.V.; Grannjeiro, J.M.; Taga, E.M. and Aoyama, H. (1998) Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatases. **Plant Physiol. Biochem.** **36:7**,487-494.

Ferreira, C.V.; Taga, E.M. and Aoyama, H. (1999) Glycolytic intermediates as substrate of soybean acid phosphatase isoforms. **Pant Science** **147**, 49-54.

Feussner, I.; Kühn, H. and Wasternack, C. (2001) Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. **TRENDS in Plant Science** **6:6**, 268-273.

Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. **J.B.C** **66**, 375-400.

Fordham-Skelton, A.P.; Skipsey, M.; Eveans, M.; Edwards, R. and Gatehouse, J.A. (1999) Higher plant tyrosine-specific protein phosphatases (PTPs) contain novel amino-terminal domains: expression during embryogenesis. **Plant Molecular Biology** **39**, 593-605.

Fosket, D.E. (1994) Plant growth and development: a moleculat approach. Academic Press, Inc. San Diego, California.

## ***Bibliografia***

Gellatly, K.S.; Moorhead, G.B.G.; Duff, S.M.G.; Lefebvre, D.D. and Plaxton, W.C. (1994) Purification and characterization of a potato tuber acid phosphatase having significant phosphotyrosine phosphatase activity. **Plant Physiol.** **106**, 223-232.

Gibbons, A. (1991) Saving seeds for future generations. **Science** **254**, 5033.

Grangeasse, C.; Doublet, P.; Vaganay, C.V.E.; Riberty, M.; Duclos, B. and Cozzone, A.J. (1998) Functional characterization of the low-molecular-mass phosphotyrosine-protein phosphatase of *Acinetobacter johnsonii*. **J. Mol. Biol.** **278**, 339-347.

Guo, Y.I. and Roux, S.J. (1995) Partial purification and characterization of an enzyme from pea nuclei with protein tyrosine phosphatase activity. **Plant Physiol.** **107**, 167-175.

Guo, Y.I. and Roux, S.J. (1996) Partial purification and characterization of a type 1 protein phosphatase in purified nuclei of pea plumules. **Biochem. J.** **319**, 985-991.

Guranowski, A. (1990) Fluoride is a strong and specific inhibitor of (*asymmetrical*)  $Ap_4A$  hydrolases. **FEBS** **262**, 205-208.

Huber, S.C.; Huber, J.L.; Liao, P.C., Gage, D.A.; McMichael, R.W.; Chourey, P.S.; Hannah, C. and Koch, K. (1996) Phosphorylation of serine-15 of maize leaf sucrose synthase. **Plant Physiol.** **112**, 793-802.

Jagiello, I.; Donella-Deana, A.; Szczegielniak, J.; Pinna, L.A. and Muszynska, G. (1992) Identification of protein phosphatase activities in maize seedlings. **Bichimica et Biophysica Acta** **1134**, 129-136.

### ***Bibliografia***

Kim, J.; Cho, H.; Ryu, S. and Choi, M. (2000) Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu<sup>2+</sup> ion. **Archives of Biochemistry and Biophysics** **382**, 72-80.

Kundu, P. and Banerjee, A.C. (1990) Multiple forms of acid phosphatase from seedling axes of *Vigna radiata*. **Phytochemistry** **29:9**, 2825-2828.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature****227**, 680-685.

Larkins, B.A.; Lending, C.R. and Wallace, J.C. (1993) Modification of maize-seed-protein quality. **Am. J. Clin. Nutr.** **58 (suppl)**, 264S- 269S.

Lebansky, B.R.; Mcknight, T.D. and Griffing, L.R. (1991) Purification and Characterization of a secreted purple phosphatase from soybean suspension cultures. **Plant Physiol.** **99**, 391-395.

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

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

Mackintosh, C and Cohen, P. (1989) Identification of high levels of type 1 and 2A protein phosphatases in higher plants. **Biochem. J.** **262**, 335-339.

Mackintosh, C; Coggins, J. and Cohen, P. (1991) Plant protein phosphatases. **Biochem. J.** **273**, 733-738.

## ***Bibliografia***

Magalhães, P.C.; Durães, F.O.M. and Paiva, E. (1995) Fisiologia da planta de milho. Sete Lagoas: **EMBRAPA – CNPMS. 27p. Circular técnica, 20**

Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A. (1963) Germination of seeds. The Macmillan Company, New York.

Miernyk, J. (1992) Purification and characterization of the major acid phosphatase isozyme secreted by maize endosperm cultures. **Phytochemistry 31:8**, 2613-2616.

Mukhopadhyay, K and Singh, M. (1997) Endogenous protein phosphorylation and protein kinase activity in winged bean. **Phytochemistry 46:3**, 455-459.

Murray, D.R. (1984) Seed Physiology, Vol 1, Academic Press, Sydney.

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

Park, H. C. and Etten, R.L.V. (1986) Purification and characterization of homogeneous sunflower seed acid phosphatase. **Phytochemistry 25:2**, 351-357.

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

Raven, P.H.; Evert, R.F. and Eichhorn, S.E. (1992) Biologia Vegetal. Quinta edição ed. Guanabara Koogan.

### ***Bibliografia***

Roknabadi, S.MM.; Bose, S.K. and Taneja, V. (1999) A histidine thiol 100 kDa, tetrameric acid phosphatase from lentil, *Lens esculenta*, seeds with the characteristics of protein tyrosine phosphatases. **Biochimica et Biophysica Acta** **1433**, 272-280.

Rotenberg, S.A. and Brautigan, D.L. (1987) Membrane protein phosphotyrosine phosphatase in rabbit kidney. **Biochem. J.** **243**, 747-754.

Rossi, A.; Palma, M.S.; Leone, F.A. and Brigliador, M.A. (1981) Properties of acid phosphatase from scutella of germinating maize seeds. **Phytochemistry** **20:8**, 1823-1826.

Salon, C.; Raymond, P. and Pradet, A. (1988) Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germination lettuce embryos. **J. Biol. Chem.** **263**, 12278-12287.

Sato, K.; Iwasaki, T.; Tamaki, I.; Aoto, M.; Tokmakov, A.A. and Fukami, Y. (1998) Involvement of protein tyrosine phosphorylation and dephosphorylation in sperm-induced *Xenopus* egg activation. **FEBS Letters** **424**, 113-118.

Seo, S.; Tan-Wilson, A. and Wilson, K. (2001) Protease C2, a cysteine endopeptidase involved in the continuing mobilization of soybean  $\beta$ -conglycinin seed proteins. **Biochimica et Biophysica Acta** **1545**, 192-206.

Sheng, Z. and Charbonneau, H. (1993) The baculovirus *Autographa californica* endonucleon protein tyrosine phosphatase. **J. Biol. Chem.** **268:7**, 4728-4733.

Shenolikar, S. (1994) Protein serine/threonine phosphatases – new avenues for cell regulation. **Annu. Rev. Cell Biol.** **10**, 55-86.

## ***Bibliografia***

Shewry, P.T. and Tatham, A.S. (1990) The prolamine storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. Review Article. **Biochem. J.** **267**, 1-12.

Smith, R. D. and Walker, J.C. (1996) Plant protein phosphatases. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** **47**, 101-125.

Sopory, S.K. and Munshi, M. (1998) Protein kinases and phosphatases and their role in cellular signalling in plants. **Critical Reviews in Plant Science** **17:3**, 245-318.

Subbarao, K. V.; Datta, R. and Sharma, R. (1998) Amylases synthesis in scutellum and aleurone layer of maize seeds. **Phytochemistry** **49:3**, 657-666.

Teno, A.M.; Palma, M.S. and Rossi, A. (1987) Acid phosphatase from maize scutellum: properties as a function of seed germination. **Phytochemistry** **26:1**, 55-58.

Tonks, N.; Diltz, C.D.; Fischer, E.H. (1988) Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatase of human placenta. **J. Biol. Chem.** **263**, 6731-6737.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **76**, 4350-4354.

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

### **Bibliografia**

Vihko, P.; Kurkela, R.; Porvari K.; Herrala, A.; Lindfors, A. ; Lindqvist, Y. and Schneider, G. (1993) Rat acid phosphatase: overexpression of active, secreted enzyme by recombinant baculovirus-infected cells, molecular properties, and crystallization. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **90**, 799-803.

Viñals, F.; Testar, X.; Palacín, M. and Zorzano, A. (1993) Inhibitory effect of fluoride on insulin receptor autophosphorylation and tyrosine kinase activity. **Biochem. J.** **291**, 615-622.

Wallace, W and Oaks, A. (1997) Hydrolysis of endosperm storage proteins in *Zea mays*: in vitro modification of an early endopeptidase. **Plant Science** **124**, 9-14.

Walton, K. and Dixon, J.E. (1993) Protein tyrosine phosphatases. **Annu. Rev. Biochem.** **62**, 101-120.

Ward, J.M.; Pei, Z. and Schroeder, J.I. (1995) Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. **Plant Cell** **7**, 833-844.

Wolpert, L. (2000) *Princípios de biologia de desenvolvimento*.

Yamasaki, Y.; Konno, H and Masima, H. (1996) Purification and properties of  $\alpha$ -glucosidase from millet seeds. **Phytochemistry** **41:3**, 703-705.

Zapata, L.C.R. and Sotomayor, T.H. (1998) Detection of tyrosine phosphatase activity in *Catharanthus roseus* hairy roots. **Plant Physiol. Biochem.** **36:10**, 731-735.

Zheng, Y. and Duranti, M. (1995) Molecular properties and thermal secretion of lupin seed acid phosphatase. **Phytochemistry** **40:1**, 21-22.

***Bibliografia***

Yupasins, T.; Moustaks, M.; Glethlion, P.; Damianidon, K. (1994) Protein phosphorylation in alfafa seeds germinating under salt strees. **J. Plant Physiol.** **143**, 234-240.





# 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](#)