UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

Luciana de Campos Leite Medeiros



Este exen	nplar o	correspo	onde à re	edação final
da, tese	defend	lida pe	lo(a) ca	ndidato (a)
Rucian	- de	Campos	Seite	medeines
			10	
		'		
e aprovad	a nela	Comis	são Jula	adora

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular na área de concentração em Bioquímica

the who

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama Co-orientador: Dr. Celso Eduardo Benedetti

> Campinas 2008

SECRETARIA DE

PÓS-GRADUAÇÃO

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M466e	Medeiros, Luciana de Campos Leite Expressão e caracterização da proteína tirosina fosfatase de soja e análise do perfil quinômico de raízes em germinação / Luciana de Campos de Leite Medeiros. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.
	Orientadores: Hiroshi Aoyama, Celso Eduardo Benedetti. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Soja. 2. Raízes. 3. Germinação. 4. Proteína tirosina fosfatase. 5. Distribuição tecidual. I. Aoyama, Hiroshi. II. Benedetti, Celso Eduardo. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.
	(scs/ib)

Título em inglês: Expression and characterization of a protein tyrosine phosphatase from soybean and kinomic profile analysis of roots under germination process.

Palavras-chave em inglês: Soybean; Roots; Germination; Protein tyrosine phosphatase; Tissue distribution.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutora em Bioquímica.

Banca examinadora: Hiroshi Aoyama, José Mauro Granjeiro, Pietro Ciancaglini, Jörg Kobarg, Janaína Nicanuzia dos Prazeres.

Data da defesa: 29/08/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Molecular e Funcional.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama (orientador)

Dr. Jörg Kobarg

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

Dra. Janaína Nicanuzia dos Prazeres

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

Dr.Cláudio Martín Jonsson

Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé

Assinatura

natura sinatu ra Assinatura

Assinatura

ssinatura

Assinatura

Assinatura

Dedico este trabalho aos meus pais Wilson e Rosa - meus grandes exemplos de amor, educação e honestidade; à minha irmã Fernanda - minha melhor amiga e confidente e ao meu marido André - a companhia que escolhi para toda a minha vida e que sempre respeitou as minhas necessidades profissionais... Estes são os que me incentivaram todos os dias, fora do laboratório e que nunca deixaram de me dar apoio quando precisei. É impossível colocar em palavras tudo o que gostaria de dizer. Simplesmente, devo a vocês o amor que têm por mim que me transformou na pessoa e na profissional que sou hoje.

Soninha, Medeiros e Guto, também o dedico a vocês, que sempre demonstraram orgulho pelo que faço e com muito carinho me adotaram como membro da família.

Vocês todos confiaram e investiram na minha capacidade e este trabalho é o fruto da credibilidade e do afeto que sempre tiveram por mim!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Hiroshi, que além de orientador, foi como um segundo pai para mim durante estes anos de Bioquímica. Meu mentor, que me acolheu em seu laboratório, que me deu o exemplo de equilíbrio, sensatez e compreensão e foi o responsável pela formação e aprendizado que tive desde a iniciação científica.

À Profa. Carmen, que além de me auxiliar muito nas discussões e idéias do meu trabalho, foi uma grande amiga. Suas tiradas inteligentes e seu bom humor fizeram com que a pesquisa se tornasse uma tarefa muito mais fácil!

Ao meu co-orientador, Prof. Celso, que me mostrou a "luz no fim do túnel" quando tudo parecia estar dando errado! Muito obrigada por abrir as portas do seu laboratório e me dar muitas idéias e oportunidades.

Ao Prof. Maikel, sua esposa, Profa. Tita e a todo o grupo de pesquisa da UMCG, pela simpatia com que me receberam e me auxiliaram em todos os problemas de adaptação dos meus experimentos.

Ao Prof. Paulo Arruda, Profa. Maricilda de Mello, Prof. Gonçalo Pereira e Prof. Tomomasa Yano por gentilmente cederem seus laboratórios e reagentes para que a parte de Biologia Molecular fosse realizada.

Aos meus queridos amigos de trabalho da Bioquímica, de todo o departamento, em especial, Roberta, Daniella, Guga, Camila, Erika, Marilena, Claudinha, Gláucia, Daisy, Antônio, Paula, Karla, Ana, Willian, Bispo, Rodolpho, Cláudia, Denise, Mika, Rodrigo, Giselle, Kati, Thaisinha e Gilberto. Obrigada pela companhia em todos os momentos, dentro e fora do laboratório. Nos experimentos, na hora do almoço, nos congressos...

Aos amigos da época do CBMEG e do LNLS: Marcelo Surpili, Adriana, Alexandre, Andrés, Carol, Rosi, Marina, Natália, Aline, Tiago, Mariane, André, Tereza, Eugênia, Givanil, Zildene, Celisa, Andréia, Marcão, Tatiana, Juliana e Camila. Vocês são muito especiais! A convivência, tanto no trabalho quanto na vida pessoal me acrescentou muito, podem ter certeza.

Ao Renato, Willian e Antônio, pela prontidão em ajudar e pelas discussões intermináveis sobre Pepchip e sinalização.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Jörg, Profa. Maricilda e Dra. Gláucia, e da banca de examinadores da tese, Dra. Janaína, Prof. Mauro e Prof. Pietro, pelas sugestões que acrescentaram muito ao meu trabalho.

À FAPESP, que financiou minha pesquisa desde a iniciação científica.

À toda a minha família, campineiros, jundiaienses e porto-ferreirenses. Aos tios, tias, primos, primas e claro, à minha avó querida, que sempre estão torcendo por mim!

Aos meus amigos do Coral Zíper na Boca, pelas cantorias e amizade que cultivo até hoje. Vocês são como uma família para mim!

Ao pessoal da época da faculdade, especialmente à Fernanda e Helene, minhas grandes amigas.

Não posso deixar de agradecer minhas amigas "quase irmãs" que são minhas companheiras para o que der e vier! Sabrina, Anamaria, Juliana Pazinatto e Roberta. Vocês moram no meu coração!

Aos meus amigos Marcelo Enrico, Batista, Ricardo, Cinthya, Mário Renato, Juliana, Beto, Rejane, Aninha, Cazzoli, Marcelinho, Suzan, Andrezinho e toda essa turma maravilhosa que me incentivou e desejou o meu sucesso.

Agradeço a todos que fizeram parte da minha vida, que de alguma maneira me auxiliaram neste trabalho e torceram por mim e a Deus, enfim, por me dar mais esta vida e me agraciar com todas as oportunidades de crescimento do meu espírito e o das pessoas que me cercam.

"Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?" Fernando Pessoa

RESUMO

Em nosso laboratório foram purificadas quatro isoformas de fosfatases ácidas, a partir de sementes de soja quiescentes, tendo sido também estudadas suas propriedades cinéticas e físico-químicas. Estudos físicos e estruturais destas enzimas requerem uma grande quantidade da proteína pura, o que exigiria várias purificações convencionais, que, em geral, são bastante trabalhosas. Devido a este fato e a existência de poucas de tais proteínas clonadas e expressas, nos propusemos a clonar e expressar uma proteína tirosina fosfatase (PTP) de soja. O estudo da cinética da PTP recombinante revelou que esta enzima possui características típicas de uma fosfatase e maior especificidade para tirosina-fosfato em relação a outros substratos analisados. Foi feito o estudo de desnaturação térmica da enzima, através de dicroísmo circular, que mostrou que a enzima recombinante apresenta baixa estabilidade térmica. Identificamos por western blot a presença da GmPTP nos diferentes tecidos de soja, germinados tanto no claro como no escuro. Estes resultados, confrontados com os obtidos no PCR quantitativo, mostram uma expressão aumentada do tecido raiz, quando comparada aos outros tecidos avaliados, que está em concordância com o encontrado na literatura, referente à importância fisiológica da enzima neste tecido. Níveis adequados de fósforo são necessários para o crescimento e desenvolvimento de todos os organismos para o bom funcionamento de funções como estrutura molecular, geração de energia e regulação metabólica. A demanda por fósforo e sua consequente absorção do solo pelas raízes, aumenta dramaticamente durante o período de rápido crescimento e divisão, por exemplo, na germinação de sementes. Sendo assim, como supridores importantes de fósforo para o metabolismo da planta, podemos citar as fitases e fosfatases, que, além de contribuírem para prover nutrientes, as fosfatases também desempenham papel importante no controle de diferentes funções da planta, particularmente na regulação das cascatas de transdução de sinal. Utilizamos microarranjos de guinases como ferramenta para avaliação do quinoma da raiz nas plântulas de soja germinadas na presença e ausência de luz. Assim, concluímos que fatores ambientais, como a presença de luz e disponibilidade de nutrientes fazem com que diferentes vias estejam ativas e que diferentes fitormônios estejam agindo predominantemente. Relacionando as condições de germinação das plântulas de soja com esses fatores e às quinases mais ativadas no chip, propomos um modelo de sinalização onde o hormônio ácido abscísico responde ao estresse através da ativação de vias como as de MAPKs e de cálcio, causando modulação da atividade de fosfatases e quinases, resultando em respostas como proliferação e rearranjo do citoesqueleto das raízes. Neste trabalho, nós descrevemos a clonagem, expressão de uma de soja, sua caracterização cinética, localização tecidual e investigação da possível relação com a sinalização disparada pela presença ou ausência de luz. A investigação e caracterização de PTPs em plantas podem fornecer informações relevantes no campo de pesquisa do metabolismo vegetal. Sendo assim, nós disponibilizamos dados bioquímicos relevantes os quais sugerem que as plântulas de soja contêm PTP típicas que são principalmente expressas em raízes e aparentemente desempenham papel importante durante a germinação da semente.

Palavras-chave: Soja, Raízes, Germinação, Proteína Tirosina Fosfatase, Distribuição Tecidual.

ABSTRACT

Our group previously described the purification and characterization of four acid phosphatase isoforms obtained from mature soybean seeds, and determined the kinetic and physicochemical properties of these enzymes. Structural and physical studies demand high amounts at purity levels of these enzymes, requiring efforts in laborious conventional purifications. Due to this fact and to the existence of few plant proteins that already has been cloned and expressed, we proposed to clone and express a protein tyrosine phosphatase (PTP) from soybean. The kinetic studies of the recombinant PTP revealed an enzyme with phosphatase typical features and higher specificity toward Tyr-phosphate when compared to other analysed substrates. The analysis of thermal inactivation of the enzyme was carried out by circular dichroism, which showed that GmPTP had low thermal stability. The immunolocalization of GmPTP, by western blot, identified the enzyme in different soybean tissues, which were germinated in the presence and absence of light. These results are in agreement with those obtained from the quantitative PCR results, that showed a higher expression of GmPTP in roots when compared with other evaluated tissues. The physiological importance of this tissue to the plant metabolism corroborates our results, because adequate levels of phosphorus are required for the good operation of metabolic functions, as growth and development. The phosphorus demand and the consequent soil absorption through the roots dramatically increase in periods of high growth rate, for instance, during germination. Therefore, phytases and phosphatases are important suppliers for plant metabolism and besides the contribution to provide nutrients, phosphatases could play an important role in regulation of signal transduction cascades. Kinase microarrays were employed as a strong tool to analyse the root kinome in soybean plantlets germinated in light and dark conditions. We concluded that abiotic factors as light presence and nutrients availability were responsible for the activation of different pathways and different phytormones prevalence. Relating the germination conditions of soybean plantlets to these factors and to the analysis of the most activated kinases on the chip, we propose a signaling model to explain that, when the hormone abscisic acid is the main response of stress stimuli, it triggers the activation of MAPK and calcium signaling, and the resulting modulation of kinases and phosphatases activities led to proliferation and cytoskeleton rearrangement in roots. In this work, we described the cloning and expression of a soybean PTP, its kinetic characterization, tissue distribution and investigation of a putative relationship with the signaling pathway triggered by light and dark. The investigation and characterization of PTPs from plants can add relevant information in the plant metabolism research field. Therefore, we provided a wealth biochemical data which suggest that soybean plantlets contain typical PTP, which is mainly expressed in roots and apparently plays a critical role during germination.

Key words: Soybean; Roots; Germination; Protein Tyrosine Phosphatase; Tissue Distribution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de catálise das proteínas tirosina fosfatases. Estado de transição para a transferência fosforil inicial do substrato para o resíduo de cisteína do sítio ativo da PTP. A alça PTP consiste de resíduos (H/C) C (X5) R (S/T) na seqüência consenso. A arginina do sítio ativo tem função de ligação ao substrato e estabilização do estado de transição. O resíduo ácido aspártico da alca flexível sofre mudanca conformacional permitindo melhor interação da enzima com o substrato. Retirado de Aoyama et al., 2003......5 Figura 2. Reacões de produção das formas oxidadas do resíduo de cisteína. O resíduo de cisteína presente no sítio ativo de proteínas tirosina fosfatases é suscetível à oxidação reversível (formação do ácido sulfênico) ou irreversível (formação do ácido sulfínico e sulfônico), dependendo da concentração e/ou tempo de exposição. (Figura retirada de Aoyama et al., 2003).7 Figura 3. Alinhamento de sequência de PTPs de plantas com PTPs representativas de outros organismos. Os organismos utilizados foram rato, humano e camundongo (A). Alinhamento da região N-terminal de PTPs de soja, feijão, ervilha e Arabidopsis (B). Resíduos idênticos (5 ou mais), em determinada posição, são mostrados em fundo cinza-escuro e regiões conservadas entre as PTPs de planta estão mostradas em fundo cinza-claro. Os asteriscos mostram as regiões que são comuns a todos os organismos analisados, que são motivos conservados importantes para a Figura 4. Esquema do Pepchip®. (A) Esquema mostrando a distribuição dos "spots" na lâmina do Pepchip. Em cada "set" estão presentes 1176 "spots" (peptídeos consenso). (B) Os peptídeos consenso de substratos de proteínas quinases são ligados à lâminas de vidro. A atividade Figura 5. Extremidade 5' do gene da GmPTP em relação ao vetor pProEx-HTa. A seta indica o sítio de restrição da extremidade 5' (EcoRI) onde o gene da GmPTP foi inserido. O códon iniciador indicado está in frame em relação ao gene da GmPTP......27 Figura 6. Análise de expressão em pProEx-HTa e Cromatograma da purificação. A. SDS-PAGE 12,5% das alíquotas para análise de expressão com IPTG de pProEx-PTP, corado com Coomassie Blue. M=marcador de massa molecular, a= pProEx-HTa (controle sem inserto); b= pProEx-PTP 1. Sobrenadante; 2. Insolúvel; 3. Eluição da Resina; 4. flow through (extrato não retido na coluna). A seta indica a GmPTP produzida na porção insolúvel após indução (~38kDa). B.Cromatografia de afinidade com resina ligada à Ni²⁺, foi utilizado 1mL de resina Ni-Sepharose. Entre as frações 1-7 e 21-27 houve eluição do flow through e GmPTP, respectivamente. A curva em preto indica a dosagem de proteínas a 280 nm das frações coletadas. A curva em vermelho Figura 7. Análise de expressão em pGEX-4T1 e Cromatograma da purificação. A.Cromatografia de afinidade com a resina Glutationa Sepharose, realizada conforme Métodos 3.2.6. B. SDS-PAGE 12,5% das alíquotas para análise de expressão com IPTG de pGEX-4T1, corado com Coomassie Blue. M=marcador de massa molecular, 1. Insolúvel, 2. Flow through (extrato não retido na coluna), 3-9 Frações eluídas da coluna. A seta indica a posição esperada para a GmPTP produzida (~64kDa). B.Cromatografia de afinidade com resina ligada à glutationa, foi utilizado 1mL de resina glutationa-Sepharose. Entre as frações 1-4 e 5-11 houve eluição do flow through e GmPTP, respectivamente. A curva em preto indica a dosagem de proteínas a 280 nm das frações coletadas. A curva em vermelho mostra a dosagem de atividade das frações Figura 8. Confirmação da digestão da GmPTP por trombina, a 4ºC. SDS-PAGE 12,5% dos eluídos após digestão com variadas concentrações de trombina, corado com Coomassie Blue.

M=marcador de massa molecular, 1. Controle após 24h (sem trombina); 2. Controle tempo zero

(sem trombina); 3. amostra após 6 horas de digestão; 4. após 12h; 5. após 18h; 6. após 24h. As Figura 9. Confirmação da segunda e terceira etapa de purificação. A. SDS-PAGE 12,5% dos eluídos após segunda etapa de purificação, corado com Coomassie Blue. M=marcador de massa molecular, 1 e 2 = flow through (GmPTP clivada, não retida na coluna), 3 e 4= frações eluídas. **B**. SDS-PAGE 12,5% da GmPTP após concentração, corado com Coomassie Blue. M=marcador de massa molecular, PTP=GmPTP concentrada. As setas indicam a massa molecular da GmPTP concentrada e dos contaminantes da amostra, GmPTP fusionada (GmPTP+GST) e GST.32 Figura 10. Potenciais sítios de N-glicosilação da GmPTP. A. Potencial de N-glicosilação X Posição na sequência de aminoácidos. O "threshold" (linha vermelha) indica o limiar mínimo para consideração dos Potenciais (linha azul). B. Análise dos valores de Potenciais gerados pela rede NetNGlyc 1.0. Os sinais de menos (-) indicam ausência de glicosilação e os sinais de mais (+) indicam glicosilação. O quadro vermelho mostra a posição com maior confiabilidade de Figura 11. Efeito do pH na atividade das enzimas. O ensaio foi realizado conforme descrito em Métodos 3.2.7, utilizando-se pNPP como substrato. Foram utilizados os tampões 100mM: Glicina (pH 2,5 e 9,0), Acetato (pH 4,0-5,5), Bis-Tris (pH 6,0) e Imidazol (pH 7,0 e 8,0). As espécies tamponantes não afetaram a atividade em nenhum momento. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro mostram que os resultados apresentaram desvio padrão menor que Figura 12. Efeito de potenciais inibidores na atividade da PTP recombinante .A atividade enzimática na ausência dos inibidores foi considerada 100% (controle) e determinada como descrito em Métodos 3.2.7. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro Figura 13. Efeito de íons metálicos na atividade da PTP recombinante. A atividade enzimática na ausência dos íons foi considerada 100% (controle) e determinada como descrito em Métodos 3.2.7. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro mostram que os Figura 14. Efeito de compostos na atividade da PTP recombinante. A atividade enzimática na ausência dos compostos foi considerada 100% (controle) e determinada como descrito em Métodos 3.2.7. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro mostram que os Figura 15. Efeito de substratos na atividade da PTP recombinante. A atividade enzimática com o substrato pNPP foi considerada 100% (controle) e determinada como descrito em Métodos 3.2.7. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro mostram que os Figura 16. Estudo da pré-incubação da isoforma AP1 de sementes quiescentes de soja. A enzima foi pré-incubada com GSH 5 mM e/ou agentes oxidantes durante 10 minutos a 37°C. Após esse tempo, a atividade enzimática foi determinada conforme Métodos 3.2.7. (Os agentes oxidantes foram adicionados após 10 minutos de incubação da enzima com o GSH). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro mostram que os resultados Figura 17. Representação gráfica do modelo de oxidação proposto para a PTP de soja por Figura 18. Análise de Dicroísmo Circular da GmPTP. Espectro da proteína com 0,8mg/mL. 50 Figura 19. Predição de estrutura secundária da GmPTP utilizando a ferramenta PSIPRED (McGuffin et al., 2000). As barras (1^a linha) correspondem à confiabilidade da predição; a linha, o

cilindro e a seta (2^a linha), correspondem, respectivamente, às porções desenoveladas, em α hélice e em folha β, identificadas pelas letras C, H e E (3ª linha) respectivamente; na 4ª linha estão Figura 20. Sobreposição de espectros de dicroísmo circular da GmPTP. Os espectros foram medidos em cada temperatura: 4°C; 14°C; 24°C; 34°C; 44°C; 54°C; 64°C; 74°C; 84°C. As setas curtas indicam o pico de 222nm diminuindo de acordo com o aumento da temperatura no intervalo de 4°C a 84°C. A seta longa (34°C) indica o início da perda de estrututra secundária da Figura 21. Titulação e sensibilidade do anticorpo anti-PTP. A. Autorradiografia da membrana contendo 2µg da fração purificada da PTP recombinante identificada por variadas concentrações de anticorpo. A seta indica a banda correspondente à PTP recombinante (~40kDa). B. Autorradiografia da membrana contendo variadas concentrações da PTP recombinante. Os números de 1-6 correspondem respectivamente às concentracões de GmPTP: 1,6µg, 320ng, 64ng, 12,8ng, 2,6ng, 512pg e 102pg. A seta indica a banda correspondente da PTP recombinante Figura 22. Imunolocalização da GmPTP em tecidos de soja. Autorradiografia da membrana contendo 100 µg dos tecidos de soja: 1= raiz; 2=hipocótilo; 3=cotilédone e 4=folha; S= semente; Figura 23. Determinação da massa molecular da GmPTP. A migração (em cm) foi medida para cada proteína na membrana após revelação, de acordo com Métodos 3.2.10, utilizando o padrão de massa molecular contendo: β -galactosidase (116kDa), albumina de soro bovino (66,2kDa), ovalbumina (45kDa), lactato desidrogenase (35kDa), endonuclease de restrição Bsp981 (25kDa), β-lactoglobulina (18.4kDa) e lisozima (14.4kDa). A banda da GmPTP foi reconhecida Figura 24. Análise de qPCR por plotagem de amplificação (ARn X Número do ciclo). A linha vermelha horizontal foi traçada automaticamente pelo software de análise para servir de base para Figura 25. Quantificação relativa da expressão da GmPTP em diferentes partes da plântula. As barras de erro mostram que os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%......60 Figura 26. Escaneamento dos arranjos de peptídeo de lâminas "Pepchip Kinase I". Os extratos das raízes foram adicionados sobre os chips. Após a reação, os PepChips foram lavados, secos e expostos por 5 dias. Após a exposição, as lâminas foram escaneadas pelo Phosphorimager Storm (GE Healthcare/Amersham). Cada "spot" representa a fosforilação de um substrato específico pela quinase presente no lisado. A= Lisado de raízes germinadas no escuro, B= Lisado de raízes germinadas no claro, C= Sobreposição das lâminas A (vermelho) e B (verde)......62 Figura 27. Visão geral do perfil de fosforilação de substratos de acordo com a provável quinase envolvida. (n=175, p<0,05) Lisados de raízes germinadas tanto na ausência quanto na presença de luz foram usados para determinar o perfil fosfoproteômico através do arranjos de Figura 28. Interações previstas pela base de dados STRING. As proteínas analisadas foram MAPK (MAPK1), Calmodulina (CALM1), PKC (PRKCA), PKA (PRKACG), e SHP-1 (PTPN6). Figura 29. Esquema do modelo proposto de sinalização em raízes de plântulas de soja germinadas no escuro. ABA afeta a morfogênese de raízes em desenvolvimento. Ele causa um aumento na concentração de Ca²⁺ no citoplasma de origem extracelular e intracelular (retículo endoplasmático) e paralelamente pode estar diretamente ativando fatores de transcrição. Os íons de Ca^{2+} , então, se ligam à calmodulina e formam o complexo Ca^{2+} -calmodulina. Este complexo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de consenso do sítio ativo para os três principais subgrupos na
superfamília das tirosina fosfatases
Tabela 2. Resumo dos genes que codificam proteínas fosfatases em Arabidopsis e humanos.
Retirado de Kerk <i>et al.</i> , 2008
Tabela 3. Lista resumida da família das MAPKs em plantas. Ativação, cascata envolvida e
alvos. ND=não determinado. (Retirada de Colcombet e Hirt, 2008)12
Tabela 4. Primers utilizados na clonagem do gene da GmPTP e qPCR
Tabela 5. Tabela de purificação. Purificação da GmPTP expressa em <i>E. coli</i> , a partir de 250 mL
de cultura. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentaram desvio
padrão menor que 5%
Tabela 6. Efeito de DTT na estabilidade das frações eluídas da coluna de afinidade. A
atividade enzimática das frações foi dosada segundo métodos, após estocagem das mesmas a 4°C
por 24 h na ausência e presença de DTT 1 mM. O tempo de incubação foi de 15 minutos, a 37°C.
O controle (100%) corresponde à atividade logo após a eluição da coluna. Os experimentos foram
realizados em triplicata e os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%34
Tabela 7. Comparação do pH ótimo da PTP recombinante com as isoformas purificadas de
sementes quiescentes de soja
Tabela 8. Comparação entre Km, Vmáx e constante de especificidade (Vmáx/Km) da
enzima recombinante (GmPTP) com as das isoformas purificadas de sementes quiescentes
de soja. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentaram desvio
padrão menor que 5%
Tabela 9. Comparação do efeito de potenciais inibidores da atividade na PTP recombinante
de soja com as isoformas purificadas de sementes quiescentes de soja. ND = não determinado.
Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentaram desvio padrão menor
que 5%
Tabela 10. Comparação do efeito de ions metálicos da atividade na PTP recombinante de
soja com as isoformas purificadas de sementes quiescentes de soja. Os experimentos foram
realizados em triplicata e os resultados apresentaram desvio padrao menor que 5%
Tabela 11. Comparação do efeito de compostos na atividade da PTP recombinante de soja
com as isoformas purificadas de sementes quiescentes de soja. Os experimentos foram
realizados em triplicata e os resultados apresentaram desvio padrao menor que 5%
Tabela 12. Estudo da especificidade por substratos. As atividades foram determinadas como
descrito em Metodos 3./, na presença de 10mM de cada substrato. A atividade quando o pNPP foi
utilizado como substrato foi considerada 100%. AP1, AP2, AP3A e AP3B sao as quatro isoformas
purificadas de semente de soja. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados $1 - 1 - 5$
apresentaram desvio padrao menor que 5%
Tabela 13. Amplificação diferencial (Ct) dos mRNAs. Os valores de amplificação,
7000 Instrument (Applied Dissustance)
Tobolo 14 Dentídeog congenço que demonstrario mesion fectorilezão
rapera 14. repudeos consenso que demonstraram maior iosiornação pelas quinases
presentes no extrato de amostras germinadas no escuro em reiação ao ciaro

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido Abscísico
ADF	Fator de Despolimerização de Actina
AMr	Alta Massa Molecular relativa
AP1	Fosfatase ácida de semente de soja - Isoforma 1
AP2	Fosfatase ácida de semente de soja - Isoforma 2
AP3A	Fosfatase ácida de semente de soja - Isoforma 3A
AP3B	Fosfatase ácida de semente de soja - Isoforma 3B
ATP	Adenosina Trifosfato
BME	β-mercaptoetanol
CaM	Calmodulina
CD	Dicroísmo Circular
CD45	Proteína Tirosina Fosfatase específica tipo receptor
CDC25	PTP de dupla especificidade reguladora de quinases dependentes de ciclinas
cDNA	DNA complementar
ConA	Concanavalina A
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DsPTP	Proteína Tirosina Fosfatase de dupla especificidade
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido Etilenoglicol tetra-acético
ERK	Proteína Quinase Ativada por Sinal Extracelular
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GA	Ácido Giberélico
GmPTP	PTP recombinante de <i>Glycine max</i>
GSH	Glutationa Reduzida
GSSG	Glutationa Oxidada
GST	Glutationa S-Transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IPTG	Isopropil-tiogalactopiranosídeo
JNK/SAPK	Quinase c-Jun terminal ou Proteína Quinase Ativada por Estresse
Ki	Constante de inibição
Km	Constante de Michaelis-Menten
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MAPKK	MAPK quinase
MAPKKK	MAPKK quinase
MOPS	Acido (morfolino) propanosulfônico
MPK1	MAPK tostatase
Mr	Massa molecular relativa
mRNA	RNA mensageiro
p38	subfamília das MAPKs
PAP	Fosfatase Acida Púrpura

<i>p</i> CMB	<i>p</i> -cloromercuribenzoato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PEP	Fosfoenolpiruvato
P _i	Fosfato inorgânico
РКА	Proteína Quinase A
РКС	Proteína Quinase C
PKG	Proteína Quinase dependente de GMP
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonila
pNP	<i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
PP1	Fosfoproteína Fosfatase Serina/Treonina Específica 1
PP2A	Fosfoproteína Fosfatase Serina/Treonina Específica 2
PP2B	Fosfoproteína Fosfatase Serina/Treonina Específica 2B
PP4	Fosfoproteína Fosfatase Serina/Treonina Específica 4
PP5	Fosfoproteína Fosfatase Serina/Treonina Específica 5
PP6	Fosfoproteína Fosfatase Serina/Treonina Específica 6
PP7	Fosfoproteína Fosfatase Serina/Treonina Específica7
PP _i	Pirofosfato
PPM	Fosfoproteína Fosfatase dependente de Mg ²⁺
PPP	Fosfoproteína Fosfatase Serina/Treonina Específica
PSIPRED	Servidor de Predição de Estrutura de Proteínas
PTK	Proteína Tirosina Quinase
PTP	Proteína Tirosina Fosfatase
PTP BMr	PTP de Baixa Massa Molecular relativa
PTP1B	Proteína Tirosina Fosfatase citoplasmática
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
qPCR	PCR em tempo real
RLKs	Quinases tipo receptor
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Transcriptase Reversa - PCR
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
SHP-1	PTP com domínio homólogo à Src
SHP-2	PTP com domínio homólogo à Src -2
Tyr-P	Tirosina fosfato
UV	Ultravioleta
VH1	Fosfatase Vaccinia virus
Vmax	Velocidade máxima

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Visão Geral das Fosfatases	1
1.2 PTPs em animais	2
1.2.1 PTPs específicas	
1.2.2 PTPs com dupla especificidade	4
1.2.3 PTPs de baixa massa molecular relativa	4
1.2.4 Estrutura e Mecanismo Catalítico das PTPs	5
1.2.5 Regulação da Atividade das Proteínas Tirosina Fosfatases	6
1.2.5.1 Fosforilação	6
1.2.5.2 Oxidação transiente	6
1.3 PTPs em Plantas	7
1.3.1 PTPs, MAPKs e Sinalização em Plantas	11
1.3.2 Regulação de PTPs de plantas pela oxidação	13
1.4 Presença e importância de fosfatases em raízes	13
1.5 Caracterização das isoformas de fosfatase ácida de soja	14
1.6 Microarranjos de Peptídeos (PepChip®) como Ferramenta para Estudos de Sinalização Celular	Vias de
2 OBJETIVOS	17
2 ODJE11 00	•17
3 MATERIAL E METODOS	.18
3.1 Material	
3.2 Métodos	
3.2.1 Germinação de Soja	
3.2.2 Extração de RNA total	
3.2.3 Clonagem da GmPTP	
3.2.4 Subclonagem e Transformação em bactérias	19
3.2.5 Expressão da GmPTP	19
3.2.6 Purificação da GmPTP	19
3.2.7 Estudos Cinéticos da GmPTP	
3.2.8 Liofilização e obtenção do anticorpo anti-PTP	
3.2.9 Dicroísmo Circular	
3.2.9.1 Análise da Estrutura Secundária	
3.2.9.2 Análise de Desenovelamento Térmico	21
3.2.10 Western Blot	21
3.2.11 PCR em Tempo Real (qPCR)	
3.2.12 Microarranjos de peptídeos- PepChip®	
4 RESULTADOS e DISCUSSAO	.27
CAPÍTULO 1: CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA	A GmPTP
	27
4.1 Clonagem da GmPTP	
4.1.1 Seqüenciamento	
4.2 Expressão e purificação da GmPTP	
4.3 Estudos Cinéticos da GmPTP	
4.3.1 Efeito do pH	
4.3.3 Efeito de Inibidores	

SUMÁRIO

4.3.4 Efeito de Íons Metálicos	41
4.3.5. Efeito de Compostos	43
4.3.6 Efeito de Substratos	45
4.3.7 Efeito de Agentes Oxidantes	46
4.4 Dicroísmo Circular (CD)	49
4.4.1 Análise da Estrutura Secundária	49
4.4.2 Análise de Desenovelamento Térmico	
CAPÍTULO 2: LOCALIZAÇÃO TECIDUAL E PEPCHIP	55
4.5.1 Titulação e Sensibilidade do Anticorpo	55
4.5.2 Distribuição Tecidual da GmPTP	56
4.6 PCR em Tempo Real (qPCR)	
4.6.1 Distribuição Tecidual na Presença de Luz	
4.7 Microarranjos de Peptídeos - Quinoma da Raiz (Pepchip®)	61
4.7.1 Cascata de sinalização pela via de MAPKs e Ca ²⁺	65
5 CONCLUSÕES	
6 PERSPECTIVAS	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS71	
APÊNDICE I Tabela de Resultados do Pepchip®78	
APÊNDICE II Artigo	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Visão Geral das Fosfatases

As fosfatases são hidrolases que utilizam fosfomonoésteres como substratos, as quais estão amplamente distribuídas na natureza, tendo sido encontradas em animais (Kozlenkov *et al.*, 2002), vegetais (Luan, 2003) e em procariotos (Kennelly, 2002). Estas enzimas podem ser divididas em 3 grupos principais: fosfatases alcalinas, fosfatases ácidas e proteínas fosfatases (Jia, 1997, Aoyama *et al.*, 2003, Mizoguchi *et al.*, 2006).

As fosfatases alcalinas apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 9,0. Atuam sobre substratos de baixa massa molecular relativa, no entanto, há necessidade de íons divalentes para catálise, como magnésio, cobalto ou manganês.

As fosfatases ácidas de mamíferos podem ser classificadas de acordo com a massa molecular relativa (Mr) e inibição, como fosfatase ácida de alta Mr (acima de 100 kDa), Mr intermediária (20 a 100 kDa) e baixa Mr (menor que 20 kDa) e são inibidas pelo tartarato, fluoreto e *p*-cloromercuribenzoato (*p*CMB), respectivamente. As fosfatases ácidas de alta e intermediária Mr podem apresentar nas suas estruturas ferro, zinco ou magnésio e algumas vezes carboidratos.

A classificação das proteínas fosfatases é muito bem estabelecida em animais e, assim, com base na função, estrutura, seqüência, especificidade, ativadores e inibidores, as proteínas fosfatases podem ser agrupadas em três grandes grupos: proteínas serina/treonina fosfatases (Golden *et al.*, 2008), fosfatases da classe aspartil (Rayapureddi *et al.*, 2005, Kerk *et al.*, 2008) e proteínas tirosina fosfatases (PTPs) (Raugei *et al.*, 2002, Tabernero *et al.*, 2008). As proteínas serina/treonina fosfatases compreendem duas famílias de genes chamados PPP, as fosfoproteínas fosfatase Ser/Thr-específicas e PPM, as fosfoproteínas fosfatases Mg²⁺-dependentes. A família PPP se divide em seis subtipos: PP1, PP2A e PP2B, PP4, PP5, PP6 e PP7, baseados nas suas características bioquímicas, sensibilidade a inibidores e substratos específicos (Mickey *et al.*, 2001). A proteína serina/treonina PP2C, piruvato desidrogenase fosfatase e outras Mg²⁺ dependentes à família PPM. As fosfatases da classe aspartil, recentemente descobertas, usam o aspartato como nucleófilo em uma reação metal-dependente e são exemplificadas pelas "Eyes Absent Proteins" (EYA) (Rayapureddi *et al.*, 2003).

1.2 PTPs em animais

As proteínas tirosina fosfatases (PTPs) são uma grande família de enzimas (> 100) responsáveis pela hidrólise do fosfato ligado a resíduos de tirosina em proteínas. São estruturalmente diversas, incluindo a citoplasmática e tipo receptor, com a capacidade de transmitir sinais diretamente a enzimas de membrana e citoplasma, controlando diversos processos celulares (Zhang, 2002). As proteínas tirosina fosfatases são caracterizadas por aproximadamente 240 aminoácidos e possuem um domínio altamente conservado com uma següência consenso no sítio catalítico característico desta família ([I/V]HCXAGXXR[S/T]G), onde I – isoleucina, V valina, H - histidina, C - cisteína, A - alanina, G - glicina, R - arginina, S - serina, T - treonina e X - qualquer aminoácido, compartilhando um padrão de sítio ativo constituído de uma cisteína e uma arginina, que são essenciais para a catálise enzimática. A presença da cisteína (C) no sítio ativo é responsável pela característica comum das proteínas tirosina fosfatases, que é a de serem inibidas pelo pervanadato, pCMB e outros agentes oxidantes (van Montfort et al., 2003, den Hertog et al., 2005). Várias estruturas tridimensionais de PTPs foram determinadas e têm ajudado a entender a função da PTP em nível molecular, por definir as interações que estabilizam a estrutura do sítio ativo e a formação do complexo enzima-substrato. Estudos bioquímicos e genéticos indicam que PTPs exercem efeitos positivos e negativos nas vias de sinalizações e participam de papéis fisiológicos cruciais em uma variedade de células e tecidos de mamíferos. Uma única PTP pode regular múltiplas vias de sinalização, ou uma via chave pode ser regulada por diversas PTPs (Tonks, 2006, Tabernero et al., 2008). Com base na função, estrutura e següência, as proteínas tirosina fosfatases podem ser agrupadas em três famílias principais: proteínas tirosina fosfatases específicas; proteínas fosfatases com dupla especificidade e proteínas fosfatases de baixa massa molecular relativa (Raugei et al., 2002). Estas famílias apresentam regiões de consenso na seqüência de aminoácidos, principalmente do sítio ativo, os quais são resumidos na Tabela 1.

Subgrupo	Ácido Geral		Padrão do sítio ativo	Seqüências conhecidas	
PTP (específica)	sWP D h	X ₂₄	PIVV HC SAGvG RT G	103	
CDC25 (dual)	yII D C	X40	liVFhCEFSseRPG	22	
PTP de BMr	dle D P	X-95	SVIfVCIGNiC RS P	14	

Tabela 1. Seqüência de consenso do sítio ativo para os três principais subgrupos na superfamília das tirosina fosfatases.

As letras em maiúsculo representam os resíduos altamente conservados (90% das seqüências possuem o resíduo idêntico ou um aminoácido similar). O número x_n refere-se ao número de resíduos de aminoácidos entre o ácido geral e o sítio ativo; nas PTPs de BMr, o ácido geral vem após a alça do sítio ativo na seqüência de aminoácidos, sendo indicado pelo número negativo. Em negrito, estão representados os aminoácidos essenciais para catálise, como o aspartato (D), cisteína (C) e arginina (R). Retirado de Aoyama *et al.*, 2003.

1.2.1 PTPs específicas

Estas enzimas hidrolisam resíduos Tyr-P alvos, são as enzimas melhor estudadas na superfamília das PTPs e apresentam alta massa molecular relativa (AMr). Estão envolvidas em várias vias de sinalização e, nos últimos anos, mais de 112 PTPs foram isoladas e seqüenciadas a partir de diversos organismos incluindo bactérias, leveduras, nematóides, insetos e vertebrados. Todas apresentam um domínio catalítico de aproximadamente 240 resíduos de aminoácidos, dos quais 71 são altamente conservados. (Tiganis e Bennett, 2007)

A família das PTPs específicas é ainda subdividida em dois grupos: proteínas tirosina fosfatases tipo receptor e citoplasmáticas. As estruturas apresentam em comum 7 folhas β torcidas e flanqueadas por oito α -hélices, tendo na porção central a alça contendo o padrão Cx5R. O alto grau de similaridade entre estas diferentes PTPs sugere que todos os membros desse subgrupo sejam muito parecidos (Zhang, 2002). As PTPs tipo receptor (CD45, PTP α e PTP γ) são enzimas modulares, consistindo de um segmento extracelular, caracterizado pela presença de motivos semelhantes àqueles presentes em domínios de moléculas de adesão, como fibronectina, estando, portanto, envolvidas na comunicação célula-célula e transdução de sinal (Alexander, 2000); seguido de um segmento transmembranar simples e um ou dois domínios catalíticos intracelulares. As PTPs citossólicas (PTP1B, VH1 e SHP), classe onde está contida a PTP recombinante (GmPTP) objeto deste estudo, freqüentemente contêm domínios extra catalíticos, que podem estar envolvidos diretamente na regulação da atividade catalítica ou servindo no endereçamento e reconhecimento do substrato. Por exemplo, as PTPs SHP-1 e SHP-2 possuem um par de domínios SH₂ responsáveis pela ligação com proteínas contendo tirosina fosforilada, incrementando sua

capacidade catalítica; as PTP1B e a PTP da célula T possuem segmentos C-terminal hidrofóbicos, que restringem a localização da enzima à região do retículo endoplasmático (Chong e Maiese, 2007). As PTPs podem ainda sofrer fosforilação do domínio não catalítico, causando modificações na atividade catalítica ou na localização celular. Outra característica marcante das PTPs é a capacidade de hidrolisar 100.000 vezes mais rápido a fosfotirosina do que a fosfoserina ou fosfotreonina. Isto se deve possivelmente à presença de resíduos de aminoácidos próximos ao sítio ativo, criando uma "bolsa", dentro da qual somente a fosfotirosina pode penetrar e sofrer a hidrólise; esta região (resíduos de 43-46, KNRY) é denominada "região de reconhecimento da fosfotirosina" (den Hertog *et al.*, 2008).

1.2.2 PTPs com dupla especificidade

São capazes de hidrolisar fosfatos monoésteres de peptídeos contendo fosfotirosina e fosfoserina/treonina, possuindo mais afinidade por fosfotirosina. Esta característica dual parece estar associada à menor profundidade do sítio ativo de, aproximadamente, 6 Å nas PTPs de especificidade dual e 9 Å nas PTPs específicas. Essas enzimas participam da regulação de sinais mitogênicos e desempenham papel importante no controle do ciclo celular (MKPs e cdc25). (Pulido *et al.*, 2008)

1.2.3 PTPs de baixa massa molecular relativa

As PTPs de baixa massa molecular relativa são as mesmas fosfatases ácidas de baixa massa molecular relativa, descritas anteriormente, possuindo massa molecular abaixo de 20 kDa e sendo inibidas por *p*CMB. Esta constatação foi determinada por Chernoff e Li, em 1985.

Estas enzimas não compartilham nenhuma homologia de seqüência com qualquer outra PTP, exceto pelo padrão de sítio ativo e mesmo mecanismo de catálise. Hidrolisam resíduos de tirosina e possuem um importante papel na regulação da proliferação celular, uma vez que a alta expressão desta enzima inibe a proliferação de células normais e transformadas (Zhang, 2002, Raugei *et al.*, 2002). Estudos cinéticos e estruturais detalhados das subfamílias das PTPs revelaram um mecanismo químico comum para reações catalisadas por estas enzimas (Figura 1). Além disso, as proteínas tirosina fosfatases possuem uma variedade estrutural de domínios, incluindo SH2 e domínios extracelulares ligantes.

1.2.4 Estrutura e Mecanismo Catalítico das PTPs

Estudos cinéticos, mutação sítio-dirigida e identificação das estruturas das PTPs permitiram identificar a cisteína, a arginina e o aspartato como resíduos extremamente importantes para catálise. Estudos abordando os mecanismos das PTPs de Yersinia, PTP1B, VHR (dupla especificidade) e fosfatase de baixa massa molecular relativa sugerem que todas PTPs compartilham um mecanismo comum para efetuar catálise, utilizando a cisteína do sítio ativo como um nucleófilo na formação de um intermediário tiofosforil (enzima-fosfato). O resíduo de arginina na seqüência assinatura tem função de se ligar ao substrato, estabilizando o estado de transição. Tanto a etapa de formação do complexo fosfoenzima, quanto a sua hidrólise são auxiliadas pelo ácido aspártico presente no sítio ativo (Figura 1) (Asthagiri *et al.*, 2002, McCain *et al.*, 2004)



Figura 1. Mecanismo de catálise das proteínas tirosina fosfatases. Estado de transição para a transferência fosforil inicial do substrato para o resíduo de cisteína do sítio ativo da PTP. A alça PTP consiste de resíduos (H/C) C (X5) R (S/T) na seqüência consenso. A arginina do sítio ativo tem função de ligação ao substrato e estabilização do estado de transição. O resíduo ácido aspártico da alça flexível sofre mudança conformacional permitindo melhor interação da enzima com o substrato. Retirado de Aoyama *et al.*, 2003.

1.2.5 Regulação da Atividade das Proteínas Tirosina Fosfatases

1.2.5.1 Fosforilação

Um mecanismo geral da regulação da atividade PTP é através da fosforilação. A fosforilação de resíduos de serina/treonina específicos pode regular as PTPs, de modo negativo ou positivo. Já se encontra descrita a ativação de várias PTPs pela fosforilação, incluindo PTP-1B e SHP-1 (Ostman e Böhmer, 2001)

1.2.5.2 Oxidação transiente

A oxidação reversível da PTP é um mecanismo de regulação da atividade desta enzima. A inibição *in vitro* ocorre por vários oxidantes, incluindo H_2O_2 , o qual atua como modulador oxidativo do resíduo de cisteína presente no sítio catalítico, causando alteração reversível deste resíduo, com produção do ácido sulfênico (Figura 2). Novas oxidações deste produto formado levam à produção dos ácidos sulfínico e sulfônico, que são produtos da oxidação irreversível (Weibrecht *et al.*, 2007). O resíduo de cisteína presente no sítio catalítico também pode participar de outro mecanismo de regulação reversível, que é a formação de pontes dissulfeto, como ocorre com a cdc25 (Savitsky e Finkel, 2002). A oxidação do resíduo de cisteína do sítio ativo pelo H_2O_2 tem sido identificada como um regulador negativo de PTP (Salmeen e Barford, 2005). Outros estudos mostram que a inibição de PTPs pelo H_2O_2 tem, também, um importante papel na sinalização via receptor tirosina quinase (RTK) (Sundaresan e Farndale, 2002). Diferentes PTPs podem ser inibidas através da irradiação UV em células intactas. A geração de espécies reativas de oxigênio induzida por UV e subseqüente oxidação reversível de PTP(s) foi proposta como um mecanismo de regulação da atividade (den Hertog *et al.*, 2005).



Figura 2. Reações de produção das formas oxidadas do resíduo de cisteína. O resíduo de cisteína presente no sítio ativo de proteínas tirosina fosfatases é suscetível à oxidação reversível (formação do ácido sulfênico) ou irreversível (formação do ácido sulfínico e sulfônico), dependendo da concentração e/ou tempo de exposição. (Figura retirada de Aoyama *et al.*, 2003)

1.3 PTPs em Plantas

Tanto proteínas quinases quanto proteínas fosfatases foram originalmente descobertas em sistemas animais. Estudos mais recentes em plantas têm demonstrado a função e estrutura única destas enzimas no desenvolvimento planta-específico e em processos fisiológicos.

Em 1996, Smith e Walker publicaram uma revisão sobre proteínas fosfatases em plantas, mostrando que modificações pós-traducionais de proteínas por fosforilação é um mecanismo universal para a regulação de diversas funções biológicas, bem como discutiram avanços no entendimento da estrutura, regulação e função dessas proteínas em vegetais.

Apesar de tirosinas quinases típicas não terem sido encontradas em plantas, em animais o grande número de proteínas quinases e suas funções são conhecidas há anos. De um modo geral,

pouco se sabe a respeito de proteínas fosfatases em plantas superiores e o número, diversidade e função destas vêm sendo valorizadas apenas recentemente (Luan, 2003).

A primeira tirosina fosfatase de planta foi caracterizada em *Arabidopsis* em 1998 (Xu *et al.*), dez anos depois das PTPs terem sido identificadas em células animais (Tonks *et al.*, 1988). Após o genoma de *Arabidopsis* ter sido revelado, foram identificados mais de 20 genes que codificam proteínas com centro catalítico típico de PTPs (Kerk *et al.*, 2002, Luan, 2003), implicando na importância da fosforilação e desfosforilação de tirosina em diferentes funções no metabolismo da planta, como, por exemplo, em processos tão diversos como desenvolvimento do pólen e abertura de estômatos, que são altamente regulados e essenciais para a sobrevivência do organismo (Gupta *et al.*, 2002, MacRobbie, 2002).

Comparando a classificação adotada para sistemas animais, citada anteriormente, com os vegetais, notamos diferenças importantes. As PTPs tipo receptor são encontradas somente em animais, e não em fungos e plantas. As outras duas categorias, PTPs intracelulares e PTPs de dupla especificidade (DsPTPs), existem em todos eucarióticos, incluindo plantas (Xu *et al.*, 1998; Fordham-Skelton *et al.*, 1999; Ulm *et al.*, 2002).

A Tabela 2 mostra a comparação entre a família das PTPs de *Arabidopsis* e humanos (Kerk *et al.*, 2008)

O alinhamento de seqüências de PTPs de várias espécies (Figura 3A) mostra que estas apresentam alta similaridade com a PTP de soja analisada, sendo de 88% em feijão, 77% em ervilha, 69% em Arabidopsis, 39% em humano e camundongo e 33% em rato. Também através deste alinhamento pode-se notar que as PTPs de planta (soja, feijão, ervilha, Arabidopsis) contêm uma região de aproximadamente 240 aminoácidos que é homóloga a domínios catalíticos de PTPs de humanos, rato e camundongo. Existem 2 motivos conservados de extrema importância para a catálise, sWPDHh (motivo do ácido geral com um resíduo aspartato) e PIVVHCSAGTGRTGT (sítio ativo), que são específicos para a família das PTPs, e o motivo KNRY, que permite o acesso preferencial da fosfotirosina ao sítio ativo em relação a resíduos menores como fosfoserina/fosfotreonina. A presença destes motivos e a alta similaridade de seqüência entre os organismos observados claramente coloca as fosfatases de planta dentro da família das PTPs. Um fato interessante a se notar é que os resíduos presentes no N-terminal das PTPs de plantas (Figura 3B) não apresentam similaridade significativa com outras seqüências de PTPs (Fordham-Skelton *et al.*, 1999).

Protein Phosphatase Family	Subclass	Arabidopsis Genes	Human Genes
Ser/Thr phosphatase			
PPP family	Total	26	13
	PP1	9	3
	PP2A	5	2
	PP2B	0	3
	PP4	2	1
	PP5	1	1
	PP6	2	1
	PP7	1	2
	Other	6	N/A
PPM family (PP2C)		76	18
PTP superfamily (CX ₅ R)			
Class I PTP (classic)	Total	1	38
	Receptor	0	21
	Nonreceptor	1	17
SSU72		1	1
Class I PTP (DSPs)	Total	22	61
	MAPKP	0	11
	Slingshots	0	3
	PRLs	0	3
	Atypical DSP	3	19
	CDC14	0	4
	PTEN	3	5
	Myotubularins	2	16
	Other	15	N/A
Class II PTPs (CDC25)		None	3
Class III PTPs (LMWPTP)		1	1
Asp-based catalysis (DXDXT	/V)		
FCP-like		19	8
HAD family (chronophins)		3	1
HAD family (EYA)		1	4
		150 Total	148 Total

Tabela 2. Resumo dos genes que codificam proteínas fosfatases em Arabidopsis e humanos. Retirado de Kerk *et al.*, 2008

PTP1SOYA PTP1Bean PTP1PEA PTP1ATH CD45_RAT 3 PTN1_HUMAN PTN6_MOUSE	86 84 83 87 87 3494 39 270	NLRKNRYTI NLSKNRYTI NLSKNRYSI NVEKNRYSI NTSKNRYTN NKNRNRYRI NKSKNRYKN	VLPFDKNR VLPFDSNR VIPFDKNR ILPVNHTR VSPFDHSR ILPFDHSR	VVLKSSTD VALKSSTD VVLKSSSD IVLNPCKD VQLKKIQD IKLHQEDN VILQGRDS	YRPEAQGY YRPAAQGY YRSEALGY SSAKGY KEGSDY DY -NIPGSDY	INAS <mark>LVS</mark> INASLVS INASKIS VNASLIK INANYID INASLIK INASLIK	-TSSAGNV -TSSPGNV -TSSPGIV -TSESESI -GAYP -MEEAQR- QLLGPDENS	SQFIATQG SQFVATQG SEFIATQG SQFIATQG KQFICTQG -SYILTQG KTYIASQG	PLQHTYED PLPHTYED PMPHTFED PLPHTMED PLPNTIAD PLPNTCGH CLDATVND	FWEMIIQYHC FWEMIIQYHC FWEMVIQYHC FWEMVIQOHC FWEMVWENRC FWEMVWEQKS FWEMVWEQNI	PATIMUTR PATIMUTR PATVMUTG PITVMUTR RITVMUSR RGVVMUNR RGVVMUTR	
PTP1SOYA PTP1Bean PTP1PEA PTP1ATH CD45_RAT 3 PTN1_HUMAN PTN6_MOUSE	168 166 165 167 3570 113 353	VDNYKMAK(VDNYKMVK(VDNYKTVK(VDNNRTVK(SENCR-IK(MEKGS-LK(VEKGR-NK(**	GDYFQAED GDYFQAED GDYFQSED GDYFQDED DRYWPEQI AQYWPQKE VPYWPEVG	OR PREVGNI OG PREVGNI OR PREFGNI OG PREFGNI GGEQFSIY EKEMIFEI GTQRVYGLY	SIIGKWEN SVIGKWVN SLTCKWTK SLTTKWIK GNGNEVFG TNLKLTLI SVTNSREH	TTETSLVLI TTETSLVLI TTKTSLVLI TTDTSLMLI TYSVELVE SEDIKSYY DTAEYKLR	RHLEVNH RLLEVNH RHLEVNR RNLEVNY VIQDPEREI VRQLELEN FLQISPLD-	R 	EVEDAPLS EVEDAPIS EVEDTPLS ETEDQPMS IFEGETRD LTTQETRE -NGDLVRE	VLHIQYPEWE VLHIQYPEWE VFHIQYPEWE VFHIQYPEWE ITQYQYEGWE ITQYQYEGWE ILHFHYTTWE IWHYQYLSWE * **	PDHGVP KD PDHGVP KD PDHGVP KD PDHGVP KD PDHGVP KD PDFGVP ES PDHGVP SE	FF FL FV FQ PA PG
PTF1SOYA PTF1Bean PTF1PEA PTF1ATH CD45_RAT 3 PTN1_HUMAN PTN6_MOUSE	244 242 241 243 654 190 428 (AVREILKR AVREILKR AVREILKR AVREILKR SFRQLLHS SFLNFLFK GVLSFLDQ	YHLPPNF YHLPPNL YHLPPNL YQVPPSL TNRQNQI /RESGSLS INQRQESL		FIVVHCS, FIVVHCS, FIVVHCS, FIVHCS, FIVHCS, FVVVHCS, FIVHCS, FIVHCS,	AGIGRTGT AGIGRTGT AGIGRTGT AGIGRTGT AG <mark>V</mark> GRTGT AGIGR <mark>S</mark> GT AGIGRTGT ** ** **	CCT IHNTI CCT IHNTI CCT IHNTI CCA IHNTI CCA IHNTI FCT INNNN FCL - ADTC IIV IDMLM	QRI QRI QRI QRI UNNN CLLL UESI	-VAGDMSA -LAGDMSA -LAGDMSA -LAGDMSA -LNN ^{SRID} -MDKDPSS -STK ^{LDCD}	VDIAKTIAM VDIANTVSVI IDIANTVSVI IDIAKTVAL IPNLFSIVLKI VDIKKVLLEM IDIQKTIQM	RSQRIGM RAQRIGM RSQRIGM RKQRIGM LREQREGM IRKERMGL /RAQRSGM * * *	VQ VQ VQ VQ IQ VQ
PTP1SOYA PTP1Bean PTP1PEA PTP1ATH CD45_RAT 3 PTN1_HUMAN PTN6 MOUSE	313 311 310 312 830 263 501	FQDQYIFC FQDQYIFC FQDQYIFC MDQYFFC QLEQYLFC FADQLRFS FADQLRFS	NATIDEL KATIDEL GATIDEL NATVDEL KTILDET LAVIEGA VATAQFI	SDL SDL SDL SDL YHR KFI STT								
В		* * *										
PTP1SOYA MA PTP1Bean MI PTP1PEA MO PTP1ATH MA	A – GN P D – GN P G – GS S AT GK I	PATTSSSAI PTTTSSSAS SAPPSSTSS SSAANLFI	SPEKFNFN PPVNFN HNNS1 GSTRFDLS	IFSPD <mark>N</mark> PS IFSPDNPS FSPDFPS SSADSPPS	RI <mark>T</mark> LTSDQ PITLTADQ RIPLTSDQ KLSLSSDQ	V <mark>NHCTQAL</mark> VSHC <mark>A</mark> QAL IKHCTEAL LNHCHQAL	NILKEKLH NLLKEKLH ALLKNKLL GVFRGKIQ	APNVITQE APHTITRE NPHTVSQK NPDSIAHE	F A HLQANF F A HLQANF F F HLQ <mark>S</mark> NF F TG LQANF	RITPSE <mark>MRRE</mark> RITPSE <mark>MRRE</mark> RIT <mark>L</mark> SE TTKE R <mark>MW</mark> PSELLLN	CTVAYDD CTVALDA CHVALNS STVAMNS	84 82 81 85

Figura 3. Alinhamento de seqüência de PTPs de plantas com PTPs representativas de outros organismos. Os organismos utilizados foram rato, humano e camundongo (A). Alinhamento da região N-terminal de PTPs de soja, feijão, ervilha e Arabidopsis (B). Resíduos idênticos (5 ou mais), em determinada posição, são mostrados em fundo cinza-escuro e regiões conservadas entre as PTPs de planta estão mostradas em fundo cinza-claro. Os asteriscos mostram as regiões que são comuns a todos os organismos analisados, que são motivos conservados importantes para a catálise. Adaptado de Fordham-Skelton, 1999.

1.3.1 PTPs, MAPKs e Sinalização em Plantas

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) foram descobertas em 1986 em células animais (Sturgill e Ray, 1986) e, só em 1990, foi demonstrado que elas pertenciam a uma família de multigenes relacionados com fosforilação de resíduos serina/tirosina (Gotoh *et al.*, 1990). Elas são classificadas em três grandes grupos: as proteínas quinases ativadas por sinal extracelular (ERKs), quinase c-Jun N-terminal ou proteína quinase ativada por estresse (JNK/SAPK) e a sub-família MAPK p38, a qual está envolvida na resposta ao estresse desencadeado por vários fatores ambientais. Em plantas, os genes das MAPKs foram reportados pela primeira vez em 1993 (Stafstrom *et al.*, 1993) e, diferentemente das encontradas em mamíferos, pertencem a um único grupo da subfamília ERK.

As MAPKs transmitem vários tipos de estímulo, resumidos na Tabela 3 (Colcombet e Hirt, 2008) e fazem parte de uma cascata linear de 3 proteínas quinases consecutivas, que participam da intermediação de reações seqüenciais de fosforilação. O último componente da série é a MAPK. Esta é ativada por fosforilação, nos resíduos de treonina e tirosina, através da ação da MAPK quinase (MAPKK ou MAPK2), a qual, por sua vez, é regulada por fosforilação de 2 resíduos serina/treonina, pelo ativador *upstream* MAPKK quinase (MAPKKK ou MAPK3). Estas 3 quinases estão funcionalmente interligadas e têm papel central em mecanismos de transdução de sinal de vários organismos eucarióticos.

Estímulo ---> MAPKKK ---> MAPKK ---> Resposta Biológica

Assim, em plantas elas também são amplamente encontradas, tanto no citoplasma quanto no núcleo e estão envolvidas em vias de osmoregulação e também no crescimento e diferenciação celular (Colcombet e Hirt, 2008).

O subgrupo das DsPTPs, que hidrolizam o fosfato tanto em proteínas fosfoserina/treonina como proteínas fosfotirosina, mostraram regular as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) em uma variedade de vias de transdução de sinal (Keyse, 1998). Assim, sua regulação por PTPs/DsPTPs é essencial para a manutenção de um padrão cinético preciso de ativação e inativação, justificando, desta maneira, a presença das PTPs em plantas superiores, que, aparentemente, não possuem tirosinas quinases típicas. (De Long, 2006).

Activated by: Genetic data Functional cascade Target(s) Name MAPK MPK1 JA; ABA ND MKK3-MPK1/2/7/14 ND MPK2 ND ND $IA \cdot ABA$ MKK3-MPK1/2/7/14 MPK3 H2O2; O3; PAMPs; Wild-type-like plant, except: ABA-dependent; MEKK1-MKK4/5-MPK3/6; VIP1 +48 impaired; YODA-MKK4/5-MPK3/6; candidates osmotic shock; ABA; H₂O₂-induced stomatal closure ET hypersensitive to O₃-induced oxidative burst; MKK9-MPK3/6 redundant with MPK6; mpk3mpk6 dwarfed with yoda-like stomatal patterning MPK4 O3; PAMPs; osmotic Dwarf; SA overproducer; resistant to pathogens; MKK2-MPK4; MKK1- MKS1 shock; cold; salt MeJA-dependent gene expression impaired ; MPK4; MEKK1-MKK2resistant to osmolarity MPK4/6 MPK6 H2O2; O3; PAMPs; Wild-type-like plant except: embryo development MEKK1-MKK4/5-MPK3/6; ACS6; EIN3+39 impaired; stomatal patterning slightly affected; YODA-MKK4/5-MPK3/6; candidates osmotic shock; JA; ET smaller flowers; hypersensitive to O3-induced MEKK1-MKK2-MPK4/6 oxidative burst; redundant with MPK3: mpk3mpk6 MKK3-MPK6; MKK9dwarf with yoda-like stomatal pattering **MPK3/6** MPK7 ND ND MKK3-MPK1/2/7/14 ND MPK14 ND ND MKK3-MPK1/2/7/14 ND MAP2K MKK1 H₂O₂; flg22; laminarin Wild-type-like plant; reduced flg22-dependent MEKK1-MKK1-MPK4; activation of MPK3 and MPK6; no flg22-dependent MKK1-MPK4 activation of MPK4 MKK2 Salt: cold Wild-type-like plant; unable to acclimate to freezing MEKK1-MKK2temperatures; hypersensitive to salt; reduced cold- MPK4/MPK6; MKK2induced activation of MPK4 and MPK6 MPK4 MKK3 to MKK3-MPK1/2/7/14; Pathogen; JA Wild-type-like plant; hypersensitive Pseudomonas; hypersensitive to JA; JA-dependent MKK3-MPK6 activation of MPK6 impaired MKK4 mkk4mkk5 RNAi; plant: dwarf with yoda-like MEKK1-MKK4/5-MPK3/6; PAMPs; H₂O₂ stomatal patterning YODA-MKK4/5-MPK3/6 mkk4mkk5 RNAi; plant: dwarf with yoda-like MEKK1-MKK4/5-MPK3/6; MKK5 PAMPs; H₂O₂ YODA-MKK4/5-MPK3/6 stomatal patterning MKK7 MKK9 ET ACC inhibition of hypocotyl elongation impaired; MKK9-MPK3/6 reduced ACC-dependent induction of ERF1; increased NaCl-sensitivity; no ACC-dependent activation of MPK3 and MPK6 MAP3K Truncated ANP1 mimics H2O2-induced gene ANP1-?-MPK3/6 ANP1 H₂O₂ expression ANP2 Cell division anp2anp3 show cytokinesis defects ND ANP3 Cell division anp2anp3 show cytokinesis defects ND YODA ND Dwarf; embryo development impaired; leaf YODA-MKK4/5stomatal-patterning impaired MPK3/MPK6 MAP3Ke2/ Wild-type-like ; redundant with M3K7: m3k6/m3k7 ND ND pollen fails to maturate M3K6 MAP3Ke1/ ND Wild-type-like; redundant with M3K6: m3k6/m3k7 ND pollen fails to maturate M3K7 MEKK1 mekk1 dwarf over-producer of SA; MPK4 MEKK1-MKK1/2-MPK4; H₂O₂; flg22 activation impaired ; reduced root hair elongation; MEKK1-MKK4/5overaccumulation of H₂O₂; spontaneous cell death; MPK3/MPK6 dwarfism reverted by higher temperature and in SAdepleted background

Tabela 3. Lista resumida da família das MAPKs em plantas. Ativação, cascata envolvida e alvos. ND=não determinado. (Retirada de Colcombet e Hirt, 2008)

1.3.2 Regulação de PTPs de plantas pela oxidação

A fosforilação/desfosforilação de resíduos de tirosina ocorre em vários processos de desenvolvimento, estando as PTPs relacionadas ao desenvolvimento do pólen (Gupta *et al.*, 2002) e à abertura de estômatos (MacRobbie, 2002). Células de plantas estão sujeitas à mudanças do potencial redox e à geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) como resultado de ataques de patógenos e fotossíntese. Dixon e colaboradores (2005) propuseram que as GmPTPs podem ser reguladas pela S-glutationilação, que é modulada pela proporção GSH (Glutationa reduzida): GSSG (Glutationa oxidada). Esse mecanismo de regulação da atividade fosfatase é decorrente da inativação oxidativa do resíduo de cisteína, o qual age como nucleófilo e aceptor intermediário de fosfato na catálise. A oxidação desta cisteína reativa por peróxido de hidrogênio ou EROS origina ácido sulfênico, o que inativa a enzima, podendo, neste momento, ser iniciada uma cascata de sinalização. Porém, dependendo da concentração do agente oxidante, esta conversão pode dar origem a outros derivados (ácido sulfônico, sulfínico) que causam inativação permanente da enzima, sendo, assim, importante a proteção do sítio catalítico contra a oxidação irreversível, para que ocorra devidamente a sinalização (Tonks, 2006).

1.4 Presença e importância de fosfatases em raízes

O fósforo é o nutriente mineral mais importante para o crescimento da planta, entretanto é o segundo menos disponível no solo depois do nitrogênio. O ânion fosfato (Pi) é a forma preferencial de assimilação do fósforo por organismos vegetais, os quais adquirem seus nutrientes minerais diretamente do ambiente em que vivem. O Pi não só desempenha um papel vital na transferência de energia e regulação metabólica, como é também importante como componente estrutural de várias biomoléculas. Desta maneira, as fosfatases, hidrolases envolvidas na remoção de fosfato de moléculas orgânicas fosforiladas, são enzimas importantes na hidrólise e mobilização de fosfato inorgânico para nutrição da planta (Duff *et al.*, 1994, Hammond *et al.*, 2004) Estas enzimas, sem dúvida, estão envolvidas na utilização rotineira de P_i, que podem ter sua expressão regulada por uma variedade de fatores ambientais e de desenvolvimento. Isto é evidenciado pelo fato de que a ausência de Pi induz a síntese "de novo" de fosfatases em raízes e, além disso, inicia uma variedade de respostas transcricionais, bioquímicas e fisiológicas, que vão servir como estratégia para aumentar a capacidade da planta em disponibilizar o fósforo do solo e a eficiência com que elas o utilizam internamente. Portanto, vão ocorrer várias mudanças metabólicas nas

raízes sob carência de Pi, e.g., aumento da formação e alongamento das raízes laterais, causando maior volume de solo explorado e a possibilidade de absorção de mais nutrientes (Hammond *et al.*, 2004) e aumento da produção de transportadores de alta afinidade por Pi, preferencialmente expressos neste tecido (Raghotama e Karthikeyan, 2005).

Especialmente em relação à fosforilação e desfosforilação de resíduos de tirosina, Yemets e colaboradores (2008) relataram que a morfologia de raízes primárias e a organização de microtúbulos corticais em *Arabidopsis* mudam completamente sob a presença de inibidores de PTPs ou PTKs (proteínas tirosina quinases). Assim, a fosforilação em tirosina pode estar envolvida na dinâmica e na organização de microtúbulos em células de planta.

1.5 Caracterização das isoformas de fosfatase ácida de soja

Fosfatases ácidas estão envolvidas em processos metabólicos de germinação e maturação de plantas. Elas são constitutivamente expressas em sementes durante a germinação e têm suas atividades aumentadas durante este processo, para liberação do material de reserva para o embrião em crescimento. (dos Prazeres *et al.*, 2004)

Em relação às fosfatases ácidas de sementes de soja, nosso grupo observou a presença das 4 isoformas na fração citoplasmática (Ferreira *et al.*, 1998a), temperatura ótima não usual quando *p*-nitrofenilfosfato (*pNPP*) foi utilizado como substrato (Ferreira *et al.*, 1998b), alta afinidade pelo fosfoenolpiruvato (PEP), sendo, assim, um substrato fisiológico em potencial (Ferreira *et al.*, 1999) e a regulação de uma das isoformas pela lectina concanavalina A (ConA) (Aoyama *et al.*, 2001).

1.6 Microarranjos de Peptídeos (PepChip®) como Ferramenta para Estudos de Vias de Sinalização Celular

A transdução de alguns sinais nas células envolve, principalmente, a atividade de quinases (Fisher, 1997, Krebs, 1997). Estima-se que um terço das proteínas celulares possa ser fosforilada e, através desta, suas atividades sejam alteradas (Johnson e Hunter, 2005).

A maioria dos membros da superfamília das proteínas quinases pode ser reconhecida pelas suas seqüências primárias, pois possuem um domínio catalítico eucariótico de aproximadamente 250 aminoácidos, sendo, assim, apenas um pequeno número de quinases não contém este domínio, que são chamadas de quinases atípicas (Leonard *et al.*, 1998, Hanks, 2003). Uma comparação

entre domínios de quinases, tanto dentro como entre as espécies, mostra uma diversidade substancial, o que é enfatizado quando se verifica que existem domínios funcionais não-catalíticos de quinases que estão envolvidos na regulação, interação e localização subcelular. Esta diversidade nos domínios catalíticos e não-catalíticos explica a diversidade funcional das quinases dentro do reino dos eucariotos.

A habilidade de uma quinase em fosforilar seus substratos depende de fatores múltiplos, como a localização física de ambas as moléculas, disponibilidade do substrato para a enzima e outro fator importante, por se tratar de quinases, é o conteúdo de aminoácidos que flanqueiam o fosfoaceptor. Os aminoácidos que cercam o aminoácido que será fosforilado conferem especificidade à qual quinase poderá ligar-se corretamente ao substrato e realizar a transferência do grupo fosfato ao aceptor.

O fato de que quinases diferentes têm diferentes substratos-alvo está sendo explorado através do delineamento dos perfis fosfoproteômicos usando arranjos de peptídeos. Nesta abordagem, seqüências consenso de substratos de quinases descritos no banco de dados de sítios de fosforilação "Phosphobase" (Kreegipuu *et al.*, 1999), são ligados à uma lâmina de vidro que é incubada com lisados de células e ATP marcado com ³³P (Figura 4).

A fosforilação de peptídeos-alvo em arranjos tem mostrado perfis de fosforilação de substratos, como, por exemplo, em monócitos estimulados por LPS (Diks *et al.*, 2004), que possibilitou a verificação do envolvimento das Lck e quinases Fyn como alvos primários de glicocorticóides.

Diks e colaboradores (2007) mostraram também que a divergência de quinases eucarióticas, observada em relação às suas seqüências primárias, não reflete necessariamente a fosforilação de seus substratos, revelando uma grande sobreposição nos perfis de fosforilação dos lisados de diferentes células eucarióticas. Sendo assim, estes resultados mostram a importância deste padrão compartilhado entre os organismos, sugerida pela presença de um conjunto comum de substratos de quinases em um ancestral que foi preservado sem variações na vida eucariótica.

Comparando-se o genoma de plantas ao de mamíferos, conclui-se que famílias similares de mediadores da transdução de sinais existem em ambos os sistemas. Para quase todas as famílias de quinases encontradas em mamíferos, genes correspondentes podem ser encontrados no genoma de Arabidopsis (Champion *et al.*, 2004). Além disso, têm sido descritas, em plantas, várias cascatas

de sinalização com alta similaridade às de mamíferos (Stevenson *et al.*, 2000, Mishra *et al.*, 2006; Francis, 2007)

A análise do perfil quinômico tem como objetivo avaliar a atividade de quinases na célula e, paralelamente, possibilitar a análise comparativa de tratamentos na presença e ausência de certo estímulo. É uma ferramenta que mede a atividade quinase diretamente, sendo, assim, uma forte aliada para a visualização de cascatas de sinalização (Ritsema *et al.*, 2007).



Figura 4. Esquema do Pepchip®. (A) Esquema mostrando a distribuição dos "*spots*" na lâmina do Pepchip. Em cada "*set*" estão presentes 1176 "*spots*" (peptídeos consenso). (B) Os peptídeos consenso de substratos de proteínas quinases são ligados à lâminas de vidro. A atividade enzimática é medida na presença de $ATP(^{33}P\gamma)$.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese foi de clonar, expressar, caracterizar, avaliar a distribuição tecidual da GmPTP e analisar o quinoma de raízes germinadas na presença e ausência de luz.

Os objetivos específicos foram:

- Expressar a GmPTP em alta escala e na forma ativa solúvel para possibilitar estudos cinéticos e conformacionais e possibilitar a confecção de anticorpos;

- Comparar as propriedades cinéticas da proteína recombinante com as das isoformas purificadas de sementes quiescentes de soja, previamente estudadas em nosso laboratório;

- Avaliar a expressão tecido-específica da PTP recombinante, tanto nos níveis de proteína quanto de mRNA;

- Analisar o perfil quinômico de raízes de soja germinadas no claro e no escuro,

- Fornecer informações sobre os processos moleculares envolvidos na germinação de plântulas de soja.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

As sementes de soja (*Glycine max*, cv. IAC-17) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Nelson Braga (Instituto Agronômico de Campinas - IAC). O substrato *p*NPP e os aminoácidos fosforilados Tyr-P e Ser-P, utilizados nos ensaios de cinética, foram obtidos da Sigma e os demais reagentes são de grau de pureza analítica.

3.2 Métodos

3.2.1 Germinação de Soja

As sementes de soja foram pré-esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio 2%, por 10 minutos e posteriormente lavadas três vezes em água MilliQ. A germinação foi feita em rolo de papel de germinação Germitest, a 25° C, na ausência e na presença de luz (fotoperíodo de 16h dia/8h noite), por 10 dias ou até o surgimento da folha primária (Brasil, 1980).

3.2.2 Extração de RNA total

As amostras dos tecidos de soja foram maceradas em N₂ líquido até a formação de pó e posteriormente solubilizada com o reagente Trizol, de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen). O RNA total foi precipitado com cloreto de lítio 4M, ressuspendido em H₂O-DEPC e novamente precipitado com 0.1 volume de acetato de sódio 3M e 3 volumes de etanol 100%, lavado com etanol 70 % e ressuspendido em H₂O-DEPC. Em seguida, realizou-se o isolamento do poli(A)⁺RNA mediante o Kit "Fast Track 2.0" (Invitrogen). As amostras de mRNA foram ressuspensas em H₂O-DEPC e guardadas a -80°C. O RNA foi quantificado por leitura de absorbância a 260nm e sua qualidade avaliada pela razão 260/280nm. A integridade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, 10% tampão MOPS 10X (0,2 M de MOPS, pH 7,0, contendo 0,05 M de acetato de sódio, 0,01 M EDTA) e 5% formaldeído.

3.2.3 Clonagem da GmPTP

Métodos usuais de clonagem foram realizados conforme descrito por Sambrook e Russel. (2001). O RNA total foi extraído do cotilédone de soja (item 3.2.2) e estes foram utilizados para a reação de RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) para produção de cDNA e
amplificação do gene da GmPTP (número de acesso no GenBank **AJ006308**) com os primers da Tabela 4 (contendo os sítios *Eco*RI e *Xba*I). Os produtos de PCR foram digeridos com as endonucleases *Eco*RI e *Xba*I, clonados no vetor de expressão procariótica pProEXTM-HTa (Invitrogen) e confirmados por seqüenciamento. Células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas com pProEX-PTP e um teste de expressão em pequena escala foi realizado por cromatografia de afinidade com uma resina ligada à Ni²⁺ (TALON® Metal Affinity Resin-Clontech.). O nível de expressão foi checado através de eletroforese desnaturante em gel 12,5% de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemli, 1970). O fragmento foi subclonado em outro vetor de expressão pGEX-4T-1 (GE Healthcare/Amersham), através da liberação do inserto clonado em pProEX-PTP, por digestão com *Eco*RI e *Xho*I.

3.2.4 Subclonagem e Transformação em bactérias

Os produtos da digestão das enzimas *EcoRI* e *XhoI* foram purificados de um gel de agarose 1%, utilizando o Kit Qiagen e os produtos da purificação foram ligados conforme protocolo de ligação do fabricante da DNA ligase (Gibco). Os produtos de ligação (pGEX-4T1-PTP) foram utilizados para transformar células de *E. coli* DH5 α competentes por choque térmico (Smith e Danner, 1981). A seleção das colônias transformantes foi feita através de minipreparação por lise alcalina (miniprep). Após a confirmação da clonagem, a construção pGEX-4T1-PTP foi utilizada para transformar células de *E. coli* BL21(DE3) pelo método de PEG (Sambrook e Russell, 2001).

3.2.5 Expressão da GmPTP

As bactérias foram crescidas em meio Luria-Bertani (LB), durante a noite, sob agitação de 200 rpm a 37°C e, no dia seguinte, inoculadas em meio de cultura fresco (1:100), onde continuaram crescendo até a fase logarítmica ($A_{600nm} \sim 0.4 - 0.8$). A indução da síntese protéica foi iniciada com adição de 0.8 mM de IPTG ao meio com agitação de 200 rpm a 30°C, por 4h.

3.2.6 Purificação da GmPTP

A suspensão de células foi centrifugada e ressuspendida em tampão PBS 2X [2X (10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl e 2,7 mM KCl)] pH 7,3, 1mM DTT e 1mM PMSF, seguida por sonicação. O sobrenadante, contendo a PTP recombinante, após nova centrifugação a 14.000 rpm, 30 min., a 4°C, foi submetido à purificação por cromatografia de afinidade com a resina Glutationa Sepharose[™] 4B, segundo recomendações do fabricante do *kit* (Amersham

Biosciences). Inicialmente, o extrato protéico foi aplicado a esta coluna de afinidade, retendo assim a GmPTP fusionada com a proteína Glutationa S-Transferase (GST). Após lavagem com tampão, a proteína foi eluída por uma solução contendo 10mM glutationa reduzida (GSH) em tampão 50mM Tris-HCl pH 8,0. A proteína de fusão foi clivada da GmPTP, utilizando 10U de trombina com variados tempos de incubação, a 4°C. Após a diálise, contra aproximadamente 2000 volumes de PBS 2X pH 7,3 e DTT 1mM, uma segunda etapa de purificação foi feita com a mesma resina de glutationa-sepharose, recuperando a GmPTP clivada na fração de proteínas não retidas na coluna (*flow-through*). Assim, foram coletadas frações em todas as etapas, das quais se verificou a atividade e foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE 12,5%, de acordo com Laemmli (1970). A GmPTP foi removida do gel e sua identidade foi confirmada por espectrometria de massas.

3.2.7 Estudos Cinéticos da GmPTP

A PTP recombinante obtida foi analisada através do estudo de seu padrão cinético. Utilizando-se *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) como substrato, foram determinados seus parâmetros cinéticos (Km e Vmáx) calculados através do ajuste da curva (V x [S]) utilizando o modelo da hipérbole retangular pelo programa ORIGIN (versão 8.0).

A cinética da proteína recombinante foi determinada através de dois métodos:

a) Formação de *p*-nitrofenol, quando *p*NPP foi utilizado como substrato. Para um volume final de 1 mL, o meio de incubação consistiu de 100mM de tampão acetato (pH 5,0); 5mM de substrato; 100µL da amostra enzimática. A reação foi paralisada após 30 min., a 37°C, com 1 mL de NaOH 1M. O *p*-nitrofenol liberado foi determinado medindo-se a absorbância em 405 nm (coeficiente de extinção molar $\varepsilon = 18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), como descrito por Ferreira *et al.*(1998a).

b) Formação de fosfato inorgânico. Este método foi utilizado quando outros fosfatos orgânicos, distintos de *p*NPP, foram utilizados como substrato. O ensaio enzimático foi o mesmo descrito para o *p*NPP. A reação foi paralisada pela adição de 1 mL de molibdato de amônio 3% (em tampão acetato 0,2 M, pH 4,0) e 0,1 mL de ácido ascórbico 1% (em tampão acetato 0,2 M, pH 4,0). O azul de molibdênio formado foi lido em 700 nm, sendo o coeficiente de extinção molar $\varepsilon = 4000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Lowry e Lopez, 1946).

A unidade utilizada para os cálculos de atividade foi de 1 Katal, que se define como a quantidade de enzima que é capaz de transformar 1 mol de produto por segundo de reação.

3.2.8 Liofilização e obtenção do anticorpo anti-PTP

A PTP recombinante foi liofilizada utilizando-se o equipamento Speed Vac SC110 Savant, com pressão em torno de 0,5 atm, até total desidratação da amostra. A GmPTP liofilizada foi enviada para o Laboratório de Imunologia - Centro de Biotecnologia – UFRGS para obtenção do anticorpo anti-PTP policional, em coelhos. O antígeno (GmPTP purificada) foi fornecido a uma concentração aproximada de 1mg/mL, e a produção do anticorpo foi feita em duas fases: 1) Imunização: produção das amostras do soro pré-imune, imunização de dois coelhos (10 semanas) e teste por ELISA com o antígeno fornecido, para avaliação do título ; 2) Coleta do soro: sangria dos coelhos e produção de 2 amostras (30 mL) de soro policional.

3.2.9 Dicroísmo Circular

3.2.9.1 Análise da Estrutura Secundária

A GmPTP purificada foi dialisada contra tampão PBS 2X sem sal (20 mM Na₂HPO₄, 3,6 mM KH₂PO₄ e 5,4 mM KCl) pH 7,3. As medidas de dicroísmo circular foram realizadas em um espectropolarímetro J-810 (JASCO) em cubeta de 1 mm de caminho óptico, a 25°C. Foram coletados espectros entre 200 a 260 nm para análise de estrutura secundária. O branco, espectro somente do tampão, foi subtraído do espectro da proteína.

Também foi feita uma predição da estrutura secundária usando a ferramenta PSIPRED (Protein Structure Prediction Server) a partir da seqüência de aminoácidos da estrutura primária (Jones, 1999) e a desconvolução do espectro foi realizada pelo software CDNN.

3.2.9.2 Análise de Desenovelamento Térmico

A desnaturação térmica foi realizada com a GmPTP purificada, nas mesmas condições supracitadas (item 3.9.1). A temperatura foi variada de 4°C a 90°C, com aquecimento de 1°C/min., sendo a desnaturação monitorada a 222 nm, obtendo-se um espectro (de 200 nm a 260 nm) a cada variação de 10°C. O branco, espectro somente do tampão, foi subtraído do espectro da proteína.

3.2.10 Western Blot

O extrato foi feito com tampão de extração (100mM tampão acetato pH5,0, 100mM sacarose, 2% β-mercaptoetanol, 15% etilenoglicol, 2 mM PMSF) (Park e Kahn, 1999) após

separação da plântula nos tecidos: raiz, hipocótilo, cotilédone e folha. Essas amostras foram analisadas em SDS-PAGE 12,5% de acordo com Laemmli (1970). As proteínas separadas pelo gel foram transferidas para membrana de PVDF em tampão de transferência (48 mM Tris-base, 39 mM glicina, 0.037 % SDS e 20 % metanol), a 350 mA por 1 h. A membrana, então, foi incubada em solução bloqueadora [5 % de leite em pó desnatado em TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl mais 0,05% Tween 20), por 1 h. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-PTP durante a noite, a 4ºC. No dia seguinte, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T e incubada com o anticorpo secundário anti-rabbit (GE Healthcare/Amersham), com diluição de 1:3000, por 1 h, temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada três vezes em tampão TBS sem Tween 20. A detecção foi feita utilizando o método de quimioluminescência do kit ECL (Amershan Pharmacia Biotech). A massa molecular da GmPTP foi determinada de acordo com as recomendações do fabricante do padrão de proteínas de massas moleculares (Fermentas), fazendo a representação da mobilidade eletroforética (mm) versus logaritmo das massas moleculares dos marcadores de massa molecular, que são: β -galactosidase (116kDa), albumina de soro bovino (66,2kDa), ovalbumina (45kDa), lactato desidrogenase (35kDa), endonuclease de restrição Bsp981 (25kDa), β -lactoglobulina (18.4kDa) e lisozima (14.4kDa).

3.2.11 PCR em Tempo Real (qPCR)

Para quantificar a expressão diferencial dos vários tecidos simultaneamente, primers específicos para a GmPTP, para a actina e tubulina (os dois últimos utilizados como normalizadores), foram sintetizados pelo próprio software do termociclador ABI PRISM 7000 Instrument (Applied Biosystems). Utilizou-se SYBR green® como sonda no qPCR. Assim, 4 μ g de RNA total foram tratados com 7,5 U de DNase I, durante 30 min., para hidrolisar qualquer contaminação com DNA genômico. Imediatamente, a enzima foi inativada a 80°C por 10 minutos. Para sintetizar o cDNA utilizou-se 4 μ g de mRNA poliA⁺ e o kit SuperScriptII (Invitrogen). Diluiu-se 40 vezes e utilizou-se 1 μ L como template para o qPCR. As reações foram feitas em placas de 96 poços onde cada amostra foi colocada em triplicata e para cada par de primer tinha-se 4 reações, uma para cada tecido de soja germinada no claro.

TÉCNICA		FORWARD	REVERSE	
Clonagem		5'-AGAGAATTCATGGCCGGCAAC-3'	5'-CATTCTAGAAAGTTCCAGCAC- 3'	
qPCR	GmPT P	5'-AATCACCCTCACTTCGGATCA-3'	5'-CGTGGAGCTTCTCCTTCAGAA- 3'	
	tubuli na	5'-CAATTGGAGC GCATCAAT-3'	5'-ATACACTCATCAGCATTCTC-3'	
	actina	5'-CTTCAATGTGCCTGCCATGT-3'	5'-TTGTGCGACCACTGGCATA-3'	

Tabela 4. Primers utilizados na clonagem do gene da GmPTP e qPCR.

3.2.12 Microarranjos de peptídeos- PepChip®

O lisado celular foi feito com raízes congeladas a -80°C. Após maceração das raízes, crescidas tanto na presença quanto na ausência de luz, foi adicionado um tampão de lise contendo 20mM de Tris-HCl pH7,5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 2,5mM pirofosfato de sódio, 1mM β -glicerofosfato, 1mM ortovanadato de sódio, 1 mM fluoreto de sódio, 1µg/mL leupeptina, 1µg/mL aprotinina e 1mM PMSF. O lisado foi mantido em gelo por 10 min. e o precipitado foi removido após centrifugar em velocidade máxima as amostras a 4°C, por 10 min. e o sobrenadante filtrado com filtro de 0,2µm. Foi adicionado então, 12,25µL do mix de ativação (10 mL 50% glicerol, 0,15 mL 100mM ATP, 0,6 mL 1M MgCl₂, 0,1 mL 3% Brij-35 e 0,3mL 5 mg/mL BSA) a 60µL de lisado com aproximadamente 8 mg/mL de proteína total.

As lâminas "Pepchip Kinase I" (PepScan Systems) foram incubadas com o lisado mais o mix de ativação e 3μ L de ATP radioativo (3μ Ci γ -[³³P]ATP, SA 1000-3000 Ci/mmol, GE Healthcare/Amersham). Após incubação por 2h a 30°C em 100% de umidade relativa, as lâminas foram lavadas duas vezes em 2M NaCl, duas vezes em PBST e duas vezes em água MilliQ. Assim, as lâminas foram dispostas em um cassete fosfoimager e expostas 5 dias ao *imager screen*. A radioatividade foi escaneadas através do Phosphorimager Storm (GE Healthcare/Amersham) e quantificada utilizando o software ImageQuant[®] software.

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os resultados da presente tese estão apresentados e discutidos na forma de dois capítulos:

CAPÍTULO 1 Clonagem, Expressão e Caracterização Cinética da GmPTP

Foram mostrados dados de clonagem, expressão da GmPTP, purificação em colunas de níquel-sepharose e glutationa-sepharose e estudos de estabilidade da enzima em presença de ditiotreitol. Também foram realizados estudos de caracterização cinética da PTP recombinante de soja, tais como, determinação de parâmetros cinéticos (Km e Vmáx); especificidade por substratos; efeito de inibidores, compostos e agentes oxidantes. Estes resultados foram confrontados aos obtidos previamente em nosso laboratório com sementes quiescentes de soja (Ferreira *et al.*1998). Todas as diferenças encontradas na cinética entre as isoformas da semente de soja e a enzima recombinante podem ser justificadas a partir da alteração conformacional que a enzima possa sofrer quando está sem a porção de carboidratos. A produção em alta escala da PTP recombinante de soja, em *E. coli*, proporcionou o estudo estrutural e produção de anticorpos. A amostra foi submetida a análise por dicroísmo circular, que revelou que a sua estrutura secundária é condizente com PTPs da mesma família encontradas na literatura e a desnaturação térmica da enzima mostrou que a GmPTP apresenta baixa estabilidade térmica.

CAPÍTULO 2 Localização Tecidual e Pepchip®

Investigamos a presença da proteína *in vivo*, para elucidar o papel desta enzima em plantas e saber a importância da sua localização tecido-específica, já que muito se sabe a respeito em mamíferos. Desta vez, foram utilizados diretamente tecidos de plântulas de soja. Tendo o anticorpo em mãos, outras perspectivas se abriram, já que não existe nenhuma publicação referente ao substrato fisiológico e função desta enzima em plantas. Desta maneira, através de western blot, identificamos a presença da GmPTP nos diferentes tecidos de soja, germinados tanto no claro como no escuro, que se apresentou mais pronunciadamente em raízes de soja, germinadas no escuro. Estes resultados, confrontados com os obtidos no PCR quantitativo, mostraram uma

expressão aumentada do tecido raiz, comparada aos outros tecidos avaliados quando germinado no claro, o que está em concordância com o encontrado na literatura, referente à importância fisiológica da enzima neste tecido. Através de Pepchip®, além da análise do quinoma de raízes em germinação, foram abertas novas perspectivas também no estudo do envolvimento desta enzima na sinalização, mecanismo ainda pouco elucidado em plantas, principalmente em relação ao envolvimento das fosfatases. Assim, propomos um modelo de sinalização onde o hormônio ácido abscísico responde ao estresse através da ativação de vias como as de MAPKs e de cálcio, causando modulação da atividade de fosfatases e quinases, resultando em respostas como proliferação e rearranjo do citoesqueleto das raízes.

CAPÍTULO 1

CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA GmPTP

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

CAPÍTULO 1: CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA GmPTP

4.1 Clonagem da GmPTP

Em nosso laboratório foram purificadas quatro isoformas de fosfatases ácidas, a partir de sementes de soja quiescentes, tendo sido também estudadas suas propriedades cinéticas e físicoquímicas. Estudos físicos e estruturais destas enzimas requerem uma grande quantidade da proteína pura, o que exigiria várias purificações convencionais que, em geral, são bastante trabalhosas. Devido a este fato e a existência de poucas de tais proteínas clonadas e expressas, propusemo-nos a clonar e expressar uma proteína tirosina fosfatase (PTP) de soja.

O gene da GmPTP foi obtido do banco de dados, sob número de acesso no GenBank AJ006308.

Após a extração do mRNA de cotilédone e amplificação do cDNA correspondente à GmPTP, este fragmento foi clonado no vetor de expressão procariótica pProEXTM-HTa.

4.1.1 Seqüenciamento

As extremidades do gene da GmPTP clonado no vetor pProEX-HTa foram seqüenciadas para confirmar a presença deste gene *in frame* em relação ao códon de iniciação e à seqüência da cauda de histidina na porção 5['] do gene (Figura 5). Assim podemos confirmar a pauta de leitura que está sendo usada pela maquinaria de tradução da bactéria na produção da PTP recombinante.

(forward) TNTTAGCNCGNTTGGTGGTGGCGCCTCCTCCAAATCGGATATCTGGTTCCGCGTG <u>BamHI</u> <u>EcoRI</u> GATCCCCGGAATTCATGGCCGGCAACCCCGCCACCACTTCCTCCTCCGCATTATC ↑

Figura 5. Extremidade 5' do gene da GmPTP em relação ao vetor pProEx-HTa. A seta indica o sítio de restrição da extremidade 5' (*Eco*RI) onde o gene da GmPTP foi inserido. O códon iniciador indicado está *in frame* em relação ao gene da GmPTP.

4.2 Expressão e purificação da GmPTP

Testou-se a expressão da GmPTP com indução por IPTG, durante 3h, a 30°C. A análise da expressão mostrou que a GmPTP foi encontrada na porção insolúvel, indicada pela banda de maior concentração visualizada no gel (Figura 6A, fração 2b). Adicionalmente, a fração 3 mostra os eluídos resultantes da purificação da porção solúvel, que apresenta bandas na região esperada para a GmPTP expressa em pProEX (~38kDa). Entretanto, a fração 3a foi obtida de um controle sem inserto, sendo assim, estas bandas não se referem à enzima recombinante, portanto, não houve expressão significativa da GmPTP.

Na primeira etapa de purificação foi realizada uma cromatografia de afinidade (Figura 6B). A resina utilizada possui íons de níquel ligados a uma matriz de agarose (Ni Sepharose), sendo estes íons os responsáveis pela afinidade à PTP recombinante, portadora de uma "cauda" de 6 histidinas inseridas pelo vetor pProEx-HTa. Entre as frações 21 e 27 aparentemente houve eluição da GmPTP, mas em concentração e atividade muito baixas.



Figura 6. Análise de expressão em pProEx-HTa e Cromatograma da purificação. A. SDS-PAGE 12,5% das alíquotas para análise de expressão com IPTG de pProEx-PTP, corado com Coomassie Blue. M=marcador de massa molecular, a= pProEx-HTa (controle sem inserto); b= pProEx-PTP 1. Sobrenadante; 2. Insolúvel; 3. Eluição da Resina; 4. *flow through* (extrato não retido na coluna). A seta indica a GmPTP produzida na porção insolúvel após indução (~38kDa). B.Cromatografia de afinidade com resina ligada à Ni²⁺, foi utilizado 1mL de resina Ni-Sepharose. Entre as frações 1-7 e 21-27 houve eluição do *flow through* e GmPTP, respectivamente. A curva em preto indica a dosagem de proteínas a 280 nm das frações coletadas. A curva em vermelho mostra a dosagem de atividade das frações eluídas, realizada conforme Métodos 3.2.3.

A diminuição de produção da proteína na parte solúvel pode estar associada à formação de corpos de inclusão, que são agregados insolúveis freqüentemente observados durante a expressão em larga escala de proteínas recombinantes em bactérias. A presença de corpos de inclusão pode estar associada à esta produção excessiva de proteínas. Neste caso, a capacidade da maquinaria das células, responsável pelo enovelamento protéico na forma nativa, fica comprometida. (Patra *et al.*, 2000).

Como o trabalho com reenovelamento de proteínas pode não restaurar a atividade enzimática, optou-se por uma subclonagem em um novo vetor.

Utilizou-se, então, o vetor de expressão pGEX-4T1, que expressa a proteína ligada à proteína de fusão Glutationa S-Transferase (GST) que, na etapa posterior à clonagem, facilita a purificação da proteína recombinante.

Após 5h de indução com IPTG, para expressão de pGEX-PTP, o extrato protéico obtido foi submetido à uma purificação por cromatografia de afinidade, utilizando uma resina de glutationasepharose, já que a proteína recombinante produzida (~38kDa) está ligada à proteína de fusão GST (~26kDa). Assim, o tamanho esperado da GmPTP fusionada é de aproximadamente 64kDa (Figura 7A).



Figura 7. Análise de expressão em pGEX-4T1 e Cromatograma da purificação. A.Cromatografia de afinidade com a resina Glutationa Sepharose, realizada conforme Métodos 3.2.6. B. SDS-PAGE 12,5% das alíquotas para análise de expressão com IPTG de pGEX-4T1, corado com Coomassie Blue. M=marcador de massa molecular, 1. Insolúvel, 2. *Flow through* (extrato não retido na coluna), 3-9 Frações eluídas da coluna. A seta indica a posição esperada para a GmPTP produzida (~64kDa). B.Cromatografia de afinidade com resina ligada à glutationa, foi utilizado 1mL de resina glutationa-Sepharose. Entre as frações 1-4 e 5-11 houve eluição do *flow through* e GmPTP, respectivamente. A curva em preto indica a dosagem de proteínas a 280 nm das frações coletadas. A curva em vermelho mostra a dosagem de atividade das frações eluídas, realizada conforme Métodos 3.2.3.

A GmPTP fusionada foi expressa na porção solúvel, com rendimento de aproximadamente 4mg/L de cultura e se apresentou praticamente pura já após a primeira etapa de purificação (Figura 7A, fração 3-9). Desta vez foi utilizada uma resina que possui glutationa ligada a uma matriz de agarose (Sepharose), que é responsável pela afinidade à PTP recombinante — ligada à proteína GST adicionada pelo vetor pGEX-4T1. Com este novo sistema de expressão houve um maior rendimento tanto da expressão quanto da purificação (Figura 7B).

A GmPTP expressa no vetor pGEX foi então submetida à digestão sítio-específica com a protease trombina para separação da cauda GST. A Figura 8 mostra que 24h (fração 6), a 4°C, foi o tempo necessário para que a GmPTP fosse liberada sem a proteína fusionada, apresentando assim, aproximadamente 38kDa.



Figura 8. Confirmação da digestão da GmPTP por trombina, a 4ºC. SDS-PAGE 12,5% dos eluídos após digestão com variadas concentrações de trombina, corado com Coomassie Blue. M=marcador de massa molecular, 1. Controle após 24h (sem trombina); 2. Controle tempo zero (sem trombina); 3. amostra após 6 horas de digestão; 4. após 12h; 5. após 18h; 6. após 24h. As setas indicam a massa molecular esperada para os produtos da reação.

A proteína clivada foi então dialisada contra 2000 volumes de PBS 2X e DTT 1mM, a fim de se retirar o tampão de eluição para possibilitar a segunda etapa de purificação.

Após a diálise, a amostra foi purificada pela segunda vez, na mesma resina e com as mesmas condições anteriores (Figura 9A).



Figura 9. Confirmação da segunda e terceira etapa de purificação. A. SDS-PAGE 12,5% dos eluídos após segunda etapa de purificação, corado com Coomassie Blue. M=marcador de massa molecular, 1 e 2 = *flow through* (GmPTP clivada, não retida na coluna), 3 e 4= frações eluídas. **B.** SDS-PAGE 12,5% da GmPTP após concentração, corado com Coomassie Blue. M=marcador de massa molecular, PTP=GmPTP concentrada. As setas indicam a massa molecular da GmPTP concentrada e dos contaminantes da amostra, GmPTP fusionada (GmPTP+GST) e GST.

A GmPTP, desta vez, foi eluída da coluna na fração de *flow through* (Figura 9A, frações 1 e 2), pois apenas os contaminantes tinham afinidade pela coluna de glutationa-sepharose e eluíram com glutationa reduzida contida no tampão de eluição (Figura 9A, frações 3 e 4).

A amostra foi concentrada com o concentrador Centricon YM30 (Millipore), a 5000xg, por 10 minutos a 4°C, mostrada pela Figura 9B. Nesta figura, nota-se ainda contaminação da amostra pela GST clivada e pela proteína fusionada, mostrando que a segunda passagem pela coluna de glutationa não teve 100% de aproveitamento, causando diminuição do grau de pureza da amostra.

Através do cálculo do coeficiente de extinção da proteína pelo programa Expasy, na ferramenta "ProtParam", a partir da seqüência de aminoácidos (Gasteiger *et al.*, 2005), assumiu-se que a concentração de 1g/L de GmPTP apresenta 0,945 de absorbância a 280nm, resultando no valor de concentração de proteína, na amostra concentrada, de aproximadamente 1mg/mL.

Segundo a Tabela 5, aproximadamente 50% da atividade enzimática do extrato refere-se à proteína recombinante, pois após a 1^a etapa de cromatografia em glutationa-sepharose (vide Figura 7), pode-se notar que a GmPTP fusionada apresenta-se praticamente pura. Entretanto, para a realização de estudos de dicroísmo circular (item 4.1.4) e confecção de anticorpos para western blot (item 4.2.1), foram necessários os passos seguintes de purificação.

Tabela 5. Tabela de purificação. Purificação da GmPTP expressa em *E. coli*, a partir de 250 mL de cultura. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%.

Etapa	Volume (mL)	Atividade (nkat)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (nkat.mg ⁻ ¹)	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
Extrato	10	18770	7,0	2681	1,0	100
Glutationa Sepharose 1	4,0	9312	2,3	4049	1,5	50
Glutationa Sepharose 2	4,0	7410	1,5	4940	1,8	40
Concentrador YM- 30	1,0	4002	1,0	4002	1,5	21

A presença de ditiotreitol (DTT), um composto antioxidante, nos tampões utilizados no procedimento de purificação, favoreceu a preservação da atividade da GmPTP (Tabela 6). As três frações extrato, *flow through* e eluído, após a primeira etapa de purificação, mantiveram as suas atividades praticamente preservadas após estocagem a 4°C por 24 horas em presença de DTT. Isto ocorre devido à propriedade protetora que este composto exerce em relação à enzima, prevenindo a oxidação dos grupos sulfidrilas do sítio ativo. A atividade enzimática mostrou-se dependente da presença de agentes redutores e declina rapidamente se estes não estão presentes.

Entretanto, mesmo na presença de DTT, após as 24h, a atividade cai drasticamente, o que compromete um maior rendimento de purificação (Tabela 5). Esta instabilidade mostrada pela proteína recombinante pode estar diretamente relacionada com a ausência de porção de carboidratos apresentada por proteínas expressas em sistemas procarióticos. Wang e colaboradores (2005) reportaram que a extensão da N-glicosilação afetava as propriedades catalíticas da fosfatase ácida púrpura (PAP) de mamíferos. Utilizando dois mutantes, ambos contendo apenas uma cadeia oligossacarídica, constatou-se uma menor afinidade por substratos e menor atividade catalítica, quando comparado às PAPs nativas que possuem 2 pontos de glicosilação.

Tabela 6. Efeito de DTT na estabilidade das frações eluídas da coluna de afinidade. A atividade enzimática das frações foi dosada segundo métodos, após estocagem das mesmas a 4°C por 24 h na ausência e presença de DTT 1 mM. O tempo de incubação foi de 15 minutos, a 37°C. O controle (100%) corresponde à atividade logo após a eluição da coluna. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%.

Frações	Atividade Enzimática após 24hs (%)				
3	Controle	-DTT	+DTT		
Extrato	100	40	98		
Flow Through	100	44	87		
Eluído	100	60	92		

A presença da porção de carboidratos nas várias isoformas de fosfatases ácidas purificadas de sementes de soja quiescentes confere a estas enzimas uma estabilidade muito grande que é intensificada na presença de *p*-nitrofenol e de fosfato inorgânico, produtos da reação quando se utiliza *p*NPP como substrato. Por exemplo, na presença destes dois produtos, a isoforma AP1 mantém-se totalmente estável a 70° C por, pelo menos, 30 minutos (Ferreira *et al.*, 1998b). Por outro lado, a interação entre esta isoforma e a porção de carboidratos é tal que glicosidases não conseguem hidrolisar a ligação glicosídica entre elas (Cavagis, 2008).

Utilizando uma ferramenta de bioinformática para predição de modificações pós traducionais, que identifica possíveis sítios de N-glicosilação (Gupta *et al.*, 2004), podemos concluir que a GmPTP é glicosilada (Figura 10) quando expressa pela própria planta.

A Figura 10A, apresenta os potenciais de glicosilação que a GmPTP possui. Os potenciais que cruzam o limiar padrão de 0,5 (linha vermelha), representam um provável sítio de glicosilação, quando estes ocorrerem no motivo Asn-Xaa-Ser/Thr, sendo Xaa qualquer aminoácido com exceção da prolina. Na Figura 10B, o número relacionado na coluna "Potential" é o valor médio apresentado pelas 9 redes neurais envolvidas nesta predição. A coluna "Jury Agreement" indica quantas, das 9 redes, concordam com a predição apresentada. Assim, apesar de ocorrerem 5 sítios com potencial de glicosilação maior que 0,5 (Figura 10A), ao se analisar a Figura 10B nota-se que apenas dois sítios mostram concordância entre as 9 redes de análise e, dentre esses, apenas um apresenta predição com maior fidelidade. Isto é justificado pela ocorrência de uma prolina adjacente ao motivo Asn-Xaa-Ser/Thr (posição 26 NPSR, Figura 10B) onde a asparagina está inserida, que é conhecida por obstruir a N-glicosilação, na maioria dos casos, por tornar o resíduo de asparagina conformacionalmente inacessível.



Figura 10. Potenciais sítios de N-glicosilação da GmPTP. A. Potencial de N-glicosilação X Posição na seqüência de aminoácidos. O "threshold" (linha vermelha) indica o limiar mínimo para consideração dos Potenciais (linha azul). **B.** Análise dos valores de Potenciais gerados pela rede NetNGlyc 1.0. Os sinais de menos (-) indicam ausência de glicosilação e os sinais de mais (+) indicam glicosilação. O quadro vermelho mostra a posição com maior confiabilidade de ocorrência de glicosilação.

4.3 Estudos Cinéticos da GmPTP

Foram estudadas as propriedades cinéticas da PTP recombinante, tais como determinação da afinidade por pNPP (Km), efeito do pH, inibidores, metais, agentes oxidantes, compostos e substratos.

4.3.1 Efeito do pH

A análise do efeito do pH para a PTP recombinante revelou que a enzima apresentou atividade ótima numa faixa de pH de 5,5 e 6,0 (Figura 11). Estes resultados, ao serem comparados com os obtidos para as isoformas purificadas das sementes quiescentes de soja (Ferreira *et al.* 1998a), sugerem que a PTP recombinante apresenta, frente ao pH, comportamento semelhante ao das isoformas AP2, AP3A e AP3B (Figura 11 e Tabela 7).



Figura 11. Efeito do pH na atividade das enzimas. O ensaio foi realizado conforme descrito em Métodos 3.2.7, utilizando-se *pNPP* como substrato. Foram utilizados os tampões 100mM: Glicina (pH 2,5 e 9,0), Acetato (pH 4,0-5,5), Bis-Tris (pH 6,0) e Imidazol (pH 7,0 e 8,0). As espécies tamponantes não afetaram a atividade em nenhum momento. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro mostram que os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%.

······································				
Fosfatases	pH ótimo			
AP1	5,0			
AP2	6,0			
AP3A	6,0			
AP3B	5,5			
GmPTP	6,0			

Tabela 7. Comparação do pH ótimo da PTP recombinante com as isoformas purificadas de sementes quiescentes de soja.

Segundo a literatura, outras fosfatases ácidas de tecidos de soja também apresentaram pH ótimo nesta faixa, sendo de 5,0 em cotilédones (Ullah e Gibson, 1988) e 6,0 para enzimas secretadas de culturas em suspensão e em folhas (LeBansky *et al.*, 1992, Staswick *et al.*, 1994).

4.3.2 Determinação da afinidade da GmPTP pelo pNPP

Em relação às fosfatases isoladas das sementes quiescentes de soja, a PTP recombinante apresentou baixa afinidade pelo substrato (Tabela 8), apresentado pelo valor alto de Km.

A eficiência da catálise (mostrada pela relação Vmáx/Km) pode estar sendo prejudicada pela ausência de glicosilação da enzima recombinante, pois a porção de carboidratos está diretamente relacionada ao reconhecimento do substrato pela enzima.

Tabela 8. Comparação entre Km, Vmáx e constante de especificidade (Vmáx/Km) da enzima recombinante (GmPTP) com as das isoformas purificadas de sementes quiescentes de soja. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%.

Fosfatases	Vmáx (nkat.mg ⁻¹)	Km (mM)	Vmáx/Km
AP1	756	0,49	1543
AP2	140	0,38	368
AP3A	18,8	0,20	94
AP3B	62	0,086	721
GmPTP	15,3	1,43	11

4.3.3 Efeito de Inibidores

Foram feitos estudos com potenciais inibidores de fosfatases ácidas. A Figura 12 mostra que a PTP recombinante foi fortemente inibida pelo fosfato (P_i) e vanadato. O fosfato é um típico inibidor competitivo de fosfatases, por ser o próprio produto da reação. O vanadato é considerado um análogo de fosfato, podendo adotar estrutura semelhante ao estado de transição das reações de

transferência de grupos fosforil, atuando também como inibidor competitivo (Davies e Hol, 2004). Um estudo mais detalhado de inibição das isoformas de sementes de soja (Ferreira *et al.*, 2000) mostrou que os valores de K_i para o fosfato e vanadato, em relação à isoforma AP1, por exemplo, foram de 250 e 12,8 μ M, respectivamente. Em todas as isoformas o vanadato mostrou ser um inibidor mais potente quando comparado com o fosfato inorgânico.

Por outro lado, o tartarato não apresentou inibição, o que é característico das fosfatases de plantas (Fujisawa *et al.*, 1993). Em eucariotos, este composto é conhecido por inibir fosfatases ácidas de AMr (Tiganis e Bennett, 2007)

Curiosamente a GmPTP não foi inibida por fluoreto. As isoformas da semente foram inibidas pelo fluoreto, que atuou como inibidor competitivo, como reportado por Ferreira e colaboradores (2000). O fluoreto pode causar inibição pelo fato de realizar uma possível e incomum ligação de hidrogênio forte com grupamentos amida (Emsley *et al.*, 1981). Em PTPs de mamíferos, existem relatos na literatura mostrando que o fluoreto inibe as PTPs de osteoblastos, causando um aumento na fosforilação e conseqüente ativação das MAPKs, fazendo com que o processo de proliferação destas células seja favorecido (Lau e Baylink, 2003).

O *p*-cloromercuribenzoato (*p*CMB), que se liga especificamente a grupos -SH livres, inibe pouco significativamente as fosfatases de planta mesmo na concentração de 1 mM, ao contrário das fosfatases de animais que, em concentrações dez vezes menores, são completamente inibidas (Davis *et al.*, 1994, Luan, 2003).

O ácido ocadáico não apresentou efeito sobre a atividade enzimática, pelo fato de ser inibidor específico de serina/treonina fosfatases.



Figura 12. Efeito de potenciais inibidores na atividade da PTP recombinante .A atividade enzimática na ausência dos inibidores foi considerada 100% (controle) e determinada como descrito em Métodos 3.2.7. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro mostram que os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%.

A Tabela 9 resume o efeito de potenciais inibidores na PTP recombinante e nas isoformas purificadas das sementes de soja. As principais diferenças observadas foram em relação ao fluoreto e vanadato. As isoformas foram fortemente inibidas pelo fluoreto (10 mM), enquanto que a PTP recombinante não foi afetada por esse composto. Em relação ao vanadato, a GmPTP foi muito mais sensível do que as 4 isoformas.

Tabela 9. Comparação do efeito de potenciais inibidores da atividade na PTP recombinante de soja com as isoformas purificadas de sementes quiescentes de soja. ND = não determinado. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%.

Inihidor	Atividade Relativa (%)					
mondor	AP1	AP2	AP3A	AP3B	GmPTP	
Ác. Ocadáico 50nM	ND	ND	ND	ND	96,3	
Fluoreto 10mM	32	15	14	22	95,4	
Tartarato 10mM	98	101	102	101	93,4	
pCMB 1mM	31	77	84	66	84,7	
Pi 10mM	18	26	32	41	13,7	
Vanadato 10mM	28	43	57	62	3,1	

4.3.4 Efeito de Íons Metálicos

Alguns metais podem interferir na atividade de fosfatases, podendo causar efeitos inibitórios ou ativadores (Olczak *et al.*, 1997). A inibição por metais está geralmente associada aos íons que se ligam a grupamentos -SH livres em resíduos de cisteína, como por exemplo Cu^{2+} . Outros podem ter efeitos ativadores (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+}) e também serem utilizados como cofatores, sendo assim essenciais para a catálise ou até podem não causar efeito algum. Em nenhum dos casos foi observado efeito significativo na atividade da PTP recombinante e nas isoformas (Figura 13 e Tabela 10).



Ions Metálicos (10mM)

Figura 13. Efeito de íons metálicos na atividade da PTP recombinante. A atividade enzimática na ausência dos íons foi considerada 100% (controle) e determinada como descrito em Métodos 3.2.7. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro mostram que os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%.

Tabela 10. Comparação do efeito de íons metálicos da atividade na PTP recombinante de soja com as isoformas purificadas de sementes quiescentes de soja. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%.

Metais (10mM)	Atividade Relativa (%)					
	AP1	AP2	AP3A	AP3B	GmPTP	
Ca ²⁺	102	94	105	102	115,7	
K ⁺	104	111	119	125	95,4	
Mg ²⁺	93	100	103	100	94,4	
Cu ²⁺	87	79	91	100	87	

A ausência de efeito pelo Cu^{2+} é intrigante, pois PTPs de mamíferos são fortemente inibidas por este composto (Raugei *et al.*, 2002) e, com base nos resultados apresentados nesta tese, apenas com pré-incubação da AP1 (item 4.3.7), esta foi significativamente inibida pelo metal em questão.

Segundo Hung e colaboradores (2007), plântulas de arroz, quando expostas a cobre, rapidamente o acumularam em suas raízes. A presença de cobre causou a ativação de PTPs *in vivo*, reduziu o nível de fosforilação nas células de raízes e causou fragmentação do DNA, o que pode indicar morte celular programada. No entanto, sob a presença de vanadato, a morte celular induzida pelo cobre foi bloqueada mostrando assim que a PTP pode estar mediando a resposta de morte provocada pelo cobre. Isto corrobora os resultados obtidos por Ferreira e colaboradores

(1999), que mostraram uma considerável ativação da isoforma AP2 pelo cobre quando pirofosfato e fosfoenolpiruvato foram utilizados como substrato.

Sendo assim, o tempo de exposição da enzima ao cobre, concentração-dependente, pode modular a atividade da GmPTP, justificando as diferenças mostradas pelos resultados de inibição com e sem pré-incubação.

4.3.5. Efeito de Compostos

Foram utilizados compostos variados para avaliar seus efeitos sobre a atividade da GmPTP. Reagentes redutores de grupos sulfidrilas como ditiotreitol (DTT) e β -mercaptoetanol (BME), não apresentaram efeito sobre a atividade (Figura 14 e Tabela 11). Estes, às vezes, podem causar um aumento da atividade enzimática por protegerem da oxidação os seus grupos -SH essenciais para a catálise (Granjeiro *et al.*, 1999). O reagente quelante de metais, EDTA, não causou inibição da enzima, o que mostra que esta não depende de metal para catalisar a reação, corroborando os resultados encontrados no estudo do efeito de metais (Figura 13 e Tabela 10).



Figura 14. Efeito de compostos na atividade da PTP recombinante. A atividade enzimática na ausência dos compostos foi considerada 100% (controle) e determinada como descrito em Métodos 3.2.7. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro mostram que os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%.

Os resultados observados são muito semelhantes para a PTP recombinante em relação às isoformas encontradas na semente (Tabela 11).

Tabela 11. Comparação do efeito de compostos na atividade da PTP recombinante de soja com as isoformas purificadas de sementes quiescentes de soja. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%.

Compostos	Atividade Relativa (%)					
Compositos	AP1	AP2	AP3A	AP3B	GmPTP	
EDTA 1mM	103	100	94	98	99,1	
DTT 10mM	92	99	93	96	94,4	
BME 1mM	71	95	90	100	81,5	

4.3.6 Efeito de Substratos

O estudo da especificidade por substratos foi realizado utilizando-se pNPP (controle), tirosina-fosfato, serina-fosfato e pirofosfato (PP_i). Conforme esperado, a PTP recombinante reconhece bem tirosina-fosfato como substrato, com maior eficiência quando comparado com o substrato sintético pNPP (Figura 15)

O PP_i é um importante intermediário no metabolismo de plantas em geral. Em muitas reações, ele pode ser utilizado como doador de Pi, em vez de nucleotídeos, como ATP, por exemplo. A enzima recombinante hidrolisou o pirofosfato na mesma proporção que as isoformas das sementes quiescentes (Figura 15 e Tabela 12).



Figura 15. Efeito de substratos na atividade da PTP recombinante. A atividade enzimática com o substrato pNPP foi considerada 100% (controle) e determinada como descrito em Métodos 3.2.7. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro mostram que os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%.

Tabela 12. Estudo da especificidade por substratos. As atividades foram determinadas como descrito em Métodos 3.7, na presença de 10mM de cada substrato. A atividade quando o *p*NPP foi utilizado como substrato foi considerada 100%. AP1, AP2, AP3A e AP3B são as quatro isoformas purificadas de semente de soja. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%.

Substrato	Atividade Relativa (%)						
	AP1	AP2	AP3A	AP3B	GmPTP		
<i>p</i> NPP	100	100	100	100	100		
Tirosina-P	82	80	83	86	260		
Serina-P	24	42	67	59	15		
PP _i	67	81	96	78	88,9		

Além desses substratos analisados na Tabela 12, as isoformas de semente também apresentaram ampla especificidade para outros substratos, como fosfoenolpiruvato, glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, mostrando capacidade de desfosforilar esses intermediários do metabolismo glicolítico (Ferreira *et al.*, 1999). Apesar dos poucos substratos testados, a GmPTP, diferentemente das isoformas, apresentou alta especificidade para o aminoácido tirosina fosforilado como substrato.

4.3.7 Efeito de Agentes Oxidantes

Relatos recentes têm demonstrado que as PTPs de planta, até então tidas como insensíveis ao estado redox, possuem um sistema de regulação através de inativação por oxidação. Para que isto ocorra, é necessária a presença de resíduos de cisteína no sítio ativo suscetíveis à oxidação (Dixon *et al.*, 2005, den Hertog *et al.*, 2005).

Dados anteriores com as isoformas de sementes de soja, sem a pré-incubação, mostraram que o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o pervanadato (mistura equimolar de m-vanadato e H₂O₂), inibiram somente 10% da atividade das isoformas AP1 e AP3B e 20 e 40% das isoformas AP3A e AP2, respectivamente. Isto, somados à ausência de efeito significativo de Cu²⁺ e *p*CMB na atividade das fosfatases mostrados neste trabalho, nos conduziram a realizar novos experimentos a fim de testar os efeitos da pré-incubação em uma isoforma (AP1) com agentes oxidantes.

Resultados anteriores mostraram que a isoforma AP1 não sofreu efeito significativo de agentes oxidantes. Portanto, após a pré-incubação, para se obter um ataque oxidativo mais efetivo

utilizou-se um tempo maior de exposição da isoforma AP1 ao agente oxidante. Assim, como se pode ver na Figura 16, o cobre provavelmente se ligou a uma sulfidrila do sítio ativo e, conseqüentemente, prejudicou a eficiência da catálise. O mesmo ocorreu com o peróxido e o pervanadato, que causaram uma queda de atividade de 68 e 95%, respectivamente.

Interessantemente, a glutationa oxidada não causou efeito significativo na atividade da enzima. Esses resultados, analisados em conjunto, sugerem que o potencial redox do agente oxidante é determinante para a inibição dessa fosfatase.



Figura 16. Estudo da pré-incubação da isoforma AP1 de sementes quiescentes de soja. A enzima foi pré-incubada com GSH 5 mM e/ou agentes oxidantes durante 10 minutos a 37°C. Após esse tempo, a atividade enzimática foi determinada conforme Métodos 3.2.7. (Os agentes oxidantes foram adicionados após 10 minutos de incubação da enzima com o GSH). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro mostram que os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%.

Outro aspecto analisado foi a capacidade de proteção do GSH da oxidação causada pelo peróxido e pervanadato. No caso do pervanadato e peróxido de hidrogênio, não se observou o efeito protetor do GSH, talvez pelo fato destes dois compostos serem altamente oxidantes mesmo nas concentrações utilizadas.

A oxidação reversível em PTPs é um mecanismo de regulação da atividade desta enzima. A inibição *in vitro* ocorre na presença de vários oxidantes, incluindo H_2O_2 , o qual atua como modulador por oxidação do resíduo de cisteína presente no sítio catalítico, causando alteração deste resíduo e a conseqüente produção do ácido sulfênico, como mostrado na Figura 2 (Introdução). Novas oxidações deste produto formado levam à produção do ácido sulfínico e ácido sulfônico, os quais são produtos da oxidação irreversível (Salmeen *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2005).

Em relação à inibição da enzima AP1 pelo cobre, observou-se um efeito protetor por GSH significante de aproximadamente 53%. Neste caso, o GSH em relação à concentração de cobre, pode estar em uma concentração que o torna mais suscetível à ação do cobre do que a enzima.

Dixon e colaboradores (2005) mostraram que a PTP recombinante de soja possui 3 resíduos de cisteínas cataliticamente importantes (Cys78, Cys176 e Cys 266) e também propuseram um modelo de oxidação (Figura 17).



Figura 17. Representação gráfica do modelo de oxidação proposto para a PTP de soja por GSSG. Retirada de Dixon *et al.*, 2005.

A GSSG rapidamente glutationila as cisteínas 176 e 78, em seguida ocorre um rearranjo lento, levando à formação de uma ponte dissulfeto intramolecular entre a Cys 78 e a Cys 266. Esta última cisteína, que dentre as três citadas, é a mais importante para a catálise, mostra uma alta resistência à oxidação. Talvez este seja um dos motivos da necessidade de uma maior interação "enzima-agente oxidante", pois este resíduo está localizado na fenda catalítica em um local profundo, onde provavelmente moléculas maiores tenham um impedimento estérico às proximidades do sítio catalítico, impossibilitando a oxidação. Esta hipótese proposta pelo grupo de Dixon pode explicar a ausência de efeito inibitório observado em nossos resultados para o pCMB e GSSG (Figura 12 e Figura 16, respectivamente).

Todas as diferenças encontradas na cinética entre as isoformas da semente de soja e a enzima recombinante podem ser justificadas a partir da alteração conformacional que a enzima possa sofrer quando está sem a porção de carboidratos. Como citado anteriormente, em relação à estabilidade da GmPTP, esta enzima recombinante foi expressa em bactérias, e como organismos procariotos não reconhecem os sítios de glicosilação pós-traducionais de proteínas eucarióticas, a porção de carboidrato está ausente. Assim, o acesso ao sítio ativo, dependente da estrutura tridimensional da proteína, com certeza está modificado fazendo com que a enzima tenha suas características cinéticas e regulatórias alteradas (Wang *et al.*, 2005).

4.4 Dicroísmo Circular (CD)

4.4.1 Análise da Estrutura Secundária

A estrutura secundária da GmPTP foi investigada por CD. O espectro resultante indicou duas bandas negativas a 208 e 222 nm e uma banda positiva a aproximadamente 195nm (Figura 18).



Figura 18. Análise de Dicroísmo Circular da GmPTP. Espectro da proteína com 0,8mg/mL.

A análise da desconvolução do espectro mostrou que a quantidade de α -hélice e fita β variaram de 33,5 a 36,8% e de 15,9 a 17% respectivamente, mostrando predominância de α -hélices na estrutura secundária da GmPTP.

Estes valores estão de acordo com a predição de estrutura secundária usando PSIPRED (Figura 19), que encontrou 28% para α -hélice e 20% para fita β . Estes resultados também estão de acordo com publicações de membros diferentes da família das PTPs, como por exemplo a estrutura das SHP-1 — PTP de humano que apresenta maior identidade para a PTP de soja — determinada por Yang e colaboradores (1998), que tem 28,8% de α -hélice e 17,7% de fita β .



Figura 19. Predição de estrutura secundária da GmPTP utilizando a ferramenta PSIPRED (McGuffin *et al.*, 2000). As barras (1^a linha) correspondem à confiabilidade da predição; a linha, o cilindro e a seta (2^a linha), correspondem, respectivamente, às porções desenoveladas, em α -hélice e em folha β , identificadas pelas letras C, H e E (3^a linha) respectivamente; na 4^a linha estão as letras correspondentes aos aminoácidos da seqüência em questão.

4.4.2 Análise de Desenovelamento Térmico

Para investigar a estabilidade térmica da PTP recombinante, foi feita uma análise espectroscópica por dicroísmo circular (CD). A desnaturação térmica da GmPTP foi realizada em um espectropolarímetro JASCO J-810. A temperatura foi variada de 4°C a 90°C sendo a desnaturação monitorada a 222 nm. O branco, espectro somente do tampão, foi subtraído do espectro da proteína.

Na Figura 20 pode-se observar que as leituras foram sobrepostas para mostrar como a banda negativa de 222 nm, característica para conteúdos em α -hélice, foi diminuindo gradualmente o seu sinal, em relação ao aumento de temperatura.



Figura 20. Sobreposição de espectros de dicroísmo circular da GmPTP. Os espectros foram medidos em cada temperatura: 4°C; 14°C; 24°C; 34°C; 44°C; 54°C; 64°C; 74°C; 84°C. As setas curtas indicam o pico de 222nm, diminuindo de acordo com o aumento da temperatura, no intervalo de 4°C a 84°C. A seta longa (34°C) indica o início da perda de estrutura secundária da GmPTP.

A sobreposição dos espectros mostra que a GmPTP começa a perder sua estrutura secundária a partir dos 34°C, onde o pico de α -hélice a 222 nm começa gradativamente a diminuir e se aproximar do zero.

Neste capítulo, nós mostramos que a GmPTP foi clonada em *E. coli*, purificada, caracterizada, sendo a atividade da PTP recombinante extremamente instável, provavelmente devido à ausência de porção de carboidratos provocada pelo sistema procariótico em que ela foi

expressa. Esta justificativa pode ser aplicada à todas as diferenças encontradas na comparação da caracterização cinética entre a GmPTP e as isoformas purificadas de sementes de soja, inclusive frente ao fato de que a GmPTP começa seu processo de desnaturação precocemente após a temperatura de 34°C, pois as isoformas mostraram alta estabilidade térmica, perdendo apenas 20% de sua atividade após 60 min. a 60°C (Ferreira *et al.*, 1998b).

CAPÍTULO 2

LOCALIZAÇÃO TECIDUAL

E

PEPCHIP
CAPÍTULO 2: LOCALIZAÇÃO TECIDUAL E PEPCHIP

Para identificação de um possível papel fisiológico para a GmPTP em soja, neste capítulo este aspecto foi avaliado através de três estratégias experimentais (western blot, PCR em tempo real e microarranjos de peptídeos) utilizando tecidos de soja durante o processo de germinação.

4.5 Western Blot

4.5.1 Titulação e Sensibilidade do Anticorpo

A amostra de 1 mg/mL da GmPTP obtida pela purificação, descrita no item 4.2, foi liofilizada e enviada para a FAURGS (Fundação de Apoio da Universidade do Rio Grande do Sul) para produção de anticorpo. A utilização desta técnica tem como objetivo avaliar a expressão tecido-específica *in vivo*.

Antes do anticorpo ser testado no tecido de soja, este foi titulado para fins de determinação da concentração ótima de anticorpo e amostra e também foi determinado o limiar de detecção, isto é, qual o mínimo de GmPTP que seria detectada pelo mesmo, por western blot.

Neste teste foi utilizada como amostra a PTP recombinante purificada expressa em *E. coli*. As diluições de anticorpo primário utilizadas foram: 1:500; 1:1000; 1:3000; 1:5000; 1:10000. (Figura 21A)



Figura 21. Titulação e sensibilidade do anticorpo anti-PTP. A. Autorradiografia da membrana contendo $2\mu g$ da fração purificada da PTP recombinante identificada por variadas concentrações de anticorpo. A seta indica a banda correspondente à PTP recombinante (~40kDa). B. Autorradiografia da membrana contendo variadas concentrações da PTP recombinante. Os números de 1-6 correspondem respectivamente às concentrações de GmPTP: 1,6µg, 320ng, 64ng, 12,8ng, 2,6ng, 512pg e 102pg. A seta indica a banda correspondente da PTP recombinante (~40kDa).

A fração de diluição 1:10000 foi a que menos apresentou interação inespecífica e que definiu melhor a banda de interesse (*vide* indicação da seta-Figura 21A). A concentração ideal de GmPTP também foi avaliada para determinar o limiar de detecção do anticorpo (Figura 21B). Foram utilizadas as concentrações de 1,6µg, 320ng, 64ng, 12,8ng, 2,6ng, 512pg e 102pg. Neste teste, observou-se que o limiar de detecção ficou entre 64 e 12,8 ng, representadas na Figura 21B como frações 3 e 4.

Uma vez que se trata de uma proteína expressa por *E. coli*, a inespecificidade "aparente" do anticorpo pode ser devida ao fato de o próprio coelho conter naturalmente anticorpos contra *E. coli*. Também pela amostra ter sido purificada de extrato da bactéria e não estar 100% pura, algum contaminante oriundo do extrato poderia estar funcionado como antígeno na confecção deste anticorpo, o que não acontece na mesma escala quando analisamos em tecidos de soja.

4.5.2 Distribuição Tecidual da GmPTP

Recentemente foi reportado que a PTP de soja, por sofrer oxidação reversível dos resíduos de cisteína presentes no sítio ativo, pode estar envolvida na regulação da resposta celular ao estresse oxidativo (Dixon *et al.*, 2005). Estado redox e pH são fatores reguladores que podem sofrer influência direta da presença de luz. Estas condições regulam, por exemplo, a proteína DSP4, que está envolvida no mecanismo de biossíntese e degradação do amido no ciclo diurno/ noturno que ocorre nos cloroplastos (Sokolov *et al.*, 2006).

Deste modo e pelo fato de todos os fotorreceptores em plantas serem fosfoproteínas ou proteínas quinases (Kim *et al.*, 2005), para investigar a importância tecido-específica da GmPTP, foram utilizadas duas condições de germinação das sementes, na presença e na ausência de luz.

Após a extração de proteínas das plântulas de soja germinadas no claro e no escuro, estas foram quantificadas e submetidas a western blot. Foram aplicados 100µg de proteínas por poço (Figura 22).

1E 2E 3E 4E S 1C 2C 3C 4C

Figura 22. Imunolocalização da GmPTP em tecidos de soja. Autorradiografia da membrana contendo 100 μ g dos tecidos de soja: 1= raiz; 2=hipocótilo; 3=cotilédone e 4=folha; S= semente; E= escuro; C= claro.

De acordo com a Figura 22, dentre os tecidos analisados, a raiz apresentou bandas mais evidentes nas duas condições de germinação analisadas, escuro e claro (frações 1E e 1C). De forma interessante, praticamente não foi detectada GmPTP no hipocótilo (Figura 22, frações 2E e 2C).

A massa molecular da GmPTP identificada por western blot foi estimada através da representação da mobilidade eletroforética frente ao logaritmo das massas moleculares conhecidas (dos marcadores de massa molecular) (Figura 23).



Figura 23. Determinação da massa molecular da GmPTP. A migração (em cm) foi medida para cada proteína na membrana após revelação, de acordo com Métodos 3.2.10, utilizando o padrão de massa molecular contendo: β -galactosidase (116kDa), albumina de soro bovino (66,2kDa), ovalbumina (45kDa), lactato desidrogenase (35kDa), endonuclease de restrição *Bsp*981 (25kDa), β -lactoglobulina (18.4kDa) e lisozima (14.4kDa). A banda da GmPTP foi reconhecida pelo anticorpo anti-PTP.

Os parâmetros gerados pelo gráfico (dados dentro da Figura 23) foram utilizados para estimar a massa molecular da GmPTP através da equação da reta. Assim, através da migração da GmPTP de aproximadamente 7 cm, cuja banda foi reconhecida pelo anticorpo anti-PTP, a massa molecular estimada foi de 70kDa (Figura 23). Esta massa está de acordo com o esperado já que a proteína expressa pela planta é provavelmente glicosilada, o que aumenta consideravelmente a

massa molecular comparado ao encontrado pela proteína expressa pelo sistema procariótico (~38kDa).

4.6 PCR em Tempo Real (qPCR)

4.6.1 Distribuição Tecidual na Presença de Luz

A Figura 24 mostra o gráfico da corrida de PCR para um detector (uma dupla de primers para GmPTP), onde se pode observar a amplificação diferencial representada por Ct, um valor limiar (*"threshold"*) referente ao número de ciclos, que reflete um ponto da reação na qual um número suficiente de amplicons se acumulou para se tornar um número estatisticamente significativo, acima da linha de base.



Figura 24. Análise de qPCR por plotagem de amplificação (Δ Rn X Número do ciclo). A linha vermelha horizontal foi traçada automaticamente pelo software de análise para servir de base para os cálculos de amplificação diferencial (Ct).

Os valores de Ct estão mostrados na Tabela 13. O valor de Ct é inversamente proporcional à quantidade de fragmentos que foram amplificados, isto é, quanto antes o amplicon é amplificado (com menor número de ciclos), maior é a quantidade de mRNA referente à GmPTP presente na amostra analisada

Tabela	13.	Amplifi	icação	diferencia	al (Ct)	dos	mRNAs.	Os	valores	de	amplifi	cação,
represen	tados	por Ct,	foram	calculados	pelo	soft	tware	disponível	pelo	termocio	clador	ABI P	RISM
7000 Ins	trume	ent (App]	lied Bi	osystems)									

Amostra	Ct
A- Raiz	24,522
B- Hipocótilo	36,306
C- Cotilédone	29,660
D- Folha	31,973

A Figura 25 mostra a quantificação relativa de mRNA nos tecidos de soja germinados no claro. Dentre os tecidos estudados, a raiz mostrou a maior quantidade de mRNA. O tecido raiz apresentou a maior detecção na condição fisiológica de claro enquanto no hipocótilo praticamente não houve detecção. Estes resultados corroboram os encontrados no western blot.



Figura 25. Quantificação relativa da expressão da GmPTP em diferentes partes da plântula. As barras de erro mostram que os resultados apresentaram desvio padrão menor que 5%.

Pode-se sugerir, então, que a GmPTP é provavelmente tecido-específica e o alto nível de expressão em raiz indica que esta enzima exerce um papel importante durante a germinação.

Os resultados obtidos dão base para construção de hipóteses em relação à função dessa enzima:

a) A raiz foi o único tecido que expressou consideravelmente a GmPTP em nível de mRNA na presença de luz, o que indica que esta GmPTP apresenta importância crítica para o metabolismo da raiz. Yemets e colaboradores (2008) examinaram o efeito do inibidor de PTP, o vanadato, em células de raízes de Arabidopsis e demonstraram que os efeitos mais fortes foram encontrados nas células meristemáticas das raízes, onde o inibidor causou a desorganização de microtúbulos. Em adição, estes autores também detectaram a reorientação dos microtúbulos de transversal para longitudinal na epiderme e no córtex das células da zona de elongação e zonas de diferenciação.

b) A importância da participação da GmPTP no suprimento de fósforo em raízes. O fosfato inorgânico é o nutriente da planta com menor disponibilidade no solo (Raghothama e Karthikeyan,

2005). Sendo assim, sob condições de privação de fosfato, as raízes apresentam níveis aumentados de fosfatase para prover fósforo livre suficiente para processos importantes como fotossíntese, sinalização e para o desenvolvimento normal de tecidos (Duff *et al.*, 1994, Hammond *et al.*, 2004)

c) Outra função que pode estar relacionada com a presença de altos níveis de GmPTP nas raízes é a sua participação na cascata de desfosforilação que desencadeia a morte celular induzida por cobre, como citado anteriormente (Hung *et al.*, 2007)

4.7 Microarranjos de Peptídeos - Quinoma da Raiz (Pepchip®)

Proteínas fosfatases são parceiras obrigatórias das proteínas quinases no controle do circuito celular, mas existem poucas vias de sinalização elucidadas que incluem proteínas fosfatases com substratos bem definidos (DeLong, 2006). A fosfoproteômica então, surge como uma poderosa ferramenta que poderá auxiliar na identificação de fosfatases e quinases que estão ativas na sinalização e regulação de mecanismos celulares. Embora o PepChip® apresente um conjunto de substratos de quinases derivadas de mamíferos, em sua maioria, Diks e colaboradores (2007) mostraram que estes podem ser reconhecidos e fosforilados por uma gama de quinases contidas em lisados de diversas células eucarióticas, desde amebas e leveduras até insetos e plantas.

A partir dos dados obtidos com a localização tecidual, que mostraram que a GmPTP está presente em quantidades consideráveis na raiz das plântulas de soja, optou-se por investigar o quinoma da raiz, comparando a germinação de plântulas no claro e escuro.

Apenas com a visualização da Figura 26 fica evidente que a germinação no escuro tem perfil de fosforilação diferente da germinada no claro, sendo muito mais intenso no primeiro caso. A comparação da fosforilação diferencial entre as lâminas foi realizada através da análise da quantificação da radioatividade, que gerou os dados apresentados no Apêndice A.



Figura 26. Escaneamento dos arranjos de peptídeo de lâminas "Pepchip Kinase I". Os extratos das raízes foram adicionados sobre os chips. Após a reação, os PepChips foram lavados, secos e expostos por 5 dias. Após a exposição, as lâminas foram escaneadas pelo Phosphorimager Storm (GE Healthcare/Amersham). Cada "spot" representa a fosforilação de um substrato específico pela quinase presente no lisado. A= Lisado de raízes germinadas no escuro, B= Lisado de raízes germinadas no claro, C= Sobreposição das lâminas A (vermelho) e B (verde).

Através destes resultados, foram obtidos 175 peptídeos consenso com fosforilação diferencial estatisticamente significantes (coluna "Teste t", p<0,05). A Tabela 14 mostra os vinte primeiros peptídeos consenso apresentados no Apêndice A, ordenados decrescentemente de acordo com o "*fold change*", isto é, quantas vezes a condição "escuro" causou maior fosforilação em relação à condição "claro".

Spot	Seqüência consenso	Proteína	ID	Quinase provável	Teste t	Fold Change
1071	PTKRSPQKG	Histone H2B.1	SWISS;P06145;H2B1_STRPU	PLCzeta	0,041656	4,51
366	RKEISVR	glycogen phosphorylase	SWISS;P11217;PHS2_HUMAN	PKA , PhK	0,042111	3,80
11	FFRRSKIAV	glutamate receptor 2	SWISS;P19491;GLR2_RAT	РКС	0,024665	3,77
833	LTRRASFSAQ	Regulatory protein ADR1	SWISS;P07248;ADR1_YEAST	РКА	0,000543	3,51
650	EDTLSDSDD	N-myc proto-oncogene protein	SWISS;P04198;MYCN_HUMAN	CKII	0,001179	3,47
828	KRPSGRAKA	Myelin basic protein	SWISS;P02687;MBP_BOVIN	PKC, PKA	0,016995	3,45
605	NTVSTSLGH	muscarinic acetylcholine receptor M2	SWISS;P08172;ACM2_HUMAN	GRK	0,029492	3,44
383	TSSSSIFDI	DNA topoisomerase II	SWISS;P06786;TOP2_YEAST	CKII	0,01594	3,43
964	NRIYTHQVV	Cell division protein kinase 7	SWISS;P20911;CDK7_XENLA	CDK2	0,016349	3,28
998	KRTLR	EGF Receptor	SWISS;P00533;EGFR_HUMAN	РКС	0,035437	3,18
924	QGTLSKIFK	Myelin basic protein	SWISS;P02687;MBP_BOVIN	РКС	0,017504	3,12
66	KQISVR	glycogen phosphorylase	SWISS;P11217;PHS2_HUMAN	PhK	0,008614	3,08
729	KKSWSRWTL	parathyroid hormone-related peptide receptor	SWISS;P25107;PTRR_DIMDA	РКА	0,025171	2,99
801	NTSSSPQPK	p53	SWISS;P04637;P53_HUMAN	CDK2, CDK5	0,005527	2,96
724	QDPVSPSLV	muscarinic acetylcholine receptor M2	SWISS;P08172;ACM2_HUMAN	GRK	0,002383	2,84
863	TPPLSPSRR	Myc proto-oncogene protein	SWISS;P01106;MYC_HUMAN	GSK3, ERK	0,03129	2,84
23	SPRKSPKKS	Histone H1	SWISS;P02256;H1_PARAN	PLCzeta	0,03943	2,82
396	ENAFSPSRS	Caldesmon	SWISS;Q62736;CALD_RAT	CDK	0,046337	2,69
844	FMTEYVATR	Mitogen-activated protein kinase	SWISS;P14681;KSS1_YEAST	MEK	0,01122	2,62

Tabela 14. Peptídeos consenso que demonstraram maior fosforilação pelas quinases presentes no extrato de amostras germinadas no escuro em relação ao claro.

Analisando os dados da Tabela 14 conjuntamente com o gráfico apresentado pela Figura 27, pode-se concluir que, dentre as quinases mais ativas, o grupo mais pronunciando é o das AGC (em negrito - Tabela 14), que compreende as famílias PKA (proteína quinase A), PKC (proteína quinase C), PKG (proteína quinase dependente de GMP), entre outras (Manning, *et al.*, 2002).



Figura 27. Visão geral do perfil de fosforilação de substratos de acordo com a provável quinase envolvida. (n=175, p<0,05) Lisados de raízes germinadas tanto na ausência quanto na presença de luz foram usados para determinar o perfil fosfoproteômico através do arranjos de peptídeos (PepChip®) contendo 1176 seqüências consenso quinase-específicas.

A recente descoberta de interação entre calmodulina (CaM) e proteínas fosfatases de quinases ativadas por mitógenos (NtMPK1), estabelece uma importante conexão entre sinalização de Ca^{2+} e a cascata de MAPK, duas das mais importantes vias de sinalização em células de plantas (Rainaldi *et al.*, 2007).

Sendo assim, através da base de dados STRING (von Mering *et al.*, 2007), uma ferramenta de bioinformática que integra e prediz interações proteína-proteína, realizou-se o cruzamento das informações das cascatas de Ca²⁺ e MAPK com a proeminente atividade das quinases do grupo AGC mostrada no Pepchip® (Figura 28). Esta predição não necessariamente afirma que existe interação por fosforilação, mas nos dá indícios de como analisar e integrar a atividade mostrada pelo chip com os dados da literatura.



Figura 28. Interações previstas pela base de dados STRING. As proteínas analisadas foram MAPK (MAPK1), Calmodulina (CALM1), PKC (PRKCA), PKA (PRKACG), e SHP-1 (PTPN6). Associações mais freqüentes foram mostradas por linhas azuis mais espessas.

A pesquisa no banco de dados foi realizada para proteínas de humanos, a espécie com interações mais bem estabelecidas. A SHP-1 foi utilizada por apresentar maior identidade de seqüência com a GmPTP dentre as PTPs de humanos. Interessantemente, as proteínas que apresentaram interação nesta Figura 28 também mostraram alta atividade no chip, como MAPKs (spots n° 911, 129, 542), ERKs (spots n° 706, 957, 863) e CaMs (spots n° 834, 302, 775) (para maiores informações, vide apêndice A).

4.7.1 Cascata de sinalização pela via de MAPKs e Ca²⁺

Com base na literatura, os resultados obtidos foram relacionados com as condições fisiológicas da planta. Assim, contextualizou-se a etapa de desenvolvimento da soja (germinação), com sua condição de crescimento (ausência *versus* presença de luz) e o tecido analisado (raiz), finalmente propondo um modelo de sinalização baseado nas principais quinases ativadas no chip (Figura 29). Este modelo foi construído com base no fitormônio ácido abscísico (ABA), que desempenha papel vital em vários aspectos do crescimento e desenvolvimento da planta, incluindo maturação do embrião, dormência de sementes, germinação, crescimento pós-germinativo e na transição do crescimento vegetativo para o reprodutivo. O ABA é também um sinal hormonal

central que regula adaptações das plantas ao estresse ambiental, como seca, frio e salinidade, regulando a abertura de estômatos e a expressão de genes de resposta ao estresse. Ele atua através de uma rede complexa de vias de sinalização, onde a resposta celular é iniciada pela percepção de ABA que dispara cascatas *downstreams* para induzir o efeito fisiológico final (Wang e Zhang, 2008).

a) GERMINAÇÃO

Em plantas, a germinação é determinada pelo habitat e a estação do ano, e o momento certo de germinar é crítico para a sobrevivência do organismo. Para isso, as sementes monitoram fatores ambientais, como umidade, temperatura e luz e os traduzem em sinais que são transmitidos por hormônios como ácido abscísico (ABA), ácido giberélico (GA), auxina, etileno, entre outros.

b) LUZ

A luz estimula fotorreceptores nas plantas. Os fotorreceptores mais estudado são os fitocromos, capazes de absorverem o comprimento de onda de 660nm na região do vermelho do espectro visível. Oh e colaboradores (2007) propuseram um mecanismo no qual a luz, ao estimular fitocromos, aumenta a biossíntese de GA e diminui a de ABA através da indução de degradação da proteína PIL5 (Phytochrome-Interacting Factor3-Like5) e induz a germinação.

As raízes são capazes de sentir e responder à luz por também possuírem fitocromos. Desta maneira, Correl e Kiss (2005) reportaram que a presença de luz pode causar inibição do crescimento de raízes através da ação de fitocromos.

c) RAIZ

O sistema radicular da planta é composto de tecidos altamente especializados e importantes na sustentação da planta e, principalmente, na absorção de água e nutrientes do solo. Recentemente foi observado que, em raízes de arroz, o ABA participa da regulação do crescimento pós-embrionário e desenvolvimento deste tecido. Na presença deste fitormônio induziu-se o inchamento das extremidades provocando a formação de pêlos radiculares e raiz lateral. A resposta das raízes ao ABA foi altamente dependente do aumento de concentração de Ca²⁺citoplasmático, oriundos tanto do meio extracelular quanto do intracelular. O ABA também alterou a expressão de proteínas, induzindo o acúmulo de ADF (fator de despolimerização de actina), o que pode acarretar em mudanças dinâmicas dos filamentos de actina e causar rearranjo do citoesqueleto, que é concernente ao mecanismo de regulação do crescimento das extremidades das raízes (Chen *et al.*, 2006).



Figura 29. Esquema do modelo proposto de sinalização em raízes de plântulas de soja germinadas no escuro. ABA afeta a morfogênese de raízes em desenvolvimento. Ele causa um aumento na concentração de Ca²⁺ no citoplasma de origem extracelular e intracelular (retículo endoplasmático) e paralelamente pode estar diretamente ativando fatores de transcrição. Os íons de Ca^{2+} , então, se ligam à calmodulina e formam o complexo Ca^{2+} -calmodulina. Este complexo ativado pode ativar outros componentes downstreams na via, como a proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina (CaMK). Isto pode levar à síntese protéica ou mudar o estado de fosforilação da ADF nas extremidades de raízes, causando o rearranjo do citoesqueleto durante o crescimento celular. A via das MAPKs também está ativada — visto as altas concentrações de Ca²⁺ — e ativam fatores de transcrição, favorecendo a possível proliferação e ativação do ciclo celular. A PTP pode atuar como modulador nestas vias, possivelmente atuando tanto em PKC, quanto em ERK. A MAPK fosfatase (MAPKP) pode modular negativamente a via de MAPKs e atua como "intersecção" entre as duas vias, por fazer ligação específica com a CaMK. CDK=proteína quinase dependente de ciclinas, FT=fator de transcrição, DAG=diacilglicerol, IP3= inositol trifosfato, RR= receptor de rianodina, RE=retículo endoplasmático, MP= membrana plasmática. As setas interrompidas indicam inibição por desfosforilação. As quinases indicadas em retângulos vermelhos são as que apresentaram ativação no PepChip®.

As vias demonstradas na Figura 29 são bem estabelecidas em mamíferos, porém, todas as quinases envolvidas no esquema desta figura possuem ortólogos em plantas: as CaMK pertencem à superfamília das CDPK-SnRK em Arabidopsis (Hrabak *et al.*, 2003); as MAPKs, como MEK e ERK, participam de vários mecanismos de sinalização em plantas (Colcombet e Hirt, 2008); CDKs fosforegulam células vegetais em proliferação (Francis, 2007); a via do fosfatidilinositol regula as quinases da família AGC e estão envolvidas no crescimento de pêlos radiculares (Anthony *et al.*, 2004) e como último exemplo, alguns receptores importantes na recepção do estímulo extracelular, como quinases tipo receptor (RLKs), que diferem das de mamíferos pelo fato de apresentarem especificidade por serina/treonina (Shiu e Bleecker, 2001)

Este capítulo tratou da localização tecidual da GmPTP e avaliação do quinoma de raízes germinadas na presença e ausência de luz. Esta proteína foi preferencialmente expressa por raízes e mostrou um aumento de expressão quando germinadas no escuro em relação ao claro.

A germinação, em ambos os casos, foi realizada somente na presença de água MilliQ, significando que ambas as condições caracterizavam estresse por escassez de nutrientes, demonstrado pelo crescimento das raízes em grandes proporções em relação ao resto da plântula. No caso das plantas estioladas, que germinaram no escuro, esta situação se complica, pois a ausência de luz faz com que a única fonte de nutrientes seja originada do material de reserva presente no cotilédone.

Esta situação de estresse justifica a presença do ABA favorecendo as vias descritas anteriormente e o remodelamento dos filamentos de actina pode funcionar como mediador deste estresse, promovendo as reações típicas observadas, como o inchamento da extremidade das raízes (onde estão presentes os tecidos meristemáticos, com alta taxa de crescimento e proliferação), maior formação de pêlos radiculares e, possivelmente, a formação de raízes laterais. (Chen *et al.*, 2006).

A quantidade de dados gerados na análise do Pepchip® é muito grande e os resultados obtidos foram focados apenas em um fitormônio. Assim, são necessárias etapas posteriores de análise, que validem e confirmem as proteínas fosforiladas e, além disso, consigam dar uma visão mais ampla do que pode estar ocorrendo no metabolismo de raízes como um todo, avaliando sob outras perspectivas de interação entre as vias, moduladas por outros fatores e hormônios.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados mostrados neste trabalho, pode-se concluir que:

- a PTP de soja foi clonada e expressa, produzindo 4mg a partir 1L de cultura de bactérias;

- a cinética da GmPTP foi comparada à das isoformas purificadas de sementes quiescentes de soja, mostrando que a enzima recombinante apresentou especificidade maior para Tyr-P quando comparada ao substrato sintético *p*NPP;

- em relação aos efeitos de compostos e inibidores, a GmPTP não foi inibida por fluoreto e por Cu²⁺. No caso do cobre, esta ausência de efeito pode estar relacionada ao fato deste metal ser um suposto regulador da GmPTP;

- a GmPTP apresentou baixa estabilidade térmica quando comparada às isoformas de semente de soja;

 - os efeitos causados pela oxidação só puderam ser detectados após a pré-incubação da AP1 com os agentes oxidantes, devido ao fato de que estas enzimas podem ser reguladas por oxidação transiente de sua cisteína presente no sítio catalítico;

 - as disparidades encontradas nos resultados de caracterização cinética podem ser discutidas com base na instabilidade proporcionada pela ausência de carboidratos na estrutura da enzima expressa num sistema procariótico;

- através de imunolocalização foi possível concluir que a GmPTP é altamente expressa em raízes, comparada aos outros tecidos avaliados, corroborado pela quantificação de mRNA;

- o grupo AGC de quinases foi o que se apresentou mais ativo no microarranjo de peptídeos de raízes em germinação, comparando as situações de presença e ausência de luz;

- analisando a fosforilação do PepChip® como um todo, o fitormônio ABA pode estar envolvido na via de sinalização hipoteticamente mais ativa nas condições analisadas;

- as vias de sinalização de MAPK e Ca⁺² podem estar relacionadas com o crescimento de raízes pós embrionário, envolvendo o ABA e mecanismos de rearranjo do citoesqueleto.

6 PERSPECTIVAS

O estudo de vias de sinalização em plantas ainda está em sua "infância", e apesar das dificuldades de trabalho, como a falta de dados na literatura e em banco de dados, é um campo muito promissor para a descoberta de novos mecanismos e processos envolvendo as fosfatases e quinases.

A possibilidade da realização do Pepchip®, em colaboração com o Prof. Dr. Maikel Peppelenbosch, da Universidade de Groningen - Holanda, surgiu no último ano do doutoramento. O chip, por sua vez, oferece uma quantidade de dados que necessita tempo para ser analisado e validado. Sendo assim, esta técnica deixou muitas perspectivas para continuação deste trabalho, como:

- validação das supostas vias e proteínas ativadas mostradas pelo padrão de fosforilação do chip;

- avaliação da ação de fitormônios na germinação e influência da presença de luz em cada um deles.

- análise do quinoma de outros tecidos em germinação, como as folhas e cotilédones;

- aprofundamento do estudo da atividade fisiológica da GmPTP em raízes, tentando assim comprovar sua atividade tecido-específica e seu suposto substrato fisiológico, através, por exemplo, de ensaios de duplo-híbrido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander, D.R. (2000) The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. Sem. Immunol. 12: 349-359.

Aoyama, H., Cavagis, A.D., Taga, E.M., Ferreira, C.V. (2001) Endogenous lectin as a possible regulator of the hydrolysis of physiological substrates by soybean seed acid phosphatase. Phytochemistry. **58**: 221-225.

Aoyama, H., Silva, T.M.A., Miranda, M.A., Ferreira, C.V. (2003) Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. Quím. Nova. 26: 896-900.

Anthony, R.G., Henriques, R., Helfer, A., Mészáros, T., Rios, G., Testerink, C., Munnik, T., Deák, M., Koncz, C., Bögre, L. (2004) A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in Arabidopsis. EMBO J. 23: 572-581.

Asthagiri, D., Dillet, V., Liu, T., Noodleman, L., Van Etten, R.L., Bashford, D. (2002) Density functional study of the mechanism of a tyrosine phosphatase: I. Intermediate formation. J Am Chem Soc. **124**: 10225-10235.

Brasil (1980) Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Regras para Análise de Sementes. Brasília, 1980. 188p.

Cavagis, A.D.M. (2008) Comunicação pessoal.

Champion, A., Kreis, M., Mockaitis, K., Picaud, A., Henry, Y. (2004) Arabidopsis kinome: after the casting. Funct. Integr. Genomics **4:**163-187.

Chen, C-W., Yang, Y.-W., Lur, H-S., Tsai, Y-G., Chang M-C. (2006) A Novel Function of Abscisic Acid in the Regulation of Rice (Oryza sativa L.) Root Growth and Development. Plant Cell Physiol. **47:** 1–13.

Chernoff, J., Li. H.C. (1985) A major phosphotyrosyl-protein phosphatase from bovine heart is associated with a low-molecular-weight acid phosphatase. Arch. Biochem. Biophys. **240**: 135-145.

Chong, Z.Z., Maiese, K. (2007) The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. Histol Histopathol. **22**: 1251-1267.

Colcombet, J., Hirt, H. (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. Biochem. J. **413**: 217–226.

Correll, M.J., Kiss J.Z. (2005) The Roles of Phytochromes in Elongation and Gravitropism of Roots. Plant Cell Physiol. **46:** 317–323.

Davies, D.R., Hol, W.G. (2004) The power of vanadate in crystallographic investigations of phosphoryl transfer enzymes. FEBS Lett. **577:** 315-321.

Davis J.P., Zhou, M.M., Van Etten, R.L. (1994) Kinetic and site-directed mutagenesis studies of the cysteine residues of bovine low molecular weight phosphotyrosyl protein phosphatase. J Biol Chem. **269:** 8734-8740.

Delong, A. (2006) Switching the flip: protein phosphatase roles in signaling pathways. Curr. Opin. Plant Biol. **9:** 470-477.

den Hertog, J., Groen, A., van der Wijk, T. (2005) Redox regulation of protein-tyrosine phosphatases. Arch. Biochem. Biophys. **434:**11-15.

den Hertog, J., Ostman, A., Böhmer, F.D. (2008) Protein tyrosine phosphatases: regulatory mechanisms. FEBS J. 275: 831-847.

Diks, S.H., Kok, K., O'Toole, T., Hommes, D.W., van Dijken, P., Joore. J., **Peppelenbosch**, M.P (2004) Kinome profiling for studying lipopolysaccharide signal transduction in human peripheral blood mononuclear cells. J Biol Chem. **279**: 49206-49213.

Diks, S.H., Parikh, K., van der Sijde, M., Joore, J., Ritsema, T., Peppelenbosch, M.P. (2007) Evidence for a minimal eukaryotic phosphoproteome? PLoS ONE. **2:** e777.

Dixon, D.P., Fordham-Skelton, A.P., Edwards, R. (2005) Redox regulation of a soybean tyrosine-specific protein phosphatase. Biochemistry. **44:** 7696-7703.

dos Prazeres, J.N., Ferreira, C.V., Aoyama, H. (2004) Acid phosphatase activities during the germination of *Glycine max* seeds. Plant Physiol. Biochem. 42: 15-20.

Duff, S.M.G., Sarath G., W.C. Plaxton (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism Physiol. Plant. **90:** 791-800.

Emsley, J., Jones, D.J., Miller, J.M., Overill, R.E., Waddilovela, R.A. (1981). An Unexpectedly Strong Hydrogen Bond: Ab Initio Calculations and Spectroscopic Studies of Amide-Fluoride systems. J. Am. Chem. Soc. 103:24-28.

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

Ferreira, C.V., Granjeiro, J.M., Taga, E.M., Aoyama, H. (1998b) Soybean seeds acid phosphatases. Unusual optimum temperature and thermal stability studies. Biochem. Biophys. Res. Commun. 242: 282-286.

Ferreira, C.V., Taga, E.M., Aoyama, H. (1999) Glycolytic intermediates as substrates of soybean acid phosphatase isoforms. Plant Sci. 147: 49-54.

Ferreira, C.V., Taga, E.M., Aoyama, H. (2000) Inhibition of acid phosphatase isoforms purified from mature soybean (*Glycine max*) seeds. J. Enzyme inhib. 15: 403-410.

Fisher, E.H. Nobel Lecture. Protein phosphorylation and cellular regulation II. In Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1991-1995. Edited by: Ringertz N. Singapore, World Scientific Publishing Co.1997: 95-113.

Fordham-Skelton, A.P., Skipsey, M., Eveans, I.M., Edwards, R., Gatehouse, J.A. (1999) Higher plant tyrosine-specific protein phosphatases (PTPs) contain novel amino-teminal domains: Expression during embryogenesis. Plant Mol. Biol. **39:** 593-605.

Francis, D. (2007) The plant cell cycle-15 years on. New Phytol. 174: 261-278.

Fujisawa, K., Katsumata, Y., Yoshino, M. (1993) Human seminal phosphatase. Properties and comparison with plant phosphatases. Int J Biochem. **25:** 627-630. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. pp. 571-607

Golden, T., Swingle, M., Honkanen, R.E. (2008) The role of serine/threonine protein phosphatase type 5 (PP5) in the regulation of stress-induced signaling networks and cancer. Cancer Metastasis Rev. 27: 169-178.

Gotoh, Y., Nishida, E., Yamashita, T., Hoshi, M., Kawakami, M. Sakai, H. (1990) Microtubule-associated-protein (MAP) kinase activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. Eur. J. Biochem. **193:** 661–669.

Granjeiro, P.A., Ferreira, C.V., Granjeiro, J.M., Taga, E.M., Aoyama, H. (1999) Purification and kinetic properties of a castor bean seed acid phosphatase containing sulphydryl groups. Physiol. Plant. **107:**151-158.

Gupta, R., Jung, E., Brunak, S. (2004).Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc

Gupta, R., Ting, J.T., Sokolov, L.N., Johnson, S.A., Luan, S. (2002) A tumor suppressor homolog, AtPTEN1, is essential for pollen development in *Arabidopsis*. Plant Cell. 14: 2495-2507.

Hammond, J.P., Broadley, M.R., White, P.J. (2004) Genetic Responses to Phosphorus Deficiency. Ann. Bot. 94: 323–332.

Hanks, S.K. (2003) Genomic analysis of the eukayotic protein kinase superfamily: a perspective. Genome Biol. 4: 111.

Hrabak, E.M., Chan, C.W., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J.K., Harmon, A.C. (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. Plant Physiol. 132: 666-680.

Hung, W.C., Huang, D.D., Chien, P.S., Yeh, C.M., Chen, P.Y., Chi, W.C., Huang, H.J. (2007) Protein tyrosine dephosphorylation during copper-induced cell death in rice roots. Chemosphere. **69:** 55-62.

Jia, Z. (1997) Protein phosphatases: structures and implications. Biochem. Cell. Biol. 75: 17-26.

Johnson, S.A., Hunter, T. (2005) Kinomics: methods for deciphering the kinome. Nat Methods. 2:17-25.

Jones, D.T. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. J. Mol. Biol. 292: 195-202.

Kennelly, P.J. (2002) Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. FEMS Microbiol Lett. **206:** 1-8.

Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D.W., Barsam, B., Veretnik, S., Gribskov, M. (2002) The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of Arabidopsis. Plant Physiol. **129**: 908-925.

Kerk, D., Templeton, G., Moorhead, G.B. (2008) Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of humans, green algae, and higher plants. Plant Physiol. **46:** 351-367.

Keyse, S.M. (1998) Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. Semin Cell Dev Biol. **9:** 143-152.

Kim, J-I., Park, J-E., Zarate, X., Song, P-S. (2005) Phytochrome phosphorylation in plant signaling Photochem. Photobiol. Sci. 4: 681-687.

Kozlenkov, A., Manes, T., Hoylaerts, M.F., Millán, J.L. (2002) Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases. J Biol Chem. **277**: 22992-22999.

Krebs, E.G. Nobel Lecture. Protein phosphorylation and cellular regulation I. In Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1991-1995. Edited by: Ringertz N. Singapore, World Scientific Publishing Co.1997: 72-98.

Kreegipuu, A., Blom, N., Brunak, S. (1999) PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0. Nucleic Acids Res. **27:** 237-239.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bateriophage T4. Nature **277**: 680-685.

Lau, K.H., Baylink, D.J. (2003) Osteoblastic tartrate-resistant acid phosphatase: its potential role in the molecular mechanism of osteogenic action of fluoride. J. Bone Miner. Res. **18**:1897-1900.

LeBansky, B.R., McKnight, T.D., Griffing, L.R. (1992) Purification and characterization of secreted purple phosphatase from soybean suspension cultures. Plant Physiol. **99:** 391-395.

Leonard, C.J., Aravind, L., Koonin, E.V. (1998) Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein protein kinase superfamily. Genome Res. **8:** 1038-1047.

Lowry, O.H., Lopez, J.A. (1946) The determination of inorganic phosphate in thwe presence of labile phosphate esters. J. Biol. Chem. 162: 421-428.

Luan, S. (2003) Protein phosphatases in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 54: 63-92.

MacKintosh, C., Coggins, J., Cohen, P. (1991) Plant protein phosphatases: Subcellular distribution, detection of protein phosphatase 2C and identification of protein phosphatase 2A as the major quinate dehydrogenase phosphatase. Biochem. J., **273**: 733-738.

MacRobbie, E.A. (2002) Evidence for a role for protein tyrosine phosphatase in the control of ion release from the guard cell vacuole in stomatal closure. Proc Natl Acad Sci U S A. **99:**11963-11968.

Manning, G., Whyte DB., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. Science. **298**: 1912-1934.

McCain, D.F., Grzyska, P.K., Wu, L., Hengge, A.C., Zhang, Z.Y. (2004) Mechanistic studies of protein tyrosine phosphatases YopH and Cdc25A with m-nitrobenzyl phosphate. Biochemistry. **43**: 8256-8264.

Mickey, C.-T., Hu, Jr-W.S., Kathie A. M., Tse-Hua, T. (2001) Genomic structure of the mouse PP4 gene: a developmentally regulated protein phosphatase Gene 278: 89-99

Mishra, N.S., Tuteja, R., Tuteja, N. (2006) Signaling through MAP kinase networks in plants. Arch. Biochem. Biophys. **452**: 55-68.

Mizoguchi, T., Putterill, J., Ohkoshi, Y. (2006) Kinase and phosphatase: the cog and spring of the circadian clock. Int Rev Cytol. 250: 47-72.

Oh, E., Yamaguchi, S., Hu, J., Yusuke, J., Jung, B., Paik, I., Lee, H.S., Sun, T.P., Kamiya, Y., Choi, G. (2007) PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in Arabidopsis seeds. Plant Cell. **19**: 1192-1208.

Olczak, M., Watorek, W., Morawiecka, B. (1997) Purification and characterization of acid phosphatase from yellow lupin (Lupinus luteus) seeds. Biochim Biophys Acta. **1341**: 14-25.

Ostman, A., Böhmer, F.D. (2001) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. Trends Cell Biol. **11:** 258-66.

Park, K.S., Kahn, M.L. (1999) Distribution of two isoforms of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in soybean (Glycine max). Plant Mol. Biol. 40: 13-21.

Patra, A.K., Mukhopadhyay, R., Mukhija, R., Krishnan, A., Garg, L.C., Panda, A.K. (2000) Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. Protein Expr. Purif.**18:** 182-192.

Pulido, R., Hooft van Huijsduijnen, R. (2008) Protein tyrosine phosphatases: dual-specificity phosphatases in health and disease. FEBS J. **275:** 848-866.

Raghothama, K.G., Karthikeyan, A.S. (2005) Phosphate acquisition. Plant Soil. **274:** 37–49.

Rainaldi, M., Yamniuk, A.P., Murase, T., Vogel, H.J. (2007) Calcium-dependent and independent Binding of Soybean Calmodulin Isoforms to the Calmodulin Binding Domain of Tobacco MAPK Phosphatase-1. J. Biol. Chem. **282:** 6031–6042.

Raugei, G., Ramponi, G., Chiarugi, P. (2002) Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. Cell Mol. Life Sci. **6**: 941-949.

Rayapureddi, J.P., Kattamuri, C., Chan, F.H., Hegde, R.S. (2005) Characterization of a plant, tyrosine-specific phosphatase of the aspartyl class. Biochemistry. **44:** 751-758.

Rayapureddi, J.P., Kattamuri, C., Steinmetz, B.D., Frankfort, B.J., Ostrin, E.J., Mardon, G., Hegde, R.S. (2003) Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. Nature. **426**: 295-298.

Ritsema, T., Joore, J., van Workum, W., Pieterse, C.M.J. (2007) Kinome of Arabidopsis using arrays of kinase consensus substrates. Plant Meth. **3**: 3.

Salmeen A, Barford D. (2005) Functions and mechanisms of redox regulation of cysteinebased phosphatases. Antioxid Redox Signal. 7: 560-577.

Salmeen, A., Andersen, J.N., Myers, M.P., Meng, T.C., Hinks, J.A., Tonks, N.K., Barford, D. (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. Nature. **423**: 769-773.

Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Savitsky, P.A., Finkel, T.J. (2002) Redox regulation of Cdc25C. Biol Chem. 277: 20535-20540.

Shiu, S.H., Bleecker, A.B. (2001) Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98: 10763-10768.

Smith H.O., Danner D.B. (1981) Genetic transformation. Ann. Rev. Biochem., 50: 41-68.

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

Sokolov, L.N., Dominguez-Solis, J.R., Allary, A.L., Buchanan, B.B., Luan S. (2006) A. redox-regulated chloroplast protein phosphatase binds to starch diurnally and functions in its accumulation. Proc. Natl Acad. Sci. U S A. 103: 9732-9737.

Stafstrom, J.P., Altschuler, M., Anderson, D.H. (1993) Molecular cloning and expression of a MAP kinase homologue from pea Plant Mol. Biol. **22:** 83–90.

Staswick, P.E., Papa, C., Huang, J., Rhee, Y. (1994) Purification of the major soybean leaf acid phosphatase that is increased by seed-pod removal. Plant Physiol. **104:** 49-57.

Stevenson J.M., Pereira, I.Y., Heilmann, I., Persson, S., Boss, W.F. (2000) Inositol signaling and plant growth. Trends Plant Sci.. 5: 252-258.

Sturgill, T.W., Ray, L.B. (1986) Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. Biochem. Biophys. Res. Commun. **134**: 565-571.

Sundaresan, P., Farndale, R.W. (2002) P38 mitogen-activated protein kinase dephosphorylation is regulated by protein phosphatase 2A in human platelets activated by collagen. FEBS Lett. **528**:139-144.

Tabernero, L., Aricescu, A.R., Jones, E.Y., Szedlacsek, S.E. (2008) Protein tyrosine phosphatases: structure-function relationships. FEBS J. **275**: 867-882.

Tiganis, T., Bennett, A.M. (2007) Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. Biochem. J. **402:** 1-15.

Tong, C.G., Kendrick, R.E., Roux, S.J. (1996) Red light-induced appearance of Red light-induced appearance of phosphotyrosine-like epitopes on nuclear proteins from pea (Pisum sativum L.) plumules. Photochem. Photobiol. **64:** 863-866.

Tonks, N.K. (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 7: 833-846.

Tonks, N.K., Charbonneau, H., Diltz, C.D., Fischer, E.H., Walsh, K.A. (1988) Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. Biochemistry. **27**: 8695-8701.

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

Ulm, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Peck, S.C., Zhu, T., Wang, X., Shinozaki, K., Paszkowski, J. (2002) Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1. EMBO J. 21: 6483-6493.

von Mering, C., Jensen, L.J., Kuhn, M., Chaffron, S., Doerks, T., Krüger, B., Snel, B., Bork, P. (2007) STRING 7--recent developments in the integration and prediction of protein interactions. Nucleic Acids Res. 35: D358-362.

van Montfort, R.L., Congreve, M., Tisi, D., Carr, R., Jhoti, H. (2003) Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. Nature. **423**: 773-777.

Wang, X-F., Zhang, D-P. (2008) Abscisic Acid Receptors: Multiple Signal-perception Sites. Ann. Bot. 101: 311–317.

Wang, Y., Norgard, M., Andersson, G. (2005) N-glycosylation infuences the latency and catalytic properties of mammalian purple acid phosphatase Arch. Biochem. Biophys. **435**: 147–156.

Weibrecht, I., Böhmer. S.A., Dagnell, M., Kappert, K., Ostman, A., Böhmer, F.D. (2007) Oxidation sensitivity of the catalytic cysteine of the protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. Free Radic Biol Med. **43**: 100-110.

Xu, Q., Fu, H.H., Gupta, R., Luan, S. (1998) Molecular characterization of a tyrosinespecific protein phosphatase encoded by a stress-responsive gene in *Arabidopsis*. Plant Cell. 5: 849-857.

Yang, J., Liang, X., Niu, T., Meng, W., Zhao, Z., Zhou, W. (1998) Crystal structure of protein-tyrosine phosphatase SHP-1 J. Biol. Chem. 273: 28199-28207.

Yemets, A., Sheremet, Y., Vissenberg, K., Van Orden, J., Verbelen, J-P, Blume Y.B. (2008) Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in Arabidopsis root cells. Cell Biol. Int. **32**: 630-637.

Zhang, S.Q., Klessig, D.F. (1997) Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. Plant Cell. **9:** 809-824.

Zhang, Z.Y. (2002) Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. Annu Rev Pharmacol Toxicol. **42:**209-234.

Spot	Seq. Consenso	Nome Proteína	ID Proteína	Quinase	Fold Change	Teste t
1071	PTKRSPQKG	Histone H2B.1	SWISS;P06145;H2B1_STRPU	PLCzeta	4,51	0,041656
366	RKEISVR	glycogen phosphorylase	SWISS;P11217;PHS2_HUMAN	PKA,PhK	3,80	0,042111
11	FFRRSKIAV	glutamate receptor 2	SWISS;P19491;GLR2_RAT	РКС	3,77	0,024665
833	LTRRASFSAQ	Regulatory protein ADR1	SWISS;P07248;ADR1_YEAST	PKA	3,51	0,000543
650	EDTLSDSDD	N-myc proto-oncogene protein	SWISS;P04198;MYCN_HUMAN	CKII	3,47	0,001179
828	KRPSGRAKA	Myelin basic protein	SWISS;P02687;MBP_BOVIN	PKC, PKA	3,45	0,016995
605	NTVSTSLGH	muscarinic acetylcholine receptor M2	SWISS;P08172;ACM2_HUMAN	GRK	3,44	0,029492
383	TSSSSIFDI	DNA topoisomerase II	SWISS;P06786;TOP2_YEAST	CKII	3,43	0,01594
964	NRIYTHQVV	Cell division protein kinase 7	SWISS;P20911;CDK7_XENLA	CDK2	3,28	0,016349
998	KRTLR	EGF Receptor	SWISS;P00533;EGFR_HUMAN	РКС	3,18	0,035437
924	QGTLSKIFK	Myelin basic protein	SWISS;P02687;MBP_BOVIN	РКС	3,12	0,017504
66	KQISVR	glycogen phosphorylase	SWISS;P11217;PHS2_HUMAN	PhK	3,08	0,008614
729	KKSWSRWTL	parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor	SWISS;P25107;PTRR_DIMDA	PKA	2,99	0,025171
801	NTSSSPQPK	p53	SWISS;P04637;P53_HUMAN	CDK2,CDK5	2,96	0,005527
724	QDPVSPSLV	muscarinic acetylcholine receptor M2	SWISS;P08172;ACM2_HUMAN	GRK	2,84	0,002383
863	TPPLSPSRR	Myc proto-oncogene protein	SWISS;P01106;MYC_HUMAN	GSK3,ERK	2,84	0,03129
23	SPRKSPKKS	Histone H1	SWISS;P02256;H1_PARAN	PLCzeta	2,82	0,03943
396	ENAFSPSRS	Caldesmon	SWISS;Q62736;CALD_RAT	CDK	2,69	0,046337
844	FMTEYVATR	Mitogen-activated protein kinase	SWISS;P14681;KSS1_YEAST	MEK	2,62	0,01122
1098	DKEVSDDEA	HSP90-alpha	SWISS;P07900;HS9A_HUMAN	CKII	2,61	0,012291
270	RRKGTDVNV	Annexin I	SWISS;P04083;ANX1_HUMAN	PKA	2,57	0,015529
82	SPSSSPTHE	phosphorylcholine transferase	SWISS;P19836;CTPT_RAT	PYK2	2,56	0,027663
925	KKRLSVERI	DNA topoisomerase II alpha	SWISS;P11388;TOPA_HUMAN	РКС	2,55	0,025437
394	KRPSQRAKY	Myelin basic protein	SWISS;P02687;MBP_BOVIN	PKC, PKA	2,54	0,036065
487	SRGDYMTMQ	insulin receptor substrate 1	SWISS;P35570;IRS1_RAT	IR	2,53	0,005669
336	KRKQISVR	glycogen phosphorylase	SWISS;P11217;PHS2_HUMAN	PhK	2,52	0,009777
120	RGRASSHSS	Lamin A/C	SWISS;P02545;LAMA_HUMAN	РКС	2,52	0,020502
642	IDKISRIGF	glycine receptor alpha	SWISS;P07727;GRA1_RAT	РКС	2,51	0,037003
838	IAADSEAEQ	insulin receptor substrate 1	SWISS;P35570;IRS1_RAT	CKII	2,50	0,01385
462	FKAFSPKGS	Caldesmon	SWISS;P12957;CALD_CHICK	CDK1	2,50	0,013922
1113	VTRRTLSMD	6-phosphofructokinase	SWISS;P17858;K6PL_HUMAN	РКА	2,49	0,018943
46	QSYSSSQRV	Desmin	SWISS;P02542;DESM_CHICK	CDK	2,49	0,033244

APÊNDICE I Tabela de Resultados do Pepchip®

539	OLIDSMANS	mitogen-activated protein kinase kinase 1	SWISS:002750:MPK1_HUMAN	Raf1	2.49	0,047044
403	FEARYOOPF	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma	SWISS:P19174:PIP4 HUMAN	EGFR	2.47	0.020198
593	HKRKSSOAL	Transforming protein erbA	SWISS;P03373;ERBA AVIER	РКА	2,46	0,017504
618	TKKTSFVNF	eukaryotic translation initation factor 2 beta	SWISS;P41035;IF2B RABIT	РКА	2,46	0,028105
804	DDAYSDTET	protein phosphatase inhibitor 2	SWISS;P11845;IPP2_RABIT	СКІ	2,43	0,028424
808	RKRSRKA	Histone H2B	SWISS;P02278;H2B_HUMAN	РКА	2,43	0,02982
1120	QEQEYVQAV	Annexin I	SWISS;P07150;ANX1_RAT	PKC,EGFR,TRPM7	2,43	0,04302
283	PSSTSSSSI	DNA topoisomerase II	SWISS;P06786;TOP2_YEAST	CKII	2,41	0,033665
177	TVTRSYRSV	Lamin A/C	SWISS;P02545;LAMA_HUMAN	РКС	2,40	0,025733
1127	QDENTVSTS	muscarinic acetylcholine receptor M2	SWISS;P08172;ACM2_HUMAN	GRK	2,38	0,020847
219	SPQPSRRGS	protein phosphatase 1	SWISS;Q16821;PP3A_HUMAN	PKA,GSK3	2,37	0,0037
279	RVYVHPF	Angiotensinogen	SWISS;P01019;ANGT_HUMAN	EGF,Src,IR	2,35	0,016701
841	GNGDYMPMS	insulin receptor substrate 1	SWISS;P35570;IRS1_RAT	IR	2,32	0,008966
1063	RRRASVA	pyruvate kinase,	SWISS;P12928;KPYR_RAT	РКА	2,29	0,028633
202	LDRSSHAQR	Insulin receptor	SWISS;P06213;INSR_HUMAN	IR	2,28	0,039491
1055	SEENSKKTV	Alpha-S2 casein	SWISS;P02663;CAS2_BOVIN	CKI	2,27	0,007879
397	HKSGYLSSE	Connection of cytoskeletal structure to plasma membrane	SWISS;P15311;EZR1_HUMAN	EGFR	2,27	0,014078
607	AKDASKRGR	myelin	SWISS;P10522;MYP0_BOVIN	РКС	2,27	0,022775
166	AVDRYIAIT	Beta-2 adrenergic receptor	SWISS;P04274;B2AR_MESAU	IR	2,27	0,046526
255	DIPESQMEE	Band 3 anion transport protein	SWISS;P02730;B3AT_HUMAN	СК	2,26	0,002159
689	EEQEYVQTV	Annexin I	SWISS;P04083;ANX1_HUMAN	EGFR	2,26	0,003675
786	KRPSNRAKA	Myelin basic protein	SWISS;P02687;MBP_BOVIN	PKC, PKA	2,26	0,011292
687	IGSESTEDQ	Alpha-S1 casein	SWISS;P02662;CAS1_BOVIN	CKII	2,26	0,026992
590	KRPSQRAKA	Myelin basic protein	SWISS;P02687;MBP_BOVIN	PKC, PKA	2,25	6,72E-05
1164	PKKGSKKAV	Histone H2B	SWISS;P02278;H2B_HUMAN	РКА	2,25	0,015483
971	TRSVSSSSY	vimentin	SWISS;P20152;VIME_MOUSE	PKA,PKC	2,25	0,04376
890	GRPITPPRN	ser/thr protein phosphatase PP1-alpha	SWISS;P08129;PP1A_HUMAN	CDK	2,23	0,014531
558	AVASSPSKA	myristolated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS)	SWISS;P12624;MACS_BOVIN	РКС	2,23	0,031147
250	IEQFSTVKG	G protein-coupled receptor kinase 5	SWISS;P43249;GRK5_BOVIN	GRK5	2,21	0,032838
713	LARNSI	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	SWISS;P13569;CFTR_HUMAN	PKA,PKG/cGK	2,21	0,034876
970	TDEDSDNEI	lower matrix phosphoprotein	SWISS;P18139;PP65_HCMVT	CSKI, CSKII	2,21	0,038296
436	KRQSSTSNA	phosphorylase b kinase beta	SWISS;P12798;KPBB_RABIT	РКА	2,20	0,033503
901	ARKFSSARP	Sodium channel protein	SWISS;P02719;CINA_ELEEL	РКА	2,19	0,039332
500	DLPMSPRTL	Signal Transducer and Activator of Transcription 3	SWISS;P42227;STA3_MOUSE	JAK1,Src	2,18	0,004234
288	KKASFKAKK	trophinin	peptide KKASFKAKK	РКС	2,18	0,004603
139	PKEVYDVML	TrkC tyrosine kinase	SWISS;Q03351;TRKC_RAT	TrkC	2,18	0,023779

40	TKFASDDEH	Lupus La protein	SWISS;P05455;LA_HUMAN	CKII	2,18	0,043286
221	RPSESNGQP	Lens fiber major intrinsic protein	SWISS;P06624;MIP_BOVIN	РКА	2,17	0,043451
475	RVSGSRR	lamin C	SWISS;P11516;LAMC_MOUSE	РКС	2,17	0,048196
949	ADSFSLNDA	galectin-3	SWISS;P38486;LEG3_CANFA	СКІ	2,16	0,023606
334	TRKVSLAPQ	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	SWISS;P13569;CFTR_HUMAN	PKA,PKG	2,15	0,027842
193	SRTLSVSSL	Glycogen [starch] synthase	SWISS;P13834;UGS1_RABIT	AMP-PK, CKI,PKA,PK	2,14	0,00218
338	LDPLSEPED	Thyroid hormone receptor alpha	SWISS;P04625;THA_CHICK	CKII	2,14	0,017878
123	RRRQSVLNL	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	SWISS;P13569;CFTR_HUMAN	PKA,PKG	2,14	0,03283
936	KQLASFEIY	Cystatin S	SWISS;P01036;CYTS_HUMAN	PKA, CKII	2,14	0,046584
1146	ATRRSYVSS	glial fibrillary acidic protein	SWISS;Q28115;GFAP_BOVIN	РКА,РКС	2,13	0,022024
530	TRKISQTAQ	ryanodine receptor	SWISS;P11716;RYNR_RABIT	PKA,PKG,CaM-II	2,12	0,018548
770	YHTTSHPGT	Band 3 anion transport protein	SWISS;P02730;B3AT_HUMAN	СК	2,10	0,000258
805	ESVDYVPML	platelet-derived growth factor receptor	SWISS;P09619;PGDR_HUMAN	PDGFR	2,10	0,018021
450	AQAASPAKG	Protein tyrosine phosphatase 1B	SWISS;P18031;PTN1_HUMAN	CDK1	2,09	0,002336
911	SYPLSPLSD	Cytosolic phospholipase A2	SWISS;P47712;PA2Y_HUMAN	MAPK	2,09	0,026558
942	GGGTSPVFP	Desmin	SWISS;P02542;DESM_CHICK	CDK	2,08	0,021759
195	LRGRSFMNN	6-phosphofructokinase	SWISS;P00511;K6PF_RABIT	РКА	2,07	0,037703
534	LDDQYTSSS	Tyrosine-protein kinase Tec	SWISS;P24604;TEC_MOUSE	Lck,Btk	2,06	0,025369
1166	TDDGYMPMS	insulin receptor substrate 1	SWISS;P35570;IRS1_RAT	IR	2,06	0,044477
716	TRQTSVSGQ	synapsins IA and IB	SWISS;P17599;SYN1_BOVIN	CaM-II	2,05	0,014681
818	RKRSRKE	Histone H2B	SWISS;P02278;H2B_HUMAN	РКА	2,04	0,016587
679	PTRHSRVAE	lamin	SWISS;P08928;LAM0_DROME	РКА	2,03	0,026006
311	NDITSL	Tropomyosin beta	SWISS;P02560;TPMB_RABIT	TrkC	2,02	0,00385
346	EIRVSINEK	cGMP-dependent protein kinase (PKG)	SWISS;P00517;KAPA_BOVIN	РКА	2,02	0,014157
325	VSSSSYRRM	vimentin	SWISS;P20152;VIME_MOUSE	РКС	2,02	0,035911
834	HRQETVEAL	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II beta	SWISS;P08413;KCCB_RAT	CaM-II	2,02	0,049601
443	LVMQTAAGT	myosin light chain kinase	SWISS;P25323;KMLC_DICDI	GRK	2,01	0,022774
784	QRRTSLTGS	Voltdep. L-type calcium channel alpha-1S	SWISS;P07293;CIC1_RABIT	РКА	2,01	0,024103
1089	GAGNSLRTA	lamin C	SWISS;P11516;LAMC_MOUSE	GRK,MAPKAPK2	2,00	0,020763
557	AEPDYGALY	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma	SWISS;P19174;PIP4_HUMAN	EGFR	2,00	0,029125
836	EEEAYGWMD	Gastrin	SWISS;P01350;GAST_HUMAN	Src	1,99	0,010245
451	DHSRSTKAA	myelin	SWISS;P27573;MYP0_MOUSE	GRK	1,97	0,038558
529	SVFSSPSAS	Caldesmon	SWISS;Q62736;CALD_RAT	CDK	1,96	0,018921
509	ARKSTRRSI	pleckstrin	SWISS;P08567;P47_HUMAN	РКС	1,95	0,023475
421	SSSSSPSRR	lamin B receptor	SWISS;P23913;LBR_CHICK	CDK	1,95	0,024987
62	EEDLSDENI	transcription factor BAF1	SWISS;P14164;BAF1_YEAST	CKII	1,95	0,034568

1081	EEPVYEAEP	Hematopoietic cell-specific LYN substrate	SWISS;P14317;HS1_HUMAN	Lyn,Syk	1,95	0,048601
181	LRRASVA	pyruvate kinase,	SWISS;P12928;KPYR_RAT	РКС	1,94	0,001552
861	RRASS	pyruvate kinase,	SWISS;P12928;KPYR_RAT	РКА	1,94	0,048481
302	GRRQSLIQD	Tyrosine 3-monooxygenase	SWISS;P17289;TY3H_BOVIN	CaM-II	1,93	0,001655
268	DRVYIHPF	Angiotensinogen	SWISS;P01019;ANGT_HUMAN	EGF,Src,IR	1,93	0,014743
165	AGDGSDEEV	myosin heavy chain	SWISS;P35579;MYSN_HUMAN	РКС	1,93	0,02627
888	NDSTSVSAV	muscarinic acetylcholine receptor M2	SWISS;P08172;ACM2_HUMAN	GRK	1,92	0,044617
706	DKVTSPTKV	Caldesmon	SWISS;Q62736;CALD_RAT	CDK,ERK	1,91	0,01814
17	PASLSRAKA	phosphorylcholine transferase	SWISS;P19836;CTPT_RAT	GSK3	1,91	0,019294
950	ATSASPPQK	p53	SWISS;P02340;P53_MOUSE	CDK2,CDK5	1,91	0,036227
1060	VKGATSDEE	DNA topoisomerase II	SWISS;P06786;TOP2_YEAST	CKII	1,89	0,013719
915	GRGLSLSR	Myelin basic protein	SWISS;P02686;MBP_HUMAN	РКА	1,89	0,042859
775	TRTYSLGSA	vimentin	SWISS;P20152;VIME_MOUSE	CaM-II	1,88	0,016411
758	FKKSFKL	myristolated alanine-rich C-kinase substrate	SWISS;P29966;MACS_HUMAN	РКС	1,88	0,018799
90	PAAVSEHGD	Na+/K+ ATPase 1	SWISS;P06685;ATN1_RAT	РКС	1,87	0,009451
521	VSRTSAVPT	Desmin	SWISS;P02542;DESM_CHICK	РКА	1,87	0,016745
298	ERSQSRKDS	alpha-1B adrenergic receptor	SWISS;P15823;A1AB_RAT	РКС	1,87	0,032954
752	RRPTPA	Protein phosphatase inhibitor 1	SWISS;P01099;IPP1_RABIT	РКА	1,87	0,045964
210	EKRASGQAF	stathmin	SWISS;P16949;STHM_HUMAN	РКА	1,86	0,029365
603	RRAISGDLT	dihydropyridine-sensitive calcium channel	SWISS;P15381;CICC_RABIT	РКА	1,85	0,041506
35	VINETSQHH	vimentin	SWISS;P20152;VIME_MOUSE	p37	1,84	0,01553
1053	STNDSPL	Beta-2 adrenergic receptor	SWISS;P04274;B2AR_MESAU	beta-ARK	1,82	0,011642
63	EPGPYAQPS	Proto-oncogene C-crk	SWISS;P46108;CRK_HUMAN	IGF1R,Abl,EGF-R	1,82	0,028209
615	NRSASEPSL	RAF proto-oncogene ser/thr-protein kinase	SWISS;P04049;KRAF_HUMAN	AMP-PK,PKA	1,80	0,035388
194	KRPSERAKA	Myelin basic protein	SWISS;P02687;MBP_BOVIN	РКС	1,80	0,03979
526	SRRPSYRKI	cAMP response element binding protein	SWISS;P16220;CREB_HUMAN	S6K	1,79	0,027806
129	VTPRTPPPS	Myelin basic protein	SWISS;P02687;MBP_BOVIN	MAPK	1,78	0,002565
1158	WLTKTPEGN	Actin and myosin binding protein	SWISS;P12957;CALD_CHICK	CDK	1,78	0,023856
258	EDVGSDEEE	HSP90-alpha	SWISS;P07900;HS9A_HUMAN	CKII	1,77	0,038554
130	REVSSLKSK	myosin heavy chain	SWISS;P14105;MYSN_CHICK	РКС	1,77	0,039994
21	ETRFTDTRK	elongation factor 2	SWISS;P13639;EF2_HUMAN	CaM-III	1,76	0,022338
186	TEGQYQQQP	proto-oncogene tyrosine-protein kinase Lck	SWISS;P42683;LCK_CHICK	CSK	1,75	0,035266
314	DLFGSDEED	elongation factor 1-beta	SWISS;P12262;EF1B_ARTSA	CKII	1,73	0,045418
84	VRTFTHEVV	Cell division protein kinase 2	SWISS;P23437;CDK2_XENLA	CDK7	1,72	0,015606
239	KASASPRRK	Histone H1	SWISS;P02256;H1_PARAN	PLCzeta	1,72	0,039734
507	MSVEEV	Eukaryotic translation initiation factor 4E	SWISS;P07260;IF4E_YEAST	CKII	1,71	0,027647

536	SRQLSSGVS	Heat Shock Protein 27	SWISS;P04792;HS27_HUMAN	MAPKAPK2	1,69	0,01457
405	DTVTSPQRA	proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	SWISS;P00523;SRC_CHICK	CDK5	1,67	0,000518
468	PPSAYGSVK	Annexin II	SWISS;P07355;ANX2_HUMAN	Src	1,67	0,026825
1079	IGHHSTSDD	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha	SWISS;P11960;ODBA_RAT	BCKDK	1,65	0,035156
32	YSGHSMSDP	pyruvate dehydrogenase E1	SWISS;P26267;ODPA_ASCSU	PDK	1,64	0,0244
542	EILNSPEKA	14-3-3 protein beta	SWISS;P29358;143B_BOVIN	MAPK8 human	1,64	0,038379
906	KSESSQK	40S ribosomal protein S6	SWISS;P10660;RS6_HUMAN	S6K	1,62	0,008255
1046	PSKKYAIKG	Glutamyl aminopeptidase	SWISS;P16406;AMPE_MOUSE	CKII	1,61	0,009219
33	SPGEYVNIE	insulin receptor substrate 1	SWISS;P35570;IRS1_RAT	IR	1,61	0,043332
216	DDEMTGYVA	Mitogen-activated protein kinase p38	SWISS;P47811;MP38_MOUSE	MEK	1,60	0,011411
895	EEKESSNDS	muscarinic acetylcholine receptor M2	SWISS;P08172;ACM2_HUMAN	GRK	1,60	0,028092
510	DLFGSDDEE	elongation factor 1-beta	SWISS;P34826;EF1B_RABIT	CKII	1,59	0,041929
516	SGYSSPGSP	microtubule-associated protein tau, RSKB	SWISS;P19332;TAU_RAT	MEK1,MAPK14	1,57	0,026056
1156	TEPQYQPGE	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn	SWISS;P06241;FYN_HUMAN	Csk	1,56	0,012257
303	ASFEYTILD	Erythropoietin Receptor	SWISS;P19235;EPOR_HUMAN	JAK2	1,56	0,04281
1066	LSEHSSPEE	Dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein	SWISS;P07516;IPPD_BOVIN	CKII	1,53	0,005144
1018	PQRATSNVF	Myosin regulatory light chain 3	SWISS;P24844;MLRN_HUMAN	ROCK1	1,51	0,032644
527	PEGDYEEVL	Hematopoietic cell-specific LYN substrate	SWISS;P14317;HS1_HUMAN	Lyn,Syk	1,49	0,032995
26	SAVASNMRD	muscarinic acetylcholine receptor M2	SWISS;P08172;ACM2_HUMAN	GRK	1,49	0,042514
60	FPVSYSSSG	receptor with tyrosine-protein kinase activity	SWISS;P07949;RET_HUMAN	Ret	1,48	0,005335
339	QAGMTAPGT	calponin alpha and beta	SWISS;P26932;CLPO_CHICK	GRK	1,46	0,026886
612	RKRSRKE	Histone H2B	SWISS;P02278;H2B_HUMAN	PKA	1,44	0,038485
502	GSEEYMNMD	insulin receptor substrate 1	SWISS;P35570;IRS1_RAT	IR	1,42	0,024816
957	SLAMSPRQR	Protein phosphatase inhibitor 1	SWISS;P01099;IPP1_RABIT	CDK5,PKC,ERK,Cdc2	1,41	0,013305
1168	PPEKTEEEE	somatostatin receptor type 5	SWISS;P30936;SSR3_RAT	GRK	1,41	0,033867
240	KRRDYLDLA	receptor with tyrosine-protein kinase activity	SWISS;P07949;RET_HUMAN	Ret	1,40	0,043177
118	DLKDTKYKL	myosin II heavy chain	SWISS;P08799;MYS2_DICDI	MHCK	1,36	0,014197
718	REQESSGEE	protein phosphatase inhibitor 2	SWISS;P11845;IPP2_RABIT	CKII	1,33	0,045796
331	PENDYEDVE	Hematopoietic cell-specific LYN substrate	SWISS;P14317;HS1_HUMAN	Lyn,Syk	1,24	0,010111
684	KKKFSFKKP	MARCKS-related protein	SWISS;P28667;MRP_MOUSE	РКС	1,18	0,049773

APÊNDICE II Artigo

Title: Soybean roots contain high level of Protein Tyrosine Phosphatase: kinetic characterization and tissue distribution

Short title: Protein Tyrosine Phosphatase: characterization and tissue distribution

Authors: Luciana de Campos-Leite^a, Carmen Veríssima Ferreira^a, Marcelo José Surpili^a, Celso Eduardo Benedetti ^b and Hiroshi Aoyama^{a*}

^aBiochemistry Department, Biology Institute, University of Campinas (UNICAMP), SP, Brazil
^bCenter for Molecular and Structural Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory,
Campinas, SP, 13083-970, Brazil

^{*}Corresponding author: Hiroshi Aoyama (<u>aoyama@unicamp.br</u>), UNICAMP, Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo - Campinas - SP, Brasil. CEP: 13083-970. Phone number: +551935216141, Fax number: +551935216129

Abstract

Despite the importance of protein tyrosine phosphatases (PTPs) in general metabolism, only recently we have had progress in structure knowledge, regulation and function of plant PTPs. Recombinant phosphatase from soybean displayed Km value of 1.43 mM and optimum pH between 5.5 and 6.0, higher activity towards tyrosine phosphate and strong inhibition by vanadate and inorganic phosphate. The secondary structure and thermostability were analyzed by circular dichroism. Root was the only tissue that expressed PTP at mRNA level under light condition, which was in agreement with immunoblotting data. Our results suggest that the PTP is extremely important in roots for phosphorus uptake from soil. This paper demonstrated, for the first time, that PTP is probably a tissue-specific enzyme and has a functional relevance during the seed germination. Overall, our findings reinforce the importance of tyrosine dephosphorylation to define the specific tissue metabolism.

Key words: Soybean; Roots; Germination; Protein Tyrosine Phosphatase; Tissue Distribution; Characterization; Cloning.

Introduction

Protein kinases as well as protein phosphatases were originally discovered in animal systems. In these organisms, protein tyrosine phosphatases (PTPs) are a superfamily of enzymes that control phosphorylation of signaling proteins, which ultimately, regulate cell growth, proliferation, mobility as well as the central metabolism [1,2].

Some studies have shown the function and unique structure of these enzymes in plant-specific development and physiological processes. However, little is still known about protein phosphatases in higher plants and their number, diversity and function have only recently been uncovered [3,4]. Tyrosine phosphorylation in plants was ignored originally due to the apparent absence of classic protein tyrosine kinases (PTKs). PTPs were discovered in animals cells in 1988 [5] and, ten years after, the first plant PTP was characterized in *Arabidopsis* [6]. After *Arabidopsis* genome had been completed, about 18 PTP coding sequences were identified with the typical catalytic core [3,7]. This fact reinforces the importance of phosphorylation and dephosphorylation in a multitude of ways, for instance, in diverse processes such as pollen development and stomatal opening, which are highly regulated and essential to organism survival [8,9].

Evidences for the presence of PTPs in plant have attributed new functions to them, *e.g.*, plant cells tyrosine phosphorylation plays an important role in different cellular processes such as cell cycle control [10], MAP kinase cascade pathways [11], plant cell signaling [12] and plant development [13]. Recently, Yemets and collaborators [14] demonstrated the involvement of tyrosine phosphorylation/dephosphorylation processes in the regulation of growth and development of *Arabidopsis thaliana* roots as well as in the regulation of microtubules organization in different cell types.

Adequate levels of phosphorus are critical to the growth and development of all organisms for a range of functions such as macromolecular structure, energy generation, and metabolic regulation. The demand for phosphorus dramatically increases during periods of rapid cell growth and division, such as in seed germination [15]. Phytase and phosphatase can be key suppliers of phosphorus to the plant metabolism requirement [16]. Besides contributing for providing phosphorus, phosphatases also play an important role in the control of different plant functions, particularly in the regulation of signal transduction cascades.

In this paper, we described cloning and expression of a soybean PTP, kinetic characterization and tissue localization. The investigation and characterization of PTPs from plants can add relevant information in the plant metabolism research field. Therefore, we provided a wealth biochemical data which suggests that soybean plantlets contain PTP, which is mainly expressed in roots and apparently plays a critical role during seed germination.

Materials and Methods

Soybean Germination

Soybean seeds (*Glycine max*, v. IAC-17) were kindly provided by Dr. Nelson Braga (Instituto Agronômico de Campinas-IAC). Germination was performed as previously described [16]. The soybean seeds were allowed to germinate on moistened germitest paper, at 25°C, under a 16h day/8h night photoperiod cycle until the appearance of the primary leaves (about 10 days).

Cloning of soybean PTP

The specific primers (forward: 5'-AGAGAATTCATGGCCGGCAAC-3' and reverse: 5'-CATTCTAGAAAGTTCCAGCAC-3') carrying an *Eco*RI and *Xba*I sites, respectively, were designed for the amplification of the coding sequence of the GmPTP gene (GenBank accession no. <u>AJ006308</u>). Total ribonucleic acid (RNA) was extracted from soybean plantlets and used to perform reverse transcriptase (RT) polymerase chain reaction (PCR) with the above primers. The PCR products were double-digested with *Eco*RI and *Xba*I endonucleases, cloned into the prokaryotic expression vector pProEXTMHTa (Life Technologies) and confirmed by DNA sequencing. *E. coli* DH5 α competent cells were transformed with pProEX-PTP and a small-scale expression test was performed, with a Ni²⁺ affinity resin (TALON® Metal Affinity Resin, Clontech Laboratories, Inc.) and the expression level was checked by 12.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [17]. The fragment was subcloned into another expression vector pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences), double-digesting the previous construction pProEX-PTP with *Eco*RI and *Xho*I endonucleases.

Purification of soybean PTP

E. coli BL21 (DE3) cell strains transformed with pGEX-PTP gene were grown at 30°C to an absorbance of 0.6–0.7 at 600 nm. PTP was expressed as a glutathione-S-transferase-PTP (GST-PTP) fusion protein upon 0.8 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside induction (IPTG), for 3 h. The suspension was centrifuged and resuspended in PBS buffer [140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7.3), 1mM dithiothreitol (DTT) and 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)], then disrupted by sonication. The supernatant-containing PTP, after centrifugation, was subjected to purification using a Glutathione SepharoseTM 4B Sepharose (Amersham Biosciences) as described by the manufacturer, followed by 10 U thrombin (Amersham Biosciences) cleavage reaction, at 4°C, varying the incubation time. Protein samples were fractionated using 12.5% SDS-PAGE and the cleaved protein was excised from the gel to confirm the identity by mass spectrometry. Protein concentration steps, the protein content was estimated by measuring the absorbance at 280 nm.

Enzyme Activity

The enzyme activity was determined as previously described [19]. The reaction mixture (1mL) contained 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), 5 mM *p*-nitrophenylphosphate (*p*NPP) and enzyme was incubated for 10 min at 37°C, the reaction was stopped by addition of 1 mL of 1 M NaOH and the absorbance was read at 405 nm. The molar extinction coefficient of p-nitrophenolate, at 405 nm is 18,000 M⁻¹.cm⁻¹. When other substrates were used, the enzyme activity was assayed by measuring the amount of phosphate released. For inorganic phosphate determination, the reaction was stopped by adding 1 mL 3% ammonium molybdate (in 200 mM

acetate buffer, pH 4.0) followed by 0.1 ml of 120 mM ascorbic acid (in 200 mM acetate buffer, pH 4.0). The color was developed for 30 min and the absorbance was read at 700 nm. The amount of inorganic phosphate produced was calculated using a molar extinction coefficient of 4,000 M⁻¹.cm⁻¹ [20].

Circular Dichroism Spectroscopy

Circular dichroism (CD) measurements of purified PTP were carried out on a JASCO J-810 spectropolarimeter at 22°C. The spectra were recorded in a 1-mm optical path cell with a wavelength range from 195 to 260 nm, a bandwidth with a step size of 0.5 nm, and a 50-nm·min⁻¹ scan speed. Purified PTP was dialyzed against PBS buffer pH 7.3, without NaCl. For each measurement, the mean values for four spectra were taken to improve the signal-to-noise ratio, and each spectrum was corrected against the blank and analyzed by using the software provided by JASCO.

Real time PCR (qPCR)

Total RNA from roots, hypocotyl, cotyledon and leaves was extracted according to the method of Verwoerd et al. [21]. Subsequently, cDNA was synthesized using the Superscript II kit for reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) (Life Technologies) with 200 ng of RNA as initial template for each sample. Primers were designed using Primer Express software (Applied Biosystems) and based on available EST sequences from GenBank to produce 80 bp amplicons. Primer sequences were as follows: GmPTP F: AATCACCCTCACTTCGGATCA, R: CGTGGAGCTTCTCCTTCAGAA; tubulin F: CAATTGGAGC GCATCAAT, R: ATACACTCATCAGCATTCTC, actin F: CTTCAATGTGCCTGCCATGT, R: TTGTGCGACCACTGGCATA. qPCR was conducted in a 15-µl reaction mixture containing 25 nM forward and reverse primers, 1x SYBR Green reaction mix (Applied Biosystems). SYBR Green fluorescence was measured with the ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems). Additionally, each sample was also run in triplicate and normalized against tubulin and actin amplification (see primers above). To normalize for variations between individual LightCycler runs, one or two arbitrarily selected samples were co-amplified as calibrators.

Western Blot

The soybean tissues, root, hypocotyl, cotyledon and leaf were ground in extraction buffer as described by Park and Kahn [22]. Protein extracts were cleared by centrifugation and the protein concentration was determined using the Lowry method [20]. 100µg of total protein were resolved by SDS–PAGE 12,5% and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Membranes were blocked in 1% fat-free dried milk in TBST [Tris-buffered saline (TBS)-Tween 20 (0.05%)] and incubated overnight at 4°C with anti-PTP primary antibody at 1:5000 dilution. After washing in TBS-T, membranes were incubated with anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies at 1:3000 dilutions, in blocking buffer for 1h. Detection was performed by using enhanced chemiluminescence (ECL-Amersham Biosciences).
Results

Cloning and Expression of PTP

The pProEXTMHT-PTP small-scale expression was induced with 0.8 mM IPTG at 30°C. The efficiency time of induction was analyzed by SDS-PAGE. The expression level increased with the induction time which was more effective at 4h. The recombinant proteins were extracted, and both soluble and insoluble fractions were analyzed by SDS-PAGE. The PTP was detected only in the insoluble form (Figure 1A, lane 2b).

After subcloning and expression of pGEX-4T-1-PTP, at the same conditions, the enzyme was localized in the supernatant, in a soluble form. The recombinant construct pGEX-4T-1-PTP was overexpressed, and the GST-PTP protein purified from the cell lysates by using glutathione-S-transferase (GST) affinity chromatography. This chromatography provided a fraction that displayed a single band correspondent to 64 kDa (Figure 1B, lane 3) with a yield of about 4 mg per liter of starting culture. The GST tag was excised by a cleavage reaction with thrombin, and approximately 24 hours, at 4°C, was enough to produce GST-tag-free PTP, with approximately 38 kDa (Figure 1C, lane 6). The PTP band was excised form the gel and submitted to mass spectrometry to confirm the identity of the recombinant protein (data not shown)

Biochemical characterization of protein tyrosine phosphatase

Kinetic characterization of the recombinant PTP was carried out by using pNPP as a substrate. The enzyme displayed a Km value of 1.43 mM (result not shown) and an optimum pH between 5.5 and 6.0 (Figure 2A)

Next, we examined the effect of potential inhibitors on the recombinant PTP. This enzyme was strongly inhibited by inorganic phosphate and vanadate and was not sensitive towards fluoride (Figure 2B). As expected, it was not affected by okadaic acid (classic inhibitor of protein serine/threonine phosphatase). In addition, we checked the influence of some ions (10 mM Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺ and Cu²⁺), 1 mM EDTA and reducing agents (10 mM DTT and 10 mM β -mercaptoethanol) on the enzyme activity. None of these substances caused significant effects on the recombinant phosphatase activity and, interestingly, was not affected by Cu²⁺ as well (data not shown).

In order to study the PTP substrate specificity, we examined the capacity of the recombinant PTP to hydrolyze tyrosine phosphate, serine phosphate and inorganic pyrophosphate. The soybean recombinant PTP presented higher activity towards tyrosine phosphate, about 2.5 fold when compared with pNPP. At the same conditions, inorganic pyrophosphate (PPi) and pNPP were similarly hydrolyzed (Figure 2C). Serine phosphate was not expressively hydrolyzed by this phosphatase.

Circular Dichroism spectroscopy

The next step of our investigation was to study the secondary structure of the recombinant PTP by CD. The resultant spectra indicated two negative bands at 208 and 222 nm, and a positive band at 195nm (Figure 3A). The deconvolution of the spectra showed that the α -helix and β -sheet contents varied from 33.5 to 36.8% and 15.9 to 17%, respectively. These values are in agreement with secondary structure prediction tool, PSIPRED (Protein Structure Prediction Server) [23], which found 28% of α -helix and 20% of β -sheet.

In addition, we also evaluated the thermal stability of the PTP by CD from 4 to 84°C. From 34°C the characteristic peak of α -helix, at 222 nm region, started to decrease the signal, which is an indicative of the protein denaturation (Figure 3B).

Soybean tissue localization of PTP

Figure 4A reveals that the expression of PTP was more pronounced in soybean roots, as shown by the qPCR analysis. The expression patterns identified in the real time PCR were confirmed by western blotting experiment, which showed that the other soybean tissues tested had lower expression levels when compared with roots (Figure 4B).

Discussion

Phosphatases are important enzymes that contribute for plant metabolism providing phosphorus, essential for the plant functions. Besides, post translational modifications in proteins, by phosphorylation, is an universal and the most common mechanism to regulate plant growth and development [3]. The importance of tyrosine phosphorylation in plants has been greatly underestimated. In *Arabidopsis*, proteins from all subcellular compartments were found to be targets for phosphorylation, indicating that most cellular processes are likely to be regulated by various phosphorylation events [4]. Therefore, the investigation and characterization of PTPs from plants can add relevant information in the plant metabolism research field.

In this work we provided biochemical data which suggest: 1) the recombinant PTP showed higher activity towards tyrosine phosphate, when compared with the synthetic substrate pNPP. Previously, our research group described the kinetic characterization of four isoforms of acid

phosphatases obtained directly from soybean seeds. All of them were able to hydrolyze tyrosine phosphate, however with lower efficiency when compared with the recombinant enzyme [24,25]; 2) the sensitivity of PTP towards vanadate and phosphate as well as the absence of effect of fluoride, tartrate and okadaic acid indicated that the recombinant PTP shares the same properties which we observed in PTPs from mammals and other organisms. Besides, the absence of effect observed in the presence of metals, and compounds like EDTA reinforce that the recombinant phosphatase is a PTP [26]; 3) The CD results are in agreement with the literature referring to different members of mammals PTP family, for example SHP-1 structure determined by Yang and collaborators [27], that showed 28.8% of α -helix and 17.7% of β -sheet. Far-UV CD spectrum indicates α -helix as predominant secondary structure; 4) we observed that the presence of reducing agent was essential for the maintenance of the recombinant PTP activity. This result was similar to the results obtained by Fordham-Skelton [28] that studied the expression of plant PTP during embryogenesis. In addition, Dixon et al. [29] showed that the recombinant PTP from soybean was hypersensitive to S-glutation value promoted by the presence of oxidized glutathione (GSSG). This work demonstrated as well an intricate protection mechanism of cysteine residues, essential for catalysis, which could be involved in regulation of signaling events, response to stress, protein metabolism as well as multiple developmental processes, as pollen development and stomatal opening [8,9].

Kinetic data showed that the recombinant PTP presented some similarities with the four isoforms purified from soybean seeds [24]. However, this enzyme presented lower affinity for pNPP, was not affected by fluoride and Cu⁺². These differences could be attributed to the absence of the carbohydrate moiety in the recombinant enzyme, expressed by a heterologous system. This can also explain the low thermal stability of PTP, that started to denaturate at 34°C, when

compared to the unusual thermal stability of soybean seed acid phosphatases, that lost only 20% activity after 60 min at 60°C [19].

In this paper, we demonstrated for the first time that PTP is probably a tissue-specific enzyme and the high level of expression in roots led us to think that this enzyme has a functional relevant role during the seed germination. Our findings allowed us to make hypothesis in regard the possible function of PTP in soybean during germination. Root was the only tissue that expressed PTP at mRNA level under light condition, which indicated that this PTP presents a critical importance for the root development. Accordingly, Yemets and collaborators [14] have examined the effect of PTPs inhibitor (sodium orthovanadate) on root cells from A. thaliana and demonstrated that the strongest effects of the PTPs inhibitor were found in meristematic root cells, where the inhibitor led to full microtubules (MTs) disorganization. Additionally, these authors also detected MTs reorientation from transverse to longitudinal in epidermis and cortex cells of the elongation and differentiation zones. Besides, the participation of this PTP in the phosphorus supply must be considered. Inorganic phosphate is considered the plant nutrient with the lowest availability in the soil [30]. Therefore, under phosphate deprivation condition the roots present increased levels of phosphatase to provide enough free phosphorus for the normal development of the plant tissues [15].

Overall, our findings reinforced the importance of tyrosine dephosphorylation to define the specific tissue metabolism. From now on, the most intriguing investigation field is to discover the physiological substrates for the PTPs and correlate them with a specialized process. Experiments addressing this new research avenue are currently under progress in our laboratory.

Acknowledgements

We thank Paulo Arruda, Gonçalo Pereira and Maricilda de Mello for sharing equipment and reagents and Raul Andrés Cerñadas and Tatiana A.C. Brasil for helping in figures assembly. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); de Campos-Leite, L. was supported by a doctoral fellowship from FAPESP (03/07664-0). C.V.F., A.H. and C.E.B. are supported by research fellowships from CNPq.

References

- [1] H. Aoyama, T.M.A. Silva, M.A. Miranda, C.V. Ferreira, Quím. Nova. 26 (2003) 896-900.
- [2] C.V. Ferreira, G.Z. Justo, A.C. Souza, K.C. Queiroz, W.F. Zambuzzi, H. Aoyama, M.P. Peppelenbosch, Biochimie. 88 (2006) 1859-1873.
- [3] S.Luan, Annu. Rev. Plant Biol. 54 (2003) 63-92.
- [4] N. Sugiyama, H. Nakagami, K. Mochida, A. Daudi , M. Tomita, K. Shirasu, Y. Ishihama, Mol.Syst. Biol. 4 (2008) 193.
- [5] N.K. Tonks, H. Charbonneau, C.D. Diltz, E.H. Fischer, K.A. Walsh, Biochemistry. 27 (1988) 8695-8701.
- [6] Q. Xu, H.H. Fu, R. Gupta, S. Luan, Plant Cell. 5 (1998) 849-857.
- [7] D. Kerk, G. Templeton, G.B. Moorhead, Plant Physiol. 146 (2008) 351-367.
- [8] R. Gupta, J.T. Ting, L.N. Sokolov, S.A. Johnson, S. Luan, Plant Cell. 14 (2002) 2495-2507.
- [9] E.A. MacRobbie, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 99 (2002) 11963-11968.
- [10] H-J. Huang, Y-M. Lin, D-D. Huang, T. Takahashi, M. Sugiyama, Plant Cell Physiol. 44 (2003) 770–775.
- [11] Y. Huang, H. Li, R. Gupta, P. Morris, S. Luan, J.J. Kieber, Plant Physiol 122 (2000) 1301–1310.
- [12] S. Luan, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 99 (2002) 11567–11569.
- [13] G.C. Ingram, R. Waites, Curr. Opin. Plant Biol. 9 (2006) 12-20.
- [14] A. Yemets, Y. Sheremet, K. Vissenberg, J. Van Orden, J.P. Verbelen, Y.B. Blume, Cell Biol.Int. 32 (2008) 630-637.
- [15] S.M.G. Duff, G. Sarath, W.C. Plaxton, Physiol. Plant. 90 (1994) 791-800.
- [16] J.N. dos Prazeres, C.V. Ferreira, H. Aoyama, Plant. Physiol. Biochem. 42 (2004) 15-20.
- [17] U.K. Laemmli, Nature 277 (1970) 680-685.

- [18] E.F. Hartree, Anal. Biochem. 48 (1972)422-427.
- [19] C.V. Ferreira, J.M. Granjeiro, E.M. Taga, H. Aoyama, Biochem. Biophys. Res. Commun. 242(1998b) 282-286.
- [20] O.H. Lowry, J.A. Lopez, J. Biol. Chem. 162 (1946) 421-428.
- [21] T.C. Verwoerd, B.M.M. Dekker, A. Hoekema, Nucleic Acids Res. 17 (1989) 2362.
- [22] K.S. Park, M.L.Kahn, Plant Mol. Biol. 40(1999) 13-21.
- [23] L.J. McGuffin, K. Bryson, D.T. Jones, Bioinformatics. 16 (2000) 404-405.
- [24] C.V. Ferreira, J.M. Granjeiro, E.M. Taga, H. Aoyama, Plant. Physiol. Biochem. 36 (1998a) 487-494.
- [25] C.V. Ferreira, E.M. Taga, H.Aoyama, J. Enzyme Inhib. 15 (2000) 403-410.
- [26] K. Fujisawa, Y. Katsumata, M. Yoshino, Int. J. Biochem. 25 (1993) 627-630.
- [27] J. Yang, X. Liang, T. Niu, W. Meng, Z. Zhao, W. Zhou, J. Biol. Chem. 273 (1998) 28199-28207.
- [28] A.P. Fordham-Skelton, M. Skipsey, I.M. Eveans, R. Edwards, J.A. Gatehouse, Plant Mol.Biol. 39 (1999) 593-605.
- [29] D.P. Dixon, A.P. Fordham-Skelton, R. Edwards, Biochemistry. 44 (2005) 7696-7703.
- [30] K.G. Raghothama, A.S. Karthikeyan, Plant and Soil 274 (2005) 37–49.

Legends to the Figures

Figure 1 - Expression of recombinant soybean PTP in *E. coli*. Proteins were resolved in as 12,5% SDS-PAGE (**A**) Expression of PTP in pProEXTMHta. Letters *a* and *b* represent pProEx-Hta, without insert, as negative control (a) and pProEx-PT (b), respectively. Lanes 1-4 represent soluble fraction (1), insoluble fraction (2), soluble fraction eluted from Ni ²⁺ resin (3) and flow through (4).M, protein molecular weight marker (kDa). Arrow indicates PTP at insoluble fraction, and the expected size was about 38kDa. (**B**) Expression of PTP in pGEX-4T-1. Lanes 1-3 represent insoluble fraction (1), flow through (2) and soluble fraction eluted from GST affinity resin (3). M, protein molecular weight markers (kDa). Arrow indicates purified PTP and the expected size was about 64kDa. (**C**) Confirmation of thrombin cleavage reaction, at 4°C. Lanes 1-6 represent sample without thrombin, after 24h, as a control (1), sample t₀ (2), sample after 6 hours (3), sample after 12 hours (4), sample after 18 hours (5), sample after 24 hours (6). M, protein molecular weight marker (kDa). Arrows indicate the expected molecular weight of the products of the reaction.

Figure 2 - **Kinetic characterization of recombinant PTP** (A) Effect of pH on the activity of recombinant PTP. The enzyme activity were determined using p-nitrophenyl phosphate as substrate, in the presence of 100 mM of the following buffers: glycine (pH 2.5), citrate (pH 3.0), acetate (pH 4.0-5.5), Bis-Tris (pH 6.0), imidazole (pH 7.0 and 8.0), and glycine (pH 9.0). (B) Effect of inhibitors on the activity of recombinant PTP. (C) Effect of potential substrates on the activity of recombinant PTP. The enzyme activity using p-nitrophenyl phosphate as substrate was considered 100% of activity (control). The experiments were performed in triplicate and bars represent the standard deviations.

Figure 3 - Circular dichroism analysis of recombinant PTP. (A) Far-UV CD spectra of PTP at concentration of 0.4 mg/mL in PBS buffer pH 7.3 (diluted 1:4). The spectra were recorded at 22°C from 195 to 260 nm in a quartz 1mm path length cuvette using JASCO J-810 spectropolarimeter.(B) Thermal denaturation of recombinant PTP. The spectra of recombinant PTP was performed at different temperature: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74 and 84°C, from 195 to 260 nm in a quartz 1mm path length cuvette using JASCO J-810 spectropolarimeter. PTP was used at 0.4 mg/mL concentration in PBS buffer pH 7.3 (diluted 1:4).

Figure 4 - Expression level of PTP in different soybean tissues. The analysis was carried out after 10 days of germination under light conditions. (A) mRNA relative quantification analysis by qPCR. Three replicates were used for each point in the graph and error bars indicate SD (P<0.05) (B) Protein expression analysis by western blotting. Letters represent R = Root; H = Hypocotyl; C = Cotyledon; L = Leaf.

Figure 1









Figure 3



Figure 4

