

## DETECÇÃO DE PROTEINASES E DE INIBIDORES DE PROTEINASES DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Parkia multijuga*: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

Rafaela Oliveira da SILVA<sup>1</sup>; Larissa Ramos CHEVREUIL<sup>2</sup>; José Francisco de Carvalho GONÇALVES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PAIC/FAPEAM-INPA; <sup>2</sup>Co-orientadora CDAM/INPA; <sup>3</sup>Orientador CDAM/INPA

### 1. Introdução

A alta diversidade vegetal presente na flora amazônica, quando investigada por métodos bioquímicos e/ou biotecnológicos pode potencializar a utilização industrial de substâncias químicas de origem vegetal. No entanto, de forma natural, visando eventos biológicos determinantes para o seu ciclo de vida, as plantas produzem moléculas responsáveis tanto pela defesa quanto pela regulação do metabolismo vegetal. Uma das moléculas envolvidas nestas ações é o inibidor proteolítico (Natarajan *et al.* 2013).

Dentre os órgãos e/ou tecidos vegetais com potencial para prospecção de biomoléculas, destacam-se as sementes, por constituírem uma das principais fontes de reserva de proteínas, importantes para o processo de germinação (Gonçalves *et al.* 2002).

Durante a germinação, vários processos metabólicos são ativados, incluindo a mobilização de proteínas, que ocorre por meio da atividade de enzimas proteolíticas (proteínases ou proteases), responsáveis por catalisar a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas, fornecendo, desta forma, nitrogênio e enxofre para as vias de biossíntese (Pesquet 2012).

Apesar da importância metabólica dessas enzimas durante a germinação, sua atividade deve ser eficientemente regulada, de modo a evitar a hidrólise prematura de proteínas e, um dos mecanismos para controle da atividade enzimática é o bloqueio ou a diminuição de sua atividade catalítica por meio da interação com inibidores proteolíticos (Kuhar *et al.* 2013).

Nos vegetais, os inibidores proteolíticos são metabolicamente importantes, pois além de regular a atividade de proteínases, podem servir como fonte de reserva e atuar na defesa vegetal contra o ataque de patógenos, inibindo enzimas digestivas em insetos e, enzimas proteolíticas extracelulares em microrganismos (Magni *et al.* 2012).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença da atividade de proteínases e de inibidores de proteínases durante a germinação de sementes de *Parkia multijuga*, além de purificar e caracterizar inibidores de tripsina visando esclarecer a participação destas proteínas no processo de germinação.

### Material e Métodos

Sementes de *P. multijuga* adquiridas da empresa Connarus Ambiental LTDA, coletadas da Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Uatumã/AM, tiveram a dormência quebrada por desponete ao lado oposto do eixo embrionário e, após embebição por 24 horas, foram semeadas em bandejas plásticas contendo vermiculita como substrato e, acondicionadas em câmara de germinação (ELETROlab, modelo EL 202) à temperatura constante de 25°C, providas de lâmpadas fluorescentes de luz branca com fotoperíodo de 12:12 horas (luz:escuro).

As amostras foram coletadas em diferentes estádios de germinação, semente quiescente (SQ) e cotilédones após embebição (EM), emissão da radícula (RA) e exposição do nó cotiledonar (NO) e submetidas à extração de proteínas.

A porcentagem de germinação (%G) e tempo médio de germinação (TMG) foram calculados de acordo com (Labouriau e Valadares 1976) e o índice de velocidade de germinação (IVG) segundo (Maguire 1962).

O material finamente pulverizado, proveniente de cada estádio de germinação, foi submetido à extração salina em NaCl 0,15M (10% p/v), durante duas horas à temperatura ambiente (26±3°C), seguida de centrifugação a 11.000 x g durante 20 minutos a 10°C. O sobrenadante foi dialisado contra água destilada durante 48 horas, e liofilizado, resultando no extrato protéico.

Os extratos protéicos de SQ foram submetidos à cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose 4B em coluna de polietileno (2 x 8 cm), utilizando-se como tampão de equilíbrio Tris-HCl 50 mM pH 7,5. O acompanhamento do perfil cromatográfico foi realizado a partir de leituras espectrofotométricas a  $\lambda=280$  nm (Visível Ultraspec 2100 pro, Armesham Biosciences).

A atividade de serinoproteínases e inibidores de serinoproteínases (inibidores de tripsina e quimotripsina) foi determinada a partir da hidrólise dos substratos BAPNA (benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida, Sigma) e Azocaseína e, de cisteinoproteínases e inibidores de cisteinoproteínases a partir da hidrólise de BANA (N-alfa Benzoil-DL-Arginina B naftilamida, Sigma) e azocaseína. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorbância em 0,01 e uma unidade de inibição (UI) como a inibição de uma unidade de atividade de proteínase.

A caracterização dos inibidores purificados foi realizada determinando a concentração mínima de inibidor capaz de inibir 50% da atividade enzimática e, por meio de testes de estabilidade térmica, incubando-se as frações em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C) durante 30 minutos e, posteriormente, submetidas a ensaios inibitórios.

A obtenção dos perfis proteicos e o monitoramento da purificação foi realizado a partir de géis de poliácridamida contendo SDS (SDS-PAGE), segundo o método de Laemmli (1970). Como marcadores de massas moleculares foram utilizados marcadores da Promega (10 a 225 kDa). Após as corridas, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue durante 2 horas e então descorados em solução de ácido acético glacial, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5 (v/v/v).

### 3. Resultados e Discussão

As sementes de *P. multijuga* exibiram germinabilidade de 95%, tempo médio de germinação de  $5 \pm 0,8$  dias e, emissão da parte aérea em  $12 \pm 0,6$  dias. O índice de velocidade de germinação foi de  $2,07 \pm 0,2$  sementes/dia).

Durante a germinação de sementes de *P. multijuga* observou-se aumento da atividade de inibidores de tripsina após RA, mantendo-se em NO, ao passo que, a atividade de inibidores de quimotripsina é reduzida durante EM (sem atividade), com posterior aumento em RA e NO (Figura 2).

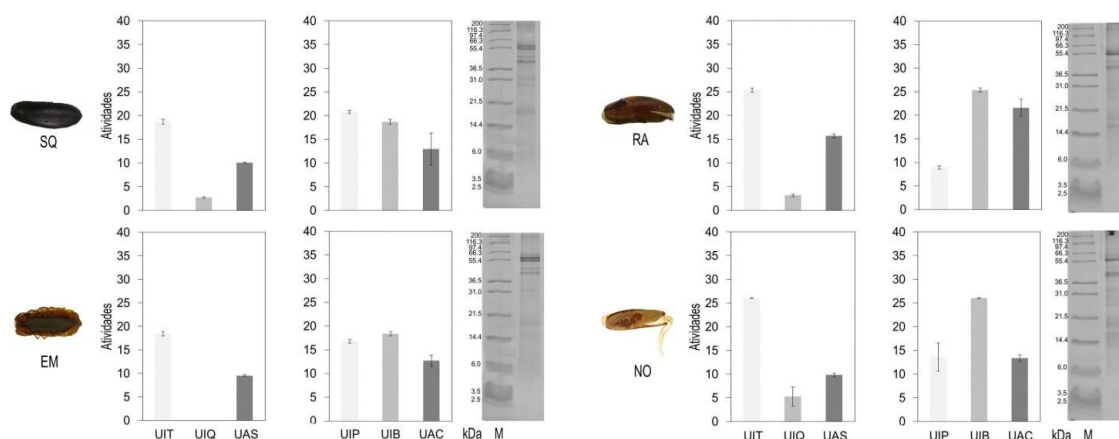


Figura 2. Atividade de proteínases e inibidores de proteínases e, perfil eletroforético em SDS-PAGE (20%) dos extratos protéicos durante a germinação de sementes de *P. multijuga*. UIT: Unidade de inibição da tripsina. UIQ: unidade de inibição da quimotripsina. UAS: Unidade de atividade de serinoproteínases. UIP: unidade de inibição da papaína. UIB: Unidade de inibição da bromelaína. UAC: Unidade de atividade de cisteínoproteínases. kDa: Quilodalton. M: marcador.

Quanto aos inibidores de papaína, observou-se decréscimo de sua atividade apenas no período que compreende RA, seguida de aumento no período pós-germinativo (NO), enquanto a atividade dos inibidores de bromelaína foi aumentada neste mesmo período (RA) (Figura 2).

No que diz respeito à atividade de serinoproteínases e cisteínoproteínases, exibiram aumento apenas em RA (Figura 2). Esse acréscimo de atividade proteolítica pode estar associado a um aumento na demanda de hidrólise protéica, necessária para dar suporte à divisão celular e desenvolvimento de novos tecidos, uma vez que, estudos indicam que proteínases estão envolvidas com a hidrólise de proteínas de reserva após a protrusão da radícula (Praxades-Garcia *et al.* 2012).

A similaridade na atividade de cisteína e serinoproteínases e de inibidores durante a germinação sugere que as sementes de *P. multijuga* apresentam um conjunto de diferentes proteínas que podem significar uma adaptação da espécie, no que diz respeito a sua defesa, visto que essa variedade de proteínases e inibidores de proteínases pode atuar sobre várias espécies de insetos e patógenos ou mesmo “contornar” a evolução adaptativa das espécies de predadores e patógenos (Scarafoni *et al.* 2013).

Existe pouca evidência de que inibidores de proteínases influenciem na atividade de proteínases da própria semente. Em alguns casos, como em sementes de feijão, relatou-se que, após a germinação há uma diminuição no teor de inibidor ao mesmo tempo em que há aumento no conteúdo de proteínases (Bewley *et al.* 2013).

O perfil protéico dos extratos nos diferentes estádios demonstrou a síntese e degradação de proteínas ao longo do processo de formação da plântula (Figura 2). Bandas protéicas com massa molecular de, aproximadamente, 55 kDa apresentam-se mais intensas nos estádios SQ e EM, com consecutiva redução da intensidade protéica ao longo processo, ao passo que, bandas protéicas com massa molecular entre 14 e 21 kDa e de 6 kDa são intensificadas após RA e NO, respectivamente (Figura 2).

Proteínas com massa molecular de, aproximadamente, 55 kDa podem pertencer à classe das cisteínoproteínases, uma vez que, no período pré-germinativo, essas proteases são armazenadas em sua forma inativa e, posteriormente, clivadas à proteínas menores, de modo a tornarem-se ativas e realizarem a hidrólise de proteínas de reserva, corroborando com os dados obtidos para *P. multijuga* uma vez que, nos períodos em que esta faixa protéica perde a intensidade, a atividade de cisteínoproteínases detectada atinge seu valor máximo (Figura 3) (Grudkowska e Zagdańska 2004).

Quanto às bandas protéicas entre 6 kDa e 14 - 21 kDa sugere-se que correspondam à classe dos inibidores de serinoproteínas do tipo Bowman-Birk e Kunitz, respectivamente, visto que, inibidores do tipo Bowman-Birk tem sido isolados de sementes de várias espécies de leguminosas como *Cajanus cajan*, com massa molecular de 8 kDa, ao passo que inibidores do tipo Kunitz, com massa molecular de 20 kDa foram isolados de sementes de *Acacia polyphylla* (Prasad *et al.* 2010; Machado *et al.* 2013). Inibidores de tripsina foram purificados de sementes quiescentes (SQ) de *P. multijuga* a partir de coluna de afinidade em tripsina-Sepharose 4B, apresentando dois picos distintos. O primeiro pico (PI) corresponde às proteínas que não interagiram com a tripsina imobilizada na coluna, ao passo que o segundo pico (PII) refere-se às proteínas com afinidade de interação, tratando-se possivelmente de inibidores de tripsina, denominados de inibidores de tripsina de *P. multijuga* (PmTI) (Figura 3A e 3B). A cromatografia de afinidade é um método conveniente para o isolamento de inibidores de tripsina, porém, em alguns casos, é possível observar a presença de contaminantes, que podem ser eliminados a partir da cromatografia de troca iônica e/ou cromatografia de exclusão molecular (Chan *et al.* 2013).

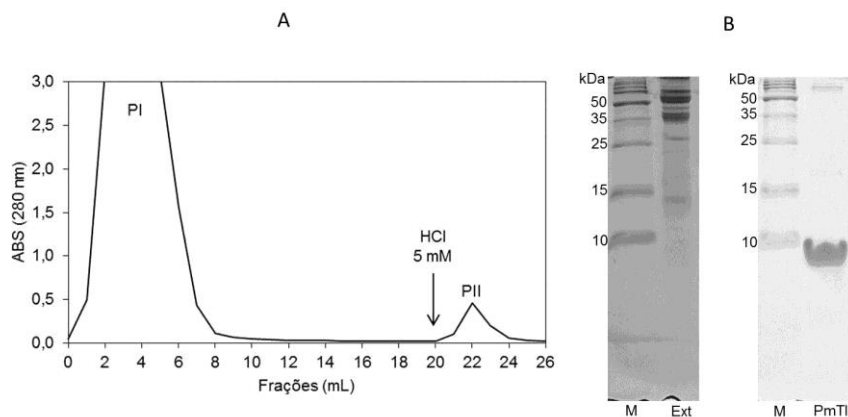


Figura 3. Purificação de inibidores de tripsina de sementes de *P. multijuga*. A. Cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose 4B. B. Perfil eletroforético em SDS-PAGE (20%), sob condições redutoras. M: Marcador de massa molecular (Promega). Ext: Extrato protéico de *P. multijuga*. PmTI: Inibidores de tripsina de *P. multijuga*. Tampão de eluição.

Um inibidor de tripsina foi totalmente purificado de sementes de *Phaseolus vulgaris*, por meio da combinação das cromatografias de afinidade em Affi-gel Blue Gel, troca iônica em Q-Sepharose e Mono Q e exclusão molecular em Superdex 75, respectivamente, demonstrando a necessidade de mais de uma etapa cromatográfica para a obtenção de uma molécula específica de interesse (Chan *et al.* 2013).

O perfil protéico do extrato e de PmTI confirma a purificação dos inibidores, com a predominância uma única banda protéica na faixa de massa molecular de 9 kDa, correspondendo, provavelmente à inibidores do tipo Bowman-Birk (Figura 3B).

Os inibidores de tripsina purificados (PmTI), apresentaram especificidade de inibição contra a tripsina e quimotripsina, sendo a atividade inibitória da tripsina 6 vezes maior comparada à quimotripsina (Figura 4).

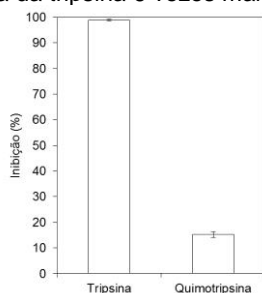


Figura 4. Especificidade de inibição dos inibidores de tripsina purificados de sementes quiescentes de *P. multijuga* (PmTI).

Os inibidores de serinoproteínas, de fato, apresentam variação quanto à inibição de diferentes proteinases, destacando-se os inibidores do tipo Kunitz, que são potentes inibidores da tripsina e poucos específicos para a quimotripsina, enquanto os inibidores tipo Bowman-Birk podem inibir tanto a tripsina quanto a quimotripsina (Jamal *et al.* 2012).

A diferença de especificidade de inibição enzimática é explicada mediante a formação do complexo estável entre enzima-inibidor. Desse modo, dependendo do tipo de resíduo de aminoácido presente no sítio reativo do inibidor, existe uma enzima específica que atua sobre este inibidor (Bode e Huber, 2000).

#### 4. Conclusão

Durante a germinação de sementes de *P. multijuga*, a atividade inibitória da tripsina, especificamente, aumenta após a emissão da radícula, sugerindo a sua participação na regulação da atividade de proteinases envolvidas na hidrólise de proteínas, necessárias para posteriores eventos, como o desenvolvimento de novos tecidos que formarão as estruturas da parte aérea.

Inibidores de tripsina foram purificados por meio de cromatografia em tripsina-Sepharose 4B, apresentam alta especificidade pela tripsina e massa molecular de, aproximadamente, 9 kDa, sugerindo-se que pertençam à família Bowman-Birk.

#### 5. Referências Bibliográficas

- Bariane, A.; Gonçalves, J.F.C.; Chevreuil, L.R.; Pereira, J.R.P.C.; Souza, L.A.G.; Bentes, J.L.S.; Pando, S.C. 2012. Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos protéicos sobre fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathol*, 38: 131-138.
- Bewley, J.D.; Bradford, K.J.; Hilhorst, H.W.M.; Nonogaki, H. 2013. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*. 3ª Ed. Springer, 392 p.
- Bode, W.; Huber, R. 2000. Structural basis of the endoproteinase protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477: 241-252.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Chan, Y.C.; Zhang, Y.; Ng, T.B. 2013. Brown Kidney Bean Bowman–Birk Trypsin Inhibitor is Heat and pH Stable and Exhibits Anti-proliferative Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, In press.
- Gonçalves, J.F.C., Fernandes, A.V., Oliveira, A.F.M., Rodrigues, L.F.; Marengo, R.A. 2002. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14(2):139-142.
- Grudkowska, M.; Zagdańska, B. 2004. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Quarterly*, 51: 609-624.
- Jamal, F.; Pandey, P.; Singh, D.; Khan, M. 2012. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochemistry Review*, In press.
- Kuhar, K.; Kansal, R.; Subrahmanyam, B.; Koundal, R.; Miglani, K.; Gupta, V. 2013. A Bowman–Birk protease inhibitor with antifeedant and antifungal activity from *Dolichos biflorus*. *Acta Physiol Plant*, 35: 1887–1903.
- Labouriau, L.G.; Valadares, M.B. 1976. On the physiology of seed of *Calotropis procera*. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, 42(2): 235-264.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Machado, S.W.; Oliveira, C.F.R.; Bezerra, C.S.; Freire, M.G.M.; Kill, M.R.; Machado, O.L.T.; Marangoni, S.; Macedo, M.L.R. 2013. Purification of a Kunitz-type Inhibitor from *Acacia polyphylla* DC seeds: Characterization and insecticidal properties against *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 2469-2478.
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2(1): 176-177.
- Magni, C.; Sessa, F.; Tedeschi, G.; Negri, A.; Scarafoni, A.; Consonni, A.; Duranti, M. 2012. Identification in lupin seed of a serine-endopeptidase activity cleaving between twin arginine pairs and causing limited proteolysis of seed storage proteins. *Molecular Plant*, 1-9.
- Natarajan s.s.; Pastor-Corrales, M.A.; Khan, F.H.; Garret, W.M. 2013. Proteomic Analysis of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 9: 424-437.
- Pesquet, E. 2012. Plant proteases – from detection to function. *Physiologia Plantarum*, 145: 1–4.
- Prasad, E.R.; Merzendorfer, H.; Madhurekha, C.; Dutta-gupta, A.; Padmasree, K. 2010. Bowman-Birk Proteinase Inhibitor from *Cajanus cajan* Seeds: Purification, Characterization, and Insecticidal Properties. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58: 2838–2847.
- Praxades-Garcia, P.; Silva, C.I.; Gozzo, A.J.; Nunes, V.A.; Torquato, R.J.; Tanaka, A.S.; Cassia, R. 2012. Biochemical Aspects of a Serine Protease from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) Seeds: A Potential Tool to Access the Mobilization of Seed Storage Proteins. *The Scientific World Journal*, 1-8.
- Scarafoni, A.; Ronchi, A.; Prinsi, B.; Espen, L.; Assante, G.; Venturini, G.; Duranti. 2013. The proteome of exudates from germinating *Lupinus albus* seeds is secreted through a selective dual-step process and contains proteins involved in plant defense. *Federation of European Biochemical Societies*, In press.