

# QUANTIFICAÇÃO DE [<sup>32</sup>P] FOSFOPROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA PELA RADIAÇÃO CERENKOV: VANTAGENS SOBRE OUTROS PROCEDIMENTOS

Carlos A. Gonçalves, Carmem Gottfried, Guido Lenz e

Christianne Salbego

Departamento de Bioquímica - Instituto de Ciências Básicas da Saúde

UFRGS - Porto Alegre, RS

## RESUMO

A fosforilação protéica tem sido reconhecida como um importante mecanismo no controle das atividades celulares. Há várias maneiras para medir a marcação com <sup>32</sup>P de fosfoproteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, incluindo densitometria de filmes autoradiográficos, cintilação líquida e radiação Cerenkov. Este trabalho compara tais diferentes procedimentos e aponta as vantagens do uso da radiação Cerenkov para medir a incorporação de fosfato radioativo em proteínas.

Palavras-chave: *Radiação Cerenkov, cintilação líquida, fosforilação protéica.*

## ABSTRACT

The phosphorylation of proteins has been recognized as an important mechanism for controlling cellular activities. There are many ways

to measure  $^{32}\text{P}$ -labelling of phosphoproteins resolved by polyacrylamide gel electrophoresis, including densitometry of autoradiographs, liquid scintillation counting and Cerenkov counting. This report compares such different procedures and indicates the advantages of Cerenkov counting to determine radioactive phosphate incorporation into proteins.

Keywords: *Cerenkov counting, liquid scintillation, protein phosphorylation.*

**Abreviaturas:** *GFAP (glial fibrillary acidic protein), HEPES (N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulphonic acid], PPO (2,5-diphenyloxazole), POPOP 1,4 -bis-5-phenyloxazol-2-yl-benzene), SDS (sodium dodecyl sulphate), TCA (trichloroacetic acid).*

## INTRODUÇÃO

A fosforilação protéica é um dos principais mecanismos de regulação da atividade celular, em eucariontes e procariontes (Roach, 1991). Muitas fosfoproteínas têm sido caracterizadas nos diversos tecidos e particularmente no tecido nervoso (Rodnight e Wofchuk, 1992).

Comumente a fosforilação protéica é estudada pela incubação de células intactas com [ $^{32}\text{P}$ ]fosfato ou frações sub-celulares, como o citoesqueleto por exemplo, com [ $^{32}\text{P}$ ]ATP. A diferença de incorporação de  $^{32}\text{P}$  em uma proteína pode ser observada em diversas situações fisiológicas ou patológicas, sugerindo o seu papel na atividade celular (Salbego e Rodnight, 1996; Pereira et al, 1994).

As [ $^{32}\text{P}$ ]fosfoproteínas resultantes da incubação são analisadas, principalmente, por eletroforese em gel de poliácridamida e identificadas por auto-radiografia, que consiste em expor o gel a um filme radiográfico (Garrison, 1993).

As manchas, no filme, indicam a localização das fosfoproteínas no gel e a medida da incorporação de  $^{32}\text{P}$  pode ser feita por

diversos procedimentos, incluindo densitometria do filme ou cintilometria do gel. Além disso, o  $^{32}\text{P}$  tem uma emissão  $\beta$  de alta energia que pode ser detectada mesmo sem o uso de líquidos de cintilação, denominada radiação Cerenkov (Kellogg, 1983).

A densitometria do filme, além de permitir somente a comparação de fosfoproteínas no mesmo gel, tem seu uso limitado pela sensibilidade dos filmes, tempo de exposição e uso de placas intensificadoras (Laskey, 1980). As principais diferenças entre os procedimentos de medida da radiação no gel são quanto à dissolução do gel e ao uso de líquido de cintilação. O objetivo deste trabalho foi comparar os procedimentos existentes quanto à eficiência e operacionalidade dos mesmos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

**Material.** O [ $^{32}\text{P}$ ]fosfato de sódio foi obtido do IPEN, São Paulo. Acrilamida, bisacrilamida, SDS, PPO, POPOP, mercaptoetanol. Triton-X100 e Nonidet P-40 foram adquiridos da Sigma, peróxido de hidrogênio e uréia da Merck.

**Marcação de fosfoproteínas com [ $^{32}\text{P}$ ]fosfato.** A marcação foi feita como descrita anteriormente (Gonçalves et al, 1990). Ratos Wistar de 60 dias foram decapitados e fatias hipocâmpais de 0,4 mm foram obtidas em um "McIlwain chopper". As fatias foram pré-incubadas em meio Krebs-Ringer tamponado com HEPES sem fosfato (NaCl 124 mM, KCl 4mM,  $\text{MgSO}_4$  1,3 mM, glicose 12 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM e HEPES sódico 25 mM, pH 7,4), durante 30 min. A seguir esse meio era substituído por meio de composição similar, porém contendo  $1\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]fosfato sódico. Cada fatia hipocâmpal era incubada num volume de  $50\mu\text{l}$ , durante 60 min a  $30^\circ\text{C}$ . A reação era interrompida pela adição de TCA 10%. As fatias foram então lavadas com TCA 4% e a seguir com etanol 80%. Finalmente eram dissolvidas em

solução de lise para eletroforese bidimensional (uréia 9,2 M, SDS 0,2%, Nonidet P-40 1% e mercaptoetanol 2%)

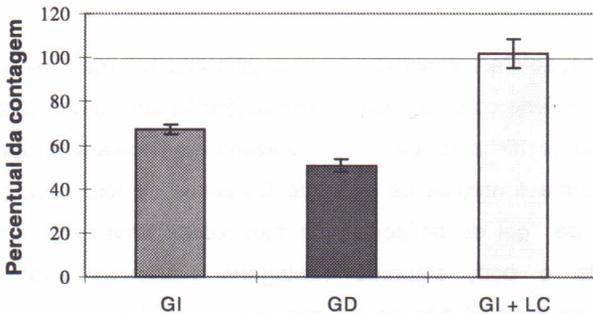
**Eletroforese e auto-radiografia.** As fosfoproteínas foram analisadas por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (Rodnight et al, 1988). A primeira dimensão consistia de uma eletroforese não-equilibrada em gradiente de pH (2,5-10) num gel cilíndrico de poliacrilamida 3,5% (0,1 cm de diâmetro e 12 cm de comprimento). Este gel após a primeira corrida era congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  e posteriormente aplicado sobre um outro gel em placa de poliacrilamida 8% contendo SDS 0,1%. Ao fim da corrida o gel era fixado em solução metanol 53% - ácido acético 7% e posteriormente embebido em metanol 50% - glicerol 1% e seco entre duas folhas de papel celofane (Juang et al, 1984). O gel seco era exposto a um filme de raio-X (X-Omat), usando placa intensificadora sobre o filme (Cronex, Du Pont), em ultra-freezer ( $-70^{\circ}\text{C}$ ), por um tempo variável de 2 a 24 horas e revelado com reagentes da Kodak.

**Medida da incorporação de  $^{32}\text{P}$ .** Várias fosfoproteínas foram localizadas no gel e recortadas para a medida da incorporação de fosfato radioativo, entre elas a GFAP (uma proteína astrocítica de filamento intermediário de 50 kDa) e a cpp-40 (uma proteína neuro-específica altamente fosforilada de 40 kDa) (Salbego e Rodnight, 1996). A área do gel recortado variou 4 a 12  $\text{mm}^2$ . A medida foi realizada em diversos procedimentos no cintilador : 1. Gel intacto sem líquido de cintilação (**GI**); 2. Gel dissolvido (**GD**) com 0,5 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a  $60^{\circ}\text{C}$ , durante 16h; 3. Gel intacto em líquido de cintilação (**GI+LC**); 4. Gel dissolvido, conforme descrito acima, acrescido de líquido de cintilação (**GD+LC**). As amostras eram submetidas sequencialmente aos procedimentos 1-3 ou 1-2-4. O líquido de cintilação era composto de Triton X-100 33%(v/v), tolueno 67% (v/v), PPO 0,55% e POPOP 0,01% (Cooper, 1977). As amostras eram lidas em "vials" de polietileno de 3 ml em "carriers" de vidro (Kellogg, 1983) num cintilador

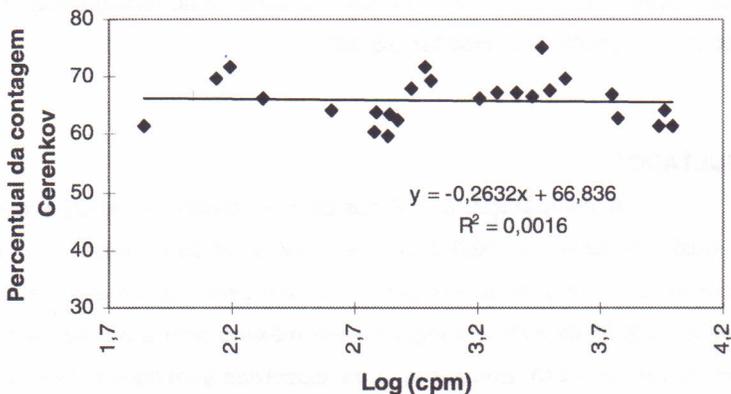
Wallac 1409. Em paralelo algumas manchas auto-radiográficas foram medidas em densitômetro Hoëffer GS 300.

## RESULTADOS

A incorporação de  $^{32}\text{P}$  nos géis dissolvidos em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e medidos em líquido de cintilação (**GD+LC**) foram adotados como referencial 100% (Figura 1). O número de contas por minuto em géis intactos sem líquido de cintilação (**GI**) foi de 67% e atingiu o valor máximo com a adição de líquido de cintilação (**GI + LC**). Entretanto, o gel dissolvido sem líquido de cintilação (**GD**) apresentou uma contagem de somente 51%. Este efeito de redução não foi devido a dissolução do gel em si, e sim a presença do peróxido de hidrogênio (dados não mostrados).



**Figura 1. Medida da incorporação de  $^{32}\text{P}$  em fosfoproteínas separadas em gel de poliacrilamida.** Fosfoproteínas separadas por eletroforese foram recortadas do gel de poliacrilamida e a radiação Cerenkov foi medida nas bandas: intactas (GI); dissolvidas com peróxido de hidrogênio (GD); intactas em líquido de cintilação (GI+LC); dissolvidas com peróxido de hidrogênio e acrescidas de líquido de cintilação (GD+LC). A contagem foi expressa percentualmente em relação ao valor da medida GD+LC (100%). As diferenças encontradas entre GI e GD em relação ao GD+LC, bem como entre si, foram significativas (teste t,  $p < 0.01$ ). O N variou de 14 a 17.



**Figura 2. Medida percentual da contagem Cerenkov no géis intactos comparados aos dissolvidos e com líquido de cintilação, em amostras que variaram da ordem  $10^2$  a  $10^4$  cpm. Os valores das amostras (em cpm) foram expressos em escala logarítmica.**

A radiação Cerenkov medida nos géis intactos mostrou uma evidente proporcionalidade com os valores obtidos em líquido de cintilação, medidos no intervalo de 100 a 10000 cpm, expressos em escala logarítmica (Figura 2). Desta forma a medida da radiação Cerenkov de fosfoproteínas em peças intactas de gel de poliacrilamida mostrou-se uma alternativa bastante adequada e com algumas vantagens adicionais sobre o procedimento que usa a dissolução do gel com  $H_2O_2$  e adição de líquido de cintilação.

## DISCUSSÃO

A medida da incorporação de  $^{32}P$  em fosfoproteínas é realizada de diversas maneiras incluindo densitometria de auto-radiografias (Gonçalves e Rodnight, 1992), cintilometria do gel dissolvido com  $H_2O_2$

(Matos et al, 1996), cintilometria do gel intacto (Huttner et al, 1987) e medida da radiação Cerenkov (Gonçalves e Rodnight, 1993).

A análise densitométrica de alguns filmes auto-radiográficos confirmou a variabilidade da quantificação obtida com diferentes tempos de exposição do filme (dados não mostrados). Para exemplificar, a diferença entre duas bandas de 400 e 360 cpm/mm<sup>2</sup> (medida da radiação Cerenkov no gel intacto sem adição do líquido de cintilação) não foi observada densitometricamente no filme exposto por 20 horas. Entretanto uma diferença percentualmente equivalente foi obtida com uma exposição de 5 horas. A não-linearidade da densitometria é comumente subestimada, mas deve ser considerada, especialmente quando se usam placas intensificadoras (Laskey, 1980).

A quantificação da radiação Cerenkov do <sup>32</sup>P em amostras biológicas foi adotado há muito tempo pela simplicidade e economia (Gould, 1972; Kellogg, 1983), mas o uso de cintiladores, particularmente o PPO, vem sendo utilizado para aumentar a eficiência da contagem. Além disso a preparação de líquidos de cintilação com Triton X-100 possibilitou uma cintilometria com amostras aquosas incluindo géis, sem porém assegurar a completa eficiência (Laskey, 1980). O uso de líquido de cintilação para quantificação de [<sup>32</sup>P]fosfoproteínas em peças de gel de poliacrilamida dispensa a dissolução do gel (Figura 1), que até mesmo pode reduzir a eficiência obtida (Huttner et al, 1987). A dissolução ainda acarreta em adicionais problemas de operacionalidade e consumo de tempo.

A radiação Cerenkov comparada a contagem obtida com líquido de cintilação mostrou uma eficiência de 67% neste estudo. Entretanto este valor está acima do valor da eficiência de 40-45% esperada para o <sup>32</sup>P. O alto valor obtido pode estar refletindo uma baixa eficiência do líquido de cintilação. Nestas condições, portanto, a adição de líquido de cintilação resultou em uma contagem de somente 33% maior que a obtida diretamente com a radiação Cerenkov.

Em suma, a medida da radiação Cerenkov, para quantificar a incorporação de <sup>32</sup>P em fosfoproteínas, em géis intactos de poliacrilamida

mostrou-se uma alternativa: (a) mais barata, por dispensar os reagentes para dissolução ou cintilação; (b) mais rápida, por eliminar a dissolução e (c) muito eficiente e sensível. Além disto, este procedimento permite a análise estrutural das proteínas em estudos posteriores (Gonçalves e Rodnight, 1993), impossibilitados com a dissolução oxidativa e possivelmente afetados pelos reagentes do coquetel de cintilação.

## REFERÊNCIAS

- COOPER, T.G. (1977). Radiochemistry. *In* The tools of biochemistry. Ed. by T.G. Copper, Willey-interscience Publication.
- DE MATTOS, A.G., DE FREITAS, M.S., GONÇALVES, C.A., AND PESSOA-PUREUR, R. (1996). Developmentally regulated in vitro phosphorylation of 85 kDa Triton-insoluble protein of cerebral cortex of rats. *Develop. Brain Res.*, 96: 76-82.
- GARRISON, J.C. (1993). Study of protein phosphorylation in intact cells. *In* Protein phosphorylation. A practical approach. Ed. D.G. Hardie, IRL press.
- GONÇALVES, C.A., SALBEGO, C.G., WOFCHUK, S.T., ROCHA, E., AND RODNIGHT, R. ( 1990). Properties of a protein phosphorylating system that labels a 47 kDa phosphoprotein (ppH-47) in slices of rat hippocampus. *Neurosci. Res. Commun.*, 6:129-134.
- GONÇALVES, C.A., AND RODNIGHT, R. (1992). Apparent identity of ppH-47 with a form of glial fibrillary acidic protein. *Neurosci. Res. Commun.*, 11:109-117.

- GONÇALVES, C.A., AND RODNIGHT, R. (1993). Electrotransfer of fixed phosphoproteins from pieces of dried polyacrylamide gel to small disks of nitrocellulose, nylon or polyvinylidene difluoride. *Electrophoresis*, 14:789-793.
- GOULD, M.J., CATHER, R., AND WINGET, G.D. (1972). Advantages of the use of Cerenkov counting of determination of  $^{32}\text{P}$  in photophosphorylation research. *Anal. Biochem.*, 50:540-548.
- HUTTNER, W.B., DEGENNARO, L.J., AND GREENGARD, P. (1987). Differential phosphorylation of multiple sites in purified protein I by cyclic AMP-dependent and calcium-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 256:1482-1488.
- JUANG, R.-H., CHANG, Y.-D., SUNG, H., SU, J.-C. (1984). Over-drying method for polyacrilamide gel slab packed in cellophane sandwich. *Analytical Biochemistry*, 141:348-350.
- KELLOGG, T.F. (1983). The effect of sample composition and vial type on Cerenkov counting in a scintillation counter. *Anal. Biochem.*, 134:137-143.
- LASKEY, R.A. (1980). The use of intensifying or organic scintillators for visualizing radioactive molecules resolved by electrophoresis. *Meth. in Enzymol.*, 65:363-371.
- PEREIRA, M.E., GONÇALVES, C.A., AND RODNIGHT, R. (1994). Phosphorylation in vitro of GFAP is increased in rat hippocampus by administration of 2,5-hexanedione. *Brain Res.*, 656:417-419.
- ROACH, P.J. (1991). Multisite and hierarchal protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 266:14139-14142.
- RODNIGHT R., ZAMANI R., TWEEDALE, A. (1988). An investigation of experimental conditions for studying protein phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Neuroscience Methods*, 24:27-38.
- RODNIGHT, R., AND WOFCHUK, S.T. (1992). Roles for protein phosphorylation in synaptic transmission. *Essays in Biochem.*, 27:91-102.

SALBEGO, C., AND RODNIGHT, R. (1996). A developmental study of protein phosphorylating systems stimulated by phorbol dibutyrate in micro-slices of rat brain. *Neurochem. Int.*, 28:431-438.