

Fosfolipídeos em Membranas de Raízes de Arroz são Alterados Diferencialmente por Estresse por Alumínio

Flávia Toledo Ramos¹, Roberto Oscar Pereyra Rossiello², Marcelo Einicker Lamas³, Danielle Péres da Rocha Oliveiros Marciano⁴, Arnaldo Rocha Façanha⁵

Introdução

Fosfolipídeos são mais que componentes estruturais de membranas, podendo ser co-fatores essenciais para enzimas de membranas, precursores de sinais ou moléculas sinalizadoras por si [1]. Durante exposição ao estresse, o maior papel dos fosfolipídeos deve ser como precursores para geração de moléculas mensageiras secundárias [2,3]. Recentemente, evidências têm mostrado que as células vegetais contêm uma variedade de vias de sinalização baseada em fosfolipídeos, incluindo fosfolipase C (PLC), D (PLD), A₂ (PLA₂) e uma via mais nova incluindo a formação de diacilglicerol pirofosfato (DGPP) e fosfatidilinositol 3,5-bisfosfato (PI (3,5)P₂). A formação de ácido fosfatídico (PA) tem sido ligada a uma variedade de tratamentos e respostas das plantas, e a maioria deles envolve estresse biótico ou abiótico, o que sugere PA como uma molécula sinalizadora para o estresse geral [1]. As plantas parecem ter desenvolvido uma via única de atenuação para PA, através de sua fosforilação a DGPP, uma molécula que tem sido encontrada em todas as plantas avaliadas [4], sendo o seu nível aumentado em resposta a uma variedade de estímulos.

Estudos sobre o efeito do Al nas propriedades físicas dos lipídeos de membranas mostraram que o Al diminui a fluidez dos lipídeos membranares [5, 6]. Estas mudanças na fluidez das membranas podem alterar várias funções celulares como permeabilidade e atividade da ATPase que depende da fluidez. [7].

O objetivo deste trabalho foi a investigação do efeito do Al sobre o padrão de fosforilação de lipídeos da membrana plasmática que devem estar atuando nas vias de sinalização de plantas de arroz submetidas ao estresse por Al.

Material e métodos

A. Material Vegetal e Condições de Cultivo

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L.), cultivares IAC 1289 (sensível) e Caiapó (tolerante) foram desinfestadas

superficialmente com hipoclorito de sódio 3 % por 20 min., lavadas com água destilada e deionizada por 1 h, trocando-se a água por seis vezes ou mais. Posteriormente foram colocadas em tela de nylon suspensa em bandejas plásticas contendo 5 L de água destilada e deionizada, onde permaneceram por 6 dias para germinação. Em seguida a água foi trocada por solução contendo CaCl₂ 200µM e AlCl₃ (0 µM, 80 µM), com o pH ajustado a 4,0 ± 0,01, onde permaneceram por 48 h com temperatura e luz controlada (fotoperíodo :14 horas; densidade de fluxo fotossintético : 300 µmol m⁻² s⁻¹; temperatura de 28 ± 3° C e umidade relativa do ar de 70 ± 20 %). Após o tratamento, as pontas das raízes (1 cm) foram seccionadas com uma lâmina de bisturi e imediatamente armazenadas a temperatura de 0 °C.

B. Extração e Fracionamento das Membranas

Aproximadamente 5 g de massa fresca de ápice das raízes foram macerados em tampão de extração, filtrado em gaze e centrifugado a 3000 rpm, 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi recolhido em tubos e completado o volume com tampão de extração, centrifugado a 100.000 g, 4° C por 30 min.. O precipitado foi ressuspenso em tampão contendo DTT (ditiotreitól) 2 mM e PMSF (fenilmetil sufonil fluoride) 2 mM. Esse material foi centrifugado em solução de sacarose duas fases, a inferior constituída de 46% e a superior de 30 %, a 100000 g, 4° C por 1,5 h com aceleração e desaceleração do rotor de 5. As bandas resultantes correspondentes a membranas plasmática na interface 30 /40 % do gradiente e tonoplasto foram separadas em alíquotas de 1 mL e armazenadas em nitrogênio líquido.

As frações obtidas pelo fracionamento foram quantificadas pelo método de Lowry [8] para proteínas e avaliadas a atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática para garantir que a fração estivesse enriquecida de membranas.

C. Preparação de [γ -³²P]ATP

A marcação de ATP com ³²P na posição γ foi realizada como o descrito por [9]. Brevemente, o procedimento

1. Doutora em Ciência do solo, analista ambiental da Fundação estadual do meio ambiente, av. Prudente de Moraes, Santa Lúcia, 1671, Belo Horizonte, MG, CEP:30380-000 : flaviat@feam.br

2. Professor Adjunto do Departamento de Ciência do solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Br.465 , Km 7, Seropédica, RJ, CEP23890-000.

3. Professor adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, BR-21941, Rio de Janeiro, RJ, CEP.21941-590

4. Aluna de pós-graduação em Biologia vegetal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627, Bloco I2, sala 254, Pampulha, Belo Horizonte, MG, CEP: 31270-901

5. Professor adjunto do Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade do Norte Fluminense, Av. Alberto lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, RJ, CEP.28013-600

Apoio financeiro: CAPES

consiste em promover a ligação covalente de ^{32}P i (ortofosfato radioativo) ao ADP, formando assim $[\gamma - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

D. Ensaio da atividade de lipídeos-cinases presentes nas membranas, extração de lipídeos e análise de $[\gamma - ^{32}\text{P}]\text{-lipídeos}$.

As membranas foram incubadas no meio utilizado para ensaios de fosforilação de lipídeos. O meio de reação (1 mL) continha Mes-Tris 30 mM (pH 7.0), MgCl_2 1,1 mM ou EDTA 1 mM para condições de livre Mg^{2+} , ouabaína 0,5 mM, NaN_3 10 mM, EGTA 0,5 mM, e 0,1 mg/mL de proteína de MBL. A reação foi iniciada com a adição de $[\gamma - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 1 mM (atividade específica $\approx 10^5$ cpm/nmol) ao meio e a incubação ocorreu a 37 °C. Após 20 min, a reação foi parada com a solução de extração, para dar início à etapa de extração dos lipídeos. As condições experimentais foram escolhidas para reproduzir os meios de reação empregados no estudo de reações de transporte iônico, potencialmente moduladas por lipídeos sinalizadores e seus precursores e metabólitos.

A extração de lipídeos totais foi realizada como descrita por [10]. Os lipídeos extraídos foram separados e analisados por cromatografia em camada fina (TLC) com corrida unidimensional em cromatoplasmas de sílica gel (60 F254, Merck), usando um sistema de solvente contendo clorofórmio: acetona: metanol: ácido acético: água (120:45:39:36:24; v/v) [10]. As cromatoplasmas foram previamente ativadas a 110 °C por 10 min, e todo o volume do extrato lipídico foi aplicado. Após a corrida e a evaporação completa dos solventes, um filme para raio X Kodak X-Omat foi exposto à cromatoplasma e o cassete mantido em freezer durante 72 h. Após este período, o filme foi revelado e a cromatoplasma exposta a vapores de iodo para a visualização dos fosfolipídeos. As áreas correspondentes ao ácido fosfatídico (PA) e ao fosfatidilinositol-4-fosfato (PtdIns(4)P), dois importantes lipídeos sinalizadores, eram marcadas na cromatoplasma, sobrepondo-a com o correspondente autorradiograma para delinear a área radioativa.

Para a quantificação da radiação presente na área dos lipídeos marcados, a sílica da região da cromatoplasma contendo o lipídeo foi cuidadosamente raspada com bisturi e colocada diretamente em vials, contendo solução cintiladora (POPOP:Tolueno; 4 g/L). A radiação foi, então, quantificada em cpm (cintilações por minuto) em um cintilador líquido.

Resultados

A Fig. 1 mostra o padrão de fosfolipídeos marcados com ^{32}P após fosforilação com $[\gamma - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$ e separação por TLC. O tratamento com Al diminuiu o nível de ácido fosfatídico (PA) nas duas cultivares, Caiapó apresentou 81 % do controle e IAC1289 apresentou 58 %, enquanto fosfatidil inositol - 4 - fosfato (PIP) foi afetado distintamente, nas membranas de Caiapó, ocorrendo um estímulo na marcação com fósforo de 32 % a mais, enquanto em IAC 1289 ocorreu um decréscimo induzido pelo Al, apresentando apenas 24 % do controle.

Ceramida -1- fosfato (C1P) apresentou um padrão similar a PIP, tendo um estímulo de 16% para Caiapó e um decréscimo para IAC 1289, apresentando valores de 37 % do controle (Tabela 1).

Discussão

PA pode ser gerado pela ativação de fosfolipases presentes na membrana plasmática, por um hormônio extracelular, por um elicitador patógeno ou, simplesmente, por resposta a um estresse físico [1, 2]. A formação de PA pode resultar tanto das atividades de PLC/DGK e/ ou PLD. Baseado no fato de que ^{32}P i oriundo do $[\gamma - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$ é lentamente incorporado aos fosfolipídeos estruturais, e está prontamente disponível para fosforilar diacilglicerol (DAG), PA, fosfatidil inositol (PI) e PIP para produzir seus respectivos derivados ^{32}P - marcados, diacil glicerol cinase (DGK) deve fosforilar DAG_{PLC} com o ^{32}P i, sendo então o PA formado pela via PLC.

As reduções nos níveis de PA podem, ser devido ao efeito de uma enzima ácido fosfatídico fosfatase (PAP) que gera DAG que pode, então, regular inúmeros eventos, como ativar PKC. A membrana plasmática de plantas contém DGK e PI cinase muito ativas e PIPcinase detectável produzindo PA, PIP e PIP_2 como produtos. Devido ao estresse que as membranas sofreram com o Al, é provável que o estoque de DAG oriundo da PLC já tenha sido fosforilado a PA antes do fornecimento de $[\gamma - ^{32}\text{P}]\text{ATP}$, portanto, os níveis de PA marcado com ^{32}P foram menores, além de ter sido usado para a síntese de DAG via PAP.

Outra justificativa para tais decréscimos nos níveis de PA seria pela ação da PLA_2 gerando ácido lisofosfatídico (LPA), cujo efeito estimulador da atividade da H^+ -ATPase tem sido mostrado [11]. Outra evidência da atividade da PLA_2 por Al vem do fato que produtos de sua atividade estimulam 1,3 β -D- glucan sintase [12], a enzima envolvida na síntese de calose, um marcador da sensibilidade ao Al em diversas espécies [13].

O aumento em PIP assim como ceramida -1-fosfato, apenas em Caiapó (cv. tolerante), pode estar associado a sua maior tolerância. Mesmo para PA, a cv. Caiapó mantém níveis mais elevados que IAC 1289. Sabe-se que PA é uma molécula envolvida na síntese de lipídeos membranares e, portanto, esta diferença pode somar a tolerância em Caiapó.

Em trabalho realizado por [14] foi verificado que a atividade da PLC em raízes de trigo foi fortemente inibida por Al, assim como a síntese de seu substrato PIP_2 , que é sintetizado a partir de PIP. Isto pode levar a efeitos profundos tanto na divisão celular, como alongamento celular, através do bloqueio do Ca^{2+} mediado por IP_3 necessário para a complementação dos eventos do crescimento celular, como pela interferência na dinâmica do citoesqueleto relacionada ao crescimento que depende da presença tanto de PIP_2 como de IP_3 . Em trigo (cv. tolerante) existe uma forte interação entre Al e componentes lipídicos da membrana plasmática, sendo notado uma maior interação com PIP_2 [15], este dado somado a outros de atividade enzimática desenvolvidos no mesmo trabalho, levaram os autores a sugerir que a

membrana plasmática e não os domínios de ligação enzimáticos seja o sítio mais provável de toxicidade de Al nas plantas. Esta possibilidade também não deve ser excluída no presente trabalho, pois o efeito do estresse por Al deve ser gerado por um conjunto de fatores, que se diferenciam com maior intensidade nas cultivares/espécies sensíveis.

Ainda que por uma via sinalizadora indefinida, o envolvimento de moléculas de lipídeos no estresse por Al foi nitidamente indicado pelos dados deste trabalho.

Agradecimentos

A CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- [1] MUNNIK, T. 2001. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends in Plant Science*, 6: 227-233.
- [2] KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, S. & SHINOZAKI, K. 2001. Involvement of a novel Arabidopsis phospholipase D, AtPLDg, in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signalling. *The plant Journal*, 26: 595-605.
- [3] XIONG, L.; SCHUMAKER, K.S. & ZHU, J. 2002. Cell signaling during cold, drought and salt stress. *The plant Cell*, supplement, 165-183.
- [4] MUNNIK, T.; VRIJJE, T.; IRVINE, R.F. & MUSGRAVE, A. 1996. Identification of diacylglycerol pyrophosphate as a novel metabolic product of phosphatidic acid during G-protein activation in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 15708-15715.
- [5] ZEL, J.; SVETEK, J.; CRNE, H. & SCHARA, M. 1993. Effects of aluminum on membrane fluidity of the mycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *Physiologia Plantarum*, 89: 172-176.
- [6] ZHANG, G.; SLASKI, J.J.; ARCHAMBAULT, D.J. & TAYLOR, G.J. 1997. Alteration of plasma membrane lipids in aluminum-resistant and aluminum-sensitive wheat genotypes in response to aluminum stress. *Physiologia Plantarum*, 99: 302-308.
- [7] MEMON, A. R. & BOSS, W. F. 1990. Rapid light-induced changes in phosphoinositide kinases and H⁺-ATPase in plasma membrane of sunflower hypocotyls. *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 14817-14821.
- [8] LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- [9] MAIA, J.C.C.; GOMES, S.L. & JULIANI, M.H. 1983. Preparation of (gamma-³²P) and (alpha-³²P)-nucleoside triphosphates with high specific activity, in: Genes and antigens of parasites, a laboratory manual proceedings. Rio de Janeiro, Editora Fundação Oswaldo Cruz. p.146-147.
- [10] HORWITZ, J. & PERLMAN, R.L. 1987. Measurement of inositol phospholipid-metabolism in PC12 pheochromocytoma cells. *Methods in Enzymology*, 141: 169-175.
- [11] MONK, B.C.; MONTESINOS, C.; LEONARD, K. & SERRANO, R. 1989. Sideness of yeast plasma membrane vesicles and mechanisms of activation of the ATPase by detergents. *Biochimica and Biophysica Acta*, 981(2): 226-234.
- [12] KAUSS, H. & JEBLICK, W. 1986. Influence of free fatty-acids, lysophosphatidylcholine, platelet-activating-factor, acylcarnitine, and echinocandin-B on 1,3-beta-D glucan synthase and callose synthesis. *Plant Physiology*, 80: 7-13.
- [13] HORST, W.J.; PÜSCHEL, A.K. & SCHMOHL, N. 1997. Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity in maize. *Plant and Soil*, 192: 23-30.
- [14] JONES, D.L. & KOCHIAN, L.V. 1995. Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: A role in aluminum toxicity? *Plant cell*, 7: 1913-1922.
- [15] JONES, D.L. & KOCHIAN, L.V. 1997. Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. *FEBS Letters*, 400:51-57.

Tabela 1. Quantificação de lipídeos fosforilados em membrana plasmática de células de raízes de arroz submetidas ao estresse por Al 80 µM por 48h.

| Cultivar /tratamento | Atividade enzimática (pmol) | | | % | | |
|----------------------|-----------------------------|------------------|-------|-----|------------------|-----|
| | PIP | C ₁ P | PA | PIP | C ₁ P | PA |
| Caiapó Controle | 45,1 | 22,2 | 187,7 | 100 | 100 | 100 |
| Caiapó Al 80 µM | 59,4 | 25,8 | 151,9 | 132 | 116 | 81 |
| IAC 1289 controle | 61,0 | 8,41 | 132,3 | 100 | 100 | 100 |
| IAC 1289 Al 80 µM | 14,9 | 3,11 | 76,5 | 24 | 37 | 58 |

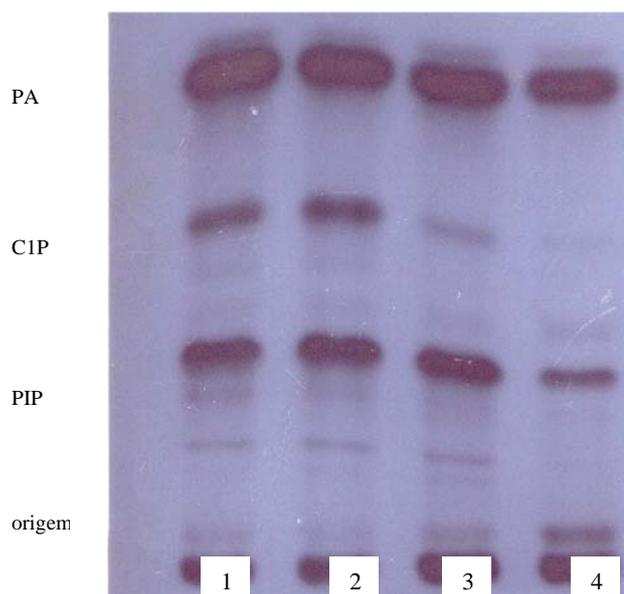


Figura 1. Autorradiograma de fosfolipídeos marcados com ³²P da fosforilação *in vitro* de membrana plasmática isolada do ápice de raízes de arroz cultivadas em AlCl₃ 80 µM por 48h. Caiapó controle (coluna 1), Caiapó Al (coluna 2), IAC 1289 controle (coluna 3), IAC 1289 Al (coluna 4), da esquerda para a direita.