

EXPRESSÃO DE GENES DE PROTEÍNAS QUINASES EM RESPOSTA À TOXIDEZ POR FERRO EM ARROZ

WOYANN, Leomar Guilherme.^{1*}; FINATTO, Taciane^{1,2}; MAIA, Luciano Carlos da¹; PICAULT, Nathalie²; COSTA DE OLIVEIRA, Antonio¹;

¹ Laboratório de Genômica e Fitomelhoramento, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. *Bolsista de Iniciação Científica/CNPq. leowoyann@gmail.com

² Laboratoire Génome et Développement des Plantes, Université de Perpignan Via Domitia

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos mais importantes cereais produzidos no mundo, alimentando dois terços da população mundial (IRRI, 2009). No Brasil, no ano de 2010, a produção foi estimada em 13,7 milhões de toneladas, sendo o estado do Rio Grande do Sul responsável por 63% desse total e cerca de 95% deste montante é produzido sob irrigação por inundação (CONAB, 2011).

A toxidez por ferro em plantas está associada à presença de elevadas concentrações de ferro reduzido (Fe^{2+}) na solução do solo, afetando a produção de arroz no sistema de cultivo irrigado por inundação. Os sintomas de toxidez por ferro são decorrentes da absorção excessiva de Fe^{2+} pelas raízes e sua translocação acrópeta para as folhas, onde ocorre estresse oxidativo, devido à elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são tóxicas e podem danificar os componentes estruturais celulares e prejudicar os processos fisiológicos (BECKER e ASCH, 2005).

O sintoma visual típico associado com a toxidez por ferro é um fenômeno chamado bronzeamento e está associado a significativas perdas na produção quando as constituições genéticas apresentam sensibilidade (YAMANOUCHI e YOSHIDA, 1981).

Os padrões de expressão gênica são alterados quando as plantas encontram quantidades excessivas de metais pesados. As proteínas quinases são a maior família de proteínas em eucariotos (MANNING et al., 2002), e são a chave da comunicação no controle intracelular, regulação e transdução de sinais. O mecanismo regulador inclui vários fenômenos que vão desde alterações químicas e estruturais das proteínas até o controle transcricional (SILVA et al. 2009). Nesse sentido, estas proteínas são importantes fatores na transdução de sinais tendo um papel central na aclimação de todos os organismos eucarióticos a mudanças ambientais (DIÉDHIU et al., 2008).

Proteínas quinases são enzimas que modificam outras proteínas quimicamente, por adição de grupos fosfato (fosforilação). Este processo, geralmente, resulta em uma alteração funcional da proteína-alvo (substrato), alterando a atividade enzimática, a localização celular, ou associação com outras proteínas (MANNING et al., 2002).

Baseado na especificidade do substrato, as proteínas quinases são divididas em três grupos: serina/treonina quinases, tirosina quinases e dual-específicas serina/treonina/tirosina quinases (HANKS et al., 1988). Dentre as proteínas quinases relatadas como transmissoras de sinais estão: proteína quinase dependente de cálcio (CDPK), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), *receptor-like* quinase (RLK), proteína quinase ribossomal e proteína de regulação da transcrição (XU et al., 2009).

A identificação de elementos sinalizadores envolvidos na adaptação das plantas a estresses é uma abordagem poderosa que pode auxiliar na identificação dos ativadores transcricionais para mecanismos de adaptação às mudanças ambientais e apresenta potencial para aumentar a tolerância a estresses em plantas cultivadas (DIÉDHIOU et al., 2008).

Com base nisto, este trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar genes codificadores de proteínas quinases super expressos em plântulas de arroz (*Oryza sativa* subsp. *japonica*) em resposta à toxidez por ferro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

No estudo foi utilizada a cultivar de arroz Nipponbare (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*), escolhida por apresentar genoma totalmente seqüenciado e com anotação gênica avançada (RAP 5). O experimento foi estabelecido em hidroponia, onde as sementes foram pré-germinadas e posteriormente transferidas para baldes contendo solução nutritiva completa, conforme descrito por Camargo e Oliveira (1981), em delineamento experimental completamente casualizado com três repetições. As plantas foram cultivadas nestas condições por quatorze dias, sendo que a solução nutritiva foi renovada aos sete dias. No décimo quarto dia, as plantas da solução controle foram trocadas para uma nova solução nutritiva completa com pH 5,5 e as plantas da solução tratamento foram trocadas para solução nutritiva completa adicionada de 7mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + EDTA com pH 4,5, permaneceram nesta solução durante quatro dias. Transcorrido esse período, procedeu-se a coleta das amostras.

A extração do RNA total foi realizada a partir de tecido foliar, utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen) conforme recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram purificadas com o kit RNeasy (Qiagen). Para hibridização no microarranjo foi realizada a síntese do cDNA (DNA complementar) a partir do RNA mensageiro, segundo o protocolo *Synthesis of Double-Stranded cDNA* (NimbleGen), utilizando o kit *SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis* (Invitrogen). Posteriormente o cDNA foi enviado para a NimbleGen, onde as três repetições de cada condição foram marcadas com o fluorocromo cianina 3 - cy3 (*single channel*) e hibridizadas com as sondas do microarranjo *Rice transposome array* v.2.0 (PICAULT et al., 2009) e produzido com a tecnologia NimbleGen™, este microarranjo contém 90.000 sondas representando 45.000 genes de *Oryza sativa* subsp. *japonica* (2 sondas/oligonucleotídeos por gene). A análise dos dados de expressão foi realizada utilizando o software R e os pacotes Limma e Biobase do software Bioconductor. Foi realizado o teste-t Bayesiano e o método de ajustamento por BH para identificar os genes diferencialmente expressos. A anotação da descrição dos genes foi realizada no banco de dados do RAP-DB versão 5, e a ontologia gênica foi realizada utilizando o programa Blast2GO (CONESA et al., 2005).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No microarranjo foram identificados 90 genes da família quinase sendo que o nível de expressão variou de 1 a 2,31 $\log_2\text{FC}$ (\log_2 *Fold change*) considerando $P \leq 0,05$. Os 90 genes representam 7,26 % dos 1.239 anotados para o genoma do arroz (subsp. *japonica*) segundo RAP 5. Na Tab. 1 estão indicados o número de genes encontrados em cada grupo de quinases de acordo com sua descrição.

Foram identificados 42 genes codificadores de proteínas que fosforilam resíduos de serina e treonina (Tab. 1), estas proteínas são responsivas a diferentes estresses em diferentes espécies, em arroz, Diédhiou et al. (2008) verificaram que a expressão induzida da quinase *SNF1-type serine-treonine*, *SAPK4* resultou no aumento da germinação, e desenvolvimento sob estresse salino tanto em plântulas quanto em plantas adultas.

Foram identificadas ainda, seis proteínas quinases associadas à parede celular (WAK), as quais foram identificadas como proteínas transmembrana RLKs que percebem o estímulo pelos seus domínios extracelulares e transmitem os sinais pela via domínio quinase citoplasmático. Em *Arabidopsis thaliana* Sivaguru et al. (2003) realizaram a super expressão do gene *WAK1* e constataram aumento da tolerância ao estresse por alumínio.

Tabela 1 - Descrição (*RAP Annotation* build 5) e número de genes da família quinase super expressos em resposta a toxidez por ferro em arroz. LGF, FAEM/UFPel, 2011.

Descrição Gênica	Nº de Genes	Descrição Gênica	Nº de Genes
<i>CDPK - Calcium-dependent protein</i>	2	<i>Pyruvate kinase</i>	1
<i>Dephospho-CoA kinase</i>	1	<i>Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3</i>	1
<i>Galactokinase</i>	1	<i>Serine/threonine-protein kinase</i>	42
<i>Kinase interaction 1</i>	1	<i>Shikimate kinase</i>	1
<i>Lectine-like receptor kinases</i>	5	<i>Similar to Protein kinase domain</i>	5
<i>MRK ou MAP3K</i>	3	<i>Similar to Receptor-like kinase</i>	9
<i>Orthophosphate dikinase precursor</i>	1	<i>SHR5-receptor-like kinase</i>	1
<i>Phosphofruktokinase</i>	1	<i>Tirosine</i>	5
<i>Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase</i>	2	<i>Uridylate kinase</i>	1
<i>Phosphoglycerate kinase</i>	1	<i>Wall-associated kinase-like/RLKs</i>	6

Outro gene RLK, *OsSIK1*, que apresenta regiões extracelulares ricas em repetições de leucinas foi clonado e caracterizado em arroz por Ouyang et al. (2010) que verificaram tolerância aos estresses por salinidade e seca quando foi induzida a super expressão do gene *OsSIK1* e, por outro lado, sensibilidade quando o mesmo gene foi silenciado.

Foram identificados ainda, dois genes codificadores de proteínas CDPKs, que são quinases sensíveis que se ligam ao Ca^{2+} , e que regulam à jusante componentes das vias de sinalização por cálcio. Estudos realizados por Asano et al. (2011) em arroz sob estresse salino, verificaram que a super expressão do gene *OsCPK21* está envolvida na regulação positiva das vias de sinalização para resposta a esta condição.

Entre as quinases super expressas (Tab. 1) destacam-se três genes de MAP quinases responsáveis por cascatas de sinalização intra e extracelular. Num estudo realizado por Tsai e Huang (2006) com raízes de arroz sob estresse por excesso de ferro foi identificada uma proteína MAPK de 42-kDa, que foi ativada pelo estresse oxidativo gerado pelo excesso de ferro.

4 CONCLUSÃO

Noventa genes da família quinase respondem ao estresse por toxidez de ferro em arroz, dentre estes, 42 codificam proteínas que fosforilam resíduos de serina e treonina. É importante destacar ainda, que os seis genes de quinases

associadas à parede celular super expressos neste estudo, são extremamente importantes no reconhecimento e ativação das cascatas de sinalização à jusante, e possivelmente sejam ativadas pelas espécies reativas de oxigênio formadas na presença de excesso de ferro.

5 REFERÊNCIAS

- ASANO, T.; HAKATA, M.; NAKAMURA, H. et al. Functional characterisation of OsCPK21, a calcium-dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice. **Plant Molecular Biology**, v.75, n.1-2, p.179-191, 2010.
- BECKER, M.; ASCH, F. Iron Toxicity – Conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.168, n.4, p.558-573, 2005.
- CAMARGO, C.E.O.; OLIVEIRA, O.F. Tolerance of wheat cultivars to different aluminum levels in nutrient solution and soil. **Bragantia**, v.49, p.21-23, 1981.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento - Acompanhamento de safra brasileira: grãos. Terceiro Levantamento, Brasília, janeiro 2011.
- CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v.21, p.3674-3676, 2005.
- DIÉDHIU, C.J.; POPOVA, O. V.; DIETZ, K.; GOLLDACK, D. The SNF1-type serine-threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene expression in rice. **BMC Plant Biology**, v.8, n.49, 2008.
- HANKS, S.K.; QUINN, A.M.; HUNTER, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. **Science**, v.241, n.4861, p.42–52, 1988.
- MANNING, G.; WHYTE, D.B.; MARTINEZ, R.; et al. The protein kinase complement of the human genome. **Science**, v.298, n.5600, p.1912–1934, 2002.
- OUYANG, S.; LIU, Y.; LIU, P.; LEI, G.; HE, S.; MA, B.; ZHANG, W.; ZHANG, J.; CHEN, S. Receptor-like kinase OsSIK1 improves drought and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*) plants. **The Plant Journal**, v.62, n.2, p.316–332, 2010.
- PICAULT, N.; CHAPARRO, C.; PIEGU, B.; et al. Identification of an active LTR retrotransposon in rice. **The Plant Journal**, v.58, p.754–765, 2009.
- RAP 5 (*Rice Annotation Genome Project Release 5*) <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/tools/blast/>
- SILVA, B. V.; HORTA, B. A. C.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, v.32, n.2, p.453-462, 2009.
- SIVAGURU, M.; EZAKI, B.; HE, Z.; TONG, H.; OSAWA, H.; BALUSKA, F.; VOLKMANN, D.; MATSUMOTO, H. Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.13, n.2, p.2256–2266, 2003.
- TSAI, T. M.; HUANG, H. J.; Effects of iron excess on cell viability and mitogen-activated protein kinase activation in rice roots. **Physiologia Plantarum**, v.127, n.4, p.583–592, 2006.
- XU, Z.; LIU, L.; NI, Z.; et al. W55a Encodes a novel protein kinase that is involved in multiple stress responses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.51, n.1, p.58–66, 2009.
- YAMANOUCHI, M.; YOSHIDA, S. Physiological mechanisms of rice's tolerance for iron toxicity. The International Rice Research Institute, Manila, Philippines. 1981.