



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

*Instituto de Química de São Carlos*



ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DO

*Bradyrizobium elkanii* (SEMIA 587)

**Ana Paula de Oliveira Sader**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências (Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

**São Carlos**

**2008**

Dedico este trabalho a meus pais, **JAMIL e MAGUITA**, por quem tenho grande amor e profunda admiração. Agradeço o apoio irrestrito e as oportunidades que na vida me proporcionaram...

Dedico também à nossa amada família **ANDRÉ**, nosso pequeno **VINÍCIUS**, meus irmãos **CRISTIANE** e **PAULO TADEU**, meus cunhados **NETO** e **REGINA**, e nossas crianças, que tornam a vida muito mais alegre e feliz!

## **AGRADEÇO...**

Ao **Prof. Dr. Emanuel Carrilho** pela disposição em me orientar. Ofereço meu respeito e profunda admiração.

Às funcionárias da seção de pós-graduação do IQSC, **Silvia e Andréa**, por tornarem as coisas sempre mais simples.

À **Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos**, pela carinhosa amizade e pela confiança ao permitir que eu fizesse parte da “sua grande família”, o LBMP.

Ao **João Carlos** pela agradável companhia e por todos os ensinamentos sobre o “mundo dos microrganismos”.

Ao **Jackson**, pela partilha dos ensinamentos e divertidos momentos na condução dos experimentos com a soja.

A **Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli**, pela confiança e oportunidade na concretização de mais um projeto de vida.

Ao **Sr. Orlando**, companheiro de trabalho, pelas inúmeras vezes em que se desdobrou para me dar tranquilidade na condução das atividades pertinentes a esta tese.

À amiga **Izabelle**, pela ajuda nos momentos mais difíceis e nos mais divertidos também.

Aos Profs. **Dr. Lewis Joel Greene e Dr. José César Rosa**, por terem mantido as portas sempre abertas.

A **Helen** pela longa amizade e, ao **André e Vanessa**, pelo começo de uma longa amizade.

Aos responsáveis pelo Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pelas oportunidades concedidas na realização das análises.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE REAGENTES.....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 A cultura da soja.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Fixação biológica do nitrogênio (FBN).....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Análise proteômica aplicada à bactérias.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>14</b>
<b>3. Experimental.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Obtenção dos organismos.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.1 Bactéria.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.1.1 Curva de crescimento da bactéria.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.1.2. Cultivo da bactéria.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.2. Bacterióide.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.2.1. Extração dos bacterióides.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</b>	<b>17</b>

<b>4. Resultados e discussão.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1. Obtenção dos organismos.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1.1 Bactéria.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1.1.1 Curva de crescimento da bactéria.....</b>	<b>19</b>
<b>4.1.2 Bacterióide.....</b>	<b>20</b>
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>23</b>
 <b>CAPÍTULO 2 – OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS</b>	
<b>1. Introdução.....</b>	<b>24</b>
<b>1.1 Métodos de extração de proteínas.....</b>	<b>24</b>
<b>1.2 Métodos de quantificação de proteínas.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3 Eletroforese bidimensional.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.1 Primeira dimensão: focalização isoeétrica (IEF).....</b>	<b>27</b>
<b>1.3.2 Segunda dimensão: separação por tamanho (SDS-PAGE)</b>	<b>27</b>
<b>1.3.3 Métodos de detecção de proteínas em géis.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4 Análise da imagem de gel bidimensional.....</b>	<b>28</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>30</b>
<b>3. Experimental.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Métodos de extração de proteínas (bactéria e bacterióide</b>	
<b>isolado de plantas de soja com 35 dias).....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.1 Método 1.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.2 Método 2.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.3 Método 3.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.4 Método 4.....</b>	<b>32</b>

3.2	Quantificação de proteínas.....	32
3.3	Eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE).....	33
3.4	Eletroforese bidimensional (bactéria e bacterióide isolado de plantas de soja com 35 dias).....	33
3.4.1	Focalização isoeétrica.....	34
3.4.2	SDS-PAGE.....	34
3.4.3	Visualização dos spots.....	35
3.5	Método de extração de proteína (bactéria e bacterióide isolado de plantas de soja com 30 dias).....	36
3.6	Eletroforese bidimensional (bactéria e bacterióide isolado de plantas de soja com 30 dias).....	37
3.6.1	Focalização isoeétrica.....	37
3.6.2	SDS-PAGE.....	37
3.6.3	Análise da imagem de gel bidimensional.....	38
4.	Resultados e Discussão.....	38
4.1	Métodos de extração de proteínas (bactéria e bacterióide 35 dias).....	38
4.2	Métodos de quantificação de proteínas.....	41
4.3	Eletroforese bidimensional.....	42
4.3.1	Bactéria e bacterióide 35 dias.....	42
4.3.2	Bactéria e bacterióide 30 dias.....	43
5.	Conclusões.....	51
<b>CAPÍTULO 3 – IONIZAÇÃO/DESSORÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ (MALDI)</b>		
1.	Introdução.....	53
1.1	Ionização/dessorção à laser assistida por matriz – MALDI.....	53



1.2 Analisador de massas Tempo de Vôo – ToF.....	54
1.3 Identificação de proteínas por <i>peptide mass fingerprinting</i> - PMF.....	55
1.4 Identificação de proteínas por MS/MS.....	56
1.5 Busca em bancos de dados.....	57
2. Objetivos.....	58
3. Experimental.....	59
3.1 Descoloração dos spots.....	59
3.2 Desidratação dos spots.....	59
3.3 Digestão enzimática.....	59
3.4 Extração dos peptídeos.....	60
3.5 Dessalinização dos peptídeos ( <i>Zip-Tip</i> ).....	60
3.6 Espectrometria de massas (MALDI-QToF).....	61
3.7 Busca no banco de dados MASCOT.....	61
4. Resultados e Discussão.....	63
4.1 Espectrometria de massas – MALDI-QToF.....	63
5. Conclusões.....	77

## **CAPÍTULO 4 – TECNOLOGIA MULTIDIMENSIONAL DE IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS (MudPIT)**

<b>1. Introdução.....</b>	<b>79</b>
<b>1.1 Multidimensional protein identification MudPIT).....</b>	<b>79</b>
<b>1.2 Ionização por electrospray (ESI).....</b>	<b>81</b>
<b>1.3 Analisador de massas quadrupolar (Q).....</b>	<b>82</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>82</b>
<b>3. Experimental.....</b>	<b>83</b>
<b>3.1 Digestão trípica em solução.....</b>	<b>83</b>
<b>3.2 Dessalinização do digesto trípico.....</b>	<b>83</b>
<b>3.3 Fracionamento das amostras em HPLC.....</b>	<b>84</b>
<b>3.4 Espectrometria de massas (ESI-QToF).....</b>	<b>85</b>
<b>3.5 Busca em Banco de dados (MASCOT).....</b>	<b>85</b>
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>86</b>
<b>4.1 Espectrometria de massas (ESI-QToF).....</b>	<b>86</b>
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>97</b>

**LISTA DE FIGURAS**

	pág.
<b>Figura 1.1</b> Estágios da iniciação e desenvolvimento de um nódulo em raíz de soja.	9
<b>Figura 1.2</b> Plantas de soja (CODETEC, CD-208), com 30 dias. Não inoculada (esquerda) e inoculada (direita) com <i>B. elkanii</i> (SEMIA 587).	10
<b>Figura 1.3</b> Microscopia eletrônica de varredura da amostra de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> (SEMIA 587). Aumento da imagem = 5.000 vezes.	18
<b>Figura 1.4</b> Curva de crescimento do <i>Bradyrhizobium elkanii</i> (SEMIA 587) em meio de cultura YMB.	19
<b>Figura 1.5</b> Microscopia eletrônica de varredura da amostra de bacterióide. Aumento da imagem = 6.000 vezes.	21
<b>Figura 2.1.</b> Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) de proteínas extraídas respectivamente da bactéria do <i>Bradyrhizobium elkanii</i> (SEMIA 587) (bandas 1-4) e do bacterióide (bandas 5-8) (plantas de soja com 35 dias), empregando-se os métodos de extração de Mehta, Smolka, Bestel e Nandakumar.	39
<b>Figura 2.2.</b> Gel bidimensional de proteínas da amostra de bactéria ( <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , SEMIA 587) obtido pelo processo de extração de Mehta (2001).	44
<b>Figura 2.3.</b> Gel bidimensional de proteínas da amostra de bacterióide (35 dias) obtido pelo processo de extração de Mehta (2001).	45
<b>Figura 2.4.</b> Gel bidimensional de proteínas da amostra de bactéria ( <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , SEMIA 587) obtido pelo processo de extração de Sarma (2005).	46

	pág.
<b>Figura 2.5.</b> Gel bidimensional de proteínas da amostra de bacterióide (plantas de soja com 30 dias) obtido pelo processo de extração de Sarma (2005).	47
<b>Figura 3.1.</b> Página da web de acesso ao Mascot, onde foram estabelecidos os parâmetros que orientaram as buscas no banco de dados.	62
<b>Figura 3.2.</b> Espectro de PMF obtido por Maldi-QToF referente ao spot no. 760 da amostra de bactéria ( <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , SEMIA 587).	69
<b>Figura 3.3.</b> Espectro de MS/MS obtido automaticamente por Maldi-QToF referente ao spot no. 760 ( $m/z$ 1495) da amostra de bactéria.	69
<b>Figura 3.4.</b> Espectro de PMF obtido por Maldi-QToF referente ao spot no. 973 da amostra de bacterióide.	70
<b>Figura 3.5.</b> Espectro de MS/MS obtido automaticamente por Maldi-QToF referente ao spot no. 973 ( $m/z$ 1306) da amostra de bacterióide.	70
<b>Figura 4.1.</b> Espectro de MS obtido por ESI-QToF, referente a uma fração (no. 79) da amostra de bactéria ( <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , SEMIA 587)	87
<b>Figura 4.2.</b> Espectro de MS/MS obtido automaticamente por ESI-QToF, referente à fração no. 79 ( $m/z$ 698) da amostra de bactéria.	87
<b>Figura 4.3.</b> Espectro de MS obtido por ESI-QToF, referente a uma fração (no. 111) da amostra de bacterióide.	88
<b>Figura 4.4.</b> Espectro de MS/MS obtido automaticamente por ESI-QToF, referente à fração no. 111 ( $m/z$ 618) da amostra de bacterióide.	88

**LISTA DE TABELAS**

	pág.
<b>Tabela 1.1</b> Produção mundial de soja e a contribuição dos três maiores produtores mundiais em anos recentes.	4
<b>Tabela 1.2</b> Balanço mundial de oferta e demanda de soja.	6
<b>Tabela 2.1.</b> Rendimento dos procedimentos de extração de proteínas avaliados para as amostras de bactéria e bacterióide.	40
<b>Tabela 2.2.</b> Teor de proteína das amostras de bactéria e bacterióide empregando-se diferentes métodos de quantificação.	41
<b>Tabela 3.1.</b> Descrição das proteínas identificadas (Mascot) por Maldi-QToF, referentes à amostra de bactéria ( <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , SEMIA 587).	65
<b>Tabela 3.2.</b> Descrição das proteínas identificadas (Mascot) por Maldi-QToF, referentes à amostra de bacterióide.	66
<b>Tabela 3.3.</b> Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot no. 760 da amostra de bactéria ( <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , SEMIA 587), submetida à análise por Maldi-QToF.	67
<b>Tabela 3.4.</b> Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot no. 973 da amostra de bacterióide, submetida à análise por Maldi-QToF.	68
<b>Tabela 4.1.</b> Programação empregada na eluição dos peptídeos por cromatografia líquida de troca catiônica.	84
<b>Tabela 4.2.</b> Proteínas identificadas por MudPIT – ESI-QToF da amostra de Bactéria ( <i>B.elkanii</i> , SEMIA 587).	89
<b>Tabela 4.3.</b> Proteínas identificadas por MudPIT – ESI-QToF da amostra de Bacterióide.	93

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>pl</b>	<b>Ponto isoelétrico</b>
<b>MS</b>	<b>Mass spectrometry (Espectrometria de massas)</b>
<b>HPLC</b>	<b>High performance liquid chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)</b>
<b>2D-E</b>	<b>Two-dimensional electrophoresis (Eletroforese bidimensional)</b>
<b>SDS PAGE</b>	<b>poliacrylamide gel electrophoresis –sodium dodecil sulfate (Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida – dodecilsulfato de sódio)</b>
<b>2D PAGE</b>	<b>Bidimensional poliacrylamide gel electrophoresis (Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida)</b>
<b>pH</b>	<b>Potencial hidrogeniônico</b>
<b>SEMIA</b>	<b>Seção de microbiologia agrícola</b>
<b>RNA</b>	<b>Ácido ribonucleico</b>
<b>DNA</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico</b>
<b>MM</b>	<b>Massa molecular</b>
<b>Maldi</b>	<b>Matrix-assisted laser desorption ionization (Ionização/dessorção a laser assistida por matriz)</b>
<b>ToF</b>	<b>Time-of-flight (Tempo de vôo)</b>
<b>Th</b>	<b>Thomson</b>
<b>PMF</b>	<b>Peptide mass fingerprinting</b>
<b>CID</b>	<b>Dissociação induzida por colisão</b>
<b>Q</b>	<b>Quadrupolo</b>
<b>LNLS</b>	<b>Laboratório Nacional de Luz Síncrotron</b>

<b>YML</b>	<b>Yeast mannitol liquid</b>
<b>YMB</b>	<b>Yeast mannitol broth</b>
<b>MEV</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura</b>
<b>FBN</b>	<b>Fixação biológica do nitrogênio</b>
<b>YMA</b>	<b>Yeast mannitol ágar</b>
<b>PVPP</b>	<b>Polivinilpolipirrolidona</b>
<b>2D</b>	<b>Eletroforese bidimensional</b>
<b>IEF</b>	<b>Focalização isoeétrica</b>
<b>DO</b>	<b>Densidade ótica</b>
<b>IPG</b>	<b>Immobilized pH gradient (gradiente de pH imobilizado)</b>

## LISTA DE REAGENTES

Reagentes/Solventes	Procedência
Acetato de amônio	Synth
Acetona	Mallinckrodt
Acetonitrila	Mallinckrodt
Ácido acético	Mallinckrodt
Ácido cítrico	Merck
Ácido clorídrico	Merck
Ácido etilenodiamintetracético (EDTA)	AmResco
Ácido fórmico	Mallinckrodt
Ácido fosfórico	Merck
Ácido tricloroacético	Mallinckrodt
Ácido trifluoroacético	Mallinckrodt
Acrilamida	Pharmacia Biotech
Ágar	Merck
Álcool etílico	Merck
Anfólitos	GE Healthcare
Azul de bromofenol	Sigma
Bicarbonato de amônio	Synth
Bis-acrilamida	Bio-Rad
Carbonato de sódio	J T Baker
3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]- 1-propanosulfonato (CHAPS)	GE Healthcare



---

Reagentes/Solventes	Procedência
Cloreto de magnésio	Sigma
Cloreto de potássio	Synth
Cloreto de sódio	USB
Coomassie Brilliant Blue G	Pharmacia Biotech
Ditiotreitol (DTT)	GE Healthcare
Dodecil sulfato de amônio (SDS)	Sigma
Extrato de levedura	AmResco
Fenol	GE Healthcare
Fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF)	Sigma
Fosfato monoácido de potássio	Synth
Hidróxido de sódio	Synth
Iodoacetamida	GE Healthcare
Manitol	Carlo Erba
Mercaptoetanol	Riedel-de-Haën
Metanol	Merck
Polivinilpolipirrolidona	Sigma
Sacarose	Carlo Erba
Sulfato de cobre	Merck
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	Synth
Tartarato de sódio e potássio	Merck
Tiouréia	Riedel-de-Haën
Tripsina	Promega
Tris-Base	J T Baker

---

---

Reagentes/Solventes	Procedência
Tris-HCl	Life Technologies
Triton X-100	Pharmacia Biotech
Uréia	GE Healthcare

---

Resumo

## **RESUMO**

Este trabalho teve como objetivo principal realizar um estudo proteômico diferencial aplicado à amostra *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587). Isso se fez através da identificação de proteínas diferencialmente expressas nesta importante bactéria fixadora de nitrogênio quando cultivada em laboratório (*in vitro*) e quando inoculada em plantas de soja (*in vivo*). A caracterização das proteínas foi feita com a poderosa técnica de espectrometria de massas, e a análise proteômica com expressão diferencial foi comparada por meio de duas estratégias diferentes: MudPIT e Maldi-QToF.

A avaliação das imagens dos géis bidimensionais permitiu verificar que a amostra de bactéria apresentou um número maior de proteínas expressas em relação ao bacterióide. Se comparada ao microrganismo na condição *in vitro* (bactéria), a espécie fixadora de nitrogênio (bacterióide) apresentou 19 proteínas induzidas e 230 reprimidas. O aumento de expressão observado para as proteínas do bacterióide foi pelo menos duas vezes maior do que o volume normalizado para 17 proteínas e, caiu pela metade (ou mais), para outras 26 proteínas em relação a bactéria.

Através de ambas as técnicas (Maldi-QToF e ESI-QToF) empregadas na identificação das proteínas observou-se, comprovando a complementariedade existente entre as metodologias, que os padrões metabólicos tanto em bactéria como bacterióide foram mantidos. Ou seja, bactérias cultivadas em meio YML apresentaram um metabolismo voltado para a síntese celular, denotada pela produção de macromoléculas e metabolismo energético, ao passo que bacterióides, endosimbiontes isolados de nódulos de plantas de soja, apresentaram um metabolismo especialmente dedicado à fixação simbiótica do nitrogênio.

Os resultados mostraram-se condizentes com o meio de cultivo de onde foram obtidos os organismos estudados. As proteínas identificadas para a bactéria,

relacionadas às funções de tradução e biossíntese de aminoácidos, denotam a necessidade deste microrganismo heterotrófico em produzir proteínas e enzimas necessárias para o seu metabolismo.

Por outro lado, quanto ao bacterióide, uma vez que a sua subsistência advém da simbiose com a planta, é de se esperar que suas proteínas estejam relacionadas com a FBN e com o metabolismo energético.

**Abstract**

## **ABSTRACT**

The main goal of this project was to perform a differential proteomic analysis of *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587). It was made by the identification of differentially expressed proteins in this important nitrogen fixing bacteria grown under different conditions: in laboratory culture (*in vitro*) and symbiotically associated with soybean plants (*in vivo*). The characterization of proteins differentially expressed was done by the powerful technique of mass spectrometry, applying two different strategies: MudPIT and Maldi-QToF.

It was possible, after computerized image analysis of 2D gels, to verify that bacteria had more expressed proteins than bacteroids. *In vivo* bacteria showed 19 proteins induced and 230 suppressed. The increase in expression observed for bacteroids macromolecules was at least two times greater than normalized volume for 17 proteins of the bacteria and two times smaller than 26 bacteria proteins.

It was also observed, through Maldi-QToF and ESI-QToF techniques applied to protein identification, that bacteria and bacteroid main metabolic activities were maintained. This fact confirms that the techniques were complementary. The data showed that bacteria cultivated in YML medium had a metabolism direct to cellular synthesis, characterized by production of macromolecules and energetic metabolism. Endosymbiont bacteroids isolated from soybean nodules showed a metabolism specially dedicated to nitrogen fixation.

The results were in agreement with the ambient that each microorganism was originated. The fact that the identified proteins in bacteria were related to translation and aminoacids biosynthesis shows the need that heterotrophic microorganisms have to synthesize its own proteins and enzymes useful for their metabolism. On other hand, since the bacteroids are symbiotically associated with soybean reducing atmospheric

nitrogen in an extremely energy-intensive process, it is expected that its proteins should be mainly related to biological nitrogen fixation and energetic metabolism.



# Capítulo 1

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 A Cultura da Soja**

Desde tempos imemoriais, quando surgiram as sociedades primitivas e economicamente extrativistas, até a atualidade da história econômica e social, em que o ser humano vive o dinamismo das comunidades virtuais, desfruta da era da prestação de serviços, da biotecnologia e da transgenia, a atividade de produzir alimentos e matérias primas agrícolas e florestais ocupa o centro de suas atenção e preocupações.

A agricultura geral é, tradicionalmente, o segmento econômico responsável pela produção de excedentes que viabilizam a acumulação de capital e liberam renda e trabalhadores para os demais setores da economia.

Durante sua trajetória sobre o planeta, as sociedades viveram momentos de muita tensão com relação à possibilidade de escassez de alimentos dado o descasamento entre o crescimento, em progressão geométrica, da população e o crescimento aritmético da produção de alimentos.

Foi no pós 2<sup>a</sup> Guerra que a escassez de alimentos e matérias primas se fez sentir mais intensamente, tanto nos países centrais como nos países periféricos, subdesenvolvidos e ex-colônias da Ásia e África. Neste momento é que os países desenvolvidos, em especial os Estados Unidos, começam a pesquisar e implementar uma série de medidas e práticas de produção e gestão agrícola que foram chamadas de “A Revolução Verde” (WIKIPEDIA).

Com o objetivo de incrementar fortemente a produção agrícola iniciou-se um ciclo de inovações que abrangia o uso extensivo de fertilizantes e agrotóxicos, mecanização e intensificação do uso de tecnologias no plantio, na irrigação e na colheita, diminuindo

o custo do manejo. Tudo com a promessa de resolução do problema da fome nos países em desenvolvimento.

Em vários países periféricos o surto de desenvolvimento agrícola foi excepcional e promoveu, inclusive, alterações profundas na sua estrutura agrária.

O Brasil também foi beneficiário deste movimento mundial, dadas suas características geográficas, de clima e solo, extensões de terra agricultável, tradição em produzir commodities agro-pastoris e florestais, e o empenho de instituições privadas, agências governamentais, como a EMBRAPA, e Universidades que, a par do desenvolvimento de tecnologia própria, adaptaram técnicas e conceitos estrangeiros à realidade do país. Encontram-se nesta onda de criação e disseminação de tecnologia, as raízes do alargamento vertiginoso das fronteiras agrícolas do país e do alcance de recordes de produção e exportação de produtos como a soja, o milho, o algodão, a carne bovina e de frango, entre outros.

Neste contexto é que tem início, a implantação e ampla difusão da grande lavoura de soja no país, até alcançar a destacada posição econômica que ocupa nos dias correntes, no PIB brasileiro e na divisão do mercado internacional agrícola. Os números do Complexo Soja no Brasil são muito exuberantes e cresceram vertiginosamente.

O incremento da demanda mundial por oleaginosas e fontes de proteína vegetal que serão transformadas em proteína animal de maior valor agregado, e, portanto, mais cara, foi determinante para o desenvolvimento verificado no complexo soja que, mediante esforço de criação de cultivares adaptados ao solo e ao clima das diferentes regiões brasileiras, passou a ocupar, em todas elas, posição de destaque nas suas economias. Aí tem-se a dimensão econômica e social que a cultura da soja e a indústria a ela subjacente assumiram no cenário nacional.

Em 1949 o Brasil aparece, pela primeira vez, nas estatísticas internacionais com a exportação de 18.000 t de grãos. Já em 2003, conforme dados do IBGE, o complexo soja (grãos, farelo e óleo) tem o Brasil na sua liderança mundial, com exportações no valor de US\$8,1 bilhões, 31% acima do valor alcançado em 2002, e como segundo maior produtor do planeta atrás dos Estados Unidos (IBGE).

No ano de 2005, as exportações totais brasileiras atingiram a cifra de US\$118 bilhões, FOB, conforme dados da SECEX do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior sendo, deste total, US\$9,477 bilhões relativos à exportações do complexo soja, equivalente a 8% do total da pauta de exportações nacionais.

Considerando-se o intervalo de doze safras, entre 1990/1991 e 2002/2003, verifica-se o salto, mais que triplicado, na produção, de 15,3 milhões de toneladas para 52 milhões de toneladas graças, entre outros fatores, a elevados ganhos de produtividade.

A recente entrada da China na OMC – Organização Mundial de Comércio - e sua voracidade para consumir matérias primas em geral, e alimentos em particular, são fatores que, a despeito de elevarem os preços internacionais e provocarem desequilíbrio no balanço de comércio do produto, impulsionam a produção brasileira.

Surgem no horizonte, ainda, aceleradores de demanda para a soja nacional tais como, o programa nacional de biocombustíveis e, mais especificamente, o biodiesel (CÂMARA, 2006). Na esteira do ecologicamente sustentável e correto, um óleo combustível produzido a partir de fontes alternativas ao petróleo e renováveis, como a soja e outras oleaginosas será, por lei, adicionado à proporção de 2%, ao óleo diesel convencional a partir de janeiro de 2008. Em 2013 essa proporção passará a 5%. Embora nenhuma planta oleaginosa tenha condição de exclusividade no atendimento às demandas do Programa de Biodiesel, por suas características agrônômicas,

químicas, econômicas e de produção, o lugar ocupado pela cultura da soja certamente será de destaque.

No boletim setorial do BNDES, n.20, p. 127-222, set.2004, ao avaliar o desempenho da cultura da soja entre 1961 e 2003, ressalta-se que a produção nascente de biodiesel mais a expectativa de aumento da demanda derivada do complexo de carnes associado a possíveis aumentos de consumo humano direto, mostra a existência de muito espaço para aumentos significativos da produção mundial destacando-se, aí, a participação do Brasil em conjunto com os Estados Unidos e a Argentina (BNDES). Na Tabela 1.1, constam dados de produção das seis últimas safras de cada um dos três principais produtores e exportadores de soja e sua participação relativa.

**Tabela 1.1.** Produção mundial de soja e a contribuição dos três maiores produtores mundiais em anos recentes.

Produção	Mundo	Estados Unidos	% mundo	Brasil	% mundo	Argentina	% mundo
Ranking		1°		2°		3°	
2000	161.406	75.055	47	32.735	20	20.200	13
2001	177.937	78.671	44	39.058	22	26.864	15
2002	181.736	75.010	41	42.769	24	30.180	17
2003	190.596	66.778	35	52.018	27	34.800	18
2004	206.462	85.013	41	49.793	24	31.500	15
2005	214.347	83.999	39	52.700	25	38.300	18

(Mil toneladas)

Fonte: FAO – Food and Agriculture Organization ([www.fao.org](http://www.fao.org)).

Lembrando que, enquanto os EUA e a Argentina possuem limitações para expansão da área cultivada, o Brasil possui uma área para cultivo disponível equivalente à atual área destinada ao cultivo da soja existente no país. É possível mais que duplicar a produção nacional e se tornar líder isolado na produção e exportação mundiais, podendo-se antever a ampliação da importância do ciclo da soja para a economia brasileira nas próximas décadas.

Ainda segundo o Boletim do BNDES, está evidente a enorme contribuição que a soja deu para o desenvolvimento econômico e agrário das regiões sul e sudeste, a imprescindibilidade para a ocupação e crescimento do centro-oeste e, no nordeste, onde seu cultivo surgiu nas últimas décadas, é vista como opção capaz de transformar grande parte do território regional, o oeste nordestino, em celeiro de grãos para o país e para o mercado mundial.

Há que se lembrar ainda que, após o inegável sucesso da Revolução Verde ela vem perdendo, técnica e ecologicamente, as condições de manter o ritmo de crescimento das produções agrícolas necessário para atender à demanda mundial por alimentos e matérias primas. Surgem vozes que clamam por uma “Segunda Revolução Verde” que revigore a produtividade estagnada de culturas baseadas em variedades uniformes, em práticas ambientalmente prejudiciais, que tem esgotado e contaminado os solos pelo seu esgotamento estrutural e contaminação química decorrente do uso excessivo de fertilizantes e herbicidas.

Na Tabela 1.2 verifica-se a pressão que o consumo tem feito sobre a produção total e sobre os estoques de passagem, ao longo das safras, fator determinante para aumento de preços e incremento de produção.

**Tabela 1.2.** Balanço mundial de oferta e demanda de soja<sup>1</sup>.

Ano	Estoque inicial	Produção	Importação	Exportação	Consumo	Estoque final
2000	30.901	175.998	53.157	53.871	171.935	34.250
2001	34.250	185.094	54.515	53.437	184.752	35.670
2002	35.670	197.033	63.167	61.197	191.585	43.088
2003	43.088	186.770	54.314	55.821	189.747	38.604
2004	38.604	215.954	63.730	64.648	205.414	48.226
2005 - 2	48.226	219.493	64.356	65.304	214.258	52.513
2006 - 3	52.513	217.738	69.101	69.233	220.149	49.970

(mil toneladas)

Fonte: USDA (www.fas.usda.gov/psd).

Notas:

<sup>1</sup> As estimativas do Brasil e da Argentina foram ajustadas para outubro/setembro, para os demais países é utilizado o ano comercial local.<sup>2</sup> Preliminar.<sup>3</sup> Previsão.

A pesquisa brasileira já foi pioneira na conquista da produtividade pelo uso racional da natureza, antes mesmo que o “ecologicamente correto” estivesse em voga. Em 1964, teve início o programa brasileiro de melhoramento da soja, influenciado, como tantas outras pesquisas nas regiões tropicais, pelos trabalhos de Johanna Döbereiner tendo representado, na época, uma quebra de paradigma (EMBRAPA). Afinal, este processo de melhoramento da soja desenvolveu-se no sentido inverso ao da orientação vigente nos EUA, maior produtor mundial de soja, que elaborava tecnologias de produção apoiadas no uso intensivo de adubos nitrogenados.

A proposta estudada por Döbereiner permitia que a soja gerasse seu próprio adubo, através de uma simbiose com bactérias do gênero *rhizobium*.

## 1.2 Fixação biológica do nitrogênio

Em razão da constituição de seus grãos, a soja [*Glycine max* (L.) Merrill], família *Fabaceae* (DELORIT E GUNN, 1986) representa uma fonte natural de proteínas e óleo vegetal, de onde se extrai grande diversidade de derivados, como o óleo, farinha, leite e outros produtos alimentícios. O elevado teor protéico característico de seus grãos (cerca de 40%), torna sua cultura exigente em relação ao índice de nitrogênio requerido para o seu desenvolvimento. Esta exigência está relacionada com a síntese de aminoácidos, os elementos construtores das proteínas.

Como fotoautótrofa, a soja tem seu crescimento tipicamente limitado pela disponibilidade de nitrogênio - um importante nutriente, que atua como precursor de uma série de outros compostos constituintes da planta, como os ácidos nucléicos, cofatores, e outros metabólitos comuns; além de ser o principal componente da molécula de clorofila.

Para suprir esta necessidade, são requeridas doses intensas de nitrogênio para as plantas, o que pode ser feito através do emprego de fertilizantes nitrogenados. No entanto, quando administrados, observa-se uma baixa eficiência de utilização por parte da planta destes fertilizantes. Isso se dá devido às perdas elevadas que ocorrem, particularmente, por lixiviação do solo e desnitrificação.

Paradoxalmente, o nitrogênio é um elemento que ocorre abundantemente na atmosfera terrestre, sob a forma de  $N_2$ , representando cerca de 80% de sua constituição. Entretanto, sua absorção por organismos eucariotos como as plantas, torna-se inviável em virtude da estabilidade desta molécula gasosa, inerente aos compostos com triplas ligações.



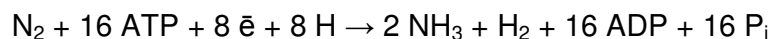
---

Em contrapartida, certos procariotos quando associados simbioticamente às plantas de soja, são capazes de catalisar a redução enzimática do nitrogênio atmosférico à amônia tornando-o assim, absorvível pelas plantas. Este processo biológico, conhecido por Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), consiste na associação endosimbiótica de bactérias da família Rhizobiaceae com plantas da família Leguminosae.

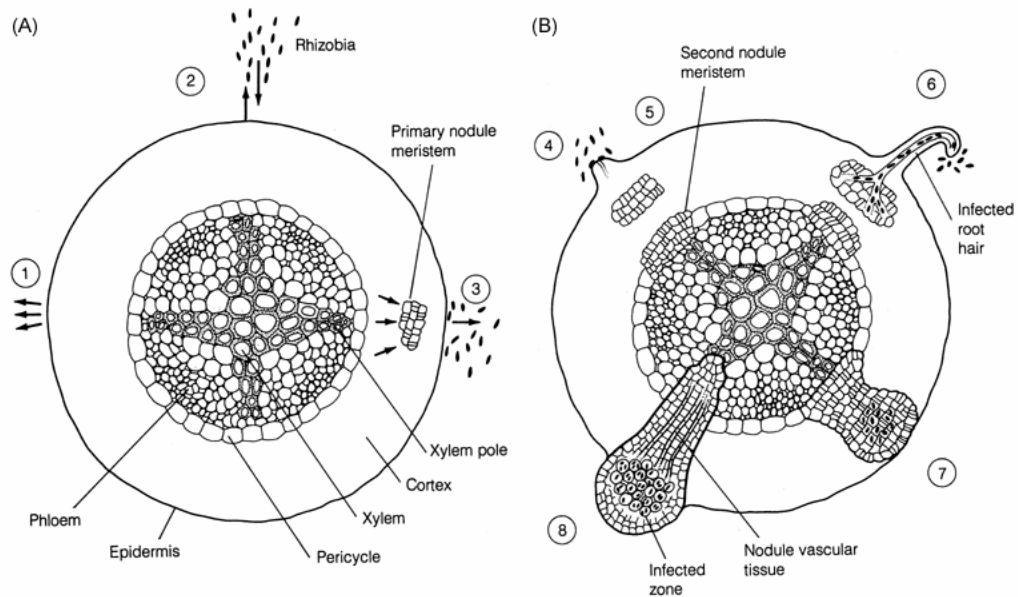
Neste evento simbiótico, as bactérias são atraídas para as raízes da leguminosa por um quimiotactismo positivo devido à ação de flavonóides liberados pela planta hospedeira. Através de seus pêlos radiculares, as bactérias penetram nos tecidos da raiz, provocando a formação de uma estrutura celular diferenciada; o nódulo, que se constitui em um novo órgão. No interior do nódulo, a bactéria se multiplica e muda de morfologia, formando os bacterióides que são, propriamente, as espécies ativas na fixação do nitrogênio atmosférico. Os estágios do estabelecimento da simbiose entre a leguminosa e o rizóbio, estão ilustrados na Figura 1.1.

A diminuição da concentração de oxigênio no tecido nodular é o principal sinal para ativar os genes envolvidos na fixação do nitrogênio e permitir que o complexo da nitrogenase, sensível ao oxigênio, fixe o nitrogênio (DAINESE-HATT *et al.*, 1999).

Dentro dos nódulos, pela ação da enzima nitrogenase, os bacterióides são capazes de quebrar a tripla ligação que une os dois átomos de nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>), transformando-o em amônia (NH<sub>3</sub>) (BUCHANAN, 2000), pela seguinte reação biossintética de redução de N<sub>2</sub>:



Se a simbiose for eficiente, o N fixado nos nódulos pode suprir todas as necessidades da planta, dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados caracterizando assim, uma agricultura mais ecológica e condizente com as necessidades do mundo presente.



**Figura 1.1.** Estágios da iniciação e desenvolvimento de um nódulo em raiz de soja.

1) Liberação de flavonóides pelas raízes da planta; 2) Quimiotaxia do rizóbio em direção à superfície das raízes; 3) Proliferação do rizóbio na rizosfera e indução da diferenciação do primórdio do nódulo; 4) Aderência do rizóbio às raízes; 5) Diferenciação do meristema secundário do nódulo; 6) Encurvamento do pêlo radicular e formação da via de infecção; 7) Múltipla infecção das células do nódulo e crescimento do nódulo; e 8) Crescimento do nódulo, diferenciação dos bacterióides e início da fixação simbiótica de nitrogênio ([www.plantphys.net](http://www.plantphys.net)).

No Brasil, atualmente, são recomendadas quatro estirpes de rizóbios para a cultura da soja, sendo duas de *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) e duas de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080).

Os benefícios proporcionados pela simbiose estabelecida entre plantas de soja e o *B. elkanii* (SEMIA 587), podem ser nitidamente observados pelo tamanho e coloração da leguminosa, expressivamente maior e viçosa do que aquela não inoculada com o microrganismo (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Plantas de soja (CODETEC, CD-208), com 30 dias. Não inoculada (esquerda) e inoculada (direita) com *B. elkanii* (SEMIA 587).

O impacto econômico que estas bactérias desempenham na área agrônômica, ao viabilizarem o aproveitamento do nitrogênio atmosférico através de sua fixação, proporciona uma economia da ordem de U\$1,5 bilhão anuais em fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA E CAMPO, 2000). Portanto, pode-se afirmar que a viabilidade

econômica da cultura da soja em nosso país, é devida à ação dessas bactérias que trabalham gratuitamente, para o agricultor, além de promoverem uma agricultura sustentável que contribui significativamente para o ciclo global do nitrogênio.

A ação do microrganismo neste processo simbiótico, embora resulte em benefícios notoriamente reconhecidos, ainda revela muitos enigmas no que diz respeito às etapas do desenvolvimento deste evento. Um sistema complexo como este, o qual envolve a atração da bactéria pela planta, a colonização e invasão das células, a diferenciação em bacterióides, bem como a fixação de nitrogênio propriamente dita, pode ser melhor compreendido através do estudo da expressão diferencial de genes específicos do microrganismo em meios distintos.

Para sobreviver mudando as condições ambientais, a bactéria que vive no solo, ao passar a viver no ambiente da raiz, deve possuir a habilidade de sofrer adaptações fisiológicas especializadas. Motivados pela compreensão deste sistema simbiótico, muitos trabalhos foram realizados no sentido de investigar os genes do microrganismo e sua expressão, o desenvolvimento e fisiologia da raiz da leguminosa e, a estrutura e atividade das proteínas envolvidas no processo, já que estas, são as macromoléculas responsáveis pela execução das tarefas vitais para o desenvolvimento e manutenção das células vivas.

A análise proteômica diferencial, que tem sido amplamente empregada como ferramenta de estudo da expressão gênica nestas interações entre plantas-microrganismos, certamente poderá contribuir para o entendimento dos mecanismos pertinentes à fixação do nitrogênio atmosférico pelo bacterióide neste importante processo biológico.

### 1.3 Análise proteômica aplicada à bactérias

O termo proteoma surgiu em meados dos anos 90 e, de forma simplificada, designa o conjunto de proteínas expressas por um determinado genoma.

Embora esta seja uma ciência recente, observa-se um número considerável de trabalhos desenvolvidos relacionados com o proteoma de bactérias (FIGEYS, 2003). Uma breve e recente consulta à base de dados *Web of Science* identificou 1267 artigos publicados relacionados com o proteoma de bactérias. Destes, apenas 48 tratavam da análise proteômica de bactérias relacionadas com a soja.

Observa-se que a grande maioria das pesquisas envolvendo bactérias visa caracterizar agentes patogênicos (BLONDER *et al.*, 2004) e organismos que causam impacto econômico, tais como aqueles que fixam o nitrogênio atmosférico em associação com as leguminosas.

Particularmente com o intuito de compreender os mecanismos envolvidos no processo de fixação biológica de nitrogênio, microrganismos do gênero *rhizobium*, cuja simbiose com leguminosas proporciona economia na redução do uso de fertilizantes nitrogenados, aumento de produtividade das plantas e preservação do meio ambiente, vem sendo investigados.

*Sinorhizobium meliloti* em associação com *Medicago truncatula* e *Melilotus alba* foi isolado, por centrifugação, para investigação de seu proteoma (DJORDJEVIC, 2004). Cerca de 1500 spots de proteínas de bactérias provenientes do nódulo e cultivadas em laboratório foram identificadas por PMF.

As proteínas mais proeminentes das bactérias do nódulo se mostraram envolvidas nos mecanismos de síntese de vitaminas e em processos relacionados à stress (chaperoninas, proteínas de choque térmico, regulação de stress e osmo-regulação).

Algumas destas proteínas foram encontradas somente em bactérias do nódulo, o que demonstra a extensão das mudanças metabólicas que ocorrem quando a bactéria invade a leguminosa estabelecendo com ela uma simbiose para realizar a fixação do nitrogênio.

Um conjunto de dezenove proteínas de choque térmico (Hsp) foi identificado em *B. japonicum* (MÜNCHBACH *et al.*, 1999) ao se alterar a temperatura de 28 para 43°C. Dentre as macromoléculas identificadas, estão as pequenas Hsp; outras, muito similares às da família sHsp; GroES, GroES<sub>2</sub>, GroEL<sub>2</sub>, GroEL<sub>4</sub> e GroEL<sub>5</sub>, além de cinco novas proteínas encontradas.

Um estudo sobre a expressão de proteínas de bacterióides de *B. japonicum* (SARMA E EMERICH, 2005) revelou que os simbiossitos apresentaram um sistema elaborado de proteínas para os metabolismos de nitrogênio e carbono, o qual é dependente do suprimento de metabólitos pela planta. No entanto, aparentemente eles não dispõem de metabolismo definido de ácidos graxos e ácidos nucléicos. Curiosamente, as proteínas relacionadas com a síntese de proteínas, enovelamento e degradação estavam entre os spots mais predominantes do proteoma do bacterióide. Além do mais, várias proteínas que demonstraram bom grau de expressão, foram associadas com a detoxificação celular, regulação de stress e sinalizadores.

A análise proteômica do *Rhizobium etli* foi estudada por Encarnación (2003), com o objetivo de verificar a expressão diferencial de proteínas sob duas condições de crescimento do microrganismo: aeróbica e fermentativa. De acordo com o observado, foi relatado que as proteínas do metabolismo de carbono apresentaram uma regulação negativa no metabolismo fermentativo, demonstrando consistência com as drásticas mudanças fisiológicas ocorridas durante este complexo processo biológico.

## **2. OBJETIVOS**

O principal objetivo a ser destacado neste capítulo, consiste na otimização dos parâmetros de obtenção dos organismos envolvidos neste estudo: bactérias e bacterióides do *B. elkanii* (SEMIA 587). Para tanto, faz-se necessário estabelecer as condições de plantio de soja, bem como da inoculação de rizóbio, e o isolamento do simbionte a partir da leguminosa.

## **3. EXPERIMENTAL**

### **3.1 Obtenção dos organismos**

#### **3.1.1 Bactéria**

As células de *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) foram mantidas em placas de petri, contendo meio YMA (*Yeast Mannitol Agar*) (fosfato monoácido de potássio 0,5 g L<sup>-1</sup>; sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,2 g L<sup>-1</sup>; cloreto de sódio 0,1 g L<sup>-1</sup>; manitol 10 g L<sup>-1</sup>; extrato de levedura 0,5 g L<sup>-1</sup>; vermelho congo 2,5 mg mL<sup>-1</sup>; ágar 9,0 g L<sup>-1</sup>; pH 6,8) (VINCENT, 1970).

A inoculação destas células em meio de cultura líquido YMB (*Yeast Mannitol Broth*) (fosfato monoácido de potássio 0,5 g L<sup>-1</sup>; sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,2 g L<sup>-1</sup>; cloreto de sódio 0,1 g L<sup>-1</sup>; manitol 10 g L<sup>-1</sup>; extrato de levedura 0,5 g L<sup>-1</sup>; pH 6,8), deu origem às amostras de bactéria. Com isso, tornou-se necessário o conhecimento das etapas de crescimento do *B. elkanii* neste meio de cultura (YMB), o que foi feito através da construção de uma curva de crescimento do microrganismo neste meio.

### 3.1.1.1 Curva de crescimento da bactéria

Um pré-inóculo foi preparado para a realização da curva de crescimento. Células de *B. elkanii* cultivadas em YMA a 28 °C foram recuperadas durante a fase exponencial de crescimento, 06 dias após o plaqueamento inicial, através da raspagem da massa bacteriana com o auxílio de uma alça de Drigalsch. A massa bacteriana de 07 placas foi recuperada e diluída em 60 mL de água milli-Q estéril. A turbidez do pré-inóculo foi registrada através da leitura em um colorímetro fotoelétrico Klett-Summerson (Klett MFG).

Dez unidades Kletts do pré-inóculo foram adicionados em frascos especiais tipo *side-arm*, contendo 100 mL do meio líquido YMB. Os frascos foram incubados por um período de 262 horas, sob constante agitação (160 rpm) a 28 °C. As leituras (Kletts), em triplicatas, foram realizadas a cada 24 horas em fotocolorímetro com filtro vermelho (640-700 nm) e, os dados, registrados em um gráfico.

### 3.1.1.2. Cultivo da bactéria

Com base na identificação das fases de desenvolvimento do *B. elkanii*, suas células passaram a ser cultivadas por 72 horas em incubadora *shaker* a 28 °C, sob agitação a 140 rpm. Após este período de incubação, a suspensão contendo bactérias foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 min, a 10 °C. O sedimento foi lavado com NaCl 0,2 mol L<sup>-1</sup> e com água purificada (Milli-Q), para remoção de polissacarídeos extracelulares e possíveis resíduos do meio de cultivo. O *pellet* de bactérias obtido, foi mantido a -80 °C.



### 3.1.2. Bacterióide

Os bacterióides foram obtidos através da inoculação de bactérias do *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) em sementes de soja. O experimento de plantio de soja foi conduzido em casa de vegetação instalada no Câmpus da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP, em tubetes preparados com vermiculita esterilizada por autoclavagem.

As sementes de soja (cultivar CODETEC; CD-208) foram desinfectadas imediatamente antes do plantio, banhando-se em uma solução de álcool etílico 95% por 1 min e, posteriormente, lavando-se com água Milli-Q por duas vezes, de 1 min cada. Em seguida, depois de ficarem de molho em água sanitária 1,5% por 6 min, as sementes sofreram sete lavagens sucessivas, de 1 min cada, com água Milli-Q. Nesta etapa em que a desinfecção das sementes se completara, foram separadas sementes para o plantio das testemunhas. As demais sementes foram imersas, por 10 min, em uma suspensão bacteriana contendo células de *B. elkanii* crescidas em meio YMB. Uma vez inoculadas, estas foram semeadas em vasos plásticos (tubetes) de 300 mL, contendo vermiculita (Plantmax, EUCATEX) esterilizada como substrato de plantio. Todo o material utilizado no plantio, foi previamente autoclavado (1 atm/30 min).

Durante seu desenvolvimento, as plantas foram molhadas com água destilada em dias alternados, re-inoculadas com uma suspensão de *B. elkanii* 7 dias após o plantio e banhadas com solução nutritiva (GIBSON, 1987) – livre de qualquer fonte de nitrogênio – aos 19 dias.

Paralelamente, as sementes desinfectadas e não inoculadas com a bactéria (testemunhas), foram igualmente plantadas e tratadas para efeitos comparativos neste experimento. As plantas de soja foram colhidas com 30 e 35 dias de idade.

---

### 3.1.2.1. Extração dos bacterióides

Indiferentemente da idade em que foram colhidas as plantas, os nódulos formados foram isolados manualmente, desinfetados segundo o mesmo procedimento adotado para desinfecção das sementes e procedeu-se a extração das células simbiotes de bacterióides.

Cerca de 0,5 g de nódulos jovens e maduros, foram macerados com polivinilpirrolidona (PVPP) e em presença de tampão de extração (Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,0; KCl 50 mmol L<sup>-1</sup>; manitol 250 mmol L<sup>-1</sup>) gelado. Esta mistura foi centrifugada por 2 min a 22 °C e 120 x g e, o sobrenadante, depois de recuperado em novo tubo, sofreu nova centrifugação nas mesmas condições.

Por fim, o sobrenadante obtido, quando submetido a 4600 x g por 4 min a 4 °C, deu origem ao pellet de bacterióides o qual manteve-se armazenado a -80 °C para os trabalhos posteriores.

### 3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras de bactéria e bacterióide foram descongeladas e preparadas para a análise por Microscopia Eletrônica de Varredura. O preparo compreendeu repetidas etapas de lavagens das células com água Milli-Q e centrifugações (14000 rpm, 10 min, 10 °C). Os pellets das amostras foram, ao final, desidratados com solução de álcool etílico em concentrações crescentes (30, 50, 70, 80,90 e 100% por 20 min cada) e, secos em *speed vac*.

As células secas foram pinceladas com tinta prata para auxílio na condução de corrente e, metalizadas com ouro quando, finalmente, foram obtidas as imagens em Microscópio de Varredura Eletrônica LEO 440.

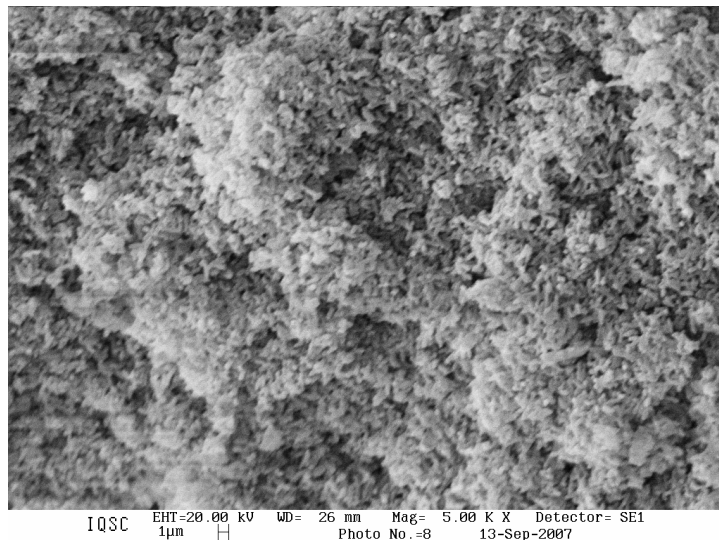
---

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Obtenção dos organismos

#### 4.1.1 Bactéria

O produto do cultivo do *Bradyrhizobium elkanii* em meio YMB foi avaliado pela obtenção da imagem do microrganismo, por microscopia eletrônica de varredura, após isolamento do meio de cultura.



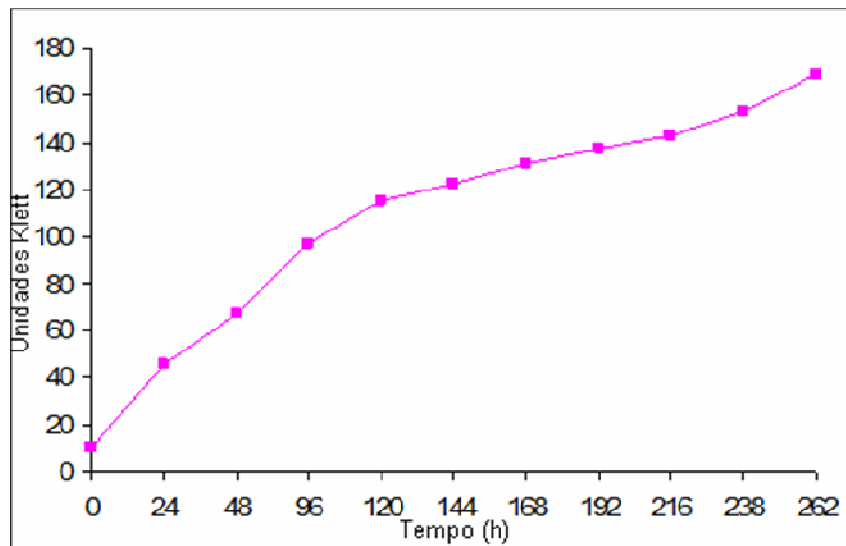
**Figura 1.3.** Microscopia eletrônica de varredura da amostra de *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587). Aumento da imagem = 5.000 vezes.

Como pode ser visualizado na Figura 1.3, ficou evidenciada a presença de grande quantidade de células bacterianas, facilmente identificadas pela presença de estruturas com a típica forma de bastão.

O procedimento de lavagem das amostras com água, por cinco vezes, seguido de lavagens com solução etanólica em concentrações crescentes possibilitou a completa eliminação do meio de cultura e isolamento do rizóbio na condição *in vitro*.

#### 4.1.1.1 Curva de crescimento da bactéria

A Curva de crescimento da bactéria do *B. elkanii* em meio YMB (Figura 1.4) foi construída a partir dos dados de leitura de absorbância obtidos durante dez dias de monitoramento.



**Figura 1.4.** Curva de crescimento do *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) em meio de cultura YMB.

Observa-se, pela inclinação da curva obtida, que a bactéria praticamente não apresentou fase lag. Pelo fato das células bacterianas terem sido recuperadas do meio de cultura YMA e inoculadas em meio YMB (de composição muito semelhante ao YMA), o período de adaptação foi tão curto que tornou-se imperceptível no intervalo de 24 horas em que foram efetuadas as leituras de absorbância para construção da curva de crescimento.

No entanto, entre 24 e 120 horas o número de células sofreu um aumento mais acelerado, típico de uma de crescimento exponencial. Nesta etapa, conhecida por fase

Log, as células bacterianas se encontravam em plena atividade, o que tornou o período intermediário de 72 horas, o mais atraente para amostragem das bactérias para análise proteômica.

Cinco dias após a incubação, a fase estacionária foi atingida. Neste período, em que o número de bactérias que cresce é o mesmo que o que morre, ocorre a exaustão de nutrientes do meio e acúmulo de metabólitos tóxicos, com a conseqüente alteração nas condições físicas do ambiente.

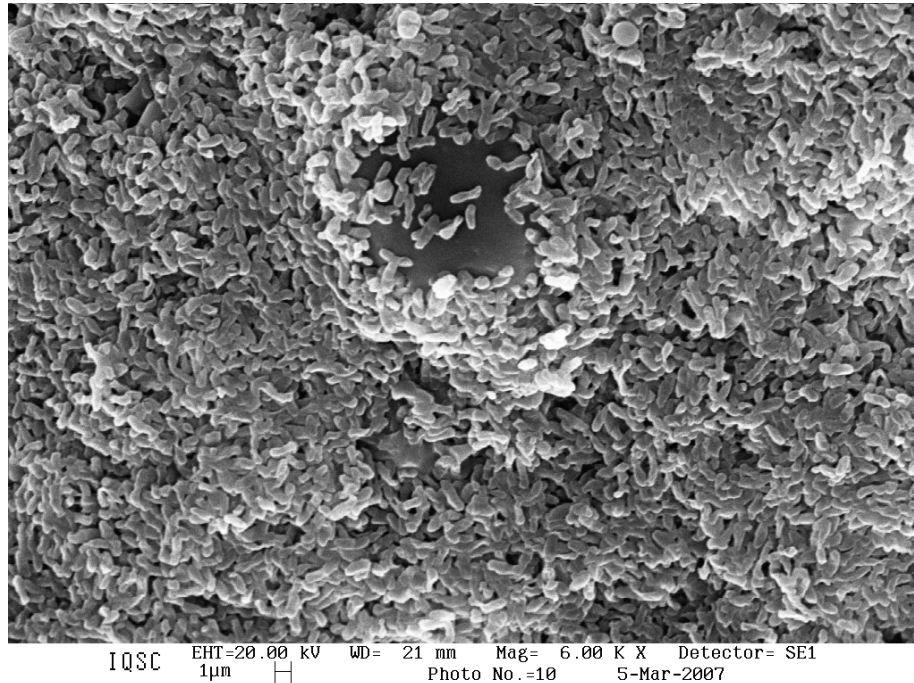
Nota-se, contudo, uma ligeira inclinação da reta a partir do nono dia após a incubação. Possivelmente, este fato esteja relacionado com a freqüente produção de polissacarídeos por este tipo de bactéria, o que ocasiona um aumento da turbidez da solução e variações na absorbância da solução.

#### **4.1.2 Bacterióide**

As amostras de bacterióide, por sua vez, foram obtidas a partir da colheita de plantas de soja noduladas. A presença de um número incontável de bacterióides, na forma de bastonetes, retratado na imagem eletrônica de varredura (Figura 1.5), pôde comprovar a eficiência do procedimento empregado para a extração destas espécies fixadoras do nitrogênio atmosférico.

O êxito deste procedimento de extração, também é devido à cuidadosa adição de polivinilpirrolidona (PVPP) ao tampão de extração respeitando-se a proporção, em massa, de PVPP:nódulo como sendo de 1:3. Pode-se dizer que este polímero atua na purificação das amostras ao possibilitar o isolamento de interferentes provenientes dos tecidos da planta. Charmont *et al.* (2005) já havia verificado que, estes tecidos são

ricos em compostos fenólicos, os quais se acumulam nos compartimentos maiores das células das plantas, os vacúolos.



**Figura 1.5.** Microscopia eletrônica de varredura da amostra de bacterióide. Aumento da imagem = 6.000 vezes.

Quando se pretende utilizar a eletroforese 2D na separação de proteínas de amostras complexas, estas devem ser submetidas à procedimentos de purificação que eliminem compostos que interferem na técnica, assim como sais, lipídeos, polissacarídeos, ácidos nucleicos e compostos fenólicos.

Em meio aquoso, os compostos fenólicos podem ser ligar às proteínas por diversos mecanismos. Através de pontes de hidrogênio, ligações iônicas e interações hidrofóbicas, tal interação pode levar à formação de um produto mais hidrofóbico e suscetível à agregação e precipitação das proteínas.

Dentro deste contexto, o polivinilpirrolidona insolúvel tem a função de “seqüestrar” os compostos fenólicos e prevenir interações inespecíficas com as proteínas. Uma hipótese é a de que o PVPP, ao se ligar com os compostos fenólicos, ficam retidos pelo polímero insolúvel evitando posteriores interações com as proteínas.

A idade dos nódulos, também é considerado outro fator responsável pela qualidade dos bacterióides e pela concentração protéica deles obtida. Aos 30 dias após o plantio, nódulos ativos com coloração característica avermelhada, ligeiramente menores do que aqueles obtidos com 35 dias, foram isolados das plantas de soja. Observou-se que o rendimento da massa de nódulos obtido para plantas colhidas cinco dias mais jovens, caiu cerca de 5 g.

No entanto, mesmo diante de um menor rendimento da massa de nódulos, optou-se pela colheita das plantas aos 30 dias pelo fato de o conteúdo protéico de bacterióides provenientes de nódulos com quatro semanas de idade, já terem sido anteriormente isolados com êxito por Sarma e Emerich (2005).

## **5. CONCLUSÕES**

As amostras de *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) *in vitro* se desenvolveram, satisfatoriamente, em meio de cultura YMB. Três dias após a inoculação, o número de células é máximo e a atividade celular é plena; características que configuram a fase log de seu desenvolvimento e portanto, consideradas ideais para amostragem.

Já a espécie *in vivo*, quando associada simbioticamente à plantas de soja, deverá ser isolada a partir da colheita de leguminosas noduladas com 30 dias de idade e, observando-se as condições de desinfecção das sementes, inoculação da bactéria e extração do bacterióide conforme estabelecidas nas seções (3.1.2) e (3.1.2.1) deste trabalho.



# Capítulo 2

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Métodos de extração de proteínas

O procedimento ideal de preparo de amostra para análise proteômica, deve compreender etapas que resultem na desrupção das células, seguida da completa solubilização, desagregação, desnaturação e redução das proteínas da amostra.

Para tanto, as amostras proteicas são freqüentemente solubilizadas em uma solução desnaturante, não iônica, a qual permite a separação das proteínas conforme o seu ponto isoelétrico (pI). Normalmente, estas soluções são compostas por um agente desnaturante como a uréia, que atua no rompimento das ligações de hidrogênio; um agente redutor o qual evita a oxidação das proteínas; um detergente não iônico ou *zwitteriônico* para solubilizar as macromoléculas reduzindo sua agregação e precipitação; e por anfólitos, os quais facilitam a focalização isoelétrica. Ocasionalmente, o uso de tiouréia nesta solução pode proporcionar a quebra de interações hidrofóbicas com a conseqüente separação de proteínas de membrana.

Adicionalmente, os métodos físicos quando associados à métodos químicos podem ser utilizados para auxiliar no rompimento da parede celular, resultando na liberação das proteínas da amostra para a solução. Aparelhos de ultrassom, banhos de aquecimento e prensa francesa, são alguns dos recursos comumente empregados com o propósito de auxiliar na desintegração das células durante o processo de extração das proteínas (KAZMI e KRULL, 2001).

## 1.2 Métodos de quantificação de proteínas

Uma vez lisadas, as amostras devem ter seu teor de proteínas determinado previamente à separação por eletroforese bidimensional. Para tanto, as técnicas espectrofotométricas ainda são as mais comumente empregadas e, dentre estas, aquelas que empregam os reagentes de Folin-Ciocalteu (HARTREE, 1972) e de *Coomassie Brilliant Blue* (BRADFORD, 1976), são as mais utilizadas.

No que diz respeito à sensibilidade, simplicidade e reprodutibilidade, os ensaios apresentam vantagens e desvantagens entre si. Observa-se, que alguns dos reagentes empregados na solubilização das proteínas como a uréia, Triton X-100 e SDS, causam grande interferência na dosagem por Bradford, afetando os resultados (FRIEDENAUER E BERLET, 1989).

Embora sejam muitos os métodos espectrofotométricos disponíveis para a determinação de proteínas totais (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998), nenhum deles é considerado de uso universal portanto, é preciso que se avalie qual o mais apropriado para o meio em questão.

## 1.3 Eletroforese bidimensional

Um aspecto fundamental da ciência proteômica está relacionado com o desenvolvimento de métodos de separação que sejam capazes de isolar os componentes individuais de misturas protéicas complexas antes da etapa de identificação, a qual é feita por espectrometria de massas.

Foi através do desenvolvimento da eletroforese bidimensional, associado ao de duas outras ferramentas essenciais (espectrometria de massas e bioinformática), que o crescimento da proteômica tornou-se, inicialmente, possível.

Ao se deparar com misturas complexas e, levando-se em conta que a ciência

proteômica visa identificar todas as proteínas presentes em um organismo, o isolamento destas macromoléculas previamente à análise por MS, favorece a identificação estrutural das mesmas.

A separação das proteínas de uma célula ou tecido para análise proteômica pode ser realizada através de uma variedade de métodos atualmente disponíveis, como as técnicas cromatográficas (HPLC), a eletroforese capilar e a eletroforese bidimensional (2D). Esta última, no entanto, introduzida no início de 1975 (O'FARRELL, 1975) é ainda a ferramenta mais empregada com a finalidade de mapear o proteoma de um organismo.

Considerada uma poderosa técnica de separação, a eletroforese bidimensional permite a resolução simultânea de misturas proteicas complexas em duas etapas consecutivas e ortogonais, denominadas focalização isoelétrica e SDS-PAGE. Ou seja, os parâmetros de separação empregados na 2D-PAGE se baseiam em duas características físico-químicas independentes das proteínas que são o ponto isoelétrico na primeira dimensão e massa molecular na segunda dimensão. Isso faz da eletroforese bidimensional uma técnica de elevada capacidade de resolução, através da qual centenas e até milhares de proteínas de uma só amostra possam ser isoladas, simultaneamente, em um único gel.

Através deste método de separação eficiente, são obtidas informações úteis sobre ponto isoelétrico das proteínas, massa molecular, nível de expressão, abundância relativa e modificações pós-traducionais, verificadas por alterações da mobilidade eletroforética da macromolécula proteica (PANDEY E MANN, 2000).

### **1.3.1 Primeira dimensão: focalização isoeétrica (IEF)**

A focalização isoeétrica é um método eletroforético que separa as proteínas com base em sua carga ou ponto isoeétrico (pI). Atualmente, a eletrofocalização é feita com a aplicação da amostra sobre tiras de géis de poliacrilamida, disponíveis comercialmente. Estas tiras de IPGs, contém um gradiente de pH imobilizado, o qual proporciona separações de proteínas eficientes e reproduzíveis.

Devido a suas características anfotéricas, as moléculas de proteínas podem apresentar carga positiva, negativa ou nula, conforme o pH do meio em que se encontram. Com isso, em presença de um gradiente de pH e sob influência de um campo elétrico, cada molécula proteica se move para a posição do gradiente onde sua carga líquida é nula, ficando ali imobilizada em um ponto onde o valor de pH é numericamente igual ao pI da proteína.

### **1.3.2 Segunda dimensão: separação por tamanho (SDS-PAGE)**

Na segunda dimensão, as proteínas separadas pela focalização são submetidas a uma eletroforese desnaturante em um gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), a qual separa as proteínas de acordo com suas massas moleculares. Essa etapa é comumente realizada em géis preparados em laboratório, com espessuras variáveis e diferentes concentrações de acrilamida. São estes parâmetros, que determinam o grau de separação entre as proteínas da amostra durante esta segunda etapa do processo eletroforético.

---

### 1.3.3 Métodos de detecção de proteínas em géis

Uma vez concluída a segunda dimensão, o mapa das proteínas separadas por eletroforese 2D pode ser visualizado no próprio gel, através da sua coloração com *Coomassie blue*, nitrato de prata ou compostos fluorescentes. A seleção do agente de coloração deve ser feita levando-se em conta a sensibilidade e o tempo requeridos para a revelação do gel, a simplicidade do procedimento, bem como as etapas futuras de análise.

Cerca de cem vezes mais sensível do que o *Coomassie blue*, a revelação com prata possibilita a visualização de *spots* de proteínas na faixa de 5 fmol (KINTER E SHERMAN, 2000). Por outro lado, a revelação do gel com o reagente de *Coomassie blue* permite detectar quantidades de proteínas da ordem de 0,2 a 0,5 pmol. Ou seja, este tipo de coloração apresenta sensibilidade adequada para grandes quantidades de proteínas se comparado à prata.

Sabe-se que o *Coomassie blue* apresenta resposta linear para a maioria das proteínas mas que, em alguns casos, proteínas muito ácidas, básicas ou glicosiladas não são bem detectáveis por este reagente. No entanto, quando se objetiva em uma etapa subsequente, a identificação das proteínas coradas no gel por espectrometria de massas este deve ser, preferencialmente, o corante empregado uma vez que as proteínas coradas não se fixam de forma irreversível ao gel.

## 1.4 Análise da imagem de gel bidimensional

Ao separar tantas proteínas em uma matriz de poliacrilamida, o gel obtido pode ser considerado um mapa protéico global para um determinado tipo celular e condição específica. Esta característica tem permitido o emprego da técnica de eletroforese bidimensional no estabelecimento de mapas padrões de células em geral, assim como

a comparação dos produtos protéicos produzidos por grupos celulares expostos à diferentes condições biológicas.

A análise comparativa destes mapas gerados permite a identificação de proteínas com acúmulo diferencial ou seja, que tenham sido induzidas ou suprimidas sob diferentes condições ambientais. Este tipo de análise diferencial de proteomas tem sido utilizada em estudos de interações simbióticas entre membros do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* e plantas da família Leguminosae (NATERA; GUERREIRO; DJORDJEVIC, 2000).

A imagem do mapa de proteínas adquirida por 2D é obtida por digitalização em scanners apropriados. Com auxílio de softwares especializados é possível que, através da análise do mapa protéico, possam ser obtidas informações quantitativas e qualitativas sobre cada proteína presente no gel, como pI e massa molecular aparente.

É através dos recursos destes programas, que é possível analisar várias imagens simultaneamente, comparando-se amostras provenientes de diferentes experimentos e identificando diferenças e semelhanças entre elas, tais como as empregadas na análise proteômica diferencial.

Em geral, este tipo de análise diferencial é realizada através da sobreposição das imagens dos géis em estudo. Com isso, é possível identificar as proteínas de um gel (amostra) correspondentes às de outro (referência) e ainda, comparar o grau de expressão entre elas.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo nesta etapa do trabalho foi estabelecer parâmetros ideais para um método de extração de proteínas para amostras de bactérias fixadoras de nitrogênio envolvidas neste estudo nas condições *in vitro* (*Bradyrhizobium elkanii* – SEMIA 587) e *in vivo* (bacterióide).

Empregando-se a técnica de separação de proteínas por eletroforese bidimensional, ajustar as condições experimentais para promover o isolamento das proteínas dos organismos, bem como identificar aquelas diferencialmente expressas nos mesmos. Em outras palavras, localizar, através da comparação dos mapas protéicos da bactéria e do bacterióide, as proteínas presentes no organismo vivendo sob uma condição (induzidas) e ausentes em outra (suprimidas) e também, as macromoléculas cujo nível de expressão diferissem em pelo menos 2 vezes entre as diferentes condições de vida do *B. elkanii* (*in vitro* x *in vivo*).

## **3. EXPERIMENTAL**

### **3.1 Métodos de extração de proteínas (bactéria e bacterióide isolado de plantas de soja com 35 dias)**

Quatro métodos de extração de proteínas foram aplicados às amostras deste estudo ou seja, quatro procedimentos experimentais foram avaliados, com ligeiras modificações, para extração do proteoma da bactéria e do bacterióide, proveniente de plantas de soja colhidas aos 35 dias.



### 3.1.1 Método 1

As amostras foram solubilizadas em tampão de lise (Tris 0,01 mol L<sup>-1</sup>; Triton X-100 1%; EDTA 0,005 mol L<sup>-1</sup> pH 8,8; PMSF 1 mmol L<sup>-1</sup>), agitadas em um vortex por 1 min, sonicadas por 2 min e centrifugadas (14.000 rpm por 5 min, a 4 °C). O *pellet* de proteínas obtido, foi lavado com acetona/etanol (1:1) gelado (SMOLKA; ZHOU; AEBERSOLD, 2001).

### 3.1.2 Método 2

As amostras foram solubilizadas em tampão (Tris-HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> pH 7; sacarose 0,7 mol L<sup>-1</sup>; EDTA 50 m mol L<sup>-1</sup>; KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>; uréia 10 m mol L<sup>-1</sup>; PMSF 2 mmol L<sup>-1</sup> e mercaptoetanol 2% v/v) e, em igual volume de fenol equilibrado com Tris pH 8,0. A mistura foi agitada por 30 min em banho de gelo e, centrifugada (13.000 rpm/3 min/4 °C). A fase fenólica foi isolada e, a etapa de lavagem, repetida. As frações fenólicas das etapas de lavagem foram somadas e, as proteínas ali presentes foram precipitadas, *overnight*, com cinco volumes de acetato de amônio 0,1 mol L<sup>-1</sup> em metanol. O *pellet* obtido foi lavado com metanol e acetona gelados (BESTEL-CORE *et al.*, 2002).

### 3.1.3 Método 3

As amostras foram solubilizadas em tampão (SDS 1%; Tris 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,5; PMSF 100 mmol L<sup>-1</sup>), fervidas em banho maria por 5 min e centrifugadas (6000 x g/10 min/4 °C). O sobrenadante foi isolado e, a extração, repetida. Ao “pool” de sobrenadantes, adicionou-se RNase 0,6 mg mL<sup>-1</sup>; DNase 0,6 mg mL<sup>-1</sup> e MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O. As proteínas foram precipitadas, *overnight*, com cinco volumes de ácido tricloroacético

20%. Após centrifugação (13.000 rpm/10 min/4 °C), o *pellet* obtido foi lavado com acetona (NANDAKUMAR E MARTEN, 2002).

### 3.1.4 Método 4

As amostras foram solubilizadas em tampão (Tris-HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>; sacarose 0,7 mol L<sup>-1</sup>; EDTA 50 mmol L<sup>-1</sup>; KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>; HCl 30 mmol L<sup>-1</sup>; DTT 40 mmol L<sup>-1</sup>) e em igual volume de fenol, estabilizado com Tris-HCl pH 7,8. Após 15 min de agitação, a mistura foi centrifugada (14.000 rpm/3 min/4 °C) e a fração fenólica, isolada. A extração com fenol foi refeita por mais duas vezes, coletando sempre a fase fenólica após cada centrifugação. Finalmente, as proteínas foram precipitadas com solução de acetato de amônio 0,1 mol L<sup>-1</sup> e, centrifugadas (14.000 rpm/10 min/4 °C). O precipitado, após lavagem com acetona 80%, foi armazenado a -80 °C (MEHTA E ROSATO, 2001).

## 3.2 Quantificação de proteínas

Os métodos de Bradford (1976) e Hartree (1972) foram avaliados na quantificação de proteínas das amostras de bactéria e bacterióide. Para as leituras de absorbância realizadas respectivamente a 595 e 650 nm em espectrofotômetro Beckman (DU 640), utilizou-se soroalbumina bovina (BSA) como proteína padrão na construção das curvas analíticas ou de calibração.

A metodologia de Bradford foi executada, simplesmente, pela adição de 1 mL do reagente de Bradford preparado em laboratório (50 mg de *Coomassie Brilliant Blue G*; 25 mL de etanol 95%; e 50 mL de Ácido fosfórico para 500 mL de solução) à 100 µL do extrato protéico total das amostras em tubos de ensaio. Estes, após homogeneizados, tiveram suas absorbâncias medidas a 595 nm.

Contudo, os dados da análise quantitativa de proteínas das amostras deste estudo, foram obtidos com base na determinação por Hartree (1972). Na determinação por este método, a uma pequena alíquota do conteúdo protéico total de amostra, foram adicionados 900  $\mu\text{L}$  de uma solução A (tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado 2 g  $\text{L}^{-1}$ ; carbonato de sódio 100 g  $\text{L}^{-1}$ ; hidróxido de sódio 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ ).

Passados 15 min de reação a 50°C em banho maria, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de uma solução B (tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado 20 g $\text{L}^{-1}$ ; sulfato de cobre penta-hidratado 10 g $\text{L}^{-1}$ ; hidróxido de sódio 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ ). Após 10 minutos à temperatura ambiente, fez-se reagir o conteúdo do tubo de ensaio com 3 mL do reativo de *Folin-ciocalteau* (diluída 1:15; v/v). As leituras de absorvância foram realizadas após 10 min a 50°C, no comprimento de onda de 650 nm.

### **3.3 Eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE)**

O proteoma das amostras de bactéria e bacterióide extraído pelos métodos anteriormente descritos, foi submetido à eletroforese em mini-gel de poliacrilamida (Gel de concentração 4%; Gel de resolução 12%) com 0,75 mm de espessura. O gel, revelado com *Coomassie blue* (etanol 40%; ácido acético 10%; *Comassie blue G-250* 0,025%), teve sua imagem obtida por digitalização em *ImageScanner* (Amersham Pharmacia Biotech).

### **3.4 Eletroforese bidimensional (bactéria e bacterióide isolado de plantas de soja com 35 dias)**

Após análise visual do gel de SDS-PAGE, foi possível verificar que o procedimento mais eficiente na extração das proteínas do *B. elkanii* e do bacterióide foi o de Mehta e Rosato (2001). Com o propósito de confirmar a eficiência do referido

método, cerca de 4 mg dos extratos protéicos de ambas as amostras, foram submetidos à eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE).

### 3.4.1 Focalização isoeétrica

O conteúdo protéico total das amostras, extraído conforme o procedimento proposto por Mehta e Rosato (2001), foi solubilizado no tampão de primeira dimensão (uréia 8 mol L<sup>-1</sup>; Chaps 2%; DTT 0,3% e anfólitos 0,5%). Imediatamente, a mistura foi centrifugada (14.000 rpm/4 °C/10 min) e, submeteu-se o sobrenadante das amostras à quantificação de proteínas (HARTREE, 1972).

Cerca de 3 mg do centrifugado foi aplicado à strip de 13 cm, com intervalo de pH de 3-10 em um gradiente não linear e, submetido à focalização em um sistema IPGphor (Amersham Biosciences) conforme a programação de voltagem: 12 horas de re-hidratação das strips, seguidas por 150 V/10 min; 500 V/1 hora, 1.000 V/1 hora, 8.000 V até que fosse atingida voltagem acumulada de 30.000 V/hora o que correspondeu a 4.406 V.

Ao término da focalização isoeétrica as strips foram equilibradas por duas vezes, sob agitação durante 15 minutos, empregando-se o tampão de equilíbrio (Tris-Cl 50 m mol L<sup>-1</sup> pH 8,8; uréia 6 mol L<sup>-1</sup>; glicerol 30%; SDS 2%; traços de azul de bromofenol). À primeira etapa, foram adicionados DTT 0,01 g mL<sup>-1</sup> ao tampão de equilíbrio e, na segunda etapa, adicionou-se iodoacetamida 0,025 g mL<sup>-1</sup>.

### 3.4.2 SDS-PAGE

Concluídas as etapas de equilíbrio, as fitas foram imediatamente submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (concentração de 12,5%), na presença de SDS segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970). Para efeito de determinação da

massa molecular das proteínas separadas no gel adicionou-se, na extremidade da fita, um padrão (*Low Molecular Weight Calibration Kit* – Amersham Pharmacia Biotech) composto por seis proteínas (fosforilase b, albumina, ovoalbumina, anidrase carbônica, inibidor de tripsina e  $\alpha$ -lactoalbumina), de massas moleculares iguais a 97,0; 66,0; 45,0; 30,0; 20,1 e 14,4 kDa.

O desenvolvimento da eletroforese de proteínas nos géis, com 1 mm de espessura cada, se processou sob agitação, em uma cuba Hoefer SE 600, acoplada a uma fonte Loccus Biotecnologia, LPS-300v e um sistema de refrigeração. Durante este procedimento, a temperatura foi mantida em 15 °C e aplicou-se uma corrente constante de 20 mA/gel, de tal modo que as proteínas migrassem por toda a extensão do gel de acrilamida.

### 3.4.3 Visualização dos spots

A revelação se deu com *Coomassie blue G*, o que permitiu a rápida visualização dos spots protéicos. O procedimento de coloração envolveu, inicialmente, uma etapa de fixação das proteínas dos géis por 30 min (etanol 400 mL L<sup>-1</sup>; ácido acético 100 mL L<sup>-1</sup>), sob agitação. Posteriormente, a reação de coloração (*Coomassie blue* 0,025%) se processou durante 90 min e, após este período os géis, foram descorados (etanol 200 mL L<sup>-1</sup>; ácido acético 50 mL L<sup>-1</sup>) e mantidos refrigerados a 4°C, em solução de preservação (ácido acético 50 mL L<sup>-1</sup>) até o momento de uso.

As imagens dos géis de bactéria e bacterióide, provenientes de plantas de soja com idade de 35 dias, obtidas conforme descrito foram analisadas relativamente ao seu aspecto visual ou seja, sem o emprego de recursos computacionais. Procurou-se detectar, desta forma, se o tratamento dado às amostras permitiu a extração representativa das proteínas que as compõem. Para isso, observou-se a presença de

---

spots bem definidos por toda a dimensão do gel, fato este que possibilitou comprovar se proteínas de caráter ácido, básico, de elevado e baixo peso molecular foram adequadamente extraídas e visualizadas dentro da faixa de pH das strips empregadas (pH 3-10 com gradiente não linear).

Verificou-se, através das imagens dos géis, que a amostra de bacterióide apresentou um número de proteínas inferior ao da amostra de bactéria. Perante este resultado, os parâmetros de obtenção e de tratamento desta amostra foram re-avaliados.

Novas amostras de bacterióides de *B. elkanii* (SEMIA 587), provenientes de plantas de soja com idade ligeiramente mais jovens (30 dias), foram submetidas ao método de extração anteriormente empregado, com sucesso, em amostras de *Bradyrhizobium japonicum* 110 (SARMA E EMERICH, 2005).

### **3.5 Método de extração de proteínas (bactéria e bacterióide isolado de plantas de soja com 30 dias)**

Previamente à extração de proteínas nos microrganismos (bacterióide e bactéria cultivada *in vitro*), foi feita leitura da densidade ótica ( $DO_{600}$ ) de suas soluções aquosas. A partir deste dado, foram tomadas quantidades equivalentes de células de bactéria e de bacterióide para proceder a extração. Para isso, o procedimento descrito por Sarma e Emerich (2006) foi empregado com algumas adaptações.

As células foram suspensas em tampão Tris-HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 8,8 e fenol, saturado com Tris. Após 5 min de agitação, esta mistura foi centrifugada e, a fase fenólica re-extraída por mais duas vezes. Finalmente, as proteínas foram precipitadas, *overnight*, com solução de acetato de amônio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em metanol. O precipitado proteico foi coletado por centrifugação, lavado com acetato de amônio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em

---

metanol e, por fim, com etanol absoluto. Os pellets proteicos, secos ao ar, foram armazenados a -80 °C para futura análise por eletroforese bidimensional.

### **3.6 Eletroforese bidimensional (bactéria e bacterióide isolado de plantas de soja com 30 dias)**

Os pellets de proteínas das amostras obtidos segundo extração por Sarma e Emerich (2006), foram solubilizados, com agitação, por 1 hora à temperatura ambiente no tampão de focalização misto (uréia 8,0 mol L<sup>-1</sup>, tiouréia 2,0 mol L<sup>-1</sup>, CHAPS 4%; Triton X-100 2,0%; DTT 50 mmol L<sup>-1</sup>; anfólitos 0,5%). Esta mistura foi centrifugada (14.000 rpm/22°C/15 min) e o teor de proteínas, determinado no sobrenadante (HARTREE, 1972).

#### **3.6.1 Focalização isoelétrica**

Procedeu-se a primeira dimensão da eletroforese com cerca de 16 mg de amostra, aplicadas à *strips* de 13 cm, pH 3-10 com gradiente não linear. O protocolo de focalização manteve-se inalterado: 12 horas de re-hidratação; 150 V/1 hora; 500 V/1 hora; 1000 V; 5000 V até obtenção de uma voltagem acumulada de 20.000 V e, a revelação dos géis, feita com *Coomassie blue G*.

#### **3.6.2 SDS-PAGE**

As fitas foram equilibradas em solução tampão com DTT e, posteriormente, com iodoacetamida. Imediatamente após, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS conforme descrito na seção 3.4.2 e, à visualização dos spots, com *Coomassie blue G*, conforme protocolo detalhado em 3.4.3.

### **3.6.3 Análise da imagem de gel bidimensional**

As imagens dos géis das amostras obtidas segundo o protocolo de extração proposto por Sarma e Emerich (2006) foram obtidas por digitalização no Image Scanner (Amersham Pharmacia Biotech) pertencente ao Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP e, analisadas utilizando-se o programa Image Master 2D Platinum da Amersham Biosciences.

Todos os spots dos géis foram normalizados. Para isso, selecionou-se um determinado spot, o qual estava presente em todos os géis sendo analisados. A normalização dos volumes dos spots de todas as proteínas foi obtida dividindo-se o volume de cada spot proteico pelo volume do spot selecionado.

A partir dos dados de volume normalizado, foi feita a análise diferencial das imagens. Segundo o critério adotado, as proteínas foram consideradas como tendo sido induzidas ou reprimidas quando detectados, respectivamente, o seu aparecimento ou desaparecimento do gel. Considerou-se como diferença quantitativa de expressão o aumento ou diminuição de pelo menos duas vezes, o volume normalizado de um spot.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Métodos de extração de proteínas (bactéria e bacterióide 35 dias)**

Na Figura 2.1, o mini-gel de SDS-PAGE representa a performance dos quatro métodos de extração de proteínas avaliados nas amostras de bactéria e bacterióide obtidos a partir de plantas de soja com idade de 35 dias.

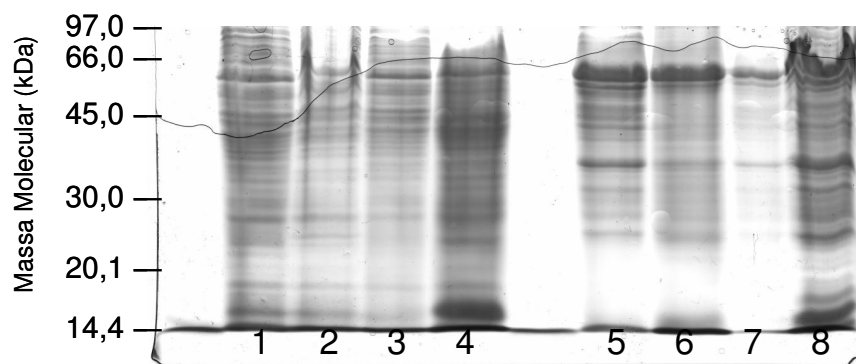
Os quatro primeiros conjuntos de bandas (01 a 04) referem-se às proteínas da bactéria obtidas, respectivamente, pelas extrações propostas por Mehta, Smolka, Bestel e Nandakumar. Nesta mesma ordem, estão dispostas as bandas de 05 a 08,



que representam as extrações de proteínas no bacterióide segundo os mesmos protocolos aplicados à bactéria.

Os métodos químicos empregados para a extração das proteínas mostraram-se eficientes para ambas as espécies (bactéria e bacterióide) envolvidas no estudo tendo-se em vista o grande número de bandas observadas no gel. Entretanto, a escolha por um dos métodos deverá ser feita considerando-se, além do número de proteínas extraídas proporcionado pelo método, a complexidade do procedimento experimental, a toxicidade e custo dos reagentes empregados e claro, a qualidade da separação bidimensional.

Pode-se observar que, com ligeiras alterações, os protocolos de Mehta e Rosato (2001) e Bestel-Core *et al.* (2002) demonstraram-se mais eficazes no propósito de extrair as proteínas dos microrganismos em estudo em uma faixa mais ampla de peso molecular, o que pode ser observado na Figura 2.1, pela presença de bandas bem definidas acima de 66,0 KDa para ambos os métodos e microrganismos.



**Figura 2.1.** Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) de proteínas extraídas respectivamente da bactéria do *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) (bandas 1-4) e do bacterióide (bandas 5-8), empregando-se os métodos de extração de Mehta, Smolka, Bestel e Nandakumar.

Outro parâmetro avaliado a fim de comparar a eficiência dos métodos de extração, foi o rendimento proporcionado por cada procedimento ou seja, a quantidade de proteína extraída em relação à mesma massa de partida da amostra, o qual está demonstrado na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1** - Rendimento dos procedimentos de extração de proteínas avaliados para as amostras de bactéria e bacterióide.

Método de extração	Quantidade extraída (mg)	
	Bactéria	Bacterióide
Mehta e Rosato (2001)	0,0103	0,0057
Smolka e Aebersold (2001)	0,0008	0,0038
Bestel-Core <i>et al.</i> (2002)	0,0060	0,0034
Nandakumar e Marten (2002)	0,0020	0,0027

Segundo o parâmetro rendimento, a metodologia proposta por Mehta e Rosato (2001) é ainda considerada a mais satisfatória dentre todas as avaliadas por ter apresentado maior quantidade de proteína extraída tanto para a amostra de bactéria quanto para a de bacterióide.

Objetivando confirmar tais resultados, os extratos protéicos das amostras obtidos segundo o procedimento de Mehta e Rosato (2001), foram submetidos a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE).

## 4.2 Métodos de quantificação de proteínas

Quando submetidas às determinações de proteína por Bradford e Hartree, amostras de bactéria e bacterióide solubilizadas no tampão de primeira dimensão (uréia 8 mol L<sup>-1</sup>; chaps 2%; anfólitos 0,5% e DTT 3 µg µL<sup>-1</sup>), tiveram resultados consideravelmente discrepantes (Tabela 2.2).

**Tabela 2.2** - Teor de proteína das amostras de bactéria e bacterióide empregando-se diferentes métodos de quantificação.

Amostra	Método de quantificação (mg mL <sup>-1</sup> )	
	Hartree	Bradford
Bactéria ( <i>B. elkanii</i> )	44,36	6,47
Bacterióide	58,64	13,90

As divergências observadas nos resultados da Tabela 2.2, podem ser atribuídas às interferências prováveis provenientes dos reagentes empregados nas etapas precedentes, de lise celular e de solubilização do conteúdo protéico das amostras.

Uréia e detergentes, como o CHAPS, que compõem o tampão de primeira dimensão utilizados na solubilização do pellet de proteína, podem ocasionar erros na determinação de proteína por espectrofotometria quando presentes em concentrações elevadas.

Da mesma forma, o tampão tris-HCl que compõem a solução de lise proteica também provoca alterações na absorção da amostra, ao reagir com o reativo de *Folin-Ciocalteu* na determinação por Hartree.

Compostos fenólicos, comumente presentes em amostras oriundas de plantas como é o caso do bacterióide, em presença do reagente de Folin superestimam os resultados nas determinações por Hartree (ZAIA *et al.*, 1998).

O método de Bradford, por sua vez, embora sofra interferência de poucas substâncias, não é considerado um procedimento recomendado para amostras contendo proteínas de baixa massa molecular sendo, portanto, considerado impróprio para amostras cuja composição proteômica é desconhecida.

Assim, diante do exposto, adotou-se a determinação por Hartree para este trabalho pois ainda que o método escolhido para a dosagem de proteínas totais não forneça resultados absolutos plenamente confiáveis, a análise proteômica, por ser comparativa, permite a utilização indistinta de um dos métodos espectrofotométricos avaliados: Hartree ou Bradford.

### **4.3 Eletroforese bidimensional**

#### **4.3.1 Bactéria e Bacterióide 35 dias**

Os géis 2D obtidos para as amostras de bactéria e bacterióide provenientes de plantas de soja com idade de 35 dias estão representados, respectivamente, pelas Figuras 2.2 e 2.3. Pela análise destas imagens foi possível reafirmar, que o método de extração mais eficiente dentre os quatro avaliados para tais amostras, foi o proposto por Mehta e Rosato (2001).

Os géis de 2D PAGE confirmaram, através de uma análise visual, as expectativas sobre o procedimento ideal de extração do conteúdo protéico total das amostras. A eficácia do método de Mehta e Rosato (2001) pôde ser demonstrada ao possibilitar a extração de proteínas das amostras de forma uniforme. Ou seja, macromoléculas ácidas, básicas, de baixa e alta massas moleculares, tiveram seus *spots*

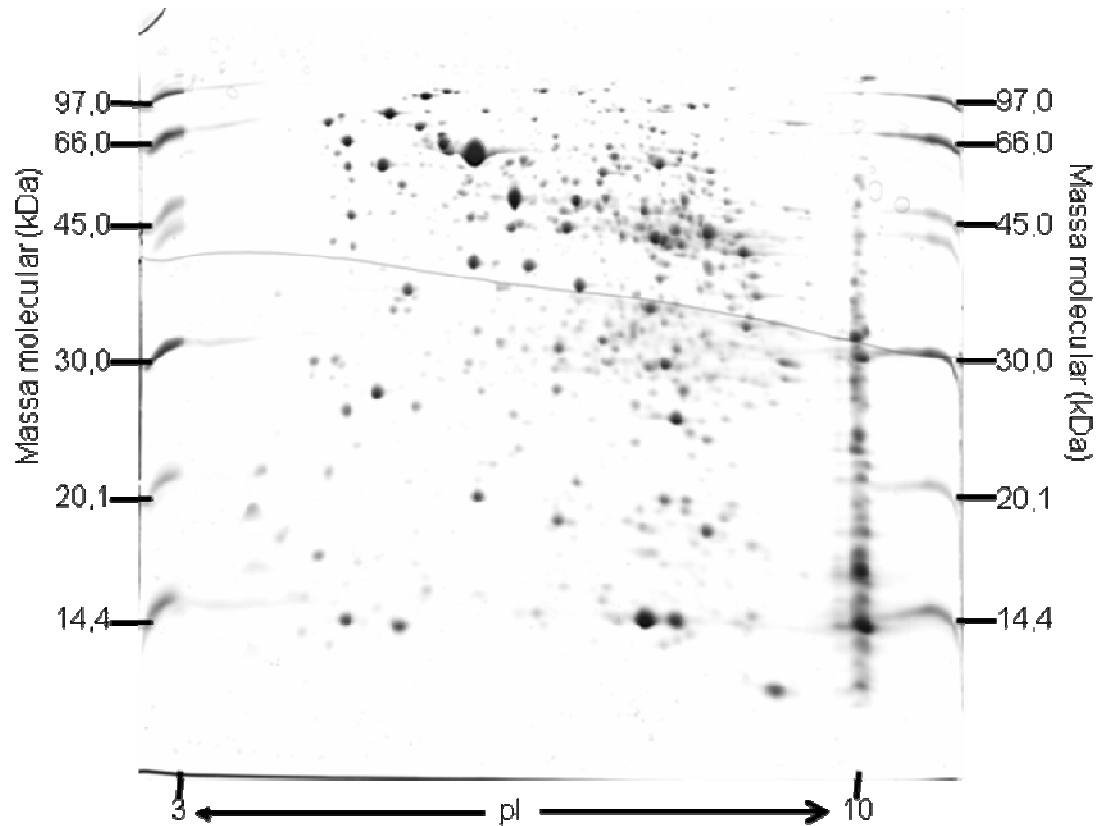
homogeneamente distribuídos por toda a dimensão do gel porém, com número reduzido de proteínas extraídas para as amostras de bacterióide oriundo de plantas de soja com 35 dias de idade.

Perante este resultado, e visando uma melhor representatividade do proteoma da espécie simbiótica do *B. elkanii* (SEMIA 587) os parâmetros de obtenção e de tratamento do bacterióide foram re-estabelecidos.

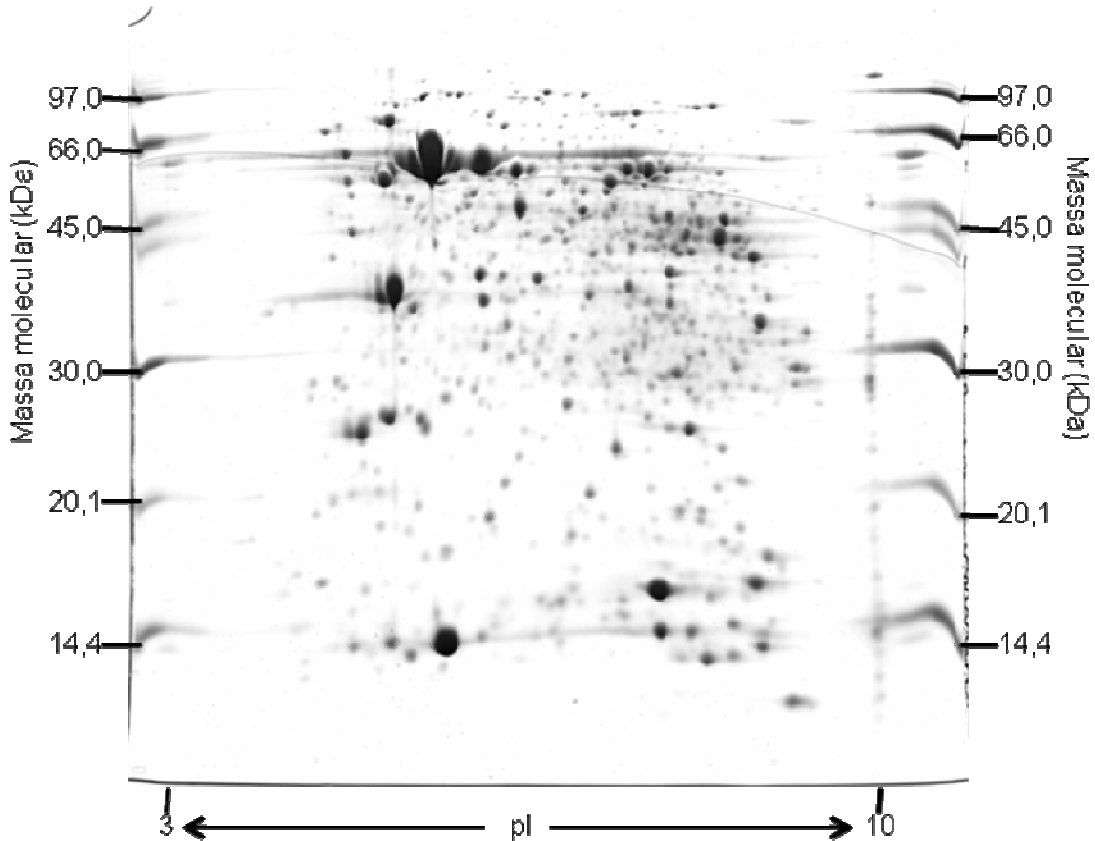
#### **4.3.1 Bactéria e Bacterióide 30 dias**

Estudos com o *Bradyrhizobium japonicum* demonstraram que a síntese protéica neste microrganismo sofre forte influência pela idade dos nódulos dos quais são obtidos (KARR E EMERICH, 1996). O declínio observado na síntese de proteínas com a maturação dos nódulos fez com que, bacterióides isolados de plantas de soja com 30 dias, fossem empregados neste estudo em detrimento daqueles que vinham sendo inicialmente avaliados (35 dias).

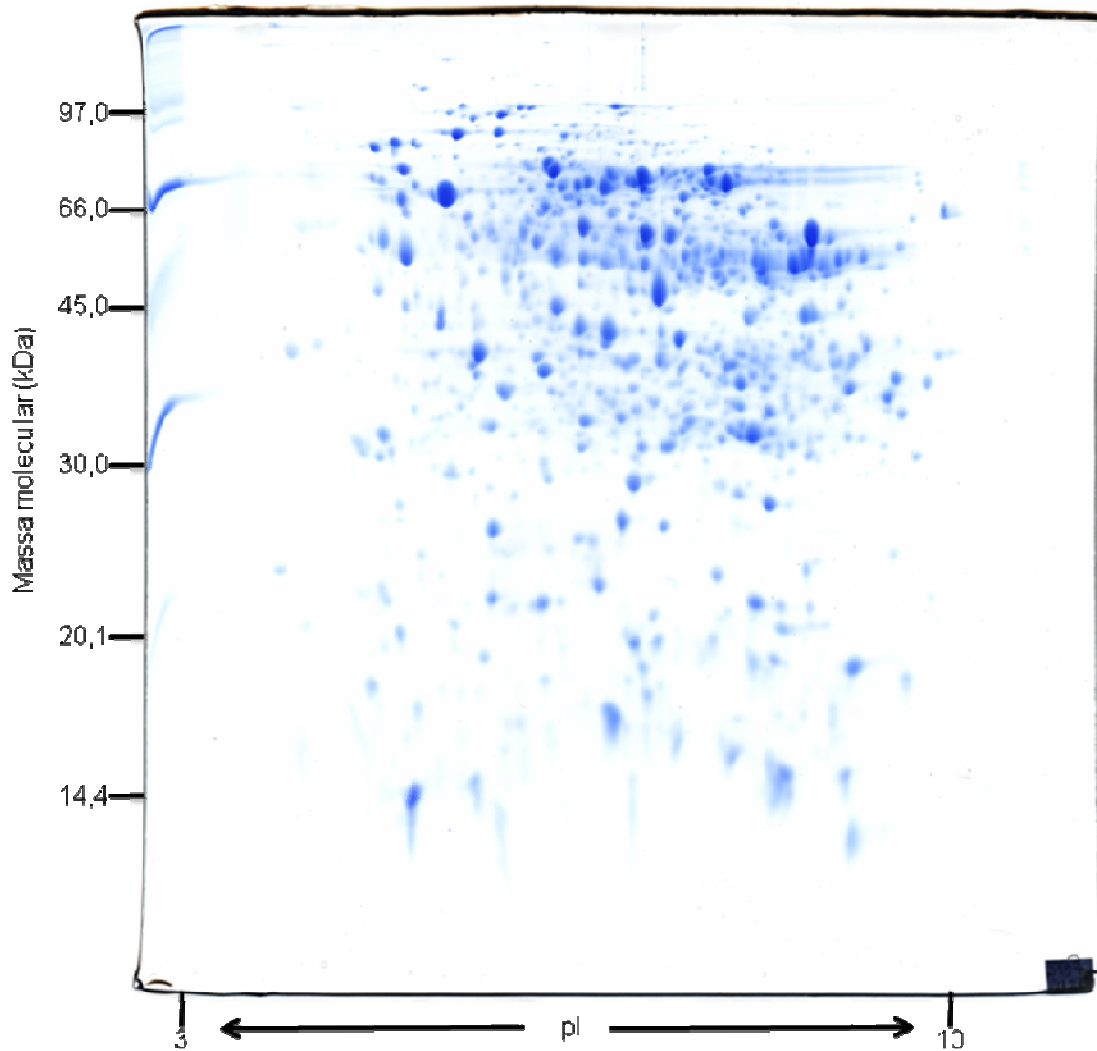
Assim, a análise comparativa entre amostras de bactéria e bacterióide, foi realizada através de géis 2D obtidos após extração do proteoma das mesmas segundo o método proposto por Sarma e Emerich (2005), cujos resultados mostraram-se mais eficientes conforme demonstrado, pelo maior número de spots extraídos para a bactéria e bacterióide (30 dias), nas Figuras 2.4 e 2.5. Estas imagens, representam os perfis protéicos das amostras de *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587), respectivamente nas condições *in vitro* e *in vivo*. As proteínas expressas, apresentam massa molecular aparente variando, aproximadamente, entre 14,40 e 97,00 kDa.



**Figura 2.2.** Gel bidimensional de proteínas da amostra de bactéria (*Bradyrhizobium elkanii*, SEMIA 587) obtido pelo processo de extração de Mehta. Fita IPG 3-10, gradiente não linear (13 cm). Parâmetros eletroforéticos: IEF = 150 V/10 min; 500 V/1 h; 1000 V/1 h; 8.000 V até 30.000V/h; SDS-PAGE 12,5% = 40 mA / 10°C; Coloração com *Coomassie blue*.

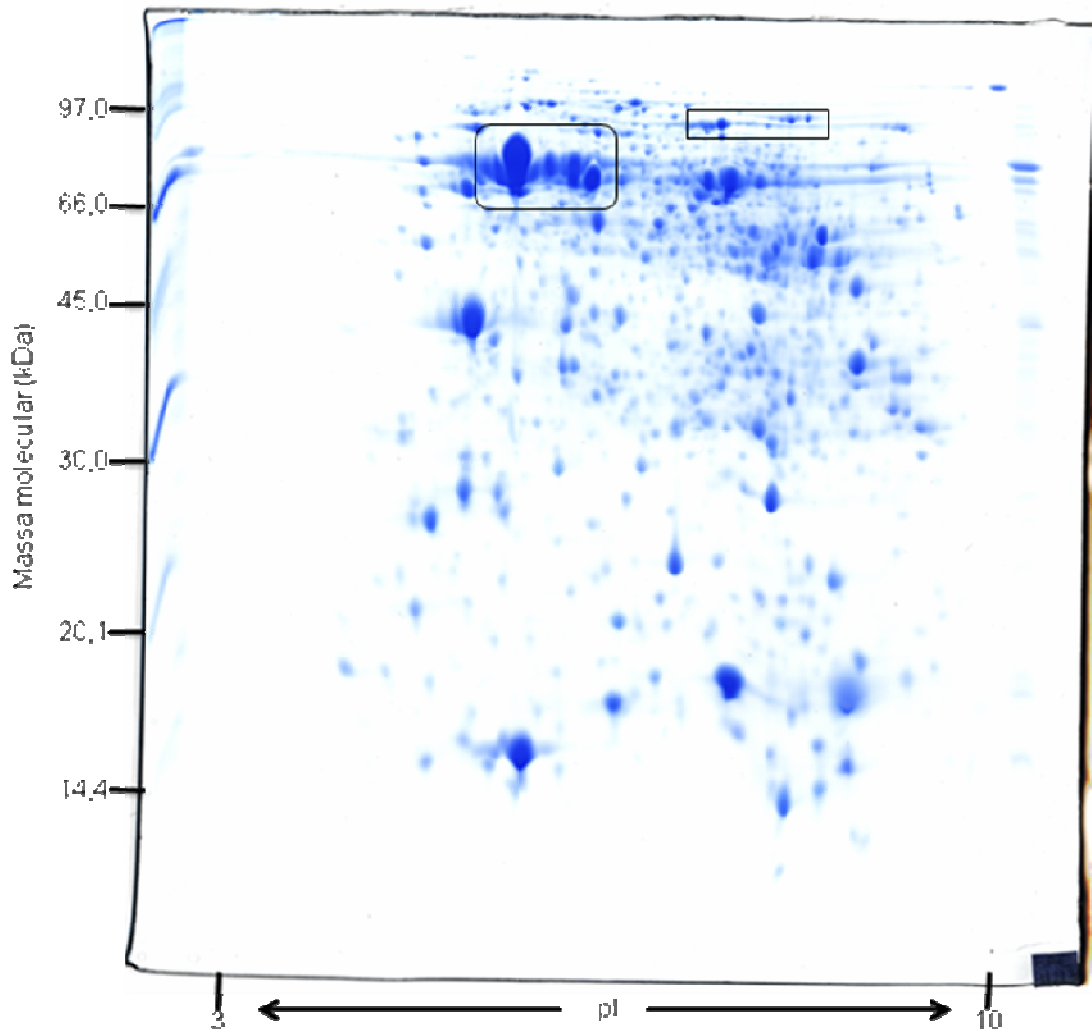


**Figura 2.3.** Gel bidimensional de proteínas da amostra de bacterióide (35 dias) obtido pelo processo de extração de Mehta. Fita IPG 3-10, gradiente não linear (13 cm). Parâmetros eletroforéticos: IEF = 150 V/10 min; 500 V/1h; 1000 V/1 h; 8.000 V até 30.000V/h; SDS-PAGE 12,5% = 40 mA / 10 °C; Coloração com *Coomassie blue*.



**Figura 2.4.** Gel bidimensional de proteínas da amostra de bactéria (*Bradyrhizobium elkanii*, SEMIA 587) obtido pelo processo de extração de Sarma e Emerich (2005). Fita IPG 3-10, gradiente não linear (13 cm). Parâmetros eletroforéticos: IEF = 150 V/10 min; 500 V/1 h; 1000 V/1 h; 8.000 V até 20.000V/h; SDS-PAGE 12,5% = 40 mA / 10°C; Coloração com *Coomassie blue*.





**Figura 2.5.** Gel bidimensional de proteínas da amostra de bacteriíide (plantas de soja com 30 dias) obtido pelo processo de extração de Sarma e Emerich (2005). Fita IPG 3-10, gradiente não linear (13 cm). Parâmetros eletroforéticos: IEF = 150 V/10 min; 500 V/1 h; 1000 V/1 h; 8.000 V até 20.000V/h; SDS-PAGE 12,5% = 40 mA / 10°C; Coloração com *Coomassie blue*.

Além de ser um método simples utilizado para a extração de proteínas, a vantagem apresentada pelo protocolo proposto por Sarma e Emerich (2006) sobre os demais, consiste no fato de ter sido anteriormente empregado, com sucesso, na análise proteômica comparativa de bacterióides e bactérias do *B. japonicum*.

O procedimento de Mehta e Rosato (2001), inicialmente aplicado às amostras deste estudo (bactérias e bacterióides provenientes de plantas de soja com 35 dias), apresenta semelhanças com a metodologia proposta por Sarma e Emerich (2006). Essencialmente, eles diferem no número das etapas de extração e de lavagem das proteínas extraídas. O primeiro, sugere que a extração fenólica seja repetida por 3 vezes ao passo que, no procedimento de Sarma e Emerich (2006), a extração das proteínas é feita em uma única etapa. Entretanto, ainda neste método, o conteúdo protéico extraído é lavado por três vezes, com um tampão capaz de solubilizar substâncias potencialmente interferentes na eletroforese bidimensional, como ácidos nucléicos e polissacarídeos.

A precipitação, com acetato de amônio, das proteínas solúveis na fase fenólica também configuram uma etapa extra de *clean-up* da amostra. Os métodos de precipitação direta das proteínas com acetato de amônio (MEHTA E ROSATO, 2001), (SARMA E EMERICH, 2006) ou com ácido tricloroacético (CHARMONT *et al.*, 2005), são amplamente empregados com o propósito de remover compostos fenólicos, pigmentos e outros compostos solúveis em acetona que possam interferir na separação por eletroforese bidimensional. No entanto, estes procedimentos podem ocasionar perdas de proteínas, uma vez que nem todas as proteínas precipitadas podem ser re-solubilizadas.

Assim, com o intuito de minimizar estas perdas pela má solubilização de certas proteínas, o conteúdo protéico total das amostras foi solubilizado, com agitação por

---

uma hora, em um tampão de focalização contendo tiouréia  $2 \text{ mol L}^{-1}$  além de outros reagentes frequentemente empregados (uréia, chaps, ditiotreitól e anfólitos). Tem sido demonstrado que, a adição deste reagente ao tampão de primeira dimensão, pode possibilitar a visualização de um número maior de spots no gel (SHAW E RIEDERER, 2003).

Utilizada desde 1996 como agente adicional de solubilização de proteínas, particularmente de membrana, a tiouréia deve ser empregada concomitantemente com uréia, em altas concentrações. Isso se faz necessário para solvatação da tiouréia, a qual se apresenta levemente solúvel em água (MOLLOY, 2000).

A plena solubilização das proteínas no tampão de primeira dimensão (etapa da focalização isoelétrica), permitiu que a separação das proteínas no gel fosse altamente eficiente e uma ampla cobertura do proteoma do organismo em estudo fosse obtida.

O aspecto “limpo” dos géis (Figuras 2.4 e 2.5) representam que os mesmos foram obtidos com uma quantidade de amostra suficiente para visualização de um grande número de proteínas ou seja, sem a sobreposição de um spot em outro; fato comumente decorrente da aplicação de grande quantidade de amostra às strips.

Na região de massa molecular mais alta de ambos os géis (Figuras 2.4 e 2.5), observa-se um arraste horizontal (*streaking*), proveniente da má focalização de proteínas na primeira dimensão. Frequentemente, este efeito pode ser minimizado aumentando-se o potencial aplicado na primeira dimensão da eletroforese bidimensional ou seja, na etapa de focalização das proteínas da amostra, com o conseqüente aumento da quantidade total da voltagem (kVh) acumulada.

A análise das imagens dos géis bidimensionais utilizando-se dos recursos do software Image Master 2D permitiu detectar cerca de 557 spots para a amostra de bactéria contra 553 para o bacterióide. Este valor representa o número de spots com

---

boa resolução, que podem estar presentes na amostra. Em outras palavras ele não deve, necessariamente, corresponder ao número de proteínas na amostra pois, diversas das macromoléculas que as compõem podem não ter sido contabilizadas em virtude da baixa resolução do gel em determinadas regiões, como a faixa de *streaking* onde a MM  $\approx$  60 kDa (Figuras 2.4 e 2.5).

Durante a análise diferencial também foi possível, com a sobreposição das imagens dos mapas proteômicos, verificar que cerca de 51% dos spots foram coincidentes entre as amostras (*match*). Além disso, observou-se a existência de perfis diferenciados de proteínas para a bactéria e bacterióide, tal como evidenciado no gel bidimensional do bacterióide (Figura 2.5), pela aparente indução de proteínas na região de massa molecular (MM)  $\approx$  66 e 97 kDa.

Para a análise comparativa, considerou-se o bacterióide como sendo a amostra e, a bactéria como referência. Desta forma, a indução, repressão, sub e super expressão de proteínas na amostra, foram identificadas.

Dentre os spots contabilizados, verificou-se que apenas 19 daqueles presentes no gel da espécie fixadora de nitrogênio podem ser considerados reprimidos no gel da bactéria, ao passo que outros 17 tiveram sua expressão aumentada de duas ou mais vezes o volume normalizado.

O *B. elkanii*, por sua vez, apresentou cerca de 230 spots a mais no gel 2D comparativamente ao bacterióide e outros 26, cujo grau de expressão foi aumentado de pelo menos duas vezes o volume normalizado.

---

## 5. CONCLUSÕES

Embora o procedimento de extração proposto por Bestel-Core *et al.* (2002) seja de rápida execução e propicie um grande número de proteínas livres, o de Mehta e Rosato (2001) apresenta maior resolução nas bandas em toda a faixa de peso molecular sendo, portanto, considerado o mais apropriado para lise das células de bactéria do *B. elkanii* (SEMIA 587) e bacterióide oriundos de plantas de soja com 35 dias. O conjunto de medidas tomadas para visualizar um número maior de spots em relação ao inicialmente obtido para a amostra de bacterióide, apresentou resultados satisfatórios. Plantas mais jovens (30 dias), em plena atividade de fixação, extraídas e isoladas em um procedimento simples (SARMA, 2006), quando eficientemente solubilizadas em um tampão de re-hidratação misto (uréia + tiouréia), apresentam um gel bidimensional que bem representa seu proteoma.

Segundo a avaliação das imagens dos géis através do software Image Master 2D, a amostra de bactéria apresenta um número maior de proteínas expressas em relação ao bacterióide. Tal fato está relacionado às condições em que habita organismo ou seja, a bactéria é responsável pela produção/geração de seu próprio alimento ao passo que, para o bacterióide, a subsistência advém da simbiose com a leguminosa.

As condições eletroforéticas para a etapa de IEF na análise de extratos protéicos de bactérias e bacterióides de *B. elkanii* (SEMIA 587) que permitem boa resolução e reprodutibilidade, ficam assim otimizadas: 12 horas de re-hidratação, 150 V/1 hora; 500 V/1 hora; 1000 V/ hora; 5000 V até que se obtenha uma voltagem acumulada de 20.000 V.

Se comparada ao microrganismo na condição *in vitro* (bactéria), a espécie fixadora de nitrogênio (bacterióide) apresentou 19 proteínas induzidas e 230 reprimidas. O aumento de expressão observado para as macromoléculas do bacterióide foi pelo

menos duas vezes maior do que o volume normalizado para 17 proteínas e, caiu pela metade (ou mais), para outras 26 proteínas em relação a bactéria.

# Capítulo 3

## 1. INTRODUÇÃO

Desde o seu surgimento, na primeira metade do século passado, a espectrometria de massas (MS) é considerada uma importante ferramenta analítica na pesquisa de compostos orgânicos e inorgânicos. Entretanto, apenas na última década se tornou uma técnica de análise valiosa em pesquisas biológicas capaz de fornecer de maneira rápida, precisa e sensível, a massa de biomoléculas como proteínas, açúcares, ácidos nucleicos, lipídeos e outros compostos orgânicos.

As limitações de sensibilidade e de ionização de macromoléculas para obter um espectro de massas, anteriormente consideradas o grande obstáculo na análise de moléculas biológicas, foram suprimidas com a introdução, em meados de 1980, de métodos brandos de ionização (SIUZDAK, 1996).

### 1.1 Ionização/dessorção a laser assistida por matriz - MALDI

Introduzida por Koichi Tanaka, a técnica de ionização a laser assistida por matriz (MALDI) foi considerada a primeira grande inovação na espectrometria de massas ao permitir que, compostos de alto peso molecular, fossem analisados com elevada sensibilidade.

Por este processo, o analito é inicialmente co-cristalizado com um grande excesso de matriz, a qual se constitui de uma molécula orgânica simples (exemplos: ácido nicotínico, ácido 2,5-di-hidroxibenzóico ou ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico) que apresenta características absorvedoras de luz.

O processo compreende o preparo de uma solução de amostra e matriz. Esta mistura é depositada sobre uma superfície metálica e o solvente, é naturalmente evaporado resultando em uma solução sólido-sólido.



O processo de dessorção-ionização do analito da superfície da matriz é iniciado com a irradiação desta solução com um pulso de laser. A matriz absorve fortemente a radiação do laser promovendo, conseqüentemente, um aquecimento localizado e seletivo. Assim, ela rapidamente se evapora carregando o analito consigo e ionizando-o por protonação (ex:  $MH^+$ ). O íon pseudo-molecular formado é, então, liberado para a fase gasosa e acelerado em direção ao analisador de massas por aplicação de um pulso de alto potencial (20 kV) aplicado à placa (BAKHTIAR E NELSON, 2001).

As características não destrutivas dos processos de vaporização e ionização de MALDI possibilitaram a análise de biomoléculas de tamanhos variados fazendo desta, uma técnica extremamente útil na identificação e caracterização de peptídeos e proteínas.

Os íons gerados são, subseqüentemente, separados no analisador de massas. Em geral, o analisador mais comumente associado à ionização por MALDI, é o do tipo tempo de voo (ToF).

## **1.2 Analisador de massas Tempo de Voo - ToF**

Trata-se de um dos mais simples analisadores no qual a separação dos íons se baseia na aceleração de um conjunto de partículas monocarregadas com a mesma energia, em direção ao detector. Mesmo que dotados da mesma energia os íons, possuindo diferentes massas, irão atingir o detector em tempos diferentes.

Assim, neste analisador, mede-se o tempo que os íons levam para percorrer uma distância fixa e conhecida; razão pela qual recebe o nome de “tempo de voo”. Este tempo está diretamente relacionado com a razão massa/carga da partícula, cuja unidade foi recentemente nomeada “Thomson”(Th), em homenagem a J. J. Thomson, o pioneiro da espectrometria de massas.

A grande vantagem deste analisador na análise de proteínas é que, em teoria, não apresenta limite superior de leitura, podendo ser perfeitamente interfaceado à fonte de ionização de MALDI. Desde que se espere pelo tempo de leitura, pode-se assegurar que todos os íons formados chegarão ao detector, o que permite considerar o equipamento MALDI-TOF altamente sensível e, sua análise, não discriminatória.

### **1.3 Identificação de proteínas por *peptide mass fingerprinting* - PMF**

Na abordagem proteômica, o procedimento geral de identificação de uma proteína se inicia pela sua digestão proteolítica por enzimas específicas como a tripsina, produzindo fragmentos menores (peptídeos) os quais podem ter suas massas determinadas com grande precisão por espectrometria de massas. Conseqüentemente, a proteólise gera um perfil de massas dos peptídeos, semelhante a uma impressão digital, única e específica para cada proteína, denominada *peptide mass fingerprinting* (PMF), através da qual pode-se chegar à identidade da macromolécula em estudo.

Softwares especiais se utilizam desta característica (PMF) da proteína para identificá-la. Isso é feito comparando-se a impressão digital da proteína em estudo (dados experimentais), com as massas de peptídeos teóricos de um determinado banco de dados, os quais são sinteticamente gerados a partir da digestão *in-silico* de todas as seqüências de proteínas constantes neste banco.

Com isso, se a seqüência da proteína em estudo estiver presente no banco de dados, é possível que, a partir de um pequeno número de peptídeos e utilizando-se de instrumentos de exatidão e resolução de massas elevadas, sua identidade seja imediatamente determinada (REINDERS *et al.*, 2004).

---

O processo de identificação por esta metodologia (*peptide mass fingerprinting*) é, sem dúvida, o método mais rápido para caracterizar proteínas provenientes de géis bi-dimensionais (2D).

#### 1.4 Identificação de proteínas por MS/MS

Entretanto, não sendo possível a identificação da proteína pelo PMF, uma outra estratégia consiste em recorrer à aquisição de informações da seqüência do peptídeo. Isso é feito pela seleção, isolamento e fragmentação dos peptídeos (ion precursor) dentro do espectrômetro de massas.

Este procedimento se tornou possível graças aos recursos inovadores da técnica de MS ao permitir a conjugação de dois ou mais analisadores de massas, em série (*tandem*), resultando em aumento significativo de sensibilidade e poder de resolução do método.

A espectrometria de massas em série (MS/MS) equivale a dois estágios de análise de massas processadas de forma sequencial, em um único experimento. Os analisadores associados em série, separados por uma célula de colisão, permitem que uma só molécula ionizada seja fragmentada pelo choque com um gás inerte, num processo conhecido por dissociação induzida por colisão (CID), originando uma série de novos fragmentos. A análise das massas dos fragmentos obtidos fornece informações sobre a seqüência primária da molécula original permitindo determinar, inclusive, eventuais alterações químicas em algum resíduo de aminoácido da proteína. Neste caso, diz-se que a identificação da proteína é feita por MS/MS.

Analisadores em série, como o MALDI-QToF, tem sido empregados para identificar proteínas isoladas por eletroforese uni e bi-dimensional a nível de femtomoles. A resolução de massas e exatidão elevadas apresentadas por este tipo de

---

instrumento, nos modos MS e MS/MS, permitem a identificação de uma proteína tanto pelo PMF da proteína digerida quanto por MS/MS (espectrometria de massas em série) através da dissociação, induzida por colisão, de peptídeos precursores (SHEVCHENKO *et al.*, 2000).

### 1.5 Busca em bancos de dados

A finalização do processo de identificação de proteínas e peptídeos se dá pelo acesso, à internet, aos bancos de dados de seqüências de genes. Paralelamente ao preparo e análise por MS da amostra, a interpretação dos dados é etapa fundamental para a conclusão, com sucesso, da identificação de proteínas e peptídeos. Para tanto, diversos algoritmos (SEQUEST, MASCOT, PROFOUND) estão disponíveis na Internet (CHAMRAD *et al.*, 2004).

O processo de busca no banco de dados requer que certos parâmetros sejam fornecidos para orientar a pesquisa na internet. De maneira simplificada, a busca é feita através de uma digestão teórica (*in silico*) das proteínas do banco de dados e, confrontando-se os resultados obtidos com os dados de MS e MS/MS (seqüência de aminoácidos) da amostra.

Se a primeira proteína do banco de dados possuir algum peptídeo com a mesma massa molecular do peptídeo em estudo passa-se, então, a comparar os espectros de MS/MS. Caso não ocorra esta coincidência, uma próxima proteína do banco de dados deve ser avaliada da mesma forma.

No entanto, quando uma proteína do banco de dados é identificada com a amostra, os resultados obtidos com a busca recebem uma pontuação (*score*). Além desta informação, são fornecidos dados relativos ao número de acesso no banco de

dados (NCBI, MSDB), massa molecular, potencial isoelétrico, cobertura da seqüência, espectros de massas (MS) e MS/MS da proteína identificada.

Assim, a combinação dos dados espectrais de MS e MS/MS adquiridos experimentalmente com as ferramentas de busca em bancos de dados, possibilita que proteínas provenientes de digeridos enzimáticos de gel 2D, sejam caracterizadas na elucidação de misturas protéicas complexas (GIORGIANNI, 2003), como as de bactérias.

Particularmente para o caso de organismos cujos genomas estão incompletos ou não seqüenciados, a análise de proteínas utilizando-se desta estratégia, pode se tornar uma tarefa desafiadora. Além disto, o êxito da identificação de uma proteína pela técnica de espectrometria de massas, é fortemente influenciado pela quantidade de proteína na amostra, do grau de modificação pós-traducional e da qualidade das buscas automáticas. Portanto, o conhecimento do genoma de um organismo é de grande importância para permitir a identificação exata das proteínas pelo padrão de peptídeos, como deve ser na análise proteômica.

## **2. OBJETIVOS**

Objetivou-se, nesta etapa do trabalho, analisar proteínas diferencialmente expressas em bactérias e bacterióides do *B. elkanii* (SEMIA 587), isoladas por eletroforese bidimensional, empregando-se a técnica de espectrometria de massas - MALDI-QToF.

### **3. EXPERIMENTAL**

Após análise diferencial das imagens dos géis da bactéria e do bacterióide, conforme descrito no Capítulo 2, os spots diferencialmente expressos, selecionados para análise por MS foram tratados segundo procedimento a seguir.

#### **3.1 Descoloração dos spots**

Uma vez selecionadas, as proteínas a serem seqüenciadas tiveram seus spots manualmente recortados dos géis e, os fragmentos, acondicionados em eppendorfs previamente lavados com metanol (2 vezes) e água Milli-Q.

Estes fragmentos de gel foram descorados empregando-se três lavagens sucessivas com solução de bicarbonato de amônio 25 mmol L<sup>-1</sup> em acetonitrila 50% (pH 8,0). Ao final, efetuou-se uma lavagem com água Milli-Q para remoção do bicarbonato de amônio e, o sobrenadante, foi desprezado.

#### **3.2 Desidratação dos spots**

Após descoloração, os spots de proteínas foram desidratados pela adição de um pequeno volume (100 µL) de acetonitrila 100%, incubados por cerca de 5 min, à temperatura ambiente e, completamente secos em *speed vac*.

#### **3.3 Digestão enzimática**

A digestão enzimática realizada com tripsina, possibilita uma especificidade elevada ao promover a quebra das seqüências peptídicas nos resíduos de lisina e arginina. O gel foi re-hidratado com 15 µL de solução gelada de Tripsina 0,02 µg/mL (PROMEGA, cat. # V511).

Passados 10 min a 4°C, foram adicionados 50 µL de solução de bicarbonato de amônio 25 mmol L<sup>-1</sup> à reação enzimática e, esta mistura foi incubada por 24 horas a 37°C.

### 3.4 Extração dos peptídeos

Cessado o período de incubação, o sobrenadante do tubo contendo o digerido foi transferido para um novo eppendorf, tratado com metanol e água Milli-Q.

Para extração quantitativa dos peptídeos digeridos, adicionou-se 50 µL de acetonitrila 50% com TFA 5% ao fragmento de gel e, a mistura foi suavemente agitada por 30 min. O sobrenadante foi coletado para o novo tubo contendo os peptídeos e, este procedimento, foi repetido por mais uma vez.

### 3.5 Dessalinização dos peptídeos (*Zip-Tip*)

Após cuidadosa análise dos géis bidimensionais, foram selecionadas proteínas de maior interesse para dessalinização empregando-se, para isso, colunas *zip-tip*. Tal procedimento objetivou a melhor ionização das moléculas e conseqüente identificação das proteínas com os dados obtidos no espectrômetro de massas.

O condicionamento das colunas *zip-tip* foi feito com ácido fórmico 0,2%. Os peptídeos aplicados à coluna, foram lavados com solução 0,2% de ácido fórmico e, eluídos com 30 µL de ácido fórmico 5% em metanol 60%. O elutato foi concentrado em *speed vac* e, analisado em espectrômetro de massas MALDI-QToF.

---

### 3.6 Espectrometria de massas (MALDI-QToF)

Os peptídeos provenientes da digestão trípica dos spots dos géis, foram analisados em espectrômetro de massas MALDI-QToF Premier (Micromass) pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massas (MAS) do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em Campinas-SP.

A matriz empregada foi o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico. Volumes iguais de uma solução  $10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  da matriz e do digesto foram homogeneizados e aplicados na placa de MALDI. Após a cristalização da mistura (amostra + matriz), espectros de MS e MS/MS foram adquiridos de forma automática, através de uma varredura no intervalo de  $m/z$  compreendido entre 1000 e 3000. Picos com intensidades superiores a 30 unidades, foram submetidos à fragmentação (MS/MS) na câmara de colisão e, os dados de MS e MS/MS obtidos experimentalmente, foram empregados na determinação da identidade das proteínas através da ferramenta de busca Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

### 3.7 Busca no Banco de dados MASCOT

As buscas no banco de dados utilizando-se das informações espectrométricas (MS e MS/MS) obtidas por MALDI-QToF, foram norteadas por alguns parâmetros previamente estabelecidos e indicados em campos específicos, conforme se pode conferir através da Figura 3.1.

A fim de permitir maior abrangência às pesquisas, utilizou-se o banco de dados constituído pelo maior número de seqüências já depositadas - o National Center (NCBI); e não se especificou o organismo em estudo permitindo a busca em todas as entradas, dada a atual indisponibilidade do genoma *B. elkanii*.



A tripsina foi a enzima utilizada na digestão das proteínas. Durante a reação triptica, a enzima pode falhar na clivagem de um ou mais sítios da cadeia polipeptídica. Por isso, uma busca mais próxima do real deve ser feita considerando-se ao menos uma provável falha na clivagem da cadeia.

Durante a pesquisa, foram consideradas possíveis ocorrências de modificações estruturais na proteína. Devido ao tratamento dado ao spot do gel, a carbamidometilação das cisteínas e oxidação das metioninas foram, respectivamente, as ocorrências fixa e variável mais prováveis nas condições eletroforéticas empregadas.

Para tornar a busca mais confiável, restringiu-se o erro máximo de  $m/z$  admitido na identificação dos íons a 0,1 Da, tanto para os dados de MS quanto para MS/MS.

The screenshot displays the Mascot MS/MS Ions Search web interface. The browser window title is "Matrix Science - Mascot - MS/MS Ions Search - Windows Internet Explorer". The address bar shows the URL: "http://www.matrixscience.com/cgi/search\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS". The page header includes the Matrix Science logo and navigation links: HOME | WHAT'S NEW | MASCOT | HELP | PRODUCTS | SUPPORT | TRAINING | CONTACT. The main heading is "MASCOT MS/MS Ions Search". The search form contains the following fields and values:

- Your name: Ana Paula de Oliveira Sader
- Email: anasader@fcav.unesp.br
- Search title: Spot no. 961 - Bacterióide
- Database: NCBI nr
- Taxonomy: All entries
- Enzyme: Trypsin
- Allow up to: 1 missed cleavages
- Fixed modifications: Carbamidomethyl (C), Carbamyl (K), Carbamyl (N-term), Carboxymethyl (C), Cation:Na (C-term)
- Variable modifications: Oxidation (M), Phospho (ST), Phospho (Y), Propionamide (C), Pyridylethyl (C)
- Quantitation: None
- Peptide tol. ±: 0.1 Da, # 13C: 0
- MS/MS tol. ±: 0.1 Da
- Peptide charge: 1+
- Monoisotopic:  Average
- Data file: Spot 961.raw
- Data format: Mascot generic
- Precursor: m/z
- Instrument: MALDI-QUAD-TOF
- Error tolerant:
- Decoy:
- Report top: AUTO hits

Buttons: Start Search ... and Reset Form.

**Figura 3.1.** Página da web de acesso ao Mascot, onde foram estabelecidos os parâmetros que orientaram as buscas no banco de dados.

---

Orientado por estes parâmetros, o Mascot submeteu a busca de todos os spots analisados. Para tanto, a sistemática adotada consiste de uma digestão teórica das proteínas constantes no banco de dados. Com isso, são gerados peptídeos teóricos, os quais têm suas  $m/z$  comparadas àquelas dos dados de MS e MS/MS obtidos experimentalmente por MALDI-QToF.

A identificação, quando assim ocorre, recebe uma pontuação em termos de probabilidade (*score*). Quando a confiança desta identificação não atinge níveis aceitáveis, uma próxima proteína da lista do banco de dados é submetida à digestão teórica e assim sucessivamente, até que a proteína em questão seja inequivocadamente identificada.

## **4. RESULTADOS e DISCUSSÃO**

### **4.1 Espectrometria de massas – MALDI-QToF**

Os dados de MS e MS/MS obtidos experimentalmente foram processados com auxílio da ferramenta *Mascot Daemon* a qual, de forma automatizada, promoveu a conversão dos dados analíticos/experimentais (raw) em arquivos com a extensão mgf. Estes, por sua vez, quando submetidos à busca no Banco de Dados do Mascot, permitiram a identificação de um certo número de proteínas tanto para a bactéria (forma *in vitro*) quanto para o bacterióide (forma *simbionte*) cujos dados estão sumarizados, respectivamente, nas Tabelas 3.1 e 3.2.

Durante as buscas, é possível que um determinado spot corresponda a diferentes proteínas. Este é o caso, por exemplo, do spot de número 753 (Tabela 3.1) o qual foi identificado como *translation elongation factor TU* em uma busca e, como *COG0050: GTPases - translation elongation factors*, em outra. Tal fato se deve a grande

similaridade observada entre as macromoléculas e à proximidade dos valores de massa molecular e potencial isoelétrico apresentado pelas mesmas.

As informações acerca das proteínas identificadas vão além dos dados resumidos nas Tabelas 3.1 e 3.2. Além dos peptídeos identificados, dados relativos a  $pI$ ,  $MM$ , erros em relação à  $m/z$  e de cobertura da seqüência de aminoácidos são fornecidos.

Para exemplificar a complexidade e número de informações geradas pela busca no banco de dados, foram tomadas as proteínas referentes aos spots de números 760 para a bactéria (Tabela 3.3) e 973 para o bacterióide (Tabela 3.4). Os espectros de massas das referidas proteínas quando analisadas de forma intacta (MS) e quando submetidas às fragmentações dentro do espectrômetro (MS/MS), também podem ser visualizados através das Figuras 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5.

**Tabela 3.1.** Descrição das proteínas identificadas (Mascot) por Maldi-QToF, referentes à amostra de bactéria (*Bradyrhizobium elkanii*, SEMIA 587).

Acesso	Identificação	Spot	pI		MW (kDa)		Organismo
			Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	
gij 86749386	Translation elongation factor TU	753	6,55	5,53	103	44	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> HaA2
gij 23014093	COG0050: GTPases - translation elongation factors	753	6,55	5,34	103	43	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1
gij 47777364	Putative AAA-type ATPase	1068	5,63	5,46	25	55	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)
gij 27381056	s-adenosylmethionine synthetase	760	7,66	5,88	36	44	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110
gij 2081612	DeltaL-pyrroline-5-carboxylate synthetase	1085	8,05	6,34	22	78	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)
gij 109090293	PREDICTED: similar to PDZ domain containing 7 isoform	954	6,08	8,99	34	55	<i>Macaca mulatta</i>
gij 150003463	Conserved hypothetical protein, putative glycosyltransferase	648	7,55	880	49	43	<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482
gij 27376634	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	846	4,39	7,77	29	36	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110
gij 27380513	Elongation factor TU	744	6,19	5,78	58	44	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110
gij 27375551	ATP synthetase subunit B	674	5,61	5,13	45	51	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110
gij 27382906	Two-component response regulator	953	5,53	5,04	34	30	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110
gij 27380419	Anti-oxidant protein	1000	7,55	6,10	29	24	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110

**Tabela 3.2.** Descrição das proteínas identificadas (Mascot) por Maldi-QToF, referentes à amostra de bacterióide.

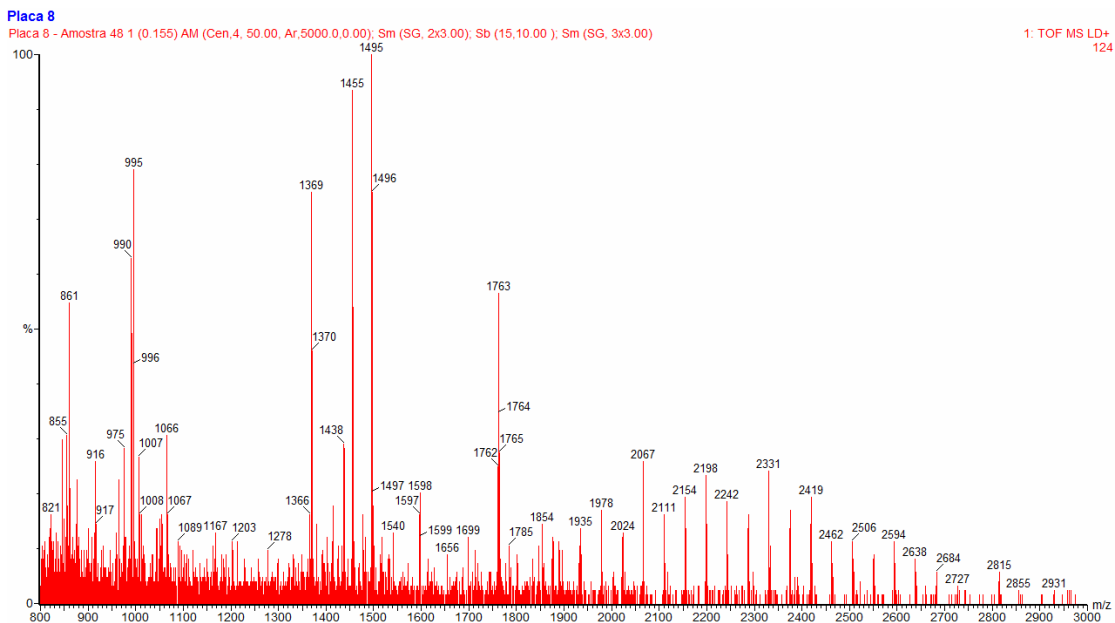
Acesso	Identificação	Spot	pI		MW (kDa)		Organismo
			Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	
gij119874243	Dinitrogenase reductase	961	5,13	4,79	39	22	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
gij27380338	Chaperonin GroEL	678	5,55	5,43	78	58	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110
gij17938875	Dehydrogenase	1210	7,51	9,65	36	33	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58
gij126139970	60S ribosomal protein	930	7,22	11,60	45	24	<i>Pichia stipitis</i> CBS 6054
gij29654768	Antioxidant, AhpC/TSA family	1158	4,75	4,79	23	21	<i>Coxiella burnetii</i> RSA 493
gij27380338	chaperonin GroEL	716	2,95	5,43	53	58	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110
gij128264	Nitrogenase iron protein	973	3,42	5,03	34	32	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ANU 289
gij27380736	Co-chaperonin GroEs	1226	2,68	7,93	20	11	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110
gij1209054	electron transfer flavoprotein beta subunit	1088	5,73	8,86	50	27	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110
Q5WU96_LEGPL	Hypothetical protein blr 2510	1158	4,75	4,70	23	20	<i>Legionella pneumophila</i> (strain Lens)
Q3SPG5_NITWN	10 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein)	1226	5,66	7,96	14	11	<i>Nitrobacter winogradskyi</i> (strain Nb-255 / ATCC 25391)

**Tabela 3.3.** Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot no. 760 da amostra de bactéria (*Bradyrhizobium elkanii*, SEMIA 587), submetida à análise por MALDI-QToF.

Nº spot:		Resultados experimentais (gel 2D)					
760	pI: 7,66	MM (kDa): 36					
<b>MASCOT</b> – Score: 110 – Cut-Off: 49							
Banco de Dados: NCBI		Taxonomia: All entries					
Nome da proteína		S-adenosylmethionine synthetase					
Código de acesso (NCBI)		gil27381056					
pI / MM (teóricos)		5,88/ 43613 Da					
Organismo		<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110					
							Peptídeos identificados
<i>m/z</i>	<i>z</i>	MM	MM	Erro(Da)	Clivagens	Sequência	Score
observada		experimental	calculada		perdidas		
1369.6567	1	1368.6494	1368.6925	-0.0431	0	R.ISDEIVDLFYR.E	56
1454.7271	1	1453.7198	1453.7790	-0.0591	0	R.SHLDLNRPIYAR.T	36
1495.6555	1	1494.6482	1494.7103	-0.0621	0	K.FYIGGPDGDAGLTGR.K	17
Sequência Primária (398 aminoácidos)							
	<b>1</b>	MRASYLFTSE	SVSEGHDPKV	CDR <b>ISDEIVD</b>	<b>LFYR</b> EGPKAG	IDPWQIRAAC	
	<b>51</b>	ETLATTNKVV	IAGETRGPKS	VTNEQIEGVV	RAAIKDIGYE	QEGFHWKTCD	
	<b>101</b>	IEILLHPQSA	DIAQGVDALQ	PGEVKKEGAG	DQGIMFGYAT	NETPDLMPAP	
	<b>151</b>	IFYAHKILRL	ISEARHSGRE	KVLGPDSKSQ	VTVQYENGKP	VGPREIVVSH	
	<b>201</b>	QHLPDLTSS	QVRDIVEPYV	REALPKDWIT	PKTIWHINPT	<b>GK<b>FYIGGPDG</b></b>	
	<b>251</b>	<b>DAGLTGR</b> KII	VDTYGGAAPH	GGGAFSGKDP	TKVDRSAAAYA	ARYVAKNIVA	
	<b>301</b>	AGLADRCTLQ	LAYAIGVARP	LSIYIDTHGT	GKVPEEQLEK	AAAQAMDLP	
	<b>351</b>	RGIR <b>SHLDLN</b>	<b>RPIYAR</b> TSAY	GHFGRTPDNE	GGFSWEKTDL	VEQLKRAL	
Cobertura da sequência		(38/398)*100 = 9 %					

**Tabela 3.4.** Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot no. 973 da amostra de bacterióide, submetida à análise por MALDI-QToF.

Nº spot:		Resultados experimentais (gel 2D)					
973		pI: H 3,42				MM (KDa): H 34	
<b>MASCOT</b> – Score: 119 – Cut-Off: 50							
Banco de Dados: NCBI		Taxonomia: All entries					
Nome da proteína		Nitrogenase iron protein (Nitrogenase component II) (Nitrogenase Fe protein) (Nitrogenase reductase)					
Código de acesso (NCBI)		gil128264					
pI / MM (teóricos)		5,03/ 31902 Da					
Organismo		<i>Bradyrhizobium sp.</i> ANU 289					
							Peptídeos identificados
<i>m/z</i>	<i>z</i>	MM	MM	Erro(Da)	Clivagens	Seqüência	Score
observada		experimental	calculada		perdidas		
1180.6135	1	1179.6062	1179.5996	0.0066	0	R.DNVVQHAELR.R	25
1306.7582	1	1305.7509	1305.7445	0.0064	0	K.LGTQLIYFVPR.D	31
1434.8511	1	1433.8438	1433.8395	0.0044	1	K.KLGTQLIYFVPR.D	63
Seqüência Primária (294 aminoácidos)		<b>1</b> MSSLRQIAFY GKGIGKSTT SQNTLAALAE MGQKILIVGC DPKADSTRLI <b>51</b> LHAKAQDTIL SLAASAGSVE DLELEDVMKV GYKDIRCVES GGPEPGVGCA <b>101</b> GRGVITSINF LEENGAYENI DYVSYDVLGD VVCGGFAMPI RENKAQEIYI <b>151</b> VMSGEMMAMY AANNISKGIL KYANSGGVRL GGLICNERQT DKELELAEAL <b>201</b> AK <b>KLGTQLIY FVPRDNVQH AELR</b> RMTVLE YAPESQQADH YRNLATKVHN <b>251</b> NGGKGIPTP ISMDELEDML MEHGIMKPV D ESIVGKTAAE LAAS					
Cobertura da seqüência		(22/294)*100 = 7 %					

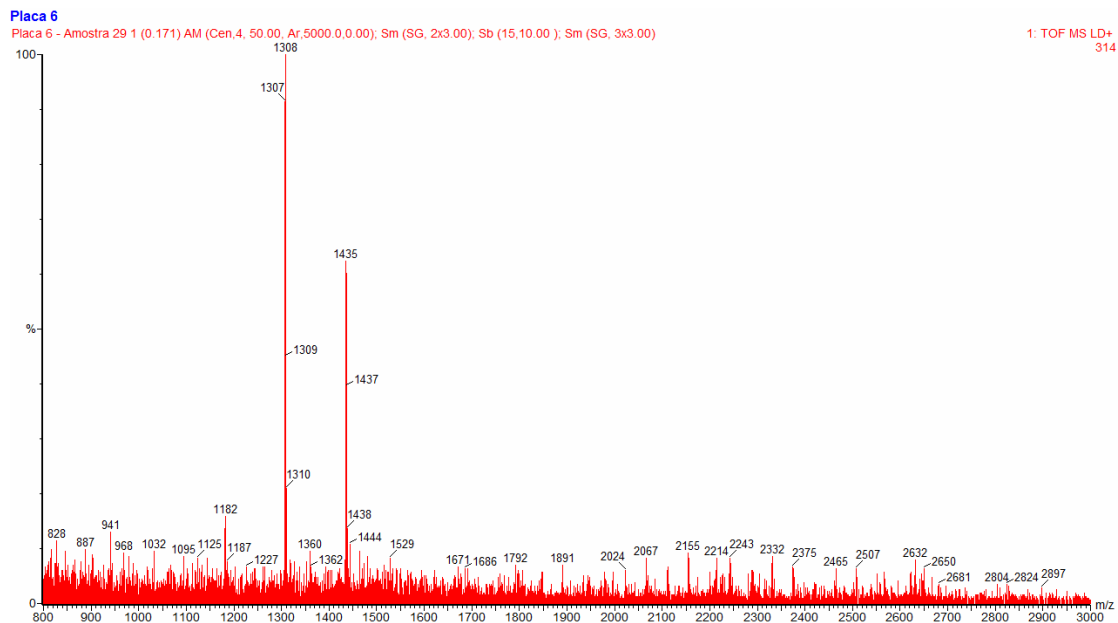


**Figura 3.2.** Espectro de PMF obtido por MALDI-QToF referente ao spot nº 760 da amostra de bactéria (*Bradyrhizobium elkanii*, SEMIA 587).

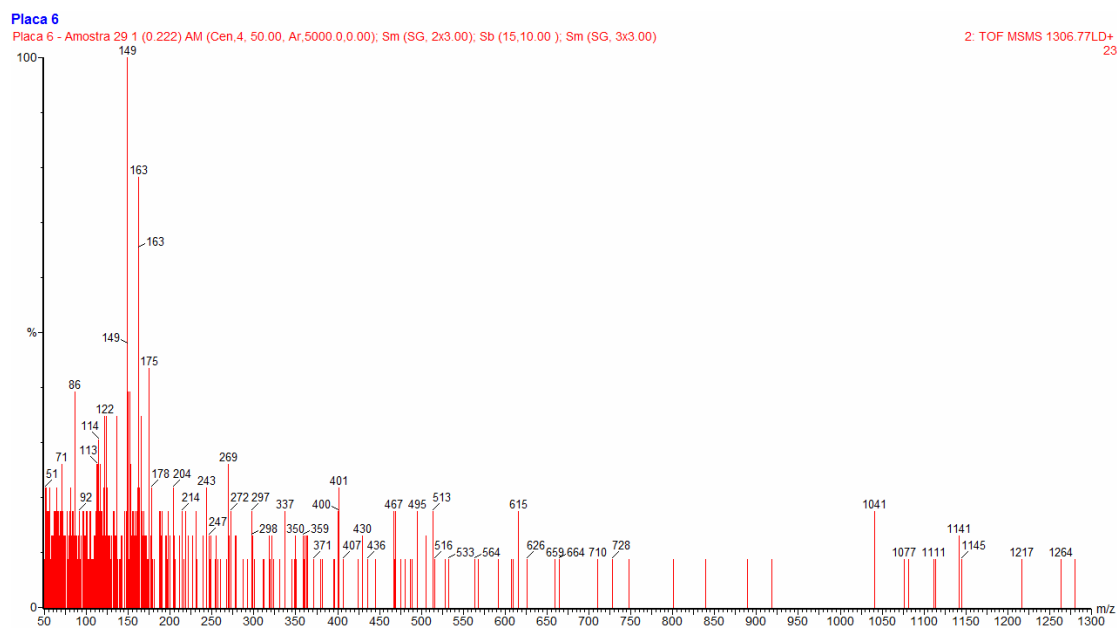


**Figura 3.3.** Espectro de MS/MS obtido automaticamente por MALDI-QToF referente ao spot nº 760 ( $m/z$  1495) da amostra de bactéria.





**Figura 3.4.** Espectro de PMF obtido por MALDI-QToF referente ao spot nº 973 da amostra de bacterióide.



**Figura 3.5.** Espectro de MS/MS obtido automaticamente por MALDI-QToF referente ao spot nº 973 ( $m/z$  1306) da amostra de bacterióide.

---

Muitos dos spots analisados, não foram identificados ou obtiveram identificação não significativa. Tal fato, pode ser atribuído a diversos fatores dentre eles, à baixa concentração de proteínas na amostra no caso de spots muito pequenos ou pouco intensos no gel, à ionização insatisfatória de peptídeos no processo de MALDI, à indisponibilidade de um banco de genes (proteínas) específico para o organismo em estudo e à ausência da proteína em questão no banco de dados do NCBI, onde foram efetuadas as pesquisas.

Algumas proteínas, como a *dinitrogenase reductase* referente ao spot 961 do bacterióide, foram identificadas com *scores* inferiores ao *cut off*. Isso significa dizer que, esta identificação foi um evento randômico ou seja, de baixa confiança.

Particularmente para esta proteína, a qual apresentou uma identificação com pontuação igual a 73, apenas *scores* maiores do que 80 podem ser considerados significativos. Entretanto, é sabido que esta proteína está presente nas formas simbióticas de bactérias do grupo de Rizóbios, com função claramente definida no processo de redução do nitrogênio atmosférico. Por esta razão é que, certas proteínas, serão consideradas inequivocadamente identificadas neste trabalho, apesar dos valores de *score* apresentados terem ficado abaixo do estipulado *cut off*.

Os dados experimentais de potencial isoelétrico e de massa molecular das proteínas identificadas pela busca também mostraram relativa discrepância com relação aos valores teóricos, obtidos experimentalmente dos géis 2D.

Esta variação observada nos valores de *pI* pode ter ocorrido devido ao fato de terem sido utilizadas fitas com gradiente de *pH* não linear na etapa de focalização isoelétrica. Este tipo de fita, por apresentar resolução diferenciada na faixa de *pH* de 5 a 7, pode ter ocasionado estas divergências durante a análise das imagens dos géis utilizando-se do software Image Master 2D Platinum (Amersham Biosciences). Já para

a segunda dimensão, erros em torno de 20% na determinação dos valores de massa molecular são bastante comuns.

Avaliando-se as proteínas da bactéria do *B. elkanii* (Tabela 3.1), cujos valores de identificação foram consideravelmente maiores do que o valor limite, nota-se coerência em relação às condições de desenvolvimento em que a bactéria foi obtida e coletada para análise espectrométrica.

A presença de proteínas de tradução - como a *translation elongation factor TU*, *COG0050: GTPases - translation elongation factors, Putative AAA-type ATPase*, expressas na bactéria - é resultado da atividade de síntese protéica pelo microrganismo. A *elongation factor TU* tem uma participação importante na síntese protéica. A entrega de um aminoácido específico ao ribossomo tradutor é uma tarefa fundamental no processo de síntese de proteínas. A ligação do *aminoacyl-transfer RNA* ao ribossomo é catalisada pelo fator de alongação Tu (EF-Tu). Este fator de alongação, o *aminoacyl-tRNA* e GTP formam um complexo ternário estável, que se liga ao ribossomo (STARK *et al.*, 1997).

Considerando-se que o microrganismo foi obtido na sua fase logarítmica de desenvolvimento, presume-se que esteja sofrendo divisões celulares e sintetizando aminoácidos, os quais vão compor as proteínas constitutivas, de reserva, de membrana e outras mais, com funções vitais para seu crescimento e subsistência. Tal suposição pode ser reforçada diante da existência de *s-adenosylmethionine synthetase* e *deltal-pyrroline-5-carboxylate synthetase*, as quais se classificam como sendo enzimas responsáveis pela biossíntese de aminoácidos - monômeros das macromoléculas proteicas.

A *deltal-pyrroline-5-carboxylate synthetase*, é uma enzima bifuncional capaz de catalisar a conversão do glutamato à *[delta]-pyrroline-5-carboxylate* a qual, por sua vez,

é reduzida à prolina. O meio de cultura em que as bactérias foram cultivadas (YML) é composto de extrato de levedura e manitol como fontes de carbono e nitrogênio. Assim, por tratar-se de um meio rico e composto, as unidades monoméricas para síntese de proteínas na bactéria devem ser sintetizadas *in vivo*. Adicionalmente, glutamato é um aminoácido chave no metabolismo geral do nitrogênio culminando na síntese de outros aminoácidos e nucleotídeos (SHATTERS; SOMERVILLE; KAHN, 1989).

A manutenção e divisão celular do microrganismo requerem a atividade da maquinaria bioquímica relacionada ao anabolismo de macromoléculas como proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Adicionalmente, tais processos requerem energia e envolvem o gasto de ATP. Associado a este papel, destacam-se enzimas do metabolismo energético e metabolismo intermediário central.

A *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* se constitui em uma proteína do metabolismo energético envolvida na glicólise, processo de quebra da glicose, relacionado ao metabolismo de carboidratos. Durante este processo, gliceraldeído-3-fosfato é convertido em piruvato culminando na formação de acetil-CoA, molécula central no metabolismo geral (ARIAS E MARTINEZ-DE-DRETS, 1976). Em *B. elkanii*, o metabolismo de carboidratos através da glicólise deve ocorrer através da via Entner-Doudoroff com operação simultânea da via Emben-Meyerhof-Parnas (MULONGOY E ELKAN, 1977).

Ainda em relação ao metabolismo de carboidratos, também foram encontradas enzimas glicosiltransferases, tais como a *conserved hypothetical protein, putative glycosyltransferase*, que atuam como catalisadores no processo de transferência de uma unidade de monossacarídeo de um glicosil doador (fosfato-açúcar ativado) para uma molécula aceptora, comumente um álcool.

---

A *ATP synthetase subunit B* participa do metabolismo de energia celular. Uma *ATP synthetase* é um termo geral para uma enzima capaz de sintetizar adenosina trifosfato (ATP) à partir de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico ( $ADP + P_i \rightarrow ATP$ ), utilizando-se de alguma forma de energia. Estas enzimas desempenham um papel de crucial importância na maioria dos organismos, porque o ATP é a forma corrente de energia das células.

A *PREDICTED: similar to PDZ domain containing 7 isoform*, se classifica como uma proteína de transdução de sinal. O domínio PDZ é um domínio estrutural comum de 80-90 aminoácidos encontrado em proteínas sinalizadoras de bactérias, leveduras, plantas e animais. A proteína *Two-component response regulator*, está ligada ao domínio PDZ e, apresenta função regulatória ou seja, são senso-transmissoras de sinais. Proteínas transportadoras e reguladoras são ativamente importantes na modulação de eventos celulares tais como absorção, metabolismo, efetividade celular e toxicidade, através da excreção.

A *anti-oxidant protein* pertence à categoria de proteínas envolvida nos processos celulares e, à subcategoria de detoxificação. Com o envelhecimento da cultura, os nutrientes do meio vão se esgotando e, por ação desta proteína, a bactéria passa a secretar radicais livres como sub-produto do seu catabolismo.

A começar pelas isoformas da dinitrogenase redutase ou Fe-proteína, a qual participa do metabolismo intermediário central, as proteínas do bacterióide (Tabela 3.2) identificadas por MALDI-QToF estão direta ou indiretamente associadas ao processo de redução do nitrogênio atmosférico à amônia.

A reação química de redução do nitrogênio gasoso à amônia ( $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \longrightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i$ ) é catalisada pela nitrogenase (NUNES; RAIMONDI; NIEDWIESKI, 2003). Esta enzima é composta por dois

componentes protéicos, que são a dinitrogenase redutase e a dinitrogenase. Atuando de forma sincronizada, a primeira prepara e doa dois elétrons de elevado potencial para a dinitrogenase. Esta, por sua vez catalisa, efetivamente, a redução do N<sub>2</sub> atmosférico convertendo-o na forma assimilável pelas plantas (amônia).

A *electron transfer flavoprotein beta subunit* é uma proteína que participa do metabolismo energético realizando processos de óxido-redução. Estas proteínas são carreadoras e doadoras de elétrons e podem reduzir a dinitrogenase redutase, a qual por sua vez reduzirá a dinitrogenase através da transferência de elétrons. Quando certo potencial redox da dinitrogenase é alcançado esta enzima catalisa a redução do nitrogênio atmosférico em amônia, o que vem a ser o processo de fixação do nitrogênio.

Ainda neste contexto, as *dehydrogenases* são enzimas que promovem a oxidação de substratos pela transferência de um ou mais prótons e um par de elétrons para um aceptor, em geral NAD/NADP ou uma *flavin coenzyme* tal como FAD ou FMN. Adicionalmente, desidrogenases específicas atuam no ciclo do ácido cítrico (TCA), alimentando a conversão de piruvato a Acetil-CoA. A acetyl-CoA, por sua vez, pode ser usada no ciclo do ácido cítrico para promover a respiração celular. Sabe-se que o ciclo TCA é predominantemente ativo em bacterióides, sendo o processo central que interliga todo o metabolismo do simbiote (LODWIG E POOLE, 2003).

A família AhpC/TSA contém proteínas relacionadas à alquil-hidroperóxido redutase (AhpC) e à *thiol specific antioxidant* (TSA). A AhpC é responsável pela redução direta de hidroperóxidos orgânicos em suas formas reduzidas “ditiol”. Já a TSA, é considerada uma importante antioxidante fisiológico o qual constitui uma defesa enzimática contra radicais contendo enxofre. Adicionalmente ao papel fisiológico de proteção, estas proteínas podem estar envolvidas na biossíntese e manutenção do

complexo 4Fe-4S da dinitrogenase redutase, ou Fe-proteína. Este grupo constitui-se em um importante centro ativo na transferência de elétrons para a dinitrogenase.

Em bacterióides foram encontradas isoformas para o complexo chaperona GroEL/GroES: *chaperonin GroEl*, *Co-chaperonin GroEs*, *Co-chaperonin GroES* e *10 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (GroEs protein)*. Estas proteínas participam de processos celulares e são consideradas indispensáveis para o funcionamento adequado de todos os organismos procariotos e eucariotos. Proteínas em formação podem formar dobramentos incorretos que prejudicariam sua função biológica associada a sua estrutura terciária e quaternária. Chaperonas podem prevenir e reverter estes dobramentos impróprios através da associação simultânea com a proteína em processo de síntese, durante ou após a tradução do respectivo transcrito de RNA, aumentando a eficiência do processo.

O sistema das chaperoninas bacterianas compreende duas proteínas “parceiras”, GroEL e a GroES, que media o dobramento da proteína em um estilo ATP-dependente. Elas envolvem a proteína nascente como uma gaiola oferecendo um ambiente seguro para a macromolécula. GroES liga-se ao topo de GroEL e forma uma espécie de “gaiola” em torno da proteína. Durante esta interação, GroEL sofre grande mudanças conformacionais (SHIMAMURA *et al.*, 2003). Associado ao processo de síntese protéica também foi encontrada uma proteínas ribossomal 60S, a qual atua em conjunção com o rRNA compondo as subunidades ribossomais envolvidas nos processos celulares de tradução. Contudo, é importante ressaltar que a síntese protéica é reduzida nas células bacterióides, um vez que a energia celular é canalizada para o processo de fixação biológica do nitrogênio (KARR E EMERICK, 1996).

Finalmente, uma proteína *hypothetical protein blr 2510* foi determinada. Uma vez que os papéis das proteínas analisadas neste trabalho foram determinadas por

homologia com seqüências depositadas em bancos de dados, proteínas classificadas como hipotéticas podem ser encontradas. Isto reflete a ausência de homologia com proteínas ou funções conhecidas.

## **5. CONCLUSÕES**

A bactéria, cultivada em meio YML, apresentou genes com categorias relacionadas às funções de tradução e biossíntese de aminoácidos, culminando na produção de mais proteínas e enzimas necessárias para o metabolismo bacteriano. Associada a estas proteínas, destacaram-se as funções relacionadas com o metabolismo energético e intermediário central, cujas enzimas estão envolvidas na produção de energia a partir dos recursos de nutrientes disponíveis no meio. Estes dados são condizentes com o fato das proteínas terem sido coletadas de bactérias em fase logarítmica de crescimento. Esta fase corresponde ao período de maior atividade metabólica celular, em que as células utilizam os nutrientes, processando-os para a síntese de macromoléculas que serão utilizadas na composição de membrana celular e outras estruturas. Estas macromoléculas são necessárias para geração das novas bactérias, pela acentuada divisão celular observada nesta fase de desenvolvimento. Desta forma, conclui-se que o metabolismo bacteriano nesta fase está intimamente relacionado às proteínas do tipo *housekeeping*, ou seja, que são tipicamente responsáveis pela manutenção celular.

Por outro lado, quanto às proteínas isoladas do bacterióide endossimbionte, observa-se que as mesmas estão relacionadas com um metabolismo mais específico, justamente voltado para a fixação biológica do nitrogênio atmosférico. Mais uma vez, proteínas relacionadas com o metabolismo energético foram abundantes nestas



células. Contudo, neste caso, este metabolismo está voltado para manutenção da atividade da enzima nitrogenase, que catalisa a redução do nitrogênio atmosférico à amônia. A fixação do N requer um gasto elevado de energia na forma de ATP. Assim, a síntese de ATP e o controle do balanço redox intracelular são essenciais para que ocorra a transferência de elétrons dos cofatores para os sítios ativos das enzimas dinitrogenase redutase e dinitrogenase.

Dentre a totalidade dos spots analisados, um número maior de proteínas poderia, certamente, ter sido identificado se o genoma do *B. elkanii* estivesse completamente seqüenciado. A inexistência de um banco de dados específico para o organismo em estudo resulta na limitação da identificação das proteínas, já que a quantidade de informação depositada nos bancos de dados torna-se bastante reduzida, e comprova o ineditismo deste trabalho.

Em conseqüência disso, muitas proteínas identificadas aqui não são proteínas de bactérias. Observa-se (Tabelas 3.1 e 3.2) que muitas proteínas de *B. elkanii* analisadas podem ter sido associadas à proteínas de outros organismos. Tais associações podem ter ocorrido pelo fato de ter-se considerado, durante a busca, as elevadas similaridades entre as seqüências dos peptídeos identificados experimentalmente com os peptídeos de proteínas do banco de dados. Dados estes, concordantes com os elevados *scores* obtidos para os peptídeos identificados.

Diante disso, pode-se afirmar que a proteína presente no gel bidimensional apresenta uma seqüência de peptídeos semelhante a da proteína identificada mas quanto a sua função, não necessariamente seria a mesma, restando estudos mais completos de função, atividade e estrutura para cada nova proteína diferentemente expressa.

# Capítulo 4

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Tecnologia Multidimensional de Identificação de Proteínas - MudPIT**

A análise proteômica vem sendo extensivamente empregada para responder questões biológicas desafiadoras. No entanto, ao se deparar com misturas complexas e, levando-se em conta que esta ciência visa identificar o maior número de proteínas presentes em um organismo em uma dada condição fisiológica, o isolamento destas macromoléculas previamente à análise por espectrometria de massas, favorece a identificação estrutural das mesmas.

O pré-fracionamento do lisado protéico proporciona uma redução da complexidade da amostra e um aumento da possibilidade de detectar proteínas pouco abundantes na mistura complexa. Dentro deste contexto, a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida é considerada uma técnica poderosa de separação, e muito bem estabelecida na análise proteômica.

Entretanto, mesmo oferecendo tantos recursos e sendo essencialmente empregada em análises proteômicas, a eletroforese 2D ainda apresenta alguns inconvenientes de metodologia, como limitações de sensibilidade, problemas de detecção de proteínas pouco abundantes, baixa solubilidade de proteínas hidrofóbicas e de membrana, e principalmente, baixa repetibilidade dos resultados (GRIFFIN E AEBERSOLD, 2001).

Além destas limitações apresentadas por esta técnica laboriosa, a manipulação extensiva da amostra na eletroforese 2D, tem induzido o emprego de métodos instrumentais alternativos e mais promissores como a cromatografia líquida multidimensional (MDLC) para a separação de proteínas de amostras complexas.

O acoplamento da cromatografia multidimensional com a espectrometria de massas, configura um excelente recurso para análise de misturas complexas de peptídeos, conhecida pelo acrônimo de MudPIT (*Multidimensional protein identification technology*) (WOLTERS; WASHBURN; YATES, 2001). Por este processo, tem sido possível identificar proteínas de toda porção celular, com valores extremos de pI, peso molecular, hidrofobicidade e abundância (WASHBURN; WOLTERS; YATES, 2001), geralmente difíceis de serem detectadas por 2D-PAGE e espectrometria de massas.

Introduzida por Yates (LINK *et al.*, 1999) a técnica inovadora de MudPIT se define como um método de separação de proteínas, e de misturas complexas de peptídeos, por cromatografia líquida bidimensional e de identificação por espectrometria de massas. O procedimento se baseia na digestão enzimática da mistura protéica com o subsequente fracionamento do lisado em uma coluna cromatográfica bifásica (CHEN *et al.*, 2005).

Além do tempo reduzido em relação a 2D e a automação do método, que minimiza a manipulação da amostra, a grande vantagem deste método reside na possibilidade de interfaceamento entre as etapas de separação e identificação que compõem este sistema analítico. Em contrapartida, a principal desvantagem desta metodologia está relacionada com o processamento dos dados experimentais. O grande volume de informações coletadas em um experimento de MudPIT representa a maior dificuldade no que diz respeito ao tempo requerido para análise e tratamento das mesmas.

Assim como na eletroforese bidimensional (SDS-PAGE), este sistema alternativo de isolamento de proteínas ou peptídeos (MudPIT), compreende duas etapas cromatográficas independentes agregadas em um capilar de sílica fundida. A primeira delas consiste de uma fase estacionária trocadora de cátions (SCX) e seguida por fase reversa (RP). Assim, nesta técnica inédita, a separação dos peptídeos se dá com base

em duas propriedades independentes ou seja, pela sua carga na primeira dimensão e, com base na hidrofobicidade na segunda dimensão.

No procedimento cromatográfico, os peptídeos são eluídos da coluna catiônica por um aumento na concentração salina e, seguidos por um gradiente crescente de hidrofobicidade (HUNTER *et al.*, 2002). Desta forma, eles são progressivamente eluídos da fase reversa e pulverizados diretamente na fonte de ionização de eletrospray, do espectrômetro de massas.

## 1.2 Ionização por electrospray (ESI)

Introduzida por Fenn *et al.* (1989), a ionização de moléculas biológicas por *electrospray* produz moléculas gasosas ionizadas a partir de uma solução. Isto é possível pela criação de um fino spray de gotas altamente carregadas na presença de um campo elétrico forte.

A solução de amostra é introduzida em uma região de um campo elétrico alto pela ponta de uma agulha metálica, mantida sob alta tensão (3000 V). As gotas carregadas que se formam, são atraídas eletrostaticamente para o interior do espectrômetro de massas. O solvente da amostra, é então evaporado por um gás e/ou por aquecimento antes que a amostra entre na região de alto vácuo do MS (GRIFFITHS *et al.*, 2001).

Conforme a gota diminui de tamanho, a densidade do cargas na superfície aumenta até o ponto em que a repulsão mútua entre as cargas na superfície se torna grande o suficiente para exceder a força de tensão superficial. Com isso, os íons começam a “deixar” a gota através da formação de um cone (cone de *Taylor*), em direção ao analisador de massas propriamente dito.

### 1.3 Analisador de massas quadrupolar (Q)

Em geral, associados à fonte de ionização por *electrospray*, estão os analisadores de massas do tipo quadrupolo. Estes analisadores são compostos por quatro pólos dispostos em paralelo, que atuam sob uma diferença de potencial de corrente direta e um potencial de rádio frequência superimposto. O campo aplicado irá determinar quais, dentre os íons da amostra, irão alcançar o detector. Ou seja, conforme o campo é imposto, os íons oscilam de acordo com sua  $m/z$  e com o campo de rádio frequência. Assim, somente íons de uma  $m/z$  determinada é que passarão pelo filtro. Por esta razão, o analisador de quadrupolo é considerado um filtro de massas.

Analisadores do tipo quadrupolo também podem ser associados a outros analisadores de massas, formando composições híbridas, como múltiplos quadrupolos ( $Q^n$ ) ou quadrupolo-tempo-de-vôo (QToF). Estes sistemas em série, são bastante úteis quando a identificação da proteína não é possível através da análise pelo PMF. Neste caso, torna-se necessário seu seqüenciamento pelo emprego destes sistemas híbridos (MS/MS).

A partir dos dados de MS e MS/MS obtidos experimentalmente e utilizando-se das ferramentas de busca em bancos de dados, torna-se possível a identificação das proteínas que compõem as frações do digesto enzimático da amostra em estudo.

## 2. OBJETIVOS

Objetivou-se, nesta etapa do trabalho, analisar os extratos protéicos totais de bactérias e bacterióides do *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) utilizando-se da

técnica de cromatografia líquida bidimensional no fracionamento dos peptídeos e, da espectrometria de massas - ESI-QToF na identificação destes.

### **3. EXPERIMENTAL**

Amostras de bactéria e bacterióide foram empregadas neste estudo e obtidas conforme anteriormente descrito (Capítulo 1). Bactérias de *B. elkanii* foram obtidas através de cultivo em meio de cultura YML e bacterióides, foram isolados a partir da extração em plantas de soja após 35 dias de plantio. O proteoma das amostras foi obtido segundo metodologia de extração proposta por Mehta e Rosato (2001).

#### **3.1 Digestão trípica em solução**

Cerca de 10 mg do extrato protéico total obtido segundo procedimento descrito por Mehta e Rosato (2001), foi solubilizado em um tampão (6 mol L<sup>-1</sup> uréia, 100 mmol L<sup>-1</sup> Tris-Base). Uma alíquota da amostra, contendo cerca de 1 mg de proteína total, foi reduzida com DTT e alquilada com iodoacetamida em ausência de luz. Posteriormente, procedeu-se a digestão da amostra com tripsina por 24 h a 37 °C (KINTER E SHERMAN, 2000). Esta reação foi interrompida pela adição de ácido acético glacial até pH 3,0 e, os digestos trípticos, na seqüência, foram dessalinizados e fracionados em HPLC.

#### **3.2 Dessalinização do digesto trípico**

Os sais presentes no digesto trípico, provenientes das etapas precedentes, foram eliminados empregando-se cartuchos OASIS (Waters). A coluna de extração foi previamente lavada com metanol PA e água Milli-Q. A amostra foi aplicada, lavada com metanol 5% e, finalmente, eluída com metanol PA. O eluído foi concentrado em

*speed vac* e reconstituído em tampão de ácido cítrico 20 mmol L<sup>-1</sup> para posterior fracionamento em HPLC.



### 3.3 Fracionamento das amostras em HPLC

Depois de centrifugado (13000 rpm, 5 min), o digesto trípico foi aplicado em HPLC (Waters, 2796) acoplado com coluna catiônica (Thermo Electron Corporation; 150 x 2,1 mm; tamanho da partículas 5  $\mu\text{m}$ ) e detector de arranjo de diodos (Waters, 2996). A eluição dos peptídeos se deu com ácido cítrico 20  $\text{mmol L}^{-1}$  e ácido cítrico 20  $\text{mmol L}^{-1}$  + NaCl 1  $\text{mol L}^{-1}$ , segundo o método assim otimizado (Tabela 4.1):

**Tabela 4.1.** Programação empregada na eluição dos peptídeos por cromatografia líquida de troca catiônica.

Tempo (min)	% Acetonitrila	% Ácido cítrico (20 $\text{mmolL}^{-1}$ )	Ác. cítrico (20 $\text{mmolL}^{-1}$ ) + NaCl (1 $\text{molL}^{-1}$ )
0	25	75	0
3	25	65	10
20	25	25	50
23	25	0	75
25	25	0	75
30	25	75	0

O fluxo de solventes se manteve constante (0,150  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) durante a corrida cromatográfica e, as frações foram coletadas a cada 1 min, perfazendo um total de 30 frações por amostra (bactéria e bacterióide).

### 3.4 Espectrometria de massas (ESI-QToF)

Diferentemente da etapa cromatográfica anterior em que, o fracionamento das amostras de bactéria e bacterióide em coluna trocadora de cátions foi realizado *off line*, a cromatografia de fase reversa foi efetuada em linha com o sistema de espectrometria de massas Eletrospray-QToF.

As frações de cada uma das amostras foram introduzidas no espectrômetro de massas através de um cromatógrafo líquido capilar (capLC) com coluna de fase reversa, interfaceado com o sistema ESI-QToF (Micromass) pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massas (MAS) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas-SP. Espectros de PMF (MS) e de MS/MS foram obtidos e os resultados foram analisados através da ferramenta de busca Mascot.

### 3.5 Busca em Banco de dados (MASCOT)

Os arquivos dos espectros de MS/MS gerados experimentalmente com o formato *raw* foram convertidos para a extensão *pkl*. Uma vez processados, estes dados foram empregados para a pesquisa em banco de dados, através da ferramenta Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), com a finalidade de identificar as proteínas presentes em cada fração. Para isso, alguns parâmetros foram utilizados na orientação da busca conforme se descreveu no capítulo 3, tornando assim possível a identificação das proteínas que compõem as frações do digesto enzimático da amostra em estudo.

---

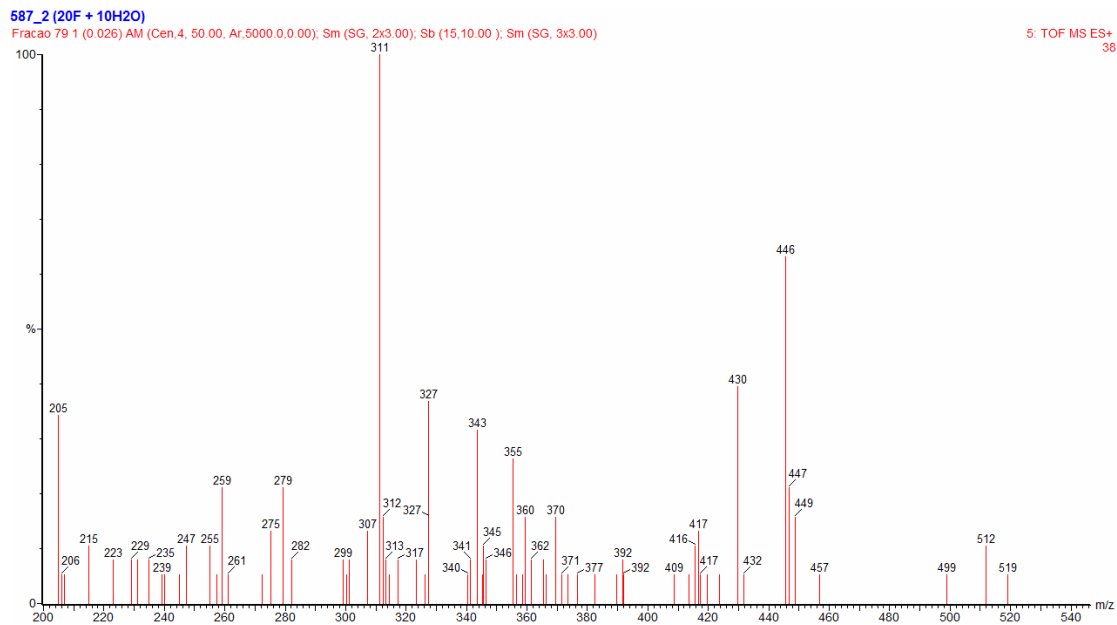
## 4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

O fracionamento, por HPLC, dos peptídeos das amostras de bactéria e bacterióide foi monitorado através dos cromatogramas. Picos de intensidade extremamente reduzidas foram observados na faixa de tempo entre 10 e 14 min da corrida cromatográfica empregando-se detector UV ( $\lambda = 214$  nm). Este fato, associado aos resultados das análises espectrométricas das frações correspondentes à faixa de tempo entre 10 e 14 min da corrida cromatográfica, indicam que o método utilizado para digestão do extrato protéico total gerou, por meio de espectros de baixa intensidade, um certo número de peptídeos para as amostras de bactéria e bacterióide conforme demonstram, respectivamente, as Tabelas 4.2 e 4.3.

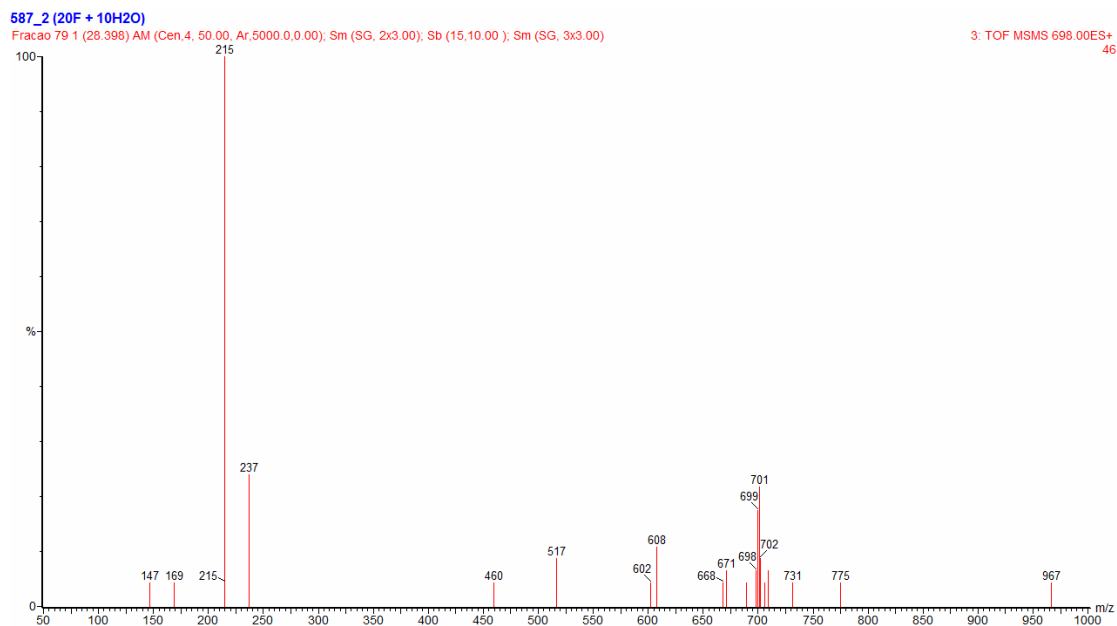
Nestas tabelas, estão compilados dados relativos ao número de acesso no banco de dados, potencial isoelétrico, massa molecular (kDa), cobertura da seqüência e *score* das proteínas identificadas pela estratégia de MudPIT. Além disso, os espectros de massas das frações protéicas quando analisadas de forma intacta (MS) e quando submetidas às fragmentações dentro do espectrômetro (MS/MS), também podem ser visualizados através das Figuras 4.1 e 4.2 para a bactéria e Figuras 4.3 e 4.4 para o bacterióide.

### 4.1 Espectrometria de massas (ESI-QToF)

Após a análise espectrométrica das frações das amostras *in vitro* e *in vivo* de *B. elkanii* (SEMIA 587) em estudo, e da interpretação dos fragmentos de íons não identificados por meio de busca no banco de dados do NCBI e MSDB, através da ferramenta Mascot, algumas proteínas puderam ser identificadas tanto para a bactéria quanto para o bacterióide (Tabelas 4.2 e 4.3, respectivamente).

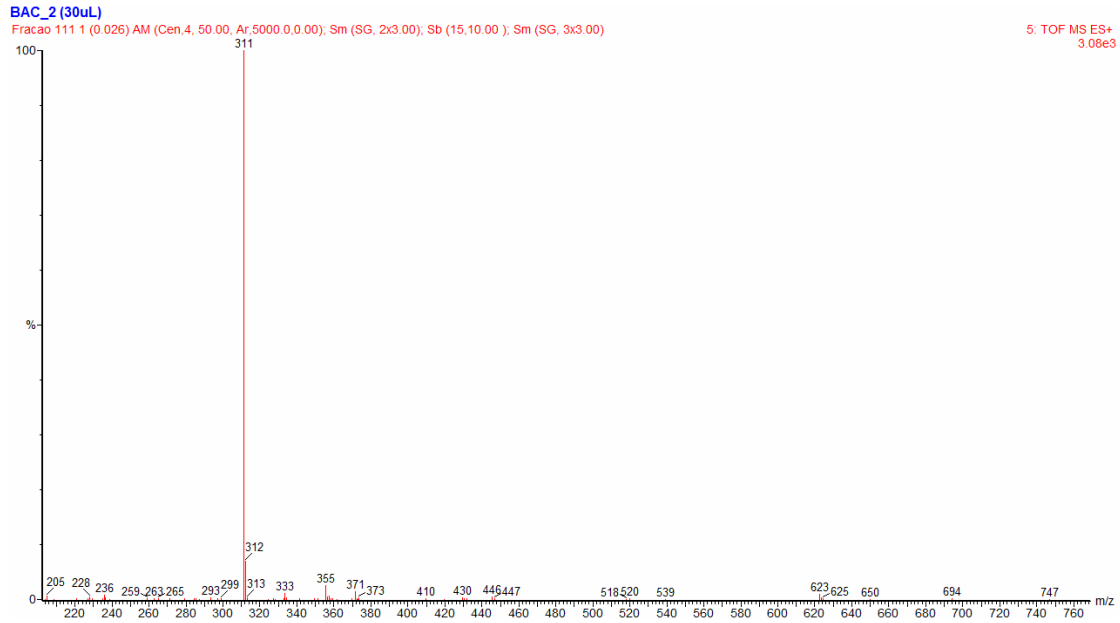


**Figura 4.1** Espectro de MS obtido por ESI-QToF, referente a uma fração (n<sup>o</sup> 79) da amostra de bactéria (*Bradyrhizobium elkanii*, SEMIA 587).



**Figura 4.2** Espectro de MS/MS obtido automaticamente por ESI-QToF, referente à fração n<sup>o</sup> 79 ( $m/z$  698) da amostra de bactéria.





**Figura 4.3** Espectro de MS obtido por ESI-QToF, referente a uma fração (n<sup>o</sup> 111) da amostra de bacterióide.



**Figura 4.4** Espectro de MS/MS obtido automaticamente por ESI-QToF, referente à fração n<sup>o</sup> 111 (*m/z* 618) da amostra de bacterióide.



**Tabela 4.2.** Proteínas identificadas por MudPIT – ESI-QToF da amostra de Bactéria (*B.elkanii*, SEMIA 587).

Acesso (NCBI/MSDB)	Proteína	MM (Da)	pI	Cobertura da seqüência (%)	Score
gi 67736394	<i>COC0459: Chaperonin GroEL (HSP60 family)</i>	57098	5,26	4	77
gi 21702581	<i>Chaperone Hsp60</i>	57518	5,76	4	63
gi 27380737	<i>Chaperonin GroEL</i>	57716	5,45	10	148
gi 86361060	<i>60 kDa chaperonin, heat shock protein</i>	57661	5,18	5	84
gi 36959008	<i>60 kDa chaperonin GroEL</i>	58202	5,25	7	68
gi 88939399	<i>Chaperonin Cpn60/TCP-1</i>	58251	5,37	4	52
gi 27376556	<i>Cold shock protein</i>	7499	9,30	24	55
gi 78696759	<i>Histone-like bacterial DNA-binding protein</i>	10989	10,37	36	256
gi 74421247	<i>Chaperonin Cpn60/TCP-1</i>	57836	5,38	9	200
gi 39935234	<i>Co-chaperonin GroES</i>	11157	7,96	38	179
gi 91974786	<i>Acetyl-CoA C-acetyltransferase</i>	40867	6,67	13	177
gi 77743581	<i>Chaperonin Cpn10</i>	11155	6,59	38	174
gi 36959008	<i>60 kDa chaperonin GroEL</i>	58202	5,25	7	153
gi 312976	<i>GroEL3</i>	57749	5,19	7	137
gi 27380494	<i>30S ribosomal protein S5</i>	21344	10,98	13	125
gi 85713824	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase</i>	21344	10,98	13	119
gi 77742285	<i>IMP dehydrogenase/GMP reductase:Chaperonin Cpn60/TCP-1</i>	57561	5,54	6	117
gi 74422109	<i>Thiolase</i>	40645	6,67	10	111
gi 27380496	<i>50S ribosomal protein L6</i>	19312	9,93	12	98
gi 90426196	<i>Chaperonin Cpn10</i>	10620	6,59	12	93
gi 39936318	<i>30S ribosomal protein S12</i>	13924	11,53	8	92
gi 7578866	<i>GroEL</i>	57480	5,17	7	89
gi 27375618	<i>Hypothetical protein bli0507</i>	19092	9,40	21	76
gi 312978	<i>GroES2</i>	11289	7,98	15	69
gi 9105487	<i>60 kDa chaperonin</i>	57835	5,45	3	67
gi 27375702	<i>Hypothetical protein bli0591</i>	47250	7,68	2	56
gi 78497759	<i>MscS Mechanosensitive ion channel</i>	63385	8,16	2	53
gi 77739707	<i>Ribosomal protein S16</i>	12332	10,81	9	52
gi 27380497	<i>30S ribosomal protein S8</i>	14665	9,56	15	47
BAC 50891	<i>BA000040 NID</i>	57716	5,45	18	286
AAB69095	<i>RQU78515 NID</i>	57575	5,19	10	184
Q6NDD2_RHOPA	<i>Putative H<sup>+</sup>-transporting ATP synthase beta chain</i>	50799	5,07	12	165



---



---

BAB49537	<i>BA000012 NID</i>	58009	5,19	9	161
----------	---------------------	-------	------	---	-----

Cont. Tabela 4.2

Acesso (NCBI/MSDB)	Proteína	MM (Da)	pI	Cobertura da seqüência (%)	Score
AAF64160	<i>AF239163 NID</i>	57480	5,17	8	144
Q7RQX6_PLAYO	<i>ATP synthase F1, beta subunit</i>	58109	5,93	6	133
AAV94192	<i>CP000031 NID</i>	57647	4,87	8	126
Q6N0C4_9PROT	<i>ATP synthase beta</i>	50503	4,88	9	109
AAM75978	<i>AF481102 NID</i>	57518	5,76	4	108
Q89J82_BRAJA	<i>Elongation factor TU</i>	43569	5,78	9	104
Q89U94_BRAJA	<i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i>	35826	7,77	21	81
CAH37933	<i>BX571966 NID</i>	56940			81
AAA28077	<i>CELHSP60CP NID</i>	60379	5,39	3	71
CAE28696	<i>BX572603 NID</i>	13924			64
Q89IK9_BRAJA	<i>10 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein)</i>	11170	7,93	29	60
AH3344	<i>protein translation elongation factor Tu (EF-Tu)</i>	44541	5,60	6	59
Q6LLS0_PHOPR	<i>Hypothetical protein STY3849</i>	35300	5,86	4	49
Q89WT7_BRAJA	<i>BII0591 protein</i>	47250	7,68	2	49
AAO29380	<i>AE009442 NID</i>	57853	5,45	3	48
Q6N8C8_RHOPA	<i>Periplasmic mannitol-binding protein, SmoM; possible Trap-T transport system, dctP subunit precursor</i>	40323	8,64	3	47
Q5GWT7_XANOR	<i>50S ribosomal protein L2</i>	29998			61
Q8PRM1_XANAC	<i>Partition protein A</i>	21572	5,44	5	57

---

Considerando-se que as células bacterianas em estudo encontravam-se na fase exponencial de seu crescimento, as mesmas se apresentavam em plena atividade de divisão celular. Este mecanismo envolve a síntese de macromoléculas, as quais deverão compor o arcabouço celular do microrganismo, bem como uma variedade de proteínas estruturais ou enzimáticas que assegurem sua subsistência nesta fase.

Neste estágio, foi detectada uma *histone-like bacterial DNA-binding protein* envolvida na compactação do DNA. O DNA bacteriano está organizado em uma estrutura compacta denominada nucleóide, ou cromatina bacteriana. Na cromatina

bacteriana o DNA está associado a um número de pequenas proteínas cujas funções não são bem compreendidas. As proteínas de destaque neste processo são denominadas de histonas. Elas atuam como “carretéis” em torno dos quais o DNA se enrola e são, por isso, essenciais no empacotamento do ácido desoxirribonucleico. Assim, durante a divisão celular, estas proteínas devem ser sintetizadas previamente para que o cromossomo da célula recém formada possa se enovelar.

A síntese protéica pode ser confirmada pelos acessos de um fator de alongação tipo TU e de um número de proteínas ribossomais. Estas proteínas estariam participando diretamente do processo de tradução. Por outro lado, um elevado número de chaperoninas detectadas participam do mesmo processo de síntese protéica, assistindo aos mecanismos de enovelamento protéico. As chaperoninas são importantes colaboradoras no dobramento de proteínas recém sintetizadas, dando origem à estrutura tridimensional destas macromoléculas durante sua síntese.

Considerando o fato de que as células em desenvolvimento requerem uma variedade de enzimas para obtenção e processamento dos nutrientes disponíveis no meio, as chaperoninas são requeridas neste período de intensa produção de novas proteínas. Este fato explica o alto número destas chaperoninas nas bactérias em contraposição ao bacterióide. A ausência de divisão celular neste organismo especializado na fixação do nitrogênio, dispensa um número elevado de proteínas desta categoria. Isso também pode ser justificado em razão do conteúdo protéico nas bactérias ser muito superior aquele encontrado nos bacterióides, conforme verificado anteriormente e relatado no capítulo 4 desta tese.

Duas enzimas relacionadas com o metabolismo de ácidos graxos, fosfolipídeos e esterol foram detectadas nas bactérias; a saber, *acetyl-CoA C-acetyltransferase* e *thiolase*. É possível que estas enzimas estejam envolvidas na síntese de membrana

---

celular, intensamente requerida pelas células em divisão, a partir do metabolismo de lipídeos.

A troca de metabólitos entre as células bacterianas e o meio nutritivo é constante durante os processos metabólicos. Assim, canais na membrana funcionam com importantes barreiras controladoras do fluxo de íons, compostos nutritivos e efluxo de catabólitos. Três acessos referentes a este sistema de transporte foram encontrados: *MscS mechanosensitive ion channel*, *periplasmic mannitol-binding protein SmoM* (*possible trap-T transport system*, *dctP subunit precursor*) e *putative H<sup>+</sup>-transporting (ATP synthase beta chain)*. Dentre estes, destaca-se o sistema de transporte para manitol, uma vez que este composto se constituiu na principal fonte de nitrogênio disponível no meio de cultura YML, em que se desenvolveram as bactérias.

Confirmando os dados obtidos no capítulo anterior desta tese, na bactéria, a enzima *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, envolvida no metabolismo energético, foi encontrada. Isto finaliza a discussão do complexo metabolismo bacteriano durante a fase exponencial de desenvolvimento, ratificado pela presença de um número de acessos para ATP sintase. A coordenação do metabolismo celular geral requer o ATP como recurso indispensável para que diversas enzimas se mantenham ativas.

Finalmente, a presença de proteínas hipotéticas neste resultado reflete a magnitude do potencial proteômico, uma vez que proteínas com função não determinada podem ser detectadas e funcionalmente experimentadas nas continuidade dos estudos.

O emprego da estratégia de MudPIT na identificação do proteoma diferencial do *B. elkani*, não somente complementa os dados obtidos anteriormente pela técnica de MALDI-QToF, como reforça a ocorrência de proteínas já apresentadas no capítulo 3.

**Tabela 4.3.** Proteínas identificadas por MudPIT – ESI-QToF da amostra de Bacterióide

Acesso (NCBI/MSDB)	Proteína	MM (Da)	pI	Cobertura da seqüência (%)	Score
BAC50891	<i>60 KDA chaperonin</i>	57716	5.45	18	286
AAB69095	<i>Heat shock protein HSP60</i>	57575	5.19	10	184
Q6NDD2	<i>Putative H<sup>+</sup>-transporting ATP synthase beta chain</i>	50799	5.07	12	165
Q7RQX6	<i>ATP synthase F1, beta subunit</i>	58109	5.93	6	133
BAC50667	<i>Elongation factor TU</i>	43569	5.78	9	104
BAC46788	<i>Glyceraldehyde 3-Phosphate dehydrogenase</i>	35826	7.77	21	81
CAE28696	<i>30S ribosomal protein S12</i>	13924	11.53	8	64
BAC45721	<i>Malate dehydrogenase</i>	34275	5.88	7	54
Q6LLS0	<i>Hypothetical protein STY3849</i>	35300	5.86	4	49
Q6N8C8	<i>Periplasmic mannitol-binding protein, SmoM; possible Trap-1 transport system, dctP subunit precursor</i>	40323	8.64	3	47
BAC50890	<i>10 KD chaperonin</i>	11170	7.93	29	60
BAC75968	<i>Dinitrogen reductase</i>	28375	5.14	24	201
B23874	<i>Nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain</i>	56902	6.03	8	55
AAQ12257	<i>Nitrogenase iron protein</i>	34704	5.24	10	75

O complexo nitrogenase apresentou-se claramente ativo nos bacterióides, através da identificação de dois acessos para dinitrogenase redutase, ou Fe-proteína, e um acesso para a dinitrogenase, ou FeMo-proteína. Estas enzimas, conforme discutido, fazem parte do metabolismo de fixação do nitrogênio atmosférico. Dentro dos nódulos radiculares, os simbiossomas confrontam-se com um ambiente de baixa tensão de oxigênio e são sustentados pelos ácidos dicarboxílicos, oferecidos pela célula vegetal.

O metabolismo premente nas células bacterióides, no simbiossoma, está sustentado pelo ciclo TCA, ciclo dos ácidos tricarboxílicos. O funcionamento perfeito

deste ciclo é dependente, entre outros fatores, de um importante balanço redox, que se resume na relação  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Este balanço, por sua vez, interfere no processo de fixação do nitrogênio. Acessos para ATP sintases foram encontrados, sendo que um deles está relacionado a uma bomba de prótons. O efluxo de prótons pode ser um importante fator para o balanço redox do bacterióide. Contudo, foi relatado a presença de uma  $\text{H}^+$ -ATPase na membrana periplasmática do simbiossoma. Esta bomba permite a acidificação do espaço periplasmático e é responsável pela conversão da amônia, produzida pelo bacterióide, em amônio (LODWIG E POOLE, 2003).

O fato de uma ATP-sintase próton-dependente ter sido encontrada, em vez de uma ATPase, pode ter um outro efeito neste metabolismo. Isso suporta o requerimento de grandes quantidades de ATP para manutenção da atividade do complexo nitrogenase. Contudo, mais uma vez, prevalece o balanço de esqueletos carbonados, agentes redutores, balanço redox e ATP para o funcionamento em paralelo do ciclo TCA e atividade da nitrogenase.

Um acesso para uma proteína transportadora (*periplasmic mannitol-binding protein, SmoM; possible Trap-T transport system, dctP subunit precursor*) que deve estar relacionado ao sistema de transporte de carboxilato (Dct) foi identificado. O transporte e catabolismo de ácidos dicarboxílicos são requeridos para alimentar a fixação do nitrogênio. L-malato, fumarato e succinato são exemplos de compostos de alta afinidade para o sistema de transporte Dct, tanto em *Rhizobium leguminosarum* e *Sinorhizobium meliloti*. Relacionado a este resultado, foi detectada a enzima *Malate dehydrogenase*. Esta enzima catalisa a oxidação de malato a oxaloacetato, acompanhada pela redução de  $\text{NAD}^+$ , sendo, portanto uma enzima chave na bioquímica do ciclo TCA.

A enzima *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, envolvida no metabolismo energético pode ter papel na síntese de glicogênio. A presença de glicogênio foi relatada em rizóbios infectando trevo e lótu. Para a formação de glicogênio, uma fonte da molécula de glicose precursora deve estar disponível em bacterióides.

Também corroborando os resultados do capítulo anterior, mais uma vez foram encontradas proteínas relacionadas direta ou indiretamente com os processos de tradução e síntese protéica, a saber *30S ribosomal protein S12* e *elongation factor TU* (RHIZOBASE). Adicionalmente, a presença de um número de chaperoninas apóia o mecanismo de síntese de proteínas, as quais podem estar especificamente requeridas para os processos celulares inerentes ao bacterióide, voltado para manutenção da fixação do nitrogênio.

Como esperado, pelo menos uma proteína hipotética foi encontrada (*hypothetical protein STY3849*). Esta classe de proteínas é amplamente encontrada em organismos que foram, e ainda estão sendo, seqüenciados consistindo de proteínas preditas pelo genes mas sem a função biológica empiricamente determinada.

## **5. CONCLUSÕES**

Poder-se-ia esperar que a análise do proteoma completo de bactérias e bacterióides do *B. elkanii* levasse à identificação de um maior número e variedade de proteínas. No entanto, a não observância deste resultado, pode ser inicialmente atribuída ao método eleito para a extração de proteínas nos organismos. O rendimento apresentado por este procedimento mostrou-se baixo à medida em que o cromatograma, durante a separação dos peptídeos, apresentou picos tão pouco

intensos. Aliado a isto, a inexistência de um banco de dados específico para o organismo em estudo definitivamente prejudicou a identificação de proteínas suficientemente concentradas nas frações dos digestos enzimáticos das amostras.

Por fim, embora tenham sido dessalinizadas, a possível presença de sal nas amostras proveniente das etapas de extração precedentes à espectrometria de massas, pode ter ocasionado a supressão da ionização dos peptídeos impossibilitando sua entrada no analisador de massas. Sem a devida ionização, as proteínas deixam de ser detectadas.

A tecnologia de MudPIT é indiscutivelmente mais simples de ser executada do que a de gel 2D, apresentada no capítulo anterior desta tese. Entretanto, nas condições em que foi executada neste trabalho, não favoreceram o seu desempenho no sentido de que, os nódulos das plantas de soja dos quais foram obtidos os bacterióides eram mais maduros do que aqueles coletados para bidimensional e o extrato protéico total das amostras era menos puro do que aquele obtido para análise por SDS-PAGE. Possivelmente, estes motivos contribuíram para que o número de proteínas encontradas nas frações das amostras ficasse aquém do esperado.

Contudo, verificou-se que, através de ambas as estratégias (MALDI-QToF e LC-ESI-QToF) empregadas na análise proteômica diferencial do *B. elkanii*, os padrões metabólicos tanto em bactéria como em bacterióide, foram mantidos. Isto quer dizer, bactérias apresentaram um metabolismo voltado para a síntese celular, denotada pela produção de macromoléculas, e metabolismo energético ao passo que, bacterióides apresentaram um metabolismo especialmente dedicado a fixação simbiótica do nitrogênio.



## Referências Bibliográficas

---

ARIAS, A.; MARTINEZ-DE-DRETS, G. Glycerol metabolism in *Rhizobium*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 66, p. 150-153, 1976.

BAKHTIAR, R.; NELSON, R. W. Mass Spectrometry of the Proteome. **Molecular Pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 405-415, 2001.

BESTEL-CORE, G.; DUMAS-GAUDOT, E.; POINSOT, V.; DIEU, M.; DIERICK, J.F.; van TUINEN, D.; REMACLE, J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 23, p. 122-137, 2002.

BLONDER, J.; GOSHE, M.B.; XIAO, W.; CAMP II, D.G.; WINGERD, M. Global Analysis of the Membrane Subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 3, n. 3, p. 434-444, 2004.

BNDES. Disponível em: <<http://www.bndes.gov.br>>. Acesso em: 13 dez. 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248–254, 1976.

BUCHANAN, B.B.; GRUTTSSEM, W. JONES, R.L. Biochemistry & molecular biology of plants. **American Society of plant Physiologists**, 2000.

CAMARA, G.M.S. Potencial da cultura da soja como fonte de matéria prima para o programa nacional de produção e uso de biodiesel. II Simpósio do Agronegócio de Plantas Oleaginosas Matérias Primas para o Biodiesel. Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Departamento de Produção Vegetal, 2006.

CHAMRAD, D. C.; KÖRTING, G.; STÜHLER, K.; MEYER, H. E.; KLOSE, J.; BLÜGGEL, M. Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. **Proteomics**, v. 4, p. 619-628, 2004.

---

CHARMONT, S.; JAMET, E.; PONT-LEZICA, R.; CANUT, H. Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 66, p. 453-461, 2005.

CHEN, E.I.; HEWEL, J.; FELDING-HABERMANN, B.; YATES, J.R. Large Scale Protein Profiling by Combination of Protein Fractionation and Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT). **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 5.1, p. 53-56, 2005.

DAINESE-HATT, P.; FISCHER, H.M.; HENNECKE, H.; JAMES, P. Classifying symbiotic proteins from *Bradyrhizobium japonicum* into functional groups by proteome analysis of altered gene expression levels. **Electrophoresis**, v. 20, p. 3514-3520, 1999.

DELORIT, R.J.; GUNN, C.R. Seeds of continental United States legumes (Fabaceae). Park Falls, Wi, USA, F.A. Weber and Sons, Lithographers, 1986.

DJORDJEVIC, M.A. Sinorhizobium meliloti metabolism in the root nodule: A proteome perspective. **Proteomics**, v. 4, p. 1859-1872, 2004.

EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 16 jan. 2008.

ENCARNACIÓN, S.; GUZMÁN, Y.; DUNN, M.F.; HERNÁNDEZ, M.; VARGAS, M.C.; MORA, J. Proteome analysis of aerobic and fermentative metabolism in *Rhizobium etli* CE3. **Proteomics**, v. 3, p. 1077-1085, 2003.

FENN, J.B; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S.F.; WHITEHOUSE, CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, p. 64-71, 1989.

FIGEYS, D. Proteomics in 2002: A Year of Technical Development and Wide-Ranging Applications. **Anal. Chem.**, v. 75, p. 2891-2905, 2003.

FRIEDENAUER, S.; BERLET, H. H. Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. **Analytical Biochemistry**, v. 178, p. 263-268,

---

1989.

GIBSON, A.H. Evaluation of nitrogen fixation by legumes in the green house and growth chamber. In: Elkan, G.H. Symbiotic nitrogen fixation technology. New York Marcel Bekker, p. 321-369, 1987.

GIORGIANNI, S. B. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 273-281, 2003.

GRIFFITHS, W. J.; JONSSON, A P.; LIU, S.; RAI, D. K.; WANG, Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. **Biochem. J.**, v. 355, p. 545-561, 2001.

GRIFFIN, T. J.; AEBERSOLD, R. Advances in Proteome Analysis by Mass Spectrometry. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 49, p. 45497-45500, 2001.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. Bactérias economizam milhões de dólares no cultivo da soja e do feijoeiro. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 17 JUN 2004.

HUNTER, T.C.; ANDON, N.L.; KOLLER, A.; YATES III, J.R.; HAYNES, P.A. The functional proteomics toolbox: methods and applications. **J. Chromatogr. B**, v. 782, p. 165-181, 2002.

IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 dez 2007.

KARR, D. B.; EMERICH, D. W. Protein Synthesis by *Bradyrhizobium japonicum* Bacteroids Declines as a Function of Nodule Age. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, p. 3757-3761, 1996.

KAZMI, S.; Krull, I. S.; Proteomics and the Current State of Protein Separations Science, Part One. **PharmaGenomics**, v. 14, p. 15-29, 2001.

---

KINTER, M.; SHERMAN, N.E. Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. Cap. 6 (The Preparation of Protein Digests for Mass Spectrometric Sequencing Experiments), 2000.

LAEMMLI, U. K. SDS-PAGE. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LINK, A.J.; ENG, J.; SCHIELTZ, D.M.; CARMACK, E.; MIZE, G.J.; MORRIS, D.R.; GARVICK, B.M.; YATES, J.R. III Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. **Nat. Biotech.** v. 17, p. 676-682, 1999.

LODWIG, E.; POOLE, P. Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 37-78, 2003.

MEHTA, A.; ROSATO, Y.B. Differentially expressed proteins in the interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* with leaf extract of the host plant. **Proteomics**, v. 1, p. 1111-1118, 2001.

MOLLOY, M.P. Two-Dimensional Electrophoresis of Membrane Proteins Using Immobilized pH Gradients. **Analytical Biochemistry**, v. 280, p. 1-10, 2000.

MULONGOY, K.; ELKAN, G. Glucose catabolism in two derivatives of a *Rhizobium japonicum* strain differing in nitrogen fixing efficiency. **Journal of Bacteriology**, v. 13, p. 179-187, 1977a.

MÜNCHBACH, M.; DAINESE, P.; STAUDENMANN, W.; NARBERHAUS, F.; JAMES, P. Proteome analysis of heat shock protein expression in *Bradyrhizobium japonicum*. **Eur. J. Biochem.**, v. 263, p. 39-48, 1999.

NANDAKUMAR, M.P.; MARTEN, M.R. Comparison of lysis methods and preparation protocols for one-and two-dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins. **Electrophoresis**, v. 23, p. 2216-2222, 2002.

NATERA, S.H.; GUERREIRO, N.; DJORDJEVIC, M.A. Proteome Analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 13, n. 9, p. 995-1009, 2000.

---

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Quim. Nova**, v. 26, n. 6, p. 872-879, 2003.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.

REINDERS, J.; LEWANDROWSKI, U.; MOEBIUS, J.; WAGNER, Y.; SICKMANN, A. Challenges in mass spectrometry-based proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3686-3703, 2004.

RHIZOBASE (The Genome Database for Rhizobia). Disponível em: <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>. Acesso em nov/2007.

SARMA, A.D.; EMERICH, D.W. Global protein expression pattern of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids: A prelude to functional proteomics. **Proteomics**, v. 5; p. 4170-4184, 2005.

SARMA, A.D.; EMERICH, D.W. A comparative proteomic evaluation of culture grown vs nodule isolated *Bradyrhizobium japonicum*. **Proteomics**, v. 6, p. 3008-3028, 2006.

SHATTERS, R. G.; SOMERVILLE, J. E.; KAHN, M. L. Regulation of glutamine synthetase II activity in *Rhizobium meliloti* 104A14. **Journal of Bacteriology**, v. 171(9), p. 5087-5094, 1989.

SHAW, M.M.; RIEDERER, B.M. Sample Preparation for two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, v. 3, p. 1408-1417, 2003.

SHEVCHENKO, A., LOBODA, A., SHEVCHENKO, A., ENS, W., STANDING, K. G. Maldi Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Proteomic Research. **Anal. Chem.**, v.72, p.2132-2141, 2000.

---

SHIMAMURA, T.; KOIKE-TAKESHITA, A.; YOKOYAMA, K.; YOSHIDA, M.; TAGUCHI, H.; IWATA, S. Crystallization of the chaperonin GroEL-GroES complex from *Thermus thermophilus* HB8. **Acta Cryst.**, v. 59, p. 1632-1634, 2003.

SIUZDAK, G. **Mass Spectrometry for Biotechnology**. California: Academic Press, 1996. 161 p.

SMOLKA, M.; ZHOU, H.; AEBERSOLD, R. Quantitative protein profiling using two-dimensional gel electrophoresis, isotope coded affinity tag labeling and mass spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**, p. 1-32, 2001.

STARK, H.; RODNINA, M. V.; RINKE-APPEL, J.; BRIMACOMBE, R.; WINTERMEYER, W.; VAN HEEL, M. Visualization of elongation factor Tu on the Escherichia coli ribosome. **Nature**, v. 389, p. 403-406, 1997.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. ICB HandBook, 15, Oxford: Blackwell Scientific, 200p., 1970.

WASHBURN, M.P.; WOLTERS, D.; YATES, J.R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature biotechnology*, v.19, p. 242-247, 2001.

WOLTERS, D. A.; WASHBURN, M. P.; YATES, J. R. An Automated Multidimensional Protein Identification Technology for Shotgun Proteomics. **Anal. Chem.**, v. 73, p. 5683-5690, 2001.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

WIKIPEDIA. Disponível em:

<[http://pt.wikipedia.org/wiki/Revolu%C3%A7%C3%A3o\\_verde](http://pt.wikipedia.org/wiki/Revolu%C3%A7%C3%A3o_verde)>. Acesso em: 20 dez. 2007.