

PAULO WAGNER PEREIRA ANTUNES

**PROTEÔMICA E PEPTIDÔMICA APLICADAS
AO ESTUDO DA DEFESA DE PLANTAS DE TOMATE
À INJÚRIA MECÂNICA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

PAULO WAGNER PEREIRA ANTUNES

**PROTEÔMICA E PEPTIDÔMICA APLICADAS
AO ESTUDO DA DEFESA DE PLANTAS DE TOMATE
À INJÚRIA MECÂNICA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 19 de Junho 2008.

Prof.^a Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Co-Orientadora)

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro
(Co-Orientador)

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

Prof. Marcelo Matos Santoro

Prof.^a Maria Cristina Baracat Pereira
(Orientadora)

“Dedico,

Aos meus pais Paulo Lopes Pereira e Neusa Antunes Pereira, pelo amor incondicional, por todo o apoio dado ao longo de toda a minha vida e sobretudo pelos nobres valores que me foram ensinados e que são responsáveis por todas as minhas conquistas.

Aos meus irmãos e grandes amigos Júlio César Pereira Antunes e Jorge Luís Pereira Antunes, por todo amor, respeito, companheirismo e pelas prazerosas discussões aos domingos.

À minha amável Erlane Batista, por todo o amor, carinho e compreensão pelos momentos de ausência. Por todos os momentos agradáveis ao seu lado, que me ajudaram a vencer mais essa etapa da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em todos os momentos;

Aos meus pais e aos meus irmãos, pela saudade sentida nos momentos de ausência, e pelo amor acima de tudo;

À Erlane, por toda a atenção e companheirismo na divisão dos problemas e na busca de suas soluções;

Ao meus estimados amigos Carlos Jr. e Gustavo, por todo o apoio em Belo Horizonte e pela grande amizade ao longo desses anos;

Aos amigos Meire, Hebreia, Patrícia, Mariana, Nayara, Tânus, Fabiano, Rubens, Eliciane e Ian, pelos ensinamentos e pela ajuda constante, por me acompanharem de perto, torcendo e sofrendo junto;

A todos os meus familiares e amigos, que de alguma forma contribuíram para a realização desta conquista;

À Universidade Federal de Viçosa, por possibilitar minha formação e realização desse trabalho;

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFV, pelos ensinamentos e por todo o auxílio prestado;

Ao Eduardo Monteiro, por todo o cuidado e por toda a ajuda;

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento dos projetos;

À minha orientadora, Professora Maria Cristina Baracat Pereira, pela orientação, apoio, paciência e, principalmente, pela amizade e confiança depositada em mim no decorrer de todo o nosso trabalho;

Ao Professor Reginaldo da Silva Romeiro, pela disponibilidade de utilização do Laboratório de Bacteriologia, por toda a atenção e amizade, e à sua equipe, especialmente ao doutorando Flávio Augusto de Oliveira Garcia, pela amizade e pelo grande auxílio prestado;

A todos do Núcleo de Biomoléculas do ICB/UFMG, em especial ao Professor Marcelo Matos Santoro, pelas orientações, e ao doutor Agenor Valadares, pela supervisão e grande auxílio prestado nas análises de espectrometria de massa;

À Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pelo apoio e disponibilidade do laboratório para a realização deste projeto;

Aos colegas do Laboratório de Proteômica e do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, pelo agradável ambiente de trabalho, e pela amizade;

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA

PAULO WAGNER PEREIRA ANTUNES, filho de Paulo Lopes Pereira e Neuza Antunes Pereira, nasceu no dia vinte de outubro de 1980, em Ipatinga, MG.

Em março de 2002, ingressou no curso de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se como Bacharel em Bioquímica em maio de 2006.

Em junho de 2006, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, em nível de mestrado, na mesma instituição, submetendo-se à defesa da dissertação em junho de 2008.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT.....	xviii
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura	3
2.1. Proteômica.....	3
2.2. Peptidômica	4
2.3. Ferramentas Moleculares da Proteômica e da Peptidômica.....	6
2.3.1. Eletroforese Bidimensional (2D)	6
2.3.2. Cromatografia Líquida Multidimensional (MDLC)	8
2.3.3. Espectrometria de Massa (MS) e Sequenciamento de Peptídeos	9
2.4. Aplicações da Proteômica e da Peptidômica	11
2.5. Defesa de Plantas.....	12
2.5.1. Proteínas Relacionadas com Defesa de Plantas	15
2.5.2. Peptídeos Relacionados com Defesa de Plantas.....	15
2.5.3. Enzimas Indicadoras do Estado de Indução de Resistência em Plantas	17
2.5.3.1. Lipoxigenases (LOX)	17
2.5.3.2. Peroxidases (PO).....	18
2.5.3.3. Fenilalanina amônia-liase (PAL)	18
2.5.3.4. Quitinases e β -1,3-Glucanases.....	19
2.6. Cultura do Tomate	20
3. Objetivo	22
3.1. Objetivo Geral	22
3.2. Objetivos Específicos.....	22
4. Materiais e Métodos	23
4.1. Cultivo das Plantas de Tomate	23
4.2. Estresse Abiótico	23
4.3. Preparo do Extrato para a Avaliação da Atividade Enzimática	23
4.4. Preparo do Extrato Solúvel (ES)	24
4.5. Preparo do Extrato de Parede Celular (EP)	24
4.6. Fracionamento de ES por Ultrafiltração	24
4.7. Quantificação de Proteínas Totais	24
4.8. Determinação da Atividade das Enzimas Indicadoras do Estado de Indução de Resistência em Plantas.....	25
4.8.1. Atividade de Lipoxigenases (LOX)	25
4.8.2. Atividade de Peroxidases (PO)	27
4.8.3. Atividade de Fenilalanina amônio-liase (PAL)	25
4.8.4. Atividade de Quitinase.....	26
4.8.5. Atividade de β -1,3-Glucanases	26
4.9. Cromatografia Líquida Multidimensional em HPLC	26
4.9.1. Cromatografia de Exclusão Molecular	26
4.9.2. Cromatografia de Troca Aniônica.....	27
4.9.3. Cromatografia de Fase Reversa.....	27
4.10. Espectrometria de Massa por MALDI-TOF/TOF	27

Capítulo I – Cromatografia líquida multidimensional (MDLC) <i>offline</i> como ferramenta para a proteômica e a peptidômica diferenciais	29
I.1. Introdução	31
I.2. Metodologia	33
I.3. Resultados e Discussão.....	35
I.3. Conclusões	51
Capítulo II – Proteômica e Peptidômica utilizando MDLC aplicadas ao estudo da defesa de plantas	53
II.1. Introdução	55
II.2. Metodologia	56
II.3. Resultados e Discussão.....	58
II.3.1. Fracionamento dos Extratos Solúveis (ES)	58
II.3.1.1. Ultrafiltração de ES	58
II.3.1.2. <i>Offline</i> -MDLC dos ES30	58
II.3.1.2.1. Troca Aniônica dos ES30	58
II.3.1.2.2. Fase Reversa da Fração SAXES30-A	60
II.3.1.3. <i>Offline</i> -MDLC dos Extratos Solúveis ES10-30	67
II.3.1.3.1. Troca Aniônica dos Extratos ES10-30.....	67
II.3.1.3.2. Fase Reversa da Fração SAXES10-30-A	69
II.3.1.3. <i>Offline</i> -MDLC do Extratos ES1-10	73
II.3.1.3.1. Troca Aniônica dos Extratos ES1-10.....	73
II.3.1.3.2. Fase Reversa do Extrato SAXES1-10-A	77
II.3.2. Fracionamento dos Extratos de Parede Celular (EP).....	78
II.3.2.1. Ultrafiltração e Fase Reversa do Extrato de Parede Celular (EP)	81
II.3.3. Espectrometria de massa das frações peptídicas diferencialmente expressas	85
II.4. Conclusões	92
Conclusões Gerais e Perspectivas	93
Referências	95

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1 - Fluxograma esquemático da metodologia de obtenção dos extratos solúveis (ES) e dos extratos de parede celular (EP) utilizados na análise proteômica.	33
Figura I.2 - Fluxograma esquemático da metodologia de offline-MDLC como ferramenta proteômica e peptidômica para a análise dos extratos de parede celular (EP).	34
Figura I.3 - Atividades específicas de enzimas indicadoras do estado de indução de resistência sistêmica em plantas de tomate submetidas a estresse abiótico por ferimentos nas folhas.	35
Figura I.4 - Cromatografias de exclusão molecular em coluna Protein Pack 125 Å (faixa de separação de 2 a 80 kDa) em eluição isocrática com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, adicionado de 150 mM de NaCl, ao fluxo de 0,25 mL.min ⁻¹	38
Figura I.5 - (a) Cromatografia de fase reversa (CFR) em HPLC da fração GF1 (Figura I.4) de extrato de parede celular (EP) de folhas de plantas de tomate sem fermento (SF, —) e feridas e coletadas em diferentes tempos: 0-Dia (...), 1-Dia (- - -), 2-Dias (-.-.-) e 7-Dias (-.-.-).....	40
Figura I.6 - (a) Cromatografia de fase reversa (CFR) em HPLC da fração GF2 (Figura I.4) de extrato de parede celular (EP) de folhas de plantas de tomate sem fermento (SF, —) e feridas e coletadas em diferentes tempos: 0-Dia (...), 1-Dia (----), 2-Dias (-.-.-) e 7-Dias (-.-.-).....	41
Figura I.7 - (a) Cromatografia de fase reversa (CFR) em HPLC da fração GF4 (Figura I.3) de extrato de parede celular (EP) de folhas de plantas de tomate sem fermento (SF, —) e feridas e coletadas em diferentes tempos: 0 Dia (...), 1 Dia (----), 2 Dias (-.-.-) e 7 Dias (-.-.-).....	43
Figura I.8 - Determinação das massas moleculares por espectrometria de massa (MALDI-TOF) de frações purificadas do pool GF4, contendo peptídeos diferencialmente expressos.	45
Figura I.9 - Espectro de massa das frações purificadas do pool GF4 contendo peptídeos diferencialmente expressos e o conjunto de massas utilizado na análise de “ <i>peptide mass fingerprint</i> ”	46
Figura I.10 - Espectro de massa das frações purificadas do pool GF4 contendo peptídeos diferencialmente expressos e o conjunto de massas utilizado na análise de “ <i>peptide mass fingerprint</i> ”	47
Figura I.11 - Espectro de massa da fragmentação do íon parental 2.211,399 Da obtido pela proteólise do peptídeo de massa molecular 9.980,852 Da identificado na amostra RPGF4 7 Dias, eluída com 42,4% de acetonitrila em cromatografia de fase reversa (coluna C18).	50
Figura II.1 - Fluxograma esquemático da metodologia utilizada para obtenção do extrato de parede celular (EP) e do extrato solúvel (ES) de folhas de plantas de tomate sem fermento (SF, controle) e de folhas feridas e colhidas 0, 1 2, e 7 dias após os ferimentos.....	56
Figura II.2 - Fluxograma esquemático da metodologia utilizada na análise proteômica e peptidômica das frações do extrato de parede celular (EP) e do extrato solúvel (ES) de folhas de plantas de tomate sem fermento (SF, controle) e de folhas feridas e colhidas 0, 1, 2, e 7 dias após os ferimentos.....	57

Figura II.3 - Troca Aniônica em coluna SPHERISORB 5 µm SAX (WATERS CORPORANTION) de 100 µL das amostras dos extratos solúveis (ES) ultrafiltradas em membrana de 30 kDa (ES30).....	59
Figura II.4 - Regiões SAXES30-A (A), SAXES30-B (B) e SAXES30-C (C) ampliadas. Os tratamentos ES-SF (—); ES-0-Dia (---); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (---) e ES-7-Dias (---) de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico são avaliados em absorvância de 280nm e 214nm.....	61
Figura II.5 - Perfis cromatográficos de Fase Reversa (RP) em coluna C18 Shim-Pack CLC-ODS dos tratamentos, ES-SF (—); ES-0-Dia (---); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (---) e ES-7-Dias (---) de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico.....	62
Figura II.6 – Destaque da região <i>RPC18-I</i> da fração SAXES30-A obtida de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico.....	63
Figura II.7 – Destaque da região <i>RPC18-II</i> da fração SAXES30-A obtida de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico.....	65
Figura II.8 - Destaque da região <i>RPC18-III</i> da fração SAXES30-A obtida de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico.....	66
Figura II.9 - Troca Aniônica em coluna SPHERISORB 5 µm SAX (WATERS CORPORANTION) de 200 µL das amostras dos extratos solúveis (ES) ultrafiltradas em membrana de 10 e 30 kDa (SAXES10-30).....	69
Figura II.10 – Regiões SAXES10-30-A (A), SAXES10-30-B (B) e SAXES10-30-C (C) ampliadas. Os tratamentos ES-SF (—); ES-0-Dia (---); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (---) e ES-7-Dias (---) de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico são avaliados em absorvância de 280nm e 214nm.....	70
Figura II.11 – Perfis cromatográficos de Fase Reversa (RP) em coluna C18 Shim-Pack CLC-ODS dos tratamentos, ES-SF (—); ES-0-Dia (---); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (---) e ES-7-Dias (---) de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico.	71
Figura II.12 – Destaque da região <i>RPC18-I</i> da fração SAXES10-30-A obtida de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico.	72
Figura II.13 – Destaque da região <i>RPC18-II</i> da fração SAXES10-30-A obtida de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico.	73
Figura II.14 – Troca Aniônica em coluna SPHERISORB 5 µm SAX (WATERS CORPORANTION) de 200 µL das amostras dos extratos solúveis (ES) ultrafiltradas em membrana de 1, 10 e 30 kDa (SAXES1-10).....	74
Figura II.15 – Regiões SAXES1-10-A (A), SAXES1-10-B (B) e SAXES1-10-C (C) ampliadas. Os tratamentos ES-SF (—); ES-0-Dia (---); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (---) e ES-7-Dias (---) de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico são avaliados em absorvância de 280nm e 214nm.....	76
Figura II.16 – Perfis cromatográficos de Fase Reversa (RP) em coluna C18 Shim-Pack CLC-ODS dos tratamentos, ES-SF (—); ES-0-Dia (---) e ES-1-Dia (---) de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico.	77
Figura II.17 – Destaque da região <i>RPC18-I</i> da fração SAXES1-10-A obtida de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico.....	79
Figura II.18 - Destaque da região <i>RPC18-II</i> da fração SAXES1-10-A obtida de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico.....	80
Figura II.19 - Perfis cromatográficos de Fase Reversa em coluna C18 Shim-Pack CLC-ODS dos tratamentos, EP1-10- SF (—); EP1-10- 0 dia (---); EP1-10- 1 dia (---); EP1-10- 2 Dias (---) e EP1-10- 7 Dias (---) de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico.	83

Figura II.20 - Perfis cromatográficos de Fase Reversa em coluna C18 Shim-Pack CLC-ODS dos tratamentos, EP1-10- SF (___); EP1-10- 0 dia (....); EP1-10- 1 dia (- -); EP1-10- 2 Dias (_.) e EP1-10- 7 Dias (_..) de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico.....	84
Figura II.21. Espectros de massa moleculares (MALDI-TOF/TOF) dos picos diferenciais obtidos pela análise proteômica e peptidômica do extratos de parede celular (EP) e extratos solúveis (ES).....	87
Figura II.22 - Espectro de massa das frações purificadas do pool GF4 contendo peptídeos diferencialmente expressos e o conjunto de massas utilizado na análise de " <i>peptide mass fingerprint</i> ".	88
Figura II.23 - Espectro de massa das frações purificadas do pool GF4 contendo peptídeos diferencialmente expressos e o conjunto de massas utilizado na análise de " <i>peptide mass fingerprint</i> ".	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das proteínas relacionadas à patogênese, de acordo com suas propriedades e mecanismos de ação. Adaptado de Pascholati et al. (2005)	16
Tabela I.1. Frações purificadas do pool GF4, contendo peptídeos diferencialmente expressos e as massas moleculares identificadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF)	44
Tabela I.2 - Proteínas identificadas por “ <i>peptide mass fingerprint</i> ” em MALDI-TOF/TOF (análise pelo software MASCOT®), das frações purificadas do pool GF4	48
Tabela II.1. Picos diferenciais obtidos pela análise proteômica dos EP e ES submetidos à análise por espectrometria de massa. (II.1.A e II.1.B) amostras dos ES purificados segundo os passos de ultrafiltração e <i>offline</i> MDLC.....	86
Tabela II.2 - Proteínas diferencialmente expressas em plantas de tomate submetidas a condições de estresse abiótico.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

2D	Eletroforese bidimensional
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
C18	Coluna de fase reversa contendo ligante com 18 carbonos
CEM	Cromatografia de exclusão molecular em HPLC
RP	Cromatografia de fase reversa em HPLC
CID	<i>"Collision-induced dissociation"</i>
DHB	Ácido 2,5-di-hidroxidobenzóico
DTT	Ditiotreitol
EP	Extrato de Parede Celular
ES	Extrato Solúvel
ES10-30	Extrato solúvel contendo proteínas com massas moleculares entre 10 e 30 kDa
ES1-10	Extrato solúvel contendo proteínas com massas moleculares entre 1 e 10 kDa
ES30	Extrato solúvel contendo proteínas com massas moleculares superiores a 30 kDa
ESI	<i>"Electrospray ionization"</i>
FAB	<i>"Fast atom bombardment"</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação
HAPHB	Hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico
HCAA	A-ciano-4-hidroxicinâmico
ISR	Resistência sistêmica induzida
LC/MS	Cromatografia líquida multidimensional <i>online</i> acoplada à espectrometria de massa
LOX	Lipoxigenases
MALDI	<i>"Matrix-assisted laser desorption/ionization"</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Offline-MDLC...	Cromatografia líquida multidimensional <i>offline</i>
Online-MDLC...	Cromatografia líquida multidimensional <i>online</i>
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Espectrometria de massa com seqüenciamento
PAL	Fenilalanina amônia-liase
PD	<i>"Plasma desorption"</i>
PLT	Proteínas transpostadoras de lipídeos
PMF	<i>"Peptide mass fingerprint"</i>
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PO	Peroxidases
PPC	Proteínas de parede celular
PRPs	Proteínas Relacionadas com Patogênese
PVPP	Polivinipolipirrolidona
Q	Quadrupolo
QqTOF	Duplo quadrupolo/tempo de voo
QTRAP	Duplo quadrupolo/ion trap

S.A.	Ácido sinapínico
SAR	Resistência sistêmica adquirida
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
TFA	Ácido trifluoracético
TOF	Tempo de voo
TOF/TOF	Tempo de voo/tempo de voo
TQ	Triplo quadrupolo
TRAP	" <i>Ion traps</i> "
TRIS	Tris(hidroximetil aminometano)

RESUMO

ANTUNES, Paulo Wagner Pereira Antunes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2008. **Proteômica e peptidômica aplicadas ao estudo da defesa de plantas de tomate à injúria mecânica.** Orientadora: Maria Cristina Baracat-Pereira. Co-orientadores: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Reginaldo da Silva Romeiro.

Plantas são expostas a estresses múltiplos, e suas respostas definirão sua capacidade de sobrevivência. Diferentes vias de resposta são induzidas pela ativação ou inibição de diversas proteínas, quando células de plantas são submetidas a alguma forma de estresse biótico ou abiótico. Estudos proteômicos estruturais e funcionais buscam avaliar os níveis de inibição, superexpressão e síntese diferencial dessas proteínas, focalizando o monitoramento e a análise de suas propriedades, e os seus envolvimento nas vias de sinalização e de defesa de plantas contra estresses. A grande dificuldade desses estudos é que na maioria das vezes, a síntese diferencial de proteínas e peptídeos é induzida em pequenas quantidades, representando baixas concentrações na célula. Além disso, o proteoma celular é representado por várias proteínas constitutivas, expressas em altas quantidades para o desenvolvimento das funções celulares normais, sendo, portanto, de alta complexidade. Essa alta complexidade e alta concentração podem dificultar a visualização dessas biomoléculas induzidas por meio dos estudos proteômicos e peptidômicos. Para superar essa dificuldade de visualização é necessário o desenvolvimento de ferramentas bioquímicas que possibilitam o enriquecimento dessas amostras, permitindo, assim, a visualização e a identificação de um maior número possível de proteínas e peptídeos diferencialmente sintetizados. Para avaliar o proteoma e o peptidoma diferencial de folhas de plantas de tomate submetidas a estresse por injúria mecânica, plantas de tomateiro Santa Cruz Kada foram cultivadas por 28 dias, em casa-de-vegetação, e foram feridas por esmagamento do limbo foliar por meio de alicate (aprox. 0,5 cm de diâmetro). Folhas sem ferimento (SF) e folhas coletadas 0, 1, 2 e 7 dias após os ferimentos foram estocadas a -80°C. A extração foi realizada por maceração, na presença de N₂ líquido, em tampão acrescido de inibidores de proteases e polivinilpolipirrolidona (PVPP). Os extratos foram centrifugados (20.000 g, 4°C, 25 min) e os sobrenadantes, denominados de Extrato Solúvel (ES). Os precipitados foram lavados e uma nova fração protéica foi extraída em presença de LiCl, sendo

denominado Extrato de Parede Celular (EP). Os extratos solúveis foram utilizados para avaliar a atividade das enzimas indicadoras do estado de indução de resistência, lipoxigenases (LOX), peroxidases (PO), fenilalanina amônia-liase (PAL), quitinases e β -1,3-glucanases. Alteração nas atividades dessas enzimas indicou que o material-fonte de proteínas a ser usado nas análises proteômicas e peptidômicas apresentava síntese diferencial de proteínas em resposta ao estresse envolvido. No primeiro experimento, EP foi fracionado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30-75% sat.) e o precipitado recuperado foi ressuspenso em tampão de extração e avaliado quanto à síntese diferencial de proteínas utilizando cromatografia líquida multidimensional (MDLC), combinando cromatografias *offline* de exclusão molecular e de fase reversa. O *pool* GF4 (pós-exclusão molecular) apresentou o maior número de picos protéicos/peptídicos diferencialmente sintetizados. Foram identificadas massas moleculares nas frações *RPGF4* correspondentes aos cinco tratamentos em diferentes tempos de eluição. Os protocolos permitiram a obtenção de 5 frações peptídicas purificadas (SF - 9.965,348 Da; 0-Dia - 5.586,304 Da; 1-Dia - 2.835,539 Da; 2-Dias - 1.611,931 Da e 7-Dias - 9.980,078 Da) e duas frações com duas massas. Análises de *peptide mass fingerprint* não demonstraram homologias significativas, apenas indicaram a associação desses peptídeos com mecanismos de defesas. Foi obtida uma sequência de nove resíduos de aminoácidos (E-N-G-E-I/L-V-D-I/L-N) por espectrometria de massa MS/MS de um peptídeo tríptico (2.211,399 Da) da amostra *RPGF4* 7-Dias (9.980,349 Da). No segundo experimento, ES e EP foram fracionados por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30-75% sat.). O precipitado recuperado foi ressuspenso e fracionado por ultrafiltração, obtendo-se amostras protéicas em faixas de massas moleculares de 1 a 10, 10 a 30 e acima de 30 kDa, denominadas ES1-10, EP1-10, ES10-30, EP10-30, ES30 e EP30, respectivamente. Cada uma dessas frações foi submetida à análise proteômica e peptidômica, por cromatografia líquida multidimensional (MDLC) *offline*, utilizando-se colunas de troca aniônica e fase reversa como dimensões de separação. Os perfis cromatográficos dos tratamentos 0, 1, 2 e 7-Dias, quando comparados com o controle (SF), apresentaram picos diferenciais em todas as frações analisadas que continham diferentes faixas de massas moleculares. Após a separação por fase reversa, a fração ES30 do tratamento 7-Dias apresentou picos protéicos diferenciais quando comparados com SF. A fração ES10-30 do tratamento 2-Dias se destacou pelo maior número de picos protéicos diferenciais gerados, enquanto que para a fração

ES1-10, o maior número de picos diferencialmente sintetizados foi evidenciado no tratamento 1 dia após os ferimentos. A eficiência da purificação de picos diferencialmente sintetizados associados a proteínas ligadas à indução de resistência possibilitou a análise desses picos por espectrometria de massa. Foram identificadas massas de 8.214,794, 1.612,940 e 5.724,462 Da para picos purificados a partir do extrato solúvel do tratamento 1-Dia. Já para EP1-10 foram identificadas massas de 8.224,107; 8.214,794 e 1.567,804 Da para os tratamentos SF, 0 e 2-Dias, respectivamente. Essas amostras purificadas foram submetidas à proteólise limitada por tripsina, reduzidas e alquiladas, e as massas moleculares do perfil peptídeos foram analisadas em bancos de dados de *peptide mass fingerprint*, entretanto sem sucesso na obtenção de seqüências peptídicas. Os protocolos de fracionamento propostos permitiram a obtenção, com sucesso, de frações purificadas, com destaque para as vantagens obtidas pelo uso da ultrafiltração para o fracionamento prévio das amostras, sobretudo das amostras de baixa massa molecular (1 a 10 kDa), tanto para os extratos de parede celular quanto para os extratos solúveis. A intensidade dos valores de absorvância indicados nos perfis cromatográficos de fase reversa, tanto para o primeiro quanto para o segundo experimento, permitiu a observação de um grande número de picos diferenciais. Porém, em função da expressão em baixas concentrações, apenas a identificação das massas moleculares foi possível, não tendo sido obtido sucesso na obtenção de seqüências. Há necessidade de acúmulo de material protéico em alto grau de purificação para os trabalhos seguintes de identificação de seqüência e análise funcional.

ABSTRACT

ANTUNES, Paulo Wagner Pereira Antunes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June 2008. **Proteomics and peptidomics applied to study the defense of tomato plants of the mechanics injury.** Adviser: Maria Cristina Baracat-Pereira. Co-Advisers: Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Reginaldo da Silva Romeiro.

Plants are exposed to multiple stresses, and their responses define their ability to survive. Different pathways of response are induced by the activation or inhibition of various proteins, when cells of plants are subjected to some form of biotic or abiotic stress. Structural and functional of proteomics studies look assess the levels of inhibition, over expression and differential synthesis of these proteins, focusing on the monitoring and analysis of their properties, and their involvement in the process of signaling and protection of plants against stress. The great difficulty of these studies is that most of the time, the synthesis of proteins and peptides differential is induced in small quantities, representing low concentrations in the cell. Moreover, the proteome is represented by several cellular protein constituent, expressed in high quantities to the development of normal cell functions and therefore of high complexity. This high complexity and high concentration may hinder the view of these biomolecules induced through proteomics and peptidomics studies. To overcome this difficulty, it is necessary to view the development of biochemical tools that enable the enrichment of these samples, thus enabling the visualization and identification of a greater number of proteins and peptides synthesized differentially. To assess the proteome and peptidome differential of leaves of tomato plants subjected to mechanical stress by injury, tomato plants (Santa Cruz Kada variety) were grown for 28 days in greenhouse, and were injured by means of pliers adapted to accomplish crush of an ground (0,5cm, to circulate) of the leaves. Leaves without injury (SF) and leaves collected 0, 1, 2 and 7 days after the wounds were kept at -80°C. The extraction was performed by maceration, in the presence of liquid N₂ in buffer plus protease inhibitors, and polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). The extracts were centrifuged (20,000 g, 4°C, 25 min) and the supernatants, denominated as Extract Soluble (ES). The precipitates were washed and a new protein fraction was extracted in the presence of LiCl, and called Extract from Wall Mobile (EP). The soluble extracts were used to assess the activity of enzymes indicator of the state of induction of resistance, lipoxygenases (LOX), peroxidases (DB), phenylalanine

ammonia-lyase (PAL), chitinases and β -1, 3 - glucanases. Amendment in the activities of these enzymes indicated that the material source of protein to be used in the proteomics and peptidomics analyses of the differential synthesis of proteins in response to stress involved. In the first experiment, EP was fragmented with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30-75% sat.) and the precipitate was recovered in extraction buffer and evaluated for differential synthesis of proteins using multidimensional liquid chromatography (MDLC), combining of molecular exclusion and reverse phase of offline chromatography. The pool *GF4* (post molecular exclusion) presented the largest number of protein and peptide peaks differentially synthesized. It have been identified in the molecular weight fractions *RPGF4* corresponding to five treatments at different times of elution. The protocols allowed the taking of five fractions peptide purified (*SF* – 9.965,348; *0-Day* - 5.586,304; *1-Day* - 2.835,539 Da, *2-Days* - 1.611,931 and the *7-Days* - 9,980 , 078 Da) and two fractions with two molecular mass. Analysis of peptide mass fingerprinting showed no significant homologies only indicated the association of these peptides with mechanisms of defenses. It obtained a sequence of nine waste of amino acids (E-N-G-E-I/L-V-D-I/L-N) by mass spectrometry MS/MS of the triptych peptide (2.211,399 Da) of the sample *RPGF4 7-Days* (9.980,349 Da). In the second experiment, ES and EP were fractionated by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30-75% sat.). The precipitate was recovered and fragmented by ultrafiltration to obtain protein samples of molecular weights between of 1 to 10, 10 and 30 and above 30 kDa, denominated to ES1-10, EP1-10, ES10-30, EP10-30, ES30 and EP30, respectively. Each of these fractions was subjected to proteomics and peptidomics analysis by multidimensional liquid chromatography (MDLC) offline, using columns of anion exchange and reversed phase as dimensions of separation. The chromatographic profiles of the treatments 0, 1, 2 and 7-Days, when compared with the control (*SF*), showed differential peaks in all fractions analyzed containing strips of different molecular weights. After the separation by reversed phase, the fraction ES30 treatment 7-Days presented peaks protein differential when compared to *SF*. The fraction ES10-30 treatment 2-Days because of the greater number of differential generated protein peaks, while for the fraction ES1-10, the highest number of peaks differentially synthesized was evidenced in treatment 1 day after the injury. The efficiency of purification of differentially peaks associated with synthesized proteins linked to the induction of resistance enabled the analysis of these peaks by mass spectrometry. They were identified mass of 8.214,794 Da, 1.612,940 Da and

5.724,462 Da for the peaks purified from the soluble extract of processing 1-Day. For EP1-10 were identified mass of 8.224,107 Da; 8.214,794 Da and 1.567,804 Da for the SF treatments, 0 and 2-Days, respectively. These purified samples were submitted to limited proteolysis by trypsin and reduced and alkylated, the molecular weights of the peptides profile were tested in the databases of peptide mass fingerprinting, though without success in obtaining peptide sequences. The proposed protocols for fractionization allowed to obtain, with success, purified fractions, with emphasis on the benefits obtained by the use of ultrafiltration prior to the division of samples, especially samples of low molecular weight (1 to 10 kDa), to both extracts of the cell wall as to the extracts soluble. The intensity of the values of absorbance indicated in chromatographic profiles of reversed phase for both the first and for the second experiment, allowed the observation of a large number of differential peaks. However, according to the expression in low concentrations, only the identification of molecular weights was possible and was not been successful in obtaining sequences. There is need for accumulation of material on the high degree of protein purification for the work following the identification of sequence and functional analysis.

1. Introdução

A proteômica e a peptidômica são áreas do conhecimento científico altamente dinâmicas. Os dados de seqüenciamento gênico associados a estudos proteômicos e peptidômicos estruturais e funcionais buscam estabelecer o melhor entendimento das reações bioquímicas induzidas por situações fisiológicas específicas. Essas situações fisiológicas distintas de uma célula, um tecido ou um determinado organismo dependem do ciclo celular ou podem estar associadas a situações de estresse provocadas pelas condições adversas do ambiente. Inúmeras rotas metabólicas estão relacionadas com essas alterações fisiológicas e estão diretamente associadas à síntese diferencial de proteínas e peptídeos.

O estudo estrutural e funcional das proteínas e peptídeos expressos em determinadas condições fisiológicas podem gerar implicações diretas em vários campos da biologia e da biotecnologia. O conhecimento dos seus envolvimento nas vias metabólicas gera um importante conhecimento para os estudos em bioquímica e biologia celular. A identificação de novas moléculas bioativas nos extratos biológicos naturais é um grande potencial para o desenvolvimento de medicamentos e de produtos comerciais na área agrônômica, alimentícia, de cosméticos, entre outras. Com relação ao campo das doenças animais e vegetais, a identificação e caracterização de moléculas endógenas e exógenas específicas de um determinado estado patológico são fundamentais para o estudo de biomarcadores capazes de atuar no diagnóstico de doenças, tanto no acompanhamento da evolução do tratamento, quanto no desenvolvimento de ferramentas moleculares de controle dessas doenças.

A grande dificuldade dos estudos proteômicos e peptidômicos relacionados com condições fisiológicas específicas, como é o caso da indução de resistência em plantas, é que na maioria das vezes, a síntese diferencial de proteínas e peptídeos é induzida em pequenas quantidades, representando baixas concentrações na célula. Além disso, o proteoma celular é representado por várias proteínas constitutivas, expressas em altas quantidades para o desenvolvimento das funções celulares normais, sendo, portanto, de alta complexidade. Essa alta complexidade e alta concentração podem dificultar a visualização dessas biomoléculas induzidas por meio dos estudos proteômicos e peptidômicos. Para superar essa dificuldade de visualização é necessário o desenvolvimento de ferramentas bioquímicas que

possibilitam o enriquecimento dessas amostras, permitindo, assim, a visualização e a identificação de um maior número possível de proteínas e peptídeos diferencialmente sintetizados.

No caso da indução de resistência em plantas, além das baixas concentrações, outra grande dificuldade da análise dos proteomas diferenciais está relacionada com as massas moleculares. Grande parte das biomoléculas envolvidas na defesa vegetal são proteínas de baixa massa molecular e peptídeos. O grupo de peptídeos abaixo de 10 kDa é bastante numeroso e possui grande diversidade estrutural e funcional, importantes nos processos regulatórios da fisiologia animal e vegetal. Em plantas, peptídeos antimicrobianos (AMPs) constituem uma estratégia de defesa eficiente e econômica para o organismo, pois são sintetizados de uma maneira flexível e com um baixo consumo de energia. A proposta das análises peptidômicas objetiva o estudo desse grupo de proteínas por meio do desenvolvimento de novas tecnologias ou da adaptação de ferramentas proteômicas já existentes, buscando a identificação e a caracterização funcional de um maior número possível de peptídeos presentes no peptidoma de uma célula, tecido ou organismo.

A visualização de moléculas com massas moleculares abaixo de 10 kDa e em baixas concentrações são uma grande limitação das técnicas proteômicas, como a eletroforese bidimensional. Proteínas com massas moleculares abaixo de 10 kDa são difíceis de serem retidas pelos géis e a baixa concentração dificulta a visualização dessas proteínas. Essas limitações têm sido superadas pela utilização de técnicas cromatográficas. A combinação de diferentes e independentes dimensões de separação, por meio da cromatografia líquida multidimensional (MDLC) tem sido bastante utilizada nas análises proteômicas recentes. Na sua forma *offline*, na qual as diferentes dimensões de separação não são diretamente acopladas, é possível a coleta das frações entre as separações, permitindo a análise de um maior número de amostras. As frações podem ser avaliadas antes da próxima dimensão de separação, aumentando a eficiência do processo de purificação, à medida que possibilita a melhor associação entre as dimensões de separação de acordo com as características de cada fração coletada.

Assim foi objetivo desse trabalho ajustar ferramentas proteômicas e peptidômicas para o estudo de proteínas e peptídeos diferencialmente sintetizados associados a mecanismos de resistência de plantas induzida por injúria mecânica.

2. Revisão de Literatura

2.1. Proteômica

Proteínas são polímeros de aminoácidos resultante da tradução das informações genéticas contidas no DNA de um genoma. Estão presentes em grande diversidade, nas membranas, no citoplasma e no interior do núcleo, agindo como enzimas, anticorpos, componentes estruturais, receptores celulares, agentes de sinalização entre outras funções variadas. Devido a essa diversidade funcional, as proteínas exercem papéis fundamentais em quase todos os fenômenos biológicos, como produção de energia, comunicação celular, defesa, contração muscular, atividade neuroquímica, reprodução, dentre outros (Souza et al., 1999).

Com os avanços na área da biologia molecular, uma grande quantidade de seqüências de DNA foi decifrada pelos diversos projetos de seqüenciamento total dos genomas, dentre eles, o seqüenciamento do genoma humano pelo Projeto Genoma Humano. Esse projeto foi responsável por um grande impacto nos estudos da biologia molecular moderna e, durante muitos anos, esse conhecimento genômico propagou a idéia de que não seriam necessários os estudos em nível de proteína para se obter dados relacionados ao aumento ou redução da sua expressão. A idéia era a de que seria necessária apenas a determinação dos níveis de mRNA, para avaliar as interações entre as proteínas e suas funções no desenvolvimento de determinada condição fisiológica (Monti et al., 2005).

A natureza estática do genoma deve ser associada com as propriedades dinâmicas do proteoma. O perfil de expressão protéica de uma célula se altera inúmeras vezes ao longo do seu ciclo e pode ser afetado por vários estímulos intra e, ou, extracelulares, tais como, temperatura, estresse, sinais apoptóticos, contato com patógenos, entre outros. Por isso, ao serem sintetizadas, as proteínas podem sofrer importantes modificações para se tornarem funcionais. Tais modificações não podem ser definidas apenas pelo conhecimento da seqüência dos genes (Baggerman et al., 2003). A idéia da genômica, de estudar as proteínas por meio do seqüenciamento de seus genes, por si só, não pode prever toda a estrutura dinâmica de um proteoma. A busca pelo entendimento da expressão, da função e da regulação das proteínas codificadas por um organismo, associada aos conhecimentos genômicos, foi responsável por mudanças nos rumos das pesquisas

em biologia molecular moderna, dando início à chamada Era Proteômica (Lesley, 2001; Dhingra et al., 2005).

O proteoma de uma célula, tecido ou organismo é composto por milhares de proteínas e apresenta, portanto, uma alta complexidade. A análise proteômica refere-se à avaliação sistemática desse proteoma, de forma a comparar a expressão protéica de células, tecidos ou organismos em distintos momentos fisiológicos, como por exemplo, tecidos doentes e saudáveis, tratados e não-tratados, resistentes e suscetíveis (Wilkins et al., 1995). Os estudos proteômicos são capazes de fornecer importantes informações para identificar, quantificar e estudar as modificações pós-traducionais das proteínas. São as proteínas os agentes definitivamente responsáveis pelos fenótipos celulares, e o seu estudo em nível molecular contribui para o entendimento global e integrado do funcionamento celular. Portanto, a proteômica despontou como uma das vertentes da era genômica, por fazer uso de um conjunto de ferramentas e estratégias em bioquímica analítica, direcionadas para auxiliar os estudos do genoma funcional, que foi resultado direto dos avanços conseguidos pelo seqüenciamento em larga escala do DNA (Pandey e Mann, 2000).

A investigação proteômica está focalizada em duas áreas: proteômica estrutural e proteômica funcional. O objetivo dos estudos estruturais é avaliar os níveis de inibição e de superexpressão, investigando modelos celulares de expressão protéica submetidos a duas ou mais situações fisiológicas diferentes. Essa pesquisa comparativa é usualmente utilizada para identificar proteínas e para relacionar o perfil de expressão do proteoma com alguma situação fisiológica específica (Monti et al., 2005).

Os estudos em proteômica funcional buscam focalizar o monitoramento e a análise das propriedades que envolvem, a nível molecular, as proteínas e o seu fluxo nas células. O aumento do número de genomas seqüenciados fez crescer exponencialmente o número de seqüência de proteínas com funções desconhecidas. Como nem sempre a seqüência genômica é suficiente para elucidar essas funções, é objetivo das pesquisas em proteômica funcional, elucidar as funções fisiológicas e definir os mecanismos de ação a nível molecular. Esse estudo funcional é complexo porque existem proteínas, que para se tornarem funcionais, dependem da interação com outros complexos protéicos, envolvendo mecanismos particulares como as vias de sinalização celular que podem levar à elucidação de

interações proteína-proteína, das redes moleculares e do seu fluxo na célula (Monti et al., 2005).

2.2. Peptidômica

Os objetivos iniciais da proteômica são separar, visualizar e identificar o maior número de proteínas e peptídeos por meio de técnicas bioquímicas analíticas. Uma das técnicas mais comumente utilizada nesses estudos é a eletroforese bidimensional. Entretanto essa técnica apresenta algumas limitações, dentre elas, a dificuldade de se separar e visualizar proteínas com baixas massas moleculares (Neverova et al., 2005). Proteínas com massas moleculares menores que 10 kDa, geralmente, não são retidas na malha do gel e são, portanto, de difícil recuperação e identificação. A linha de pesquisa denominada de peptidômica busca o estudo desse grupo de proteínas, reforçando a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias ou da adaptação de técnicas proteômicas já existentes para purificar e identificar o maior número de peptídeos presentes no peptidoma de uma célula, tecido ou organismo. Esse grupo de peptídeos é bastante numeroso e possui grande diversidade estrutural e funcional, importantes nos processos regulatórios da fisiologia animal e vegetal (Baggerman et al., 2003).

As diferenças entre a proteômica e a peptidômica não se restringem aos valores de massas moleculares dos peptídeos. Estudos envolvendo o peptidoma não necessitam de proteólise química ou enzimática prévia da amostra e, assim, o pesquisador possui a possibilidade de identificar peptídeos na sua forma nativa. Embora essa vantagem seja uma oportunidade para a busca pela identificação de novos peptídeos, a peptidômica está sujeita a algumas limitações. Em relação à concentração, alguns peptídeos estão presentes em baixas concentrações e sua detecção pelo espectrômetro de massa torna-se muito difícil (Fricker et al., 2006). Além disso, a abundância de diferentes tipos de enzimas proteolíticas dentro das células pode aumentar a complexidade do *pool* peptidômico, devido à degradação das proteínas com altas massas moleculares. Portanto devidos cuidados devem ser tomados durante todas as etapas de trabalho, com o objetivo de minimizar a proteólise. Esses problemas podem ser minimizados com o acréscimo de inibidores de proteases e com o enriquecimento dessas amostras de baixas massas moleculares (Farrokhi et al., 2008).

2.3. Ferramentas Moleculares da Proteômica e da Peptidômica

O estudo do proteoma contribui para o entendimento integrado do funcionamento celular, ao estudar a expressão, as funções e o envolvimento das proteínas nas vias metabólicas celulares. As análises proteômica e peptidômica correspondem a um conjunto de ferramentas utilizadas para identificar proteínas e peptídeos, avaliar a sua síntese diferencial e estudar as suas modificações pós-traducionais, como proteólise, fosforilação, glicosilação, metilação, acetilação, entre outras. Essas informações associadas facilitam o entendimento do conjunto de reações bioquímicas definidas por situações fisiológicas específicas (Park, 2003).

Todo esse estudo estrutural e funcional simultâneo de um grande número de proteínas e peptídeos requer o uso de técnicas bioquímicas refinadas. Para o sucesso das informações geradas a partir do estudo do proteoma celular é necessário purificar e identificar o maior número possível de proteínas e peptídeos, permitindo que sejam, respectivamente, catalogados computacionalmente e estudados por técnicas analíticas de caracterização. Esse é um dos objetivos básicos dos projetos proteômicos e peptidômicos. Muitos dos métodos de bioquímica analítica usados na análise proteômica e peptidômica foram adaptados ou, em alguns casos, simplesmente adotados de técnicas bioquímicas já existentes. Dentre as técnicas de separação de proteínas, a eletroforese bidimensional (2D) e a cromatografia líquida multidimensional (MDLC) são as mais utilizadas por apresentarem uma maior versatilidade e resolução. Já para a detecção de proteínas e peptídeos diferencialmente sintetizados, destaca-se a espectrometria de massa (Di Clero e Bellato, 2002).

2.3.1. Eletroforese Bidimensional (2D)

O princípio das técnicas de separações eletroforéticas está baseado no movimento migratório de moléculas, incluindo-se proteínas, pela influência de um campo elétrico. A velocidade de migração das proteínas depende da força do campo elétrico aplicado, da carga, do tamanho das proteínas, da força iônica, da viscosidade e da temperatura do meio de separação (Rocha et al., 2005).

A eletroforese de proteínas foi realizada pela primeira vez em 1937 por Arne Tiselius, estudando a decomposição do soro sanguíneo em frações protéicas, trabalho que lhe rendeu o prêmio Nobel. Em 1970, Laemmli descreveu o uso de géis porosos, formados pela polimerização de acrilamida e bis-acrilamida, na

presença do agente desnaturante de proteínas, dodecilsulfato de sódio (SDS), para analisar massas moleculares de proteínas oligoméricas por eletroforese. Já os fundamentos da abordagem de separação em duas dimensões, utilizando a eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), foram apresentados pela primeira vez por O'Farrel e Klose em estudos na década de 70 (O'Farrel, 1975 e Klose, 1975), sendo designada eletroforese bidimensional (2D).

Na eletroforese 2D, as proteínas são submetidas a duas dimensões consecutivas de separação, baseadas em propriedades das proteínas, que são físico-quimicamente diferentes e independentes. Na primeira dimensão, a separação por focalização isoeletrica (IEF) ocorre de acordo com o ponto isoeletrico (pI) da proteína e, na segunda dimensão, por SDS-PAGE, de acordo com as suas massas moleculares. Quando bem sucedida, a eletroforese 2D dá origem a um mapa contendo numerosos *spots*, bem definidos e separados. Cada *spot* corresponde a uma proteína ou a uma forma protéica, a qual pode ser removida do gel e analisada (Westermeyer, 2001).

A capacidade de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa e a possibilidade de se fazer análise da expressão gênica por meio de comparação entre perfis protéicos de diferentes situações fisiológicas, posiciona essa metodologia entre as principais ferramentas proteômicas. Ao separar as proteínas, é possível ter informações sobre ponto isoeletrico, massa molecular, expressão, abundância relativa e modificações pós-traducionais, verificadas pela alteração da mobilidade eletroforética. Modificação pós-tradução, por exemplo, implicam em alteração do ponto isoeletrico e das massas moleculares, possibilitando ainda a distinção entre formas fosforilada e não-fosforilada de certas proteínas (Pandey e Mann, 2000).

Apesar de ser uma das principais técnicas utilizadas nos estudos proteômicos, a eletroforese 2D possui limitações para detectar proteínas em baixa concentração, com valores extremos de massas moleculares e ponto isoeletrico e proteínas hidrofóbicas, incluindo as de membranas, as quais, muitas são normalmente usadas como alvos para a ação de drogas, e são promissoras para o desenvolvimento de novas drogas ou testes diagnósticos (Hanash, 2003; Nagele et al., 2004). Segundo Salekdeh et al. (2002), proteínas com faixas moleculares entre 10 e 100 kDa apresentam boa mobilidade na segunda dimensão de separação, porém segundo Berggerman et al., (2003), proteínas abaixo de 10 kDa, geralmente,

não são retidas pela malha do gel e são ignoradas quando essa técnica é empregada. Como alternativa, surgem as técnicas cromatográficas.

2.3.2. Cromatografia Líquida Multidimensional (MDLC)

Desde o início da era Proteômica, com os estudos divulgados por Wilkins e seus colaboradores, em 1995, o estudo do proteoma esteve fortemente associado à utilização de géis bidimensionais para a detecção simultânea de um grande número de proteínas expressas por uma célula, tecido ou organismo. Porém os géis 2D, em geral, permitem apenas que as proteínas mais abundantes da célula sejam identificadas, enquanto que as proteínas expressas em pequenas concentrações não são bem visualizadas nos géis. Além disso, é necessário o uso criterioso e preciso da técnica para produzir géis 2D de boa qualidade e reproduzíveis (Berggerman et al., 2003; Nagele et al., 2004; Neverova et al., 2005).

As limitações da técnica proteômica baseadas em géis têm sido superadas por métodos que envolvem a separação por técnicas cromatográficas, utilizando-se colunas e/ou nanocolunas, que podem inclusive estar acopladas à injeção em equipamentos para a espectrometria de massa. Esse método constitui a Cromatografia Líquida Multidimensional (MDLC), que corresponde a uma combinação ortogonal de diferentes técnicas de alto desempenho, que permite alta capacidade de separação das proteínas por meio de cromatografias líquidas seqüenciais. A técnica utiliza de forma independente, diferentes propriedades físico-químicas das moléculas, contribuindo dessa forma, com um alto poder de resolução (Moritz et al., 2003; Nagele et al., 2004; Neverova et al., 2005).

Dependendo do tipo de análise proteômica que se pretende realizar, duas formas de MDLC têm sido propostas. Quando a amostra a ser analisada possui pequena ou média complexidade, a forma *online* - MDLC é a mais apropriada. Por exemplo, quando se deseja analisar bandas de géis digeridas, identificar biomarcadores em fluidos biológicos, avaliar secreções glandulares ou proteomas de organelas específicas entre outras. Na técnica *online* - MDLC, as colunas são acopladas em seqüência, e a amostra ao passar pela última dimensão de separação é diretamente injetada em um tipo de identificador da proteína, como o espectrômetro de massa. Essa técnica acoplada à espectrometria de massa (LC/MS) é um exemplo desse arranjo *online* (Moritz et al., 2003; Miller et al., 2004).

Para a análise proteômica de amostras de alta complexidade, provenientes de células ou tecidos lisados, em geral, utilizam-se análises por arranjo *offline*. Essa forma é apropriada para a purificação e a análise de proteínas presentes em baixas concentrações, pois as amostras separadas são sempre recolhidas no final de cada dimensão de separação por um coletor de frações, avaliadas e injetadas em uma próxima dimensão. Após a última dimensão, as frações são encaminhadas para uma forma de identificação de proteínas, possivelmente por espectrometria de massa não acoplada ao cromatográfico. Esse procedimento facilita o estudo pela capacidade de se trabalhar com um maior número de amostras e pela possibilidade de análise individual das frações coletadas, permitindo a seleção das frações para a próxima dimensão de separação ou análise no identificador, de acordo com o interesse específico. O uso da *offline*-MDLC tem gerado significativos ganhos na resolução das separações protéicas, ao facilitar a identificação de um maior número de proteínas, tornando-se apropriada para ser utilizada em análise proteômicas com o objetivo de realizar a bioprospecção de proteínas e peptídeos (Moritz et al., 2003; Miller et al., 2004; Nagele et al., 2004; Neverova et al., 2005).

Assim as separações por MDLC, especialmente *offline*, apresentam vantagens em relação às separações por eletroforeses 2D, pois um maior número de proteínas pode ser analisado a partir de um mesmo extrato, favorece a análise de proteínas em baixas concentrações na mistura e ainda, permite a recuperação de proteínas na forma nativa para a realização de ensaios biológicos. MDLC pode também ser utilizada na purificação de proteínas hidrofóbicas, como as de membranas, que são freqüentemente alvos de drogas. O seu uso tem sido uma alternativa eficiente para superar as limitações encontradas nas separações utilizando a eletroforese 2D (Lanças et al., 2003).

2.3.3. Espectrometria de Massa (MS) e Seqüenciamento de Peptídeos

A espectrometria de massa (MS) é uma técnica analítica que determina as massas moleculares com base no movimento de partículas carregadas em um campo eletromagnético. As moléculas da amostra são convertidas em íons na fase gasosa e separadas de acordo com as suas relações de massa/carga (m/z) (Westermeyer e Naven, 2002).

Os principais componentes de um aparelho de espectrometria de massa são a fonte ionizadora, o analisador, o detector e o processador de dados. Para serem

separados pelo campo eletromagnético, moléculas neutras devem ser ionizadas e convertidas à fase gasosa pela fonte ionizadora. Devido aos grandes valores de massas moleculares e da polaridade das proteínas e peptídeos, a fonte, além de ionizá-los, deve também promover a desolvatação dos seus íons na fase gasosa. Existe dificuldade em obter esses íons intactos na fase gasosa, sem promover a sua decomposição ou fragmentação, motivo pelo qual o uso da técnica de espectrometria de massa ficou inicialmente limitada à análise química de pequenos e médios compostos. As primeiras técnicas de ionização que permitiram o trabalho com proteínas foram o *fast atom bombardment* (FAB), a *plasma desorption* (PD) e a *thermospray*. Apesar da possibilidade do cálculo das massas moleculares de proteínas com exatidão moderadas e do estudo das fragmentações em peptídeos por meio da *collision-induced dissociation* (CID), a sensibilidade na detecção, por essas técnicas, é limitada. As quantidades necessárias para análise são superiores às necessárias para o seqüenciamento em Edman, o que torna essas técnicas de ionização pouco usuais para a rotina de identificação em laboratórios de análise de proteínas. No final dos anos 80, o surgimento das técnicas *electrospray ionization* (ESI) e *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) permitiram a aplicação completa da MS nos estudos e análises de proteínas e peptídeos. Em 1988, Karas and Hillenkamp publicaram espectros de proteína acima de 10 kDa, utilizando a técnica de MALDI e em 1989, Fenn e colaboradores demonstraram a possibilidade de se obter espectros de massas de proteínas utilizando poucos picomoles, por meio de ESI (Karas e Hillenkamp, 1988; Fenn et al., 1989; Canas et al., 2006).

O analisador é a parte do instrumento que separa os íons obtidos pela fonte ionizadora. A característica mais importante de um analisador de íons é a sua capacidade de resolução. Todos os analisadores existentes podem ser utilizados para trabalhar com proteínas e peptídeos, mas os mais usados são o quadrupolo (Q), o tempo de voo (TOF) e o *ion trap* (TRAP), que podem ser utilizados sozinhos ou acoplados. Espectrômetros de massa compostos por mais de um analisador acoplados são denominados seqüenciais, ou *in tandem*, como por exemplo, o triplo quadrupolo (TQ), o duplo quadrupolo/tempo de voo (QqTOF), o duplo quadrupolo/ion trap (QTRAP) e tempo de voo/tempo de voo (TOF/TOF). O TOF é o analisador mais simples e consiste em um tubo de alto vácuo pelo qual os íons gasosos acelerados voam em velocidades inversamente proporcionais às suas massas (Canas et al., 2006).

A identificação das proteínas utilizando os dados de MS é realizada por comparação entre os mapas teóricos de peptídeos por *peptide mass fingerprint* (PMF). As proteínas e os peptídeos maiores são submetidos a uma proteólise enzimática ou química e os peptídeos resultantes têm sua massa molecular, posteriormente, identificada por MS. Esses valores de massas moleculares obtidos são utilizados nas buscas computacionais em que são comparados com resultados de proteólise *in silico* das proteínas existentes em bancos de dados, utilizando softwares específicos. Outra técnica de identificação importante para a análise proteômica é o seqüenciamento, como o uso da Espectrometria de Massa Seqüencial, ou *in tandem* (MS/MS). Nela, são acoplados dois analisadores de massa em série. O peptídeo a ser fragmentado (íon parental) é identificado pelo primeiro analisador. Entre esses analisadores, existe uma câmara de colisão, contendo um gás neutro e inerte, que proporciona a geração de fragmentos filhos (íons “filhos”), via choque cinético. Esses íons filhos são detectados pelo segundo analisador, determinando a sua razão massa/carga. Os espectros gerados são analisados pela diferença entre os picos de massa referente aos íons filhos e essa diferença é associada à massa dos 20 aminoácidos que compõe as proteínas, fornecendo informações para a formação da seqüência (Westermeyer e Naven, 2002). Seqüenciadores automáticos, que utilizam a metodologia de Edman, são também aplicados à identificação das seqüências peptídicas, entretanto consomem mais tempo e amostra. Porém podem ser requeridos para confirmar a seqüência de amostras que a espectrometria massa deixou dúvidas.

Devido à rapidez das análises em MS, essa tem sido a metodologia preferida para a identificação de proteínas. Entretanto, o desenvolvimento de alguns programas computacionais e a atualização contínua dos bancos de dados é fundamental para o sucesso dessa técnica (Westermeyer e Naven, 2002).

2.4. Aplicações da Proteômica e da Peptidômica

A proteômica e a peptidômica constituem um conjunto de ferramentas bioquímicas utilizadas para se entender o funcionamento dos genes, pois analisam o produto final da expressão do genoma (Pandey e Mann, 2000). Com as dificuldades de se caracterizar funcionalmente as proteínas e peptídeos a partir da seqüência dos genes, o uso da proteômica e da peptidômica garante informações relacionadas às vias de sinalização celular, conjunto de proteínas e peptídeos reguladores,

modificações pós-traducionais, além de informações mais completas sobre estados fisiológicos e fitopatológicos das células, tecidos e organismos associados a expressões de proteínas e peptídeos específicos (Suresh et al., 2005).

Na mesma linha, há a possibilidade de se avaliar a presença de proteínas fosforiladas num determinado proteoma, tratando-se parte da amostra com uma fosfatase e comparando os mapas bidimensionais obtidos após a separação por eletroforese 2D das amostras tratada e não tratada. A perda do grupo fosfato resulta na da proteína para zonas mais básicas do gel, durante a focalização isoeletrica. Fosfoproteínas e fosfopeptídeos são importantes intermediárias de rotas de sinalização e a sua identificação e associação a situações fisiológicas específicas são de grande importância para o entendimento do mecanismo de fenômenos celulares específicos (Yamagata et al., 2002).

A proteômica e a peptidômica também se aplica à biologia e à biotecnologia. O conhecimento sobre proteínas e vias metabólicas envolvidas em diversos processos celulares gera importantes informações para a biologia celular e bioquímica. A caracterização de moléculas bioativas presentes em extratos biológicos naturais pode gerar a identificação de princípios ativos para desenvolver medicamentos e produtos bioativos comerciais para o uso na área agrônômica, alimentícia, de cosméticos, entre outras (Lanças et al., 2003). Proteínas podem ainda ser identificadas como biomarcadores para diagnóstico ou para o tratamento de doenças de difícil controle em animais e plantas (Rocha et al., 2005). Uma proteína relacionada com uma determinada doença específica, quando estudada por ferramentas proteômicas pode vir a ser utilizada tanto como biomarcadores de diagnóstico, quanto alvo para terapias (Lim e Elinitoba-Johnson, 2004).

2.5. Defesa de Plantas

As plantas utilizam mecanismos de defesa presentes nas células que constituem uma forma de defesa primária. Elas não possuem um sistema imune somático capaz de sintetizar células móveis de defesa, assim como os mamíferos. Em contato com alguma forma de estresse do ambiente, as células vegetais respondem utilizando uma grande variedade de barreiras mecânicas e princípios de defesa já existentes de forma natural nas plantas, essas defesas pré-existentes são denominadas constitutivas, inespecíficas ou estáticas (Sticher et al., 1997; Tuzun, 2001; Jones e Dangl, 2006).

Para se adaptar às diferentes adversidades do ambiente, as plantas possuem mecanismos de defesa ainda mais eficientes, inativos ou latentes. A simples exposição ou o contato permanente com algum agente eliciador ativa esses mecanismos. Essa ativação promove uma série de alterações bioquímicas, com o objetivo de adaptar a planta à forma de estresse, alterando o estado fisiológico das células. Nesse caso a resistência é definida como dinâmica, pós-infeccional ou induzida (Colson e Deverall, 1996; Sticher et al., 1997; Vallad e Goodman, 2004).

Para designar os fenômenos pelos quais as plantas, ao serem expostas a um agente eliciador, ativam mecanismos de defesa, não apenas no sítio de indução como também em locais dele distantes e de forma generalizada, são utilizadas as denominações, resistência sistêmica induzida (ISR) e resistência sistêmica adquirida (SAR). Esse agente eliciador pode ser bióticos como extratos celulares e microrganismos vivos, ou abióticos como temperatura, umidade, poluição, luminosidade, estresse mecânico e nutritivo, ou ainda ativadores químicos. Esses agentes levam a planta a uma situação de estresse, induzindo mecanismos de defesa expressos no fenômeno de indução de resistência (Liu et al., 2003).

Estudos parecem concordar que ISR e SAR são fenômenos distintos quanto às formas pelas quais os diferentes mecanismos bioquímicos são induzidos e desencadeados, mas trata-se de fenômenos bastante semelhantes, se não idênticos, quando comparados com relação aos fenótipos expressos a partir da indução de resistência sistêmica. Pressupõe-se que SAR envolve o acúmulo de PRPs (Proteínas Relacionadas com Patogênese) como mecanismo de defesa da planta, e a sua indução é salicilato-dependente, podendo resultar em alterações visuais na planta induzida, como por exemplo, necrose das células submetidas ao estresse. Geralmente, a SAR está associada à indução por patógenos ou ativadores químicos. Na ISR, não há acúmulo de PRPs, a planta induzida não exibe alterações perceptíveis e normalmente, o agente eliciador é um não-patógeno. A ISR não é salicilato-dependente, parece haver outra rota de sinalização mais associada à jasmonatos e etileno (Romeiro, 1999; Vallad e Goodman, 2004; Block et al., 2005).

Após serem expostas a agentes eliciadores abióticos e, ou, bióticos, capazes de induzir resistência, as plantas podem desenvolver uma defesa contra determinados patógenos. Nem sempre pode se afirmar que essa proteção foi resultado direto do fenômeno de indução de resistência, pois o agente em teste tanto pode estar realmente induzindo resistência, ou seja, agindo como um agente

eliciador, como simplesmente pode estar atuando diretamente sobre o patógeno, ou ainda, atuando das duas formas simultaneamente (van Loon et al., 1998).

Existem algumas características definidas para diferenciar o fenômeno de indução de resistência de outros mecanismos de biocontrole capazes de reduzir a severidade e a incidência da doença em plantas. A confirmação da indução de resistência, por exemplo, só ocorre na ausência de efeitos tóxicos diretos do agente eliciador sobre o patógeno desafiante. A exposição da planta ao eliciador e a expressão da resistência necessita de um intervalo de tempo e não deve haver relação entre a magnitude da resistência expressa e as crescentes quantidades do agente eliciador aplicado, à semelhança do que se observa em casos típicos de uso de defensivos agrícolas. Outras características utilizadas para a confirmação dessa resistência induzida são a inespecificidade da proteção, a dependência do genótipo da planta e o seu desenvolvimento local ou sistêmico (Silva et al., 2004).

As defesas induzidas possuem a vantagem de demandar um menor investimento de recursos por parte das células do que aquelas constitutivas, pois promovem gasto de energia de produção apenas quando são ativadas, tornando-se assim defesas mais efetivas para as células vegetais. O estresse provocado por um agente induz a defesa tanto na região diretamente em contato com esse agente (resposta local), quanto em áreas distantes (resposta sistêmica). Para o perfeito desenvolvimento desses mecanismos, as células vegetais fazem uso de vias de transduções de sinais, muitas das quais identificadas e parcialmente caracterizadas (León et al., 2001). A sinalização ocorre pela percepção do sinal, mediada por receptores celulares capazes de interagir com um determinado eliciador. A transdução desse sinal promove a sua amplificação direta ou indireta via passos de fosforilação reversíveis de proteínas, ativação de mensageiros secundários e produção de espécies reativas de oxigênio. Essas espécies reativas possuem um alto efeito citotóxico, necrosando células vegetais e patogênicas e diminuindo a oferta de nutriente para o patógeno, numa reação denominada de hipersensibilidade. Além disso, elas induzem a produção de hidroperóxidos de lipídeos que são precursores de fitormônios, como o ácido jasmônico, que podem ser translocados para partes distantes do sítio de contato com o eliciador, caracterizando a sistematicidade da resistência induzida (Guzzo, 2004).

2.5.1. Proteínas Relacionadas com Defesa de Plantas

A maioria dos organismos vivos é constantemente exposta a patógenos potencialmente prejudiciais. A sobrevivência desses organismos depende de uma rede de mecanismos de defesa que envolve várias biomoléculas. Por meio da rede de transduções de sinais intra e intercelulares, são geradas respostas celulares de ativação de genes envolvidos na síntese de proteínas de defesa, que atuam em diferentes vias bioquímicas (Bals, 2000; Hultmark, 2003).

Enzimas integrantes de rotas metabólicas da síntese de fitoalexinas e da síntese de compostos capazes de promover mudanças estruturais na parede celular são ativadas e são responsáveis por mudanças estruturais no sistema de defesa. Mudanças que, por sua vez, são responsáveis pelo reparo do tecido vegetal danificado, pela produção de substâncias que inibem o crescimento do patógeno, pela biossíntese de moléculas envolvidas nas diferentes vias de sinalização, e que ainda ajudam a ajustar o metabolismo da planta às demandas nutricionais impostas (Bonas e Lahaye, 2002).

Um grupo de proteínas envolvidas nessas mudanças é conhecido como Proteínas Relacionadas com a Patogênese (Proteínas-PR). Elas não se acumulam apenas na região lesionada, estando associadas ao desenvolvimento da sistematicidade da reação, com a função de adaptar as células vegetais às condições de estresse (van Loon e van Strien, 1999). Caracterizadas pelo baixo peso molecular e resistência à ação de proteases, possuem estabilidade e alta solubilidade em pH ácido. As proteínas PR são amplamente distribuídas nos tecidos vegetais, estando presentes em parede celular, membranas plasmáticas celulares, citoplasma e no núcleo celular. As PR de parede possuem um caráter ácido, enquanto as básicas estão localizadas, em sua maioria, no núcleo. São classificadas de acordo com as suas propriedades e mecanismos de ação em 17 famílias (León et al., 2000) (Tabela 1).

2.5.2. Peptídeos Relacionados com Defesa de Plantas

Nos animais vertebrados, o sistema de defesa envolve a síntese de células de defesa e de imunoglobulinas específicas para determinado microrganismo patogênico (Broekaert et al., 1995; Taylor, 1998). A defesa de plantas por sua vez é realizada célula por célula, tornando-se altamente dependente de defesas constitutivamente expressas ou induzidas. A atividade de defesa dos peptídeos

endógenos, constitutivamente expressos ou induzidos por infecção em plantas corresponde a um importante mecanismo capaz de estabelecer uma rápida e efetiva defesa contra patógenos (Reddy et al., 2004). Esse grupo de moléculas chamadas peptídeos antimicrobianos (AMPs) constitui um mecanismo de defesa primitivo, e são encontrados desde organismos simples, como bactérias, até organismos mais complexos, como animais, incluindo-se os humanos (Ostberg, 2005). A diversidade de AMPs é muito grande, cerca de 1000 diferentes peptídeos antimicrobianos já foram identificados (Bechinger, 2006; Straus e Hancock, 2006).

Tabela 1 - Classificação das proteínas relacionadas à patogênese, de acordo com suas propriedades e mecanismos de ação. Adaptado de Pascholati et al. (2005).

Família	Propriedades	Mecanismos de ação
PR-1	Antifúngicas, 14-17kDa	Desconhecida
PR-2	Classe I, II e III endo- β -1,3-glucanases, 25-35kDa	Ação catalítica de hidrólise de β -1,3-glucanas
PR-3	Classe I, II, IV, V, VI e VII endoquitinases, acima de 30kDa	Atividade enzimática de hidrólise de quitina
PR-4	Antifúngicas, atividade de quitinase, domínio C-terminal, 13-19kDa	Atividade enzimática de hidrólise de quitina
PR-5	Antifúngicas, proteínas como a traumatina, osmatina, pearmetina, similar aos inibidores α -amilase e tripsina	Permeabiliza a membrana de fungos
PR-6	Inibidores de proteases, 6-13kDa	Inibidores de proteinases
PR-7	Endoproteases	Atividade endo-proteolítica
PR-8	Classe III das quitinases, ação lizosima	Atividade enzimática de hidrólise de quitina
PR-9	Peroxidases e proteínas como peroxidases	Síntese de lignina
PR-10	Ribonucleases	RNAases
PR-11	Atividade endo-quitinases	Atividade enzimática de hidrólise de quitina
PR-12	Defensinas de plantas	Atividade antimicrobiana
PR-13	Tioninas	Atividade antimicrobiana
PR-14	Proteínas de transferência de lipídeos não específicos	Atividade antimicrobiana
PR-15	Oxidase do oxalato	Catálise da formação do peróxido de hidrogênio
PR-16	Proteínas como as que oxidam o oxalato	Catálise da formação do peróxido de hidrogênio
PR-17	Desconhecidas	Desconhecida

Adaptado de Pascholati et al. (2005)

Os AMPs são, em sua maioria, menores que 10 kDa, têm carga líquida positiva, e 50% de seus aminoácidos são hidrofóbicos (Hancock et al., 2000). Os AMPs descobertos têm sido divididos em vários grupos baseados em seu tamanho,

estrutura secundária e terciária, e na presença ou ausência de pontes dissulfeto (Reddy et al., 2004). Muitos são sintetizados ou ativados por proteólise a partir de proteínas específicas, mas podem ser prontamente sintetizados de uma maneira flexível e com um baixo consumo de energia, em função do seu pequeno tamanho (Broekaert et al., 1995; Borregaard et al., 2000).

Devido à diversidade dos AMPs, da sua capacidade de estabelecimento de defesa rápida e efetiva e da sua flexibilidade de síntese, a peptidômica é de grande importância para a purificação e identificação de peptídeos expressos de forma diferencial de acordo com as situações fisiológicas associadas aos diferentes mecanismos de defesa de planta. Essas informações ajudam no entendimento dos mecanismos moleculares específicos de ação desses peptídeos (Mamone et al., 2004).

2.5.3. Enzimas Indicadoras do Estado de Indução de Resistência em Plantas

O fenômeno da Resistência Sistêmica Induzida em plantas é capaz de promover a superexpressão ou inibição de grande diversidade de biomoléculas, incluindo enzimas, tais como lipoxigenases, peroxidases, fenilalanina amônia-liase, β -1,3-glucanases e quitinases (van Loon, 1997; Silva et al., 2004).

2.5.3.1. Lipoxigenases (LOX)

As lipoxigenases (EC 1.13.11.12) são isoenzimas que catalisam a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados para formar hidroperóxidos. Quando os tecidos de plantas são expostos a alguma forma de estresse, a degradação seqüencial de lipídios de membrana é ativada, liberando ácidos graxos, como o linoléico e o linolênico. Os hidroperóxidos desses ácidos são produtos de reações catalisadas pelas LOX. Esses produtos primários são metabolizados pelas vias enzimáticas da hidroperóxido-liase e hidroperóxido-ciclase (Farmer e Ryan, 1992; Croft et al., 1993; Breusengem et al., 2001).

A via da hidroperóxido-liase produz aldeídos de seis carbonos, como o trans-2-hexenal (composto característico do sabor e odor de frutos e folhas), e a traumatina. Os aldeídos formados nessa via parecem estar associados à inibição do crescimento de fungos, insetos e protozoários (Croft et al., 1993). Já a traumatina, também conhecida como o hormônio do ferimento em plantas, está associada ao processo de sinalização, divisão celular e na resposta a ferimentos em plantas. Já a

via da hidroperóxido-ciclase produz ácido 12-oxo-fitodienólico, que, após uma reação de redução e três reações de β -oxidações, dá origem ao ácido jasmônico. Este composto, além de possuir atividade de regulador do crescimento de plantas, é fundamental para o processo de sinalização responsável pela indução de resistência sistêmica. Ele está envolvido diretamente nos processos de desenvolvimento dos mecanismos de resposta da planta a lesões e a patógenos (Farmer e Ryan, 1992; Croft et al., 1993; Guzzo, 2004).

2.5.3.2. Peroxidases (PO)

A peroxidase (EC 1.11.1. 7) presente em plantas catalisa diversas reações metabólicas envolvidas no crescimento e desenvolvimento vegetal. A sua atividade está presente em ligações de polissacarídeos, ligações de monômeros, regulação da alongação de células e ainda em mecanismos associados à defesa de plantas como a lignificação, cicatrização de ferimentos e a oxidação de compostos fenólicos (Baysal et al., 2003).

Em resposta à presença de um patógeno, uma defesa inicial comum é a resposta de hipersensibilidade. Nela as células adjacentes à infecção morrem rapidamente, privando o patógeno de nutrientes e assim dificultando a sua propagação. Quando há sucesso nessa resposta, apenas uma pequena região próxima do local do ataque, permanece morta, evitando que o restante da planta seja afetado (Liavonchanka e Feussner, 2005). A morte dessas células é precedida pela produção, pelas células vizinhas, de espécies reativas de oxigênio, como o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e os radicais hidroxilas ($OH^\cdot$), que são liberados por ações enzimáticas e são altamente tóxicos às células, podendo levar o patógeno à morte. Radicais hidroxilas, por exemplo, podem iniciar reações em cadeia com várias moléculas orgânicas, levando à inativação enzimática e degradação de ácidos nucleicos. Essas espécies reativas de oxigênio não são tóxicas apenas para os fitopatógenos, elas provocam danos nas células vegetais também, que para se protegerem induzem mecanismos de ativação de enzimas antioxidantes, como a família da peroxidases (Mittler, 2002; Soares e Machado, 2007).

2.5.3.3. Fenilalanina amônia-liase (PAL)

A fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5) está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primários e secundários. A etapa catalisada por

essa enzima é a principal etapa reguladora da síntese de compostos fenólicos. Essa enzima catalisa a síntese do ácido transcinâmico, por reação de desaminação do aminoácido aromático fenilalanina. Esse ácido é o precursor de vários metabólitos secundários, incluindo fenóis, monômeros de lignina e o ácido salicílico, importante na defesa direta, na defesa estrutural e no processo de sinalização da resposta sistêmica (Bonas e Lahaye, 2002).

As plantas produzem uma enorme variedade de compostos fenólicos secundários. Eles são quimicamente bastante heterogêneos e, devido a essa enorme diversidade, eles apresentam uma variedade de funções nas plantas, entre elas pode-se citar a ação como compostos de defesa da planta, agindo diretamente contra alguns patógenos. A lignina, um polímero de grupos fenilpropanóis altamente ramificados, derivados do ácido cinâmico, além de proporcionar suporte mecânico, desempenha funções protetoras importantes nas plantas. Sua resistência física bloqueia o crescimento de patógenos e é uma resposta freqüente à infecção ou a lesão. O ácido salicílico é um dos fitormônios associados com as vias de transduções de sinais responsáveis pela ativação de mecanismos de defesa em plantas. Por desempenhar uma função-chave na síntese desses compostos envolvidos na fitoimunidade e exibir uma alta reatividade a fatores de estresse, muitos autores afirmam que essa enzima serve como marcadora da indução de resistência sistêmica em plantas (Gerasimova et al., 2004).

2.5.3.4. Quitinases e β -1,3-Glucanases

As quitinases (EC 3.2.1.14) e as β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.6) constituem um grupo de enzimas hidrolíticas, distribuídas em plantas adultas. De forma constitutiva, elas são expressas em pequenos níveis em plantas e desempenham diversas funções no crescimento e desenvolvimento do vegetal, incluindo ações de microsporogênese, embriogênese, germinação, floração e abscisão. Essas enzimas são um bom exemplo de proteínas PR, pois são drasticamente induzidas quando as plantas respondem a processos de infecção por fungos, bactérias ou vírus patogênicos. As quitinases catalisam reações de hidrólise de quitina. Esse polissacarídeo é um polímero de monômeros de N-acetilglicosamina responsável por uma estrutura cristalina e insolúvel, presente na parede celular de muitos fungos patogênicos. As reações de hidrólise catalisadas pelas β -1,3-glucanases degradam parcialmente a parede celular e inibem o crescimento micelial e a germinação de

esporos de fungos patogênicos, pois promovem a hidrólise de β -1,3-glucanas presentes na parede celular de fungos (Wu e Bradford, 2003).

A associação dessas enzimas pode atuar diretamente nas paredes celulares dos patógenos, promovendo uma degradação que libera oligossacarídeos que atuam como eliciadores nas células vegetais e são responsáveis pela indução de outras respostas de defesa de plantas a injúrias (Wu e Bradford, 2003).

2.6. Cultura do Tomate

Considerada uma das hortaliças mais consumidas no mundo, o tomate é originário dos países andinos, desde o norte do Chile até a Colômbia. É um fruto pertencente à família das Solanáceas, como pimentão, o jiló, a berinjela e a batata. Consumido *in natura* ou cozido, os tomates contêm poucas calorias. Os frutos são ricos em vitaminas A, B e C, e sais minerais como fósforo, ferro, potássio e magnésio. São, também, boas fontes de licopeno, um antioxidante natural associado à proteção contra alguns tipos de câncer.

No Brasil, a sua produção agrícola é bastante desenvolvida. Conforme informações da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO), o país é o nono produtor de tomate do mundo, com uma safra em 2007/2008, em torno de 3,3 milhões de toneladas. O estado de Goiás é o principal produtor nacional de tomate destinado à indústria. No ano de 2005, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o estado foi responsável por 23,7% da produção nacional, equivalentes a 747 mil toneladas. Porém o estado de São Paulo foi o maior em área de plantio, com aproximadamente 11 mil hectares. Seguindo a classificação dos estados produtores, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Bahia foram responsáveis por 21,3%, 16,5%, 6,7% e 6,1% respectivamente, da produção nacional no ano de 2005.

A cadeia produtiva do tomate industrial apresenta grande importância sócio-econômica no contexto do agronegócio, principalmente por sua elevada capacidade de geração de emprego e renda em todos os setores da economia. O crescimento da demanda nacional por produtos oriundos do tomate e seus derivados é cada vez maior e tem sido suprido com o aumento da produtividade industrial. Aumento esse, facilitado pela concentração da produção em áreas de cerrado, nos estados de GO e MG. O clima seco nos meses de março a setembro favorece o cultivo do tomateiro nessas regiões. Além disso, os solos profundos e bem drenados e a topografia plana

facilitam a adoção novos métodos de manejo da cultura que permitem o uso de técnicas mais eficientes de grandes sistemas irrigação associadas às novas fórmulas para nutrição de plantas.

Um grande número de pragas e doenças que acometem o tomateiro tem sido relatado. Elas são responsáveis por uma grande redução na produtividade e na qualidade dos frutos. Diversas bactérias, fungos, vírus e nematóides tem sido caracterizados como agentes causadores de doenças em tomateiro. Bactérias como *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*, *Pseudomonas syringae pv. tomato*, *Pseudomonas solanacearum* e *Erwinia spp*, além dos fungos *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum fsp. Lycopers* e *Alternaria solanii* são responsáveis por doenças prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento da planta e de seus frutos. Com relação aos nematóides, os causadores da galha, do gênero *Meloidogyne* são importantes pragas do tomateiro. Já os vírus que mais causam danos econômicos na cultura de tomate, no Brasil, são os geminivírus (Embrapa, 2008).

Devido ao grande número de pragas e doenças que afetam o tomateiro, essa cultura ocupa o segundo lugar em consumo de agrotóxicos por área na produção de frutos com valor comercial (Neves, 2003). A demanda por uma cultura que possa ser produzida sem a utilização de agrotóxicos vem crescendo, principalmente com a divulgação freqüente de contaminação do fruto com resíduos de pesticidas. Assim, a produção de tomates por ser uma grande oportunidade de negócio, constitui um enorme desafio na busca de informações e alternativas viáveis para o combate das doenças e pragas associadas a essa cultura.

Organismos como as plantas de tomate são constantemente desafiadas com inúmeros estresses do ambiente, sejam bióticos ou abióticos, e são capazes de ativar respostas de defesa induzindo a ativação e a transcrição de genes específicos. A injúria em plantas é uma forma de estresse abiótico capaz de ativar mecanismos de defesa que previnem futuras lesões e induzem resistência. Considerando que essa forma de estresse induz uma resposta sistêmica caracterizada pela síntese diferencial de proteínas, o estudo proteômico e peptidômico da defesa de plantas de tomate sob injúria mecânica é capaz de avaliar, identificar e caracterizar proteínas e peptídeos que possam ser utilizados como agentes de defesa para o controle de doenças de plantas.

3. Objetivo

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho foi à identificação de proteínas e peptídeos relacionados com a defesa em plantas, por meio da análise proteômica e peptidômica de plantas de tomate que tiveram o tecido foliar submetido a um estresse mecânico.

3.2. Objetivos Específicos

Para alcançar o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Cultivar plantas de tomate por 28 dias, promover ferimentos nas folhas e coletá-las 0, 1, 2 e 7 dias após os ferimentos, para a comparação do perfil protéico com plantas sem ferimento.
- Determinar a metodologia de preparo de extratos solúveis e de parede celular das folhas de tomate e avaliar a atividade de lipoxigenases, peroxidase, fenilalanina amônia-liase, β -1,3-glucanases e quitinases nos extratos brutos.
- Ajustar o protocolo de purificação dos extratos por fracionamento salino, fracionamento por ultrafiltração e por cromatografia líquida multidimensional.
- Comparar os perfis cromatográficos de fase reversa (RP-HPLC) para os cinco tratamentos e selecionar os picos diferenciais.
- Buscar a identificação de proteínas associadas a esses picos diferenciais por meio de determinação de massa molecular e da seqüência total das proteínas e peptídeos por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF.
- Buscar homologias em bancos de dados genômicos e proteômicos para identificar proteínas de interesse para a defesa de plantas.

4. Materiais e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Proteômica do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agronomia (BIAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os ensaios de espectrometria de massa foram realizados em equipamentos da Rede Proteômica Nacional, no Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.1. Cultivo das Plantas de Tomate

Sementes da variedade de tomateiro Santa Cruz “Kada” foram, gentilmente, cedidas pelo Prof. Reginaldo da Silva Romeiro do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico, do Departamento de Fitopatologia (DFP) da UFV. As plantas foram cultivadas em sistema parcialmente hidropônico, desenvolvido pelo Prof. Paulo Roberto Gomes Pereira, do Laboratório de Nutrição de Plantas, do Departamento de Fitotecnia (DFT) da UFV. Em copos descartáveis de 200 mL, contendo furos na porção inferior, foi adicionado o substrato Bioplant® não esterilizado e as sementes de tomateiro. Esses copos foram colocados sobre uma bandeja de isopor contendo o mesmo substrato, sendo essa bandeja irrigada com água uma vez ao dia. Foram cultivadas duas plantas por copo, em um total de 90 plantas por tratamento, mantidas em ambiente de casa-de-vegetação do DFP, da UFV.

4.2. Estresse Abiótico

Após 28 dias, todas as folhas do tomateiro sofreram ferimentos no limbo foliar, por meio de um alicate adaptado (diâmetro aprox. 0,5 cm). Folhas sem ferimento (controle) e de plantas com 0, 1, 2 e 7 dias após o ferimento foram coletas e armazenadas a -80°C, em envelopes de papel alumínio, que foram colocados dentro de envelopes de papel pardo, até a utilização como fonte protéica.

4.3. Preparo do Extrato para a Avaliação da Atividade Enzimática

Os extratos para avaliar a atividade das enzimas indicadoras do estado de indução de resistência sistêmica foram obtidos por maceração com nitrogênio (N₂) líquido na presença de tampão de extração. Folhas congeladas de plantas de tomateiro submetidas, a cada um dos tratamentos, após pesadas (5 g), foram trituradas com N₂ líquido em almofariz e pistilo. Os extratos foram macerados na

proporção 1:2,5 (2,5 mL/g) com Tris-HCl 50 mM pH 7,0, acrescido de benzamidina e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) a 1 mM. Acrescentou-se polivinilpolipirrolidona (PVPP) a 2% ao homogenato, que foi centrifugado a 20.000 g e 4 °C por 25 minutos em centrífuga refrigerada, condição utilizada para todos os procedimentos de centrifugação. O sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades das enzimas.

4.4. Preparo do Extrato Solúvel (ES)

O extrato solúvel foi preparado de forma semelhante ao extrato para avaliar a atividade enzimática, porém foram maceradas 100 g de folhas. O sobrenadante, que correspondeu ao Extrato Solúvel (ES) foi fracionado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30-75%sat.) e o precipitado ressuscitado em Tris-HCl 50mM pH 7,0, acrescido de PMSF e benzamidina a 1 mM, constituiu a fonte de material para análise proteômica e peptidômica.

4.5. Preparo do Extrato de Parede Celular (EP)

O precipitado obtido no preparo do extrato solúvel foi ressuscitado em LiCl 1,5 M e deixado sob agitação por 16h, a 4 °C. O sobrenadante obtido após nova centrifugação foi denominado de Extrato de Parede Celular (EP). O EP foi fracionado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30-75%sat.). O precipitado recuperado foi ressuscitado em Tris-HCl 50 mM pH 7,0, acrescido de PMSF e benzamidina a 1 mM e constituiu a fonte de material para análise proteômica e peptidômica.

4.6. Fracionamento de ES por Ultrafiltração

Para o fracionamento, utilizou-se a técnica de ultrafiltração em aparelho do tipo AMICON® (MILLIPORE Stirred Ultrafiltration Cell), utilizando membranas de 1, 10 e 30 kDa (MILLIPORE Ultrafiltration Membranes Regenerated Cellulose). Foram obtidas três amostras dessalinizadas, nas faixas de massas moleculares 1-10 kDa, 10-30 kDa e superior a 30 kDa.

4.7. Quantificação de Proteínas Totais

A quantificação de proteínas totais do extrato para a avaliação enzimática foi feita utilizando-se o ácido bicinonínico (Smith, 1985), com pequenas modificações. Para o EP, a quantificação foi conforme Bradford (1976). Para ambos, a curva-padrão foi preparada utilizando BSA como proteína padrão.

4.8. Determinação da Atividade das Enzimas Indicadoras do Estado de Indução de Resistência em Plantas

4.8.1. Atividade de Lipoxigenases (LOX)

A atividade de LOX foi determinada à temperatura ambiente, segundo metodologia descrita por Axelrod, et. al. (1981), utilizando ácido linoléico na forma de linoleato de sódio 10 mM, pH 9,0 como substrato, por meio do aumento da absorvância no comprimento de onda de 234 nm. O ensaio foi composto por 1000 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, 20 µL do substrato e 10 µL do extrato foliar. No controle, o extrato foliar foi substituído por tampão de extração, no mesmo volume. A velocidade de formação dos produtos (v), em M.min⁻¹, foi calculada pela equação, $v = \Delta \text{Abs}_{234} / \epsilon \cdot l \cdot \Delta t$, utilizando-se ΔAbs_{234} correspondente à diferença entre os valores de absorvância obtidos 10 min e 30 s e 30s após o início da reação. O coeficiente de extinção molar (ϵ) foi o dos hidroperóxidos para o ácido linoléico e igual a 25.000 M⁻¹.cm⁻¹. Caminho ótico (l) foi de 1,0 cm e o tempo de reação (Δt) foi de 10 minutos. A atividade específica foi expressa em µmol de produto formado.min⁻¹.µg proteína⁻¹.

4.8.2. Atividade de Peroxidases (PO)

A atividade de PO foi determinada a 30° C, segundo metodologia descrita por Hammerschmidt et. al. (1982). O ensaio de reação foi composto por 1019 µL de uma solução de reação e 1 µL do extrato foliar. A solução de reação continha 125 µL de guaiacol, 153 µL de peróxido de hidrogênio presentes em 50 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. No controle, o extrato foliar foi substituído por tampão de extração. A reação foi incubada em banho-maria e em seguida foram realizadas leituras de absorvância em 470 nm, nos tempos de 30 s e 15 min e 30 s após o início da reação. A atividade específica foi expressa em Δ unidades de absorvância.min⁻¹.µg proteína⁻¹.

4.8.3. Atividade de Fenilalanina amônia-liase (PAL)

A atividade de PAL foi determinada segundo a metodologia descrita por Pascholati et al. (1986). Foram realizadas medidas espectrofotométricas diretas, em 290 nm, a 37°C. Nos ensaios enzimáticos, avaliou-se a conversão de L-fenilalanina em ácido cinâmico, nos tempos de 30 s e 5 min e 30 s após o início da reação. O ensaio foi composto de 10 µL do extrato foliar e 1000 µL de uma solução de L-

fenilalanina 0,2%. No controle, o extrato foliar foi substituído por tampão de extração. A atividade específica foi expressa na forma de nmol ácido cinâmico.min⁻¹.µg proteína⁻¹.

4.8.4. Atividade de Quitinases

A atividade de quitinases foi determinada pela variação colorimétrica do produto liberado pelo substrato Chitin Azure, segundo metodologia descrita por Hackman e Goldberg (1964), com pequenas modificações. Para cada reação 10 µg do substrato, que correspondem a uma concentração final do substrato de 1% de mistura de reação, foram adicionados a 600 µL de tampão de extração e 400 µL de extrato foliar. No controle, o extrato foliar foi substituído por tampão de extração. Incubou-se a 25°C e após 48 horas, os ensaios tiveram a absorvância determinada a 575 nm. A atividade específica foi expressa pela atividade de quitinases.dia⁻¹.g quitina⁻¹.µg proteína⁻¹.

4.8.5. Atividade de β-1,3-Glucanases

A atividade de β-1,3-glucanases foi determinada segundo metodologia descrita por Lever (1972). A mistura de reação, incubada a 45°C, foi composta de 220 µL do tampão de extração, 250 µL de laminarina 0,4% e 30 µL do extrato foliar. Após 1 hora, foram acrescentados 1,5 mL de hidrazina do ácido p-hidroxibenzóico - HAPHB, para o desenvolvimento de cor. Essa solução foi composta de 0,5 g de ácido p-hidroxidobenzóico diluído em 10 mL de HCl e 50 mL de NaOH, ambos 0,5 M. Em seguida a mistura foi aquecida a 100° C por 5 min. Após resfriamento, as amostras tiveram a absorvância determinada a 410 nm. Subtraiu-se do valor de absorvância de cada amostra o valor de absorvância do controle (mistura idêntica ao ensaio sem a incubação prévia). As atividades específicas foram expressas em unidades de absorbância. min⁻¹. µg proteína⁻¹.

4.9. Cromatografia Líquida Multidimensional em HPLC

4.9.1. Cromatografia de Exclusão Molecular

As cromatografias de exclusão molecular foram realizadas em coluna Protein Pack 125 Å (WATERS CORPORATION) com limite de exclusão de 2 – 80 kDa, utilizando-se equipamento HPLC semi-preparativo, BREEZE™ HPLC SYSTEM (WATERS CORPORATION). O tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,0 adicionado de 150 mM de NaCl foi utilizado para o equilíbrio e para a eluição isocrática em fluxo de

0,25 mL.min⁻¹. Ribonuclease A (13,7 kDa), quimiotripsinogênio (25 kDa), ovalbumina (43 kDa) e albumina (64 kDa), LMW GEL FILTRATION CALIBRATION KIT (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) foram utilizadas como proteínas-padrão, para estimar o tempo de eluição das proteínas de acordo com as massas moleculares. Para padronização, 5 µg de cada proteína foram separadamente diluídas em 100 µL de tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,0 e cromatografadas duas a duas. Uma alíquota de 50 µL de cada amostra de EP foi diluída com 50 µL do tampão de eluição e correspondeu às amostras separadas por cromatografia.

4.9.2. Cromatografia de Troca Aniônica

Para as cromatografias de troca aniônica foi utilizada a coluna Spherisorb® 5 µm SAX (WATERS CORPORATION) que foi equilibrada com o tampão Tris-HCl 25mM pH 7,0 e as proteínas foram eluídas com um gradiente crescente de NaCl 0 a 1 M, ao fluxo de 1,0 mL.min⁻¹.

4.9.3. Cromatografia de Fase Reversa

As cromatografias de fase reversa foram realizadas em coluna C18, Shim-Pack CLC-ODS (SHIMADZU CORPORATION) que foi equilibrada em TFA 0,1%. A eluição das proteínas foi com TFA 0,1% na presença de um gradiente crescente de acetonitrila (0 a 80%), ao fluxo de 1,0 mL.min⁻¹.

4.10. Espectrometria de Massa por MALDI-TOF/TOF

Os experimentos para a determinação das massas moleculares e seqüenciamento dos peptídeos por espectrometria de massa foram realizados no Núcleo de Biomoléculas do ICB/UFMG, sob a co-orientação do Prof. Marcelo Matos Santoro, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da UFMG. As análises do tipo MALDI-TOF/TOF foram realizadas em um espectrômetro de massa, modelo Autoflex III Smartbean (BRUKER DALTONICS®) com a supervisão técnica e operacional do Dr. Agenor Valadares.

Para o preparo das amostras para a espectrometria de massa, alíquotas de 300 µL das amostras selecionadas foram liofilizadas em microtubos individualizados e cada amostra foi reduzida e alquilada. A redução e a alquilação das proteínas ocorreu pela adição de 20 µL de NH₄HCO₃ a 0,4 M e de Uréia 8 M, seguida da adição de 5 µL de Ditiotretitol (DTT) a 45 mM e da incubação a 50^o C. Após 50 minutos, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e acrescentaram-se 5 µL de

iodoacetamida 100 mM. Incubou-se a mistura à temperatura ambiente, protegida da luz, e após 15 minutos, foram acrescentados 130 µL de água ultrapura, para diluir a uréia até a concentração final de 1 M. A proteólise enzimática foi realizada com tripsina, pela adição de 2 µg da protease modificada (Sequencing Grade Modified Trypsin - Promega) e incubação a 37⁰ C por 24 h.

Após a proteólise, 8 µL de amostra reduzida, alquilada e proteolisada foram dessalinizadas e concentradas utilizando-se microcolunas de fase reversa Zip Tip (Millipore) de acordo com os passos seqüenciais:

- 1 - Em um novo microtubo foram adicionados 8 µL de TFA 0,1% e Acetonitrila 50%, e esse microtubo foi reservado.
- 2 - As microcolunas Zip Tip foram lavadas com 8 µL de Acetonitrila 50% (3x).
- 3 - As microcolunas foram equilibradas, lavando-as com 8 µL de TFA 0,1% (3x).
- 4 - Foram passados pela coluna 8 µL de amostra (10x).
- 5 - Foram passados pela coluna 8 µL de TFA 0,1% (3x).
- 6 - No microtubo reservado (item 1), lavou-se o Zip Tip (10x) e alíquotas da amostra obtida foram utilizadas para as análises no MALDI-TOF/TOF.

Foi misturado 1 µL da amostra contida no microtubo com 1 µL de matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (5 µg.mL⁻¹ em 50% de acetonitrila e TFA 0,1%) no poço da placa de aço MTP Anchor ChipTM 600/384 TF (BRUKER DALTONICS[®]) do espectrômetro de massa. Para que os espectros obtidos tivessem a maior precisão e confiabilidade, foi realizada a calibração externa com o padrão, *Peptide calibration standard II* (BRUKER DALTONICS[®]) que foi alíquotado com a mesma matriz em outro poço da placa de aço. Esse padrão é composto pelas proteínas bradisinina (757 Da), angiotensina II (1.046 Da), angiotensina I (1.296 Da), substância P (1.347 Da), bombesina (1.619 Da), ACTH clip 1-17 (2.093 Da), ACTH clip 18-39 (2.465 Da) e somatostatina (3.147 Da).

Os espectros foram editados manualmente usando o programa *FlexAnalysis* (BRUKER DALTONICS[®]), com seleção dos picos mono carregados apenas. As buscas em bancos de dados foram realizadas utilizando o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), usando o banco de dados do National Center of Biotechnology Information (NCBI). Os parâmetros de busca foram máximos de um sítio tríptico de corte não clivado; carbamidometilação como modificação constante de cisteínas e oxidação de metionina como modificação variável.

Capítulo I – Cromatografia líquida multidimensional (MDLC) *offline* como ferramenta para a proteômica e a peptidômica diferenciais em plantas

Resumo

Alterações na expressão de proteínas em plantas ocorrem como resposta ao fenômeno de indução de resistência sistêmica. Visando identificar proteínas associadas a esse fenômeno, plantas de tomate foram feridas por esmagamento do limbo foliar em cada uma das folhas, usando-se um alicate adaptado. Todas as folhas de plantas sem ferimentos (SF) e de plantas feridas foram coletadas e estocadas a -80°C após 0, 1, 2 e 7 dias de tratamento. Extratos protéicos foram preparados por trituração das folhas em N₂ líquido e maceração em tampão de extração contendo inibidores de protease. Os extratos foram centrifugados e os sobrenadantes, denominados de Extrato Solúvel (ES), foram utilizados para avaliar a atividade das enzimas indicadoras do estado de indução de resistência, lipoxigenases (LOX), peroxidases (PO), fenilalanina amônia-liase (PAL), quitinases e β-1,3-glucanases. Os precipitados foram lavados e uma nova fração protéica foi extraída em presença de LiCl, sendo denominada Extrato de Parede Celular (EP). EP foi fracionado com (NH₄)₂SO₄ (30-75% sat.) e o precipitado recuperado foi ressuspenso em tampão de extração e avaliado quanto à síntese diferencial de proteínas utilizando cromatografia líquida multidimensional (MDLC), combinando cromatografias *offline* de exclusão molecular e de fase reversa. Proteínas-padrão foram utilizadas para estimar o tempo de eluição em cromatografias de exclusão molecular, e a comparação entre os perfis de eluição dos cinco tratamentos mostraram diferenças na expressão protéica. Os eluatos foram reagrupados em quatro *pools* (GF1 a GF4), de acordo com o tempo de eluição obtido, e esses *pools* foram separados por cromatografias de fase reversa e comparados entre os diferentes tratamentos. Aumentos nas atividades de todas as enzimas marcadoras de indução de resistência avaliadas indicaram que o material-fonte escolhido para as análises proteômicas apresentava proteínas diferencialmente sintetizadas em função dos tratamentos propostos. O *pool* GF4 apresentou o maior número de picos protéicos/peptídicos diferencialmente sintetizados. Foram identificadas massas moleculares nas frações *RPGF4* correspondentes aos cinco tratamentos em

diferentes tempos de eluição. Os protocolos permitiram a obtenção de 5 frações peptídicas purificadas (SF - 9.965,348 Da; 0-Dia - 5.586,304 Da; 1-Dia - 2.835,539 Da; 2-Dias - 1.611,931 Da e 7-Dias - 9.980,078 Da) e duas frações com duas massas. Análises de *peptide mass fingerprint* não demonstraram homologias significativas, apenas indicaram a associação desses peptídeos com mecanismos de defesas. Foi obtida uma sequência de nove resíduos de aminoácidos (E-N-G-E-I/L-V-D-I/L-N) por espectrometria de massa MS/MS de um peptídeo tríptico (2.211,399 Da) da amostra *RPGF4* 7-Dias (9.980,349 Da).

Palavras-chave: Análise proteômica diferencial; Análise peptidômica diferencial; *offline*-MDLC, Peptídeos e proteínas de defesa, enzimas indicadoras de indução de resistência, extrato de parede celular, plantas de tomate.

1.1. Introdução

Plantas cultivadas no campo são expostas a estresses múltiplos, e suas respostas definirão sua capacidade de sobrevivência. Sabe-se que algumas proteínas, como as enzimas marcadoras do estado de indução de resistência sistêmica, lipoxigenases, peroxidases, fenilalanina amônia-liase, β -1,3-glucanases e quitinases podem ser avaliadas pelas atividades catalíticas, e o seu aumento corresponde a um indicativo desse estado de indução (Kolomiets et al., 2001; Silva et al., 2004; Vallad e Goodman, 2004).

Diferentes vias de resposta são induzidas pela ativação ou inibição de diversas proteínas, quando células de plantas são submetidas a alguma forma de estresse biótico ou abiótico. Estudos proteômicos estruturais e funcionais buscam avaliar os níveis de inibição e de superexpressão dessas proteínas, focalizando o monitoramento e a análise de suas propriedades, e os seus envolvimento em redes moleculares de sinalização e de defesa de plantas contra estresses (Lesley, 2001; Dhingra et al., 2005; Monti et al., 2005).

As plantas possuem um complexo mecanismo sensorial de monitoramento para adaptar seu crescimento e desenvolvimento às condições ambientais presentes ao seu redor. Ao lado das proteínas constitutivas, proteínas diferencialmente sintetizadas são inibidas e, ou, superexpressas, de acordo com as necessidades adaptativas, como em condições de estresse (Ahsn et al., 2007).

Por fazer parte desse mecanismo latente nas células vegetais, proteínas ligadas à defesa são diferencialmente sintetizadas, em geral, em baixas concentrações. A análise proteômica do estado fisiológico originado por essa indução, em géis bidimensionais, é dificultada por esses baixos níveis de expressão. As limitações das técnicas proteômicas baseadas em géis têm sido superadas pelo uso de técnicas cromatográficas combinadas, que corresponde à cromatografia líquida multidimensional (MDLC), uma combinação ortogonal de diferentes técnicas de alto desempenho que permite alta capacidade de separação das proteínas pelo uso de cromatografias seqüenciais, utilizando-se diferentes propriedades físico-químicas das moléculas. Quando comparada com a eletroforese bidimensional, essa técnica possui a grande vantagem de não promover a degradação das amostras, que podem ser recuperadas na forma nativa e podem ser utilizadas para avaliar as atividades biológicas e, assim, as potencialidades dos extratos purificados, como as

características antimicrobianas (Nagele et al., 2004; Delahunty e Yates, 2005; Neverova et al., 2005).

As formas *online* e *offline* de combinação das dimensões de separação em MDLC apresentam particularidades. Na técnica *online*, o acoplamento em seqüência das colunas e a injeção automática da amostra na segunda dimensão e, ainda, em um identificador das proteínas como os espectrômetros de massa, facilitam o processo de análise aumentando a rapidez e a reprodutibilidade do processo. Porém para as análises proteômicas com o objetivo de bioprospectar proteínas em amostras complexas, as separações cromatográficas em colunas não diretamente acopladas, designada *offline*-MDLC, permite ensaios biológicos entre as frações e a seleção de acordo com o interesse específico para a próxima dimensão de separação ou para a análise no identificador. Essa técnica aumenta a eficiência nas comparações e, em geral, permite a identificação de um maior número de proteínas.

O objetivo desse trabalho, portanto, foi analisar, por técnica *offline*-MDLC, utilizando cromatografias de exclusão molecular e de fase reversa, o extrato de parede celular em diferentes estados fisiológicos de resistência sistêmica induzida, em plantas de tomate submetidas a ferimentos mecânicos como forma eliciadora, comparando-se plantas não feridas, utilizadas como controle.

I.2. Metodologia

Conforme apresentado no item Material e Métodos, seguem os procedimentos utilizados para a obtenção de EP (Figura II.1 e II.2) e os procedimentos de purificação e caracterização desses extratos.

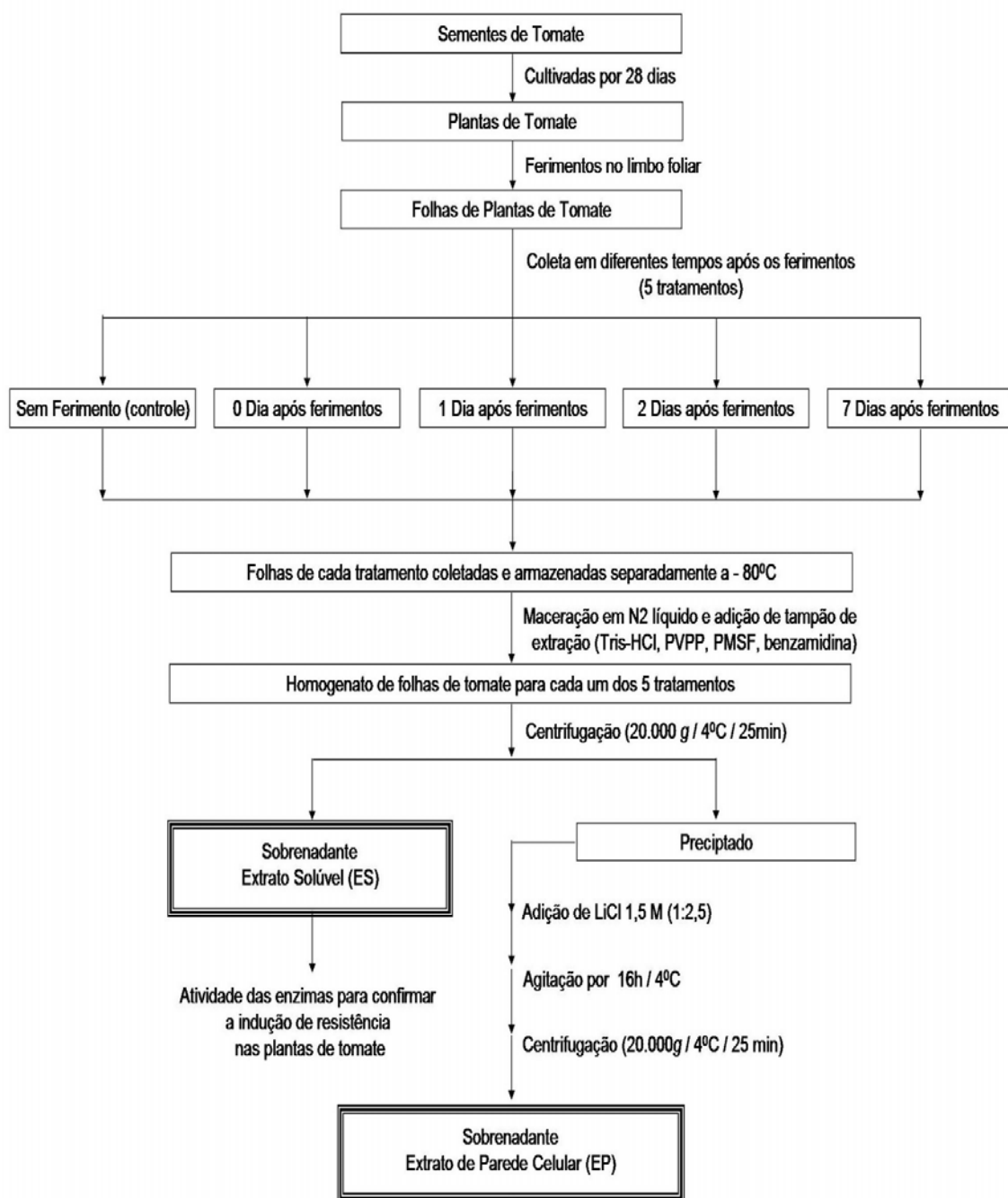


Figura I.1 - Fluxograma esquemático da metodologia de obtenção dos extratos solúveis (ES) e dos extratos de parede celular (EP) utilizados na análise proteômica.

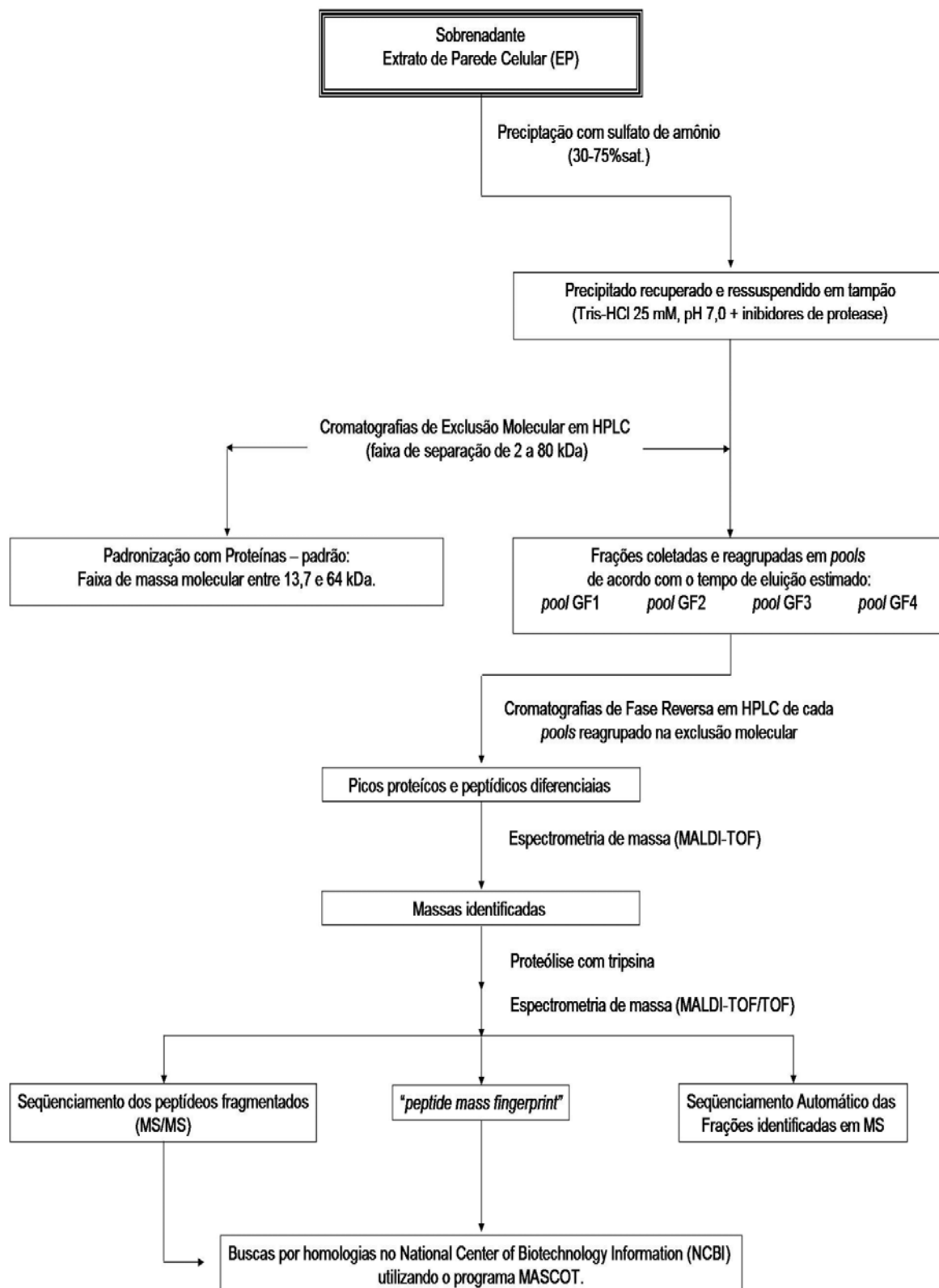


Figura 1.2 - Fluxograma esquemático da metodologia de *offline*-MDLC como ferramenta proteômica e peptidômica para a análise dos extratos de parede celular (EP).

I.3. Resultados e Discussão

Plantas de tomate feridas mecanicamente e coletadas em diferentes tempos após os ferimentos, quando comparadas com plantas não feridas, apresentaram alterações nas atividades de enzimas indicadoras do estado de indução de resistência sistêmica, indicando que o material-fonte de proteínas a ser usado nas análises proteômicas e peptidômicas diferenciais apresenta síntese diferencial de proteínas em resposta ao estresse envolvido (Figura I.3).

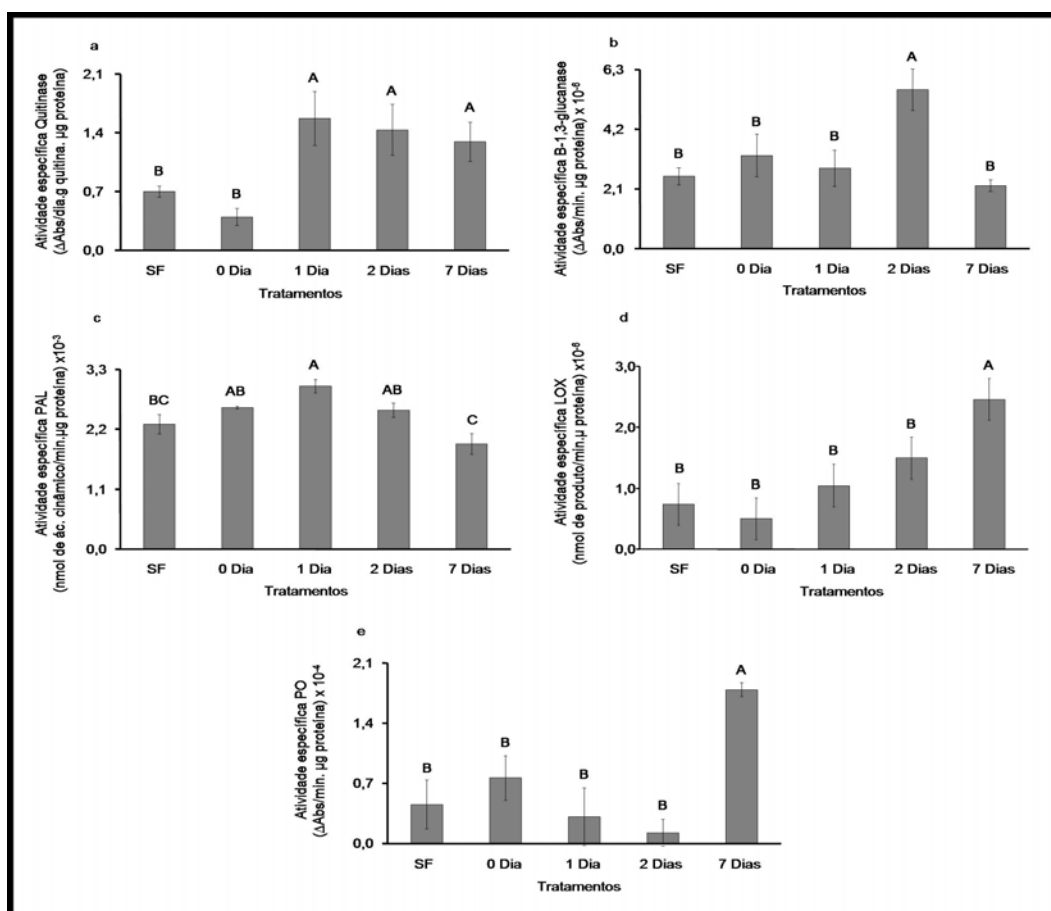


Figura I.3 - Atividades específicas de enzimas indicadoras do estado de indução de resistência sistêmica em plantas de tomate submetidas a estresse abiótico por ferimentos nas folhas. As enzimas avaliadas foram: (a) quitinases; (b) β -1,3-glucanases; (c) fenilalanina amônia-liase (PAL); (d) lipoxigenases (LOX) e (e) peroxidases (PO). Os tratamentos corresponderam ao tempo de coleta das folhas (0; 1; 2; e 7 dias) após os ferimentos das plantas, comparados com o tratamento controle (SF, folhas sem ferimento). Os ensaios foram realizados em triplicata e as barras correspondem ao desvio padrão. Tratamentos marcados com as mesmas letras não apresentaram diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em geral, o aumento da atividade dessas enzimas evidencia a indução de resistência sistêmica em plantas (Ye et al., 1990; Koch et al., 1992; van Loon et al., 1997, Kolomiets et al., 2001; Rizzardl et al., 2003). Essa indução de resistência é capaz de alterar o estado fisiológico das células, tornando-as assim uma excelente fonte de material para o estudo do proteoma e do peptidoma diferencial associado a fenômeno de resistência sistêmica induzida.

Os extratos de folhas de plantas coletadas em 1, 2 e 7 dias após os ferimentos apresentaram atividades específicas de quitinases significativamente semelhantes entre si, porém superiores às dos extratos de plantas sem ferimentos e de plantas feridas e coletadas em 0 dia (Figura I.3.a). As atividades específicas de β -1,3-glucanases foram significativamente maiores nos extratos de folhas coletadas 2 dias após os ferimentos, quando comparada com os demais tratamentos (Figura I.3.b). As quitinases e as β -1,3-glucanases, as quais estão amplamente distribuídas nas plantas, desempenham diversas funções no crescimento e desenvolvimento das plantas e foram, anteriormente, relatadas como sendo induzidas em respostas de defesa contra ferimentos (Wu e Bradford, 2003). Após os ferimentos, os extratos apresentaram um aumento significativo na atividade de PAL, sendo o maior valor obtido nos extratos de folhas colhidas 1 dia após os ferimentos, seguindo-se de um decréscimo significativo nesses valores de atividade específica (Figura I.3.c).

As atividades das lipoxigenases (LOX) e das peroxidases (PO) detectadas aos 7 dias após os ferimentos foram significativamente superiores às detectadas nos demais tratamentos, sendo cerca de três vezes superiores àquelas das plantas não feridas (Figuras I.3.d e I.3.e). Esses resultados podem indicar uma indução das PO para neutralizar hidroperóxidos gerados pelas LOX no processo de sinalização celular. As plantas possuem mecanismos de defesa eficientes, que permanecem inativos ou latentes, só sendo ativados ou expressos após os organismos serem expostos a agentes de indução (Colson e Deverall, 1996; Sticher et al., 1997; Vallad e Goodman, 2004). A reação de hipersensibilidade é o mecanismo de defesa induzida inicial resultando em uma alta concentração de espécies reativas de oxigênio, cujo efeito citotóxico resulta na necrose das células vegetais, privando o patógeno de nutrientes e dificultando a sua propagação (Liavonchanka e Feussner, 2005; Soares e Machado, 2007). Os superóxidos gerados provocam a peroxidação de lipídeos de membrana, responsáveis pela produção de ácidos graxos livres, como o linoléico e o linolênico (Breusengem et al., 2001). Hidroperóxidos desses

ácidos são produtos de reações catalisadas pelas LOX, como o ácido hidroperoxilinolênico, um precursor do óxido sintase (AOS) presente na via de síntese metabólica do ácido jasmônico, um importante fitormônio de defesa de plantas (Guzzo, 2004). O aumento da atividade das LOX ao longo dos dias após os ferimentos pode estar relacionado com o processo de sinalização envolvendo essa enzima. A toxidez desses hidroperóxidos não é restrita aos fitopatógenos, as células e os compartimentos subcelulares são também protegidos por mecanismos de indução de enzimas antioxidantes, que é a forma de ação das enzimas da família das peroxidases (Mittler, 2002; Soares e Machado, 2007).

A confirmação da resistência sistêmica induzida, principalmente pelos aumentos significativos de atividade das enzimas LOX e PO, indicam o possível envolvimento de proteínas de parede celular nas reações de sinalização (León et al., 2000; Carvalho e Gomes, 2007) e justifica a escolha dos extratos de parede celular (EP) como material-fonte para a análise proteômica associada à resistência de plantas.

O proteoma celular foi fracionado nos extratos protéicos solúveis (ES) e de parede celular (EP). O EP foi preparado em presença de LiCl, envolvido na remoção de proteínas de parede celular (PPC). A escolha de EP foi justificada pela presença de proteínas de defesa associadas à parede e pela menor complexidade de proteínas desses extratos em comparação com ES. As PPC são, em geral, fracamente ligadas à parede celular por interações de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações iônicas e hidrofóbicas. Soluções salinas de íons catiônicos monovalentes (Li^+ , por exemplo) desestabilizam essas ligações e favorecem a solubilização dessas proteínas, que em geral, possuem ponto isoelétrico básico, entre 8 e 11 (Jamet et al., 2006). As PPC têm sido relacionadas a mecanismos de sinalização e adaptação contra diversos estresses do ambiente. Um grupo de proteínas de baixa massa molecular, como as proteínas transportadoras de lipídeos PTL1s, com 9 kDa, e PTL2s, com 7 kDa (Carvalho e Gomes, 2007) e também fosfoproteínas de massas moleculares 29 e 34 kDa (Castro e Fontes, 2005) têm sido descritos pelas suas propriedades antimicrobianas e envolvimento em rotas bioquímicas de sinalização.

Eletroforeses desnaturantes dos EP dos cinco tratamentos (folhas de plantas sem ferimentos ou feridas e coletadas após 0, 1, 2 e 7 dias) evidenciaram a presença de um perfil protéico complexo, com massas moleculares variadas (dados

não mostrados). A cromatografia líquida multidimensional com colunas não-acopladas (*offline*-MDLC) aplica-se com sucesso à prospecção de proteínas diferencialmente sintetizadas em extratos protéicos. Entretanto, visando obter amostras menos complexas, o que certamente garantiria melhor resolução nas separações posteriores, os EP de todos os tratamentos foram submetidos à cromatografia de exclusão molecular (CEM) como primeira etapa cromatográfica, para a obtenção de grupos protéicos com diferentes faixas de massas moleculares (Figura I.4). A calibração da coluna com proteínas-padrão permitiu estimar um tempo de eluição para as proteínas entre 30 e 50 min.

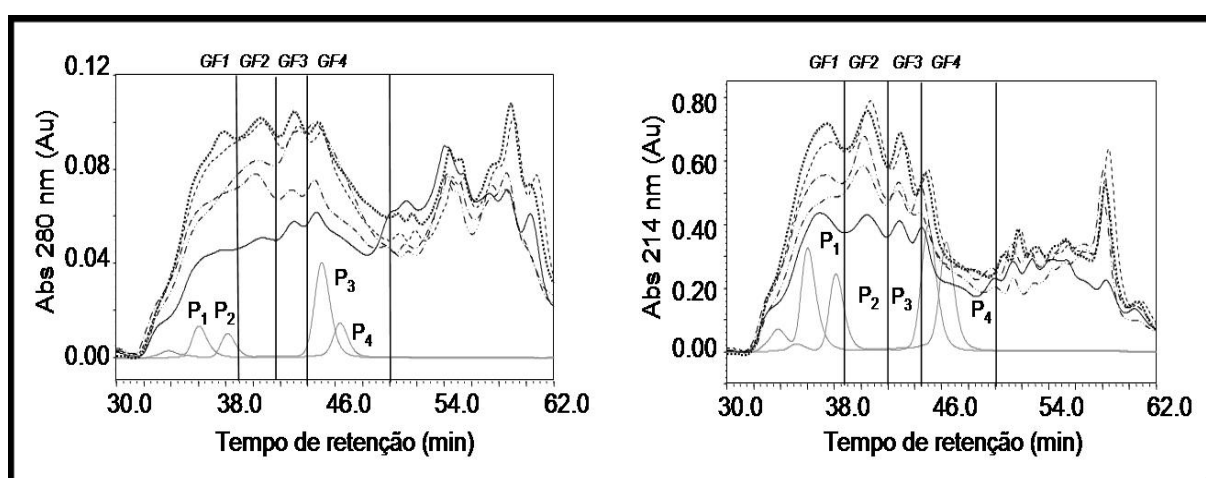


Figura I.4 – Cromatografias de exclusão molecular em coluna Protein Pack 125 Å (faixa de separação de 2 a 80 kDa) em eluição isocrática com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, adicionado de 150 mM de NaCl, ao fluxo de 0,25 mL.min⁻¹. Os eluatos de EP de plantas de tomate sem fermento (—) e feridas e coletadas após 0 (.....), 1 (---), 2 (-.-) e 7 (-.-) dias foram associados formando os pools GF1, GF2, GF3 e GF4 para cada tratamento. A coluna foi calibrada com (P1) albumina soro bovina (64 kDa), (P2) ovalbumina (43 kDa), (P3) quimiotripsinogênio (25 kDa) e (P4) ribonuclease A (13,7 kDa) (LMW GEL FILTRATION CALIBRATION KIT, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). As separações protéicas foram monitoradas em 280 nm e 214 nm.

O perfil de eluição da CEM foi diferente para cada tratamento, confirmando a síntese diferencial de proteínas entre os tratamentos. Quatro grupos protéicos, obtidos para os EP de cada tratamento e designados *pools* GF1, GF2, GF3 e GF4 (Figura I.4), foram analisados por eletroforeses monodimensionais desnaturantes (dados não mostrados) e evidenciaram também a síntese diferencial de proteínas, especialmente na região entre 30 e 50 kDa. As análises dos géis permitiram ainda

observar um enriquecimento das frações GF2 para massas próximas de 50 kDa e GF3 para massas em torno de 25 kDa.

A separação dos quatro pools (GF1, GF2, GF3 e GF4) de cada tratamento (Figura 1.4) por cromatografia de fase reversa (RP) (Figuras 1.5, 1.6 e 1.7), que explorou as características de hidrofobicidade das PPC, permitiu evidenciar três regiões de interesse para GF1 (Figura 1.5.a) e GF2 (Figura 1.6.a), e duas regiões para GF4 (Figura 1.7.a). GF3 não apresentou diferenças visuais entre os tratamentos (dados não mostrados). As comparações foram entre plantas sem ferimentos (SF) e plantas feridas e coletadas por diferentes períodos (0, 1, 2 e 7 Dias).

A sobreposição dos perfis cromatográficos de acordo com o tempo de eluição, realizadas para as comparações de expressões protéicas diferenciais, permitiu evidenciar que picos similares foram eluídos em momentos diferentes, sugerindo que a presença de proteínas diferencialmente sintetizadas em algumas frações promove o deslocamento dos perfis cromatográficos. Após as RP, os picos com expressão protéica diferencial foram coletados e encaminhados para análises de espectrometria de massa.

Na região R1 dos perfis referentes aos pools GF1 (Figura 1.5.b) e GF2 (Figuras 1.6.b), os tratamentos 2-Dias e 7-Dias apresentaram regiões com expressão protéica diferencial quando comparados com o tratamento SF. As diferenças foram observadas tanto no formato quanto na intensidade dos valores de absorvância dos picos. As regiões R2 de GF1 (Figura 1.5.a) e de GF2 (Figura 1.6.a) não foram destacadas considerando a baixa expressão protéica diferencial observada.

Na região R3, para o pool GF1, picos protéicos diferencialmente expressos puderam ser observados em 52% de acetonitrila, para os tratamentos 1, 2 e 7-Dias, e em 64,8% de acetonitrila, para 0-Dia (Figura 1.5.c).

Para o pool GF2, um pico eluído em 53,6% de acetonitrila, próximo a 45 minutos (Figura 1.6.c), parece ser o mesmo encontrado nos tratamentos 0, 1, 2 e 7-Dias, porém está ausente no controle (SF), o que pode representar indução de proteínas em resposta aos tratamentos. Com o aumento do tempo após os ferimentos, a sua intensidade em 280 nm tornou-se cada vez menor, ocorrendo o

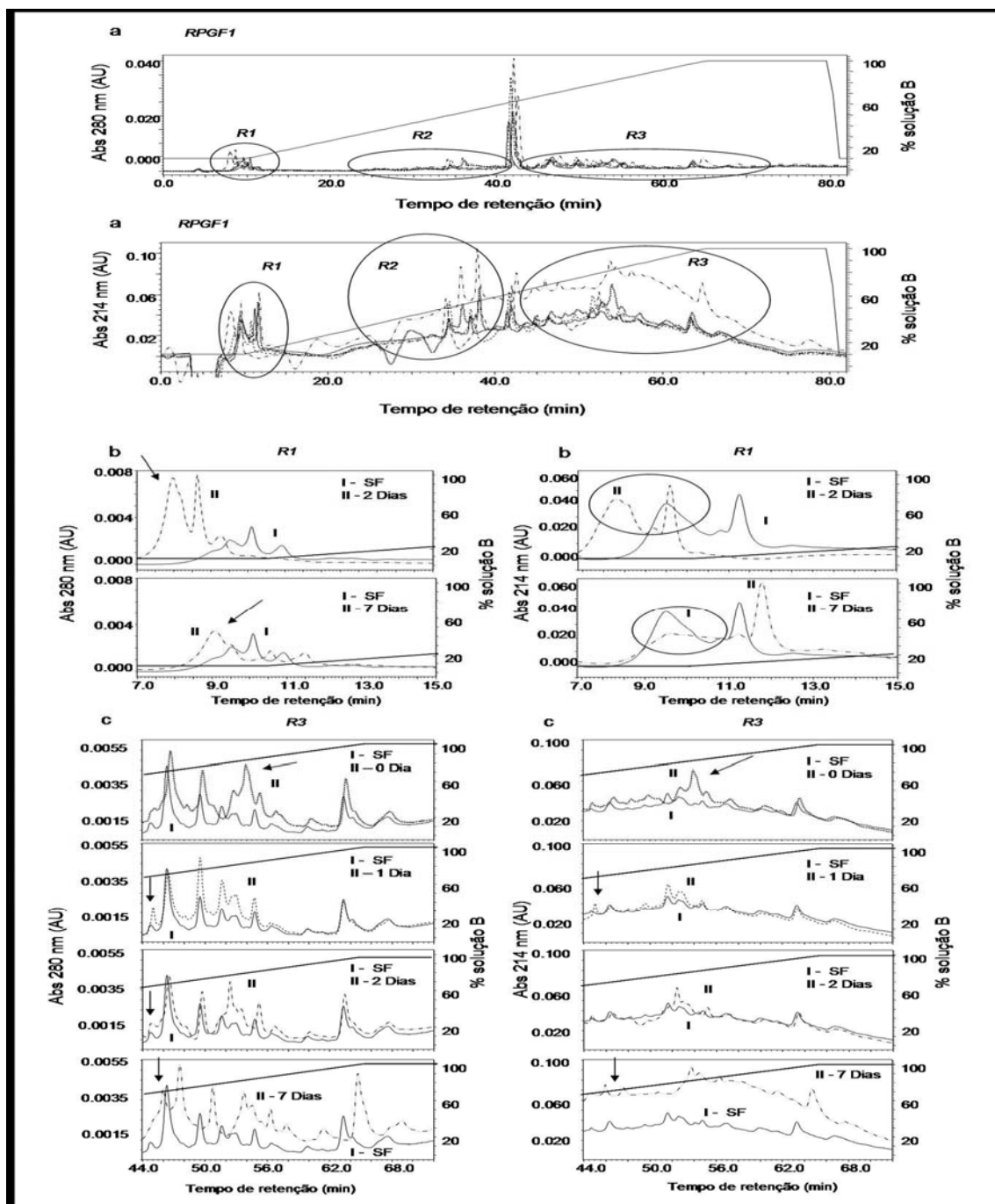


Figura I.5 - (a) Cromatografia de fase reversa (RP) em HPLC da fração GF1 (Figura I.4) de extrato de parede celular (EP) de folhas de plantas de tomate sem ferimento (SF, —) e feridas e coletadas em diferentes tempos: 0-Dia (....), 1-Dia (- - -), 2-Dias (-.-.-) e 7-Dias (-.-.-). Os círculos indicam três regiões (R1, R2 e R3) com proteínas diferencialmente sintetizadas, e as setas apontam picos diferencialmente sintetizados nessas regiões. Para cada tratamento, os picos de proteínas diferencialmente sintetizadas, observados em R1 (b) e R3 (c), foram individualmente comparados com o perfil do tratamento-controle (SF) a 280 nm (à esquerda) e a 214 nm (à direita). A coluna C18-Shim-Pack CLC-ODS foi equilibrada em 0,1% de TFA e as proteínas foram eluídas em gradiente contínuo de acetonitrila (10-80%), a 1,0 mL.min⁻¹.

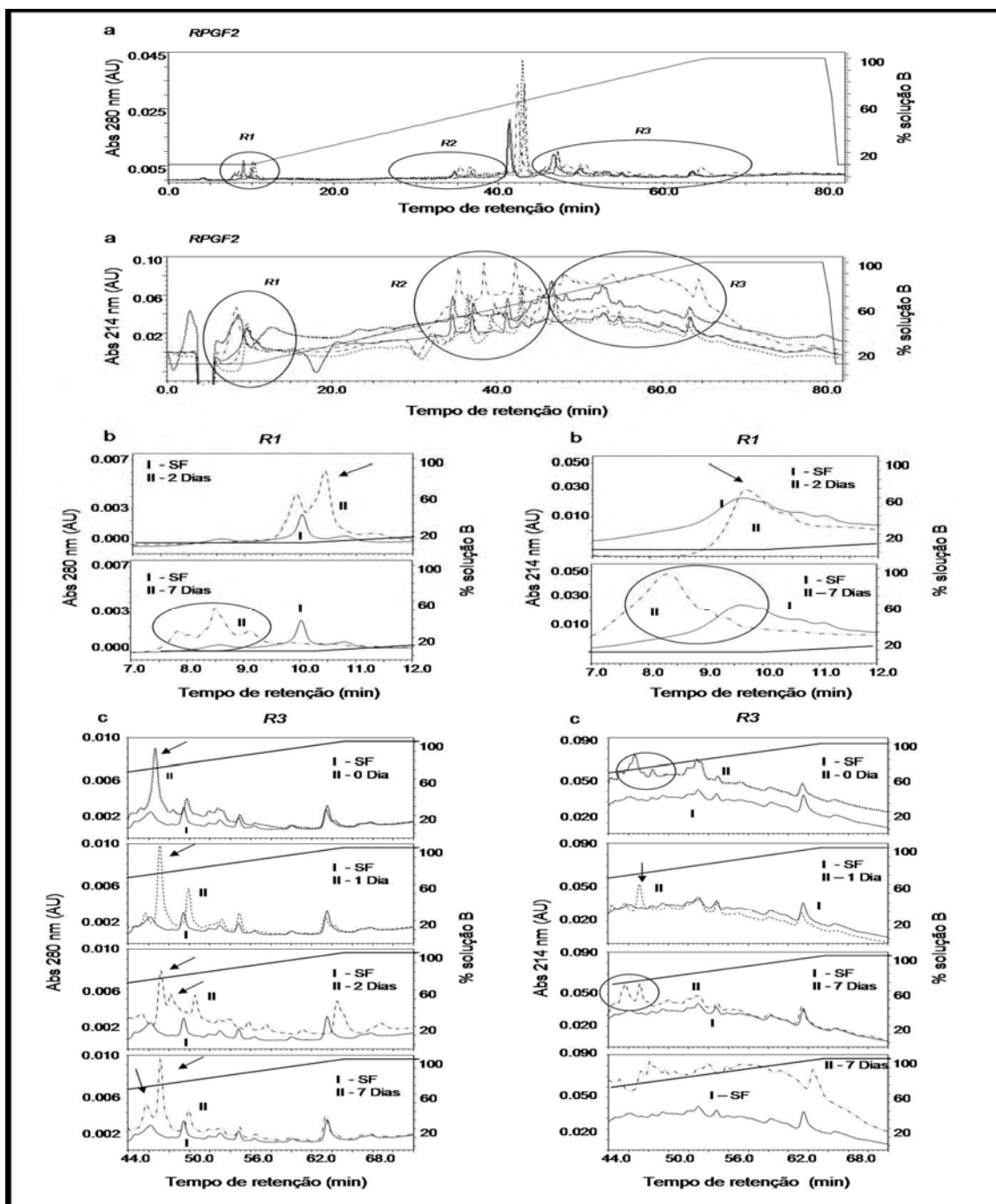


Figura I.6 - (a) Cromatografia de fase reversa (RP) em HPLC da fração GF2 (Figura I.4) de extrato de parede celular (EP) de folhas de plantas de tomate sem ferimento (SF, —) e feridas e coletadas em diferentes tempos: 0-Dia (....), 1-Dia (----), 2-Dias (-.-.-) e 7-Dias (-.-.-). Os círculos indicam três regiões (R1, R2 e R3) com proteínas diferencialmente sintetizadas, e as setas apontam picos diferencialmente sintetizados nessas regiões. Para cada tratamento, os picos de proteínas diferencialmente sintetizadas, observados em R1 (b) e R3 (c), foram individualmente comparados com o perfil do tratamento controle (SF) a 280 nm (à esquerda) e a 214 nm (à direita). A coluna C18-Shim-Pack CLC-ODS foi equilibrada em 0,1% de TFA e as proteínas eluídas em gradiente contínuo de acetonitrila (10-80%), a 1,0 mL.min⁻¹.

surgimento de um pico próximo, eluído em 56% de acetonitrila, próximo a 46 minutos (Figura 1.6.c), presente apenas nos tratamentos 2 e 7-Dias.

O *pool* GF4 foi o que apresentou os perfis de RP com um maior número de picos protéicos diferencialmente sintetizados para os tratamentos, quando comparados com o controle (SF) (Figura 1.7). Esse *pool* contém os peptídeos e as proteínas de baixas massas moleculares (inferiores a 30 kDa, em média), pois foi eluído na mesma região das proteínas de 25 e 13,7 kDa quando se procedeu a calibração da coluna de exclusão molecular (Figura 1.4). Na região R1 de separação de GF4 foi observado um pico diferencialmente expresso apenas no tratamento 1 Dia (próximo a 7 min), e que apresentou um valor de absorvância cerca de quatro vezes superior à do pico eluído na mesma região do tratamento 0-Dia, tanto a 280 quanto a 214 nm. Esse pico de alta intensidade (0-Dia) não foi observado nos tratamentos 2 e 7- Dias (Figura 1.7.b).

Um maior número de picos diferencialmente sintetizados foi observado, em R2 para GF4 (Figura 1.7.b), para os tratamentos SF (43,2% e 44% de acetonitrila e 39 e 40 minutos); 0-Dia (39,2% de acetonitrila e 36 minutos); 1-Dia (32% e 45,6% de acetonitrila e 30 e 42 minutos); 2-Dias (37,6%; 40,8% e 47,2% de acetonitrila e 35, 37 e 42 minutos) e 7-Dias (39,2%; 42,4%; 49,6%; 51,2% e 64% de acetonitrila e 36, 39, 45 e 46 minutos) (Figura 1.7.c). Além disso, os perfis relacionados a esse *pool* apresentaram os maiores valores de absorvância, a 280 nm e a 214 nm, indicando maior concentração protéica e peptídica nessas amostras, fator que deve ser considerando, pois essas amostras foram a seguir analisadas por MS e, ou, seqüenciamento automático de Edman.

Deve-se reforçar que, para o *pool* GF4, que contém moléculas pequenas, o maior número de picos diferencialmente sintetizados em R2 ocorreu em percentagens de acetonitrila entre 30 e 50%. Peptídeos de defesa em plantas são, em geral, menores que 10 kDa, muitos possuem carga líquida positiva e têm, em média, 50% dos seus resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Hancock et al., 2000). Em perfis cromatográficos de fase reversa em coluna C18, a eluição ocorre geralmente próxima a 20-40% de acetonitrila. Os estudos de peptídeos associados à defesa de plantas têm apresentado destaque dada a grande importância dessa forma de defesa, pois são de pequeno tamanho e podem ser rapidamente sintetizados com baixo consumo energético celular, permitindo uma defesa rápida,

eficiente, pois, em geral, atuam em baixas concentrações (Broekaert et al., 1995; Zasloff, 2002).

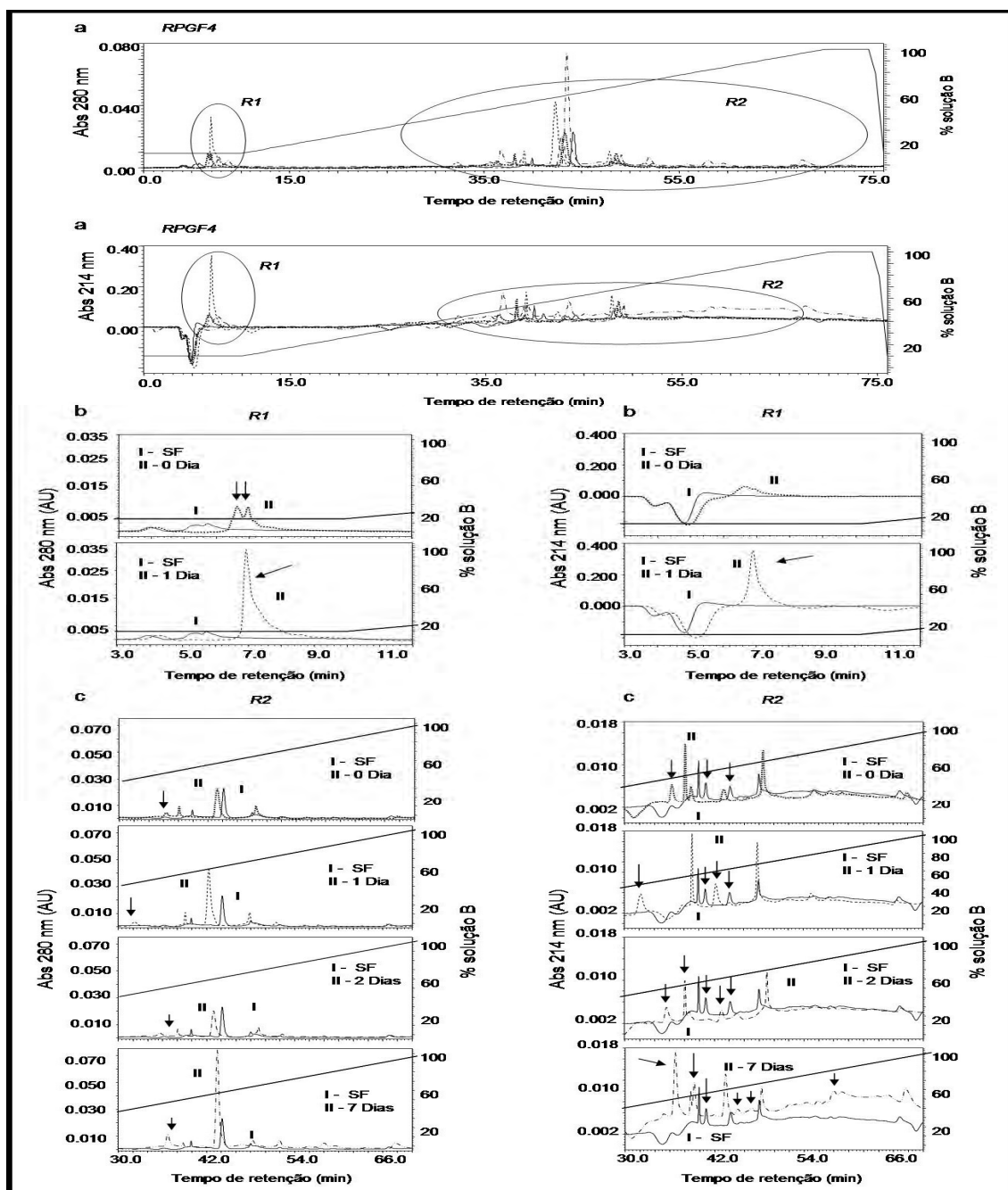


Figura I.7 - (a) Cromatografia de fase reversa (RP) em HPLC da fração GF4 (Figura I.3) de extrato de parede celular (EP) de folhas de plantas de tomate sem ferimento (SF, —) e feridas e coletadas em diferentes tempos: 0 Dia (···), 1 Dia (----), 2 Dias (-.-.-) e 7 Dias (-.-). Os círculos indicam três regiões (R1, R2 e R3) com proteínas diferencialmente sintetizadas, e as setas apontam picos diferencialmente sintetizados nessas regiões. Para cada tratamento, os picos de proteínas diferencialmente sintetizadas, observados em R1 (b) e R3 (c), foram individualmente comparados com o perfil do tratamento controle (SF) a 280 nm (à esquerda) e a 214 nm (à direita). A coluna C18-Shim-Pack CLC-ODS foi equilibrada em 0,1% de TFA e as proteínas eluídas em gradiente contínuo de acetonitrila (10-80%), a 1,0 mL.min⁻¹.

Para a seleção das amostras que foram submetidas às análises por espectrometria de massa considerou-se a separação por cromatografia de fase reversa (RP) do pool *GF4*, no qual foi evidenciado o maior número de picos diferenciais, com valores de absorvância de duas a quatro vezes maiores do que os picos diferenciais observados nas separações dos pools *GF1* e *GF2*, tanto em 280 nm quanto em 214 nm. Como maiores valores de absorvância associam-se a uma maior concentração de proteínas e peptídeos, foram selecionados os picos diferenciais na região *R2* do pool *GF4* (Figura I. 7 c). Das 16 amostras diferenciais analisadas, oito tiveram suas massas moleculares identificadas (Tabela I.1).

Tabela I.1 – Picos protéicos diferencialmente sintetizados obtidos das separações cromatográficas do pool *GF4*, que foram analisados por espectrometria de massa (MALDI-TOF).

Tratamento	[Acetonitrila] (%)	Massa Molecular (Da)
S/F	43,2	9.965,349
S/F	44,0	----
0 Dia	39,2	5.586,304
1 Dia	08,0	----
1 Dia	32,0	2.835,539
1 Dia	45,6	6.229,786 e 8.394,512
2 Dias	37,6	----
2 Dias	40,8	1.611,931
2 Dias	47,2	6.256,216 e 9.971,445
2 Dias	48,0	----
7 Dias	39,2	----
7 Dias	42,4	9.980,852
7 Dias	42,4	9.972,078
7 Dias	49,6	----
7 Dias	51,2	----
7 Dias	64,0	----

Seis amostras apresentaram-se purificadas, gerando pico único nas análises por MS (Figura I.8), enquanto que duas amostras apresentaram duas massas moleculares (Tabela 1). Todas as massas moleculares detectadas correspondem a peptídeos diferencialmente sintetizados, purificados (massas moleculares únicas variando entre 2 e 10 kDa), obtidas dos tratamentos SF, 0, 1, 2 e 7-Dias. A eluição dessas amostras na RP ocorreu em regiões de concentração de acetonitrila característica de peptídeos antimicrobianos de plantas (Figura I.7).

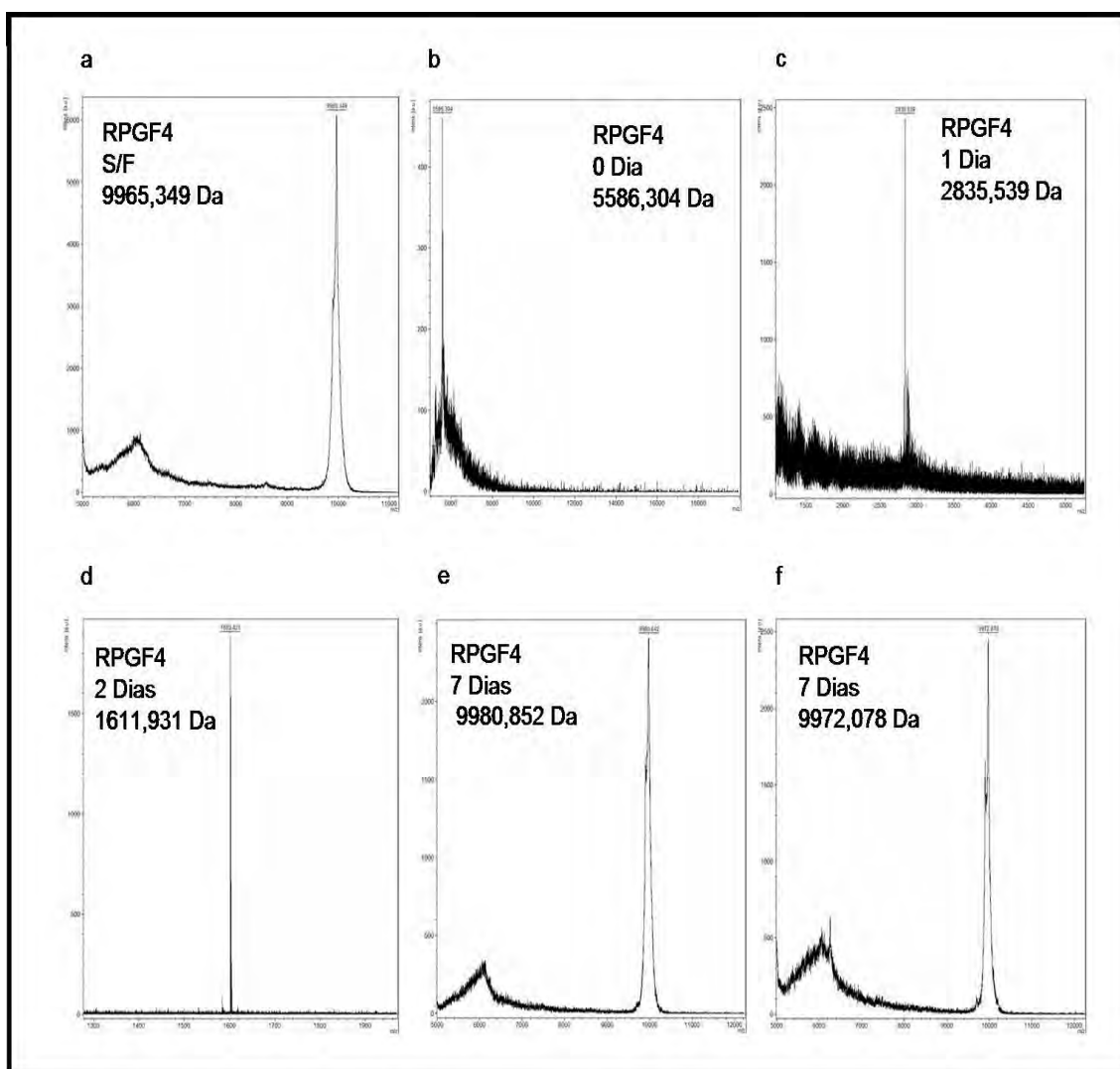


Figura I.8 - Espectros de massas moleculares (MALDI-TOF/TOF) dos picos com síntese diferencial de proteínas obtidos pela análise peptidômica das frações purificadas do *pool GF4*. (a) *SF* (9.965,349 Da, a 43,2% de acetonitrila); (b) *0 Dia* (5.566,040 Da, a 39,2% de acetonitrila); (c) *1 Dia* (2.835,539 Da, a 32,0% de acetonitrila); (d) *2 Dias* (1.611,931 Da, a 40,8% de acetonitrila); (e) *7 Dias* (9.980,852 Da, 42,4% de acetonitrila) e (f) *7 Dias* (9.972,078 Da, a 42,4% de acetonitrila).

Considerando tratar-se de proteínas purificadas, as amostras foram proteolisadas com tripsina e as massas dos peptídeos trípticos foram identificadas por MALDI-TOF/TOF (Figura I.9 e I.10). Essas massas moleculares foram submetidas à análise de *peptide mass fingerprint*, utilizando o software MASCOT® (Perkins et. al., 1999). As informações foram utilizadas na busca por homologia em bancos de dados genômicos *Swissprot* 52.2, limitando-se as buscas por taxonomia em plantas verdes (*Viridiplantae*), com 22.346 seqüência (Tabela I.2).

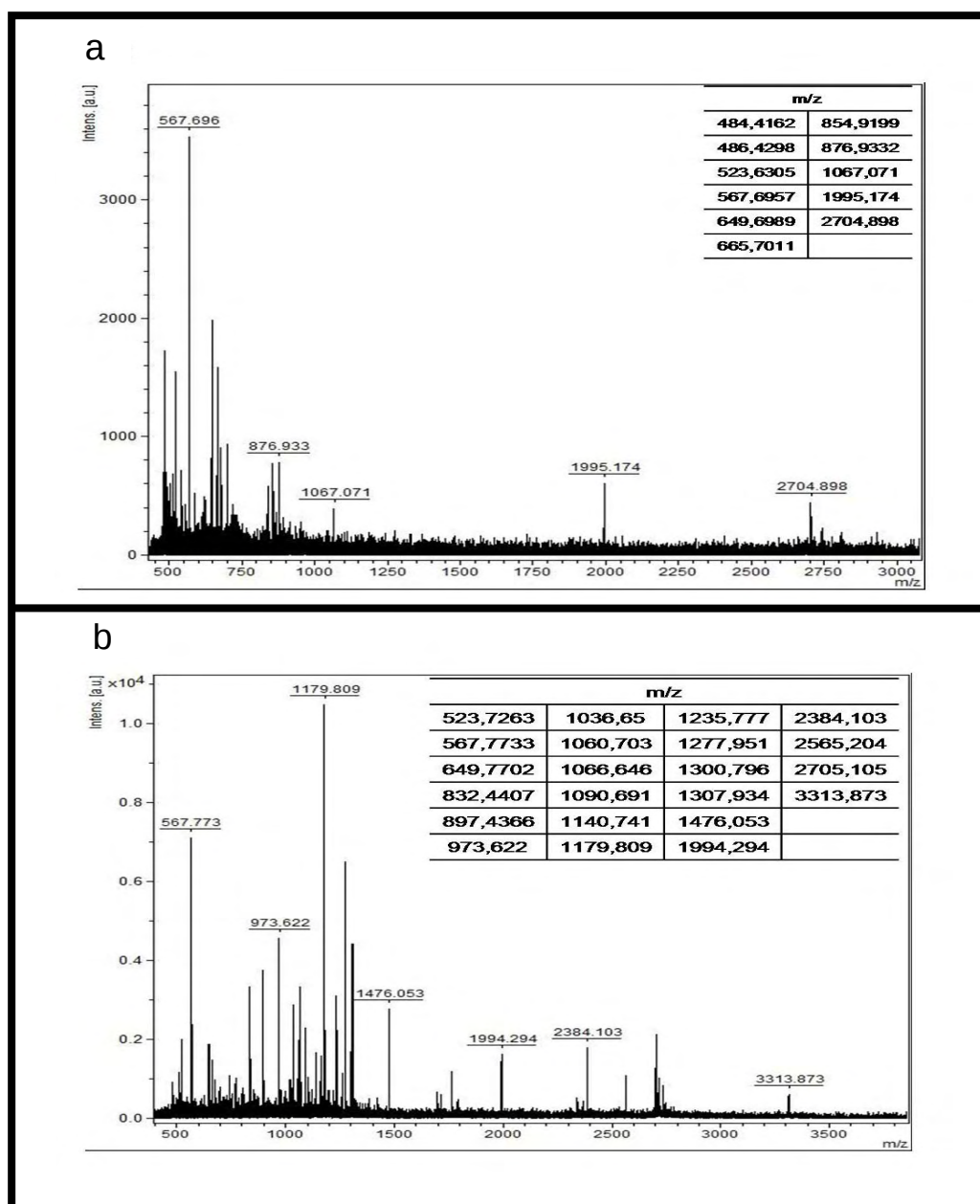


Figura I.9 - Espectro de massa das frações purificadas do *pool* GF4 contendo peptídeos diferencialmente sintetizados e o conjunto de massas utilizado na análise de *peptide mass fingerprint*. (a) Tratamento SF (RPGF4 - 9.965,349 Da) e (b) tratamento 0-Dia (RPGF4 - 5.566,040 Da).

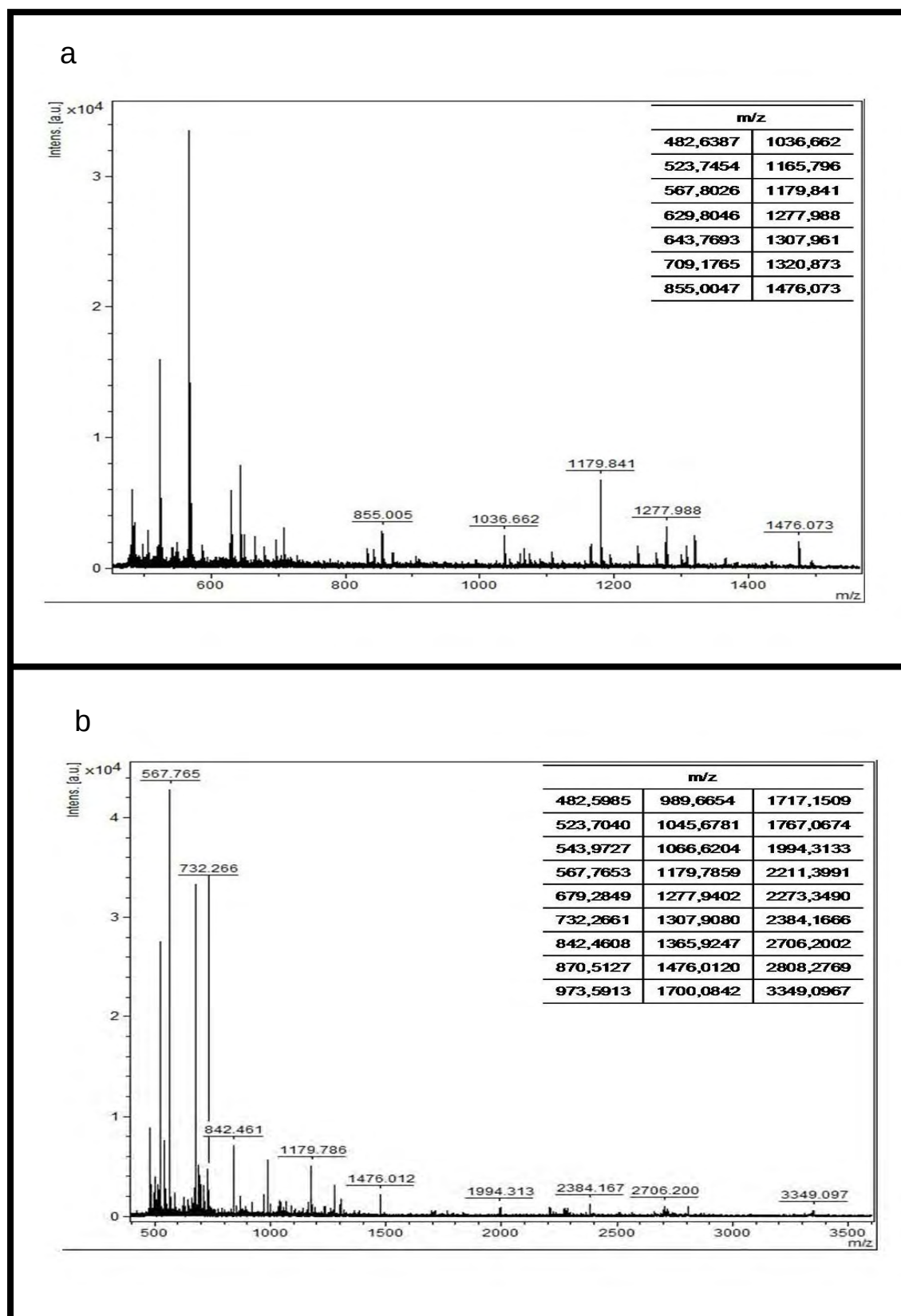


Figura I.10 - Espectro de massa das frações purificadas do *pool GF4* contendo peptídeos diferencialmente sintetizados e o conjunto de massas utilizado na análise de *peptide mass fingerprint*. (a) Tratamento 1-Dia (RPGF4 - 2.835,539 Da) e (b) tratamento 7-Dia (RPGF4 - 9.980,852 Da).

Tabela I.2 – Proteínas diferencialmente sintetizadas em plantas de tomate submetidas a condições de estresse abiótico. Amostras purificadas das frações do *pool GF4* por *peptide mass fingerprint* em MALDI-TOF/TOF (análise pelo software MASCOT®).

Amostra	Proteína	score	Massa Molecular (Da)*
<i>RPGF 4 SF</i>	RPOA CERDE Subunidade alfa de RNA polimerase <i>Ceratophyllum demersum</i> (planta aquática – “Rabo de raposa”)	35	44284
<i>RPGF4 0-Dia</i>	IAA6 ORYSJ Proteína de resposta à Auxina (IAA6) <i>Oryza sativa subsp. Japonica</i> (arroz)	12	36.912
<i>RPGF4 1-Dia</i>	GPX4 SPIOL Provável Peroxidase Glutaciona de Hidroperóxido de fosfolipídeos <i>Spinacia oleracea</i> (espinafre)	34	19.207
<i>RPGF4 2-Dias</i>	PHOT1 ARATH Fototropina 1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	42	112.246

*Massa molecular deduzida.

Nenhum peptídeo analisado apresentou homologia significativa com sequência disponível no banco de dados utilizado na análise (valores de *scores* estatisticamente significativos acima de 55 - $p < 0,05$). Problemas na identificação de seqüências, em análise proteômica e peptidômica, estão relacionados a não-produção de *scores* significantes (ranqueamento), já que vários desses bancos estão incompletos ou não bem estabelecidos (Medina et al., 2005). Mesmo não significativo, os valores dos *scores*, aqui encontrados, não devem ser desconsiderados. A busca por homologia foi realizada em banco de dados, considerando uma alta quantidade de seqüência correspondente às mais variadas espécies vegetais, uma vez que não existe um banco de dados completo para o genoma do tomate. Essa dificuldade de se encontrar um banco de dados mais apropriado para cada análise é responsável por redução nos valores dos *score*.

Na tabela I.2 podemos associar quatro proteínas diferencialmente sintetizadas e purificadas de extratos de parede celular de folhas de tomate com proteínas de diferentes espécies. A amostra *RPGF4-SF* apresentou homologia com uma RNA polimerase, um proteína que não está presente na parede celular. Esse resultado deve estar associado ao grande número de seqüência relativa a várias espécies vegetais que foram utilizadas como banco de dados. O peptídeo purificado na fração

RPGF4-1 Dia apresentou homologia com a enzima peroxidase glutationa de hidroperóxido de fosfolipídeos. A atividade dessa enzima é aumentada em situações de estresse abiótico, inibindo estresses oxidativos em plantas (Chen et. al., 2004).

Os espectros de massa obtidos pela fragmentação dos peptídeos trípticos (MS/MS), foram utilizados para a determinação da seqüência de aminoácidos, por análise das séries de fragmentação. A diferença de massa molecular entre os picos do espectro dessas séries permite a montagem da seqüência por meio da associação entre esses valores de massas e os valores de massa molecular correspondente a cada aminoácidos protéico (Westermeyer e Naven, 2002).

A fragmentação por colisão imposta pelo modo operacional em seqüência, por possuir baixa energia, promove uma maior fragmentação das ligações peptídicas. Séries de íons C-terminal, denominadas séries íon-y, contêm a extremidade C-terminal; já as séries íon-b, contêm os resíduos de aminoácidos N-terminal. Essa nomenclatura de fragmentação foi descrita por Roepstorff e Fohlman (1984) e permite que os diversos íons fragmentados (íons-filho) gerados a partir do esqueleto peptídico do precursor (íon-parental) possam ser analisados sob a forma de séries complementares, a qual é utilizada para indicar a seqüência peptídica. Essas séries são utilizadas como forma de validação da seqüência peptídica indicado por uma dessas séries (Westermeyer e Naven, 2002).

Os espectros de massa de íons-filho gerados a partir da fragmentação de íons-parentais tiveram suas séries analisadas. O íon-parental de massa 2.211,399 Da foi obtido a partir da proteólise da proteína identificada na amostra *RPGF4 7Dias* (9.980,852 Da). A série de íons-y forneceu o indicativo da seqüência de 9 resíduos de aminoácidos E-N-G-E-I/L-V-D-I/L-N, confirmada pelo estabelecimento da série de íons-b complementar (Figura I.11).

O valor de absorvância dos picos diferencialmente evidenciados correspondente a essas proteínas é baixo, o que reflete uma baixa concentração. Mesmo com a eficiência das purificações e da alta sensibilidade do espectrômetro de massa, a baixa concentração pode dificultar a aquisição de espectros de massa moleculares dos peptídeos trípticos correspondentes, impedindo o estabelecimento das séries de fragmentação completas dos ion-parentais.

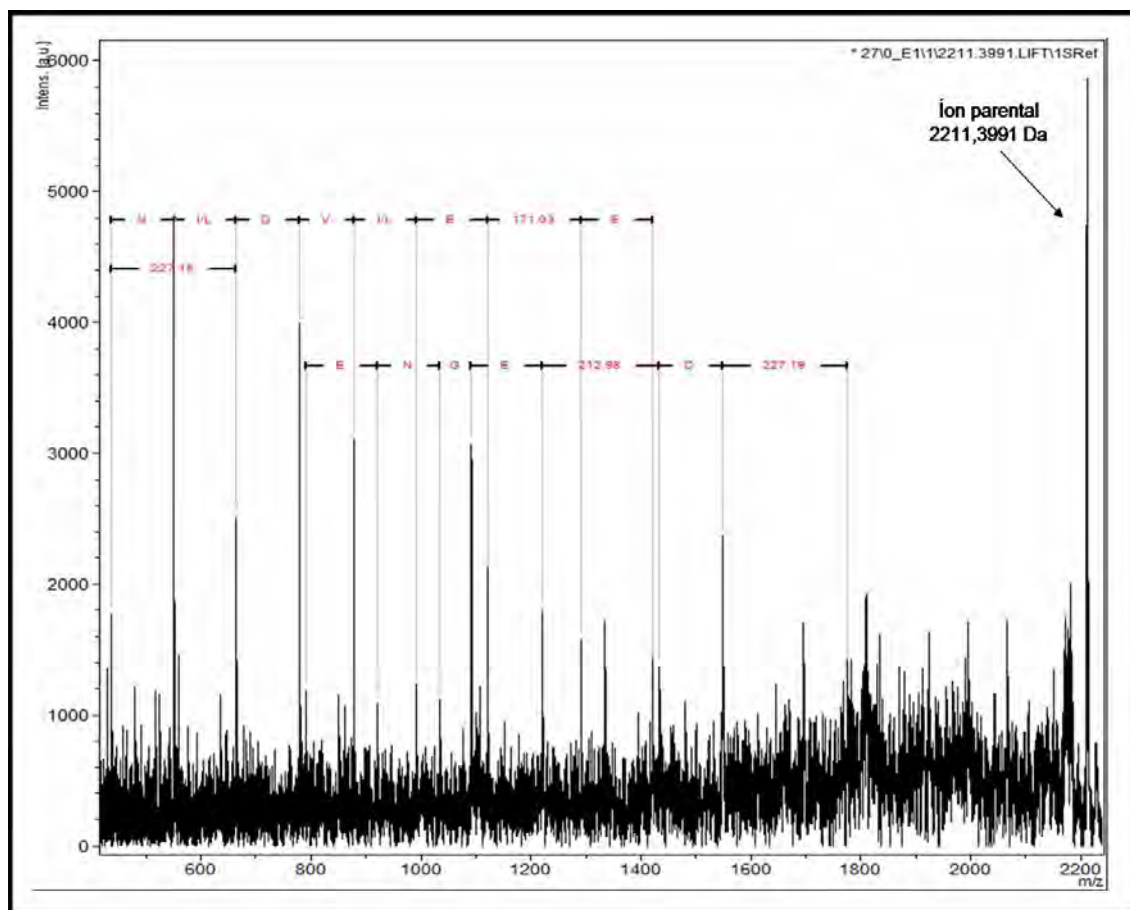


Figura I.11 - Espectros de massa da fragmentação do íon parental 2.211,399 Da obtido pela proteólise do peptídeo de massa molecular 9.980,852 Da identificado na amostra RPGF4 7 Dias, eluída com 42,4% de acetonitrila em cromatografia de fase reversa (coluna C18). A série de íons-y indicou uma seqüência de 9 resíduos de aminoácidos E-N-G-E-I/L-V-D-I/L-N, confirmada pela série de íons-b.

Os resultados aqui descritos não se mostram conclusivos na identificação dos peptídeos purificados dos extratos de parede celular de folhas de tomate submetidas a estresse abiótico. Entretanto, a perspectiva é de que, por meio dos passos de purificação descritos seja possível concentrar material suficiente para experimentos de identificação dos peptídeos por seqüenciamento automático. Essa identificação confiável dos peptídeos diferencialmente sintetizados na defesa de plantas à injúria mecânica é importante para o conhecimento da fisiologia desse fenômeno de defesa induzido.

1.3. Conclusões

Plantas de tomate submetidas a ferimentos mecânicos como uma forma de eliciação de resistência sistêmica induzida, confirmada pelo aumento significativo das atividades de LOX e PO, apresentaram um proteoma diferencial de grande potencial exploratório, considerando o grande número de picos diferencialmente evidenciados nos perfis cromatográficos. A busca por proteínas expressas diferencialmente foi realizada, com sucesso, no extrato protéico de parede celular, que apresentou diferentes massas moleculares em regiões características de peptídeos antimicrobianos de vegetais. Um fato que corrobora essa sugestão é que a concentração de acetonitrila em que ocorreu a eluição dessas biomoléculas correspondeu à faixa de eluição de peptídeos antimicrobianos vegetais, entre 20 e 40%. Os espectrogramas obtidos demonstraram que as biomoléculas se apresentam em alto grau de purificação, indicando que a técnica de separação por cromatografia líquida multidimensional (MDLC) *offline* aqui proposta, utilizando colunas de exclusão molecular e de fase reversa não-acopladas, permitiram a seleção de peptídeos vegetais presentes em baixas concentrações a partir de amostras vegetais complexas.

O grande número de picos protéicos diferencialmente selecionados, tanto a 280 nm como a 214 nm, demonstrou a eficiência da técnica *offline*-MDLC no processo de purificação e análise da síntese diferencial de proteínas associadas à parede celular. Os protocolos de enriquecimento e de purificação de frações na região de baixa massa molecular permitiram a obtenção de frações peptídicas purificadas e as análises de *peptide mass fingerprint*, apesar de não ter demonstrado *scores* significativas indicou a associação desses peptídeos com mecanismos de defesas. Já a obtenção da seqüência de nove resíduos de aminoácidos demonstrou a possibilidade da obtenção de séries de fragmentação completa mesmo para o ion-parental derivado da proteólise de proteína diferencialmente sintetizada em baixa concentração.

Portanto, a metodologia ajustada apresentou-se como uma eficiente ferramenta de avaliação de proteomas e peptidomas diferenciais de extratos de parede celular (EP), mesmo em condições de síntese diferencial em baixas concentrações. Por meio dos passos de purificação descritos é possível concentrar

material suficiente para experimentos de identificação dos peptídeos por seqüenciamento automático. A identificação confiável dos peptídeos diferencialmente sintetizados na defesa de plantas à injúria mecânica é importante para o conhecimento da fisiologia desse fenômeno de defesa induzido nas células vegetais em estado fisiológico de indução de resistência sistêmica.

Capítulo II – Ultrafiltração aplicada ao fracionamento por MDLC na Proteômica e na Peptidômica para o estudo da defesa de plantas

RESUMO

Proteínas ligadas aos mecanismos de defesa em células vegetais podem ser encontradas em paredes e membranas celulares, e também solubilizadas no citoplasma ou no interior de organelas, muitas vezes, em baixas concentrações. Podem estar envolvidas em diversas reações bioquímicas ligadas a transduções de sinais ou em ações diretas em resposta e adaptação às situações de estresse do ambiente, como atividade antimicrobiana. Para analisar o proteoma solúvel de folhas de plantas de tomate submetidas a estresse abiótico, plantas de tomateiro Santa Cruz Kada foram cultivadas por 28 dias, em casa-de-vegetação, e foram feridas por esmagamento do limbo foliar por meio de alicate (aprox. 0,5 cm de diâmetro). Folhas sem ferimento (SF) e folhas coletadas 0, 1, 2 e 7 dias após os ferimentos foram estocadas a -80°C. A extração foi realizada por maceração, na presença de N₂ líquido, em tampão acrescido de inibidores de proteases e polivinilpolipirrolidona (PVPP). O homogenato foi centrifugado (20.000 g, 4°C, 25 min) e o sobrenadante, denominado de Extrato Solúvel (ES). Os precipitados foram lavados e uma nova fração protéica foi extraída em presença de LiCl, sendo denominado Extrato de Parede Celular (EP). ES e EP foram fracionados por (NH₄)₂SO₄ (30-75% sat.). O precipitado recuperado foi resuspendido e fracionado por ultrafiltração, obtendo-se amostras protéicas em faixas de massas moleculares de 1 a 10, 10 a 30 e acima de 30 kDa, denominadas ES1-10, EP1-10, ES10-30, EP10-30, ES30 e EP30, respectivamente. Cada uma dessas frações foi submetida à análise proteômica e peptidômica, por cromatografia líquida multidimensional (MDLC) *offline*, utilizando-se colunas de troca aniônica e fase reversa como dimensões de separação. Os perfis cromatográficos dos tratamentos 0, 1, 2 e 7-Dias, quando comparados com o controle (SF), apresentaram picos diferenciais em todas as frações analisadas que continham diferentes faixas de massas moleculares. Após a separação por fase reversa, a fração ES30 do tratamento 7-Dias apresentou picos protéicos diferenciais quando comparados com SF. A fração ES10-30 do tratamento 2-Dias se destacou pelo maior número de picos protéicos diferenciais gerados, enquanto que para a fração ES1-10, o maior número de picos diferencialmente sintetizados foi

evidenciado no tratamento 1 dia após os ferimentos. A eficiência da purificação de picos diferencialmente sintetizados associados a proteínas ligadas à indução de resistência possibilitou a análise desses picos por espectrometria de massa. Foram identificadas massas de 8.214,794, 1.612,940 e 5.724,462 Da para picos purificados a partir do extrato solúvel do tratamento 1-Dia. Já para EP1-10 foram identificadas massas de 8.224,107; 8.214,794 e 1.567,804 Da para os tratamentos SF, 0 e 2-Dias, respectivamente. Essas amostras purificadas foram submetidas à proteólise limitada por tripsina, reduzidas e alquiladas, e as massas moleculares do perfil peptídeos foram analisadas em bancos de dados de *peptide mass fingerprint*, entretanto sem sucesso na obtenção de seqüências peptídicas. Os protocolos de fracionamento propostos permitiram a obtenção, com sucesso, de frações purificadas, com destaque para as vantagens obtidas pelo uso da ultrafiltração para o fracionamento prévio das amostras, sobretudo das amostras de baixa massa molecular (1 a 10 kDa), tanto para os extratos de parede celular quanto para os extratos solúveis.

Palavras-chave: estresse abiótico, ultrafiltração, MDLC *offline*, troca aniônica, fase reversa, picos diferenciais e proteínas de baixa massa molecular.

II.1. Introdução

Para se adaptar às condições ambientais adversas, as plantas possuem mecanismos para o seu crescimento e desenvolvimento, em que muitas proteínas expressas constitutivamente estão envolvidas. Porém em determinadas condições de estresse, as células vegetais ativam mecanismos latentes de defesas, e muitos apresentam alta eficiência e baixo gasto energético. Esses mecanismos induzidos são responsáveis pela superexpressão e, ou, inibição de proteínas de acordo com essa necessidade fisiológica. Essas proteínas, em geral, apresentam baixas massas moleculares e são expressas em baixas concentrações (Léon et al., 2001; Tuzun, 2001; Vallad e Goodman, 2004; Jones e Dangl, 2006).

Muitas proteínas associadas à defesa de plantas em resposta a estresses podem ser encontradas associadas às paredes e membranas celulares, bem como solubilizadas no citoplasma, quando reações bioquímicas de defesa são ativadas pela indução de resistência sistêmica em plantas. Em geral, essas proteínas estão envolvidas em complexas redes de transdução de sinais ou em mecanismos diretos de adaptação às situações adversas provocadas por condições de estresse (Castro e Fontes, 2005; Carvalho e Gomes, 2007).

O proteoma de uma célula vegetal é extremamente complexo e formado por milhares de proteínas solúveis, responsáveis diretamente por todo o funcionamento da maquinaria celular. A análise proteômica e peptidômica diferencial de plantas em situações de estresse envolve proteínas relacionadas à defesa de plantas, que são, em geral, expressas em baixas concentrações e de forma induzida. Torna-se, assim, necessário utilizar uma combinação de técnicas de purificação de proteínas capaz de obter uma melhor separação visando à identificação dessas proteínas envolvidas no fenômeno de indução de resistência sistêmica (Berggerman et al., 2003; Nagele et al., 2004; Neverova et al., 2005).

Considerando a complexidade e a grande variedade de proteínas presentes em extratos solúveis, etapas de separação prévia por fracionamento salino e por ultrafiltração são práticas que podem melhorar os resultados de purificação por cromatografia líquida multidimensional (MDLC) em colunas não acopladas (*offline*-MDLC).

II.2. Metodologia

Conforme apresentado no item Material e Métodos, seguem os procedimentos utilizados para a obtenção de ES e EP (Figura II.1a e II.1b) e os procedimentos de purificação e caracterização desses extratos.

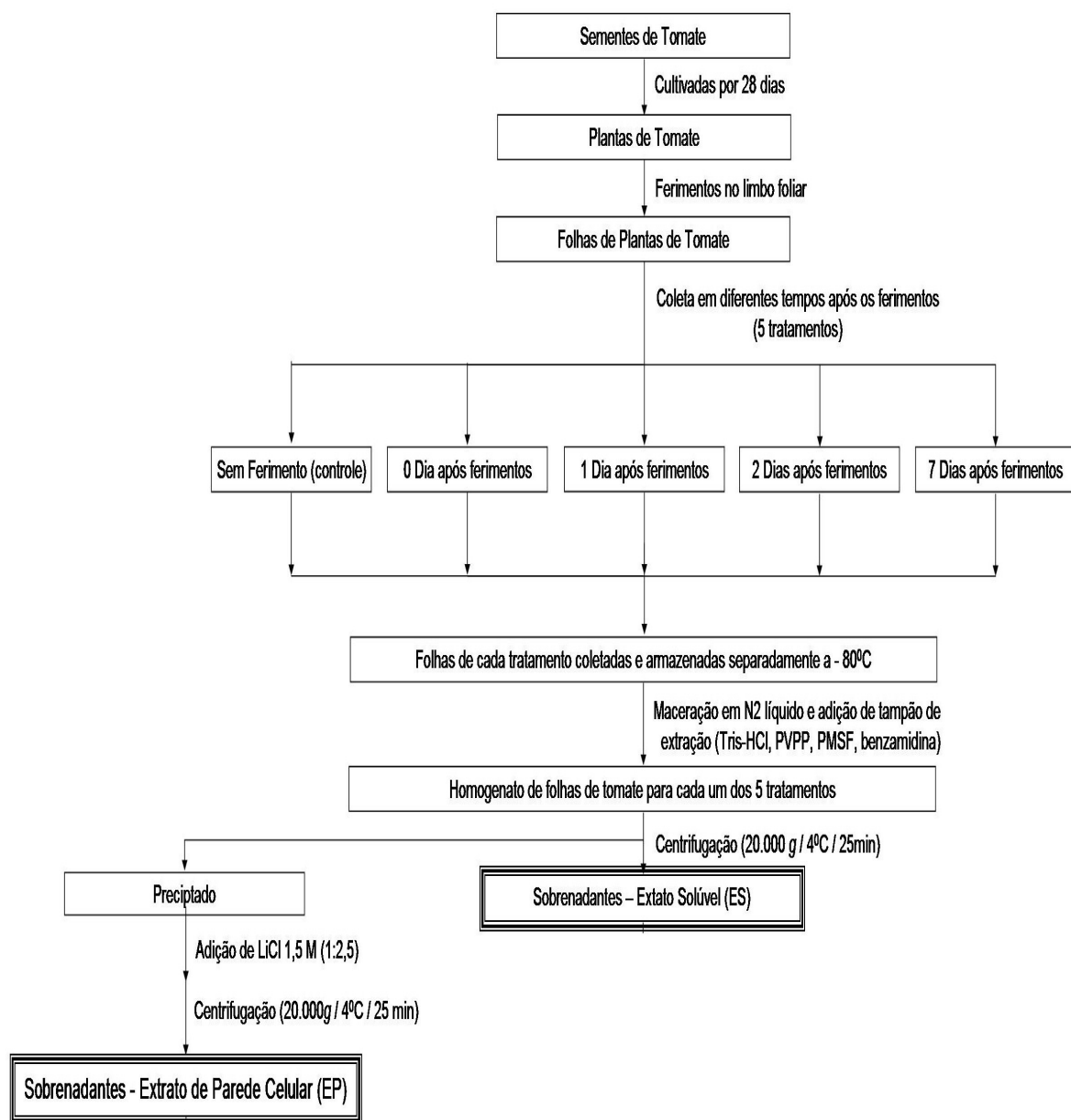


Figura II.1 - Fluxograma esquemático da metodologia utilizada para obtenção do extrato de parede celular (EP) e do extrato solúvel (ES) de folhas de plantas de tomate sem fermento (SF, controle) e de folhas feridas e colhidas 0, 1, 2, e 7 dias após os ferimentos.

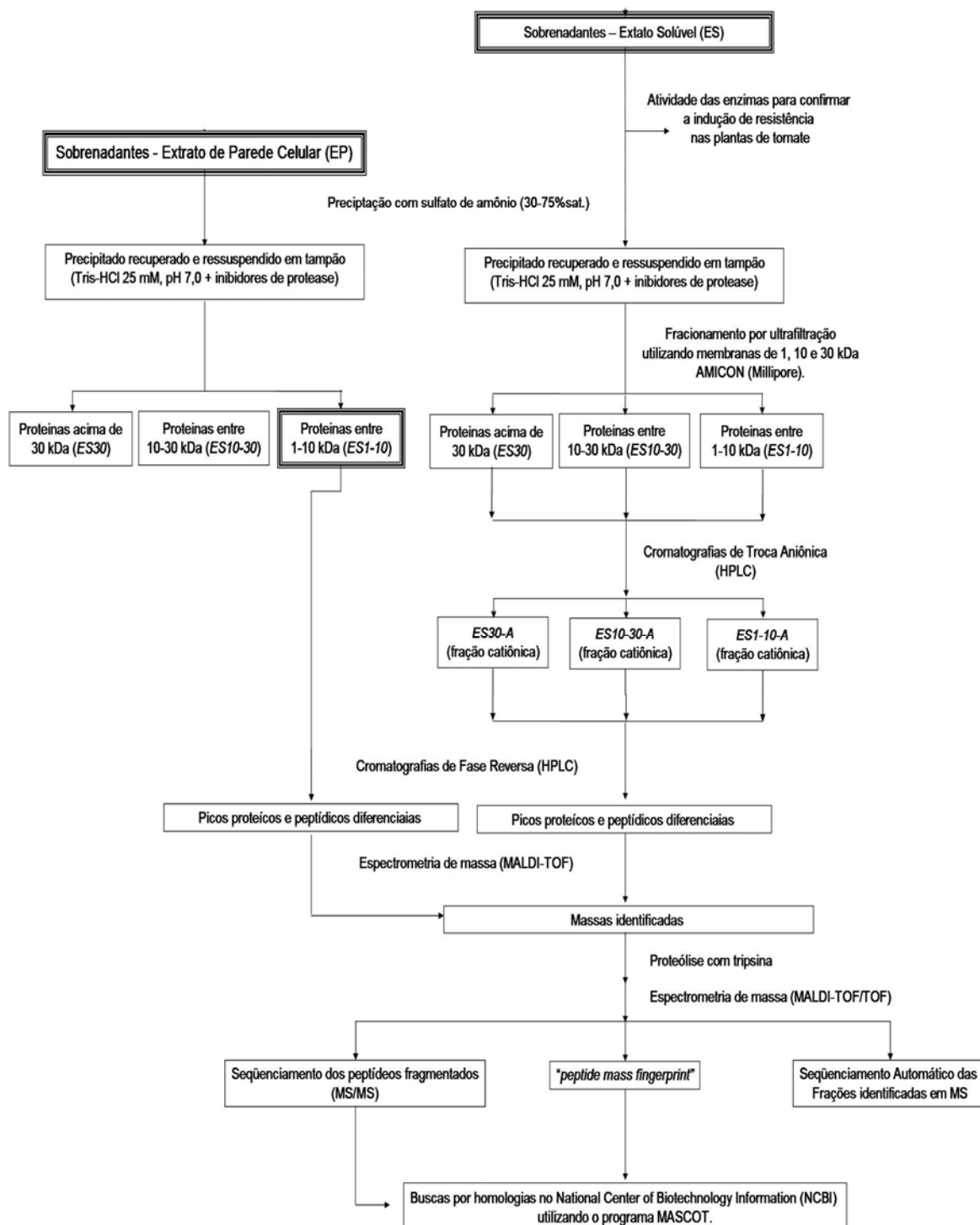


Figura II.2 - Fluxograma esquemático da metodologia utilizada na análise proteômica e peptidômica das frações do extrato de parede celular (EP) e do extrato solúvel (ES) de folhas de plantas de tomate sem ferimento (SF, controle) e de folhas feridas e colhidas 0, 1, 2, e 7 dias após os ferimentos. O fracionamento por sulfato de amônio (30-75% sat.) e pela ultrafiltração em AMICON utilizando membranas de 1, 10 e 30 kDa de faixas de exclusão molecular, permitiram obter frações purificadas que foram analisadas por espectrometria de massa.

II.3. Resultados e Discussão

II.3.1. Fracionamento dos Extratos Solúveis (ES)

II.3.1.1. Ultrafiltração de ES

Buscando a maior eficiência na purificação de proteínas e peptídeos associado à defesa de plantas, o extrato solúvel de cada tratamento foi submetido a um clareamento por fracionamento salino $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 30-75% de saturação, tendo ocorrido à remoção de debris celulares e interferentes solúveis e ainda, essa etapa contribuiu para a concentração das proteínas. Para a dessalinização e o fracionamento inicial por massas moleculares, cada um dos cinco tratamentos foi submetido à ultrafiltração em membrana de nitrocelulose, em equipamento sob pressão positiva, processo que permitiu a recuperação das proteínas solúveis totais em três amostras contendo moléculas com massas moleculares superiores a 30 kDa, de 10 a 30 e 1 a 10 kDa, denominadas de *ES30*, *ES10-30* e *ES1-10*, respectivamente. O enriquecimento das amostras promovido por esse fracionamento foi fundamental para o processo de purificação, aumentando a capacidade de visualização de proteínas diferencialmente sintetizadas em condições de indução de resistência, que em geral ocorrem em baixas concentrações em um proteoma ou peptidoma de alta complexidade.

II.3.1.2. Offline-MDLC dos ES30

II.3.1.2.1. Troca Aniônica dos ES30

Os perfis cromatográficos de troca aniônica dos *ES30* de plantas feridas e coletadas após os diferentes tempos foram comparados com os perfis obtidos de plantas sem ferimento, inicialmente, por meio de cromatografias de troca aniônica quando foram utilizadas alíquotas de 100 μL de *ES30* de cada um dos tratamentos.

Os perfis cromatográficos de troca aniônica apresentaram três regiões de interesse associadas a diferenças entre os tratamentos, especialmente quando observados a 214 nm (Figura II.3). Por terem sido eluídas anteriormente ao início do gradiente salino crescente, as duas primeiras regiões dos perfis, correspondem a proteínas com características catiônicas, e que, portanto não se interagiram com a resina, nas condições utilizadas. Já a terceira região, compreendida dentro do gradiente salino crescente, corresponde a proteínas aniônicas. As três regiões foram denominadas, respectivamente, *SAXES30-A*, *SAXES30-B* e *SAXES30-C*.

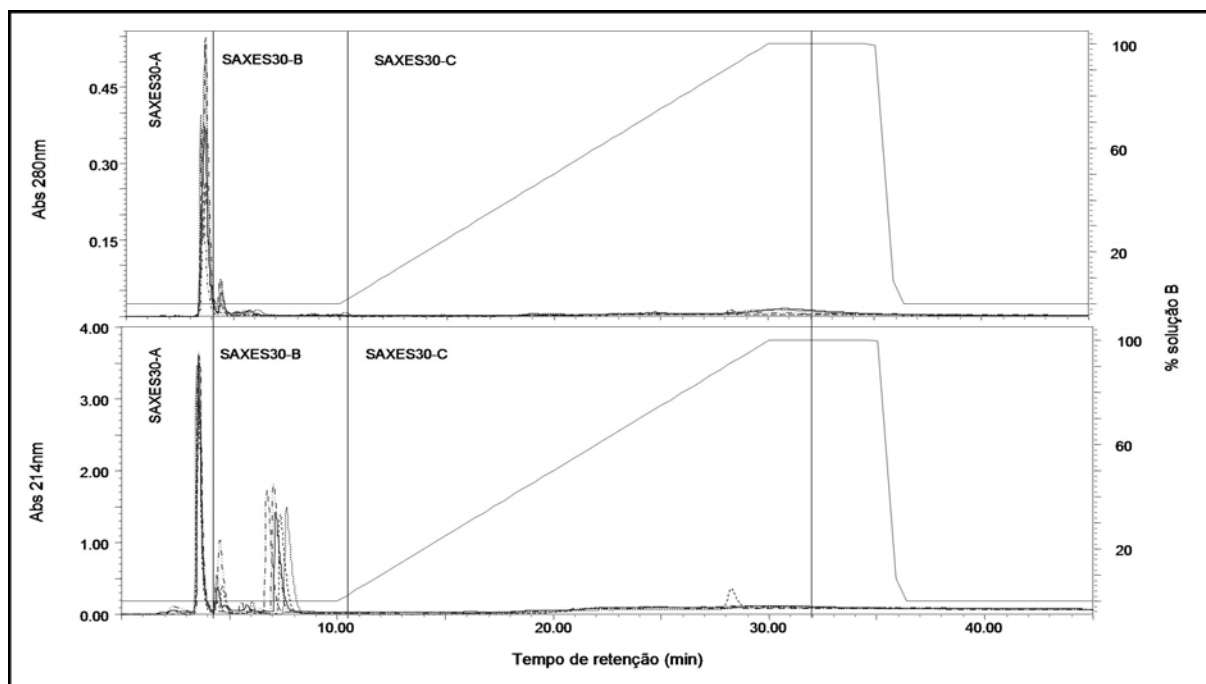


Figura II.3 - Troca Aniônica em coluna SPHERISORB 5 μ m SAX (WATERS CORPORATION) de 100 μ L das amostras dos extratos solúveis (ES) ultrafiltradas em membrana de 30 kDa (ES30). Os tratamentos ES-SF (—); ES-0-Dia (---); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (---) e ES-7-Dias (---) de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico são avaliados em absorvância de 280nm e 214nm. A coluna foi equilibrada em Tris-HCl pH 7,0 25 mM, e as proteínas foram eluídas no mesmo tampão em presença de um gradiente crescente de NaCl (0 a 1 M) (solução B). Os perfis apresentam 3 regiões de interesse.

Quando comparados os perfis cromatográficos de troca aniônica referentes aos cinco tratamentos, foram observadas diferenças nas três regiões. Em SAXES30-A, eluída pelo tampão de equilíbrio, ocorreu uma intensa sobreposição dos perfis, e as diferenças foram especialmente observadas no formato e amplitude das absorvâncias a 280 nm e 214 nm, exceto para a fração correspondente ao tratamento 2-Dias que apresentou apenas um pico sem ombro, diferente das demais frações (Figura II.4.a). Assim como para a região SAXES30-A, os tratamentos SF, 0-Dia e 7-Dias apresentaram perfil protéico de eluição semelhantes, com 2 picos, embora deslocados entre si em relação ao tempo de eluição (Figura II.4.b). Os tratamentos 1 e 2-Dias, para eluição entre 5 e 7 min, apresentaram valores de absorvância menores que os demais a 280 nm (Figura II.4.b). Esses valores de absorvância são aproximadamente 30 vezes menores que os valores referentes aos picos eluídos na região SAXES30-A. Mesmo em baixos valores de absorvância foi possível observar diferenças de expressão entre os tratamentos, reforçando a eficiência da concentração e a separação prévia por ultrafiltração das amostras.

A região aniônica, *SAXES30-C* que corresponde à eluição de proteínas no gradiente salino crescente, foi a que apresentou maior grau de diferenciação quando os perfis cromatográficos referentes aos cinco tratamentos foram comparados. Quando monitorados em 280 nm, em 23% de NaCl foi eluído um pico diferencial referente ao tratamento 0 dia. Outro destaque foram os picos eluídos em 39 e 40% de sal, correspondentes aos tratamentos 0-Dia e SF. Uma terceira região de destaque foi observada para o tratamento SF, com eluição em 73% de sal. Todos os picos mencionados não foram observados nos perfis de eluição a 280 nm dos demais tratamentos, e também quando monitorados a 214 nm. A grande diferença nessa região pôde ser observada no perfil referente ao tratamento 1 dia, tanto quando monitorado em 280 nm, quanto em 214 nm. Na região de eluição correspondente a 89% de solução B, foi eluído um pico diferencial em relação aos demais tratamentos, tanto a 280 nm quanto em 214 nm (Figura II.4.c).

Esses resultados das figuras II.3 e II.4 sugerem respostas celulares diferentes a 1, 2 e 7 dias após os ferimentos, observadas pela síntese diferencial protéica. Essa expressão em função do tempo de resposta a ferimentos é um indicativo da indução de respostas celulares rápidas e tardias como mecanismos de defesa de plantas.

II.3.1.2.2. Fase Reversa da Fração *SAXES30-A*

As diferenças de forma e intensidade apresentada pelos picos catiônicos dos perfis cromatográficos correspondente aos *ES30* foram um indicativo de possíveis proteínas diferencialmente presentes nessa região de eluição. Para prospectar essas proteínas, os eluatos coletados na troca aniônica, correspondentes a esses picos foram agrupados e deram origem ao *pool/SAXES30-A*. Apenas a fração *SAXES30-A* foi submetida à cromatografia de fase reversa, assim como ocorreu para as amostras *SAXES10-30* e *SAXES1-10*. As frações designadas como “B” e “C” de cada amostra serão analisadas em trabalho posterior.

Os perfis cromatográficos de fase reversa das frações *SAXES30-A* apresentaram três grupos de proteínas com síntese diferencial, assim considerado para uma avaliação dos resultados (Figura II.5). A região inicial até 12 minutos de eluição, na faixa de 0 a 5% de acetonitrila, foi denominada de *RPC18-I*, respectivamente, entre as faixas de 0 a 50% e 50 a 80% de acetonitrila. As proteínas eluídas inicialmente

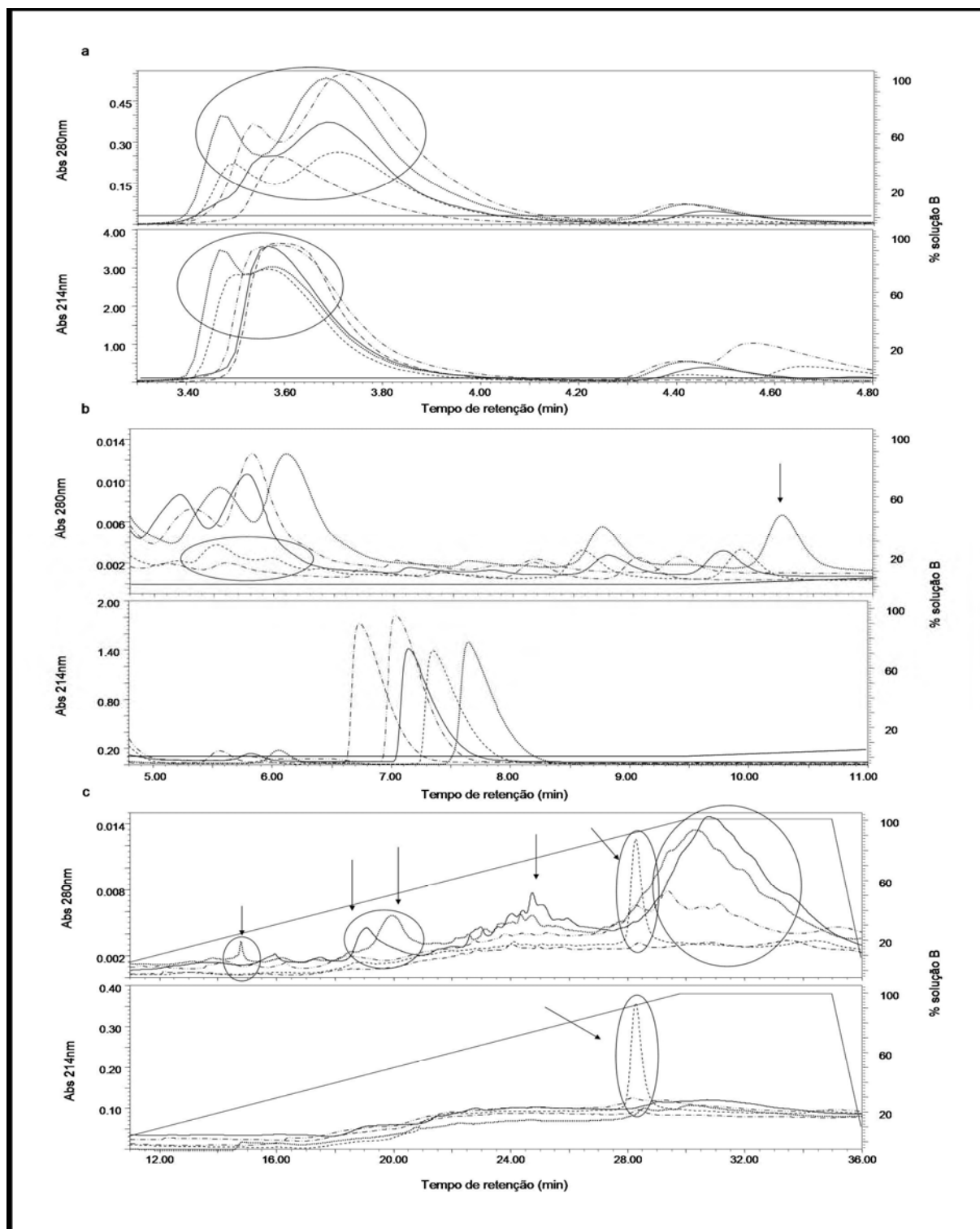


Figura II.4 - Regiões SAXES30-A (a), SAXES30-B (b) e SAXES30-C (c) ampliadas. Os tratamentos ES-SF (—); ES-0-Dia (···); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (-.-) e ES-7-Dias (- - -) de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico são avaliados em absorvância de 280nm e 214nm. Valores expressos em unidades de absorvância (AU). Os círculos identificam as regiões com perfis de eluição diferenciados e as setas indicam picos diferenciados em relação aos demais tratamentos.

apresentaram características hidrofílicas, seguindo-se a eluição de proteínas com características crescentes de hidrofobicidade.

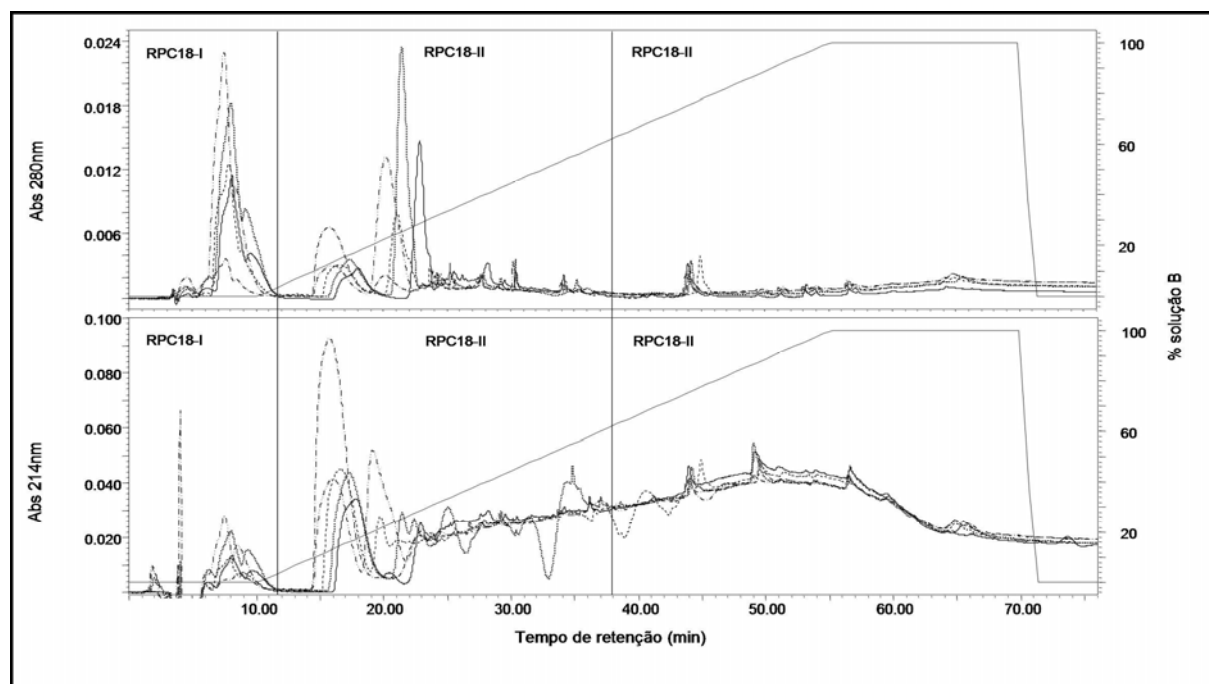


Figura II.5 - Perfis cromatográficos de Fase Reversa (RP) em coluna C18 Shim-Pack CLC-ODS dos tratamentos, ES-SF (—); ES-0-Dia (···); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (-.-) e ES-7-Dias (-.-.-) de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico. O perfil cromatográfico foi avaliado como 3 regiões de interesse: *RPC18-I*, *RPC18-II* e *RPC18-III*. A eluição foi feita com TFA 0,1%, utilizando gradiente crescente de acetonitrila de 0 a 80% (solução B), no fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Valores expressos em unidades de absorvância (AU), a 280nm e 214nm.

A ampliação da região *RPC18-I* da cromatografia de fase reversa da fração SAXES30-A obtida da Figura II.4.a evidenciou alta sobreposição entre os perfis dos diferentes tratamentos, especialmente entre o controle (SF), 0 e 1 dia (Figura II.6). Diferenças nos perfis protéicos obtidos para os tratamentos 2 e 7 dias, quando comparados com os demais tratamentos (Figura II.6.a) ou com o controle apenas (SF) (Figura II.6.b), seja a 280 nm (à esquerda na Figura) ou a 214 nm (à direita na Figura), sugere a ocorrência de duas possíveis respostas de defesa das plantas sob estresse abiótico, em diferentes tempos após os ferimentos. Foram observadas diferenças nas intensidades de absorvância e formatos dos perfis, embora nenhum pico protéico diferencial individualizado tenha sido observado (Figura II.6).

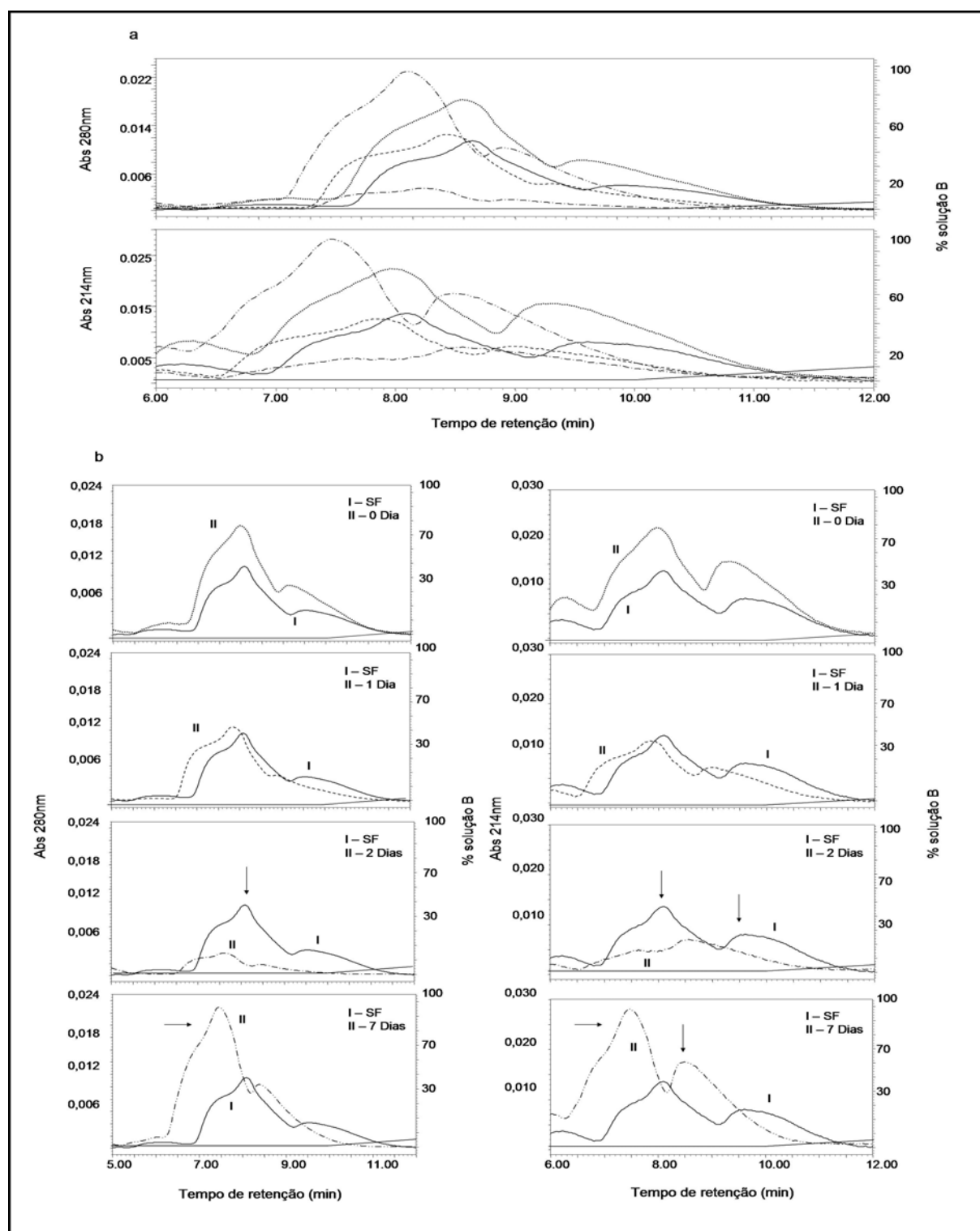


Figura II.6 – Destaque da região *RPC18-I* da fração *SAXES30-A* obtida de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico. (a) Comparação entre os diferentes tratamentos. (b) Comparação de cada tratamento, ES-0-Dia (····); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (---) e ES-7-Dias (---), com o controle ES-SF (—). As setas evidenciam as regiões com proteínas diferencialmente sintetizadas nos tratamentos 2 e 7-Dias, especialmente. Valores de absorvância expressos em unidades de absorvância (AU), a 280 nm e 214 nm.

Embora não tenha sido realizada, sugere-se que uma nova separação dos eluatos dos tratamentos 2 e 7 dias, por RP em coluna C4, por exemplo, permitiria melhor resolução na separação, o que poderia também ser obtido por uma recromatografia de fase reversa na mesma coluna, em condições diferentes de eluição.

A região *RPC18-II* dos perfis cromatográficos de separação da fração *SAXES30-A* apresentou poucas diferenças de expressão protéica entre os tratamentos (Figura II.7). O deslocamento dos perfis de eluição entre os tratamentos, tanto a 280 nm quanto a 214 nm, dificulta observações visuais mais precisas. Entretanto, foi possível observar que os tratamentos 2 e 7-Dias novamente destacam-se pela expressão protéica diferencial. Na Figura II.7.a, entre 14 e 28 min de eluição, o pico eluído em 22 min no controle SF aparenta ser o mesmo eluído em 21 min para 0 e 1-Dia, e tem, respectivamente, o dobro e a metade do valor de A_{280} de SF. Já para 2 e 7-Dias, surge um novo pico em 20 min (2-Dias), para A_{280} , que aparece com amplitude quatro vezes maior em 7-Dias. Em A_{214} observa-se também o surgimento de novo pico para o tratamento 2-Dias e, ainda a presença de outro pico entre 18 e 21 min (Figura II.7.b).

A região *RPC18-III* dos perfis cromatográficos de separação da fração *SAXES30-A*, eluída com porcentagens de acetonitrila acima de 60%, mostrou perfis cromatográficos bastante semelhantes, quando comparados todos os tratamentos entre si (Figura II.8.a) e dois a dois (Figura II.8.b), utilizando como controle o perfil referente ao tratamento SF. Os perfis apresentaram alto grau de sobreposição, não tendo sido possível indicar picos protéicos diferencialmente expressos entre os tratamentos (Figura II.8).

As comparações de síntese diferencial de proteínas aqui descritas permitem inferir que a técnica é capaz de identificar visualmente um grande número de proteínas com síntese aumentada ou reduzida em diferentes tratamentos, que é um dos objetivos básicos da proteômica, com a grande vantagem de permitir a recuperação de amostras na forma nativa. Um grande número de proteínas diferencialmente sintetizadas foi detectado em concentrações mais baixas de acetonitrila, inferiores a 40%, e muitas recuperam a atividade biológica após a remoção dessas acetonitrila, por liofilização e lavagem das amostras.

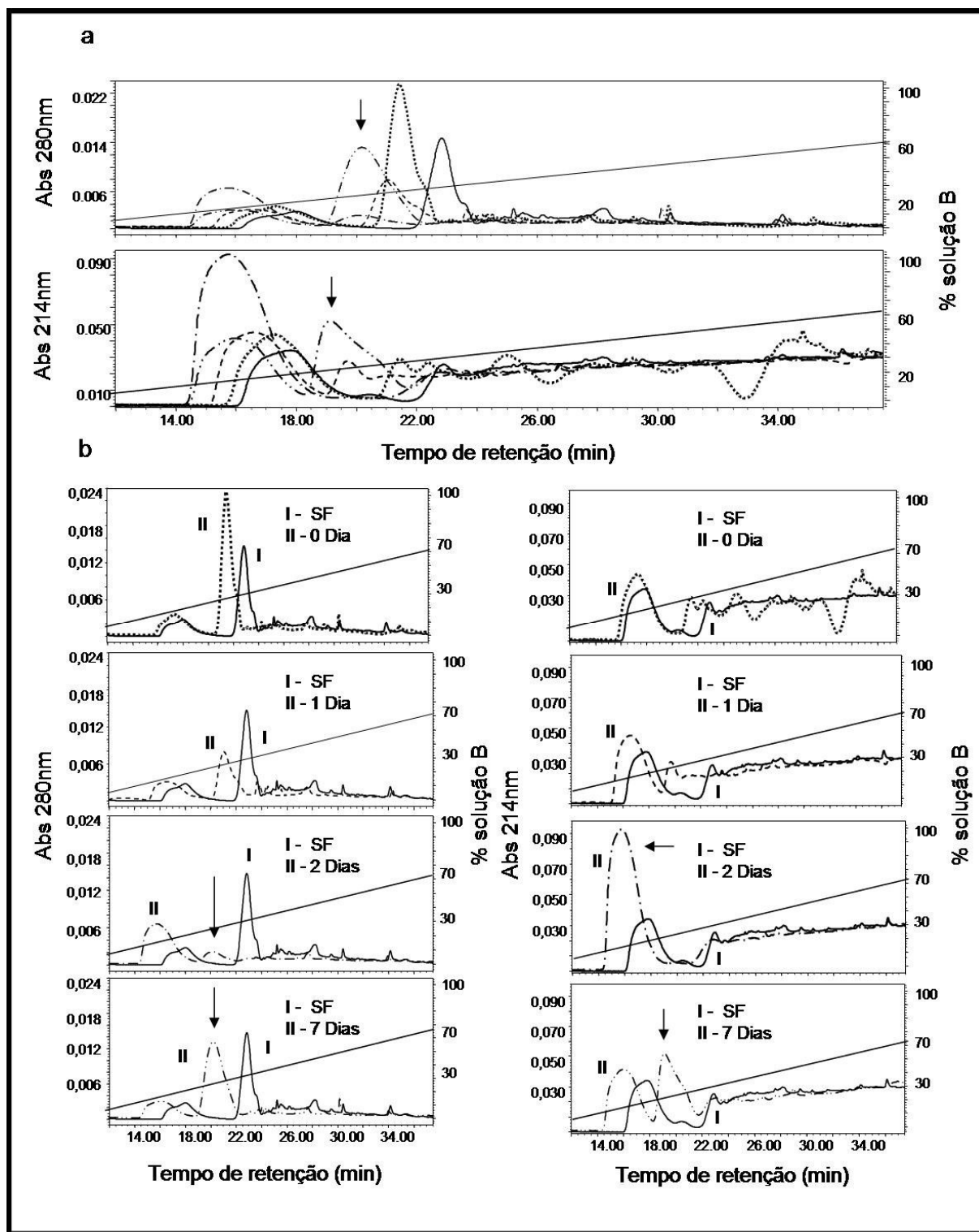


Figura II.7 – Destaque da região *RPC18-II* da fração *SAXES30-A* obtida de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico. (a) Comparação entre os diferentes tratamentos. (b) Comparação de cada tratamento, ES-0-Dia (····); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (---) e ES-7-Dias (---) com o controle ES-SF (—). As setas evidenciam as regiões com proteínas diferencialmente sintetizadas nos tratamentos 2 e 7-Dias, especialmente. Valores de absorvância expressos em unidades de absorvância (AU), a 280 nm e 214 nm.

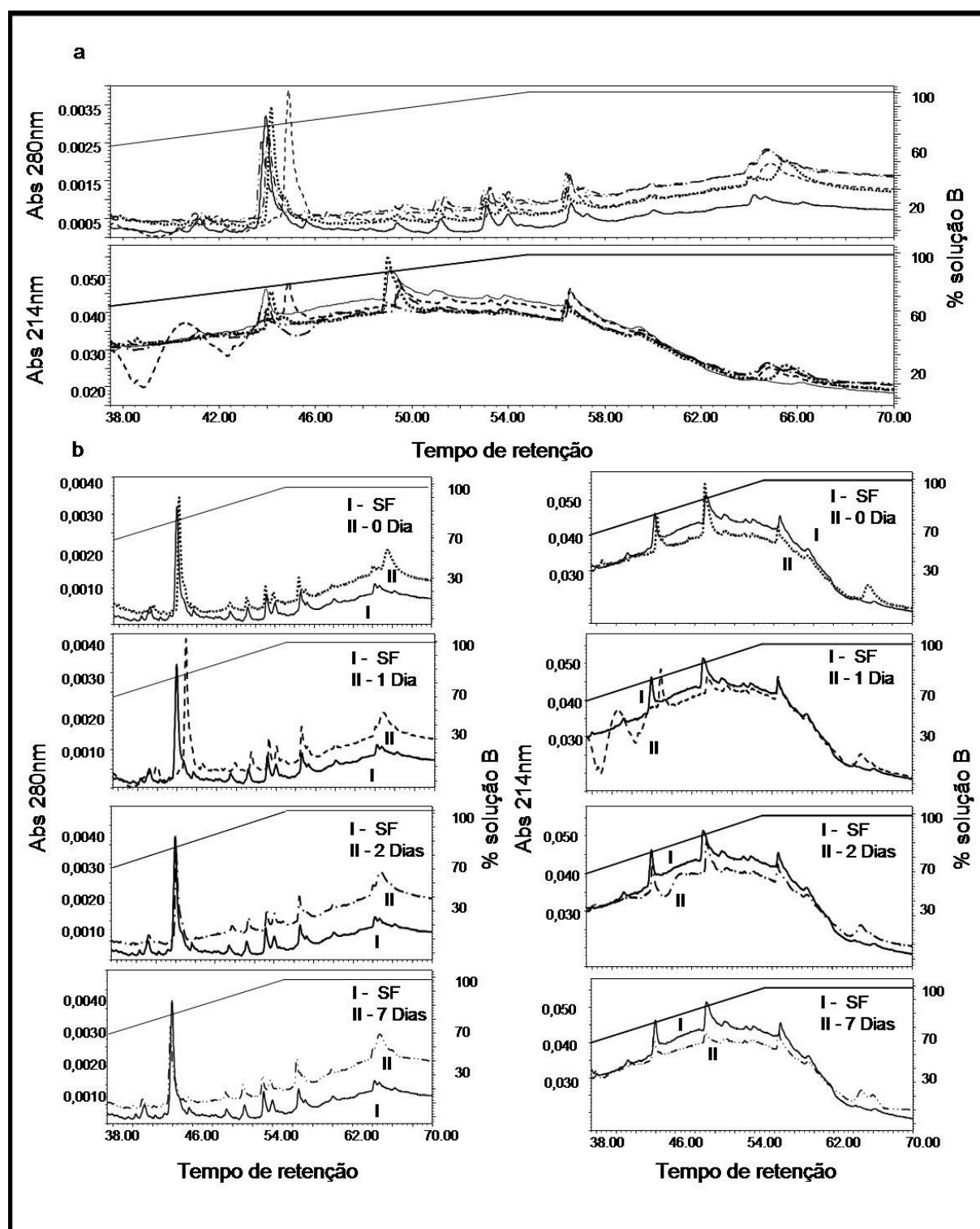


Figura II.8 - Destaque da região *RPC18-III* da fração *SAXES30-A* obtida de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico. (a) Comparação entre os diferentes tratamentos. (b) Comparação de cada tratamento, ES-0-Dia (---); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (---) e ES-7-Dias (---) com o controle ES-SF (—). Valores de absorvância expressos em unidades de absorvância (AU), a 280 nm e 214 nm.

Uma das grandes dificuldades aqui observadas é relativa à baixa quantidade de proteínas recuperadas em cada fração (valores de A_{280} e A_{214} baixos), em função do intenso fracionamento das amostras. A utilização de um HPLC semi-preparativo, com colunas de fase reversa de alta capacidade, certamente permitirão desenvolver esse processo de forma a recuperar as amostras nativas e em quantidades suficientes para ensaios biológicos.

As frações SAXES30-B e SAXES30-C (Figura II.4.b e c) não foram separadas por cromatografia de fase reversa. A fração SAXES30-B não apresentou expressão protéica diferencial detectável visualmente. Para a fração SAXES30-C, entretanto, foi observado um grande número de picos protéicos diferencialmente sintetizados (Figura II.4.c), presentes nos tratamentos SF, 0 e 1 dia, e ausentes em 2 e 7-Dias. Entretanto, enquanto os picos constituintes de SAXES30-A apresentaram valores de A_{280} de até 0,5, os picos em SAXES30-C apresentaram amplitudes entre 0,002 e 0,012, que corresponderão a muito baixas concentrações protéicas, o que dificulta sobremaneira a recuperação de dados. Além disso, há necessidade de recuperação de quantidades que permitam as análises de espectrometria de massa, para determinação das massas moleculares e de seqüências peptídicas.

II.3.1.3. Offline-MDLC dos Extratos Solúveis ES10-30

II.3.1.3.1. Troca Aniônica dos Extratos ES10-30

Os ES de plantas feridas e coletadas nos quatro estágios após fermentos tiveram o seu perfil protéico avaliado também na faixa de massa molecular entre 10 e 30 kDa (ES10-30), e foram comparados com os perfis de plantas sem ferimento (controle), inicialmente, por meio de cromatografias de troca aniônica, sendo utilizadas alíquotas de 200 μ L de cada um dos tratamentos.

Os perfis cromatográficos de troca aniônica obtidos para os cinco tratamentos apresentaram três regiões de interesse associadas a diferenças entre os tratamentos (Figura II.9). Por terem sido eluídas anteriormente ao início do gradiente salino crescente, as duas primeiras regiões dos perfis, correspondem a proteínas com características catiônicas, e que, portanto não se interagiram com a coluna. Já na terceira região, compreendida dentro do gradiente salino crescente, foram eluídas proteínas que interagiram com a resina catiônica. Com o aumento da concentração de NaCl utilizado para a eluição protéica, proteínas com características aniônicas foram sendo eluídas gradativamente ao longo do tempo. As

três regiões foram denominadas, respectivamente, *SAXES10-30-A*, *SAXES10-30-B* e *SAXES10-30-C*.

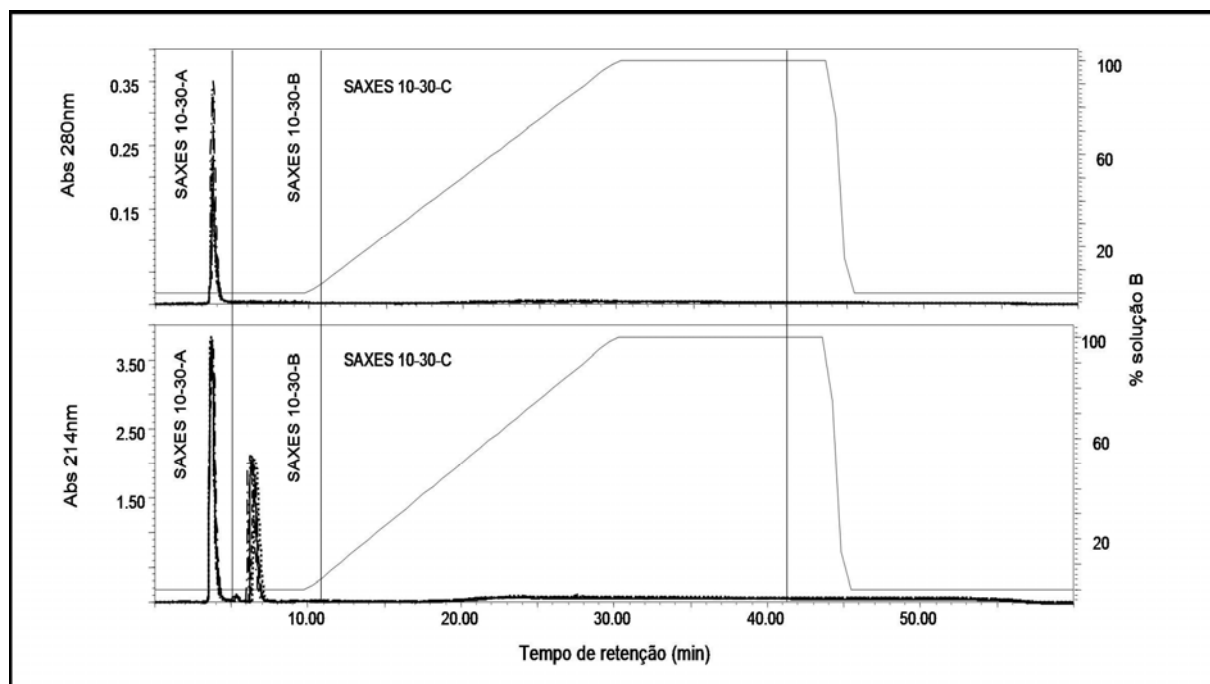


Figura II.9 - Troca Aniônica em coluna SPHERISORB 5 μ m SAX (WATERS CORPORATION) de 200 μ L das amostras dos extratos solúveis (ES) ultrafiltradas em membrana de 10 e 30 kDa (*SAXES10-30*). A coluna foi equilibrada em Tris-HCl pH 7,0 25 mM, e as proteínas foram eluídas no mesmo tampão em presença de um gradiente crescente de NaCl (0 a 1 M) (solução B). Os perfis apresentam 3 regiões de interesse. As absorvâncias foram avaliadas em 280nm e 214nm. Os valores expressos em unidades de absorvância (AU).

Os perfis de troca aniônica das amostras de proteínas com massas moleculares entre 10 e 30 kDa apresentaram diferenças entre os tratamentos, principalmente, em relação ao tratamento 1-Dia. O seu perfil evidenciou picos diferenciados eluídos ao longo de todo o tempo de eluição. Na primeira região catiônica, novamente se observou uma sobreposição dos perfis, porém apresentando picos com formatos e intensidades diferenciadas, tanto em monitoramento a 280 nm, quanto em 214 nm (Figura II.10.a). Em *SAXES10-30-B*, destacaram-se as presenças de quatro picos diferenciais, apenas quando avaliados a 280 nm, estando dois desses picos presentes no perfil correspondente ao tratamento 1-Dia, e os outros dois, nos perfis dos tratamentos 0-Dia e 7-Dias, todos eluídos no tampão de eluição (em ausência de sal), portanto predominando proteínas com carga líquida total positiva, nessas condições de eluição (Figura

II.10.b). À medida que a eluição foi sendo realizada, com o aumento das concentrações salina, novamente, o perfil correspondente ao tratamento 1-Dia se destacou quando comparado com os demais tratamentos. Picos diferenciais foram eluídos nas concentrações de 8%, 68% e 87% de NaCl (Figura II.10.c).

Assim, de maneira geral, foram observadas diferenças nas três regiões e eluição quando os perfis cromatográficos de troca aniônica referentes aos cinco tratamentos foram comparados (Figura II.9 e Figura II.10). A segunda região (SAXES10-30-B) apresentou uma difícil interpretação devido à não sobreposição dos tempos de eluição de picos semelhantes para os diferentes tratamentos, o que pode ser evidenciado no perfil a 214 nm. Sugere-se, assim, que alguns picos que se destacaram no perfil a 280 nm, indicados por setas na Figura II.10.b, podem corresponder a proteínas diferencialmente sintetizadas entre os tratamentos. A experiência em nosso laboratório sugere que a presença de proteínas diferencialmente sintetizadas, e assim presentes em uma amostra e não na outra, podem promover o deslocamento do perfil de eluição de fase reversa e, uma mesma proteína poderá ser eluída em diferentes tempos nas amostras diferentes.

II.3.1.3.2. Fase Reversa da Fração SAXES10-30-A

Apenas a fração SAXES10-30-A foi submetida à cromatografia de fase reversa, assim como ocorreu para as amostras SAXES30 e SAXES1-10. As frações designadas como “B” e “C” de cada amostra serão analisadas em trabalho posterior. Essa região apresentou perfis cromatográficos de troca aniônica diferentes entre os cinco tratamentos, embora com os tempos de eluição semelhantes para amostras com formato e amplitudes diferentes (Figura II.10.a).

As cromatografias de fase reversa em coluna C18 (C18-RP-HPLC) das frações SAXES10-30-A dos cinco tratamentos, quando alíquotas de 700µL de cada tratamento foram separadas, evidenciaram também a expressão de picos diferencialmente sintetizados, que foram agrupados em duas regiões de interesse, denominadas de *RPC18-I* e *RPC18-II* (Figura II.11).

Os perfis cromatográficos ampliados dos tratamentos 1, 2 e 7-Dias na região *RPC18-I* mostraram uma alta sobreposição quando comparados os tratamentos 0-Dia e SF, a 280 nm e em 214 nm. Observou-se, a 280 nm, que um pico diferencialmente expresso, eluído em torno de 8 min, foi apresentado pelo tratamento 1-Dia, estando presente também nos tratamentos 2 e 7-Dias. Ao longo

dos dias após os fermentos, esses picos diferem-se no formato e na intensidade dos valores de absorvância, apresentando maior valor no tratamento 7-Dias (Figura II.12).

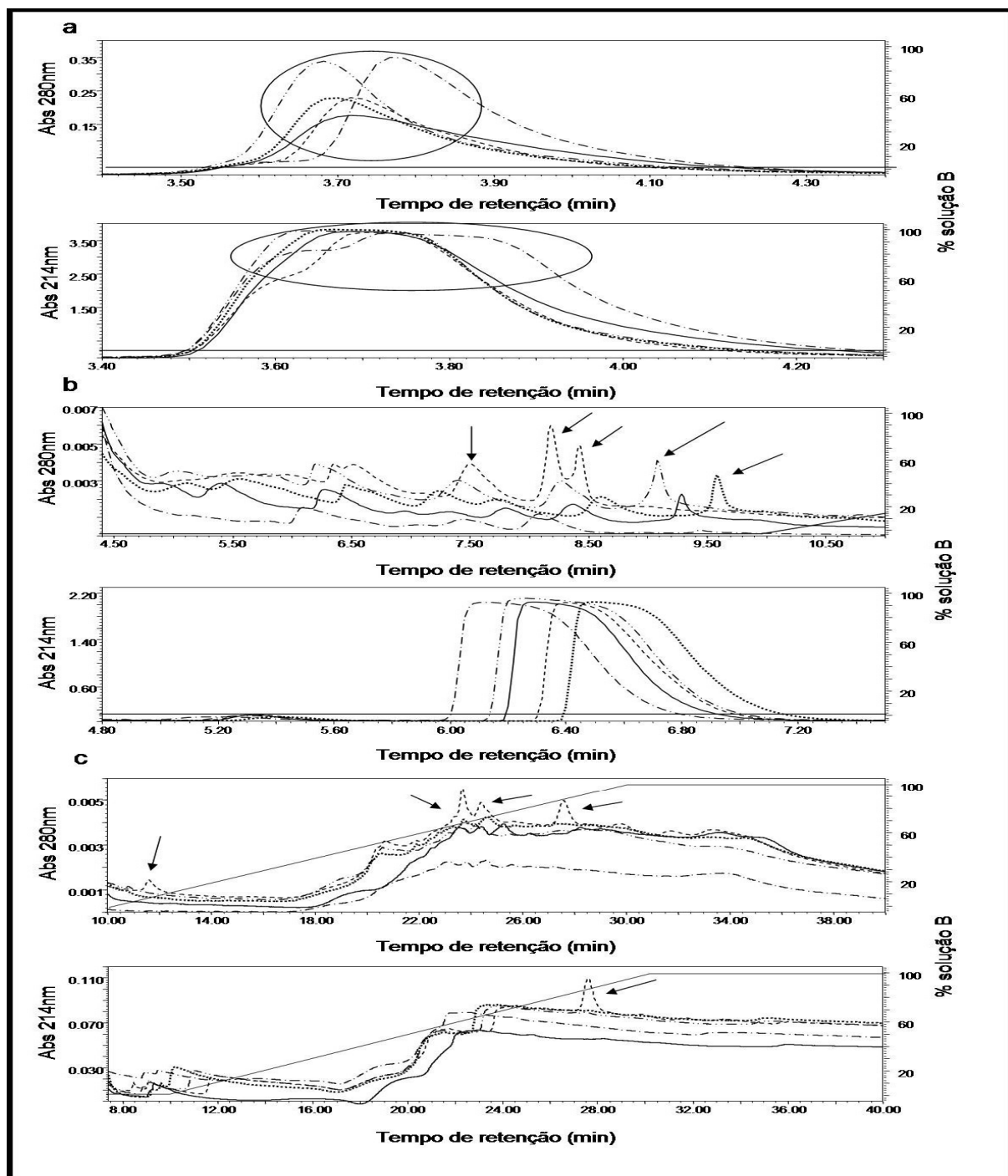


Figura II.10 – Regiões SAXES10-30-A (a), SAXES10-30-B (b) e SAXES10-30-C (c) ampliadas. Os tratamentos ES-SF (—); ES-0-Dia (···); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (-.-) e ES-7-Dias (- - -) de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico são avaliados em absorvância de 280nm e 214nm. Valores expressos em unidades de absorvância (AU). O círculo identifica as regiões com perfis de eluição diferenciados e as setas indicam picos diferenciados em relação aos demais tratamentos.

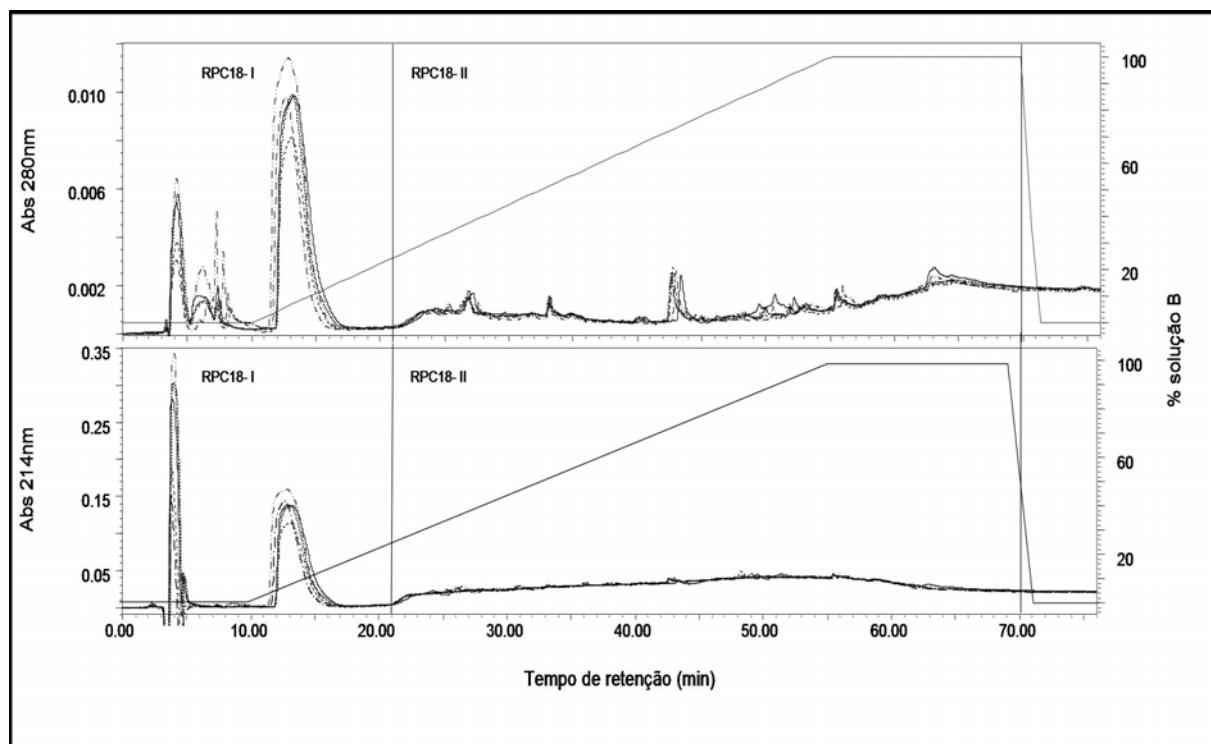


Figura II.11 – Perfis cromatográficos de Fase Reversa (RP) em coluna C18 Shim-Pack CLC-ODS dos tratamentos, ES-SF (—); ES-0-Dia (····); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (---) e ES-7-Dias (---) de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico. O perfil cromatográfico foi avaliado como 2 regiões de interesse: *RPC18-I* e *RPC18-II*. A eluição foi feita com TFA 0,1%, utilizando gradiente crescente de acetonitrila de 0 a 80% (solução B), no fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Valores expressos em unidades de absorvância (AU), a 280nm e 214nm.

A segunda região dos perfis de fase reversa da *pool* SAXES10-30-A foi a que destacou um maior número de picos diferenciais, mas apenas a 280 nm (Figura II.13.b). Um pico diferencialmente expresso, referente ao tratamento 2-Dias foi eluído com 26% de acetonitrila. Em 60%, um pico de baixa absorvância foi observado em todos os tratamentos, exceto no controle. Esse pico diferencial aparece mascarado pela presença de um pico de alto valor de absorvância, comum a todos os cinco tratamentos. Em 72% de acetonitrila, um pico diferencial presente apenas no tratamento controle SF não foi observado nos demais tratamentos (Figura II.13.b).

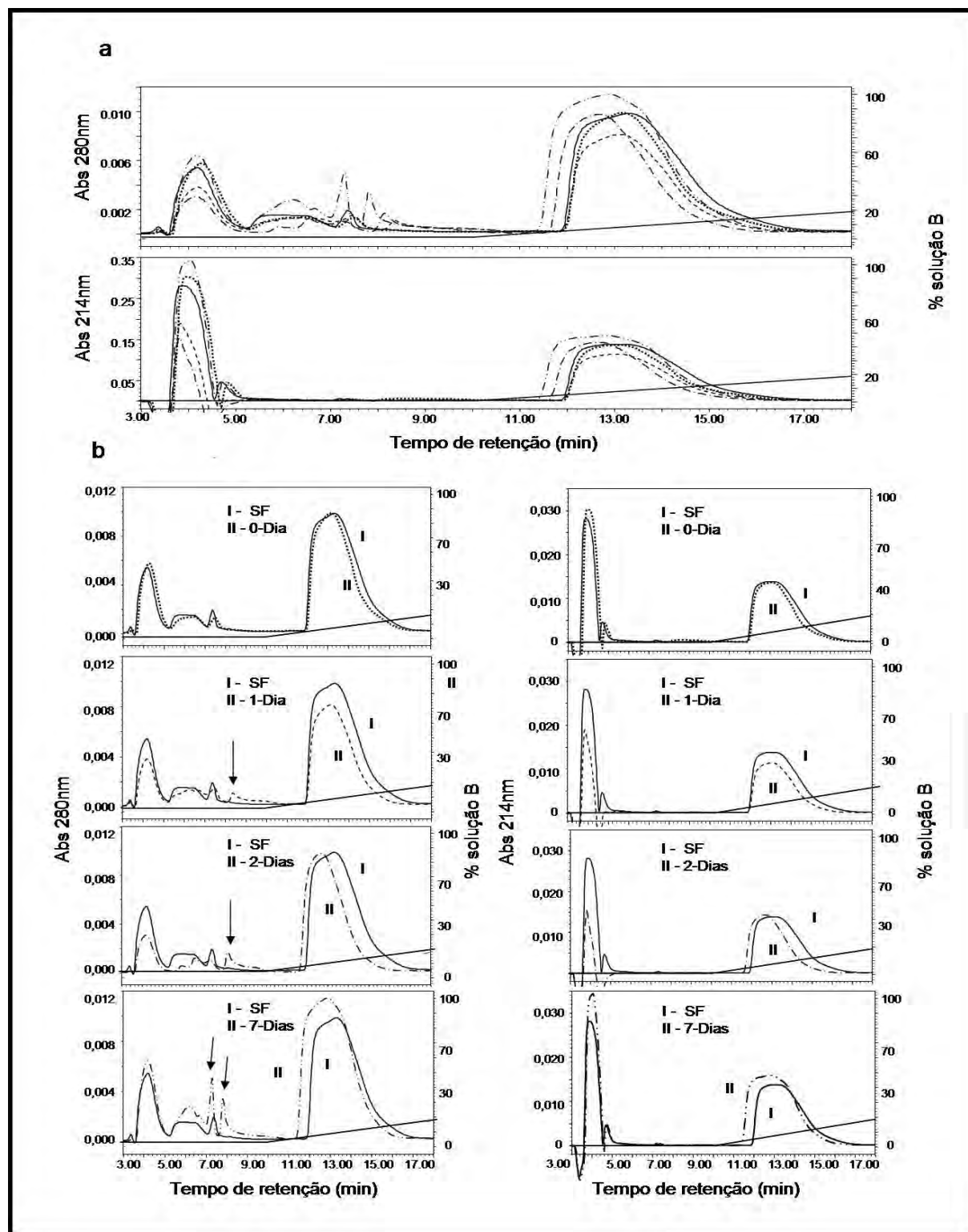


Figura II.12 – Destaque da região *RPC18-I* da fração *SAXES10-30-A* obtida de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico. (a) Comparação entre os diferentes tratamentos. (b) Comparação de cada tratamento, ES-0-Dia (····); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (-.-) e ES-7-Dias (---), com o controle ES-SF (—). As setas evidenciam picos diferencialmente sintetizados nos 1, 2 e 7-Dias. Valores de absorvância expressos em unidades de absorvância (AU), a 280 nm e 214 nm.

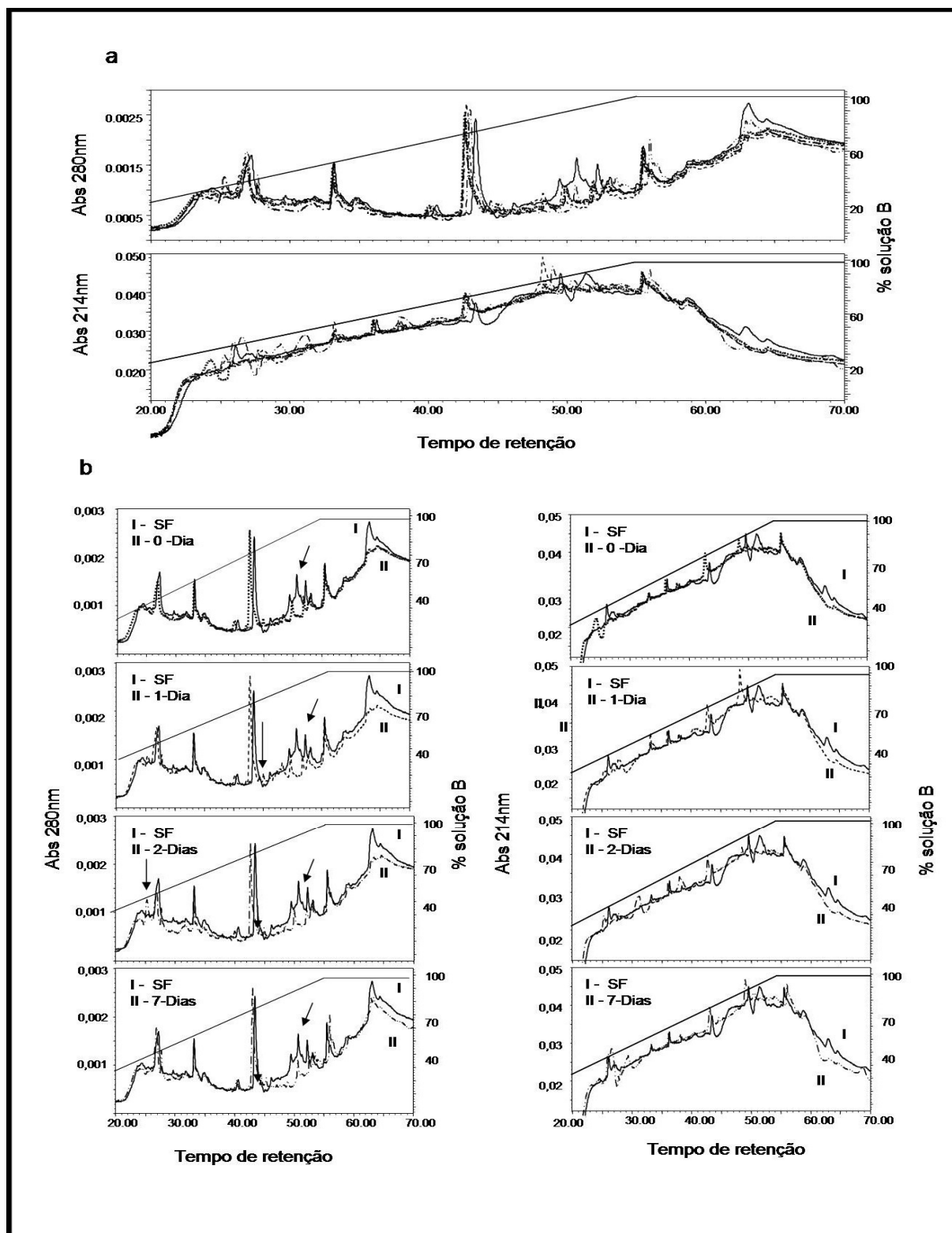


Figura II.13 – Destaque da região *RPC18-II* da fração *SAXES10-30-A* obtida de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico. (a) Comparação entre os diferentes tratamentos. (b) Comparação de cada tratamento, ES-0-Dia (····); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (---) e ES-7-Dias (---), com o controle ES-SF (—). As setas evidenciam picos diferencialmente sintetizados. Valores de absorvância expressos em unidades de absorvância (AU), a 280 nm e 214 nm.

II.3.1.3. Offline-MDLC dos Extratos ES1-10

II.3.1.3.1. Troca Aniônica dos Extratos ES1-10

Comparações entre os perfis cromatográficos de troca aniônica das amostras de *ES1-10*, em que alíquotas de 200µL referente a cada tratamento foram separadas, evidenciaram três regiões de interesse, quando foi possível a visualização de picos diferencialmente sintetizados entre os tratamentos (Figura II.14). As duas regiões inicialmente eluídas correspondem a proteínas catiônicas, enquanto que na terceira região, eluída ao longo do gradiente salino, concentram-se as proteínas aniônicas nas condições avaliadas. As três regiões foram denominadas, respectivamente, *SAXES1-10-A*, *SAXES1-10-B* e *SAXES1-10-C*.

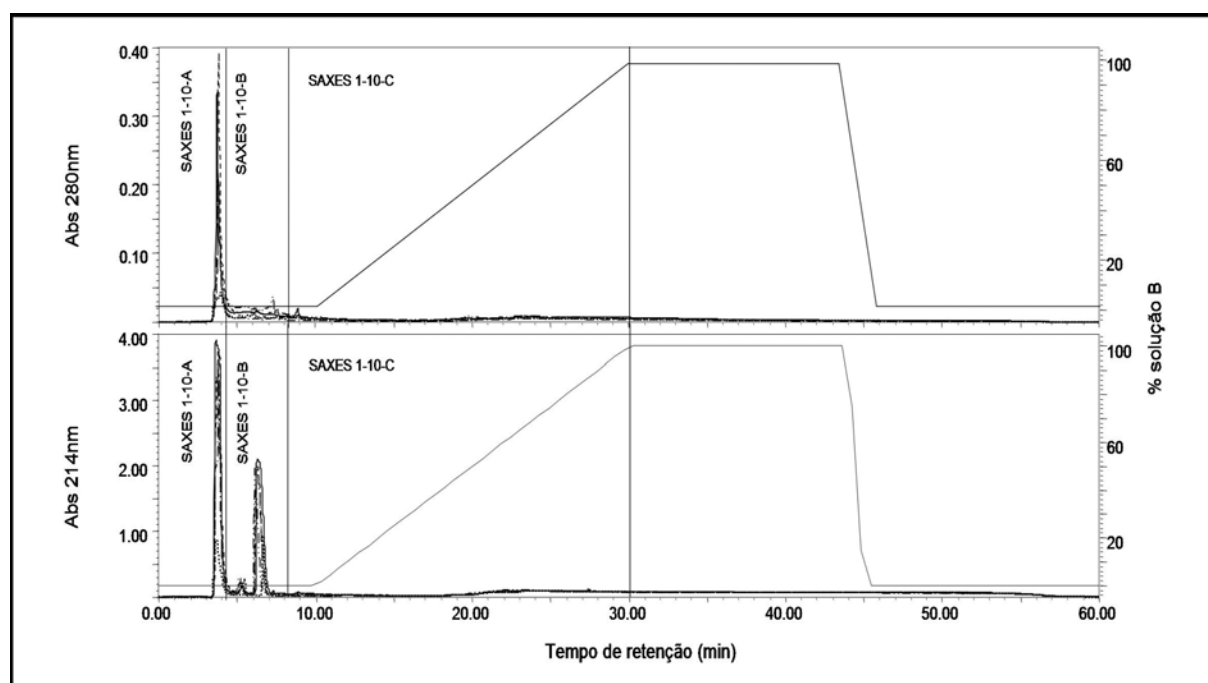


Figura II.14 – Troca Aniônica em coluna SPHERISORB 5 µm SAX (WATERS CORPORATION) de 200 µL das amostras dos extratos solúveis (ES) ultrafiltradas em membrana de 1, 10 e 30 kDa (*SAXES1-10*). A coluna foi equilibrada em Tris-HCl pH 7,0 25 mM, e as proteínas foram eluídas no mesmo tampão em presença de um gradiente crescente de NaCl (0 a 1 M) (solução B). Os perfis apresentam 3 regiões de interesse. As absorvâncias foram avaliadas em 280nm e 214nm. Os valores expressos em unidades de absorvância (AU).

De modo geral, foi observada a síntese diferencial de peptídeos ao longo de todo o perfil de eluição, quando se procedeu à comparação de todos os tratamentos. Curiosamente, o tratamento 0-Dia, que corresponde a um tempo de apenas algumas horas compreendidas entre os fermentos e a coleta inicial do material, apresentou

muito baixa expressão peptídica e um maior deslocamento do tempo de eluição desses peptídeos quando comparado com os demais tratamentos. Poderia corresponder a um momento de alto empenho celular em preparar as defesas contra o estresse imediatamente detectado, pela redução da expressão dos peptídeos constitutivamente expressos e a síntese de alguns peptídeos de defesa induzidos (Figuras II.15). Esse resultado pode sugerir ainda que esse material apresente alta expressão de peptídeos constitutivos, os quais seriam sintetizados em caso de necessidade celular.

Como os perfis em destaque indicam que todos os tratamentos avaliados diferem nos perfis peptídicos observados, seja a 280 nm ou a 214 nm, também como sabe-se que os peptídeos de defesa podem ser prontamente sintetizados pelas células em momentos de necessidade, que podem atuar de forma sinérgica, induzida ou constitutiva, e com diferentes atividades de defesa, e ainda que possam estar envolvidos em diferentes rotas metabólicas (Baggerman et al., 2003; Vallad e Goodman, 2004; Jones e Dangl, 2006). Essas amostras apresentam-se biotecnologicamente interessantes para a exploração visando isolar formas de defesa naturais como defensivos para as plantas.

Para a primeira região catiônica, a eluição de *SAXES1-10-A* evidenciou perfis diferenciados com relação ao formato e à intensidade dos valores de absorvância, a 280 nm e a 214 nm (Figura II.15.a). A ocorrência de um deslocamento dos perfis cromatográficos entre os tratamentos, em relação aos tempos de eluição, pode interferir nas análises de comparação entre os tratamentos, especialmente na segunda região catiônica e na região aniônica, tanto a 280 nm como a 214 nm. Há incerteza sobre picos diferencialmente sintetizados, poderiam ser confirmados por análises de espectrometria de massa. Alguns picos sugeridos como diferencialmente sintetizados estão apontados por setas nas Figuras II.15.B e C. Pode ser destacado o pico eluído em 67% de acetonitrila, observado a 280nm e a 214nm, referente ao tratamento 1-Dia. Também em 49% de acetonitrila destaca-se um pico diferencialmente expresso, a 280 nm, para o tratamento 7-Dias.

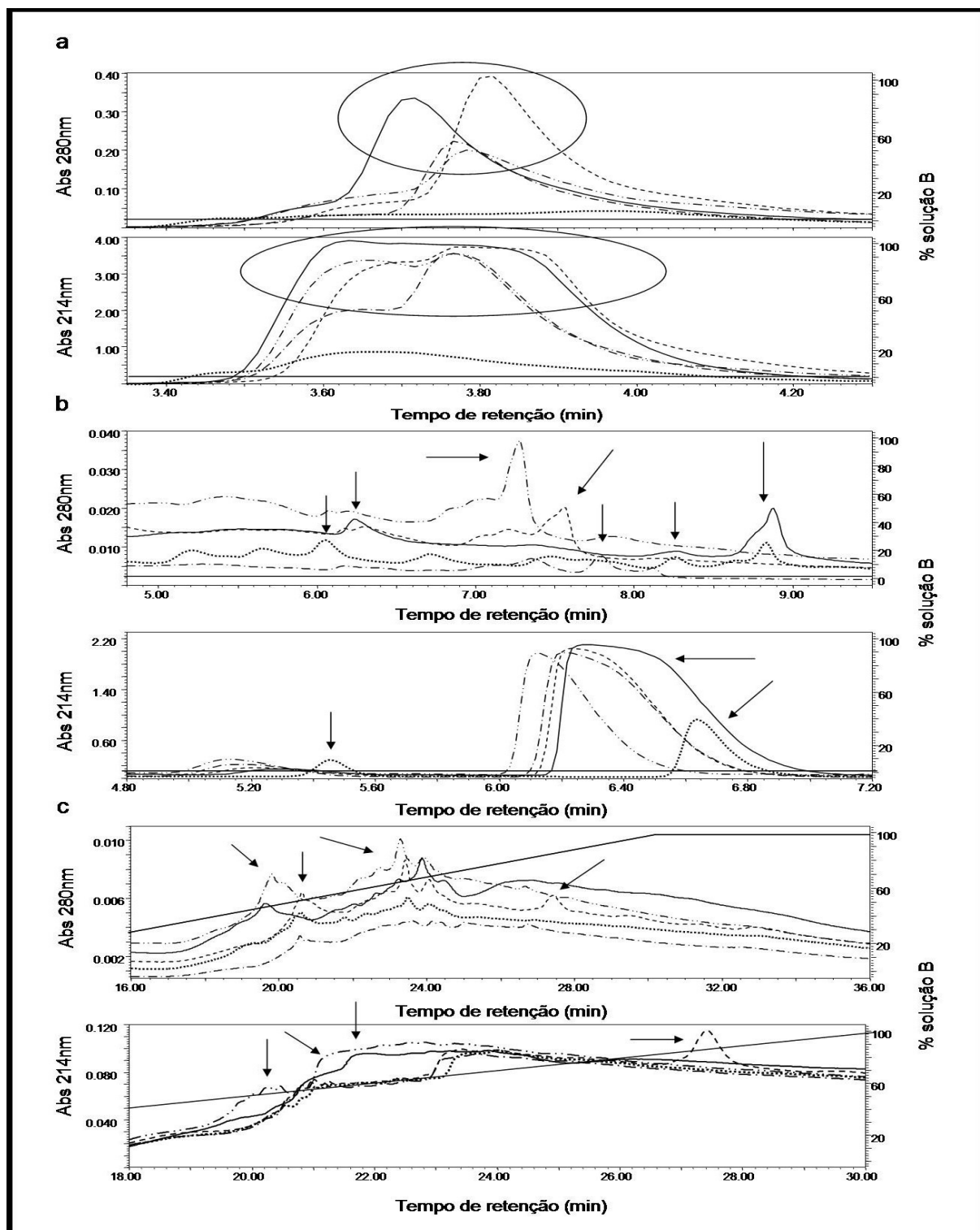


Figura II.15 – Regiões SAXES1-10-A (a), SAXES1-10-B (b) e SAXES1-10-C (c) ampliadas. Os tratamentos ES-SF (—); ES-0-Dia (---); ES-1-Dia (---); ES-2-Dias (---) e ES-7-Dias (---) de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico são avaliados em absorvância de 280nm e 214nm. Valores expressos em unidades de absorvância (AU). Os círculos identificam as regiões com perfis de eluição diferenciados e as setas indicam picos diferenciados em relação aos demais tratamentos.

II.3.1.3.2. Fase Reversa do Extrato SAXES1-10-A

Apenas a fração SAXES1-10-A foi submetida à cromatografia de fase reversa, assim como ocorreu para as amostras SAXES30 e SAXES10-30. As frações designadas como “B” e “C” de cada amostra serão analisadas em trabalho posterior. Apesar de terem sido apontadas regiões protéicas de síntese diferencial em SAXES1-10-A, observou-se baixa eficiência na separação de picos protéicos individualizados, exigindo uma nova dimensão de separação, que foi a fase reversa em coluna C18 (RP-C18-HPLC), utilizando-se 700 µL de amostra.

A comparação entre os perfis cromatográficos obtidos a partir do *pool* catiônico SAXES1-10-A, para os cinco tratamentos, sugerem duas regiões a serem consideradas para estudo, *RPC18-I* e *RPC18-II* (Figura II.16).

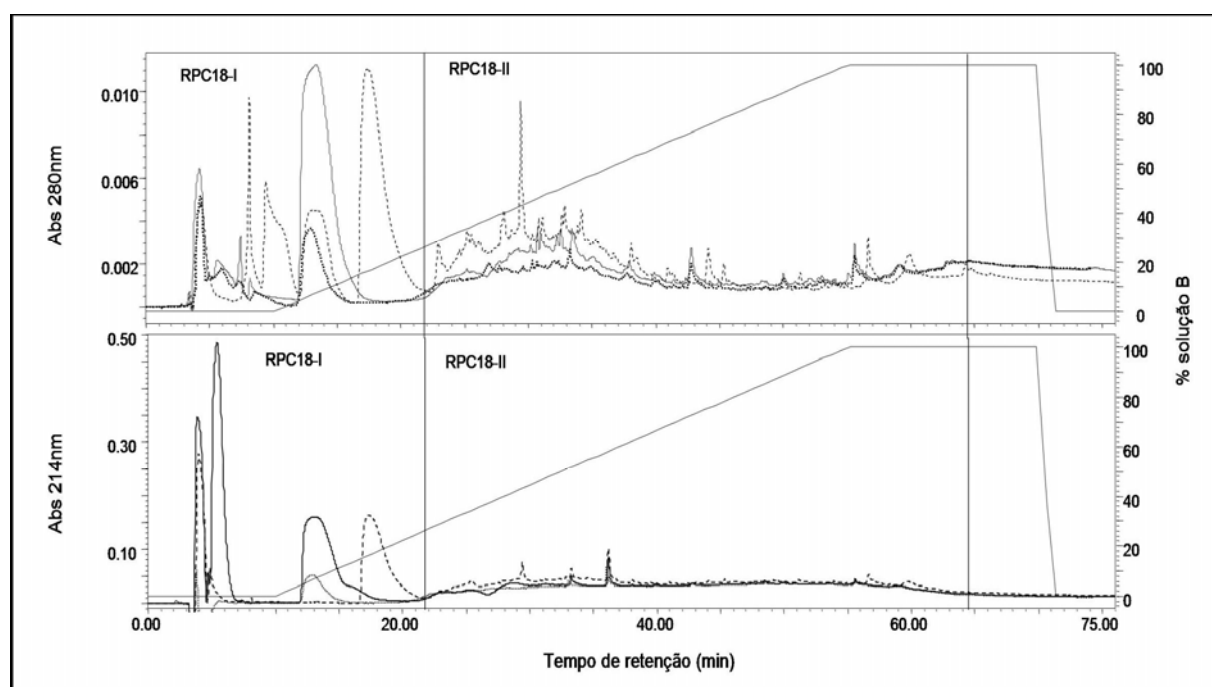


Figura II.16 – Perfis cromatográficos de Fase Reversa (RP) em coluna C18 Shim-Pack CLC-ODS dos tratamentos, ES-SF (—); ES-0-Dia (····) e ES-1-Dia (---) de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico. O perfil cromatográfico foi avaliado como 2 regiões de interesse: *RPC18-I* e *RPC18-II*. A eluição foi feita com TFA 0,1%, utilizando gradiente crescente de acetonitrila de 0 a 80% (solução B), no fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Valores expressos em unidades de absorvância (AU), a 280nm e 214nm.

Ao comparar picos protéicos diferencialmente sintetizados após a fase reversa, observou-se que os tratamentos 0, 2 e 7-Dias apresentaram perfis de

eluição com maiores semelhanças entre si, enquanto que os tratamentos SF e 1-Dia apresentaram perfis diferentes entre si e diferentes dos demais (Figura II.17.a), a 280nm e a 214nm. Como a escala de absorvância no gráfico a 214nm é 50 vezes maior do que no de 280 nm, picos diferencialmente sintetizados podem não ter sido evidenciados a 214 nm, que é o comprimento de onda em que são em geral avaliados os peptídeos e as proteínas de baixas massas moleculares.

Esses perfis destacam picos diferenciados presentes no tratamento 1-Dia, entre 8 e 11 min (início da eluição e na ausência de acetonitrila) e entre 17 e 20 min de eluição (13% de acetonitrila), sendo os primeiros detectados apenas a 280 nm, enquanto que os segundo grupo foi observado a 280 e a 214 nm, e estão ausentes nos demais tratamentos, (Figura II.17.a e b).

A região *RPC18-II* eluída a partir de 21% de acetonitrila apresentou uma série de picos com características mais hidrofóbicas, especialmente no tratamento 1-Dia (Figura II.18). Esses picos, quando avaliados em 214 e 280nm, não estão presentes nos demais tratamentos. Esses picos foram eluídos ao longo de todo o gradiente crescente de acetonitrila 80%, tendo sido detectados em regiões com concentração de 22, 24, 29 e 35%, como também em altas concentrações de acetonitrila, 53 e 100% (Figura II.18.b).

II.3.2. Fracionamento dos Extratos de Parede Celular (EP)

O maior número de picos diferenciais associados a regiões de baixas massas moleculares reforçam os relatos na literatura de peptídeos envolvidos com mecanismos rápidos e efetivos de defesa em plantas contra a ação de patógenos (Broekaert et. al., 1995; Borregaard et. al., 2000; Reddy et. al., 2004). Proteínas de parede celular têm sido descritas pelas suas propriedades antimicrobianas, envolvimento em rotas bioquímicas de sinalização e adaptação contra diversos estresses do ambiente (Castro e Fontes, 2005; Carvalho e Gomes, 2007). Os importantes resultados de purificação encontrados e a associação de proteínas de baixa massa molecular com os mecanismo de defesa deram base para novos estudos para avaliar a síntese diferencial de proteínas de baixa massa molecular nos extratos de parede celular.

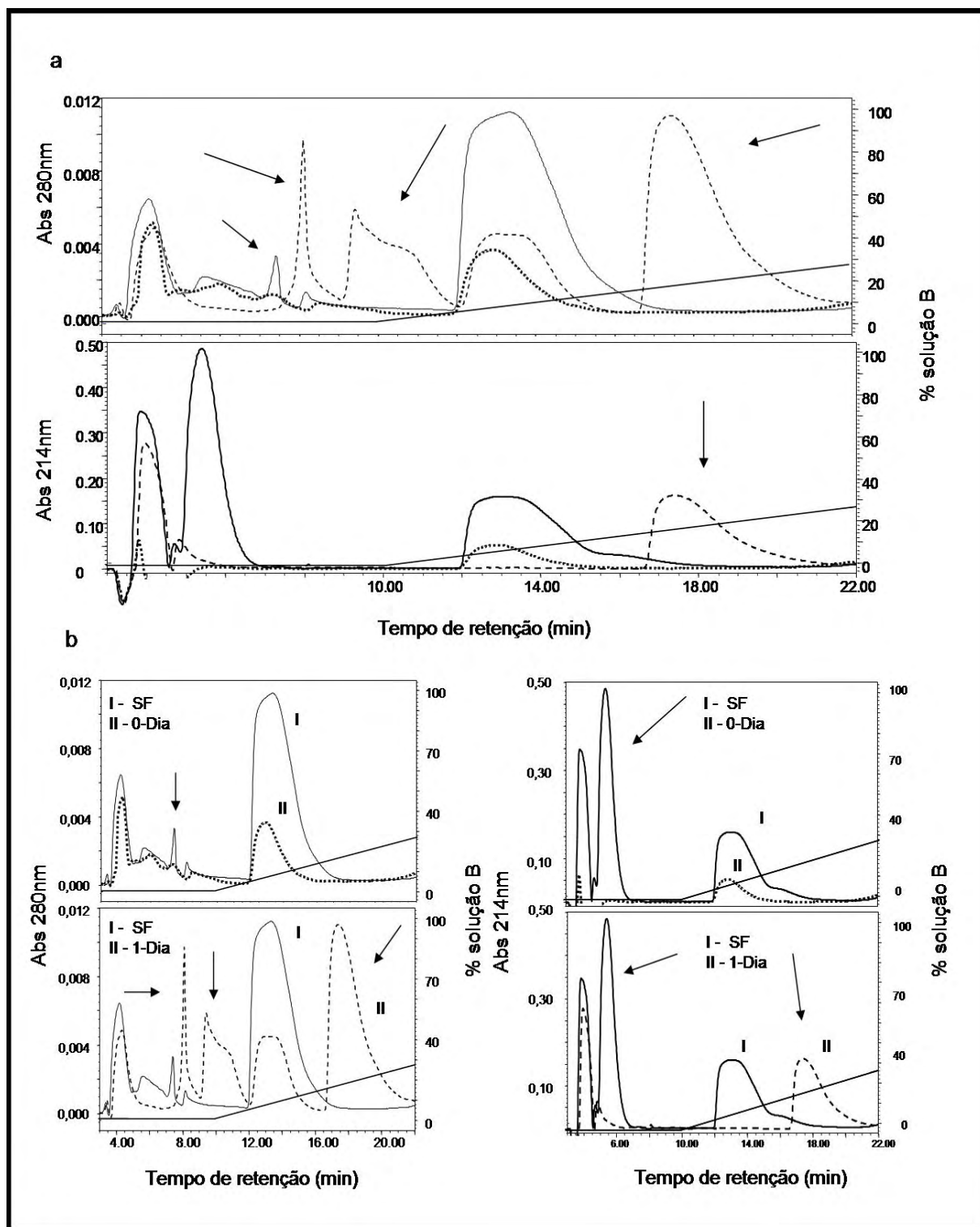


Figura II.17 – Destaque da região *RPC18-I* da fração *SAXES1-10-A* obtida de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico. (a) Comparação entre os diferentes tratamentos. (b) Comparação de cada tratamento, ES-0-Dia (····) e ES-1-Dia (---), com o controle ES-SF (—). As setas evidenciam picos diferencialmente sintetizados no tratamento 1-Dias. Valores de absorvância expressos em unidades de absorvância (AU), a 280 nm e 214 nm.

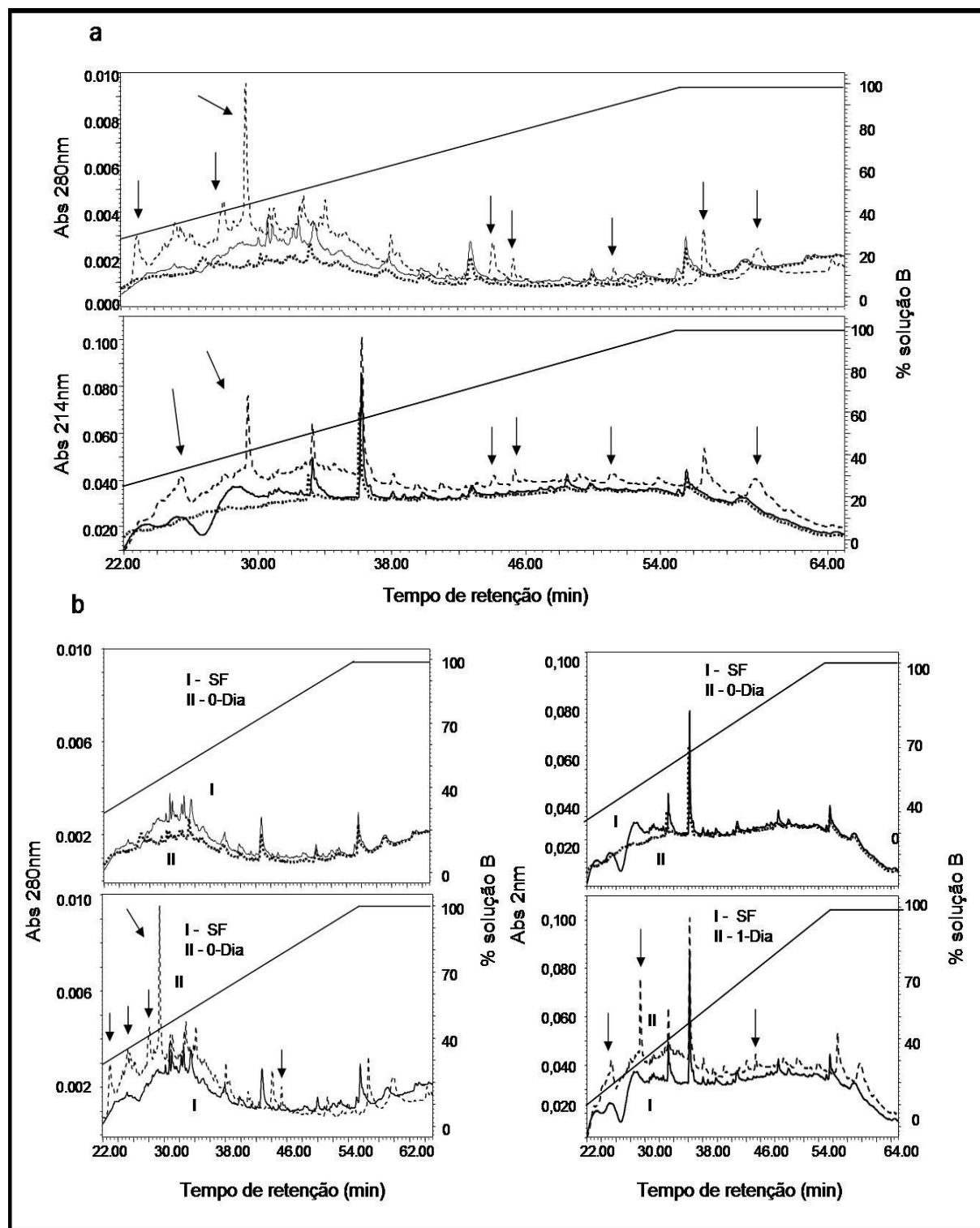


Figura II.18 - Destaque da região *RPC18-II* da fração *SAXES1-10-A* obtida de folhas de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico. (a) Comparação entre os diferentes tratamentos. (b) Comparação de cada tratamento, ES-0-Dia (····) e ES-1-Dia (---), com o controle ES-SF (—). As setas evidenciam picos diferencialmente sintetizados no tratamento 1-Dias. Valores de absorvância expressos em unidades de absorvância (AU), a 280 nm e 214 nm.

II.3.2.1. Ultrafiltração e Fase Reversa do Extrato de Parede Celular (EP)

A separação dos extratos de parede celular (EP) obtidos das mesmas amostras que originaram ES nesse Capítulo foi também realizada por cromatografia de fase reversa (RP-C18-HPLC), precedida pela separação por ultrafiltração, tendo sido dispensada a etapa de cromatografia de troca iônica usada para ES, dada a menor complexidade dos EP de cada tratamento.

A técnica de *offline*-MDLC utilizada para purificar os extratos de parede celular (EP) descrita no Capítulo I desse trabalho utilizou como primeira dimensão de separação a cromatografia de exclusão molecular em HPLC, obtendo-se quatro frações que continham proteínas com massas moleculares superiores a 40-45 kDa (GF1), entre 30 e 40 kDa (GF2 + GF3) e inferiores a 25-30 kDa (GF4), conforme Figura I.3. Esse procedimento experimental se mostrou eficiente na comparação da síntese diferencial dos proteomas de plantas de tomate feridas e não feridas, com recuperação de grande número de frações peptídicas diferencialmente sintetizadas. Entretanto, deve-se salientar que EP é menos rico em número e em quantidade de diferentes proteínas e, assim, menos complexo.

Quando aplicada à purificação de extratos solúveis (ES) dos cinco tratamentos realizados, conforme resultados desse Capítulo, a técnica de ultrafiltração utilizando *AMICON* (MILLIPORE) promoveu a dessalinização e o fracionamento dos extratos, e também diminuiu a complexidade das frações obtidas, separando as proteínas em três faixas de massas moleculares (ES1-10, 1 a 10 kDa; ES10-30, 10 a 30 kDa, e ES30, proteínas maiores que 30 kDa). Observar que trata-se de uma separação sem desnaturar a amostra (nativa), de baixo custo e rápida, em que as proteínas são pouco manipuladas. Ainda, quando associado à *offline*-MDLC, esse fracionamento enriqueceu as amostras protéicas, especialmente as de baixa massa molecular, permitindo que os cromatogramas de fase reversa de ES para todos os tratamentos revelassem um grande número de picos peptídicos diferencialmente sintetizados a partir da fração SAXES1-10, total ou parcialmente purificados (Figuras II.6, II.7, II.8, II.12, II.13, II.17 e II.18.).

A maior parte dos picos protéicos diferencialmente sintetizados, obtidos nos cromatogramas de fase reversa dos EP dos cinco tratamentos, foram observados em frações de massas moleculares entre 1 a 10 kDa. As cromatografias não acopladas (*offline*) utilizadas para a avaliação dos ES e dos EP foram capazes de purificar parcial ou totalmente 47 picos diferenciais, sendo que 29 deles

correspondem a proteínas com baixas massas moleculares, sendo 16 obtidas de EP e 13 de ES.

Assim, visto que a maior parte dos picos diferencialmente obtidos foi encontrada em amostras peptídicas ou de proteínas com baixa massa molecular, os EP foram precipitados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fracionados por ultrafiltração em membranas de 30, 10 e 1 kDa de exclusão, seqüencialmente, sendo então obtidas as amostras EP1-10 para cada tratamento. A ultrafiltração proporcionou uma redução de complexidade das amostras, tanto de ES como de EP, que refletiu em uma eficiente separação de proteínas expressas diferencialmente, com massas moleculares entre 1 e 10 kDa, quando a RP-C18-HPLC foi utilizada.

A comparação entre os cromatogramas de fase reversa (RP-C18-HPLC) obtidos de EP1-10 dos diferentes tratamentos (Figuras II.19.a e II.20.a), indicaram seis regiões de interesse, designadas R1 a R6. Exceto R6, as demais regiões apresentaram picos protéicos diferencialmente sintetizados, podendo-se citar: em R1, ao comparar o tratamento 2 Dias e 7-Dias com o controle (Figura II.19.b); em R2, três picos diferenciais são observados no controle (SF) e outro apenas nos tratamentos 1 Dia e 2 Dias, com maior intensidade de absorvância para o maior tempo após os ferimentos (Figura II.19.c); em R3, um pico diferencial eluído em 8% de acetonitrila não pôde ser observado apenas no tratamento 1 Dia (Figura II.20.b); em R4, um pico eluído em 32,8% de acetonitrila não foi evidenciado apenas nos tratamentos 0 Dia e 1 Dia (Figura II.20.c), em R5, o tratamento 2 Dias evidenciou a presença de dois picos diferencialmente sintetizados e eluídos em 63,2 e 66,4% de acetonitrila, estando ausentes nos demais tratamentos. (Figura II.20.d).

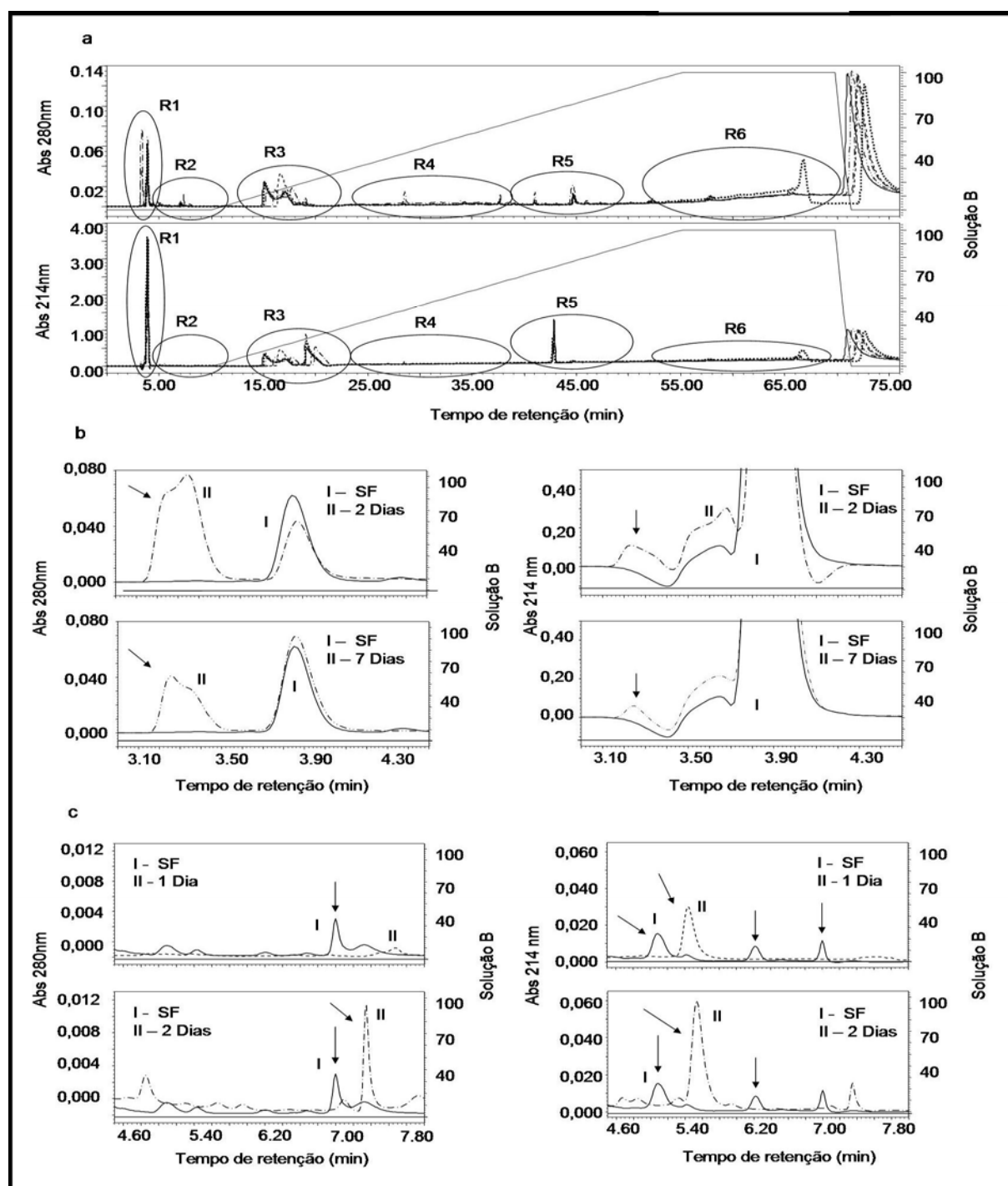


Figura II.19 - Perfis cromatográficos de Fase Reversa em coluna C18 Shim-Pack CLC-ODS dos tratamentos, EP1-10- SF (—); EP1-10- 0 dia (....); EP1-10- 1 dia (---); EP1-10- 2 Dias (---) e EP1-10- 7 Dias (---) de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico (a). As cromatografias de fase reversa dos EP1-10 foram agrupadas conforme as regiões de interesse (R1 a R6). As setas indicam picos diferenciais entre os tratamentos nas regiões de interesse R1 (b) e R2 (c) ampliadas. A eluição foi feita com TFA 0,1% em gradiente crescente de acetonitrila 0 a 80% (solução B), ao fluxo de 1,0 mL/min. Absorvância avaliada a 280nm e 214nm. Valores de absorvância expressa em unidades de absorvância (AU).

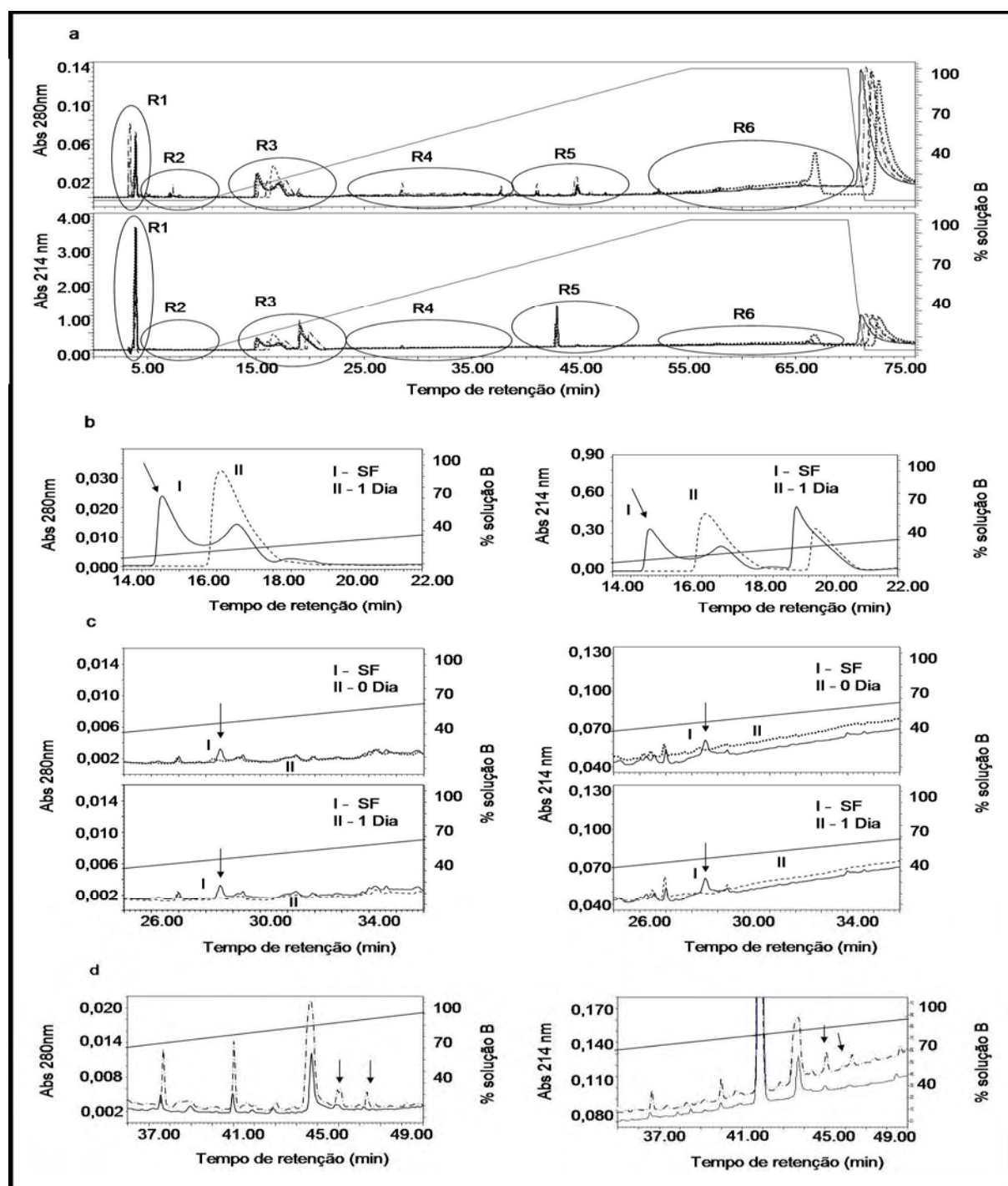


Figura II.20 - Perfis cromatográficos de Fase Reversa em coluna C18 Shim-Pack CLC-ODS dos tratamentos, EP1-10- SF (—); EP1-10- 0 dia (....); EP1-10- 1 dia (---); EP1-10- 2 Dias (-.-) e EP1-10- 7 Dias (-.-) de plantas de tomates submetidas a estresse abiótico (a). As cromatografias de fase reversa dos EP1-10 foram agrupadas conforme as regiões de interesse (R1 a R6). As setas indicam picos diferenciais entre os tratamentos nas regiões de interesse R3 (b), R4 (c) e R5 (d) ampliadas. A eluição foi feita com TFA 0,1% em gradiente crescente de acetonitrila 0 a 80% (solução B), ao fluxo de 1,0 mL/min. Absorvância avaliada a 280nm e 214nm. Valores de absorvância expressa em unidades de absorvância (AU).

II.3.3. Espectrometria de massa das frações peptídicas diferencialmente sintetizadas

As análises proteômica e peptidômica dos extratos solúveis (ES) e dos extratos de parede celular (EP) utilizando o fracionamento por ultrafiltração e as cromatografias líquidas multidimensional foram responsáveis pela purificação de 26 picos protéicos com síntese diferencial, com massas moleculares entre 1 e 10 kDa (Tabela II.1). Desses picos, 10 são referentes às amostras dos ES purificados segundo os passos de ultrafiltração em *offline*-MDLC (Tabela II.1.A). As outras 5 amostras dos ES são frações coletadas da cromatografia de fase reversa do pico eluído em 84% de NaCl correspondente ao tratamento 1-Dia (SAXES1-10P9) (Tabela II.1.B). As purificações dos EP fracionados por ultrafiltração e submetidos a cromatografias de fase reversa são correspondentes aos 11 picos diferenciais restantes (Tabela II.1.C). Esses 26 picos foram selecionados para o estudo de identificação por análise em espectrometria de massa.

A fonte ionizadora utilizada no processo de identificação foi a do tipo MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*). Foram testados três diferentes tipos de matriz para a cristalização das proteínas ou peptídeos presentes nas amostras a serem submetidas ao laser de ionização, pois cada matriz favorece a dessorção de determinadas moléculas, a qual será identificada pelo analisador do espectrômetro de massa. As matrizes testadas foram o α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCAA), o ácido sinapínico (S.A.) e o ácido 2,5-di-hidróxidobenzóico (DHB). As massas correspondentes a picos obtidos a partir das purificações dos extratos EP e ES, que foram identificadas, foram a partir de experimentos com a matriz HCAA. Esse resultado é corroborado pela literatura, uma vez que essa matriz é a mais adequada em estudos de análise de proteínas digeridas e de peptídeos, com massas moleculares menores do que 10 kDa. A matriz DHB é mais indicada em estudos de glicoproteínas, uma vez que ela possibilita a formação de cristais de glicoproteínas com maiores possibilidades de serem dessorvidos e, portanto identificados. A S.A. favorece as análises de proteínas e polipeptídios maiores que 10 kDa (Beavis et al., 1989; Strupat et al., 1991; Beavis et al., 1992; Westermeier e Naven, 2002).

Foram identificadas massas na fração peptídica menores que 10 kDa para 6 picos purificados a partir das análises realizadas com os extratos EP e ES, sendo 3 relacionados às purificações dos EP e 3 referentes aos ES (Tabela II.1).

Tabela II.1 - Picos protéicos diferencialmente sintetizados obtidos das separações cromatográficas de EP e ES, que foram analisados por espectrometria de massa. (II.1.A) Picos purificados de ES por ultrafiltração e *offline* MDLC (II.1.B) Picos da RP da fração SAXES1-10. (II.1.C) Amostras de EP provenientes das purificações por cromatografias de fase reversa das amostras, com massas moleculares entre 1 e 10 kDa, fracionadas por ultrafiltração.

Cromatografia de fase reversa (CFR)	II.1.A						
	Extrato Solúvel (ES)						
	Amostra	Coluna	Trat.	Tempo de retenção (min'seg")	solução B (%)	Acetonitrila (%)	Massas (Da)
	SAXES1-10	SAX	1 Dia	26'80"	84		—
	SAXES1-10-A	C18	SF	4'75"	0	0,0	—
	SAXES1-10-A	C18	SF	7'30"	0	0,0	—
	SAXES1-10-A	C18	1 Dia	7'88"	0	0,0	—
	SAXES1-10-A	C18	1 Dia	16'58"	15	12,0	—
	SAXES1-10-A	C18	1 Dia	22'00"	27	21,6	—
	SAXES1-10-A	C18	1 Dia	27'83"	40	32,0	—
	SAXES1-10-A	C18	1 Dia	41'63"	71	56,8	—
	SAXES1-10-A	C18	1 Dia	43'78"	75	60,0	—
	SAXES1-10-A	C18	1 Dia	50'83"	91	72,8	—
	SAXES1-10-A	C18	1 Dia	56'13"	100	80,0	—
	II.1.B						
	Extrato Solúvel (ES)						
	Amostra	Coluna	Trat.	Tempo de retenção (min'seg")	Solução B %B	Acetonitrila (%)	Massas (Da)
	RPC18 SAX1-10 P9	C18	1 Dia	39'02"	65	52,0	8.214,794
	RPC18 SAX1-10 P9	C18	1 Dia	42'13"	71	56,8	—
	RPC18 SAX1-10 P9	C18	1 Dia	43'23"	74	59,2	1.612,940 / 1.643,946
	RPC18 SAX1-10 P9	C18	1 Dia	45'28"	78	62,4	5.724,462
	RPC18 SAX1-10 P9	C18	1 Dia	50'98"	96	76,8	—
	II.1.C						
	Extrato de Parede Celular (EP)						
	Amostras	Coluna	Trat.	Tempo de retenção (min'seg")	solução B (%)	Acetonitrila (%)	Massas (Da)
	EP1-10kDa	C18	SF	4'95"	0	0,0	—
	EP1-10kDa	C18	SF	6'15"	0	0,0	—
	EP1-10kDa	C18	SF	6'95"	0	0,0	—
	EP1-10kDa	C18	SF; 0-Dia; 2-Dias e 7-Dias	14'90"	10	8,0	8.224,107
	EP1-10kDa	C18	SF; 2-Dias e 7-Dias	28'50"	41	32,8	8.214,794
	EP1-10kDa	C18	1 Dia	5'35"	0	0,0	—
	EP1-10kDa	C18	2 Dias	3'15"	0	0,0	—
	EP1-10kDa	C18	2 Dias	5'40"	0	0,0	—
	EP1-10kDa	C18	2 Dias	7'35"	0	0,0	1.567,804
	EP1-10kDa	C18	2 Dias	45'85"	79	63,2	—
	EP1-10kDa	C18	2 Dias	47'25"	83	66,4	—
	EP1-10kDa	C18	7 Dias	3'15"	0	0,0	—

Os espectrogramas de massa obtidos para cada um desses picos revelaram a presença de massas únicas para as amostras de ES eluídas em picos isolados na RP, correspondentes ao tratamento 1-Dia (Figura II.21 a, b, c) e para os tratamentos SF, 0 e 2-Dias para EP (Figura II.21 d, e, f).

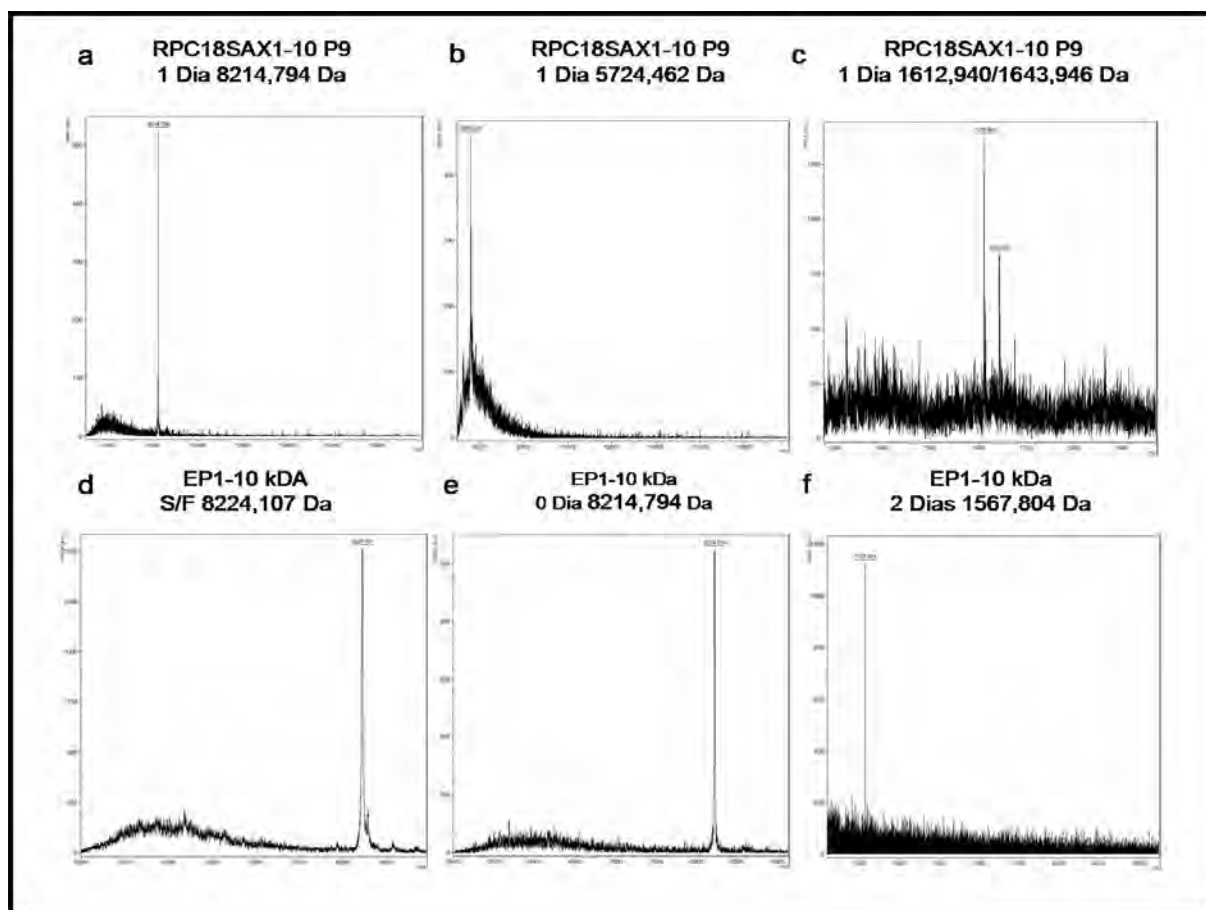


Figura II.21 - Espectros de massas moleculares (MALDI-TOF/TOF) dos picos com síntese diferencial de proteínas obtidos pela análise proteômica e peptidômica dos extratos de parede celular (EP) e extratos solúveis (ES). (a) *RPC18SAX1-10 P9* 1-Dia 8.214,794 kDa; (b) *RPC18SAX1-10 P9* 1-Dia 5.724,462 kDa; (c) *RPC18SAX1-10* 1-Dia 1.612,940 kDa e 1.623,946 kDa; (d) *EP1-10* SF 8.224,107 kDa; (e) *EP1-10* 0-Dia 8.214,794 kDa e (f) *EP1-10* 2-Dias 1.567,804 kDa. Massas identificadas entre 1500 e 10.000 Da.

As amostras 1-Dia *RPC18SAX1-10P9* (Figura II.21 a, b); SF *EP1-10* (Figura II.21 c) e 0-Dia *EP1-10* (Figura II.21 d) foram proteolisadas com tripsina. Os peptídeos trípticos gerados pela proteólise tiveram suas massas identificadas pelo MALDI-TOF/TOF (Figura II.22 e II.23). Os espectros de massa e as informações obtidas foram utilizados para a busca por homologia em bancos de dados genômicos ou proteômicos. As massas moleculares dos peptídeos trípticos

identificadas por espectrometria de massa foram analisadas com o software MASCOT® com a técnica de PMF (*peptide mass fingerprinting*) e as informações obtidas foram utilizadas para a busca por homologia em bancos de dados genômicos ou proteômicos (Tabela II.2).

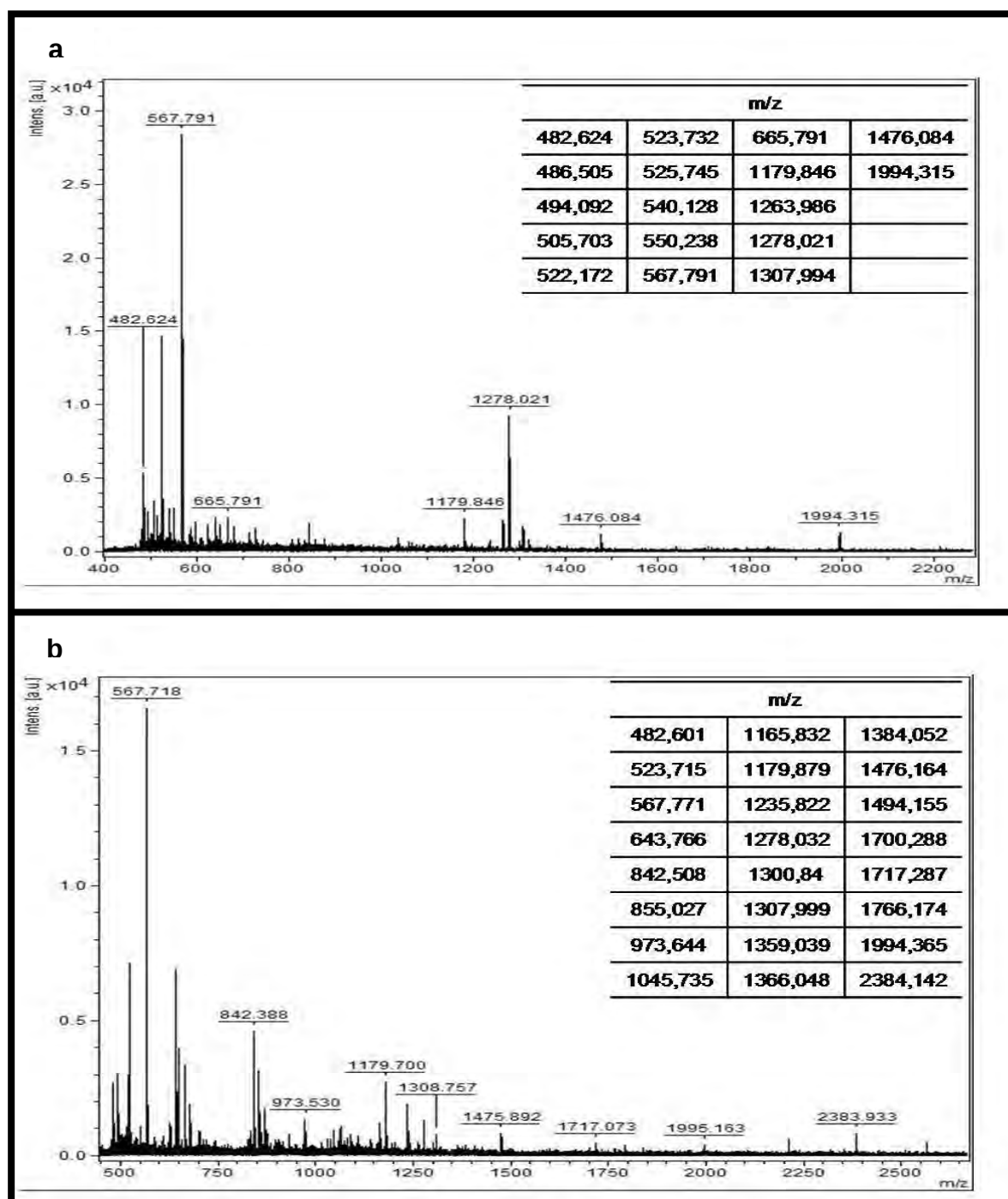


Figura II.22 - Espectros de massas moleculares (MALDI-TOF/TOF) e o conjunto de massas utilizado na análise de *peptide mass fingerprint* dos picos com síntese diferencial de proteínas obtido pela análise proteômica e peptidômica dos extratos solúveis (ES). Tratamento 1-Dia, (a) RPC18SAX1-10 P9, 8.214,794 kDa e (b) RPC18SAX1-10 P9, 5.724,462 kDa.

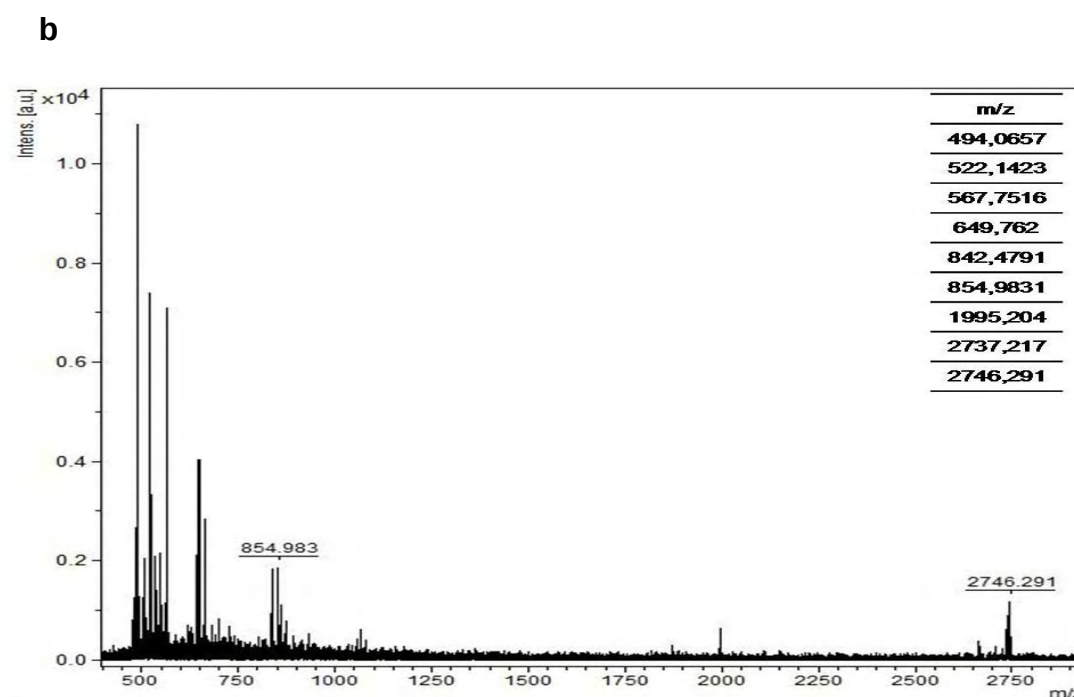
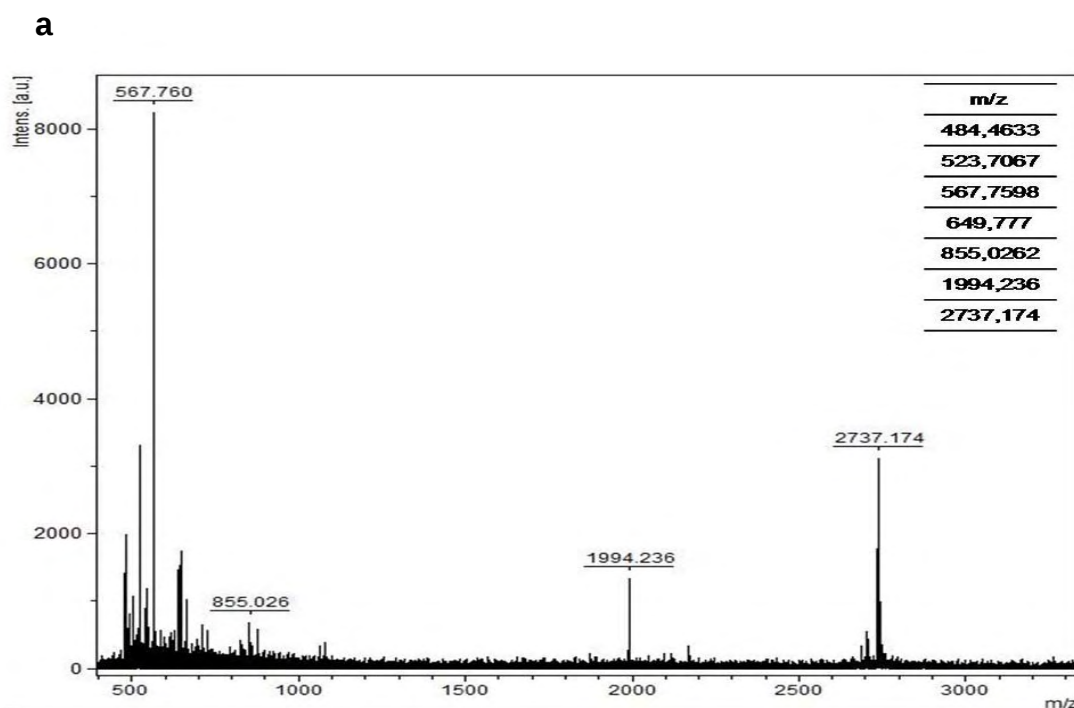


Figura II.23 - Espectros de massas moleculares (MALDI-TOF/TOF) e o conjunto de massas utilizado na análise de *peptide mass fingerprint* dos picos com síntese diferencial de proteínas obtido pela análise proteômica e peptidômica dos extratos de parede celular. (a) Tratamento SF (EP1-10 - 8.224,107 kDa) e (b) tratamento 0-Dia (EP1-10 - 8.214,794 kDa).

Tabela II.2 - Proteínas diferencialmente sintetizadas em plantas de tomate submetidas a condições de estresse abiótico. Amostras purificadas dos extratos ES e EP e identificadas por *peptide mass fingerprint* em MALDI-TOF/TOF (análise pelo software MASCOT).

Amostra	Proteína	Score	Massa Molecular (Da)*
<i>RPC18</i> <i>SAXES1-10 P9</i> 1-Dia	ERF62 ARATH Fator de transcrição ERF062 de resposta de Etileno <i>Arabidopsis thaliana</i>	35	44.284
<i>RPC18</i> <i>SAXES1-10 P9</i> 1-Dia	AFP1 PASED (Proteína antifúngica 1 <i>Passiflora edulis</i> (maracujá)	20	2.998
<i>EP1-10</i> SF	NAP10 ARATH Proteína 10 ABC puntativa não intrínica <i>Arabidopsis thaliana</i>	40	26.016
<i>EP1-10</i> 0-Dias	SAP7 ARATH, Proteína anti-estresse com domínios Zinc Finger A20 e An1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	32	19.606

*Massa molecular deduzida.

Nenhum peptídeo analisado apresentou homologia significativa (valores de Score superiores a 55, $p < 0,05$) com sequência disponíveis no banco de dados utilizado na análise. Em análise proteômica, os problemas na identificação de seqüências, estão relacionados a não-produção de scores significantes (ranqueamento) com os bancos de dados disponíveis, já que vários desses bancos estão incompletos ou não bem estabelecidos (Medina et al., 2005). Mesmo não significativos, os valores dos scores encontrados não devem ser desconsiderados. Esses valores são importantes uma vez que não existe um banco de dados completo para o genoma do tomate e, portanto, as comparações foram realizadas em banco de dados com uma alta quantidade de seqüência associadas às mais variadas espécies vegetais. Essa dificuldade de se encontrar um banco de dados mais apropriado para essas análises, por si só já resulta em uma queda nos valores de score.

Os peptídeos purificados a partir dos extratos de ES (*RPC18SAXES1-10 P9*) apresentaram homologias consideráveis com proteínas associadas com defesas de plantas. O fator de transcrição ERF062 atua, provavelmente, como um ativador transcricional ao se ligar às regiões promotoras de genes relacionados à patogênese, envolvendo-se na regulação da expressão desses genes por fatores de estresse e de componentes envolvidos na via de transdução de sinais envolvendo o

fitormônio etileno. A proteína antifúngica 1, apesar de ter apresentado valor de *score* igual a 20, pode ser um bom indicativo de relação funcional desses peptídeos purificados com a atividade de defesa vegetal, pois sua massa estimada está na faixa de valores de massas moleculares correspondentes a peptídeos, além disso, é descrita como apresentando forte ação antifúngica (UNIPROT, 2008).

Os peptídeos purificados a partir do EP 0-Dia também apresentaram um resultado associado à defesa de plantas. Apesar do *score* não significativo de 32, o peptídeo apresentou homologia com uma proteína 7 associada ao estresse, que possui um domínio do tipo *Zinc Finger* (Dedo de Zinco) com massa molecular estimada de 19.606 Da, sendo uma proteína pequena. O peptídeo correspondente ao tratamento EP 1-Dia apresentou a maior homologia, entre aqueles analisados, e massa estimada de 26.016 Da. A homologia apresentada foi com uma provável proteína relacionada com a biossíntese do complexo C (UNIPROT, 2008).

A tentativa de seqüenciamento por meio da fragmentação dos peptídeos originados pela proteólise por tripsina também não apresentou muito sucesso. Os espectros de massa obtidos pela fragmentação desses peptídeos trípticos não permitiram o estabelecimento das séries de fragmentação. Essas séries auxiliam na análise da diferença de massa entre os picos do espectro, permitindo a montagem da seqüência por associação aos valores de massas moleculares dos aminoácidos presentes nas proteínas. Os valores de absorvância dos picos diferenciais nos quais foram encontradas essas proteínas é baixo, o que reflete uma baixa concentração protéica na amostra. Mesmo com a eficiência das purificações e a alta sensibilidade do espectrômetro de massa, essas baixas concentrações podem ter dificultado a aquisição de espectros de massa referentes a esses peptídeos trípticos, não possibilitando o estabelecimento das séries de fragmentação.

II.4. Conclusões

A *offline*-MDLC associada ao fracionamento por ultrafiltração em membranas no AMICON (MILLIPORE) mostrou-se eficiente para avaliar a síntese diferencial do proteoma solúvel das células vegetais de tomateiro submetidos a estresse abiótico, devido à grande quantidade de picos diferenciais selecionados nos perfis cromatográficos finais obtidos com a separação por fase reversa.

Em todas as faixas de massas moleculares, os perfis cromatográficos referentes aos tratamentos diferiram entre si e quando comparados com o tratamento controle (SF). Picos diferenciais foram purificados tanto dos extratos referentes ao tratamento SF, quanto aos demais tratamentos pós-ferimentos. Esses resultados mostram a eficiência da ultrafiltração como um passo inicial para o fracionamento de extratos complexos, sendo responsável pela diminuição dessa complexidade, ao dividir o proteoma inicial em faixas de massas moleculares. Além disso, a ultrafiltração foi um importante passo de enriquecimento protéico, permitindo que proteínas diferencialmente sintetizadas, que em geral estão presentes em baixas concentrações, pudessem ser visualizadas entre os tratamentos, no proteoma e peptidoma diferenciais.

As diferenças peptidômicas encontradas nas análises por *offline*-MDLC dos EP e ES foram comprovadas pela identificação das massas moleculares menores do que 10 kDa por espectrometria de massa. De todos os picos diferenciais purificados pelas cromatografias realizadas com as amostras de EP e ES, a maior parte, 26 picos diferenciais, foi encontrada na região de baixa massa molecular.

A eficiência da purificação desses picos diferencialmente sintetizados associados a proteínas ligadas à indução de resistência possibilitou a identificação de peptídeos em ES e em EP. A proteólise limitada, por tripsina, e a análise em bancos de dados de *mass fingerprint*, sugeriram a presença de peptídeos e proteínas envolvidos na defesa de plantas. Os protocolos de fracionamento propostos permitiram a obtenção, com sucesso, de frações purificadas, com destaque para as vantagens obtidas pelo uso da ultrafiltração para o fracionamento prévio das amostras, sobretudo das amostras de baixa massa molecular (1 a 10 kDa), tanto para ES quanto para EP.

Conclusões Gerais e Perspectivas

Plantas de tomateiro submetidas ao estresse abiótico apresentaram uma indução de resistência comprovada pelo aumento na atividade de enzimas indicadoras desse estado de indução. E a avaliação da síntese diferencial de proteínas e peptídeos associados a esse fenômeno foi realizada por meio de ajuste de protocolos de fracionamentos e purificações. A proposta de ferramentas proteômicas e peptidômicas apresentadas por esse trabalho, portanto, mostrou-se eficiente na busca por proteínas associadas a situações de estresse, uma vez que foi observada a presença de dezenas de picos diferenciais associados aos cromatogramas. E, além disso, a partir das análises feitas, o maior número de picos diferenciais associados ao fenômeno de defesa de plantas foi associado a proteínas de menores valores de baixas massas moleculares (abaixo de 10 kDa).

O fracionamento do proteoma total das células vegetais em extrato de parede celular (EP) e extrato solúvel (ES) permitiram a concentração das amostras, além da avaliação de grupos distintos. Os EP, em geral possuem uma menor complexidade, e trata-se de uma amostra com menor número de interferentes. A menor complexidade do extrato, associada ao fato de que várias proteínas associadas à parede celular foram descritas como envolvidas em mecanismos de defesa vegetal, tornou essa fração uma importante fonte de material para o estudo proteômico e peptidômico nesse trabalho. Já os ES, por sua maior complexidade, necessitaram de ajustes metodológicos como o fracionamento por ultrafiltração (AMICON), que permitiu o enriquecimento protéico e tornou a amostra menos complexa, à medida que promoveu a divisão do proteoma inicial em frações com diferentes faixas de massas moleculares.

Esse fracionamento inicial em EP e ES, bem como o fracionamento por ultrafiltração dos ES, somados com o ajuste na purificação, favoreceram os estudos peptidômicos, utilizando a técnica de MDLC “*offline*”, na qual foram conjugadas dimensões de separações diferentes e independentes, que permitiram a coleta das frações entre as separações. Essa coleta permitiu a avaliação e a recuperação de um maior número de amostras que puderam ser separadas em uma segunda dimensão, com uma maior eficiência. A MDLC *offline* demonstrou um alto poder de

visualização de peptídeos e ainda permitiu o estudo de proteínas e peptídeos diferencialmente sintetizados associados a paredes celulares.

Os protocolos de purificação, portanto permitiram a separação de 47 picos diferenciais que podem estar relacionados à síntese diferencial de proteínas e peptídeos associada ao fenômeno de resistência em plantas. Mais da metade desses picos diferenciais, 25 deles, corresponderam a proteínas com baixas massas moleculares.

Os resultados de busca por homologias não se mostraram conclusivos na identificação dos peptídeos purificados de EP e de ES de folhas de tomate submetidas a estresse abiótico. Entretanto, a perspectiva é de que, por meio dos passos de purificação descritos seja possível concentrar material suficiente para experimentos de identificação dos peptídeos por seqüenciamento automático. Essa identificação confiável dos peptídeos diferencialmente sintetizados na defesa de plantas à injúria mecânica é importante para o conhecimento da fisiologia desse fenômeno de defesa induzido

A intensidade dos valores de absorvância indicados nos perfis cromatográficos de fase reversa permitiu a observação de um grande número de picos diferenciais. Porém, em função da expressão em baixas concentrações, apenas a identificação das massas moleculares foi possível, não tendo sido obtido sucesso na obtenção de seqüências. Há necessidade de acúmulo de material protéico em alto grau de purificação para os trabalhos seguintes de identificação de seqüência e análise funcional.

As informações proteômicas e peptidômicas funcionais relacionadas com mecanismos fisiológicos de defesa de plantas serão utilizadas para representar uma nova estratégia no desenvolvimento biotecnológico, visando à melhor adaptação das plantas às condições adversas do ambiente. Por exemplo, neutralizando ou inibindo patógenos sem provocar a indução de resistência, por meio da produção de plantas que superexpressam proteínas e peptídeos de defesa ou por síntese química das mesmas, provocando, assim, um aumento na eficiência ao combate de patógenos de plantas.

Referências

- Ahsan, N., Leea, D.-G., Leea, S.-H., Kanga, K.Y., Bahka, J.D., Choib, M.S., Leec, I.-J., Renautd, J., Leea, B.-H. A comparative proteomic analysis of tomato leaves in response to waterlogging stress. *Physiologia Plantarum*, **131**: 555-570, 2007.
- ANVISA, 2008 – www.anvisa.org.br, acessado em 20/05/2008.
- Axelrod, B., Cheesbrough, T.M., Laakso, S. Lipxygenase from Soybean. *Methods Enzymology*, **71**: 441-451, 1981.
- Baggerman, G., Verleyen, P. Clynen, Huybrechts, J. De Loof, A., Schoofs, L. Peptidomics. *Journal of Chromatography B*, 2003.
- Bals, R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respiratory Research*, **1**:141–50, 2000.
- Baysal, O., Soylu, E.M. Solyu, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Plant Pathology*, **52**: 747-753, 2003.
- Bechinger, B., Lohner, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica acta Biomembranes*, **1758**: 1529–1539, 2006.
- Beavis, R. C., Chait, B. T. Cinamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Communication Mass Spectrometry*, **3**: 432-435, 1989.
- Beavis, R. C., Chaudhary, T., Chait, B. T. α -cyano-4-hidroxyxinnamic acid as a matrix for matrix assisted laser desorption mass spectrometry. *Org Mass Spectrometry*, **27**: 156-158, 1992.
- Block, A., Schmelz, E., O'donnell, P.J., Jones, J.B., KLEE, H.J. Systemic Acquired Tolerance to Virulent Bacterial Pathogens in Tomato. *Plant Physiology*, **138**: 1481-1490, 2005.
- Bonas, U., Lahaye, T. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Current Opinion in Microbiology*, **5**: 44–50, 2002.
- Borregaard, N., Elsbach, P., Ganz, T., Garred, P. Innate immunity: from plants to humans. *Immunology Today*, **21**: 68-70, 2000.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248–254, 1976.
- Breusegem, F.V., Vranova, E., Dat, J.F., Inze, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, **161**: 405–414, 2001.
- Broekaert, W.F., Terras, F.R., Cammue, B.P., Osborn, R.W. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*, **108**: 1353–1358, 1995.
- Broekaert, W. F.; Cammue, B. P. A.; De Bolle, M. F. C.; Thevissen, K.; De Samblanx, G. W.; Osborn, R. W. Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sc.*, **16**: 297-323, 1997.
- Canas, B., López-Ferrer, D., Ramos-Fernández, A., Camafeita, E., Calvo, E. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, **4**: 295-320, 2006.
- Carvalho, A.O., Gomes, V.M. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology – A concise review. *Peptides*, **28**: 1144-1153, 2007.

- Castro, M.S., Fontes, W. Plant Defense and Antimicrobial Peptides. *Protein and Peptide Letters*, **12**: 11-16, 2005.
- Chen S., Vaghchhipawala Z., Li W., Asard H., Dickman M.B. Tomato phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by Bax and oxidative stresses in yeast and plants. *Plant Physiology*, **135**: 1630-1641, 2004.
- Colson, E., Deverall, B. Helping Plants Fight their Own Disease Battles. *Australian Cotton Grower*, **17**: 76-80, 1996.
- Croft, K.P.C., Juttner, F., Slusarenko, A.J. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Physiology*, **101**: 13-24, 1993.
- Delahunty, C., Yates, J R. Protein identification using 2D-LC-MS/MS. *Methods*, **35**: 248-255, 2005.,
- Dhingra, V., Gupta, M., Andacht, T., Fu, Z.F. New frontiers in proteomics research: A pepspective. *International Journal of Pharmaceutics*, **299**: 1-18, 2005.
- Di Clero, L., Bellato, C.M. PROTEOMA - Avanços Recentes em Técnicas de Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de Massa. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, **29**: 158-164, 2002.
- EMBRAPA, 2008 – site acessado pelo endereço: <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/tomate/doencas.htm>, em 30/04/2008.
- Farmer, E.E., Ryan, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*, **4**: 129-134, 1992.
- Farrokhi, N., Whitelegge, J.P., Brusslan, J.A. Plant peptides and proteomics. *Plant Biotechnology Journal*, **6**: 105-134, 2008.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246**: 64 - 71, 1989.
- Fricker, L.D., Lim, J., Pan, H.; Che, F.Y. Peptidomics: identification and quantification of endogenous peptides in neuroendocrine tissues. *Mass Spectrometry Reviews*, **25**: 327-344, 2006.
- García-Olmedo, F.; Rodríguez-Palenzuela, P.; Molina, A.; Alamillo, J. M.; López-Solanilla, E.; Berrocal-Lobo, M. e Poza-Carrión, C. Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Leters*, **498**: 219 - 222, 2001.
- Gerasimova, N. G., Pridvorova, S. M., Ozeretskovskaya, O.L. Role of L-Phenylalanine Ammonia Lyase in the Induced Resistance and Susceptibility of Potato Plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **41**: 103-105, 2005.
- Gerhardson, B. Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*, Londres, **8**: 338 - 343, 2002.
- Guzzo, S. D. Aspectos Bioquímicos e Moleculares da Resistência Sistêmica Adquirida em cafeeiro contra Hemileia vastarix. *Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP-Piracicaba*, 2004.
- Hackman, R.H., Goldberg, M. New Substrates for Use with Chitinases. *Analytical Biochemistry*, **8**: 397-401, 1964.
- Hammerschmidt, R., Nuckles, E., KUC, J. Association of Enhanced Peroxidase Activity with Induced Systemic Resistance of Cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **20**: 73-80, 1982.
- Hanash, S. Disease proteomics. *Nature*, **422**: 226-232, 2003.
- Hancock, R.E.W., Diamond, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology*, **8**: 402-410, 2000.
- Hultmark, D. Drosophila immunity: paths and patterns. *Current Opinion Immunology*, **15**: 12-19, 2003.

- Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., PONT-LEZICA, R.F. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in Plant Science*, **11**, 2006.
- Jones, J.D.-G., Dangl, J.-L. The plant immune system. *Nature*, **444**, 2006.
- Karas, M., Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10 000 Daltons. *Analytical Chemistry*, **60**: 2299-3001, 1988.
- Klose, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, **26**: 231-243, 1975.
- Knight, S. C.; Anthony, V. M.; Brady, A. M.; Greenland, A. J.; Heaney, S. P.; Murray, D. C.; Powell, K. A.; Schulz, M. A.; Spinks, C. A.; Worthington, P. A.; Youle, D. Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annual Review Phytopathology*, **35**: 349-372, 1997.
- Koch, E., Meier, B.M., Eiben, H.G., Slusarenko, A. A Lipoxygenase from Leaves of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is Induced in Response to Plant Pathogenic Pseudomonads. *Plant Physiology*, **99**: 571-576, 1992.
- Kolomiets, M.V., Chen, H., Glandon, R.J., Braun, E.J., Hannapel, D.J. A Leaf Lipoxygenase of Potato Induced Specifically by Pathogen Infection. *Plant Physiology*, **124**: 1121-1130, 2000.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685, 1970.
- Lanças, F.M. The Role of the Sepation Sciences in the 21th Century. *Journal Brazilian Chemistry Society*, **14**: 183-197, 2003.
- León, J., Rojo, E., Sánchez-Serrano, J.J. Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 1-9, 2001.
- Lesley, S.A. High-Throughput Proteomics: Protein Expression and Purification in the Postgenomic World. *Protein Expression and Purification*, **22**: 159-164, 2001.
- Lever, M.A. New Reaction for Colorimetric Determination of Cabohydrates. *Analytical Biochemistry*, **47**: 273-279, 1972.
- Liavonchanka, A., Feussner, I. Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology*, **163**: 348-357, 2006.
- Lim, M.S., Elenitoba-Johnson, K.S.J. Proteomics in pathology research. *Laboratory Investigation*, **84**: 1227-1244, 2004.
- Liu, J.J., Ekramoddoullah, A.K.M., Yu, X. Differential Expression of Multiple PR10 Proteins in Western White Pine Following Wounding, Fungal Infection and Cold-Hardening. *Physiologia Plantarum*, **19**: 544-553, 2003.
- Mamone, G., Addeo, F., Chianese, L., Di Luccia, A., De Martino, A., Nappo, A., Formisano, A., De Vivo, P., Ferranti, P. Characterization of wheat gliadin protein by combined two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Proteomics*, **5**: 2859-2865, 2004.
- Miller, C.A., Meza, J.E., Perkins, P.D. Evaluation of Multidimensional Strategies for the Analysis of Complex Proteomics Samples. *Agilent Technologies presented at the 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 2004.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidantes and stress tolerance. *Trends in Plant in Science*, **9**: 405-410, 2002.
- Monti, M., Orrù, S., Pagnozzi, D., Pucci, P. Functional proteomics. *Clinica Chimica Acta*, **357**: 140-150, 2005.
- Moritz, R., Nagele, E., Vollmer, M., Horth, P. Off-line Multi Dimensional LC/MS as Effective and Flexible Tool for Proteomics Research. *Agilent Technologies presented at the 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 2003.

- Nagele, E., Vollmer, M., Horth, P., Vad, C. 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Expert Review Proteomics*, **1**: 37-46, 2004.
- Neverova, I., Van Eyk, J.E. Role of Chromatographic Techniques in Proteomic Analysis. *Journal of Chromatography B*, **815**: 51-63, 2005.
- O'Farrel, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **250**: 4007-4021, 1975.
- Ostberg, J.E., Attar, M.J., Mohamed-Ali, V., Conway, G.S. Adipokine dysregulation in turner syndrome: comparison of circulating interleukin-6 and leptin concentrations with measures of adiposity and C-reactive protein. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**: 2948-2953, 2005.
- Medina, M.L.; Haynes, P.A.; Breci, L.; Francisco, W.A. Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Proteomics*, **5**: 3153-3161, 2005.
- Pandey, A., Mann, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, **405**: 837-846, 2000.
- Park, O.K. Proteomics Studies in Plants. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **37**: 133-138, 2004.
- Pascholati, S.F., Nicholson, R.L., Butler, L.G. Phenylalanine ammonia-lyase Activity and Anthocyanin Accumulation in Wounded Maize Mesocotyls. *Journal of Phytopathology*, **115**: 165-172, 1986.
- Pascholati, S.F., Cavalcanti, L.S., Di Pietro, R.M., Resende, M.L.V., Romeiro, R.S. Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos. FEALQ, Piracicaba-SP, 263p., 2005.
- Reddy, K.V.R., Yedery, R.D., Aranha, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **24**: 536-547, 2004.
- Rizzardi, M.A., Fleck, N.G., Agostinetto, D., Balbinot, A.A. Ação de Herbicidas sobre Mecanismos de Defesa de Plantas aos Patógenos. *Ciência Rural Santa Maria*, **33**: 957-965, 2003.
- Rocha, T.L., Da Costa, P.H.A., Magalhães, J.C.C.; Evaristo, R.C.S., De Vasconcelos, E.A.S., Coutinho, M.V., Paes, N.S., Da Silva, M.C.M., Grossi-de-Sá, M.F. Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas. *Comunicado Técnico 136*, ISSN 9192-0099, 2005.
- Roepstorff, P., Fohlman, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*, **11**: 611, 1984.
- Romeiro, R. S. Indução de resistência em plantas e patógenos. 45p., 1999.
- Salekdeh, G.H., Siopongco, L.J., Wade, B., Ghareyazie, J., Bennett, J. A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. *Fields Crops Research*, **76**: 199-219, 2002.
- Silva, H.S.A., Romeiro, R.S., Macagnan, D. Halfeld-Vieira, B.A., Baracat Pereira, M.C., Mounteer, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, **29**: 288-295, 2004.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallis, A.K., Gartner, F.H., Provezano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. Measurement of protein using Bincinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, **150**: 76-86, 1985.
- Soares, A.M.S., Machado, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas*, **1**: 9, 2007.
- Souza, M.V., Fontes, W., Ricart, C.A.O. Análise de Proteomas: O despertar da era pós genômica. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, **2**: 12-14, 1999.
- Sticher, L., Mauch Mani, B., Metraux, J. P. Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **35**: 235-270, 1997.

- Straus, S.K., Hancock, R.E.W. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**: 1215–1223, 2006.
- Strupat, K., Karas, M., Hillenkamp, F. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionisation mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **111**: 89-102, 1991.
- Suresh, S., Mohan, S.S., Mohan, S.S., Mishra, G., Hanumanthu, G.R., Suresh, M., Reddy, R., Pandey, A. Proteomics resources: Integrating biomedical information in humans. *Gene*, **364**: 13-18, 2005.
- Taylor, C.B. Defense responses in plants and animals - more of the same. *Plant Cell*, **10**: 873-874, 1998.
- Tuzun, S. The Relationship Between Pathogen - Induced Systemic Resistance (ISR) and Multigenic (horizontal) Resistance in Plants. *European Journal of Plant Pathology*, **107**: 85-93, 2001.
- UNIPROT, site de endereço: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9SVQ0>, acessado dia 09/07/2008.
- Vallad, G.E., Goodman, R.M. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Science Society of America*, **44**: 1920-1934, 2004.
- van Loon, L.C. Induced Resistance in Plants and The Role of Pathogenesis-Related Proteins. *European Journal of Plant Pathology*, **103**: 753-765, 1997.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. Systemic Resistance Induced by Rhizosphere Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **36**: 453-483, 1998.
- van Loon, L.C., Van Strien, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**: 85-97, 1999.
- Westermeyer, R. Electrophoresis in practice: A guide to methods and applications of DNA and proteins separations. 349p., 2001.
- Westermeyer, R., Naven, T. Proteomics in Practice : A Laboratory Manual of Proteomic Analysis. 317p., 2002.
- Wilkins, M. R., Sanches, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L. Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by Genome Should be Identified and How to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **13**: 19-50, 1995.
- Wu, A.T., Bradford, K.J. Class I Chitinase and β -1,3-Glucanase Are Differentially Regulated by Wounding, Methyl Jasmonate, Ethylene, and Gibberellin in Tomato Seeds and Leaves. *Plant Physiology*, **133**: 263-273, 2003.
- Yamagata, A., Kristensen, D.B., Takeda, Y., Miyamoto, Y., Okada, K., Inamatsu, M., Yoshizato, K. Mapping of phosphorylated proteins on two-dimensional polyacrylamide gels using protein phosphates. *Proteomics*, **2**: 1267-1276, 2002.
- Ye, X.S., PAN, S.Q., KUC, J. Association of Pathogenesis-Related Proteins and Activities of Peroxidase, β -1,3-glucanase and Chitinase with Systemic Induced Resistance to Blue Mould of Tobacco but not to Systemic Tobacco Mosaic Virus. *Physiology Molecular Plant Pathology*, **36**: 523-531, 1990.
- Zaslloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **415**: 389-395, 2002.