

ANÁLISE PROTEÔMICA DO ESTRESSE HÍDRICO EM CAFEIEIRO

Humberto J.O. RAMOS¹, E-mail: humramos@iapar.br; Daniela F.S. CHAVES²; Luiz F.P. PEREIRA³; Leonardo M. CRUZ²; Maria H. FUNGARO⁴; Mariângela HUNGRIA⁵; Clarice OSAKU⁶; Maria L. PETZL-ERLER⁷; Ricardo A. AYUB⁸; Rosane M. PERALTA⁹; Celso J. MARURI; Emanuel M. SOUZA²; Luiz G. E. VIEIRA; Fábio O. PEDROSA²; REDE PROTEOPAR

¹IAPAR, Laboratório de Biotecnologia, Londrina-PR; ²UFPR, Dep. Bioquímica e Biologia Molecular, Curitiba-PR ³EMBRAPA-Café, Laboratório de Biotecnologia, Londrina-PR; ⁴UEL, Londrina-PR; ⁵EMBRAPA-Soja, Londrina-PR; ⁶UNIOESTE, Cascavel-PR; ⁷UFPR, Dep. Genética, Curitiba-PR; ⁸UEPG, Ponta Grossa-PR; UEM⁹, Maringá-PR; * <http://proteopar.genopar.org>

Resumo:

Déficit hídrico é um dos fatores ambientais mais importantes para a diminuição da produtividade do cafeeiro, tanto no Brasil quanto em outros países produtores. O estabelecimento de estratégias para obtenção de cultivares tolerantes ao estresse hídrico depende da compreensão das respostas biológicas ao nível genético, molecular e bioquímico. Para estudar a resposta ao estresse hídrico no gênero *Coffea*, foi estabelecida uma rede de pesquisa em proteômica (PROTEOPAR – Programa Proteoma do Paraná) constituída de oito laboratórios. Quatro genótipos de *Coffea*, com diferentes respostas fisiológicas à seca, foram analisados: *C. canephora* (Clone 14, tolerante e Clone 109A, sensível) e *C. arabica* (BA10, tolerante e Geisha, sensível). Proteínas foram extraídas de folhas e raízes de plantas (18 meses de idade) mantidas em casa-de-vegetação, utilizando-se o método de SDS-Fenol modificado. Os regimes hídricos constituíram-se dos seguintes tratamentos: controle irrigado, estresse hídrico severo (-4,0 MPa de potencial de água) e recuperação pós-estresse (36 horas após irrigação). Os extratos protéicos foram distribuídos aos laboratórios do PROTEOPAR para obtenção e análise do padrão de expressão protéica diferencial via eletroforese bidimensional. O método de identificação de proteínas PMF (“*Peptide mass fingerprinting*”) foi aplicado utilizando-se um espectrômetro de massa (MS) do tipo MALDI-TOF e comparando os espectros de digestão triptica contra bancos de dados baseados em ESTs de *Coffea*.

Palavras-chave: *Coffea*, seca, proteoma, PROTEOPAR

COMPARATIVE PROTEOMIC ANALYSIS OF DROUGHT STRESS RESPONSE IN *Coffea*

Abstract: Water deficit is an important environmental factor that decreases the productivity of coffee in Brazil and several other producing countries. Knowledge on coffee drought tolerance at the molecular, biochemical and genetic levels may permit to design strategies for the development of tolerant cultivars. To study drought stress response in *Coffea*, a proteomic research network (PROTEOPAR -Paraná Proteome Program) constituted of eight laboratories was established. Four *Coffea* genotypes with differential physiological response to drought were used: *C. canephora* (Clone 14, drought-tolerant and Clone 109A, drought-sensitive) and *C. arabica* (BA10, drought-tolerant and Geisha, drought-sensitive). Proteins were extracted from leaves and roots of eighteen-month old greenhouse grown plants using a modified SDS-Phenol method. The treatments were: unstressed, submitted to a severe water deficit (-4.0 MPa water pressure potential) and recovered (36 hours after water stress). The protein extracts were distributed to the laboratories of the PROTEOPAR for comparative 2D analyses to identify protein spots differently expressed. Peptide mass fingerprint (PMF) was used for the identification of these proteins using MALDI-TOF mass spectrometry (MS) of tryptic peptides and comparisons with EST-based coffee database.

Key words: *Coffea*, drought stress, proteome, PROTEOPAR

Introdução

Estresses abióticos, tais como seca, salinidade, metais pesados, baixas e altas temperaturas causam grandes perdas na agricultura, o que tem levado ao desenvolvimento de estratégias de melhoramento visando tolerância a esses fatores. A falta de protocolos eficientes de seleção e o conhecimento incompleto das bases fisiológicas, moleculares e genéticas das respostas das plantas ao déficit hídrico têm limitado o progresso do melhoramento vegetal (Boyer, 1982; Epstein e Rains, 1987). A aplicação de ferramentas de genômica funcional possibilita um maior entendimento das bases genéticas e metabólicas da resposta das plantas de café ao estresse hídrico. Assim, a disponibilidade de dados gerados pelo projeto “Genoma Café” (Vieira et al., 2006), que consistiu do seqüenciamento em larga escala de genes expressos (ESTs), facilita o estudo do proteoma em relação à resposta a seca, assim como outros estresses bióticos e abióticos.

A Proteômica tem como objetivo estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e mecanismos regulatórios (Blackstock & Weir, 1999). O estudo da expressão protéica global (*Expression proteomics*) é a abordagem proteômica mais comumente aplicada e envolve a criação de mapas quantitativos das proteínas expressas de extratos de células ou tecidos. Estes perfis protéicos, constituindo os proteomas expressos sob diferentes condições fisiológicas, são então comparados. Desta forma a análise proteômica comparativa de cultivares/variedades de cafeeiro em diferentes níveis de estresse, tanto para materiais suscetíveis como tolerantes ao estresse hídrico, viria também complementar e adicionar aos estudos do genoma.

Uma rede de pesquisa de oito laboratórios, pertencentes a instituições de ensino e pesquisa do estado do Paraná, foi formada visando estruturação e criação de competência em proteômica para inicialmente aplicá-la na caracterização e identificação de genes envolvidos na resistência ao estresse hídrico de *Coffea spp*, os quais poderão ser utilizados na obtenção de novas variedades, contribuindo com avanços no melhoramento genético do cafeeiro.

Material e Métodos

Ensaio de estresse hídrico em casa-de-vegetação

Para avaliação das alterações no proteoma de plantas de café sob condições de estresse hídrico foram utilizados cultivares/clones contrastantes de duas espécies de *Coffea*: *C. canephora*, clones 14 (tolerante) e 109A (sensível) e *C. arabica*, variedades BA10 (tolerante) e Geisha (sensível), fornecidos respectivamente pelo INCAPER, ES e pelo IAC, SP. Estes genótipos mostram diferenças marcantes quanto a alguns parâmetros de relações hídricas (DaMatta et al., 2003, Pinheiro et al., 2005; Queiroz-Voltan et al., 2005; Carelli et al., 2005). Plantas de 18 meses crescidas em vasos de 18 litros foram utilizadas para os ensaios em casa de vegetação. O solo foi mantido na capacidade de campo durante dois dias, quando as folhas e raízes de plantas de cada variedade foram coletadas, correspondendo ao tratamento controle irrigado. Os demais vasos foram submetidos ao estresse hídrico por meio da interrupção da irrigação, com o monitoramento da água do solo feito com o auxílio de sondas TDR (Time Domain Reflectometry). O estado da água nas folhas foi avaliado por meio da determinação da potencial de pressão (ψ) utilizando-se uma Câmara de Scholander. Folhas e raízes de uma planta de cada genótipo, apresentando potencial de água na folha entre -2.0 e 2.5 MPa (estresse hídrico severo) e entre -4.0 e 4.4 MPa (estresse hídrico severo), foram coletadas, imersas imediatamente em N líquido e mantidas em freezer -80°C. Outras plantas submetidas ao mesmo nível de estresse foram irrigadas à capacidade de campo, sendo suas raízes e folhas coletadas após 36 horas, correspondendo ao tratamento recuperação pós-estresse. Logo após a coleta do material em cada tratamento, as taxas de fotossíntese líquida ($\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) foram obtidas utilizando um sistema portátil de análise fotossintética, modelo LI-6200 (LI-COR).

Obtenção de extratos protéicos de folha e raiz

Proteínas totais de folhas e raízes de plantas de café foram extraídas utilizando-se um método de Fenol/SDS (Wang et al., 2003) modificado. Todas as etapas de lavagens e centrifugações foram realizadas em tubos de centrífuga de 50 mL. As folhas e raízes armazenadas em freezer -80°C foram maceradas em N líquido. Aproximadamente 10 mL do macerado foram transferidos para tubos de centrífuga de 50 mL e em seguida foram adicionados 20 mL de uma de acetona gelada contendo 1% de PVPP, 2% de β -mercaptoetanol e 1mM de PMSF. O material vegetal foi homogeneizado em vórtex por 30 s e mantido em gelo por 30 min. As amostras foram sonicadas, com os tubos mantidos em gelo, por 3 ciclos de 25s (40% de amplitude máxima) com intervalos de 1 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 20 min a 4°C e o sobrenadante descartado. O pelet foi resuspendido em 20 mL acetona gelada e centrifugado a 12.000 x g por 4°C por 5 min. Em seguida, o pelet foi lavado por 3-4 ciclos de ressuspensão e centrifugação nas mesmas condições acima, inicialmente com 20 mL de TCA 10% em acetona gelada até o sobrenadante ficar incolor e depois com TCA 10% em água. Finalmente, o pelet foi lavado com acetona 80% por dois ciclos e com etanol 70% por um ciclo de ressuspensão e centrifugação, seco a 30°C e armazenado em freezer -80°C. Aliquotas de 5-10 mL do pelet foram macerados e ressuspendidos em 10-20 mL de tampão de SDS (30% de sacarose, 2% de β -mercaptoetanol, 1mM de PMSF e Tris-HCl 0.1M, pH 8.0). Em seguida, foram adicionados 8-12 mL de fenol equilibrado pH 8.0 e a mistura foi homogeneizada em vórtex por 3 ciclos de 30s e mantidos em gelo por 10 min. A mistura foi centrifugada por 10000xg por 5 min a 4°C e a fase fenólica foi coletada, evitando tocar a interface contendo o SDS precipitado, e transferida para um tubo novo. A solução fenólica foi novamente centrifugada e transferida para um novo tubo para total remoção da fase aquosa contendo SDS. As proteínas foram precipitadas pela adição de 4 volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol, em freezer -20°C por 30 min, seguida de centrifugação a 12.000 x g por 20 min a 4°C. O pelet foi lavado por 3 ciclos de ressuspensão e centrifugação a 12 por 5 min, com acetona 80% gelada e 1 ciclo com etanol 70%. O pelet foi seco à temperatura ambiente e estocado em freezer -80 °C.

Os materiais coletados originaram-se de quatro variedades (duas espécies), dois tecidos (raiz e folha) e três regimes hídricos (Irigado, Estressado e Recuperado), totalizando 24 tratamentos, cujos extratos protéicos foram solubilizados em tampão TS (7 mol/L uréia, 2 mol/L tiouréia, 1.0 % CHAPS, 0,5%). Aliquotas contendo 500 μg /tubo foram distribuídas para os laboratórios da rede PROTEOPAR para a obtenção das análises proteômicas comparativas.

Eletroforese Bidimensional – 2DE

As análises proteômicas da rede foram padronizadas pela utilização dos mesmos equipamentos e protocolos para obtenção dos géis 2D e para análise dos padrões de expressão protéica. A isoeletrofocalização das proteínas foi realizada em equipamento IPGphor II (GE Healthcare), utilizando-se inicialmente as tiras IPG (gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida) de pH 3-10 e pH 4-7 de 13 cm. As amostras foram aplicadas nas tiras IPG (preparativa: 500 a 1000 μg /tira) simultaneamente a hidratação, no equipamento “reswelling tray” a 20°C durante 12 h. Em seguida, as proteínas foram focalizadas via “manifold” com as seguintes etapas e parâmetros elétricos: 1) 200 Vhr em passo único de 200 volts; 2) 500 Vhr em passo único de 500 volts; 3) 800 Vhr em gradiente até 1000 volts; 4) 11300 Vhr em gradiente até 8000 volts; 5) 12000 Vhr em passo único de 800 volts.

Após a isoeletrofocalização, as tiras foram equilibradas em duas etapas de 40 min: em tampão de equilíbrio (200 mg de DTT e 400mg de iodoacetamida) e submersas por alguns segundos em tampão de corrida (Laemmli, 1970) e

imediatamente submetidas à segunda dimensão: SDS-PAGE, 12,5% de poliacrilamida, em cuba tipo “Hoefler SE 600 Ruby” (GE Healthcare). Parâmetros elétricos da corrida: 15 mA/gel por 45 min, seguido de 30 mA/gel, a 12°C.

Análise dos géis e identificação de proteínas por espectrometria de massas (MS)

Os géis bidimensionais preparativos foram corados com Coomassie Blue G-250 e R-350 e as imagens foram digitalizadas no UMAX ImageScanner. Em seguida os géis foram armazenados em ácido acético 5%, a 8°C. As análises das imagens foram realizadas no programa Imagemaster 2D Platinum 6.0. As análises foram feitas em triplicata e os spots que tiveram sua expressão alterada em resposta ao tratamento foram selecionados, retirados manualmente, descorados, desidratados e enviados para o Laboratório de Proteômica do núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio da UFPR (Nfix) para análise por espectrometria de massa do tipo MALDI-ToF, conforme o protocolo modificado por Chaves (2004). Os fragmentos de digestão triptica foram utilizados inicialmente para a identificação das proteínas por PMF (“peptide mass fingerprinting”), utilizando-se o programa MS-Fit do pacote ProteinProspector v3.2.1 rodando em plataforma local. Foi criado um banco de dados com a ferramenta FA-Index, específico para a espécie de *C. canephora* a partir de dados do HarvEST Coffea (<http://harvest.ucr.edu/>), baseados em ESTs. Serão utilizados os valores das massas tripticas obtidas pelas análises espectrométricas em MALDI-ToF (tolerância de massa de 100-200ppm) e os valores de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM), calculados pelo programa Imagemaster (Mooney et al., 2004; Hajduch et al., 2005).

Resultados e Discussão

As extrações de proteínas foram realizadas de modo a padronizar as condições da eletroforese bidimensional e obter quantidades suficientes para distribuição aos laboratórios da rede PROTEOPAR. Foram obtidos rendimentos de proteínas por mL de raízes e folhas maceradas, respectivamente, de 0,4 a 0,6 mg e 3,0 a 5,0 mg. Além de obter bons rendimentos, as amostras extraídas pelo o método de SDS/Fenol modificado apresentaram excelentes performances eletroforéticas (Figura 1A e 1 B), não apresentando problemas de condutividade elétrica ou arrastes horizontais, o que permitiu que os laboratórios da rede obtivessem géis com boa reprodutibilidade (Figura 1C e 1D). Isto pode ser comprovado pela similaridade dos perfis de proteínas, de uma mesma amostra de folha detectadas no gel 2D, obtidos por diferentes laboratórios da rede (Figura 1A, grupo IAPAR e Figura 1B, grupo UEPG). Foram observados também elevado número de spots, mesmo detectados com Coomassie R-350 (Figura 1). Este fato é muito importante para a integração das análises entre os diferentes tratamentos pelos diferentes grupos da rede PROTEOPAR, via a web page <http://proteopar.genopar.org>. Como a grande maioria das proteínas extraídas de folhas de café está concentrada próximo a região de pH neutro (Figura 1), as amostras foram focalizadas também com tiras de pH 4-7 (Figura 3). O volume das amostras de raízes, calculado para 500ug/tira e aplicadas nas tiras de IPG, foi dobrado para alcançar um elevado número de spots (Figura 4), provavelmente em função da existência de interferentes ao ensaio de quantificação de proteínas dos extratos de raízes.

Até presente momento já foram obtidos pelos laboratórios da rede PROTEOPAR cerca de 48 géis 2D (pH 3-10) e 12 géis (pH 4-7) de boa qualidade, permitindo o início das análises comparativas da expressão protéica entre os diversos tratamentos (Figura 3). Respostas diferenciais têm sido observadas entre as cultivares analisadas tanto em termos de expressão constitutiva (Figuras 3 e 4), quanto em termos de indução e repressão da expressão protéica pelo estresse hídrico e recuperação (Figura 2). Cerca de 100 spots diferencialmente expressos já foram analisados por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF e os espectros de massa triptica obtidos (Figura 5) estão sendo utilizados para a identificação das proteínas por “peptide mass fingerprinting” (PMF), comparando-se as massas obtidas experimentalmente (Figura 5B) com as massas geradas in silico pelo programa Ms-Fit, do pacote ProteinProspector. Inicialmente foi criado um banco de dados específico para a espécie *Coffea canephora*, baixando-se as seqüências de Unigenes pelo Programa HarvEST. O projeto pretende utilizar também os dados do Projeto Genoma Café, criando um banco específico para as espécies de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*. O programa MS-Fit foi rodado em plataforma local e utilizando-se do banco gerado para as identificações por PMF. Estão sendo considerados como identificações positivas, pesquisas nos bancos que apresentem MOWSE Score superior a 103, com no mínimo 3 massas idênticas (+/- 200ppm) e acima de 25 % de cobertura da proteína do banco (Figura 5). Os *contigs* candidatos que obedeçam estes critérios são submetidos ao Blastx (NCBI) para identificação das proteínas e cálculo do pI (ponto isoelétrico) e MW (massa molecular) pelo programa ExPASy, os quais são comparados com os pI e MW determinados experimentalmente nos géis 2D, para confirmação da identificação. Com a aplicação desta metodologia tem sido possível identificar várias proteínas (dados não mostrados). Em etapa subsequente do projeto PROTEOPAR, as proteínas diferentemente expressas em resposta ao estresse hídrico em cafeeiro que não tenham sido eficientemente identificadas por MALDI-TOF-MS serão analisados por seqüenciamento de peptídeos por espectrometria do tipo Q-tof MS/MS e identificação contra bancos de dados públicos externos e do Projeto Genoma Café.

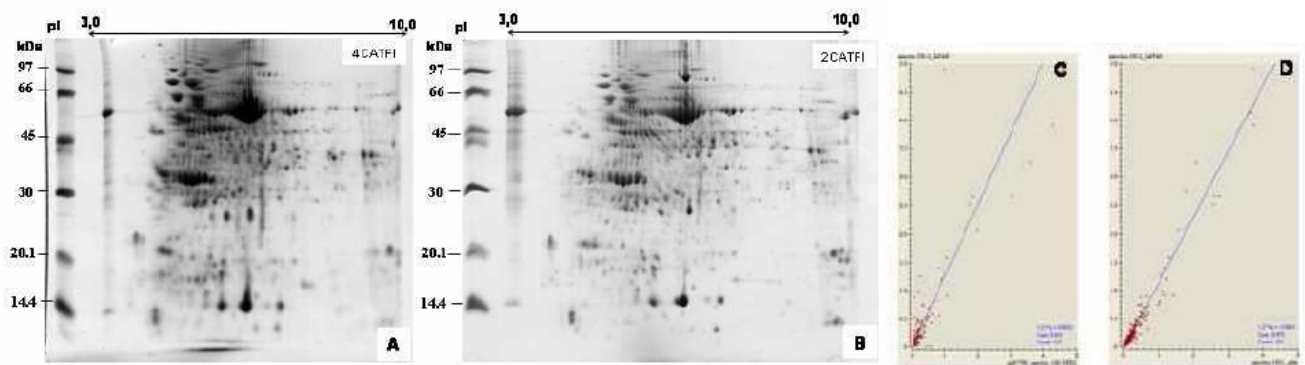


Figura 1– Eletroforese bidimensional 2D de amostras de folha de *C. arabica* variedade tolerante BA10, extraídas de plantas irrigadas e analisadas pelos laboratórios do IAPAR (A) e da UEPG (B). Em (C) o scatter plot do volume percentual (%Vol) dos spots detectados no gel dos grupos IAPAR X UEPG e em (D) dos spots detectados por duas repetições do grupo IAPAR. 4CATFI: grupo 4 (IAPAR), *C. arabica*, Tolerante, Folha, Irrigado e 2CATFI: grupo 2 (UEPG), *C. arabica*, Tolerante, Folha, Irrigado.

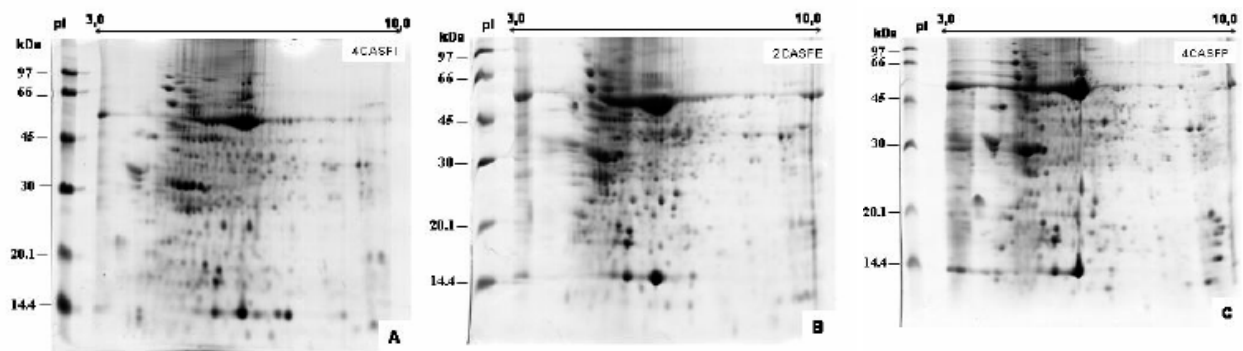


Figura 2– Padrão de expressão protéica de folhas de *C. arabica* variedade sensível Geisha em resposta ao estresse hídrico e recuperação. Em (A) tratamento controle Irrigado, 4CASFI: grupo 4 (IAPAR), *C. arabica*, cv. Sensível, Folha, Irrigado; em (B) tratamento estressado, 2CASFE: grupo 2 (UEPG), *C. arabica*, cv. Tolerante, Folha, Estressado. Em (C) tratamento recuperação pósstresse, 4CASFP: grupo 4 (IAPAR), *C. arabica*, cv. Sensível, Folha, Recuperado.

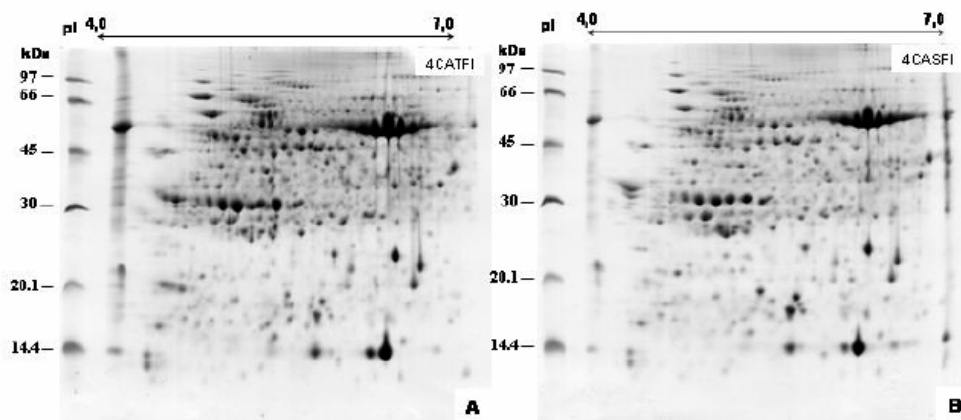


Figura 3– Géis 2D de referência do padrão de expressão protéica de folhas de *C. arabica* cv. tolerante BA10 e cv. sensível Geisha, em condições de irrigação. Em (A) 4CATFI: grupo 4 (IAPAR), *C. arabica*, cv. Tolerante BA10, Folha, Irrigado; em (B) 4CASFI: grupo 4 (IAPAR), *C. arabica*, cv. sensível Geisha, Folha, Irrigado. SDS-PAGE, 11,0%, corado com Coomassie R-250.

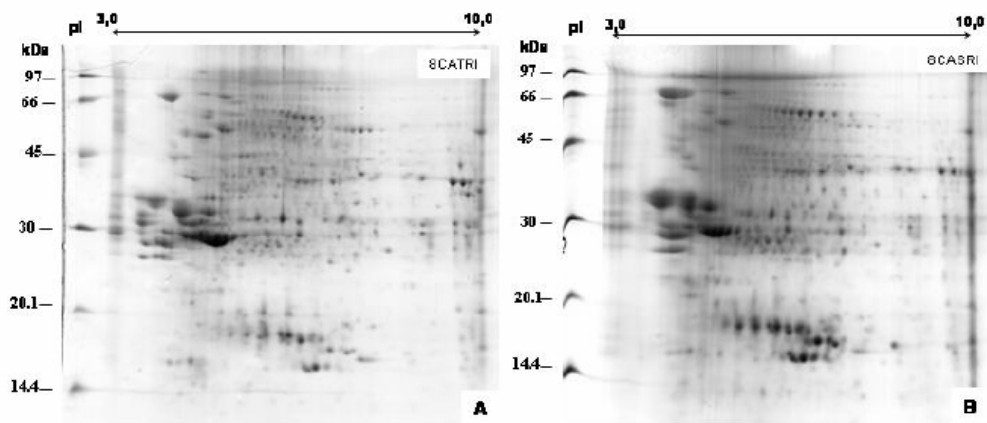


Figura 4– Géis 2D de referência do padrão de expressão protéica de raízes de *C. arabica* variedade sensível Geisha e variedade resistente BA10, em condições de irrigação. Em (A) 8CATRI: grupo 8 (UNIO), *C. arabica*, var. Resistente BA, Raiz, Irrigado; em (B)

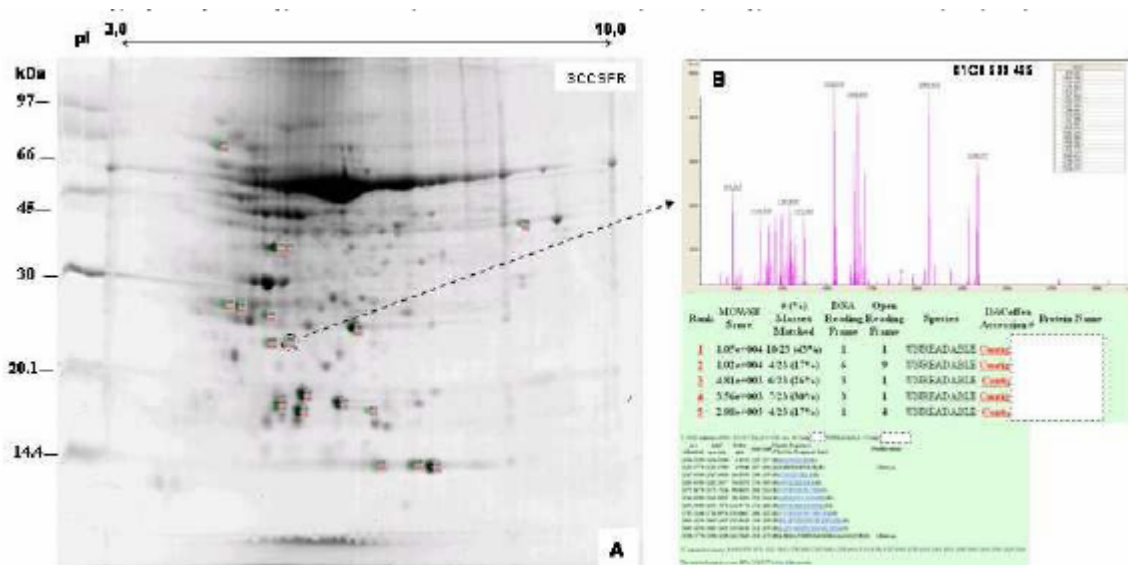


Figura 5– Identificação de uma proteína de folha de *C. canephora*, cv. sensível 109A, por espectrometria de massa MALDI-TOF. Em (A) o spot indicado foi retirado do gel 2D. Em (B) O resultado da análise utilizando o espectro de massa tríptica obtida (PMF) contra um banco de dados de *C. canephora*, utilizando-se do programa MS-Fit.

Referências Bibliográficas

Blackstock, W.P.; Weir, M.P. **Reviews: TIB TECH.**, v.17, p.121-127, 1999.

Boyer, J.S. Plant productivity and environment. **Science**, v.218, p.443-448, 1982.

Chaves, D. F. S. Tese de Mestrado, UFPR, 2004.

DaMatta F. M., Chaves A. R. M., Pinheiro, H. A., Ducatti, C., Loureiro, M. E. **Plant Science** 64 (1): 111-117, 2003.

Epstein, E.; Rains, D.W. **Plant and Soil**, v.99, p.17-29, 1987.

Hajdusch, M.; Ganapathy, A; W. Stein, J. W.; Thelen, J.J. **Plant Physiology**, V. 137: 1397-1419, 2005.

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

Mooney, B. P.; Thelen, J. J. **Phytochemistry** 65:1733-1744, 2004.

Pinheiro, H. A.; DaMatta, F. M.; Chaves, A. R. de M.; Loureiro, M. E.; Ducatti, C. **Annals of Botany**, v.96,1:101-108, (2005).

Vieira, L. G. E. e consórcio Genoma Café. **Braz. J. Plant Physiol.**, 18(1):95-108, 2006.

Wang , W.; Scali , M.; Vignani, R.; Spadafora, A.; Sensi , E.; Mazzuca, S.; Cresti, M. **Electrophoresis**, Vol. 24, 14: 23692375, 2003.

Apoio Financeiro: FINEP/MCT and Fundação Araucária