

Proteômica comparativa aplicada à cultura de tecidos de plantas.

Dias, Leonardo L. C.¹; Floh, Eny I. S.¹; Santa-Catarina, Claudete¹; Silveira, Vanildo².

¹Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL), Departamento de Botânica, Instituto de Biociências/USP. São Paulo-SP; ²Laboratório de Biotecnologia (LBT), Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Avenida Alberto Lamego, 2000. Parque Califórnia. CEP 28013-602. Campos dos Goytacazes-RJ. E-mail: vanildo@uenf.br.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas os códigos genéticos de diversos organismos foram completamente seqüenciados, representando um importante avanço do conhecimento na área genômica. No contexto das “ômicas” grande ênfase tem-se dado para a genômica funcional, que visa a identificação da seqüência e função dos genes e proteínas através de estudos do transcriptoma e proteoma dos organismos vivos (Figura 1).

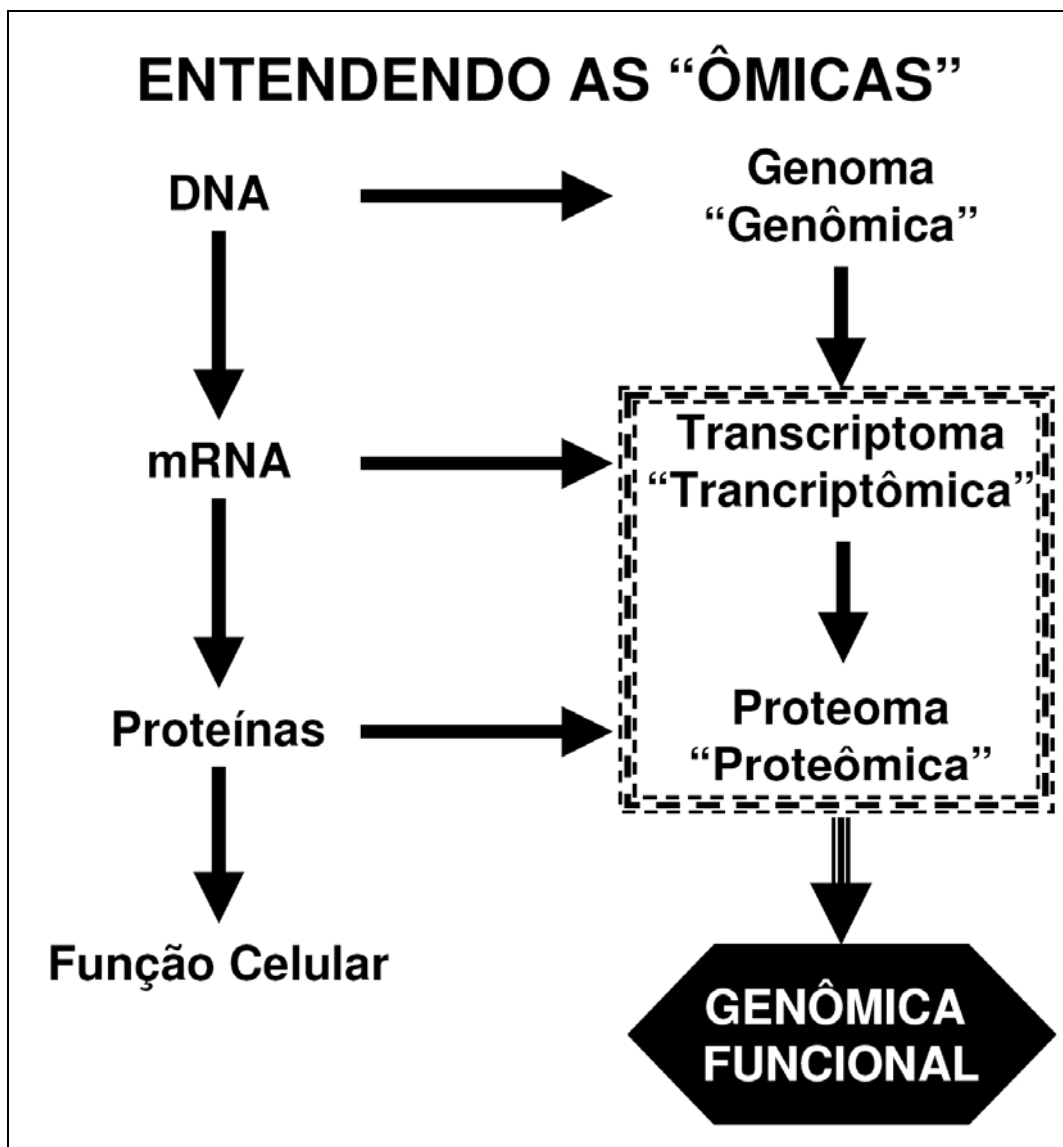


Figura 1. Organograma dos estudos das “ÔMICAS” nos organismos vivos. A genômica funcional refere-se aos estudos do transcriptoma e proteoma.

Embora a proteômica tenha ganhado destaque nos últimos anos, o termo Proteoma é relativamente novo e refere-se ao conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo num dado momento ou condição (Wasinger et al., 1995). Neste contexto, a proteômica é a ciência que estuda sistematicamente um proteoma (Park, 2004), permitindo avaliações quantitativas e qualitativas de proteínas que atuam no metabolismo celular (Chen & Harmon, 2006). Conseqüentemente, a identificação de proteínas expressas diferencialmente permite a associação destes polipeptídeos com diferentes eventos fisiológicos que ocorrem nas células, tecidos e órgãos (Korkumat et al., 2006).

A proteômica possui diversas aplicações como: 1) estudo da expressão diferencial de proteínas, que pode fornecer importantes informações sobre a sinalização celular e desenvolvimento dos organismos; 2) estudo de modificações pós-traducionais; 3) estudos de interação proteínas-proteínas e suas possíveis aplicações no desenvolvimento de mecanismos de defesa; 4) estudo da proteômica estrutural que visa o estudo da composição protéica de organelas e membranas; 5) estudo da função das proteínas através da proteômica funcional e; 6) proteômica computacional, que visa estudos de modelagem e dinâmica das proteínas (Figura 2).

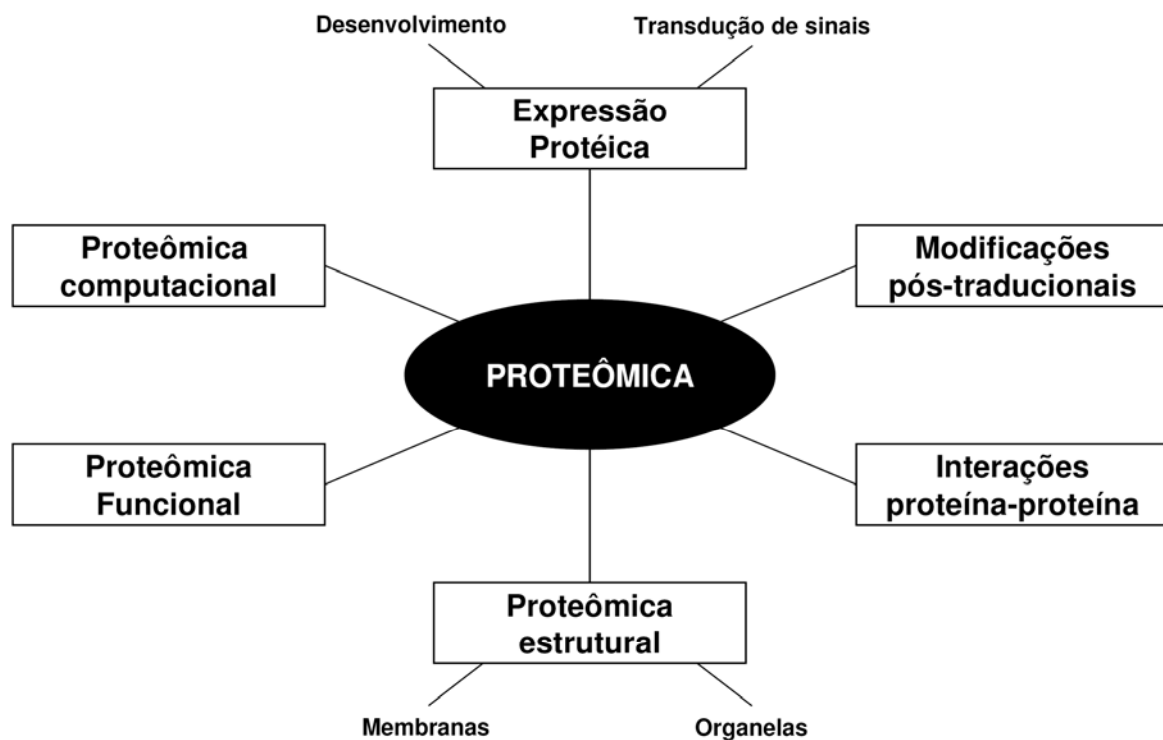


Figura 2. Tipos e aplicações de estudos em proteômica em diferentes sistemas biológicos.

A dinâmica de proteínas em um sistema vivo é influenciada por diversos fatores internos e externos que determinam modificações estruturais e a conformação das proteínas. Neste sentido, o estudo e caracterização de mapas proteômicos apresentam-se como uma importante ferramenta complementar aos estudos de genômica. A análise proteômica oferece a oportunidade de examinar simultaneamente alterações e classificar padrões temporais de acúmulo de proteínas que ocorrem durante o desenvolvimento da semente, possibilitando a identificação de proteínas marcadoras estágio específicas (Dias et al., 2007; Silveira et al., 2007). Nos últimos anos vários estudos têm focado a caracterização da dinâmica de proteínas ao longo do desenvolvimento vegetal, associada à caracterização do genoma e transcriptoma (Roberts, 2002; Heazlewood & Millar, 2003; Chen & Harmon, 2006; Rossignol et al., 2006).

Avaliações da expressão gênica em nível do transcriptoma fornecem informações importantes sobre carga genética transcrita de um organismo em um determinado estado, entretanto, ela não reflete diretamente a expressão das proteínas deste organismo (Chen & Harmon, 2006). Vários mecanismos estão envolvidos no controle da síntese protéica, mecanismos estes que atuam desde a transcrição do gene até a obtenção da proteína na forma ativa (Figura 3). Durante a síntese protéica podem ocorrer modificações pós-transcricionais e pós-traducionais alterando conformação espacial de proteínas e gerar diferentes classes protéicas, as quais bioquimicamente e estruturalmente que podem desempenhar diferentes funções nas vias metabólicas e na composição do proteoma do organismo.

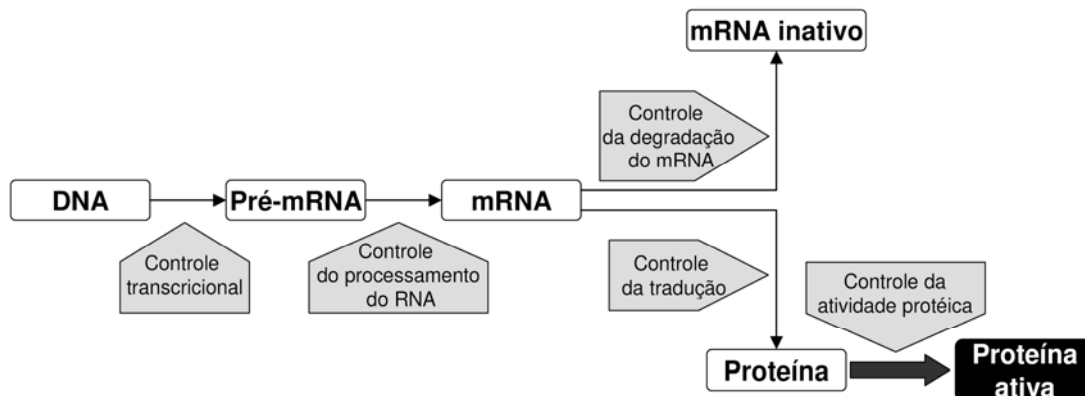


Figura 3. Mecanismos de controle que atuam na síntese protéica. Estes mecanismos fazem com que um único gene dê origem a múltiplas proteínas com conformações e funções distintas.

PROTEÔMICA EM PLANTAS

Os estudos proteômicos em plantas foram iniciados com milho (Touzet et al., 1996) e *Arabidopsis thaliana* (Shanoun et al., 2000). De acordo com os trabalhos iniciais, as análises proteômicas em plantas foram divididas em duas categorias: 1) estudo do proteoma específico de determinados órgãos ou tecidos e conseqüente elaboração de mapas proteômicos de referência e; 2) análise proteômica comparativa de diferentes proteomas (Rose et al., 2004). Este último ainda pode ser dividido de acordo com o objetivo do estudo em: 1) avaliação entre diferentes genótipos; 2) avaliação da influência da aplicação de sinais no metabolismo vegetal, como por exemplo a adição ou supressão de reguladores de crescimento e; 3) comparação entre diferentes tecidos e/ou estádios de desenvolvimento vegetal.

Atualmente, uma das maiores dificuldades da proteômica vegetal é a capacidade de identificação de proteínas de espécies, cujos genomas ainda não foram seqüenciados. A identificação e caracterização de proteínas são aceleradas pela disponibilidade de seqüências genômicas e de seqüências expressas (EST, Expressed Sequence Tags). Para contornar os problemas de falta de seqüências genômicas, duas são as alternativas possíveis: 1) através de seqüências ESTs disponíveis, as proteínas podem ser identificadas por seqüências de peptídeos obtidas por MS/MS, mas é altamente dependente do tamanho e qualidade dos bancos de dados de ESTs e; 2) outro caminho seria realizar buscas baseadas na homologia com proteínas de outras espécies vegetais, preferencialmente usando-se seqüências obtidas de MS/MS ou seqüenciamento de Edman.

Em geral, a maioria absoluta dos trabalhos em proteômica comparativa em plantas utilizam a interface que consiste principalmente na separação das proteínas através de eletroforese bidimensional (2-DE) em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) com posterior identificação da proteína por espectrometria de massas (MS/MS)(Figura 4).

A 2-DE é um poderoso e amplo método de análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos e outros materiais biológicos. A 2-DE separa as proteínas em dimensões distintas, em que na primeira dimensão as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoelétricos (pI) e na segunda dimensão estas são separadas de acordo com suas massas moleculares. Mesmo com as limitações inerentes da técnica, em estudos de proteômica comparativa em que o objetivo é identificar diferenças quantitativas e qualitativas entre amostras de proteínas, a 2-DE é normalmente o método de escolha, e gera dados em um formato que possibilita uma fácil avaliação visual e fornece comparação físico-químicos e quantitativos (Cánovas et al., 2004).

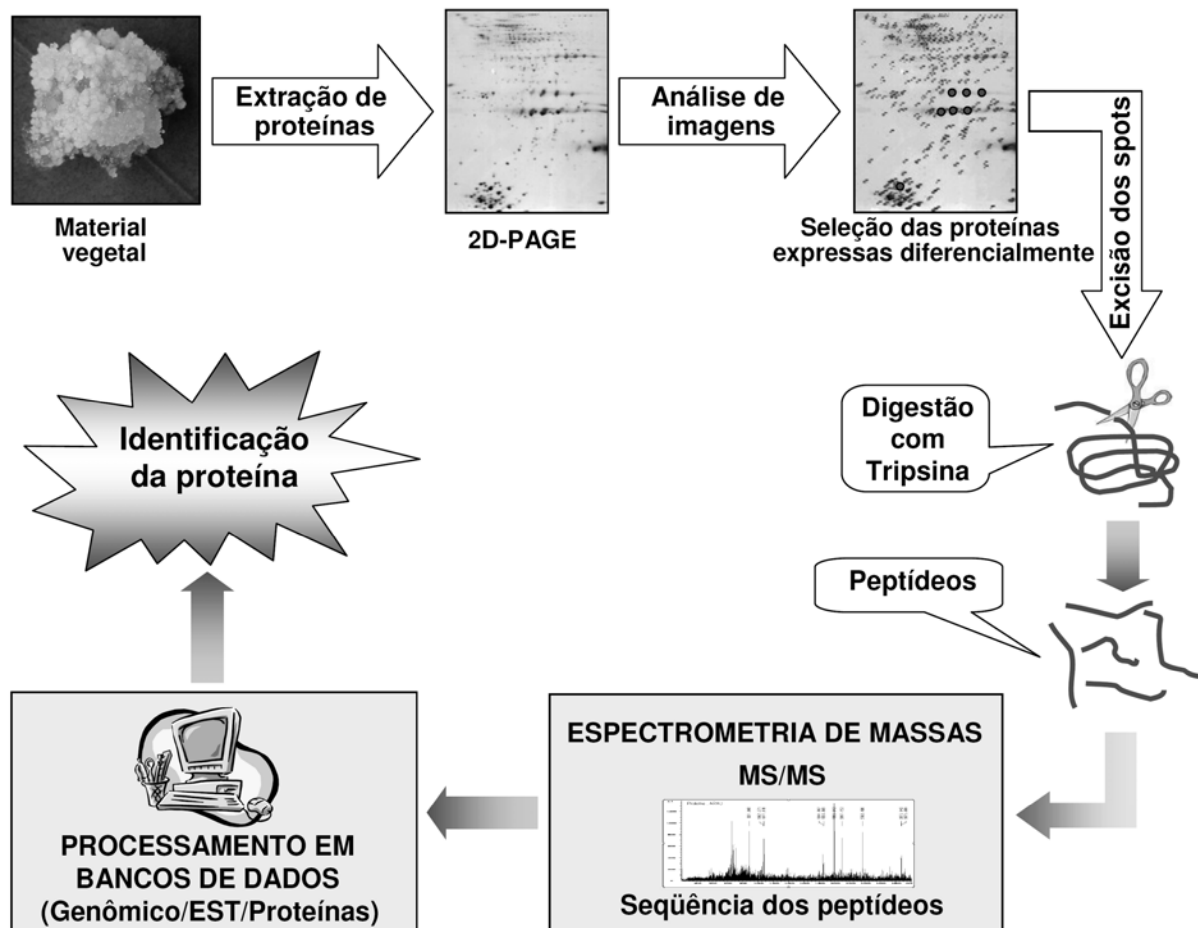


Figura 4. Etapas da análise proteômica em plantas, usando a interface eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e espectrometria de massas MS/MS.

Atualmente a 2-DE tem sido amplamente utilizada em resultado de inúmeros avanços nas metodologias. O uso de gradientes imobilizados de pH (IPG) na isofocalização e a otimização no processo de aplicação das amostras têm permitido a utilização de quantidades cada vez menores de proteínas (Cánovas et al., 2004).

Em plantas o preparo da amostra também merece preocupação e trata-se de uma etapa crítica e absolutamente essencial para a obtenção de bons resultados. Neste sentido, especial atenção deve ser destinada ao preparo inicial da amostra, em que diferentes métodos de extração podem ser testados e utilizados para isolar e fracionar as proteínas dos materiais vegetais (Carpentier et al., 2005; Natarajan et al., 2005)

Os tecidos vegetais possuem grande quantidade de água e baixa relação proteína/matéria fresca, além de possuir substâncias que interferem na análise protéica,

como compostos fenólicos, enzimas proteolíticas e oxidativas, terpenóides, pigmentos, ácidos orgânicos, íons inibitórios e carboidratos. Após a extração, geralmente as proteínas são precipitadas em soluções salinas, tamponantes e/ou solventes orgânicos, visando a eliminação da maioria dos interferentes (Carpentier et al., 2005).

A seleção da solução extratora ideal, aquela que solubiliza a maior quantidade de proteínas, depende de cada espécie, tecido e das proteínas de interesse. As diferentes soluções extratoras possuem afinidades com classes específicas de proteínas, o que permite uma extração diferencial de acordo com o método utilizado (Carpentier et al., 2005). Os métodos mais utilizados para extração de proteínas totais em células e tecidos vegetais utilizam soluções caotrópicas, geralmente a base de uréia e tiouréia ou diretamente com ácido tricloroacético (TCA)/Acetona (Carpentier et al., 2005; Natarajan et al., 2005; Saravanan & Rose, 2004) seguido de pelo menos um método de precipitação para a concentração das proteínas e a eliminação dos interferentes (Carpentier et al., 2005).

PROTEÔMICA COMPARATIVA E CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS

O uso da biotecnologia em muitas espécies vegetais depende de protocolos de regeneração *in vitro* a partir da cultura de células e/ou de tecidos de plantas. No sentido de viabilizar a cultura de tecidos de plantas, a proteômica comparativa apresenta-se como uma importante ferramenta no estudo e controle dos processos morfogenéticos *in vitro*.

O uso de proteínas como marcadores para o monitoramento e compreensão de diferentes fases do desenvolvimento da planta *in vitro*, seja via organogênese ou embriogênese somática, apresenta-se como uma das principais alternativas para a otimização destes processos *in vitro*.

Na cultura de tecidos vegetais, os estudos proteômicos comparativos vem sendo utilizados principalmente no sistema de embriogênese somática. Neste contexto, padrões protéicos vêm sendo utilizados como marcadores da competência das culturas embriogênicas, onde são observadas diferenças significativas nos perfis protéicos de tecidos embriogênicos e não embriogênicos (Kormutak & Vookova, 1997; Moraes et al., 2006).

Na embriogênese somática uma melhor compreensão dos fatores associados a embriogênese em plantas também pode ser obtida na interface entre os modelos de embriogênese somática e embriogênese zigótica (Silveira et al., 2007). Durante o desenvolvimento embrionário, a deposição de substâncias de reserva é um processo chave, fornecendo os compostos que serão usados desde os estádios iniciais do desenvolvimento até a autotrofia, após a germinação (Merkle et al., 1995).

As proteínas estão entre as principais substâncias de reserva acumuladas durante o desenvolvimento embrionário (Bewley & Black, 1994). Na embriogênese zigótica, o aumento no conteúdo de proteína ocorre como resultado da síntese de proteínas de reserva e proteínas LEA ("late embryogenesis abundant"). As proteínas LEA têm grande afinidade com as moléculas de água, atuando na proteção à desidratação da semente (Bewley & Black, 1994). As proteínas de reserva são utilizadas como fonte de nitrogênio no desenvolvimento e germinação do embrião, sendo divididas em quatro classes de acordo com a sua solubilidade: (a) albuminas, solúveis em água ou em tampão de pH neutro, (b) globulinas, solúveis em soluções salinas e insolúveis em água, (c) glutelinas, solúveis em ácido diluído ou em soluções alcalinas e (d) prolaminas, solúveis em álcoois (Shewry *et al.*, 1995).

Em *Helianthus annuus*, as deidrinas e outros dois grupos de LEA, além de outras proteínas de baixo peso molecular, foram identificadas durante a dormência dos embriões (Garello et al., 2000). Campalans et al. (2000) estudando os eventos moleculares envolvidos na aquisição de tolerância à desidratação, observou a indução de novos polipeptídeos durante a desidratação de embriões de *Prunus amygdalus*. Como resposta à ação do ABA e do estresse osmótico que ocorre no embrião maduro, foram identificadas as proteínas tipo

deidrinhas, LEA e outras (Campalans et al., 2000), que têm sido utilizadas como marcadores das diferentes fases desses processos (Garello *et al.*, 2000).

Finalmente, a proteômica comparativa aplicada a cultura de tecidos de plantas apresenta um grande potencial de aplicação para controle, viabilização e otimização dos processos morfogênicos *in vitro*. A identificação de proteínas diferencialmente expressas durante o desenvolvimento vegetal configura-se como um potente marcador molecular do metabolismo em plantas, podendo fornecer informações importantes sobre a competência e grau de evolução da morfogênese *in vitro*. Estudos em proteômica comparativa são essenciais e complementares aos estudos de Bioquímica e Biologia Celular, Morfologia e Fisiologia Vegetal que tradicionalmente são realizados para monitoramento e otimização dos protocolos de cultura de tecidos de plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**, 2. ed. New York:Plenum Press, 1994.p. 445.

CAMPALANS, A.; PAGÈS, M.; MESSEGUER, R. Protein analysis during almond embryo development. Identification and characterization of a late embryogenesis abundant protein. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 449-457, 2000.

CÁNOVAS, F.M.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECORBET, G.; JORRIN, J.; MOCK, H.P.; ROSSIGNOL, M. Plant proteome analysis. **Proteomics**, v. 4, p. 285-298, 2004.

CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, p. 2497-2507, 2005.

CHEN, S.; HARMON, A.C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, p. 5504-5516, 2006.

DIAS, L.L.C.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; BALBUENA, T.S.; FLOH, E.I.S. Comparative analysis of the two-dimensional gel electrophoresis patterns during seed development in *Ocotea catharinensis*. **Proteomics**, (submetido). 2007.

GARELLO, G.; BARTHE, P.; BONELLI, M.; BIANCO-TRINCHANT, J.; BIANCO, J.; PAGE-DEGIVRY, M.L. Abscisic acid-regulated responses of dormant and non-dormant embryos of *Helianthus annuus*: role of ABA-inducible proteins. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 473-482, 2000.

HEAZLEWOOD, J.L.; MILLAR, A.H. Integrated plant proteomics – putting green genomes to work. **Functional Plant Biology**, v 30, p. 471-482, 2003.

KORMUTÁK, A.; SALAJ, T.; VOOKOVÁ, B. Storage protein dynamics in zygotic and somatic embryos of white fir. **Biologia Bratislava**, v. 61, p. 479-485, 2006.

KORMUTÁK, A.; VOOKOVÁ, B. Biochemical variation between non-embryogenic and embryogenic calli of silver fir. **Biologia Plantarum**, v. 39, p.125-130, 1997.

MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A.; FLINN, B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 155-203.

MORAES, F. M. DE S.; SOUSA, M. V.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E.I.S.; RICART, C. A. O. Two-dimensional electrophoresis analysis of *Ocotea catharinensis* during somatic embryogenesis and embryogenic competence acquisition. In: XXXV Reunião Anual da SBBq. Águas de Lindóia. **Anais da...** v. 1, p. W-19, 2006.

NATARAJAN, S.; XU, C.; CARPENA, T.J.; GARRETT, W.M. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 342, p. 214-220, 2005.

PARK, O.K. Proteomic Studies in Plants. **J. Bioch. Mol. Biol.**, v. 37, p. 133-138, 2004.

ROBERTS, J.K.M. Proteomics and a future generation of plant molecular biologists. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 143-154, 2002.

ROSE, J.K.C.; BASHIR, S.; GIOVANONI, J.J.; JAHN, M.M.; SARAVANAN, R.S. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. **The Plant Journal**, v. 39, p. 715-733, 2004.

ROSSIGNOL, M.; PELTIER, JB.; MOCK, H.P.; MATROS, A.; MALDONADO, A.M.; JORRIN, J. Plant proteome analysis: a 2004 – 2006 update. **Proteomics**, v. 6, p. 5529-5548, 2006.

SAHNOUN, I.; DÉHAIS, P.; MONTAGU, M.V.; ROSSIGNOL, M.; ROUZÉ, P. PPMdb: a plant plasma membrane database. **J. Biotechnology**, v. 78, p. 235-246, 2000.

SARAVANAN, R.; ROSE, J.K.C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, v. 4, p. 2522-2532, 2004.

SHEWRY, P.R.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A.S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, p. 945-956, 1995.

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; BALBUENA, T.S.; MORAES, F.M.S.; RICART, C.A.O.; SOUSA, M.V.; GUERRA, M.P.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Endogenous abscisic acid levels and comparative proteome during seed development of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Biologia Plantarum**, (no prelo), 2007.

TOUZET, P.; RICCARDI, F.; MORIN, C.; DAMERVAL, C.; HUET, J.C.; PERNOLLET, J.C.; ZIVY, D.; DEVIENNE, D. The maize two dimensional gel protein database: towards an integrated genome analysis program. **Theor. App. Genet.**, v. 93, p. 997-1005, 1996.

WASINGER, V.C.; CORDWELL, S.J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; WILKINS, M.R.; DUNCAN, M.W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K.W.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, p. 1090-1094, 1995.

PALAVRAS CHAVES:

Proteômica, micropropagação, vegetal.