

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

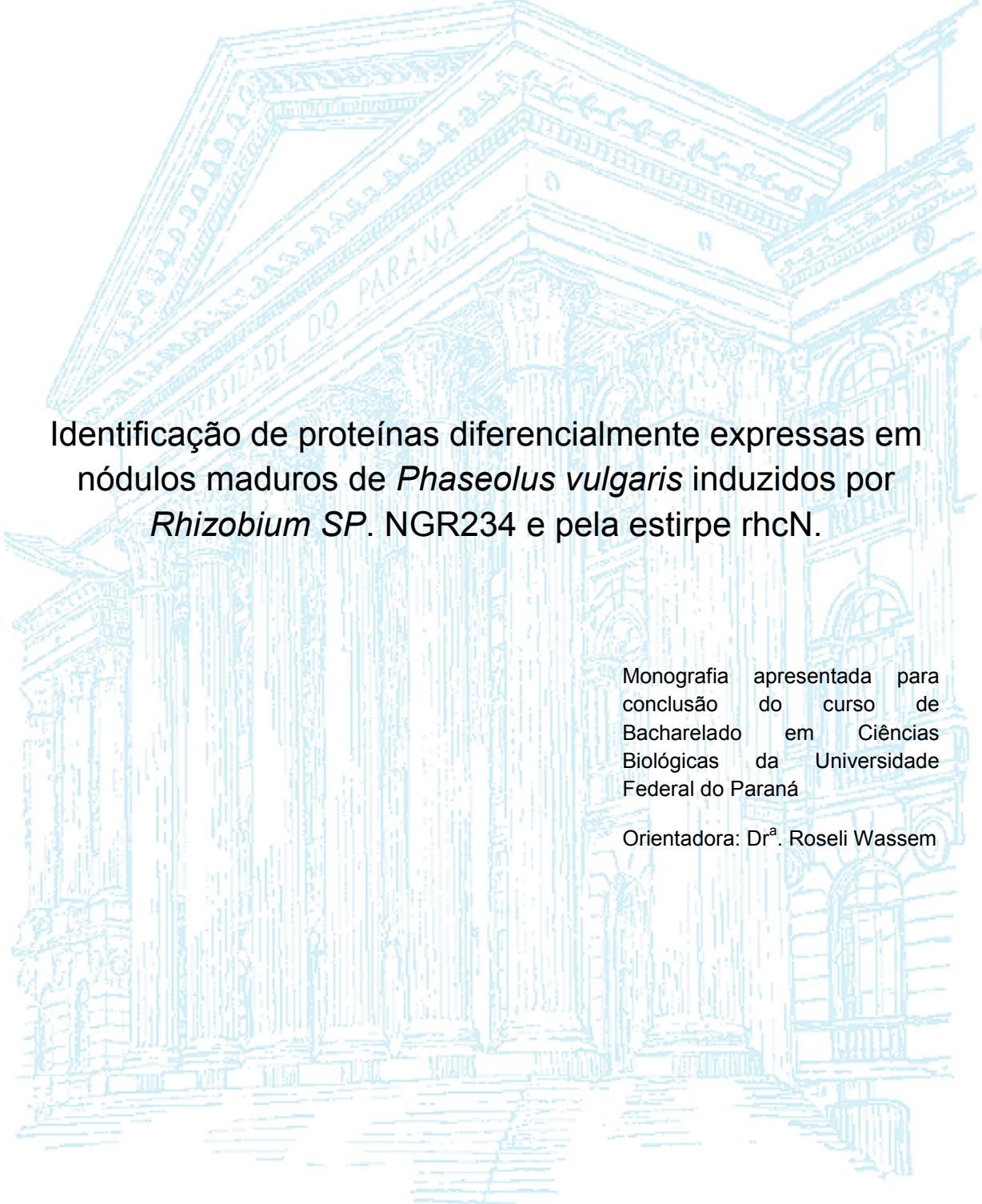
DIOGO BARBALHO HUNGRIA

Identificação de proteínas diferencialmente expressas em
nódulos maduros de *Phaseolus vulgaris* induzidos por
Rhizobium sp. NGR234 e pela estirpe mutante *rhcN*

CURITIBA

2009

Universidade Federal do Paraná – Ciências biológicas – Departamento de genética
Aluno: Diogo Barbalho Hungria - Orientadora: Dr^a Roseli Wassem



Identificação de proteínas diferencialmente expressas em
nódulos maduros de *Phaseolus vulgaris* induzidos por
Rhizobium SP. NGR234 e pela estirpe rhcN.

Monografia apresentada para
conclusão do curso de
Bacharelado em Ciências
Biológicas da Universidade
Federal do Paraná

Orientadora: Dr^a. Roseli Wassem

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio realizada por bactérias simbióticas é uma forma eficiente e barata de se disponibilizar nitrogênio para as plantas. *Rhizobium sp.* é uma bactéria diazotrófica capaz de formar nódulos, num processo de simbiose com as raízes de plantas, quase exclusivamente da família das leguminosas. Os nódulos são estruturas simbióticas cuja finalidade é converter o nitrogênio atmosférico em amônia, que será utilizado pela planta como fonte de nitrogênio. O presente estudo tem por objetivo determinar e comparar o perfil protéico de nódulos de *Phaseolus vulgaris* induzidos por uma estirpe selvagem *Rhizobium sp.* NGR234 e uma mutante *Rhizobium sp.* NGR Ω *rhcN*. A estirpe NGR Ω *rhcN* tem uma mutação no gene *rhcN*, o qual codifica uma proteína com características de ATPases, a qual disponibiliza energia para o processo de secreção. Já se sabe que a estirpe mutante NGR Ω *rhcN* é capaz de nodular *P. vulgaris* de forma mais eficiente que a selvagem, mas as respostas moleculares provocadas nas plantas que causam essa diferença ainda não são conhecidas. Para avaliar quais modificações estão ocorrendo a nível molecular, que possam explicar essa diferença, o perfil protéico das estirpes selvagem e mutante foi estabelecido em gel bidimensional (2D-PAGE). Após comparação dos perfis protéicos foram selecionados 33 pontos protéicos (*spots*), sendo 15 expressos diferencialmente e 18 expressos similarmente. Os *spots* foram recortados do gel, descorados e digeridos com tripsina, e analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF (Bruker). A partir dos espectros das massas dos peptídeos, foram identificados 24 dos 33 *spots* selecionados, correspondentes a 22 proteínas diferentes. Grande parte das proteínas identificadas está envolvida com o metabolismo do carbono, compatível com a função do nódulo. Nenhuma das proteínas identificadas está claramente envolvida com a melhor capacidade de indução de nódulos, exibida pela estirpe NGR Ω *rhcN*.

Palavras-chave: *Rhizobium sp.* NGR234. *Phaseolus vulgaris*. Fixação biológica de nitrogênio. Nodulação.

ABSTRACT

The biological nitrogen fixation carried out by symbiotic bacteria is an efficient way to provide nitrogen for plants. *Rhizobium sp.* is a diazotrophic bacterium capable of inducing nodules, a process of symbiosis with plant roots, especially of the legume family. The nodules are symbiotic structures where nitrogen is converted into ammonia, which will be used by the plant as a nitrogen source. This study aims to compare the protein profile of nodules of *Phaseolus vulgaris* induced by wild type *Rhizobium sp.* and the mutant *NGR Ω rhcN* strain. The *NGR Ω rhcN* strain has a mutation in the *rhcN* gene, which encodes for a protein with ATPases characteristics, which provides energy to the process of protein secretion. It is known that the mutant strain *NGR Ω rhcN* is able to nodulate *P. vulgaris* more efficiently than the wild type, but the molecular responses induced in plants that cause this difference are unknown. To evaluate alterations at the molecular level that may explain this difference, the protein profile of wild type and mutant strains was established in two-dimensional gel (2D-PAGE). After comparison of the protein profiles 33 protein spots were selected, from which 15 were differentially expressed and 18 equally expressed. The spots were excised from the gel, unstained, digested with trypsin and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. Based on the mass spectra of peptides 24 of the 33 spots selected were identified, corresponding to 22 different proteins. Many of the identified proteins are involved with carbon and nitrogen metabolism, compatible with the nodule function. None of them is clearly involved with a more efficient ability to induce nodules, as exhibited by the *NGR Ω rhcN* strain.

Keywords: *Rhizobium sp.* NGR234. *Phaseolus vulgaris*. Nitrogen fixation. Nodulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Gel bidimensional de nódulos induzidos pela estirpe selvagem	23
Figura 2: Gel bidimensional de nódulos induzidos pela estirpe mutante	24
Figura 3: Gel bidimensional de nódulos induzidos pela estirpe selvagem	25
Figura 4: Gel bidimensional de nódulos induzidos pela estirpe mutante	26
Figura 5: Programa FlexControl	28
Figura 6: Programa FlexAnalysis	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da solução estoque de B&D	14
Tabela 2: Soluções estoque para preparo de RMS	15
Tabela 3: Solução de rehidratação para tiras IPG pH 4-7	18
Tabela 4: Programa para focalização isoeletrica em tiras de 13 cm e pH 4-7.	18
Tabela 5: Tampão de equilíbrio para tiras IPG pH 4-7	18
Tabela 6: Composição do Coomassie Coloidal	19
Tabela 7: Proteínas igualmente expressas	32
Tabela 8: Proteínas diferentemente expressas.	33

LISTA DE ABREVIações

Cob. – Cobertura
ESTs – Sequências etiqueta expressa
HR – Resposta Hipersensitiva
ID – Identificação do <i>spot</i>
LAR – Resistência Local Adquirida
LCOs – Oligossacarídeos lipoquitínicos
MW – Peso Molecular
MW-T – Peso Molecular teórico
N. – Nome do <i>spot</i>
NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NPS – Número de peptídeos pesquisados
NPM – Número de peptídeos encontrados
D.O. – Densidade Ótica
pI – Ponto isoeletrico
pI-T – Ponto isoeletrico teórico
Pont. – Pontuação

Sumário

LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE ABREVIações.....	V
1 INTRODUÇÃO.....	5
1.1 Fixação de Nitrogênio.....	6
1.2 Nodulação.....	7
1.3 Sistema de Secreção do Tipo III.....	9
1.4 Proteoma.....	11
1.5 Justificativa.....	12
2 OBJETIVOS.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Ensaio de nodulação.....	13
3.2 Cultivo Bacteriano e Inoculação.....	14
3.3 Extração dos Nódulos e Obtenção do Extrato Protéico.....	15
3.3.1 Metodologia de extração com fenol - ISAACSON, et al. (2006).....	16
3.4 Dosagem da concentração de proteínas.....	17
3.5 Eletroforese Bidimensional.....	17
3.6 Focalização Isoelétrica.....	17
3.7 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	19
3.8 Detecção das Proteínas.....	19
3.9 Digestão Trípica de proteínas em gel de poliacrilamida.....	20
3.9.1 MALDI-TOF.....	20
3.9.2 Identificação das Proteínas - Peptide Mass Fingerprint.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Géis Bidimensionais dos nódulos de <i>Phaseolus vulgaris</i> induzidos por <i>Rhizobium</i> sp. das estirpes selvagem NGR234 e a mutante NGR Ω rhcN.....	21
4.2 Análises dos diferentes perfis protéicos entre os géis dos nódulos induzidos pelas estirpes selvagem e mutante de <i>Rhizobium</i>	22
4.3 Identificação de proteínas pelo Espectro de Massas dos Peptídeos Resultantes da Digestão Trípica.....	26
4.4. Proteínas identificadas.....	29
COCLUSões.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

O feijão é uma das principais fontes de proteína da dieta humana no Brasil e o cultivo desta leguminosa é bastante difundido, principalmente entre pequenos e médios agricultores como uma cultura de subsistência, onde há baixo nível de tecnologia agrícola e solos com baixos níveis de nitrogênio, contribuindo para a baixa produtividade nacional (HUNGRIA et al., 1997; PINTO, 2007).

Como um dos principais fatores limitantes de crescimento vegetal, a presença de nitrogênio no solo é de grande importância e quando em quantidades insuficientes para suprir as necessidades das plantas, há uma redução na produtividade da agricultura. Esse problema na maioria das vezes é resolvido por adubação química ou por inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio.

A fixação biológica do nitrogênio é a principal via que a natureza utiliza para tornar o N_2 disponível para outros organismos. O nitrogênio fixado é disponibilizado por bactérias de vida livre e simbiotes, que detêm a capacidade de reduzir o N_2 a amônia (NH_3). Em bactérias simbiotes o processo bioquímico de fixação é o mesmo que em bactérias de vida livre, mas os simbiotes ainda dependem da interação com seus hospedeiros para se tornarem fixadores de nitrogênio ativos. Essa interação é altamente específica tornando-a complexa, ou seja, a nodulação nem sempre ocorre.

O nódulo é uma estrutura resultante da interação simbiótica entre planta e bactéria e essas estruturas se localizam nas raízes das plantas quando estas foram infectadas por alguma espécie de rizóbio. Em função da alta especificidade no processo de nodulação, o processo de fixação de nitrogênio em simbiose é muitas vezes limitante. Sendo assim, uma forma de aumentar a eficiência da fixação biológica do nitrogênio é melhorar a eficiência de nodulação entre simbiote e hospedeiro. Para melhorar a eficiência da nodulação, é necessário entender como esta interação funciona. Estes estudos devem envolver métodos moleculares, que devem permitir a identificação dos genes envolvidos no processo.

As interações moleculares envolvem diversos tipos de proteínas, as quais são resultado da tradução dos genomas celulares. Logo para se compreender a interação simbiótica, é essencial estudar as proteínas que são expressas pelas células no

momento em que essas se encontram interagindo entre si. Uma das formas de fazer isto é utilizando a proteômica, que permite estudar as proteínas expressas no momento em que se interrompem os processos e interações moleculares que estavam ocorrendo no organismo.

O presente estudo visa identificar proteínas diferentemente expressas na simbiose entre a leguminosa *Phaseolus vulgaris* e duas estirpes da bactéria *Rhizobium sp.*, sendo uma delas a estirpe selvagem, NGR234, e uma mutante para o gene *rhcN*. Neste estudo a técnica utilizada foi a proteômica, utilizando géis bidimensionais e a identificação das proteínas por espectrometria de massa, utilizando MALDI-TOF.

Revisão da Literatura

1.1 Fixação de Nitrogênio

O nitrogênio disponível no ambiente terrestre apresenta-se principalmente na forma gasosa e constitui cerca de 78% da atmosfera (SPRENT & SPRENT, 1990; EVANS & BURRIS, 1992). Em sua forma gasosa não pode ser diretamente utilizado pela maioria dos seres vivos, sendo necessária a sua redução a amônia, processo este conhecido por Fixação de Nitrogênio. Na natureza, a fixação pode ser atmosférica, catalisada pela energia de relâmpagos, ou biológica, realizado por bactérias de vida livre ou simbióticas, denominadas bactérias diazotróficas. Bactérias simbióticas, como os rizóbios, realizam associações com leguminosas, a maioria da família *leguminosae*, onde fixam nitrogênio tornando-o disponível para a planta, que disponibiliza ao simbionte fontes de carbono. O processo de simbiose planta-rizóbio ocorre por meio de troca de sinais moleculares altamente específicos, os quais regulam a formação de nódulos radiculares (DILWORTH & GLENN, 1991; DIXON & KAHN, 1994; PATRIARCA et al., 2002).

1.2 Nodulação

Para que a nodulação ocorra por completo é necessário um reconhecimento recíproco entre a planta e o rizóbio e este é mediado por flavonóides, secretados pelas raízes das plantas, e os fatores Nod (oligosacarídeos lipoquitínicos LCOs) secretados pelas bactérias (FREIBERG et al., 1997). Esse reconhecimento recíproco é um dos fatores que tornam este processo altamente específico.

Acredita-se que a interação simbiótica planta-rizóbios envolva uma troca de sinais integrantes do sistema de ataque, defesa e contra ataque, entre plantas e fitopatógenos (patógenos de plantas) (STAHL & BISHOP, 2000). Basicamente o mecanismo de interação, ataque e defesa, se resume em a planta tentando desativar o sistema de ataque da bactéria e a bactéria por sua vez, tentando desativar o sistema de defesa da planta. Quando a planta reconhece o sistema de ataque do fitopatógeno, que se dá por uma interação direta entre proteínas de avirulência (*avr*) do patógeno com as proteínas R da planta, diz-se que a planta é resistente a esse organismo. A partir daí a planta irá ativar o seu sistema de defesa. Assim, quando o patógeno entra em contato com a planta deflagra nela uma Resposta Hipersensitiva (HR), onde ocorre uma rápida ativação do sistema de defesa da planta. O local de contato planta-patógeno é conhecido como Região de Resistência Local Adquirida (LAR).

Nas plantas existe uma grande diversidade de proteínas R, que conferem resistência a inúmeros fitopatógenos (BAKER et al., 1997). Mesmo com essa ampla variedade de proteínas R, não seria possível explicar a resistência a tantas doenças. Mas a planta apresenta algumas estratégias que aumentam essa resistência, que é a possibilidade de as proteínas R reconhecerem duas ou mais proteínas *Avr* diferentes (homólogas ou não). Há possibilidades como: de as proteínas R conferirem resistência a organismos não relacionados, ou uma mesma proteína R poder conferir resistência a diferentes organismos e há ainda a possibilidade dos genes R apresentarem variações alélicas que codificam diferentes proteínas R as quais tem a capacidade de reconhecer diferentes *avr* (TAKKEN & JOOSTEN, 2000). Na interação rizóbio-plantas não se conhece bem as vias envolvidas no reconhecimento da bactéria como não patogênica, mas muitas evidências

confirmam que é essencial a supressão do sistema de defesa da planta (ABRAMOVITCH et al., 2006). Os genes da planta envolvidos no reconhecimento de bactérias diazotróficas simbióticas e formação de nódulos têm sido intensamente investigados e permitiu a compreensão parcial de suas etapas, especialmente no modelo *Medicago-Sinorhizobium* (JONES et al., 2007).

Por outro lado, a via de sinalização que leva à formação dos nódulos é melhor conhecida no parceiro bacteriano. A grande maioria dos rizóbios inicia o processo de nodulação induzindo a formação do nódulo através da secreção de fatores Nod em resposta a sinais exudados pelas raízes das plantas. Neste caso, ao entrar em contato com o gradiente de flavonóides produzidos pelas raízes das plantas, as bactérias são atraídas por quimiotaxia para a superfície radicular. Após esta etapa de pré-infecção, ocorre o enovelamento dos pelos radiculares, seguido do desenvolvimento do cordão de infecção e da divisão das células corticais da raiz no ponto de infecção. Para tal, se faz necessário o reconhecimento específico dos fatores Nod pelo hospedeiro (GEURTS et al., 2005).

Se a troca de sinais ocorrer corretamente e houver reciprocidade, o processo de nodulação será bem sucedido, resultando em um nódulo. Do contrário, haverá a formação de pseudo-nódulos os quais não contem rizóbios.

Dentro de nódulos desenvolvidos encontram-se estruturas denominadas de simbiossomas e dentro dos simbiossomas os rizóbios que, através da nitrogenase convertem N_2 em NH_3 , assim disponibilizando-a para a planta (BROUGHTON et al., 2006). A fixação do nitrogênio só ocorre quando há concentrações ideais de oxigênio e para efetuar esse controle dentro dos simbiossomas a planta expressa uma proteína específica, a leghemoglobina, a qual confere ao nódulo uma coloração rosada, fator este utilizado como indicativo de fixação de nitrogênio (DIXON et al., 2004)

1.3 Sistema de Secreção do Tipo III

Em rizóbios, outro sistema também expresso na presença de flavonóides é o sistema de secreção do tipo III (TTSS ou T3SS) que auxilia a nodulação secretando proteínas efetoras, as quais podem suprimir ou ativar o sistema imune da planta (MUDGETT, 2005.). O sistema TTSS contém cerca de 20 proteínas estruturais ou secretadas pela bactéria e que influenciam na capacidade de interação da bactéria com o hospedeiro (MARIE et al., 2003). Em fitopatógenos as proteínas secretadas pelo TTSS podem ser reconhecidas pelas plantas e desencadear uma resposta hipersensitiva, onde uma das conseqüências pode ser a indução da morte celular programada a qual evita que a infecção se espalhe (VIBOUD & BLISKA, 2005; BÜTTNER & BONAS, 2006). Alterações na expressão dessas proteínas efetoras também influenciam a nodulação por rizóbios, podendo inibir ou mesmo facilitar o processo.

A expressão do TTSS em *Rhizobium* sp. NGR234 depende da transcrição do gene *ttsI*, que é regulado pela NodD1 a qual depende de flavonóides. Portanto a cascata regulatória é ativada por flavonóides que regulam a transcrição de *ttsI* produzindo a proteína TtsI, que ativa a transcrição dos genes do sistema T3SS (MARIE et al., 2004; KRAUSE et al., 2002). Após a indução por flavonóides o sistema TTSS secreta proteínas chamadas de Nops (Proteínas externas de nodulação) as quais participam diretamente da nodulação. A inativação completa do TTSS pode ser obtida através da mutagênese sítio dirigida em um dos genes essenciais do sistema, como por exemplo, o *rhcN*, que codifica uma ATPase essencial para a secreção das Nops (VIPREY et al., 1998). A linhagem mutante *rhcN* e outras linhagens mutantes nos genes codificadores de proteínas efetoras alteram drasticamente a capacidade de nodulação de NGR234 (MARIE et al., 2003).

A linhagem selvagem NGR234 secreta pelo menos oito Nops, das quais cinco são efetoras e três são estruturais (VIPREY et al., 1998; MARIE et al., 2003; AUSMEES et al., 2004; DEAKIN et al., 2005; SAAD et al., 2005). As proteínas NopA, NopB e NopX foram confirmadas como estruturais, enquanto a NopJ, NopL, NopM, NopP e NopT foram identificadas como efetoras. As proteínas estruturais estão relacionadas diretamente com a formação da maquinaria de injeção e na própria

injeção de proteínas efetoras, as quais podem ser injetadas diretamente no citoplasma dos hospedeiros (HUGUET et al., 1997; BÜTTNER et al., 2002; DEAKIN et al., 2005; SAAD et al., 2005). As evidências disponíveis sugerem que as proteínas efetoras têm diferentes funções no citoplasma do hospedeiro, e em função destas, podem reduzir ou aumentar a eficiência da nodulação. NopJ age como um efetor negativo, uma vez que uma linhagem mutante no gene *nopJ* nodula mais eficientemente *Lablab purpureus* e diversas variedades de *Phaseolus vulgaris* do que a estirpe selvagem (dados não publicados). NopJ exhibe semelhança com diversas proteínas Avr de fitopatógenos, incluindo AvrXv4 de *Xanthomonas campestris* e também é similar a YopJ de *Yersinia* sp. AvrXv4 e YopJ exibem atividade de SUMO iso-peptidase e YopJ exhibe ainda atividade de acetiltransferase, tendo como substrato uma MAP quinase (MUKHERJEE et al., 2006).

NopM é semelhante a YopM de *Yersinia*, onde sua função não é bem conhecida. Dados da literatura mostram duas possíveis funções para YopM: alterar a expressão gênica em células eucarióticas e forma um complexo protéico com duas quinases que altera sua atividade (McDONALD et al., 2003).

O mutante no gene *nopM* de NGR234 exibiu diferente capacidade de nodulação evidente em *Lablab purpureus* e menos proeminente em variedades de *P. vulgaris*. Entretanto, ensaios de nodulação com duplos mutantes em *nopM* e um segundo gene efetor sugerem que NopM modula a resposta da planta a um segundo efetor, quando este é reconhecido (DEAKIN, E., KAMBARA, K., LARIGUET, P. E WASSEM, R., dados não publicados).

NopT é homólogo a membros de uma família de cisteína proteases, que inclui YopT de *Yersinia* sp. e AvrPphB de *P. syringae* pv. *Phaseolicola* (SHAO et al. 2002).

A proteína AvrPphB tem atividade auto-proteolítica, que permite seu encaminhamento para a membrana celular vegetal, o que é essencial para sua atividade. YopT também sofre clivagem auto-proteolítica, bem como NopT de NGR234 em *E. coli* e leveduras, mas não no próprio NGR234 (dados não publicados). NopT é responsável pelo efeito negativo do sistema T3SS de NGR234 em *P. vulgaris* e *Crotalaria juncea*, e sua remoção produz fenótipos semelhantes ao observado no mutante *rhcN* (que não secreta nenhuma das Nops) (SKORPIL et al., 2005; ANDERSON et al., 2006).

Os outros dois efetores, NopL e NopP, são encontrados exclusivamente em alguns dos rizóbios que possuem T3SS. Em NGR234 ambos podem ser fosforilados por extratos de plantas (SKORPIL et al., 2005).

A expressão de *nopL* em células de tabaco bloqueia a indução de proteínas R após infecção com vírus patogênicos a este, sugerindo que NopL modula as vias de transdução de sinais que ativa os genes R. Mutações nos genes *nopL* ou *nopP* reduziu a eficiência de nodulação em *Flemingia congesta* e *Tephrosia vogelii* (MARIE et al., 2003; SKORPIL et al., 2005). Dados mais recentes também mostram que AvrPto, uma proteína Avr de *Pseudomonas syringae* é fosforilada por extratos de plantas (ANDERSON et al., 2006).

1.4 Proteoma

O conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um tipo celular num dado momento de seu desenvolvimento é denominado proteoma, termo esse proposto por Mark Wilkins e Keith Williams quando se referiam à identificação do complexo protéico expresso por um genoma (BLACKSTOCK & WEIR, 1999; LOPEZ, 1999; HAYNES & YATES, 2000). A proteômica, contrariamente a genômica, vem responder como funciona a dinâmica de proteínas nos seres vivos. O proteoma é variável e depende da idade do organismo, estado fisiológico, fatores ambientais, genéticos entre outros e por comparações entre diferentes géis possibilita a identificação de proteínas específicas do organismo em estudo (GRAVES & HAYSTEAD, 2002; CAHILL et al., 2001). A proteômica complementa a genômica, comprovando a existência de produtos gênicos (PANDEY & MANN, 2000).

Um genoma pode dar origem a vários proteomas através das diferentes modificações pós traducionais que as proteínas estão sujeitas, como metilação, fosforilação, clivagem proteolítica e outras (CAHILL *et al.*, 2001). Portanto através da proteômica podemos determinar a distribuição e função celular das proteínas sob certas condições (CASH, 1998).

Um dos métodos mais amplamente utilizados para estudos de proteoma envolve a análise através de géis bidimensionais. A eletroforese bidimensional é

dividida em duas etapas: a primeira é a focalização isoeétrica (IEF) das proteínas, onde as mesmas serão separadas de acordo com seu ponto isoeétrico. A segunda dimensão consiste na separação das proteínas de acordo com suas massas moleculares por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS – PAGE) (O’FARREL, 1975).

Na primeira dimensão, as proteínas, sob efeito de um campo elétrico, migram por um gradiente de pH e quando atingem seu ponto isoeétrico param de migrar. Esta etapa é realizada em tiras IPGs (*immobilised pH gradients*), que contém gradientes de pH imobilizados em gel de poliacrilamida. Na segunda dimensão as proteínas migram “carregadas” por uma corrente elétrica, separando as proteínas em função de suas respectivas massas moleculares em um gel de poliacrilamida na presença de SDS (desnaturante) (SDS-PAGE).

A partir dos perfis protéicos, pode-se identificar por comparação as proteínas diferencialmente expressas e os diferentes níveis de expressão das mesmas. Após análise preliminar, as proteínas de interesse são identificadas e excisadas do gel. Após descoloração, as proteínas selecionadas são digeridas com proteases (mais comumente tripsina) e a massa dos peptídeos gerados é determinada por espectrometria de massa (MS). Utilizando espectrômetro MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight) (AEBERSOLD & GOODLET, 2001; KÖPKE, 2003), pode-se determinar a relação carga/massa (m/z) dos peptídeos de íons gerados pela molécula analisada. O resultado obtido é um perfil peptídico, que é único, podendo ser considerado uma impressão digital daquela molécula (QUADRONI & JAMES, 2001).

1.5 Justificativa

A inoculação do *Phaseolus vulgaris*, feijoeiro, com NGR234 apresenta uma baixa produção de nódulos e baixa produtividade de feijão, mas quando inoculado com um mutante, que inativa o sistema TTSS, um maior número de nódulos e uma maior produção de feijão é obtida. Não se conhece o mecanismo que a planta utiliza para reconhecer estes efetores de nodulação e assim permitir uma colonização mais

eficiente. A identificação de proteínas envolvidas neste mecanismo pode ser feita por análise do proteoma e por comparação de diferentes estirpes, mutantes e selvagem. Com isso, pode-se chegar a um melhor entendimento de como funciona a interação simbiote-hospedeiro mediada pelas proteínas secretadas.

2 OBJETIVOS

- Obter o perfil protéico de nódulos de *Phaseolus vulgaris* induzidos por *Rhizobium sp.* NGR234 e pela estirpe *rhcN*.
- Identificar possíveis proteínas diferencialmente expressas.
- Identificar as proteínas diferencialmente expressas através de espectrometria de massa.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ensaio de nodulação

Para o cultivo das plantas, as sementes de *Phaseolus vulgaris* BAT93 foram esterilizadas por imersão em ácido sulfúrico durante dez minutos. Após a esterilização, as sementes, foram lavadas com água estéril, e colocadas em placas de petri com solução B&D contendo 1,5% de agar, (composição Tabela 1) (BROUGHTON & DILWORTH, 1971). As placas foram embrulhadas em papel alumínio e incubadas a temperatura de 27°C para a germinação. O período de incubação terminou por volta do terceiro dia quando as mesmas tiveram tamanho o suficiente para serem transferidas para seus frascos definitivos, apresentando raízes com aproximadamente três centímetros. Os frascos, também estéreis, continham vermiculita e solução B&D separadamente, sendo que a vermiculita ficou na parte superior e o meio na inferior. Posteriormente, foram acondicionadas por dois dias na

casa de vegetação para que as plântulas apresentassem porte suficiente para abertura dos frascos. As raízes das plantas foram cobertas com 10^7 células das estirpes de *Rhizobium sp.* e o substrato foi coberto com uma camada de polipropileno estéril, evitando a contaminação.

Para se obter a solução de uso do B&D é necessário diluir as soluções estoques duas mil vezes, lembrando de se manter sempre nas mesmas proporções. A solução foi esterilizada através de autoclavagem a 120 °C por 20 minutos.

Tabela 1: Composição da solução estoque de B&D

Solução A	CaCl ₂	2M
Solução B ₁	KH ₂ PO ₄	1M
Solução B ₂	K ₂ HPO ₄	1M
Solução C	FeC ₆ H ₆ O ₇ · 2H ₂ O	0,02M
Solução D	Solução de oligoelementos: MgSO ₄ 0,5M; K ₂ SO ₄ 0,5M; MnSO ₄ 2mM; H ₃ BO ₃ 4 mM; ZnSO ₄ 1mM; CuSO ₄ 4 mM; CoSO ₄ 0,2 mM; Na ₂ MoO ₄ 0,2 mM.	

FONTE: BROUGHTON & DILWORTH (1971)

3.2 Cultivo Bacteriano e Inoculação

O *Rhizobium sp.* NGR234 e a estirpe *rhcN* foram cultivados em meio TY, 3g/l de extrato de levedura, 10mM CaCl₂ 5g/l de peptona hidrolisada (BERINGER, 1974) e posteriormente em RMS (Tabela 3) sob agitação a 28 °C.

Para inoculação das plantas as células bacterianas foram centrifugadas, em um eppendorf de 1,5 ml, e lavadas em solução de sulfato de magnésio 10mM para se obter uma DO₆₀₀ de 0,7. Essa amostra foi diluída 10 vezes em solução de sulfato de magnésio 10mM e 300 µl da suspensão bacteriana fosse inoculada nas raízes de *P. vulgaris*.

Tabela 2: Soluções estoque para preparo de RMS

Solução I-A	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ NaCl	1,2M 1M 0,25M
Solução I-B	NH ₄ NO ₃	0,6M
Solução II	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2M
Solução III	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,06M
Solução IV	MgSO ₄ ·7H ₂ O K ₂ SO ₄ MnSO ₄ ·H ₂ O H ₃ BO ₃ ZnSO ₄ ·7H ₂ O CuSO ₄ ·5H ₂ O CoSO ₄ ·7H ₂ O Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,5M 0,5M 2mM 4mM 1mM 4mM 0,2mM 0,2mM
Solução de vitaminas de Gamborg 1000X (Sigma)		
Succinato de sódio		1,2M

O RMS propriamente dito é constituído de 0,1% das soluções I-A, I-B, II e Succinato de sódio 1,2M e 0,01% das soluções III, IV e vitaminas de Gamborg 1000X.

FONTE: BROUGHTON & DILWORTH (1971)

A solução de RMS é preparada a partir das soluções de estoque indicadas na tabela 2. No preparo deve-se manter a proporção de 0,1% das soluções I-A, I-B, II e Succinato de Sódio 1,2M para 0,01% das soluções III, IV e solução de vitaminas de Gamborg 1000X. Essa diluição deve ser já deve ser feita em uma água bidestilada estéril.

3.3 Extração dos Nódulos e Obtenção do Extrato Protéico

Após 45 dias da inoculação das estirpes selvagem e mutante, os nódulos foram coletados manualmente e armazenados em ultra-freezer (-70°C) até o momento da extração

O método utilizado para a obtenção do extrato protéico foi descrito por ISAACSON, et al., (2006).

3.3.1 Metodologia de extração com fenol - ISAACSON, et al. (2006).

Procedimento

Utilizando um cadinho e nitrogênio líquido macere o tecido vegetal até virar pó, cuidando para que o tecido não descongele. Após a maceração adicionar no máximo um microlitro de tampão de extração fenólico (sacarose 0,7M; KCl 0,1M; Tris HCl pH 7,5 0,5M; EDTA 0,05M; β -mercapto etanol 2%, PMSF 1mM), de preferência tentar deixar o mais concentrado possível.

Adicionar 5-10% de polivinil polipirrolidona (PVPP), homogeneizar vigorosamente no vortex, em seguida incubar sob agitação a 4 °C por 30 minutos e após a incubação sonicar no mínimo 6 vezes por 10 segundos cada tubo, deixar as amostras sempre no gelo.

Centrifugar a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C, se não separar as duas fases repetir a centrifugação até separar a fase fenólica da amostra. Separando as duas fases transferir a fase fenólica, a superior, para um novo tubo e lavar o fenol que sobrou no tubo com ½ volume de tampão de extração para recuperar o máximo de proteína possível. Agitar, centrifugar e transferir o fenol para o tubo contendo a primeira parte da coleta adicionando 5 volumes de solução gelada de acetato de amônio 0,1M em metanol, homogeneizar e incubar a -20 °C por oito horas.

Após oito horas incubando centrifugar a amostra a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C e remover cuidadosamente o sobrenadante e descartá-lo. Lavar o pellet com metanol gelado e centrifugar a amostra a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C após a lavagem. Repetir o procedimento 3 vezes. Após lavar o *pellet* com metanol lave-o 3 vezes com acetona gelada centrifugando a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C as 3 vezes, para retirar o metanol. No fim da lavagem secar o pellet, para retirar a acetona, na bancada ou na estufa e ressuspender em aproximadamente 400 μ l de tampão de lise (Uréia 8M; Chaps 4%; Bio lite 0,8%; Tris 35mM; PMSF 1mM; EDTA 5mM; DTT 40mM).

3.4 Dosagem da concentração de proteínas

Para se determinar a concentração de proteínas nos extratos protéicos foi feita uma curva de calibração utilizando BSA (Albumina do Soro Bovino) contendo uma concentração conhecida de proteínas que é de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Como é necessário colocar uma determinada quantidade de proteína nas tiras de focalização a determinação da concentração de proteínas na amostra é necessária.

Na construção da curva padrão foi utilizado um gradiente de BSA que é de 2, 4, 6, 8 e 10 μL de BSA mais 2 μL de tampão de lise, o volume foi completado para 100 μL com água bidestilada e foi adicionado 1 mL da solução de Bradford (100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250; 50 ml de etanol 95%; 100 ml de ácido fosfórico 85%; completar para um litro com água bidestilada).

Foram utilizados 2 e 5 μL de amostra para determinar a concentração pela absorbância. Tudo foi feito em duplicatas e para o resultados foram calculadas as médias.

3.5 Eletroforese Bidimensional

A produção dos géis bidimensionais seguiu os protocolos fornecidos pela GE Healthcare. Algumas modificações foram feitas para que os protocolos se adaptassem às condições de trabalho e de material.

3.6 Focalização Isoelétrica

Na focalização isoeletrica foram utilizadas tiras de pH 4-7 com 13 cm da GE Healthcare. As tiras foram reidratadas por 16 horas com uma solução contendo: 400 μg de proteína, 1,5% de tampão-IPG pH 4-7 e 50 mM de DTT (Tabela 3).

Tabela 3: Solução de rehidratação para tiras IPG pH 4-7

IPG buffer pH 4-7 (GE)	1,5%
DTT	50mM
Amostra	400µg de proteína, calculado conforme resultado da dosagem
Tampão de rehidratação (GE) FONTE: (GE Healthcare)	Até completar 250µl

Após a rehidratação as tiras foram colocadas no equipamento IPGphor II para a isoeletrofocalização seguindo a programação sugerida pela GE Healthcare (Tabela 4).

Tabela 4: Programa para focalização isoeétrica em tiras de 13 cm e pH 4-7.

Step 1	200 W	0,2 kV/h
Step 2	500 W	0,2 kV/h
Step 3	1000 W	0,8 kV/h
Step 4	8000 W	11,3 kV/h
Step 5	8000 W	12,0 kV/h

FONTE: (GE Healthcare)

Após a isoeletrofocalização as tiras foram equilibradas em 5 ml de tampão de equilíbrio (tebela 5) contendo 50mg de DTT por 30 minutos e por mais 30 minutos em 5 ml do mesmo tampão contendo 200mg de iodoacetamida. Durante o processo de equilíbrio, as tiras ficaram sob constante homogeneização.

Tabela 5: Composição do tampão de equilíbrio para tiras IPG pH 4-7

1,5M Tris-HCl pH 8,8	50mM
Uréia	6M
Glicerol	30%
SDS	2%
Azul de Bromofenol	Traço

FONTE: (GE Healthcare)

3.7 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A eletroforese foi feita num gel de poliacrilamida 12% acrescido de SDS (SDS-PAGE) conforme descrito por LAEMMLI (1970).

Após a corrida o gel foi retirado da cuba e colocado em uma solução fixadora (1,3% de ácido orto-fosfórico e 20% de Metanol) por uma hora. Após a fixação, a solução foi trocada por uma solução de Coomassie coloidal (tabela 6) até ser possível a visualização das bandas. Quando as bandas ficaram visíveis, a solução foi trocada por água destilada para descoloração.

Tabela 6: Composição do Coomassie Coloidal

Ácido orto-fosfórico	0,8%
Metanol	20%
Sulfato de Amônio	8%
Coomassie Blue G-250	0,08%

FONTE: BLUM *et al.* (1987).

3.8 Detecção das Proteínas

Após análise dos géis no programa ImageMaster, os *spots* foram detectados automaticamente e manualmente.

Os géis foram comparados manualmente para identificação das proteínas diferentemente expressas nos nódulos induzidos pelas estirpes selvagem *Rhizobium sp.* NGR234 e pela mutante *Rhizobium sp. rhcN*.

Os spots de interesse foram removidos e preparados para a análise espectrométrica por MALDI-TOF.

3.9 Digestão Triptica de proteínas em gel de poliacrilamida

As bandas de proteínas foram recortadas do gel com auxílio de uma ponteira plástica de 1 ml com a ponta cortada e transferidas para microtubo de 0,2 ml.

As bandas foram descoradas com sucessivas lavagens em solução de acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0. Após completa descoloração as bandas foram desidratadas pela adição de 40 µL de acetonitrila 100% e incubação por 5 a 10 minutos em temperatura ambiente. Quando necessário o procedimento foi repetido. A acetonitrila foi removida e as bandas foram secadas ao ar livre ou no vácuo por 20 minutos, até completa secagem.

A cada amostra foi adicionado 10 µL de tripsina (10µg/ml em tampão 40mmol/l de bicarbonato de amônio e 10% de acetonitrila) de forma a cobrir os pedaços de gel. Os tubos foram mantidos no gelo por 30 minutos até completa rehidratação e em seguida incubados em estufa a 37 °C por oito horas para que ocorresse a digestão triptica.

3.9.1 MALDI-TOF

Após a digestão Triptica, parte da amostra foi misturada com uma solução saturada de alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic em acetonitrila 50% com 1% de ácido Trifluoroacético, em uma proporção de 1:1. Um µL desse preparado foi depositado sobre uma placa própria para a espectrometria de massas do Maldi-Tof (MTP 384 massive MS target T da Bruker) onde os peptídeos cristalizaram-se junto à matriz.

A massa dos peptídeos tripticos foi determinada no espectrômetro de massa Maldi-ToF Autoflex II da Bruker Daltonics, utilizando o programa Flex Control. Para a obtenção dos espectros dos peptídeos foi feita antes a calibração com o padrão de peptídeos "*Peptide calibration standard*" da Bruker Daltonics.

Após a calibração foram obtidos os espectros dos peptídeos de interesse disparando os pulsos de laser na amostra e assim obtendo os espectros necessários para identificar a proteína. Os espectros foram analisados no programa “*Flex Analysis*”.

3.9.2 Identificação das Proteínas - Peptide Mass Fingerprint

Utilizando o “*Flex Analysis*” foi gerada para cada proteína uma lista de massa molecular dos peptídeos e dessa lista foram retirados os peptídeos contaminantes que já se conhece. Essas massas foram comparadas com o banco de dados da NCBI (Centro Nacional de Informação Biotecnológica) para a identificação das proteínas com o auxílio do programa “MASCOT”.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Géis Bidimensionais dos nódulos de *Phaseolus vulgaris* induzidos por *Rhizobium sp.* das estirpes selvagem NGR234 e a mutante NGR Ω rhcN

Com o objetivo de identificar proteínas diferencialmente expressas em nódulos de *P. vulgaris* induzidos pela estirpe selvagem e a mutante no gene *rhcN*, utilizamos uma abordagem proteômica. Os nódulos obtidos foram utilizados na obtenção de extrato protéico total, conforme descrito no item 3.5.

Em trabalho anterior (KUKOLJ, C. 2009) foram produzidos quatro géis de nódulos induzidos pela estirpe selvagem, *Rhizobium sp.* NGR234, utilizando a mesma metodologia descrita neste trabalho. No presente trabalho, foram produzidos quatro géis, com extratos protéicos de nódulos induzidos por *rhcN*. Devido às

diferentes taxas de migração tanto em géis da estirpe selvagem quanto mutante, um gel de menor migração de cada estirpe foi utilizado para a comparação.

4.2 Análises dos diferentes perfis protéicos entre os géis dos nódulos induzidos pelas estirpes selvagem e mutante de *Rhizobium*

A comparação dos géis foi feita utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum v.6.01 da GE e também por observação visual. Através dessa comparação foi possível selecionar quinze possíveis proteínas diferencialmente expressas e dezoito proteínas igualmente expressas.

As comparações foram feitas entre os géis das figuras 01 e 03 e entre os géis das figuras 02 e 04. A análise contou com o auxílio do programa ImageMaster para determinar o ponto isoelétrico (pI), o peso molecular (MW) e marcar as proteínas escolhidas. As proteínas de interesse foram recortadas do gel, digeridas com tripsina e os fragmentos tripticos tiveram sua massa determinada através de espectrometria de massa, utilizando MALDI-TOF. Após a determinação da massa dos fragmentos, o número e massa dos peptídeos foi utilizado para procura, em um banco de dados, de proteínas candidatas que gerassem um perfil semelhante ao obtido. Esta abordagem é denominada de “peptide mass fingerprinting” (PMF) e pode ser suficiente para identificar a proteína em análise. Normalmente, mais de uma proteína candidata é encontrada, especialmente quando grandes bancos de dados são utilizados. Para definir se o resultado obtido é confiável, os programas de busca utilizam parâmetros estatísticos e geram índices, que representam a probabilidade de o perfil obtido ser proveniente da proteína candidata.

No presente trabalho, as proteínas fracionadas no gel podem ser provenientes tanto de NGR234 quanto de *P. vulgaris*. Dessa forma, o banco de dados utilizado para a comparação deve incluir ambos os organismos. O genoma de NGR234 foi completamente seqüenciado (Schmeisser et al 2009) e depositado no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Entretanto, o genoma de *P. vulgaris* encontra-se em fase inicial de sequenciamento e dispõe apenas de ESTs seqüenciadas e depositadas no mesmo banco de dados.

Os perfis de peptídeos obtidos para todas as amostras foram comparados contra o banco de proteínas de Proteobactérias e também de plantas superiores.

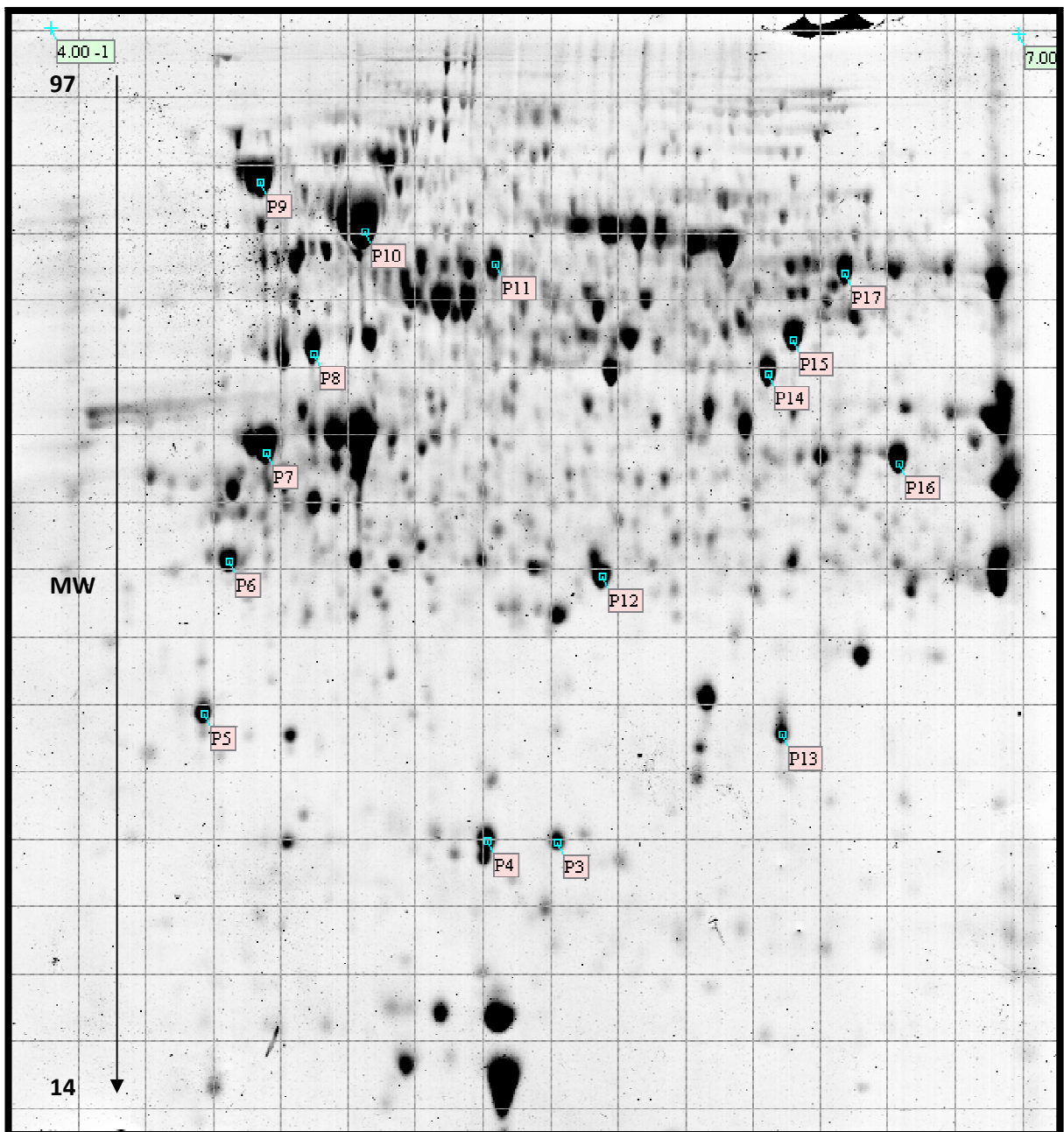


Figura 1: **Gel bidimensional de nódulos induzidos pela estirpe selvagem**: após análise pelo programa ImageMaster. Gel produzido por Kukolj, C., 2009 Na região superior do gel está indicado o pH da tira da focalização isoeétrica. Spots marcados pela letra P são os spots igualmente expressos nos dois géis.

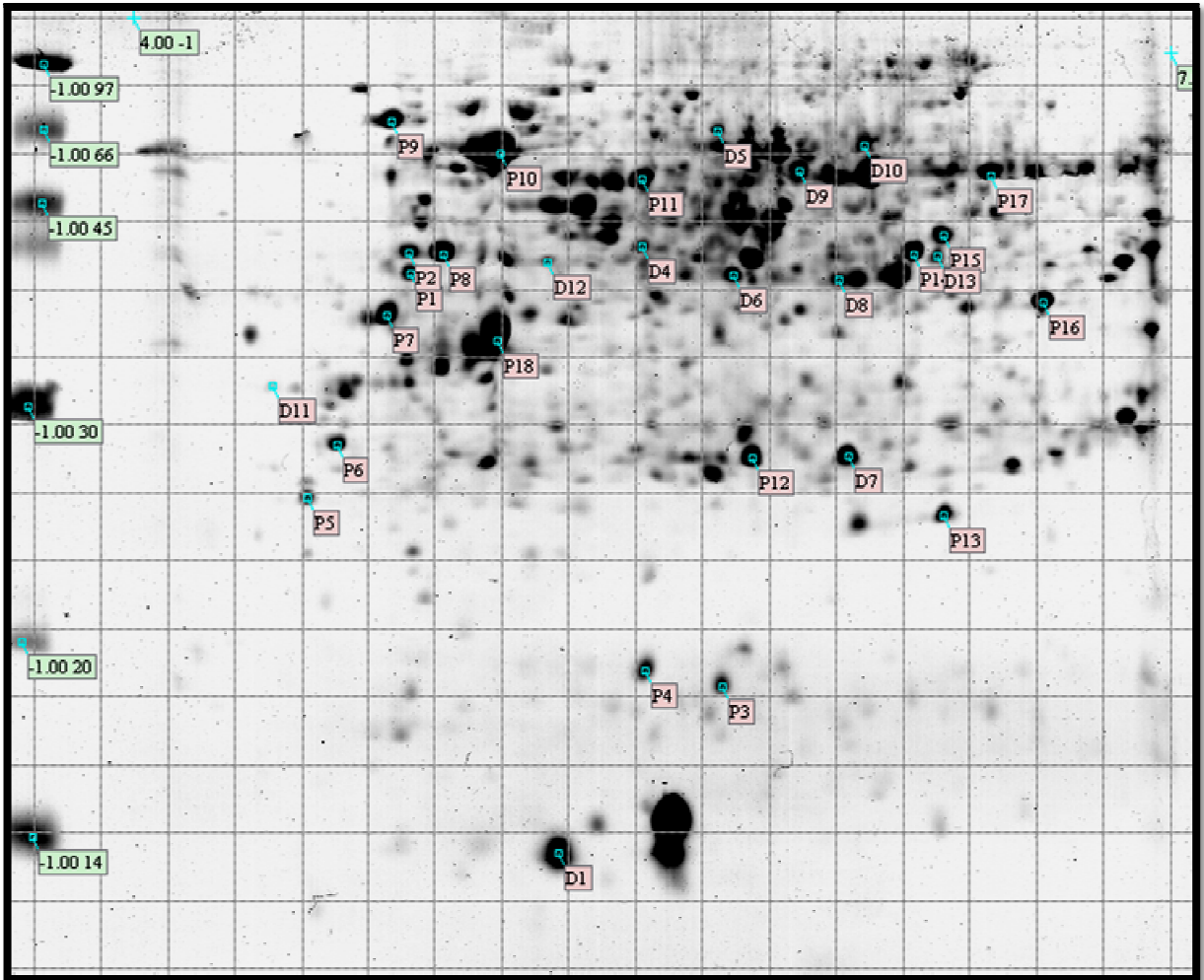


Figura 2: Gel bidimensional de nódulos induzidos pela estirpe mutante *rhcN*: após a análise no programa ImageMaster. Na esquerda do gel está indicado o massa molecular das bandas e na parte superior do gel, o pH da tira da focalização isoeletrica. Spots marcados com a letra P estão igualmente expressos tanto no mutante quanto no selvagem e possíveis spots diferenciais estão marcados pela letra D.

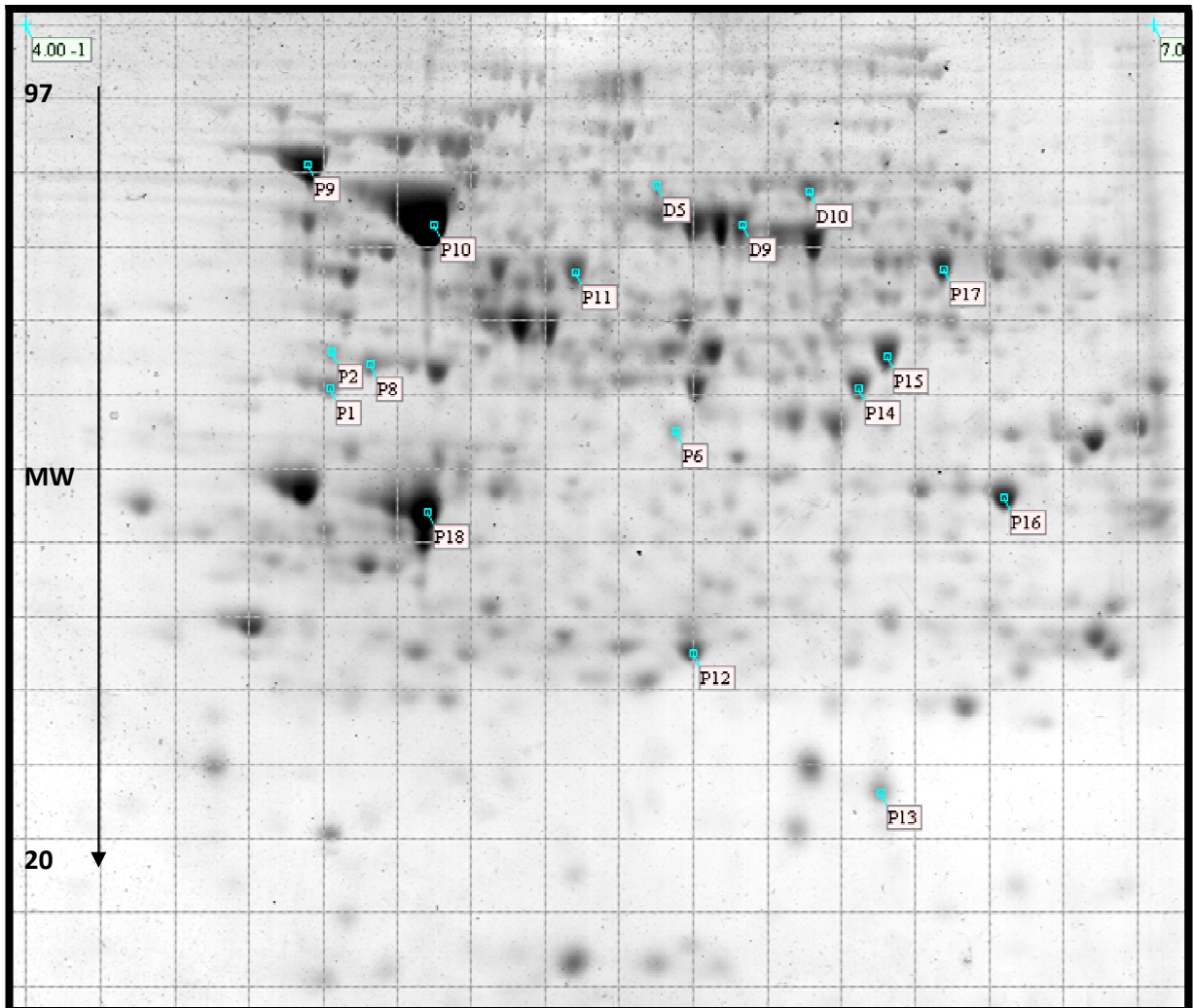


Figura 3: **Gel bidimensional de nódulos induzidos pela estirpe selvagem**: após análise pelo programa ImageMaster. Gel produzido por Kukulj, C., 2009. Na região superior do gel está indicado o pH da tira da focalização isoeletrica. Spots marcados pela letra P são igualmente expressos nos dois géis. Spots diferenciais estão marcados com a letra D.

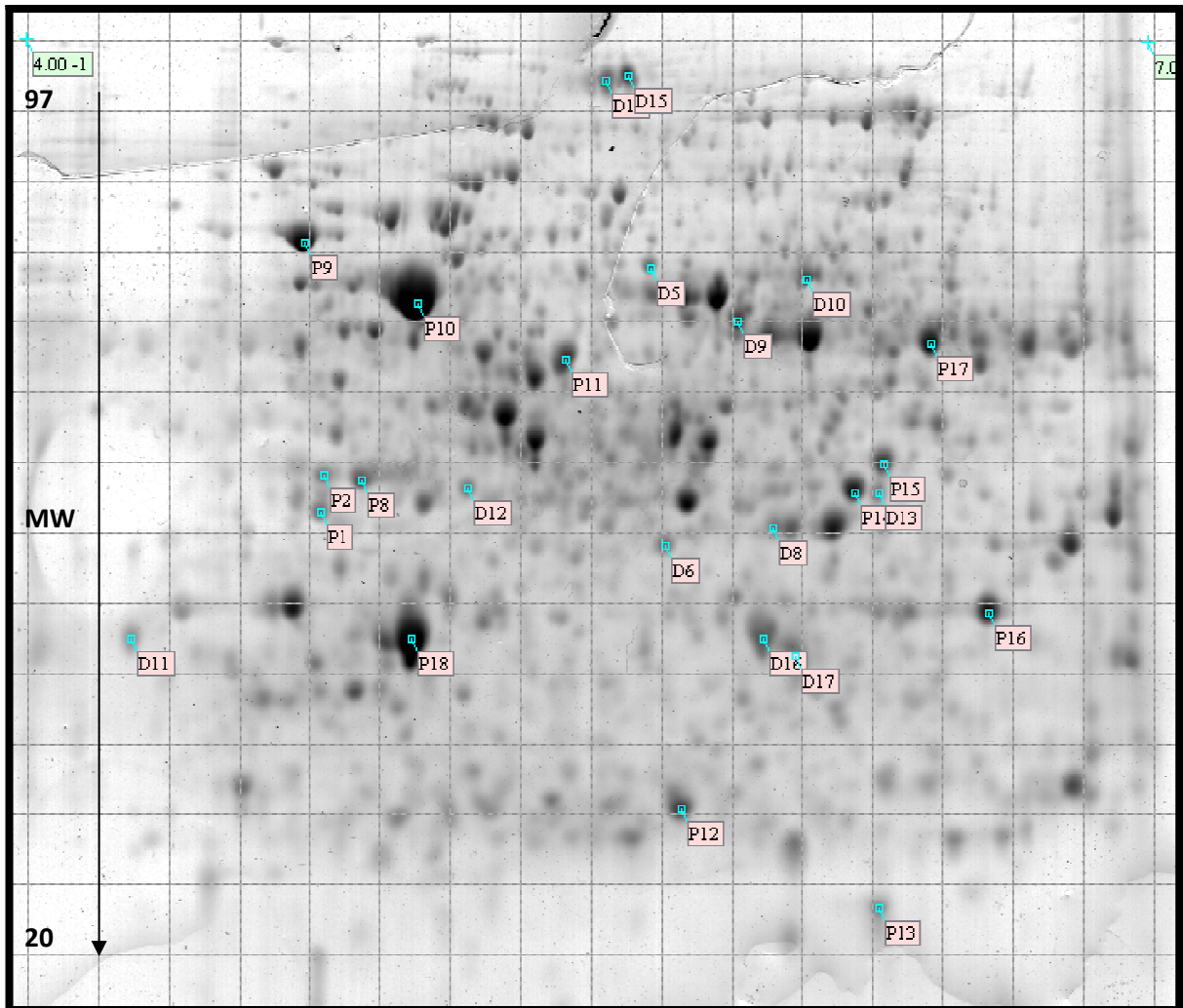


Figura 4: **Gel bidimensional de nódulos induzidos pela estirpe mutante *rhcN***: após análise no programa ImageMaster. Na parte superior do gel está indicado o pH da tira da focalização isoeétrica. *Spots* diferencialmente expressos nos dois géis estão marcados com a letra D e os *spots* igualmente expressos estão marcados com a letra P.

4.3 Identificação de proteínas pelo Espectro de Massas dos Peptídeos Resultantes da Digestão Triptica

No mapeamento de massas dos peptídeos feito no equipamento MALDI-TOF foram obtidos os espectros de tempo de voo (TOF), dos íons produzidos de todas as amostras, mas nem todos os *spots* foram identificados. Apesar da ferramenta de busca identificar uma proteína que mais se aproxima do padrão de espectro de peptídeos da amostra analisada, nem sempre esta identificação pode

ser considerada confiável. Isto se deve a vários motivos, como por exemplo, um espectro de massa de peptídeos pouco definido, a ponto de não sustentar a identificação significativa de uma proteína, ou seja, os dados gerados pela análise da amostra pelo MALDI-TOF não são suficientes para identificá-la. *Spots* fracos são também difíceis de serem identificadas por conterem uma quantidade insuficiente de proteínas, tornando a banda de difícil identificação ou impossível. Um *spot* forte, ou seja, que contém quantidade de proteína suficiente para identificação e apresenta um bom espectro, pode ainda não ser identificado. Uma das possibilidades pode ser contaminação de forma que não é possível encontrar aquela proteína no banco de dados utilizado. Outro fator que prejudica na identificação das proteínas é a contaminação dos espectros de peptídeos com o espectro da matriz, a qual adiciona muitos picos que não são identificados e contam como uma pontuação negativa.

A figura 5 mostra uma das análises em MALDI-TOF, onde são observados os sinais e as massas dos peptídeos correspondentes ao *spot* D10, o qual foi identificado.

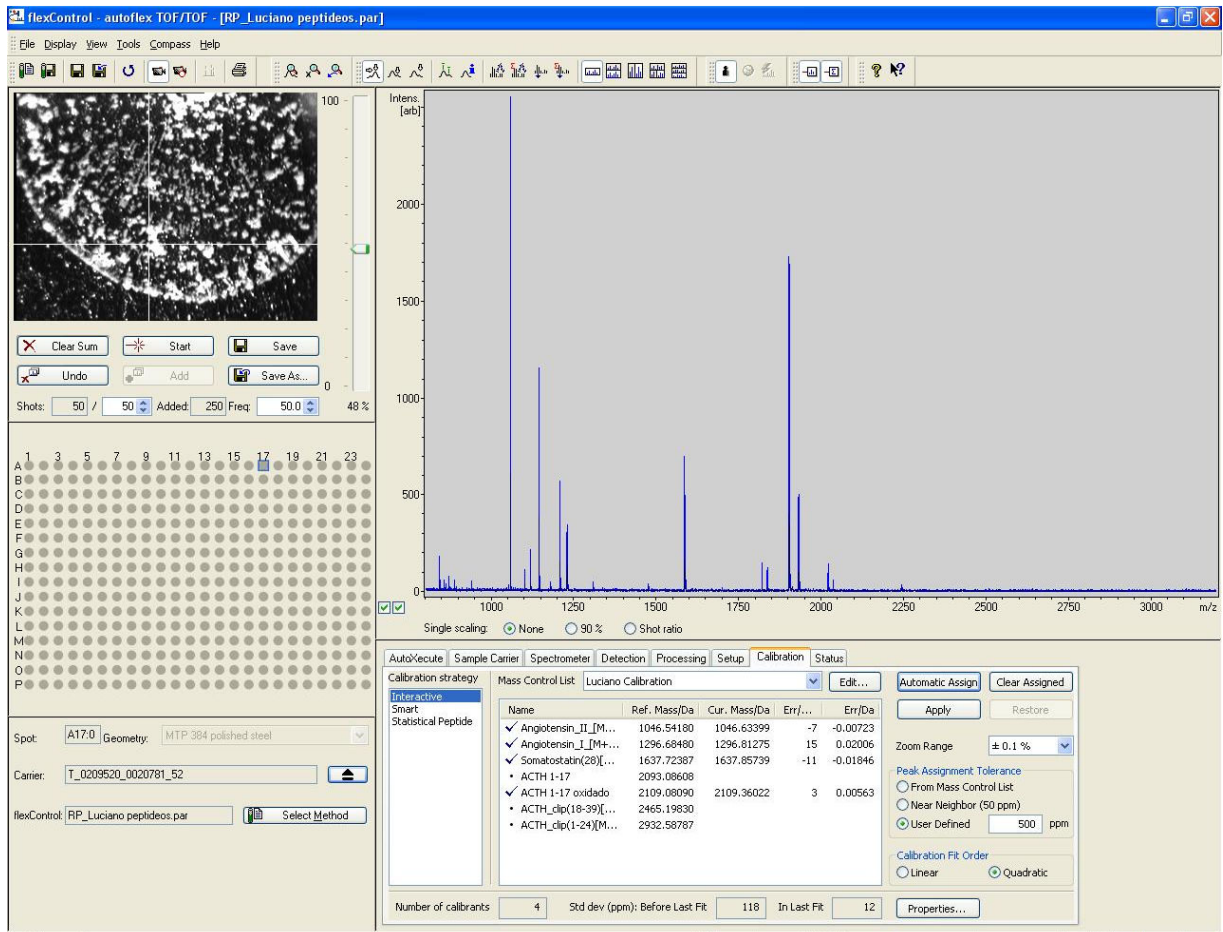


Figura 5: **Programa FlexControl:** Imagem da interface do programa FlexControl, utilizado para visualização dos espectros de massas dos peptídeos, quando utiliza-se o MALDI-TOF

A figura 6 mostra a interface do programa FlexAnalysis, que é utilizado para analisar os espectros de massa dos peptídeos. Este programa possibilita fazer modificações e produz o arquivo utilizado na busca no banco de dados para a identificação das proteínas. Dos espectros observáveis na figura 6, o primeiro e o quarto podem ser considerados espectros bons e o segundo e o terceiro como espectros ruins. Neste caso o único espectro que teve uma identificação positiva foi o primeiro, que é o espectro dos peptídeos da proteína D2.

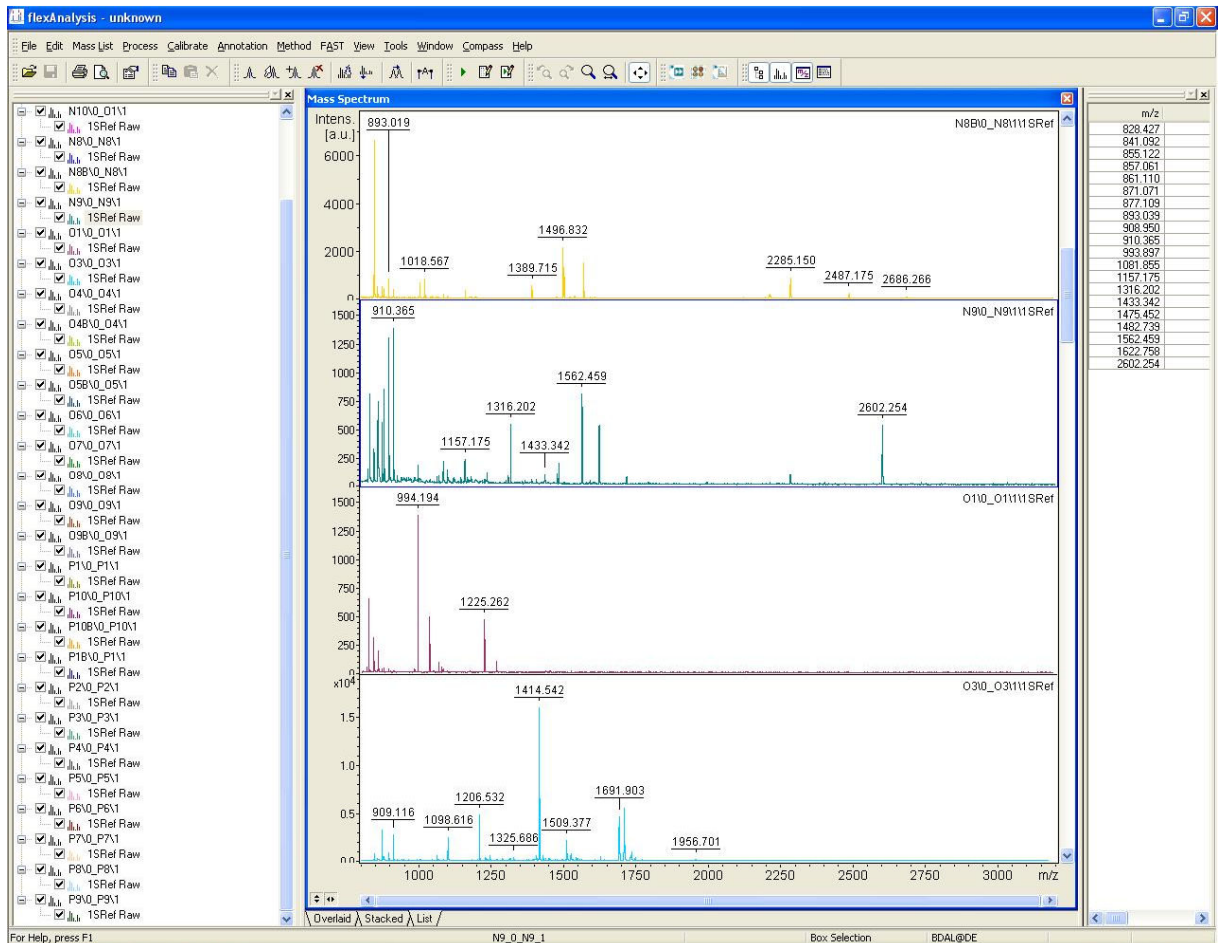


Figura 6: Programa FlexAnalysis. Imagem da interface do programa FlexAnalysis, que é utilizado para analisar os espectros obtidos, antes da comparação com bancos de dados.

Os arquivos gerados pelo programa FlexAnalysis foram utilizados no programa Mascot para a identificação das proteínas nos bancos de dados NCBI.

4.4. Proteínas identificadas

Após a análise em gel bidimensional dos extratos protéicos dos nódulos, um total de 33 *spots* foram analisados, e destes, 23 foram identificados. Alguns dos *spots* selecionados para análise estavam igualmente expressos nas estirpes selvagem e mutante, enquanto outros pareciam diferenciais. Os dados das proteínas selecionadas e analisadas estão nas tabelas 7 e 8.

Dos quinze *spots* que foram discriminados como expressos diferencialmente, foi possível identificar oito de NGR234 e um de *P. vulgaris*. Dos 6 *spots* restantes, três não apresentaram candidatos prováveis e outros três são similares a proteínas de outras espécies vegetais, incluindo algas (*Micromonas sp.*) gramíneas (*Zea mays*) e leguminosas (*Pisum sativum*). Os índices de similaridade de algumas proteínas são baixos, próximos ao índice mínimo (66 para o banco de plantas e 75 para o de Proteobactérias), abaixo do qual a probabilidade ($p > 0,05$) de este ser um evento ao acaso é significativa.

Dos dezoito *spots* selecionados como igualmente expressos foram identificados doze *spots*, sendo que no *spot* P17 foram identificadas duas possíveis proteínas.

No *spot* D1 foi identificada a leghemoglobina de *P. vulgaris*, cuja expressão parece estar aumentada na estirpe mutante. A leghemoglobina tem papel muito importante na fixação de nitrogênio em simbiose, pois fornece oxigênio para a respiração do rizóbio, além de manter um ambiente microaeróbico para a atividade da nitrogenase, a qual é inativada na presença de excesso de oxigênio (UCHIUM et al., 1998). Uma vez que os nódulos na estirpe mutante são maiores e mais abundantes e o vigor da planta inoculada com esta também é maior, este resultado sugere um envolvimento maior desta proteína na eficiência na fixação de nitrogênio nos nódulos da estirpe mutante.

Além de D1, os *spots* D5, D6, D8, D9, D12 e D13 apresentam maior expressão nos nódulos da estirpe mutante do que na estirpe selvagem. Estes *spots* foram identificados como proteínas integrantes do metabolismo de carbono, sugerindo que as vias metabólicas de metabolismo de carbono estão mais ativas na estirpe mutante. A fixação de nitrogênio é uma reação altamente dispendiosa necessitando de grande quantidade de energia proveniente do metabolismo do carbono. A maior utilização de carbono para geração de energia pode estar relacionada à maior taxa de fixação de nitrogênio na estirpe mutante. A proteína presente no *spot* D11 também está envolvida com metabolismo de carbono, agindo como receptor de açúcares. Além disso, o gene *chvE* está envolvido na indução de genes de virulência em *Agrobacterium tumefaciens*, durante a infecção de plantas hospedeiras (CANGELOSI et al., 1990). Estirpes mutantes no gene *chvE* exibem menor faixa hospedeira (HUANG et al., 1990). Dados recentes confirmam que a

proteína ChvE age diretamente como receptor de açúcares, especialmente glucose, quanto interage com proteínas determinantes do processo de virulência de plantas (TSAI et al., 2009). *Rhizobium* e *Agrobacterium* fazem parte da mesma família, Rhizobiaceae, e possuem a mesma organização genômica na região do gene *chvE*, o que sugere a mesma função gênica. Entretanto, a confirmação da função e do efeito fenotípico de mutações no gene *chvE* terá que ser confirmada experimentalmente. O menor nível de expressão de D11 na estirpe *rhcN* também deverá ser confirmada em novos géis 2D.

Os spots D16 e D17 e P18 foram identificados como a proteína nitrogenase reductase, mas a posição de migração de D16 e D17 não corresponde a posição esperada para esta proteína, se considerarmos o pI e massa teóricos da mesma. Essa diferença pode ter ocorrido devido a algum artefato de manipulação, uma vez que D16 e D17 não aparecem no primeiro gel da estirpe mutante, mesmo a amostra utilizada no gel tendo sido a mesma.

As proteínas presentes nos spots P5, P18, D7 e D8 são codificadas a partir de genes presentes no plasmídeo pNGR234a, cujo perfil de expressão de mRNA é bem conhecido (PERRET et al., 1999). Os dados obtidos neste trabalho estão em acordo com o perfil de expressão baseado nos níveis de mRNA, onde os genes *y4vD* (spot D7) *y4mB* (spot P5) e *nifH* (spot P18) são dependentes de NifA; portanto só expressos em condições de fixação de nitrogênio. O gene *y4sG* também é intensamente expresso em nódulos, de acordo com PERRET et al., 1999.

Tabela 7: Proteínas igualmente expressas.

N.	ID	pl	MW	Grupo	Organismo	Proteína Blast	pl-T.	MW-T.	Pont.	Cob.	NPP	NPE
P1	258	4,8	41	Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	putative solute-binding component of ABC	4.95	39	164	42%	22	12
P2	275	4,8	39	Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	DNA-directed RNA polymerase alpha	4.77	37	123	38%	30	11
P3	395	5,7	18	Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	putative nucleoside diphosphate kinase	5.43	15	93	37%	28	9
P4	394	5,5	19	Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	hypothetical protein NGR_b06120	5.43	19	76	45%	35	6
P5	469	4,5	26	Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	Y4mB	4.73	25	71	16%	23	6
P6	360	4,6	28									
P7	301	4,7	36	Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	predicted phosphate ABC transporter, substrate-binding protein	4.86	36	85	26%	20	7
P8	255	4,9	41									
P9	132	4,7	69	Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	4.78	73	262	38%	50	26
P10	149	5,1	59	Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	60 kDa chaperonin 2	5.00	58	163	31%	25	19
P11	185	5,5	51									
P12	365	5,8	27									
P13	384	6,3	25									
P14	252	6,3	41	Green plants	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Full=Glutamine synthetase N-1; AltName: Full=Gln isozyme gamma; AltName: Full=Glutamate-a	6.13	39	106	28%	24	11
P15	240	6,3	42									
P16	297	6,6	37									
P17	186	6,5	52	Proteobacteria	<i>Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum WPP14</i>	hypothetical protein PcarcW_05984	6.56	43	77	31%	30	9
P17	186	6,5	52	Green plants	<i>Vigna unguiculata</i>	inosine monophosphate dehydrogenase	6.34	53	102	23%	33	14
P18	311	5,05	34	Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	nitrogenase reductase	4.89	32	253	51%	25	17

Tabela 8: Proteínas diferentemente expressas.

N.	ID	pl	MW	Grupo	Organismo	Proteína Blast	pI-T.	MW-T.	Pont.	Cob	NPP	NPE
D1	407	5,2	14	Green plants	<i>Phaseolus vulgaris</i>	leghemoglobina	5.37	17	74	49%	31	5
D4	249	6,5	42									
D5	142	5,7	66	Green plants	<i>Zea mays</i>	phosphoglycerate mutase	5.30	61	87	15%	30	11
D6	279	5,7	39	Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	malate dehydrogenase	5.53	34	116	42%	42	12
D7	366	6,1	28	Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	conserved putative 21.4 kDa peroxiredoxin protein [Y4vD].	5.67	22	111	33%	35	10
D8	284	6	39	Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	conserved putative 40.0 kDa D-alanine--D-alanine ligase [Y4sG]	5.70	37	139	41%	27	12
D9	177	5,9	53	Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	ATP dependant phosphoenolpyruvate carboxykinase	5.60	58	179	41%	41	18
D10	156	6,1	61	Green plants	<i>Micromonas sp. RCC299</i>	predicted protein	5.90	53	72	23%	25	8
D11	483	4,40	31	Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	multiple sugar-binding periplasmic receptor ChvE precursor	4.52	38	85	28%	23	9
D12	267	5,19	40	Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	succinyl-CoA synthetase, beta subunit	5.11	42	191	46%	27	16
D13	448	6,33	41	Green plants	<i>Pisum sativum</i>	cytosolic phosphoglycerate kinase	5.73	42	98	28%	26	9
D14	1762	5,5										
D15	1761	5,6										
D16	1921	6		Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR233</i>	nitrogenase reductase	4.88	32	253	51%	25	17
D17	1925	6		Proteobacteria	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	nitrogenase reductase	4.89	32	232	51%	25	17

COCLUSÕES

- Com base nos resultados observados pode-se verificar que de fato a estirpe mutante para o gene *rhcN* nodula mais eficientemente a leguminosa *P. vulgaris*.
- Em relação a resposta da nodulação, não foi encontrada nenhuma proteína que possa explicar a resposta da planta à nodulação.
- Como foi utilizado nódulos maduros como material para a obtenção do extrato protéico, era de se esperar que não fossem encontradas proteínas envolvidas no processo de nodulação.
- Faz-se necessárias novas abordagens experimentais que possam elucidar os mecanismos de nodulação na planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVITCH, R. B., ANDERSON J. C.; MARTIN G. B. Bacterial Elicitation And Evasion Of Plant Innate Immunity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, New York, v. 7, p. 601-611, ago. 2006.

AEBERSOLD, R.; GOODLET, D.R. Mass spectrometry in proteomics. **Chem. Rev.**, Washington, v.101, p. 269-295, fev. 2001.

ANDERSON, J. C.; PASCUZZI, P. E.; XIAO, F.; SESSA, G.; MARTIN, G. B. Host-mediated phosphorylation of type III effector AvrPto promotes *Pseudomonas* virulence and avirulence in tomato. **Plant Cell**, v. 18 p. 502-514. 2006.

AUSMEES, N. H. KOBAYASHI, W. J. DEAKIN, C. MARIE, H. B. KRISHNAN, W. J. BROUGHTON, and X. PERRET. Characterisation of NopP, a type III secreted effector of *Rhizobium* sp. NGR234. **Journal of Bacteriology**, Sweden, v. 186, p. 4774-4780, jul. 2004.

BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S. P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science** 2, Berkeley, v. 276, n. 5313, p. 726-733, mai. 1997.

BERINGER, J.E. R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v. 84, p. 188-198, 1974.

BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Elsevier Science Ltd**. Reviews: TIBTECH, Stevenage, v.17, p.121-127, jun.1999.

BROUGHTON, W. J.; DILWORTH, M. J. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. **Biochemistry Journal**, v. 125 p. 1075-1080, 1971.

BROUGHTON, W. J., S. JABBOURI, and X. PERRET. Keys to symbiotic harmony. **Journal of Bacteriology**, Chambésy/Geneva v. 182, p. 5641-5652, out. 2000.

BROUGHTON, W. J.; HANIN, M.; RELIC, B.; KOPCINSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; SIMS, EK, S.; OJANEN-REUHS, T.; REUHS, B. *et al.* Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234- legume symbioses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, p. 3654–3663, mai. 2006

BÜTTNER, D., D. NENNSTIEL, B. KLÜSENER, and U. BONAS. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of Bacteriology**, Leverkusen, v. 184 p. 2389-98. Mai. 2002.

BUTTNER, D.; BONAS, U. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. **Curr. Opin. Microbiology**, Halle (Saale), v. 9, p. 193–200, mar. 2006.

CAHILL, D.J.; NORDHOFF, E.; O'BRIEN, J.; KLOSE, J.; EICKHOFF, H.; LEHRACH, H. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S.R; DUNN, M.J (Ed.). Proteomics from protein sequence to function. **BIOS Scientific Publishers Limited**, p. 1-22, 2001.

CANGELOSI, G.A.; ANKENBAUER, R.G.; NESTER, E.W. Sugars induce the Agrobacterium virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, v. 87, p. 6708-6712, Set.1990.

CASH, F. Review: Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. **Anal. Chimica Acta**, Foresterhill Aberdeen, v. 372, p. 121-145, fev. 1998.

DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R. Biology and biochemistry of nitrogen fixation. **Elsevier Science**, Murdoch 1991.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of nitrogen fixation. **Nat Rev Microbiol**. Norwich, v. 2, p. 621–631, ago. 1994.

DUNN, M.J (Ed.). Proteomics from protein sequence to function. **BIOS Scientific Publishers Limited**, p. 1-22, 2001.

DEAKIN, W. J., C. MARIE, M. M. SAAD, H. B. KRISHNAN, and W. J. BROUGHTON. NopA is associated with cell surface appendages produced by the type III secretion system of *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Geneva, v. 18, p. 499-507, mai. 2005.

DENARIE, J., DEBELLE, F.; ROSENBERG, C. Signaling and host range variation in nodulation. **Annu Rev Microbiol**, Castanet-Tolosan Cedex, v. 46, p. 497-531, out. 1992.

FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathológica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p.68-74, 1994.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, San Diego v. 66, p. 39-63, mar. 2002.

FREIBERG, C.; FELLAY, R.; BAIROCH, A.; BROUGHTON, W. J.; ROSENTHAL, A.; PERRET, X. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. **Nature**, v. 387, p. 394-401, mai. 1997.

GEURTS, R.; FEDOROVA, E.; BISSELING, T. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. **Curr Opin Plant Biol**, Wageningen, v. 8, n. 4, p. 346-52, jun. 2005.

HAYNES, P.; YATES, J. R. Review article: Proteome profiling – pitfalls and progress. **Yeast**, San Diego, v. 17, n. 2, p. 81-87, 2000.

HUANG M L; CANGELOSI G A; HALPERIN W; NESTER E W
A chromosomal *Agrobacterium tumefaciens* gene required for effective plant signal transduction. **Journal of bacteriology**, Seattle, v. 172 n. 4, p. 1814-22, abr. 1990.

HUGUET, E.; BONAS, U. *hrpF* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes an 87-kDa protein with homology to NolX of *Rhizobium fredii*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Gif-sur-Yvette, v. 10, n. 4, p. 488-498, mai. 1997.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAUJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (ed), **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p.189-295. 1997.

ISAACSON, T.; DAMASCENO, C.M.; SARAVANAN, R.S.; HE, Y.; CATALÁ, C.; SALADIÉ, M.; ROSE, J.K. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. **Nature protocols**, v. 1, p. 769-74, 2006.

JONES, K. M.; KOBAYASHI, H.; DAVIES, B. W.; TAGA, M. E.; WALKER, G. C. How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium–Medicago model. **Nature Reviews Microbiology**, Cambridge, v. 5, p. 619-633, ago. 2007.

KOBAYASHI, H.; NACIRI-GRAVEN, Y.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X.; Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod*-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. **Molecular Microbiology**, Genève, v. 51, p. 335-347, jan. 2004.

KÖPKE, A. Proteomics – a new drug discovery tool. Disponível em: <<http://www.wita-proteomics.com>> Acesso em: 01 nov. 2003.

KRAUSE, A.; DOERFEL, A.; GOTTFERT, M. Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Dresden, v. 15, p. 1228-1235, ago. 2002.

KUKOLJ, C. **Obtenção De Perfil Protéico Bidimensional De Nódulos De *Phaseolus vulgaris* Induzidos Por *Rhizobium sp.* NGR234 E Pela Estirpe *nopJ***. Monografia (Especialização em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MARIE, C.; DEAKIN, W. J.; VIPREY, V.; KOPCINSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; KRISHNAN, H. B.; PERRET, X.; BROUGHTON, W. J. Characterisation of Nops, Nodulation Outer Proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 9, p. 743-751, abr. 2003.

MARIE, B.; SWEENEY, S.T.; POSKANZER, K.E.; ROOS, J.; KELLY, R.B.; DAVIS, G.W. Dap160/intersectin scaffolds the periactive zone to achieve high-fidelity endocytosis and normal synaptic growth. **Neuron**, San Francisco, v. 43, n. 2, p. 207–219, jul. 2004.

MARIE, C.; DEAKIN, W. J.; OJANEN-REUHS T.; DIALLO, E.; REUHS, B.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X. TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Geneva, v. 17, n. 9, p. 958-966, sep. 2004.

McDonald, C.; Vacratsis, P. O.; Bliska, J. B.; Dixon, J. E. The *Yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278 p. 18514-18523. 2003.

MUDGETT, M. B. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Stanford, v. 56, p. 509-531, 2005.

MUKHERJEE, S.; KEITANY, G.; LI, Y.; WANG, Y.; BALL, H. L.; GOLDSMITH, E. J.; ORTH, K. *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. **Science**, v. 312 p. 1211-1214. 2006.

O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 4007-4021, mai. 1975.

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

PATRIARCA, E.J.; TATE, R.; IACCARINO, M. Key role of bacterial NH₄(b) metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Naples, v. 66, p. 203-222, jun. 2002.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Chambésy/Geneva, v. 64, p. 180-201, mar. 2000.

PINTO, F. G. S. Genômica e diversidade de *Rhizobium tropici*, uma espécie tropical microssimbionte do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).128f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

PUEPPKE, S. G.; BROUGHTON, W. J. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host-ranges. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Columbia, v. 12, p. 293-318, abr. 1999.

QUADRONI, M.; JAMES, P. Enhancing high-throughput proteome analysis: the impact of stable isotope labeling. In: PENNINGTON, S.R; DUNN, M.J (Ed.). Proteomics from protein sequence to function. **BIOS Scientific Publishers Limited**. p. 151-169, 2001.

RESENDIS-ANTONIO O.; REED, J. L.; ENCARNACION, S; COLLADO-VIDES, J; PALSSON B. Metabolic Reconstruction and Modeling of Nitrogen Fixation in *Rhizobium etli*. **PLoS Computational Biology**, v. 3, p. 1887-1895, ago. 2007.

SAAD, M. M.; KOBAYASHI, H.; MARIE, C.; BROWN, I.; MANSFIELD, J. W.; BROUGHTON, W. J.; DEAKIN, W. J. NopB, a type III secreted protein of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is associated with pilus-like surface appendages. **Journal of Bacteriology**, Geneva, v. 187, p. 1173-1181, Fev. 2005.

SCHMEISSER, C.; LIESEGANG, H.; KRYSCIAK, D.; BAKKOU, N.; LE QUÉRÉ, A.; WOLLHERR, A.; HEINEMEYER, I.; MORGENSTERN, B.; POMMERENING-RÖSER, A.; FLORES, M.; PALACIOS, R.; BRENNER, S.; GOTTSCHALK, G.; SCHMITZ, R. A.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X.; STRITTMATTER, A. W.; STREIT, W. R. *Rhizobium* sp. Strain NGR234 Possesses a Remarkable Number of Secretion Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Hamburg, v. 75, n. 12 p. 4035–4045. Jun. 2009.

SHAO, F.; MERRIT, P. M.; BAO, Z.; INNES, R. W.; DIXON, J. E. A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. **Cell**, v. 109 p. 575-588. 2002.

SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O. E MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68 p.850-858. 1996.

SKORPIL, P.; SAAD, M. M.; BOUKLI, N. M.; KOBAYASHI, H.; ARES-ORPEL, F.; BROUGHTON, W. J.; DEAKIN, W. J. NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. **Molecular Microbiology**, v. 57 p. 1304-1317. 2005.

SPRENT, J.I.; SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms. **London: Chapman and Hall, 2nd ed.**, NEW YORK p. 256, 1990.

STAHL, E. A.; BISHOP, J. G. Plant–pathogen arms races at the molecular level. **Curr. Opin. Plant. Biol.**, Chicago, v. 3 p. 299-304, 2000.

STRYER, L. Bioquímica. Rio de Janeiro: **Ed. Guanabara Koogan S. A**, 1000 p. 1994.

TSAI Y.; WANG M.; GAO C.; KLUSENER S.; BARON C.; NARBERHAUS F.; LAI E.. Small heat-shock protein HspL is induced by VirB protein(s) and promotes VirB/D4-mediated DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Microbiology**, v. 155, p. 3270–3280, 2009.

UCHIUMI, T.; KUWASHIRO, R.; MIYAMOTO, J.; ABE, M.; HIGASHI, S. Detection of the Leghemoglobin Gene on Two Chromosomes of *Phaseolus vulgaris* by in situ PCR Linked-Fluorescent in situ Hybridization (FISH). **Plant Cell Physiol**, v. 39, n. 7, p. 790-794. 1998.

VIBOUD, G.I.; BLISKA, J.B. Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, New York v. 59, p. 69–89, abr. 2005.

VIPREY, V., A. DEL GRECO, W. GOLINOWSKI, W. J. BROUGHTON, and X. PERRET. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Molecular Microbiology**, v. 28, p 1381-1389, abr. 1998.