



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

Geisi Mello Balsamo

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE VARIEDADES DE FEIJÃO
(*Phaseolus vulgaris*) GENETICAMENTE MODIFICADO
EMBRAPA 5.1 E DE GENÓTIPOS DE MILHO (*Zea mays*) COM
ALTO E BAIXO TEOR DE FLAVONÓIDES**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como um dos pré-requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Dr^a Ana Carolina Maisonnave Arisi

**FLORIANÓPOLIS
2016**

GEISI MELLO BALSAMO

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE VARIEDADES DE FEIJÃO
(*Phaseolus vulgaris*) GENETICAMENTE MODIFICADO
EMBRAPA 5.1 E DE GENÓTIPOS DE MILHO (*Zea mays*) COM
ALTO E BAIXO TEOR DE FLAVONOÍDES**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como um dos pré-requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Dr^a Ana Carolina Maisonnave Arisi

FLORIANÓPOLIS
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Balsamo, Geisi

Análise proteômica de variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*) geneticamente modificado Embrapa 5.1 e de genótipos de milho (*Zea mays*) com alto e baixo teor de flavonoides / Geisi Balsamo ; orientadora, Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi – Florianópolis, SC; 2016.

131 PG.

Tese (Doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Análise Proteômica em Alimentos. 3. Eletroforese Bidimensional. 4. Feijão EMBRAPA 5.1. 5. Milho com alto teor de flavonoides. I. Maisonnave Arisi, Dr. Ana Carolina. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE VARIEDADES DE FEIJÃO
(*Phaseolus vulgaris*) GENETICAMENTE MODIFICADO
EMBRAPA 5.1 E DE GENÓTIPOS DE MILHO (*Zea mays*) COM
ALTO E BAIXO TEOR DE FLAVONOÍDES**

por

GEISI MELLO BALSAMO

Tese julgada foi julgada adequada para obtenção do Título de “**Doutor** em Ciências dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos.

Florianópolis, 30 de março de 2016.

Prof^a. Dr^a. Roseane Fett
Coordenadora

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Maisonnave Arisi
Orientadora (UFSC)

Prof. Dr. Jeverson Franzzon
Membro (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Emanuel Maltempi de Souza
Membro (UFPR)

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Oliveira Costa
Membro (UFSC)

Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner
Membro (UFSC)

Eu dedico este trabalho à sociedade brasileira, que financia a pesquisa pública e a formação intelectual nas Universidades Federais do Brasil.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à energia Divina que me permite a vida todos os dias.

À Prof Ana Carolina Maisonnave Arisi, por oportunizar o trabalho nos projetos do Laboratório de Biologia de Molecular CAL e por fornecer a estrutura completa para que o trabalho fosse realizado. Agradeço pela correção dos artigos científicos e pelo tempo disponibilizado em orientação.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela estrutura e pelos professores que a compõem, aos quais participei das aulas.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, pelo curso disponibilizado. Ao secretário do Programa, Sérgio, pelas informações e pela ajuda na resolução dos problemas que surgiram.

Agradeço ao meu filho Gabriel e à minha mãe Gisele, por terem sido nada menos que o meu horizonte, do início ao fim deste caminho chamado doutorado. Por terem suportado minha angústia nos momentos difíceis, de ausência e de escolhas.

Ao meu pai Beto, por ser o primeiro a falar que através do estudo podemos verdadeiramente evoluir, princípio que me trouxe até aqui.

Ao meu marido Fabrício, que se juntou à mim durante essa caminhada e foi companheiro. Foi conforto quando encontrei amargura. Me incentivou à terminar, quando eu quis desistir.

À minha amiga-irmã Eunice Ilha, que me faz merecedora de sua amizade, e que me mostrou um caminho de Luz durante o período de doutorado. Gratidão por me oportunizar o reencontro com a União.

Aos queridos colegas e amigos Carla e Pedro, por terem dividido a bancada proteômica e por serem parceiros no trabalho, e pela amizade. Por suportarem minha hiperatividade.

Aos meus queridos colegas do LabMol, Pamela, Tomas, Gabriela, Mirella, Fábio, Andrea, Ferdi, por termos compartilhado os momentos de trabalho, diversão e de tensão, sempre um tanto enriquecedores.

Ao CEBIME UFSC por disponibilizar os equipamentos de Espectrometria de Massa; às funcionárias Elis e Martina, que auxiliaram nos experimentos.

Ao Profº Hernan Terenzi, pela oportunidade de doutorado sanduíche através do programa CAPES-COFECUB. Aos colegas

do INRA-DIJON, especialmente Olivier Lamotte, que me mostrou uma outra forma de trabalho e que pacientemente me ensinou técnicas de BIOMOL.

À Embrapa Arroz e Feijão, representada pelo Dr Josias Correa Faria, que disponibilizou os grãos de feijão utilizados. À Embrapa CENARGEN, pelo curso formação em espectrometria de massas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas concessões de bolsa DT12 (01/08/2011 – 30/05/2012) e de doutorado (01/06/2012 – 31/10/2013). À CAPES pela concessão da bolsa no projeto CAPES-COFECUB (13/11/2013 – 01/04/2014).

Ao mestre Gabriel, que me mostrou a luz, o caminho e me fortalece com sua companhia.

O Bicho

*Vi ontem um bicho
Na imundície do pátio
Catando comida entre os detritos.
Quando achava alguma coisa,
Não examinava nem cheirava:
Engolia com voracidade.
O bicho não era um cão,
Não era um gato,
Não era um rato.
O bicho, meu Deus, era um homem.*

(Manuel Bandeira)

RESUMO

Análises amplas de perfil podem complementar a avaliação de culturas vegetais alimentares. A proteômica comparativa permite observar diferenças entre o perfil de proteínas entre duas culturas equivalentes, que diferem apenas pela expressão de uma característica. Neste contexto, as técnicas de eletroforese bidimensional (2-DE) seguida de espectrometria de massa (MS) foram utilizadas para avaliar variedades de feijão geneticamente modificado (GM) Embrapa 5.1 e genótipos de milho mutantes com diferentes teores de flobafenos. No primeiro trabalho, o perfil de proteínas dos grãos de duas variedades de feijão, Pérola e Pontal, derivadas do evento Embrapa 5.1, foram comparadas com suas contrapartes não-GM. Foram detectados 23 *spots* diferencialmente acumulados entre Pérola GM e Pérola não-GM e 21 *spots* diferencialmente acumulados entre Pontal GM e Pontal não-GM. Entre os *spots* detectados como diferencialmente acumulados, oito proteínas foram identificadas em Pérola e quatro proteínas em Pontal. A função das proteínas identificadas nas variedades Pérola e Pontal não foram as mesmas, indicando que a variabilidade observada não está relacionada a transformação genética. Além disso, aplicamos análise de componentes principais (PCA) aos dados obtidos por 2-DE e a variação entre as variedades foi explicada nos dois primeiros componentes. No segundo trabalho, comparou-se os proteomas dos grãos de dois genótipos de milho não comerciais, *P1-rr* (R) e *P1-ww* (W) que apresentam alto e baixo conteúdo de flobafenos, respectivamente. A comparação por ANOVA resultou em 55 *spots* diferencialmente expressos. Após análise de MS, oito proteínas foram identificadas. Aplicou-se PCA a porcentagem de volume de 135 *spots* combinados em todos os seis géis analisados, e foi observada a separação dos perfis de proteína dos dois genótipos de milho. Os resultados obtidos nos dois estudos demonstram que a técnica 2-DE seguida por MS, acompanhada de PCA, é aplicável para análise de grãos que se diferenciam pela expressão de uma característica, assim como é possível diferenciar cultivares GM e não GM.

Palavras-chave: proteômica, eletroforese bidimensional, 2-DE, PCA, *Phaseolus vulgaris*, Embrapa 5.1, Feijão comum GM, *Zea mays*, flobafenos, MS.

ABSTRACT

Profile analyses are complementary for crop food assessment. The comparative proteomics allows observing differences between the protein profiles between two equivalent cultures that differ in a feature. In this context, two-dimensional electrophoresis (2-DE) technique was used followed by mass spectrometry (MS) to evaluate genetically modified (GM) common bean varieties (EMBRAPA 5.1) and maize genotypes with different phlobaphenes contents. In the present work grain proteome profiles of two Embrapa 5.1 common bean varieties, Pérola and Pontal, and their non-GM counterparts were compared by two dimensional gel electrophoresis (2-DE) followed by mass spectrometry (MS). Analyses detected 23 spots differentially accumulated between GM Pérola and non - GM Pérola and 21 spots between GM Pontal and non-GM Pontal. Among them, eight proteins were identified in Perola varieties, and four proteins were identified in Pontal. Although, they were not the same proteins in Perola and Pontal varieties, indicating that the variability observed may not be due the genetic transformation. Moreover, we applied principal component analysis (PCA) on 2-DE data, and variation between varieties was explained in first two principal components. In this study the grain proteomes of the two genotypes of non-commercial maize, P1-rr (R) and P1-ww (W), with high and low flavonoid content, were also compared. ANOVA comparison resulted in 55 spots differentially accumulated. After MS analyses, eight proteins were identified. PCA was applied in the volume percentage of the 135 matched spots in all six gels. The multivariate analysis showed the separation of protein profiles of the two maize genotypes using 2-DE data. The results of both studies show that 2-DE followed by MS, accompanied by PCA, is applicable for profile analysis of grains that differ by one characteristic, and it is possible to differentiate between GM and non-GM varieties.

Key words: Proteomics, 2-DE, Two-dimensional electrophoresis, 2-DE, PCA *Phaseolus vulgaris*, Embrapa 5.1, Commun bean, GM, *Zea mays*, phlobaphens, MS.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1.1.1 Países com maior área (milhões de ha) de cultivo de plantas geneticamente modificadas	37
Figura 1.2.1 Imagem da mosca branca (<i>Bemisia tabaci</i>) e sintomas do vírus do mosaico dourado no feijoeiro.....	39
Figura 1.2.2 Plantas de feijoeiro GM e não-GM inoculadas com o vírus do mosaico dourado.....	40
Figura 1.3.1.1 Grãos de milho dos fenótipos <i>P1-ww</i> e <i>P1-rr</i>	45
Figura 1.4.2.1.1 Esquema da técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida.....	55

CAPITULO II

Figure 2.1 Draft of experimental design.....	72
Figure 2.3.1 2-DE reference gels of Pérola and Pontal varieties, GM and non-GM.....	80
Figure 2.3.2 Identified spots differentially detected between GM and non-GM in Pérola and Pontal analyses. Those images were selected in ImageMaster software in one of the triplicate gels. .	82
Figure 2.3.3 Spot volume percentages (% vol) of identified proteins to (a) Pérola and (b) Pontal analyses from triplicate gels	82
Figure 2.3.4 PCA score plots representing GM and non-GM comparison: (a) PCA plot of Pontal varieties (GM (squares) and non-GM (diamonds)). (b) PCA plot of Pérola varieties (GM (squares) and non-GM (diamonds))	88
Figure 2.3.5 PCA score plots of matched spots volume (% vol) of 2-DE gels from grains of Pontal (circles), GM Pontal (diamonds), Pérola (squares), and GM Pérola (triangles) common beans ...	88
Figure S2.1 2-DE gels of Pérola, GM Pérola, Pontal and GM Pontal varieties showing spots differentially accumulated between GM and non-GM varieties and selected for MS analysis	90

CAPITULO III

Figure 3.3.1 Representative 2-DE gels of protein extracts from maize grains: *P1-ww* has low flavonoid content and *P1-rr* has high flavonoid content.....107

Figure 3.3.2. Identified protein spots differentially detected between *P1-rr* and *P1-ww* using 2-DE analysis. Identified spots are indicated with arrows. Images were selected in ImageMaster[®] software from one of the three gels.....108

Figure 3.3.3 Spot volume percentage (% vol) of identified proteins calculated by ImageMaster software, using 2-DE gels data of *P1-ww* and *P1-rr* proteins extracts.....108

Figure 3.3.4 Principal Component Analysis plot of 2-DE matched protein spots (% vol) of *P1-ww* and *P1-rr* maize grains.....111

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1.1.1 Culturas geneticamente modificadas aprovadas no Brasil, número de eventos e características modificadas.....	35
Tabela 1.1.2 Exemplos de plantas da nova geração das Culturas GM	36
Tabela 1.2.1 Produção feijão total no Brasil 2014/2015 (1 ^a , 2 ^a e 3 ^a safra).....	38

CAPITULO II

Table 2.3.1 Total spot number in 2-DE gels (Coomassie Blue stained) of Pérola and Pontal varieties common bean grains	79
Table 2.3.2 Differentially Accumulated Spots in 2-DE Analyses and Identified Proteins by Mass Spectrometry (MS or MS/MS)	81
Table 2.3.3 2-DE identified proteins by MS and MS/MS in Pérola and Pontal varieties, comparing GM and non-GM counterpart .	86
Table S2.1 Normalized volume of differentially accumulated spots in Pontal and Pérola 2-DE analyses.....	91

CAPITULO III

Table 3.3.1 Total spot number, matched spots, slope and correlation coefficient (R2) of scatter plots of 2-DE triplicates of colorless maize grains P1-ww (W1, W2 and W3) and red maize grains P1-rr (R1, R2 and R3).....	106
Table 3.3.2 Matched spots, slope and correlation coefficient (R2) of scatter plots of 2-DE, comparing in each run, colorless maize grains P1-ww (W1, W2 and W3) and red maize grains P1-rr (R1, R2 and R3).....	106
Table 3.3.3 Spots differentially accumulated in 2-DE gels by ImageMasterTM analysis and identified proteins by PMF of colorless maize grains (<i>P1-ww</i>) and red maize grains (<i>P1-rr</i>).	109

Table 3.3.4 List of differentially expressed proteins identified by MS-PMF of colorless maize grains (<i>P1-ww</i>) and red maize grains (<i>P1-rr</i>).....	113
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

2-DE	Eletroforese bidimensional
Ac	Elemento ativador
AtAHAS	Acetohidroxiácido síntase
CHAPS	3- [(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CNBS	Conselho Nacional de Biossegurança
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DFR	di-hidroflavonol 4-redutase
Ds	Elemento dissociador
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	ácido etilenoglicol tetra-acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPSPS	<i>5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GE	General Eletric
GM	Genticamente Modificado(s)
IPG	<i>imobilized pH gradient</i>
MALDI	Matrix-assisted laser desorption / ionization
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OGM	Organismo(s) Geneticamente Modificado(s)
PCA	Análise de componentes principais
PC	Componente Principal
pI	ponto isoelétrico
PMSF	fluoreto de metil sulfonil
RI	Resistência à Insetos
hpRNA	Ácido ribonucléico <i>Hairpin</i> Ácido ribonucléico
dsRNA	dupla fita
RNAi	Ácido ribonucléico de interferência
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS PAGE	dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida
Spots	Spots de proteínas detectados nos géis de eletroforese bidimensionais
TFA	ácido trifluoracético
TH	Tolerância à Herbicida

TOF
UE
VMDF

Time of Flight
União Européia
Vírus do Mosaico Dourado do Feijoeiro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	25
OBJETIVO GERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
CAPÍTULO I.....	30
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	32
1.1 PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS.....	33
1.2 FEIJÃO COMUM (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L) GENETICAMENTE MODIFICADO EMBRAPA 5.1.....	37
1.3 MILHO (<i>ZEA MAYS</i>).....	41
1.3.1 MILHOS <i>P1-WWE P1-RR</i>	43
1.4 AVALIAÇÃO DE CULTURAS BIOTECNOLÓGICAS.....	46
1.4.1 TECNOLOGIAS “ÔMICAS” COMO FERRAMENTAS COMPLEMENTARES NA AVALIAÇÃO DE PLANTAS.....	49
1.4.2 ANÁLISE PROTEÔMICA.....	51
1.4.2.1 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE).....	53
1.4.3 ESPECTROMETRIA DE MASSA – MALDI TOF E MALDI TOF/TOF.....	57
1.5 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).....	58
1.6 REFERÊNCIAS.....	59
CAPÍTULO II.....	69
COMPARATIVE PROTEOMIC ANALYSIS OF TWO VARIETIES OF EMBRAPA 5.1 COMMON BEAN (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L.) AND THEIR NON-GM COUNTERPARTS.....	72
2.1 INTRODUCTION.....	74
2.2 MATERIAL AND METHODS.....	76
2.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	79

2.4	REFERENCES.....	92
	CAPÍTULO III.....	97
3	PROTEOME COMPARISON OF GRAINS FROM TWO MAIZE GENOTYPES, WITH COLORLESS KERNEL PERICARP (<i>P1-WW</i>) AND RED KERNEL PERICARP (<i>P1-RR</i>).....	98
3.1	INTRODUCTION.....	100
3.2	MATERIAL AND METHODS.....	102
3.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	105
3.4	REFERENCES.....	114
	APÊNDICE A – RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE DOUTORADO CAPES/COFECUB - BEX 11320/13-3.....	121

INTRODUÇÃO

A crescente utilização da biotecnologia para melhoramento e modificação de plantas utilizadas na produção de ração animal e na alimentação humana amplia a necessidade de estudos que investiguem o metabolismo das novas variedades introduzidas comercialmente e suas consequências tanto no meio ambiente como para a saúde humana.

Uma nova planta geneticamente modificada (GM) antes de ser liberada para plantio e consumo é sistematicamente avaliada a partir do conceito de “equivalência substancial”. Essa abordagem sugere a utilização de técnicas que investiguem compostos alvos e que sejam aplicadas para comparar a planta GM e a planta não-GM isogênica que tenha um histórico de uso seguro. A avaliação de uma variedade GM deve indicar que a inserção do DNA recombinante para a aquisição de uma nova característica não traz consigo efeitos indesejados (não intencionais), e ainda, se apresentar, que esses não causem algum impacto à saúde e ao meio ambiente.

Nesse sentido, análises amplas de perfil como transcriptômica, proteômica e metabolômica têm sido aprimoradas e propostas para complementar a avaliação de segurança de novas plantas obtidas por melhoramento clássico e por modificação genética. Tais análises são relevantes pois medem simultaneamente e comparam centenas de componentes moleculares, sem a identificação prévia desses, permitindo o estudo das diferenças encontradas entre a nova planta e sua isolinha considerada segura.

As culturas GM são plantas de fácil propagação e são elas mesmas eficientes sistemas biológicos para a elucidação molecular dos processos genéticos e epigenéticos que envolvem a expressão de transgenes. Técnicas de análise que avaliem esses processos podem gerar conhecimento prático sobre questões de biossegurança, ou ainda, alimentar bancos de informações para estudos futuros.

A proteômica é a ciência que engloba o estudo das proteínas, incluindo abordagens não-alvo, que permitem analisar quantitativa e qualitativamente o conjunto de proteínas (proteoma) de uma célula, tecido ou organismo. O proteoma representa a expressão funcional do genoma em determinado

momento e pode refletir o estado fisiológico de uma planta, possibilitando a avaliação de resposta a fatores bióticos, abióticos e alterações no genoma, como as mutações induzidas e a transgenia.

Técnicas que fornecem o perfil de proteínas, como a eletroforese bidimensional (2-DE), separam as proteínas extraídas de uma amostra e são geralmente seguidas de uma técnica de identificação das proteínas de interesse, como a espectrometria de massa. A identificação das proteínas, assim como suas respectivas funções no metabolismo da cultura é feita a partir dos dados obtidos sobre a estrutura primária dos peptídeos e/ou de aminoácidos, quando pesquisados em bancos de dados. A análise de um proteoma depende do tratamento de uma grande quantidade de dados obtidos e que precisam ser analisados com o auxílio de ferramentas estatísticas. Neste sentido, análises multivariadas, como Análise de Componentes Principais (PCA), podem ser úteis para o agrupamento e/ou classificação das amostras.

Neste trabalho objetivou-se explorar a técnica 2-DE seguida por MS como uma ferramenta de análise ampla comparativa e para isso foram avaliadas variedades de grãos, que diferem entre si pela expressão de uma característica. A PCA foi utilizada como ferramenta de agrupamento das amostras a partir dos dados de acúmulo de proteínas. A abordagem utilizada é sugerida como complementar as análises direcionadas em avaliações de segurança para culturas GM, pois fornece informações sobre proteínas específicas.

O presente trabalho está dividido em três capítulos. O primeiro capítulo apresenta uma revisão bibliográfica referente aos estudos que foram desenvolvidos no doutorado e que serão apresentados nos CAPÍTULOS II e III.

No segundo capítulo da tese é apresentada a análise proteômica de duas variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), Pérola e Pontal, contendo o evento Embrapa 5.1, totalmente desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias e aprovado para plantio e comercialização no Brasil desde 2011. A análise proteômica aplicada identificou proteínas que foram diferencialmente acumuladas entre os grãos da variedade que recebeu a inserção do DNA recombinante e sua isolinha não transformada. Para tal, foram utilizadas as técnicas de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

(2-DE) e posterior espectrometria de massa (MALDI-TOF MS/MS) para identificação de proteínas.

O terceiro capítulo é o estudo comparativo do proteoma de duas variedades de milho (*Zea mays*) mutantes não comerciais, *P1-ww* e *P1-rr*, utilizando as técnicas 2-DE seguida e espectrometria de massa (MS) com identificação por *peptide mass fingerprint* (PMF). As variedades de milho estudadas foram desenvolvidas pelo *Maize Genetics Cooperation Stock Center*, e diferem entre si na produção de flobafenos, classe de flavonóides que designa coloração roxa aos grãos e ao sabugo do milho e que possuem ação antioxidante quando ingeridos na alimentação. *P1-rr* é denominado milho roxo, e apresenta teor aumentado de flabofenos e *P1-ww* é denominado milho branco, por apresentar coloração clara e teor reduzido de flobafenos.

A Análise de Componentes Principais complementou a análise proteômica nos dois estudos apresentados. A ferramenta estatística multivariada avaliou a separação dos genótipos, em cada estudo, utilizando para isso os valores de percentagem de volume dos *spots* detectados nos géis 2-DE.

O apêndice A é o relatório do trabalho desenvolvido no INRA (*Institute National de Recherche Agroalimentaire*) em Dijon na França, durante quatro meses de doutorado sanduíche. Na oportunidade, foram utilizadas técnicas de biologia molecular para produção da proteína EPSPS (*5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase*).

OBJETIVO GERAL

Utilizar a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) seguida por espectrometria de massa (MS) para comparar o perfil de proteínas de grãos geneticamente modificados (GM) de feijão Embrapa 5.1 com os grãos da variedade isolinha e ainda, avaliar as diferenças entre os perfis de proteínas de dois genótipos mutantes de grãos de milho com diferente expressão de flobafenos, *P1-ww* e *P1-rr*.

Desse modo o objetivo geral foi demonstrar a abordagem 2-DE/MS como uma ferramenta na avaliação de grãos obtidos por modificação genética ou outras técnicas de melhoramento.

Objetivos Específicos

- Aplicar a técnica de eletroforese bidimensional e analisar os géis para avaliar o perfil de proteínas nos grãos dos dois genótipos de milhos mutantes: *P1-ww* e *P1-rr*, que apresentam baixo e alto teor de flobafenos, respectivamente.

- Analisar por espectrometria de massa, MALDI-TOF, os *spots* de proteínas encontrados como diferencialmente acumulados na análise dos géis bidimensionais.

- Aplicar Análise de Componentes Principais (PCA) aos dados obtidos na análise proteômica dos genótipos de milho e avaliar a separação das amostras no diagrama relacionada às diferenças entre os perfis de proteínas.

- Utilizar 2-DE para obter o perfil de proteínas de quatro variedades de feijoeiro, Pérola, Pérola Embrapa 5.1, Pontal e Pontal Embrapa 5.1. Comparar o perfil de proteínas das variedades GM com suas respectivas isolinhas não-GM, utilizando o programa ImageMaster.

- Analisar por espectrometria de massa, MALDI-TOF e MALDI-TOF/TOF, os *spots* de proteínas encontrados como diferencialmente acumulados na análise dos géis bidimensionais.

- Identificar proteínas através dos espectros de massa obtidos por MS, em bancos de dados.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

A elucidação da estrutura do DNA em dupla hélice, em 1953 (WATSON E CRICK, 1953), permitiu avanços na utilização da biotecnologia para estudos de funcionamento dos organismos vivos, melhoramento genético de plantas, utilização de microrganismos na produção industrial, entre outros. Esses avanços permitiram o desenvolvimento de técnicas para a realização do processo conhecido como modificação genética, que permite que genes individuais, componentes de um código de DNA, sejam modificados para expressar ou reprimir características importantes, tais como maturação de frutos (KRAMER E REDENBAUGH, 1994), resistência à doenças (ARAGAO *et al.*, 1998) e tolerância à herbicidas (BRANDAO, BARBOSA E ARRUDA, 2010).

A produção de uma planta geneticamente modificada (GM) baseia-se em uma transformação genética através da inserção de uma ou mais sequências de DNA no genoma receptor, geralmente sequências isoladas de espécies diferentes, que garantirão a expressão do(s) gene(s) de interesse (ANKLAM E NEUMANN, 2002). A transformação genética envolve o isolamento do DNA, a definição da modificação do DNA e a transferência do DNA recombinante para o genoma do organismo alvo, que inclui a construção do inserto e a seleção da forma de transferência (MIRAGLIA *et al.*, 2004). A inserção de um OGM contém pelo menos três elementos:

- promotor, responsável pela expressão do gene inserido/alterado;
- gene inserido/alterado que codifica uma característica específica desejada;
- terminador, que sinaliza o término da transcrição do gene inserido/alterado.

A inserção do transgene no genoma receptor pode ser de forma direta ou indireta. No método indireto é utilizado um vetor, como *Agrobacterium tumefaciens* (CHILTON *et al.*, 1977) ou *Agrobacterium rhizogenes* (CHILTON *et al.*, 1982), que através de um DNA de transferência intermedia a introdução do gene de interesse no organismo alvo. A transferência direta de genes é realizada através de processos físicos ou químicos que modificam a parede e/ou a membrana da célula receptora,

introduzindo o DNA exógeno aleatoriamente. Um exemplo é a técnica de bombardeamento de micropartículas, que através de jatos de alta pressão, introduz nas células as partículas de ouro ou tungstênio pré-revestidas do fragmento DNA de interesse (FISK E DANDEKAR, 1993). Essa técnica foi utilizada na inserção do transgene no feijão Embrapa 5.1, uma das plantas estudadas neste trabalho (ARAGAO *et al.*, 1998).

No Brasil, organismos geneticamente modificados (OGM) são definidos como toda entidade biológica cujo material genético (DNA/RNA) foi alterado por meio de qualquer técnica de engenharia genética, de uma maneira que não ocorreria naturalmente (BRASIL, 2015b).

Termos e conceitos em biotecnologia moderna são importantes ferramentas que facilitam a comunicação científica, a compreensão de legislação e as recomendações internacionais (SCBD, 2000):

• **Modificação genética pode ser substituída pelos termos Engenharia Genética (EG) ou Biotecnologia Moderna; é a aplicação de:**

a) Técnicas *in vitro* de ácidos nucleicos, incluindo ácido desoxiribonucléico recombinante (DNAr) e injeção direta de ácido nucleico em células ou organelas; ou

b) Fusão de células que não da mesma família taxonômica, que ultrapassam as barreiras naturais reprodutivas ou de recombinação fisiológica e que não sejam técnicas de reprodução e seleção utilizadas tradicionalmente.

• **Organismos Geneticamente Modificados:** é frequentemente utilizado como sinônimo de **Organismos Vivos Modificados (OVMs)**. São considerados OVM os organismos vivos que possuam uma combinação nova de material genéticos obtido através do uso de biotecnologia moderna.

• **Cultura Geneticamente Modificada** é a denominação utilizada para as plantas geneticamente modificadas, também conhecidas como transgênicas ou culturas biotecnológicas. Podem ser férteis ou estéreis; os últimos são incapazes de reproduzir.

A primeira cultura geneticamente modificada foi liberada para plantio, comercialização e consumo em 1994, nos Estados Unidos da América, através da autoridade *Animal and Plant Health Inspection Service* (APHIS), ligada ao departamento de

Agricultura desse país. A cultura em questão é o tomate FLAVR SAVR™, que apresentava inicialmente a supressão da transcrição da enzima endógena poligalacturonase, retardando assim o seu amadurecimento (KRAMER E REDENBAUGH, 1994).

No Brasil, o primeiro parecer técnico de liberação de uma planta GM foi em 1998 e autorizou a comercialização e plantio da soja Roundup Ready™ tolerante ao herbicida glifosato. Atualmente existem liberações comerciais expressando mais de uma característica intencional, contendo dois insertos ao mesmo tempo, como tolerância a herbicida (TH) e resistência à insetos (RI). As culturas transgênicas liberadas para plantio no Brasil pela Comissão Técnica Nacional de Biotecnologia (CTNBio) são a soja, o milho, o feijão, o algodão e, mais recentemente, o eucalipto (Tabela 1.1.1) (BRASIL, 2015b).

Tabela 1.1.1 Culturas geneticamente modificadas aprovadas no Brasil, número de eventos e características modificadas

Planta	Característica	Nº eventos aprovadas
Soja		6
Milho	TH, RI ou as duas características	29
Algodão		12
Feijão	Resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro	1
Eucalipto	Aumento volumétrico de madeira	1

TH: Tolerância à herbicidas; RI: Resistência à insetos.

Fonte: adaptado *site* da CTNBio

As culturas biotecnológicas podem ser classificadas pelo tipo da característica expressa. As plantas GM de primeira geração contêm eventos que expressam a característica de tolerância a herbicidas (glifosato, glufosinato e oxinyl) e/ou resistência a doenças causadas por insetos (formas das proteínas *Cry* derivadas do *Bacillus thuringiensis*) e são a maioria das culturas autorizadas atualmente (BOUIS, CHASSY E OCHANDA, 2003). Uma nova geração de plantas GM tem sido desenvolvida por pesquisadores e/ou empresas, e apresentam características como tolerância ao estresse abiótico, incremento nutricional, alteração da qualidade do produto ou melhora do

potencial de rendimento no cultivo. Incluem plantas consideradas funcionais (Tabela 1.1.2).

Tabela 1.1.2 Exemplos de plantas da nova geração das Culturas GM

Alvo da modificação	Cultura	Característica da inserção	Referência
β- caroteno	Arroz	Incremento de pró vitamina A; prevenção do raquitismo e mortalidade infantil	(YE, X. D. <i>et al.</i> , 2000)
Folato	Arroz	Incremento de folato; prevenção de defeitos no tubo neural (formação embrionária)	(STOROZHENKO <i>et al.</i> , 2007)
Ácido oleico	Soja	Incremento de 100x na produção de ácido oléico em soja; Auxilia no controle da pressão sanguínea	(WAGNER <i>et al.</i> , 2011)
Antocianinas	Tomate	Aumento da expressão de antocianinas – aumentou o tempo a vida de ratos com câncer de próstata	(BUTELLI <i>et al.</i> , 2008)
Carboidratos; Fosfoenol Peroxidase	Batata	Redução do potencial de formação de acrilamida; limita a formação de açúcares redutores pela degradação do amido; redução da atividade de Fosfoenol peroxidase;	(ISAAA, 2015)

A estimativa das Nações Unidas sobre o crescimento populacional para as próximas décadas, de que seremos em torno de 10 bilhões em 2050, posiciona desafios sobre como produzir alimentos suficientes para suprir a demanda mundial (UN, 2015). Os produtores de diversos países buscam o aumento da produtividade de grãos cultivados e assim, a cada ano cresce o plantio de monoculturas geneticamente modificadas (GM) (JAMES, 2015).

Segundo o levantamento do *International Service for the Acquisition of Agro-Biotech Applications* (ISAAA) a área mundial ocupada pelo plantio de plantas biotecnológicas em 2014 foi de 181.5 milhões de hectares (JAMES, 2015) (Figura 1.1.1).



* Área total: 181.5 milhões de ha em 28 países

Fonte: ISAAA, 2016

Figura 1.1.1 Países com maior área (milhões de ha) de cultivo de plantas geneticamente modificadas

A área do cultivo de plantas geneticamente modificadas em 2014 atingiu 42,2 milhões de hectares no Brasil, posicionando o país em segundo lugar entre os que cultivam transgênicos. Por exemplo, 93% da área total de soja plantada em 2014 foi de cultivares transgênicas, para o milho (safras de inverno e verão) a proporção foi de 82% e para o algodão, 68% (JAMES, 2015).

1.2 FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L) GENETICAMENTE MODIFICADO EMBRAPA 5.1

O feijão é uma leguminosa cultivada em aproximadamente 100 países e totalizou uma produção de 26 bilhões de toneladas em 2014, envolvendo um grande número de gêneros e espécies (FAOSTAT, 2015). O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é consumido por bilhões de pessoas principalmente na América Latina e África, e representa uma importante fonte vegetal de proteínas, carboidratos complexos, ferro, vitaminas (principalmente do complexo B) e fibras (CARVALHO, J. L. *et al.*, 2015).

O feijoeiro comum pertence à família Fabaceae (leguminosae); ao gênero *Phaseolus* e espécie *Phaseolus vulgaris* L, e é um dos plantios de elevada relevância socioeconômica para o Brasil, cultivado principalmente para obtenção de grãos, verdes ou secos, para consumo humano (FARIA *et al.*, 1996; BRASIL, 2011b).

O Brasil é um grande produtor e consumidor de grãos de feijão, majoritariamente das espécies *Phaseolus vulgaris* L e *Vigna unguiculata* (L) Walp (BRASIL, 2008). Dados de consumo *per capita* indicam que o brasileiro consome em média 16,5 kg/ano, confirmando que o feijão é um alimento de consumo frequente, que o torna um elemento de representação cultural do nosso país (MAPA, 2011).

Na safra 2014/15 as 5 regiões brasileiras totalizaram uma produção de cerca de 3,2 milhões de toneladas, sendo a Região Sul a maior produtora com 950,2 mil toneladas, seguida pela Região Centro-Oeste que produziu em torno de 788,7 mil toneladas (BRASIL, 2015a) (Tabela 1.2.1).

Tabela 1.2.1 Produção feijão total no Brasil 2014/2015 (1^a, 2^a e 3^a safra)

Regiões	Safra 2014/15 (produção em mil t)
Sul	950,2
Centro-Oeste	788,7
Sudeste	706,6
Nordeste	661,6
Norte	78,3
BRASIL	3.185,4

Fonte – CONAB, 2015.

Nas regiões de clima tropical em que o feijoeiro comum é produzido muitos fatores desfavoráveis são responsáveis por perdas potenciais, entre eles doenças, insetos, secas e baixa fertilidade do solo. Nesse contexto, a doença do vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF) representa uma restrição para a produtividade na América Latina (BONFIM *et al.*, 2007; CARVALHO, J. L. V. *et al.*, 2015).

O VMDF é um vírus do gênero *Begamovirus* (família *Geminiviridae*), transmitido às plantas de feijoeiro através da mosca branca (*Bemisia tabaci*) (Figura 1.2.1b). A ação sobre o feijoeiro foi evidenciada no início da década de 70, em lavouras do Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, durante os plantios da seca, onde a doença foi responsável por uma redução de produtividade significativa devido ao surgimento e disseminação do biotipo B da mosca branca (FARIA *et al.*, 1996) .

Os sintomas da doença do VDMF no feijoeiro incluem lesões em forma de mosaicos amarelados nas nervuras das

folhas, diminuição no crescimento da planta e deformação das vagens (Figura 1.2.1a) (ARAGÃO E FARIA, 2010). Países da América do Sul e Central, México e Estados Unidos têm suas lavouras afetadas pela doença do VMDF principalmente durante o verão, período em que as populações de mosca branca são maiores. No Brasil, a infecção por VMDF vem sendo agravada pela expansão da produção de soja em áreas de cultivo de feijão, manejo que provoca o aumento gradativo nas populações de mosca branca (Figura 1.2.1b) (ARAGAO *et al.*, 2013).

As medidas para evitar a infecção por VMDF são focadas no controle da mosca branca, principalmente através da aplicação sistêmica de inseticidas, porém com baixa razão custo benefício. A baixa eficácia desse controle se deve ao potencial do vírus em desenvolver resistência ao inseticida e além disso, os produtos utilizados causam prejuízos ao meio ambiente. Por outro lado, pesquisadores realizaram uma extensiva triagem no germoplasma do feijão comum para resistência ao VMDF, o que não gerou genótipos com resistência ao vírus (ARAGAO *et al.*, 1998; BONFIM *et al.*, 2007; ARAGAO *et al.*, 2013).



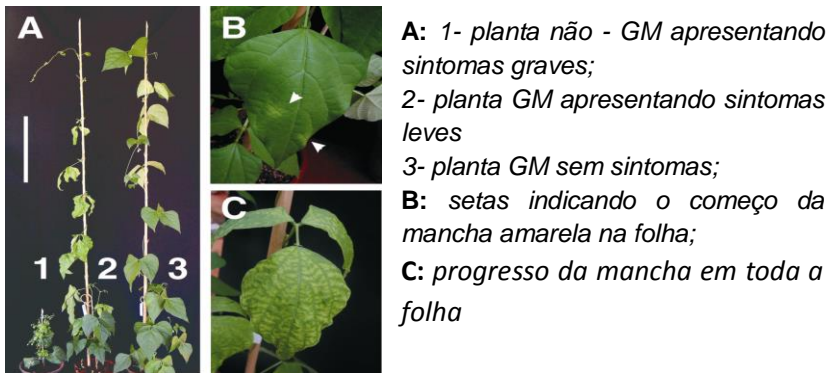
a) Ataque da Mosca Branca (*Bemisia Tabaci*) em folhas de soja e folhas de feijoeiro b) Sintomas da infecção por VMDF nas vagens e nas folhas do

Figura 1.2.1 Imagem da mosca branca (*Bemisia tabaci*) em folhas e sintomas do vírus do mosaico dourado no feijoeiro.

Com o objetivo de minimizar as perdas nas lavouras de feijão provocadas pelo VMDF, pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) desenvolveram um feijoeiro GM contendo o evento Embrapa 5.1, que é capaz de inibir a reprodução viral quando infectado, reduzindo ou evitando

o surgimento dos sintomas da doença do mosaico dourado (Figura 1.2.2) (BONFIM et al. 2007).

O feijoeiro GM foi aprovado para plantio e comercialização no Brasil em 2011, pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, porém ainda não há o registro de colheita. O feijão transgênico EMBRAPA 5.1 é um marco nacional, pois é a primeira cultura GM aprovada comercialmente que foi totalmente desenvolvida e produzida na América Latina por uma empresa pública (BRASIL, 2011).



GM : geneticamente modificado; Fonte : (BONFIM et al. 2007)

Figura 1.2.2 Plantas de feijoeiro GM e não GM inoculadas com o vírus do mosaico dourado.

O evento Embrapa 5.1 possui a construção $\Delta AC1hpRNA$ que tem por objetivo silenciar o gene específico AC1 *rep* do VMDF. O gene *rep* é responsável pela produção de uma proteína essencial para a replicação do genoma do VMDF, provavelmente abundante no ciclo inicial da infecção da planta. Sendo assim, seu silenciamento leva ao comprometimento da geração de novos vírus, e por isso a planta se torna resistente (BONFIM et al., 2007).

O cassete $\Delta AC1hpRNA$ expressa um RNA-grampo (*hpRNA*), com regiões de dupla fita (*dsRNA*), composto de um fragmento de 411 pb do gene *rep* (BONFIM et al., 2007). O *dsRNA* é processado por uma enzima RNase em pequenos RNA interferentes, desencadeando uma sequência de degradação de RNA mensageiros específicos, em um processo conhecido como RNA de interferência (RNAi); a sequência complementar de

RNAm quando clivada leva ao silenciamento gênico (RAMON *et al.*, 2014).

A caracterização molecular do feijoeiro Embrapa 5.1 confirmou a presença do transgene em um único *locus*, o que corresponde à duas cópias intactas do cassete $\Delta AC1hpRNA$ e três cópias intactas do gene *AtAhas*, todos flanqueados por sequências do genoma do feijoeiro. O gene *AtAhas* produz uma subunidade não ativa da enzima acetohidroxiácido síntase (*AtAHAS*) e foi utilizado para permitir a seleção dos eventos de transformação. Quando analisada por *Southern blot*, a estrutura dos transgenes permaneceu estável em oito gerações de autopolonização e após retrocruzamentos com a variedade comercial não geneticamente modificada. O siRNA foi detectado nos grão de feijão, nas folhas em maior quantidade e não foi detectado em grãos cozidos por 10 minutos (ARAGÃO *et al.*, 2013).

1.3 MILHO (*Zea mays*)

Zea mays L. ssp. *mays* conhecido popularmente como milho é um dos mais importantes cereais cultivados no mundo, movimentando ao ano bilhões em dólares. O milho pertence à família das gramíneas (*Poaceae*) e é originário da região Mesoamericana, sendo o teosinte seu ancestral selvagem. Estudos genéticos da domesticação do milho estimam que sua separação do ancestral teosinte datam de 6.000 à 9.000 anos atrás (MATSUOKA *et al.*, 2002).

Dados da FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentos e Agricultura) colocam o milho domesticado como a 3º maior *commodity* produzida em 2015, atingindo 1 bilhão de toneladas produzidas na safra 2015 no mundo (USDA, 2016). No Brasil, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção total de milho na safra 2015 foi de 84,7 milhões de toneladas, tornando o Brasil o 3º produtor mundial, atrás dos Estados Unidos e China (BRASIL, 2015a).

A principal utilização do milho é para composição de ração animal, o que o torna indispensável para a cadeia de produtividade de alimentos. Também é matéria-prima em setores como indústria têxtil, indústria farmacêutica e biocombustíveis (PECHANOVA *et al.*, 2013).

Apesar de uma porção reduzida ser destinada para alimentação humana direta, o milho é matéria-prima para produtos como cereais matinais, biscoitos, além de sua farinha ser utilizada para preparações domésticas. Na sua composição nutricional, o milho possui cerca de 79% de carboidratos, 12% de proteínas e 6,5% de lipídeos, representando uma importante fonte de nutrientes (DAMODARAN, PARKIN E FENNEMA, 2010). Ainda, o milho se destaca como uma fonte de carotenóides, como a luteína e a zeaxantina, compostos envolvidos na prevenção de doenças cardiovasculares e de Degenração Macular (MESSIAS *et al.*, 2014).

Além do papel econômico nas diferentes cadeias produtivas, o milho tem sido utilizado em pesquisas de genética, desde os estudos iniciados em 1869 por Gregor Mendel. Na época, estudos com o milho corroboraram com os resultados obtidos no mais renomado estudo genético de reprodução em ervilhas (*Pisum*). O milho possui ciclo de desenvolvimento curto, são plantas grandes e adequadas para análises fenotípicas, possuindo vantagens para análises genéticas de mutantes morfológicos, incluindo coloração dos grãos e formato (COE, 2001).

Várias características, tais como uma coleção significativa de estoques de mutantes, colocou o milho como um dos sistemas genéticos mais conhecidos que serve de modelo para estudos de biologia das plantas, que vão desde o desenvolvimento vegetal até epigenética. Um progresso considerável foi adquirido nas pesquisas com milho a partir da disponibilidade da sequência genômica da linha B73, bem como o acesso das informações genéticas em bases de dados públicas (PECHANOVA *et al.*, 2013).

As mutações já identificadas na semente do milho fornecem importantes informações sobre a síntese de amido, composição das proteínas de estoque e a biossíntese de carotenóides. O estudo dos pigmentos antocianinas nas sementes de milho permitiram a elucidação e a análise de elementos transponíveis, que passaram a ser utilizados para o isolamento de genes via marcação transposon.

Elementos transponíveis ou transposons são sequências do DNA que se transpõe de um sítio do genoma à outro e carregam informações genéticas, que podem produzir diferentes fenótipos através da alteração da expressão de genes. Esses elementos

contêm sequências repetidas invertidas de 10 pb, aproximadamente, que flanqueiam sequências codificadoras e que são reconhecidos pela transposase, enzima codificada por outros elementos transponíveis. Os transposons se ligam às sequências repetidas invertidas e se integram aos elementos transponíveis no sítio alvo (BUCHANNAN, B. B. ; et al 2000)

O sistema de transposon Ac/Ds descoberto no milho é uma estrutura que contém o elemento autônomo ativador (*Ac*) e o não autônomo dissociador (*Ds*). O elemento ativador codifica produtos que são necessários para transpor o gene, e o elemento *Ds* é uma família de elementos que é reconhecido por transposases codificadas por *Ac* (FEDOROFF, WESSLER E SHURE, 1983).

No sentido de saber mais sobre a transposição do elemento *Ac* no processo de mutação por transposon, pesquisadores utilizaram diferentes posições de inserção do elemento *Ac* no gene *P* do milho. Esse gene está envolvido na formação de pigmentos vermelho-marron derivados dos flavonóides, então os estudos de mutação genética nesse locus dão origem à diferentes fenótipos de coloração em milhos devido aos diferentes teores de pigmentos (ATHMA, GROTEWOLD E PETERSON, 1992).

1.3.1 Milhos *P1-ww* e *P1-rr*

Os dois fenótipos de milho (*Zea mays*) utilizados nesse estudo, *P1-ww* 107H e *P1-rr* 107B, são mutantes oriundos da variedade 107, contendo diferentes teores de uma classe de flavonóides, os flobafenos. Essas sementes de milho foram desenvolvidas e cedidas pelo *Maize Genetics Cooperation Stock Center* (University of Illinois, Urbana, EUA).

Os flavonóides são metabólitos secundários aromáticos das plantas e que desempenham importantes funções biológicas, entre elas, absorção de UV, resposta ao ataque de patógenos, resposta às baixas temperaturas e à deficiência de nutrientes (LEA *et al*, 2008 ;PETRONI, PILU E TONELLI, 2014).

Mais de 6000 diferentes flavonóides já foram relatados e subdivididos em diferentes classes incluindo flavonóis, flavanóis, flavonas e antocianinas, de acordo com o grau de oxidação do anel aromático (SCHIJLEN *et al*, 2004). O tipo, quantidade e

localização do flavonóide varia de acordo com as espécies vegetais, o estágio de desenvolvimento dos tecidos e pode ser modulado por sinais ambientais, como luz, temperatura e nutrição (LEPINIEC *et al*, 2006).

O consumo humano de alimentos que contenham classes específicas de flavonóides pode reduzir os riscos de doenças cardiovasculares, câncer e obesidade. Nesse sentido, o desenvolvimento de alimentos isogênicos modelo e nutricionalmente idênticos, exceto pelo tipo e quantidade da molécula bioativa específica (flavonóide), representa uma importante ferramenta para estudos nutricionais (PETRONI, PILU E TONELLI, 2014).

O extenso conhecimento sobre a regulação da via dos flavonóides no milho e sua utilização em estratégias de melhoramento proporcionam o desenvolvimento de plantas funcionais modelo que permitam estudos sobre o metabolismo, a produção e até mesmo o consumo das mesmas (TSUDA, 2012).

Os flobafenos são uma classe de flavonóides derivados das flavonas, C-glicosil-flavonas, que possuem coloração vermelho-marrom e no milho são encontrados nos órgãos florais, espiga e no pericarpo (revestimento mais externo do grão); são constituídos por polímeros de apiferol e luteoferol, que são derivados da narigenina e eriodictiol, respectivamente, produzidos pela atividade da enzima di-hidroflavonol 4-redutase (DFR) (PETRONI, PILU E TONELLI, 2014).

Os flobafenos, assim como outros flavonóides, são metabólitos secundários que desempenham um importante papel na defesa da planta contra diferentes tipos de stress. Por exemplo, um estudo comparou a contaminação por micotoxina Fumonisina B1 em diferentes genótipos de milho, com diferente acúmulo de compostos da classe de flavonóides, previamente infectados por *fusarium*. Observou-se a redução na contaminação por Fumonisina B1 em grãos de milho *P1-rr* com alto teor de flobafenos no pericarpo, em relação à milhos contendo altos teores de antocianinas e antocianidinas. Os resultados demonstram a atividade anti-fúngica dos flobafenos em plantas (PILU *et al*. 2011).

A via de formação de flavonóides e seus pigmentos derivados é amplamente conhecida, inclusive sua regulação através da ação de genes responsáveis pela expressão de fatores de transcrição *myb*. O acúmulo de flobafenos no milho é

regulado por um fator de transcrição R2R3-MYB, produzido pelo pericarp color 1 (*p1*) gene. Diferentes alelos do *p1* gene, produzidos por mutação via transposon, permitem diferentes padrões de pigmentação para os tecidos (sabugo e pericarpo) do milho (STYLES E CESKA, 1989; GROTEWOLD et al.1994). O gene *p1* do milho, que regula a síntese de flobafenos, representa um excelente sistema genético para o estudo da regulação gênica específica em um tecido (LOIDL et al. 1996).

Os diferentes padrões fenotípicos do gene *p1* são especificados pelo P1, que designa o locus, seguido de duas letras, a primeira letra especifica a cor do pericarpo e a segunda letra especifica a cor da espiga. A letra "r" representa a cor vermelha e a letra "w" cor amarelo-branco. Por exemplo, o *P1-rr* apresenta pericarpo e espiga vermelhos e o *P1-ww* apresenta pericarpo e espiga brancos (Figura 1.3.1.1) (ZHANG, CHOPRA E PETERSON, 2000).



Figura 1.3.1.1 Grãos de milho dos fenótipos *P1-ww* e *P1-rr*

Os milhos *P1-rr* e *P1-ww* foram obtidos por mutações induzidas, utilizando transposon. A alteração do genoma de uma planta através de uma técnica de mutação por transposon pode representar inserções e subsequentes excisões em regiões regulatórias de um gene, o que pode alterar os padrões de expressão genética e assim a codificação de novos transcritos e

um diferente padrão na produção de proteínas (GIRARD E FREELING, 1999).

1.4 AVALIAÇÃO DE CULTURAS BIOTECNOLÓGICAS

O cultivo de variedades GM é realizado há mais de duas décadas e um consenso sobre os riscos de sua utilização ainda não foi atingido. O aumento no consumo de produtos alimentícios derivados de plantas GM levanta questionamentos dos legisladores, pesquisadores e consumidores a respeito dos possíveis impactos das plantas geneticamente modificadas (PGM) na saúde humana e animal, no meio ambiente e na agricultura (DAVIES, 2010; GARCIA-CANAS *et al.*, 2011; GONG E WANG, 2013).

Para avaliar a segurança de PGM, uma das diretrizes fundamentais em escala global é o conceito de “equivalência substancial” ou avaliação comparativa de segurança. A Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), a Organização das Nações Unidas pela Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), desenvolvem documentos de consenso para as culturas de maior interesse econômico. As publicações são a referência para as análises composicionais comparativas que se realizam entre a planta GM e a não-GM mais próxima considerada segura, chamada contraparte convencional (KOK E KUIPER, 2003; OECD, 2006; GARCIA-CANAS *et al.*, 2011). A análise composicional comparativa é uma parte importante da avaliação de segurança de alimentos GM e, em muitos casos, testes em animais também são sugeridos (RICROCH, 2013).

Segundo a OMS as análises de segurança propostas para culturas alimentares GM incluem (OMS, 2014):

- efeitos diretos à saúde (de toxicidade);
- potencial alergênico;
- componentes específicos com considerado potencial tóxico ou nutricional;
- estabilidade do gene inserido;
- efeitos nutricionais associados com a modificação genética;
- quaisquer efeitos imprevistos que podem resultar da inserção do gene.

O cultivo de plantas GM é precedido da avaliação de um dossiê pelas agências reguladoras de cada país. Para a concessão de liberação de plantio, comércio e consumo das plantas GM a agência reguladora geralmente exige uma análise composicional de compostos e nutrientes específicos, além de informações técnicas sobre a modificação genética e os possíveis efeitos diretos e indiretos da inserção do DNA recombinante. Desse modo os riscos potenciais e os impactos na saúde humana, animal e no meio ambiente são avaliados (OMS, 2003; CELLINI *et al.*, 2004; RUEBELT, LIPP, *et al.*, 2006; RICHROCH, BERGE E KUNTZ, 2011).

No Brasil a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBs) são os responsáveis por avaliar os dossiês apresentados pela empresa desenvolvedora da cultura GM e assim emitir os pareceres de liberação, se for o caso. A Lei 11.105 de 2005 (Lei de Biossegurança) dispõe sobre as normas para liberação comercial de OGM e as normas para avaliação da segurança alimentar de plantas GM. As questões centrais a serem respondidas pela empresa desenvolvedora na proposta apresentada para a liberação, incluem informações sobre a espécie modificada, sobre a modificação genética e o objetivo pela qual ela foi realizada, o contexto do local onde será liberada, e resultados de estudos ambientais e de segurança já realizados (BRASIL, 2005).

Tecnologias e intervenções que envolvem sistemas biológicos complexos, como a inserção de fragmentos de DNA recombinante na planta, implicam incertezas sobre riscos potenciais oriundos de efeitos inesperados desconhecidos. Alterações não intencionais ou indesejadas são aquelas ocorridas no fenótipo, na resposta fisiológica ou na composição da planta GM que são observadas significativamente em relação à contraparte não-GM (a partir da qual a GM é derivada), e que não incluem o efeito desejado pela modificação (CELLINI *et al.*, 2004; PAUWELS *et al.*, 2015).

Os efeitos não intencionais podem resultar da integração do gene inserido e/ou integração biológica da proteína codificada por ele, os quais podem ser previstos pelo conhecimento do local de inserção do gene no DNA, pela função do transgene e as vias metabólicas às quais ele se relaciona. No entanto, o processo de integração do transgene e a cultura de tecidos durante a

transformação podem induzir alterações genômicas não intencionais e não previsíveis, como deleções e inserções, que podem gerar efeitos secundários ou pleiotrópicos (KUIPER *et al.*, 2001; CELLINI *et al.*, 2004; GARCIA-CANAS *et al.*, 2011).

No conceito de equivalência substancial as análises comparativas direcionadas abrangem a avaliação de nutrientes essenciais como proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e outros compostos nutricionais/antinutricionais, modificados ou não intencionalmente, e que possam afetar o valor nutricional e a segurança da nova cultura desenvolvida. No entanto, o uso de abordagens analíticas direcionadas à compostos alvo é questionado por apresentar limitações, já que não analisa substâncias tóxicas desconhecidas e anti-nutrientes, principalmente em plantas sem histórico de uso seguro (MILLSTONE, BRUNNER E MAYER, 1999 ;KUIPER *et al.*, 2001).

Nesse contexto, um estudo compilou dados já publicados sobre análises composicionais comparativas, que avaliavam cultivares de milho GM e de soja GM. Foram utilizados os resultados obtidos com sete variedades de culturas GM, em um total de nove países e em onze diferentes estações de crescimento. Os autores concluíram que a contribuição da biotecnologia moderna tem sido negligenciável na variação composicional da planta GM em relação à sua equivalente convencional. As diferenças encontradas permaneceram dentro da variabilidade natural da cultura convencional, o que não permite utilizar tais resultados para distinguir agronomicamente as plantas GM das não GM (HARRIGAN *et al.*, 2010).

Outro estudo comparou a composição em nutrientes e anti-nutrientes de duas variedades comerciais de feijão Embrapa 5.1 e suas isolinhas não-GM, depois do cruzamento e retrocruzamento. Os resultados demonstraram que as plantas GM cultivadas à campo foram substancialmente equivalentes às plantas não-GM cultivadas nas mesmas condições. Além disso, a variação encontrada no teor de alguns componentes nutricionais estava dentro dos limites observados em cultivares convencionais cultivadas em diferentes locais e estações (CARVALHO, J. L. et al., 2015).

Mesmo que alguns estudos tenham identificado efeitos não intencionais em plantas GM utilizando abordagens direcionadas

(HASHIMOTO et al., 1999; YE, X. et al., 2000), a estratégia de comparar componentes específicos restringe as possibilidades de detectar outros efeitos não intencionais imprevisíveis, que possam resultar direta ou indiretamente da modificação genética.

1.4.1 Tecnologias “ômicas” como ferramentas complementares na avaliação de plantas

Sistemas complexos como plantas inteiras requerem testes mais elaborados do que os habitualmente utilizados na análise de compostos simples para avaliação de segurança de alimentos. Técnicas tradicionais como análises que pesquisam compostos alvos para partes da planta e estudos em animais para avaliação toxicológica são pouco sensíveis ou ainda necessitam de alternativas mais diretas (DAVIES, 2010; RICHROCH, BERGE E KUNTZ, 2011; GONG E WANG, 2013).

Tem-se verificado o aumento no número de tecnologias disponíveis para melhoramento vegetal para que se obtenha características desejadas no genoma das plantas. No passado, alguns casos foram relacionados como potenciais riscos à segurança alimentar, como batatas brancas com alto teor de glicocalcóides (VANGELDER, VINKE E SCHEFFER, 1988). No melhoramento clássico de plantas, que fundamenta-se na diversidade genética das espécies, questões de segurança alimentar não são sistematicamente abordadas antes da introdução no mercado de novas variedades, a menos que existam indicações de que a composição do vegetal é significativamente alterada. Apenas um número limitado de espécies de alimentos vegetais é rotineiramente analisado quanto aos anti-nutrientes e substâncias específicas (KOK, E. J., KEIJER, J., *et al.*, 2008)

Debates sobre o procedimento padrão para a liberação de novas variedades de plantas alimentares no mercado apresentam a necessidade de estudos que avaliem a segurança alimentar dessas culturas (KOK, E. *et al.*, 2008; VAN DIJK *et al.*, 2009; VAN DIJK *et al.*, 2014)

Neste contexto, as tecnologias chamadas “ômicas”, como a metabolômica, transcritômica e proteômica são ferramentas que auxiliam à identificar alterações não intencionais no metabolismo das plantas obtidas por melhoramento clássico ou através de

biotecnologia moderna. Assim, diversos institutos de pesquisa na Europa têm utilizado técnicas amplas de perfil para investigar a detecção de efeitos não esperados em plantas utilizadas como alimento (HUGAS *et al.*, 2007; VAN DIJK *et al.*, 2009; DAVIES, 2010; RICROCH, 2013; VAN DIJK *et al.*, 2014).

Abordagens amplas de perfil podem medir simultaneamente milhares de componentes sem indentificá-los previamente, e permite relacioná-los ao seu possível papel metabólico na planta contribuindo para a compreensão global do sistema. Por essas razões as tecnologias "ômicas" têm sido sugeridas como complemento na avaliação de segurança de novas plantas utilizadas para consumo (CELLINI *et al.*, 2004; CHASSY, 2010; DAVIES, 2010; VAN DIJK *et al.*, 2014).

Trabalhos utilizando abordagens amplas de perfil já provaram ter capacidade de detectar alterações em plantas utilizadas em alimentos (ALBO *et al.*, 2007; ZOLLA *et al.*, 2008; VAN DIJK *et al.*, 2009; BATISTA E OLIVEIRA, 2010; COLL *et al.*, 2011; RICROCH, 2013).

Na última década alguns trabalhos utilizaram análises de perfil para avaliar culturas GM, comparando as diferenças entre variedades GM e suas progenitoras não-GM. Utilizando análise transcriptômica e proteômica, Coll e colaboradores (COLL *et al.*, 2010; COLL *et al.*, 2011) avaliaram duas variedades de milho GM MON810 e suas isolinhas, tanto *in vitro* quanto a campo. Os resultados de transcriptoma mostraram expressão diferencial em um pequeno conjunto de sequências, nas análises do cultivo *in vitro*. Quando avaliado o experimento a campo, as diferenças no transcriptoma não se repetiram e os resultados permaneceram dentro do intervalo de variação natural. Em relação ao proteoma de grãos de duas variedades MON810 e suas isolinhas, o perfil de proteoma foi virtualmente idêntico, com somente 10 proteínas diferencialmente expressas, proteínas específicas para cada variedade.

Utilizando dados de transcriptômica, um estudo comparou os perfis de seis diferentes variedades de batatas, comparadas em diferentes épocas e locais de plantio. O objetivo foi avaliar um método de análise multivariada como classificador das variedades, servindo como um modelo de avaliação de riscos (VAN DIJK *et al.*, 2014).

1.4.2 Análise Proteômica

Proteínas são macromoléculas biológicas presentes de forma abundante na natureza, pois compõem todas as células e estão presentes em todas as suas partes. Essas moléculas existem em uma grande variedade de tamanho, podemos encontrar desde um pequeno peptídeo à um grande polímero com alto peso molecular, em uma simples célula por exemplo. Além disso, as proteínas apresentam grande diversidade de função biológica e são o importante produto final da expressão da informação genética (NELSON E COX, 2000).

À partir da década de 90 os avanços na química de proteínas permitiram que a função gênica pudesse ser melhor compreendida, principalmente, das análises de sequências de nucleotídeos. Desde então estudos em larga escala das proteínas expressas pelos genomas começaram a ser realizados e o termo "proteômica" passou a ser utilizado (WILKINS *et al.*, 1997).

A revolução genômica dos anos 2000 foi marcada pelo sequenciamento do genoma completo de organismos, como por exemplo da *Arabidopsis thaliana* (INITIATIVE, 2000). Desde então as técnicas de transcriptômica e proteômica, que estudam respectivamente RNAm e proteínas resultantes da expressão gênica, passaram a ser aprimoradas e utilizadas (OLIVEIRA, COORSSSEN E MARTINS-DE-SOUZA, 2014).

O proteoma de um organismo, tecido ou célula é o conjunto de proteínas que reflete a expressão dos genes em determinado estado de funcionamento desse organismo. O controle dessa expressão gênica ocorre desde a transcrição do mRNA até as modificações pós-traducionais das proteínas, como glicosilação, fosforilação, carboxilação, entre outras (WILKINS *et al.*, 1997).

O genoma representa o perfil de sequências de DNA e é constante para um organismo; já o proteoma é altamente dinâmico pois depende do ciclo celular, de mudanças ambientais e é tecido específico (RUEBELT, LEIMGRUBER, *et al.*, 2006). Portanto, é provável que um genoma possa dar origem à um número infinito de proteomas (GRAVES E HAYSTEAD, 2002).

Identificar todas as proteínas codificadas por um genoma é uma realização longa e difícil de se realizar. Porém é possível

acessar bancos de informações proteômicas de diferentes organismos, que são cada vez mais completos devido à compilação de dados obtidos de diferentes estudos realizados por diferentes pesquisadores e em vários países. Os novos conhecimentos sobre a expressão gênica e sua implicação na produção de proteínas estão relacionados às vias de sinalização celular, conjuntos de proteínas reguladoras, modificações pós traducionais e informações sobre estados fisiológicos de células e organismos (PICARIELLO *ET AL.*, 2012; OLIVEIRA, COORSSSEN E MARTINS-DE-SOUZA, 2014).

A proteômica em vegetais é uma ferramenta eficaz para análise do estado fisiológico da planta, de processos específicos e também avaliação das respostas a fatores bióticos e abióticos. As proteínas são especialmente interessantes para a avaliação de segurança, pois podem estar envolvidas ou resultarem na síntese de toxinas, antinutrientes ou alérgenos (CELLINI *et al.*, 2004; VALDES *et al.*, 2013).

O perfil de proteínas de um organismo pode ser alterado por influência de modificações genéticas induzidas, como a inserção de um fragmento de DNA, uma mutação ou um cruzamento entre variedades vegetais. Tais modificações afetam a regulação gênica, podendo modificar vias metabólicas ou produzir novas proteínas. A análise dos perfis de proteína de plantas GM pode fornecer informações sobre os produtos de transcrição do gene introduzido e também as vias bioquímicas modificadas através dele, já que esse pode interagir regulando outros genes ou outras vias bioquímicas (CELLINI *et al.*, 2004; RUEBELT, Lipp, *et al.*, 2006; DAVIES, 2010).

Através da comparação do perfil de proteínas, a probabilidade de detecção de efeitos adversos inesperados é ampliada, tanto em estudos com plantas GM, como com plantas obtidas por melhoramento clássico. No contexto das culturas GM a análise proteômica pode representar um passo analítico complementar ao conceito de equivalência substancial (KOK E KUIPER, 2003; KOK, E. J., LEHESRANTA, S. J., *et al.*, 2008; VAN DIJK *et al.*, 2014).

Vários métodos estão disponíveis para a comparação qualitativa e quantitativa do proteoma de plantas, eles pretendem separar, identificar e quantificar as proteínas de toda a planta ou de um tecido específico (ANDERSON E ANDERSON, 1998; CANOVAS *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

A técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-DE PAGE) seguida da identificação por espectrometria de massa (MS) é uma abordagem utilizada para a comparação do perfil de proteínas, com a finalidade de detectar e identificar proteínas diferencialmente expressas (RUEBELT, LEIMGRUBER, *et al.*, 2006; BRANDAO, BARBOSA E ARRUDA, 2010; VALENTIM-NETO *et al.*, 2015; BALSAMO *et al.* 2015; WANG *et al.*, 2015).

1.4.2.1 Eletroforese Bidimensional (2-DE)

Amplamente utilizada para a separação de proteínas à partir de extratos proteicos purificados, a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-DE PAGE) foi descrita como uma técnica de alta resolução de separação de proteínas em 1975 (O'FARRELL, 1975).

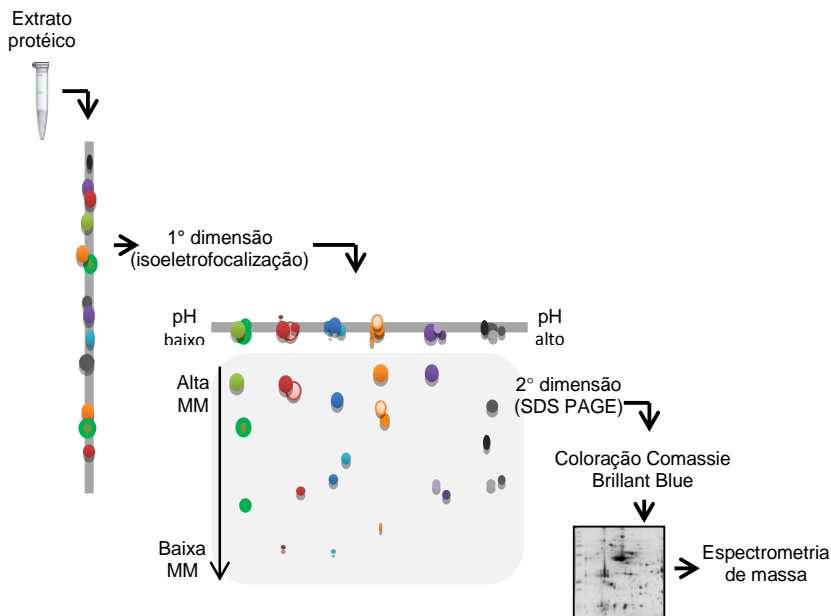
A técnica 2-DE PAGE possui a capacidade de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa, possibilitando análises de expressão gênica por meio da comparação dos padrões protéicos. Outra vantagem é que a matriz de poliacrilamida que separa as proteínas permite, dependendo do método de coloração, a detecção das proteínas com sensibilidade elevada e ainda, proteínas selecionadas podem ser retiradas do gel para sequenciamento, identificação e caracterização, por isso é uma técnica qualitativa e quantitativa (CANOVAS *et al.*, 2004; CELLINI *et al.*, 2004; OLIVEIRA, COORSSSEN E MARTINS-DE-SOUZA, 2014).

A primeira etapa da técnica 2-DE é a separação das proteínas solubilizadas sob um gradiente elétrico em tiras com gradiente de PH imobilizado, onde elas se separam em função do seu ponto isoeletrico (PI), que corresponde ao valor de pH no qual o somatório de todas as suas cargas parciais é igual a zero. Após a IEF, é feita a etapa de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), que separa as proteínas desnaturadas pela sua massa molecular (MM). Após a corrida, os géis passam pela etapa de coloração que permite a visualização de pontos que correspondem às proteínas. A coloração com Comassie Brilliant Blue (CBB) é frequentemente utilizada por sua reprodutibilidade, por possuir detecção mínima de 10 ng de proteína, e ainda a vantagem de ser compatível com técnicas de extração dos peptídeos para

análise em espectrômetro de massas. As intensidades dos *spots* corados no gel podem ser correlacionadas com a quantidade da proteína através de programas de informática que analisam estatisticamente as imagens dos géis 2-DE (GORG, WEISS E DUNN, 2004; OLIVEIRA, COORSSSEN E MARTINS-DE-SOUZA, 2014).

A validação da técnica 2-DE deve ser um pré-requisito para que esta seja uma análise recomendada, pelas agências regulamentadoras, na avaliação da segurança de alimentos (RUEBELT, LEIMGRUBER, *et al.*, 2006). Para a obtenção de géis 2-DE de alta qualidade todas as etapas da técnica precisam ser padronizadas de acordo com as amostras que serão analisadas. Iniciando pelo método de extração de proteínas, que interfere diretamente na primeira etapa da técnica, a isoeletrofocalização. Para a extração de proteína, o tecido vegetal e as células são inicialmente rompidos por técnicas como a sonicação, trituração com auxílio de nitrogênio líquido, entre outras. Durante a quebra dos tecidos e células a integridade da proteína extraída pode ser ameaçada pela presença de enzimas proteolíticas e sais, compostos que devem ser removidos ou inibidos. A realização de todas as etapas em baixas temperaturas e a utilização de inibidores de proteases previnem a degradação protéica. Os sais são removidos através da precipitação com ácido tricloroacético (TCA) ou outros solventes orgânicos, evitando assim que interfiram na separação eletroforética (DAMERVAL *et al.*, 1986; GORG, WEISS E DUNN, 2004).

O protocolo de extração de proteínas usa diferentes tampões para amostras específicas. O conjunto de proteínas primeiramente é precipitado para eliminar interferentes da amostra e permitir sua concentração. Além disso, as proteínas são desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas, etapas que rompem as interações moleculares, permitindo a boa separação dos *spots* no gel. Isso é importante principalmente quando a amostra é uma matriz complexa, como um tecido vegetal, que pode conter baixos níveis de proteína e alta concentração de interferentes como pigmentos, fenólicos, enzimas oxidativas e proteolíticas e carboidratos (DAMERVAL *et al.*, 1986; THIELLEMENT, 2006).



*MM: massa molecular; SDS PAGE: dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida

Figura 1.4.2.1.1 Esquema da técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

A etapa de precipitação à - 20°C com ácido tricloroacético (TCA) 10% em acetona, seguida pela etapa de solubilização das proteínas em altas concentrações de uréia (8 – 9,5 M) ou uma combinação de uréia (7 M) com tiouréia (2 M), têm sido utilizada para obtenção de extratos proteicos totais em tecidos vegetais (DAMERVAL *ET AL.*, 1986; DE LA FUENTE *et al.*, 2011; VALENTIM-NETO *et al.*, 2015). Na presença de altas concentrações de agentes caotrópicos (desnaturantes), como ureia e tioureia, a solubilização de proteínas de membrana se torna eficiente. A ureia é responsável pela ruptura das ligações de hidrogênio, promovendo o desdobramento e a desnaturação de proteínas, enquanto a tioureia desfaz interações hidrofóbicas (GORG, WEISS E DUNN, 2004).

A utilização de detergentes nos tampões de solubilização, como o 3-[(3-colamidopropil) dimetilamônio]-1-propanossulfonato (CHAPS) e o dodecilsulfato de sódio (SDS),

reduz as interações hidrofóbicas e impede a agregação protéica e a precipitação do solubilizado. Os agentes redutores adequados para isoeletrofocalização (IEF), como ditiotritol (DTT) e tributilfosfina (TBP), quebram as pontes dissulfeto intra e inter-moleculares, favorecendo a desnaturação protéica e assim contribuem para melhor solubilização de proteínas no extrato, e conseqüentemente melhor qualidade de separação dos *spots* nos géis finais (DAMERVAL *et al.*, 1986; GORG, WEISS E DUNN, 2004)

A análise proteômica por 2-DE PAGE como instrumento de comparação exige uma metodologia padronizada. Os principais parâmetros são especificidade, precisão e linearidade. Para a análise proteômica, o significado de especificidade está relacionado à capacidade de detecção de uma proteína no proteoma, o que reporta principalmente ao método de coloração do gel (CANDIANO *et al.*, 2004; ANTTONEN *et al.*, 2010).

A técnica 2-DE já demonstrou ter poder discriminatório para pequenas diferenças entre cultivares. Um estudo comparou o perfil de proteína de batatas cultivadas em dois diferentes sistemas de produção, orgânico e não orgânico. Utilizando Análise de Componentes Principais (PCA) aos dados obtidos por 2-DE, foi encontrada diferença apenas em relação às práticas de fertilização nas batatas (matéria orgânica x fertilizante mineral), onde foram observadas diferenças significativas no acúmulo de 160 proteínas (LEHESRANTA *et al.*, 2007).

No Brasil, um estudo apresentou a análise proteômica comparativa entre sementes de soja *Roundup Ready* GM e não-GM. Os resultados demonstraram diferença significativa no acúmulo de 10 proteínas, porém relataram a importância de eliminar a variabilidade experimental, padronizando os parâmetros que envolvem a aquisição das imagens dos géis 2-DE (BRANDAO, BARBOSA E ARRUDA, 2010).

Em 2011 nosso grupo comparou o proteoma da folha de quatro variedades de milho GM (MON810) e de suas isolinhas não-GM. Proteínas exclusivas foram observadas no proteoma de dois pares das variedades avaliadas (MON810 e não-GM) e não foi possível relacionar estas diferenças ao caráter GM, uma vez que nos outros dois pares de variedades não foram observadas proteínas exclusivas (BALSAMO *et al.*, 2011).

1.4.3 Espectrometria de Massa – MALDI TOF e MALDI TOF/TOF

A espectrometria de massas tem sido utilizada como uma importante ferramenta em proteômica, na análise da massa molecular de peptídeos e de proteínas. As proteínas de uma amostra são separadas, como por exemplo por eletroforese bidimensional, e depois são clivadas na forma de peptídeos. A clivagem geralmente é realizada por enzimas purificadas como a tripsina, que cliva proteínas especificamente na extremidade C terminal dos resíduos de arginina e lisina.

A técnica de espectrometria de massa chamada *Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization – Time of Flight* (MALDI-TOF) baseia-se em um processo em que os peptídeos são adicionados de uma matriz que os protona (geralmente um ácido orgânico) permitindo sua ionização. Os peptídeos então absorvem a energia emitida por um *laser* (*light amplification stimulated energy radiation*) e desencadeiam um processo de dessorção, o que possibilita a passagem da amostra do estado sólido para o estado gasoso. As partículas são então aceleradas por um campo elétrico dentro de um tubo de vácuo, e então é medido o tempo que uma partícula carregada leva para atingir uma placa detectora, que se situa a uma distância conhecida. Os íons acelerados atingem uma velocidade no campo de "vôo" em função da massa molecular e da carga que possuem, e assim obtemos a razão massa/ carga (m/z) (STEEN E MANN, 2004).

Os espectrômetros de massas diferem em relação aos analisadores da razão massa/carga (m/z) dos peptídeos ionizados. O analisador TOF detecta o tempo que uma partícula carregada leva para atingir uma placa detectora, que se situa a uma distância conhecida (STEEN E MANN, 2004).

MALDI-TOF MS é comumente utilizada para análise *peptide mass fingerprint*, que é a comparação da massa dos peptídeo obtida no espectro com a massa de peptídeos de uma proteína em uma base de dados. Embora a técnica se ajuste à muitos casos, o sequenciamento de peptídeos é um método de identificação de proteínas mais específico e sensível (STEEN E MANN, 2004; OLIVEIRA, COORSSEN E MARTINS-DE-SOUZA, 2014).

O método MALDI-TOF MS/MS possui vantagens de alto rendimento em função da quantidade de peptídeo analisada e

elevada sensibilidade. A última está relacionada à capacidade de dissociação induzida das moléculas provocada por uma colisão de alta energia com uma gás inerte. A análise da sequência de aminoácidos obtida por MS/MS pode fornecer resultados mais precisos sobre os peptídeos e sobre a possível identidade de uma proteína da qual ele seja parte.

1.5 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A técnica proteômica 2-DE permitem a análise simultânea de centenas de variáveis, chamadas *spots*, que representam os dados de acúmulo de proteínas, resultando em um grande volume de dados. Nesse contexto, ferramentas estatísticas que analisam simultaneamente todos as variáveis são necessárias, pois permitem o manuseio eficaz dos dados, desde a coleta até o pré-processamento, que facilitam comparações diretas entre conjuntos de dados. Além disso, essas ferramentas extraem os componentes de interesse através do processamento e da exploração dos dados e permite a apresentação dos dados complexos sob uma forma de fácil compreensão usando estratégias visuais (SCHOLZ et al., 2004, LEHESRANTA et al, 2007).

Ferramentas de análise estatística comuns, como ANOVA (Análise de variância), servem para examinar o nível de variação do acúmulo de uma determinada proteína, o que é possível com um determinado número de amostras. Porém, os géis 2-DE apresentam uma grande quantidade de *spots*, e quando o objetivo é uma comparação de todas essas variáveis entre duas amostras, as abordagens estatísticas multivariadas permitem a geração de hipóteses após essa análise multivariada, ao invés de se trabalhar com hipóteses dirigidas (GOTTLIEB et al., 2004 ; ENKILDE et al., 2007).

Análises multivariadas são ferramentas que permitem a avaliação da grande quantidade de dados originados por análises amplas de perfil pois fornece graus de liberdade suficientes para suportar o volume de dados gerados. A análise de componentes principais (PCA) é uma análise geralmente utilizada para se ter uma visão geral do conjunto de dados e para se verificar o estabelecimento de possíveis conexões entre os dados (ENKILDE et al., 2007).

As variáveis possivelmente correlatas são transformadas em um número menor de variáveis não correlatas, chamadas componentes principais (PC). Essas variáveis não são medidas diretamente, mas são expressas como uma combinação linear de um conjunto de variáveis. Essa combinação pode ser visualizada através de gráficos (*score plots* ou diagramas de dispersão) onde os eixos originais são substituídos por eixos de componentes principais, e dependem dos valores atribuídos para cada amostra e para cada variável. O primeiro PC cobre tanto o quanto é possível da variação do conjunto de dados, e cada componente subsequente cobre tanto quanto possível do restante da variação. Deste modo, a maioria da variação é contida no primeiro componente, e progressivamente menos informação será contida quanto maiores forem os componentes. Os diagramas de dispersão indicam a posição das amostras ao longo dos componentes principais. Amostras com maior similaridade em um determinado PC, estarão mais próximas no gráfico, e indica que são similares em função das variáveis originais (ENGLILDE et al., 2007; GOTTLIEB et al., 2004).

1.6 REFERÊNCIAS

- ALBO, A. G. et al. Proteomic analysis of a genetically modified maize flour carrying Cry1Ab gene and comparison to the corresponding wild-type. **Maydica**, v. 52, n. 4, p. 443-455, 2007.
- ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. **Electrophoresis**, v. 19, n. 11, p. 1853-1861, Aug 1998. ISSN 0173-0835.
- ANKLAM, E.; NEUMANN, D. A. Method development in relation to regulatory requirements for detection of GMOs in the food chain. **Journal of Aoac International**, v. 85, n. 3, p. 754-756, May-Jun 2002.
- ANTTONEN, M. J. et al. Genetic and Environmental Influence on Maize Kernel Proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 12, p. 6160-6168, Dec 2010.
- ARAGAO, F. J. L. et al. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. **Journal of Biotechnology**, v. 166, n. 1-2, p. 42-50, Jun 20 2013.

_____. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. **Molecular Breeding**, v. 4, n. 6, p. 491-499, 1998.

ARAGÃO, F. J. L.; FARIA, J. C. Proposta de Liberação Comercial do Feijão Geneticamente Modificado Resistente ao Virus do Mosaico Dourado -Evento Embrapa 5.1 (EMB-PV 051-1): Comissão Técnica Nacional de Biossegurança -CTNBio 2010.

ATHMA, P.; GROTEWOLD, E.; PETERSON, T. INSERTIONAL MUTAGENESIS OF THE MAIZE P-GENE BY INTRAGENIC TRANSPOSITION OF AC. **Genetics**, v. 131, n. 1, p. 199-209, May 1992.

BALSAMO, G. M. et al. Proteomic Analysis of Four Brazilian MON810 Maize Varieties and Their Four Non-Genetically-Modified Isogenic Varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 21, p. 11553-11559, Nov 9 2011.

_____. Comparative Proteomic Analysis of Two Varieties of Genetically Modified (GM) Embrapa 5.1 Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Non-GM Counterparts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 63 (48), pp 10569–10577, 2015.

BATISTA, R.; OLIVEIRA, M. Plant natural variability may affect safety assessment data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 58, n. 3, p. S8-S12, 2010.

BONFIM, K. et al. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 6, p. 717-726, Jun 2007.

BOUIS, H. E.; CHASSY, B. A.; OCHANDA, J. O. Genetically modified food crops and their contribution to human nutrition and food quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n. 5-8, p. 191-209, Apr 2003.

BRANDAO, A. R.; BARBOSA, H. S.; ARRUDA, M. A. Z. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 8, p. 1433-1440, Jun 16 2010.

BRASIL. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005: Lei da Biossegurança. Legislações da CTNBio. Disponível em www.ctnbio.gov. Acesso em 20/12/2015.

_____. Instrução normativa nº8 de 2008 - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2008.

- _____. CONAB: Levantamento da safra de Grãos 2014/2015 no Brasil. <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&> 2015a. Acesso em 16/12/2015.
- _____. Organismos Geneticamente Modificados: MAPA 2015.
- _____. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Aprovações Comerciais de Plantas Geneticamente Modificadas, 2015. Disponível em www.ctnbio.gov. Acesso em 20/12/2015.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.
- BUTELLI, E. et al. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1301-1308, Nov 2008.
- CANDIANO, G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, May 2004.
- CANOVAS, F. M. et al. Plant proteome analysis. **Proteomics**, v. 4, n. 2, p. 285-298, Feb 2004.
- CARVALHO, J. L. et al. Comparative analysis of nutritional compositions of transgenic RNAi-mediated virus-resistant bean (event EMB-PV051-1) with its non-transgenic counterpart. **Transgenic Res**, Apr 2015.
- CARVALHO, J. L. V. et al. Comparative analysis of nutritional compositions of transgenic RNAi-mediated virus-resistant bean (event EMB-PV051-1) with its non-transgenic counterpart. **Transgenic Research**, v. 24, n. 5, p. 813-819, Oct 2015.
- CELLINI, F. et al. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food Chem Toxicol**, v. 42, n. 7, p. 1089-125, Jul 2004.
- CHASSY, B. M. Can - omics inform a food safety assessment? **Regul toxicol pharmacol**, v. 58, n. 3 Suppl, p. S62-70, Dec 2010.
- CHILTON, M. D. et al. Stable incorporation of plasmid dna into higher plant-cells - molecular-basis of crown gall tumorigenesis. **Cell**, v. 11, n. 2, p. 263-271, 1977.
- _____. Agrobacterium-rhizogenes inserts t-dna into the genomes of the host plant-root cells. **Nature**, v. 295, n. 5848, p. 432-434, 1982.
- COE, E. H. The origins of maize genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 11, p. 898-905, Nov 2001.

COLL, A. et al. Natural variation explains most transcriptomic changes among maize plants of MON810 and comparable non-GM varieties subjected to two N-fertilization farming practices. **Plant Molecular Biology**, v. 73, n. 3, p. 349-62, Jun 2010.

_____. Proteomic analysis of MON810 and comparable non-GM maize varieties grown in agricultural fields. **Transgenic Research**, v. 20, n. 4, p. 939-49, Aug 2011. ISSN 1573-9368.

DAMERVAL, C. et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic-variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, n. 1, p. 52-54, Jan 1986.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Artmed 2010.

DAVIES, H. A role for "omics" technologies in food safety assessment. **Food Control**, v. 21, n. 12, p. 1601-1610, 2010.

DE LA FUENTE, M. et al. 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 2, p. 262-267, Feb 1 2011.

ENKILDE, K.; JACOBSEN, S.; SØNDERGAARD, I. Multivariate data analysis of proteome data. **Methods Mol Biol**, v. 355, p. 195-210, 2007.

FAOSTAT, F. A. A. O. O. T. U. N. S. D. World Crops Production 2014. 2015. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org> >. Acesso em: 01/01/2016.

FARIA, J. C. et al. Doenças causadas por vírus e seu controle. Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba: Potafos: p. 731-760. p. 1996.

FEDOROFF, N.; WESSLER, S.; SHURE, M. ISOLATION OF THE TRANSPOSABLE MAIZE CONTROLLING ELEMENTS AC AND DS. **Cell**, v. 35, n. 1, p. 235-242, 1983.

FISK, H. J.; DANDEKAR, A. M. THE INTRODUCTION AND EXPRESSION OF TRANSGENES IN PLANTS. *Scientia Horticulturae*, v. 55, n. 1-2, p. 5-36, Aug 1993. ISSN 0304-4238.

GARCIA-CANAS, V. et al. MS-BASED ANALYTICAL METHODOLOGIES TO CHARACTERIZE GENETICALLY MODIFIED CROPS. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 30, n. 3, p. 396-416, May-Jun 2011.

GOTTLIEB, D. M. et al. Multivariate approaches in plant science. **Phytochemistry**, v. 65, n. 11, p. 1531-48, Jun 2004.

- GONG, C. Y.; WANG, T. Proteomic evaluation of genetically modified crops: current status and challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 2013.
- GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-3685, Dec 2004. ISSN 1615-9853.
- GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 39+, Mar 2002.
- GROTEWOLD, E. et al. The myb-homologous p-gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. **Cell**, v. 76, n. 3, p. 543-553, Feb 11 1994.
- HARRIGAN, G. G. et al. Natural variation in crop composition and the impact of transgenesis. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 402-404, May 2010.
- HASHIMOTO, W. et al. Safety assessment of genetically engineered potatoes with designed soybean glycinin: compositional analyses of the potato tubers and digestibility of the newly expressed protein in transgenic potatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 12, p. 1607-1612, SEP 1999.
- HUGAS, M. et al. Risk assessment of biological hazards in the European Union. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1-2, p. 131-135, 2007.
- INITIATIVE, A. G. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 408, n. 6814, p. 796-815, Dec 2000. ISSN 0028-0836.
- ISAAA, I. S. F. T. A. O. A.-B. A. Genetic Modified Approval Database - "GM Crop list": ISAAA 2015.
- JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014: ISAAA Brief. n° 49 2015.
- KOK, E. et al. Changes in Gene and Protein Expression during Tomato Ripening - Consequences for the Safety Assessment of New Crop Plant Varieties. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 6, p. 503-518, DEC 2008.
- KOK, E. J. et al. Comparative safety assessment of plant-derived foods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 50, n. 1, p. 98-113, Feb 2008. ISSN 0273-2300.

KOK, E. J.; KUIPER, H. A. Comparative safety assessment for biotech crops. *Trends in Biotechnology*, v. 21, n. 10, p. 439-444, 2003. ISSN 0167-7799.

KOK, E. J. et al. Changes in Gene and Protein Expression during Tomato Ripening - Consequences for the Safety Assessment of New Crop Plant Varieties. *Food Science and Technology International*, v. 14, n. 6, p. 503-518, 2008. ISSN 1082-0132.

KRAMER, M. G.; REDENBAUGH, K. COMMERCIALIZATION OF A TOMATO WITH AN ANTISENSE POLYGALACTURONASE GENE - THE FLAVR SAVR(TM) TOMATO STORY. *Euphytica*, v. 79, n. 3, p. 293-297, 1994. ISSN 0014-2336.

KUIPER, H. et al. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. **Plant Journal**, v. 27, n. 6, p. 503-528, SEP 2001.

LEHESRANTA, S. et al. Effects of agricultural production systems and their components on protein profiles of potato tubers. **Proteomics**, v. 7, n. 4, p. 597-604, FEB 2007.

LOIDL, A.; LOIDL, P. Oncogene- and tumor-suppressor gene-related proteins in plants and fungi. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 7, n. 1-2, p. 49-64, 1996.

MAPA. Culturas: Feijão. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil). 2011.

MATSUOKA, Y. et al. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 9, p. 6080-6084, Apr 30 2002.

MESSIAS, R. D. S. et al. Carotenoid Biosynthetic and Catabolic Pathways: Gene Expression and Carotenoid Content in Grains of Maize Landraces. **Nutrients**, v. 6, n. 2, p. 546-563, Feb 2014.

MILLSTONE, E.; BRUNNER, E.; MAYER, S. Beyond 'substantial equivalence'. **Nature**, v. 401, n. 6753, p. 525-6, Oct 1999.

MIRAGLIA, M. et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, n. 7, p. 1157-1180, Jul 2004. ISSN 0278-6915. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000221924900006 >.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. 3rd ed. New York: Worth, 2000. XXIX, 1152 p ISBN 1572591536.

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

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. An introduction to the food/feed safety consensus documents of the Task Force. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds., v. 14, 2006.

OLIVEIRA, B. M.; COORSSEN, J. R.; MARTINS-DE-SOUZA, D. 2DE: The Phoenix of Proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 104, p. 140-150, Jun 2 2014.

OMS, Organização Mundial da Saúde. Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-dna plants - CAC/GL 45-2003, 2003.

_____. Frequently asked questions on genetically modified foods. Organização Mundial da Saúde, 2014.

PAINE, J. A. et al. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 482-487, Apr 2005.

PAUWELS, K. et al. Next-generation sequencing as a tool for the molecular characterisation and risk assessment of genetically modified plants: Added value or not? **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 319-326, Oct 2015.

PECHANOVA, O. et al. Maize proteomics: An insight into the biology of an important cereal crop. **Proteomics**, v. 13, n. 3-4, p. 637-662, Feb 2013. ISSN 1615-9853.

PETRONI, K.; PILU, R.; TONELLI, C. Anthocyanins in corn: a wealth of genes for human health. **Planta**, v. 240, n. 5, p. 901-911, Nov 2014.

PICARIELLO, G. et al. Novel Mass Spectrometry-Based Applications of the 'Omic' Sciences in Food Technology and Biotechnology. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 3, p. 286-305, Jul-Sep 2012.

PILU, R. et al. Effect of flavonoid pigments on the accumulation of fumonisin B1 in the maize kernel. **Journal of Applied Genetics**, v. 52, n. 2, p. 145-152, May 2011.

RAMON, M. et al. RNAi-based GM plants: food for thought for risk assessors. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 9, p. 1271-1273, Dec 2014.

RICROCH, A. E. Assessment of GE food safety using '-omics' techniques and long-term animal feeding studies. **New Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 349-354, May 2013.

RICROCH, A. E.; BERGE, J. B.; KUNTZ, M. Evaluation of Genetically Engineered Crops Using Transcriptomic, Proteomic,

and Metabolomic Profiling Techniques. **Plant Physiology**, v. 155, n. 4, p. 1752-1761, Apr 2011.

RUEBELT, M. C. et al. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 1. Assessing analytical validation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2154-2161, Mar 2006.

_____. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 3. Assessing unintended effects. *J Agric Food Chem*, v. 54, n. 6, p. 2169-77, Mar 2006. ISSN 0021-8561.

SCBD, S. O. T. C. O. B. D. Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity 2000.

SCHOLZ, M., GATZEK, S., STERLING, A. *et al.* Metabolite fingerprinting: detecting biological features by independent component analysis. *Bioinformatics* 20, 2447-2454. 2004.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 9, p. 699-711, Sep 2004.

STOROZHENKO, S. et al. Folate fortification of rice by metabolic engineering. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1277-1279, Nov 2007.

STYLES, E. D.; CESKA, O. Pericarp flavonoids in genetic strains of zea-mays. **Maydica**, v. 34, n. 3, p. 227-237, 1989.

THIELLEMENT, H. Plant proteomics: methods and protocols. Totowa, NJ: **Humana Press** XIII, 399 p., 2006.

UN, United Nations. Revision World Population Prospects 2015. <http://esa.un.org/unpd/wpp/>. Acesso em 16/01/2015.

USDA, U. S. D. O. A. World Agriculture Production 2015.: 1-27 p. 2016.

VALDES, A. et al. Foodomics strategies for the analysis of transgenic foods. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 2-15, Dec 2013.

VALENTIM-NETO, P. A. et al. Leaf Proteome Comparison of Two GM Common Bean Varieties and Their Non-GM Counterparts by Principal Component Analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, p. n/a-n/a, 2015.

VAN DIJK, J. P. et al. Transcriptome Analysis of Potato Tubers- Effects of Different Agricultural Practices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1612-1623, 2009.

- _____. Safety assessment of plant varieties using transcriptomics profiling and a one-class classifier. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 297-303, Oct 1 2014.
- VANGELDER, W. M. J.; VINKE, J. H.; SCHEFFER, J. J. C. Steroidal glycoalkaloids in tubers and leaves of solanum species used in potato breeding. **Euphytica**, p. 147-158, Dec 1988.
- WAGNER, N. et al. RNAi trigger fragment truncation attenuates soybean FAD2-1 transcript suppression and yields intermediate oil phenotypes. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 7, p. 723-728, Sep 2011.
- WANG, L. M. et al. Comparative proteomics of Bt-transgenic and non-transgenic cotton leaves. **Proteome Science**, v. 13, May 2015.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.
- WILKINS, M. R. et al. **Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics**: 243 p. 1997.
- YE, X. et al. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 303-305, JAN 14 2000.
- ZHANG, P. F.; CHOPRA, S.; PETERSON, T. A segmental gene duplication generated differentially expressed myb-homologous genes in maize. **Plant Cell**, v. 12, n. 12, p. 2311-2322, Dec 2000.
- ZHANG, Y. Y. et al. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2343-2394, Apr 2013.
- ZOLLA, L. et al. Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modifications. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 5, p. 1850-1861, May 2008.

CAPÍTULO II

Análise Proteômica comparativa de duas variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L), Pérola e Pontal, contendo o evento Embrapa 5.1 e suas isolinhas não-GM

Comparative Proteomic Analysis of Two Varieties of Genetically Modified (GM) Embrapa 5.1 Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Non-GM Counterparts

Geisi M. Balsamo, Pedro A. Valentim-Neto, Carla S. Mello, and Ana C. M. Arisi*

Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga 1346, 88034-001 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Supporting Information

ABSTRACT: The genetically modified (GM) common bean event Embrapa 5.1 was commercially approved in Brazil in 2011; it is resistant to golden mosaic virus infection. In the present work grain proteome profiles of two Embrapa 5.1 common bean varieties, Pérola and Pontal, and their non-GM counterparts were compared by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) followed by mass spectrometry (MS). Analyses detected 23 spots differentially accumulated between GM Pérola and non-GM Pérola and 21 spots between GM Pontal and non-GM Pontal, although they were not the same proteins in Pérola and Pontal varieties, indicating that the variability observed may not be due to the genetic transformation. Among them, eight proteins were identified in Pérola varieties, and four proteins were identified in Pontal. Moreover, we applied principal component analysis (PCA) on 2-DE data, and variation between varieties was explained in the first two principal components. This work provides a first 2-DE-MS/MS-based analysis of Embrapa 5.1 common bean grains.

KEYWORDS: common bean, proteome, 2-DE, MS/MS, PCA, GMO

INTRODUCTION

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an important vegetal source of nutrients, mainly proteins, carbohydrates, fibers, minerals, and vitamins, for millions of people worldwide. Consumption of beans in Latin America represents a significant contribution to human nutrition, mainly to people of restricted economic conditions. They are consumed as a whole, representing a source of iron, phosphorus, magnesium, and other minerals.¹ In addition to its nutritional properties, common bean has been described as a functional food, mainly for its antioxidant capacity.^{2–4} In Brazil, 3.34 million tons of beans were produced in 2014/2015, mostly grown on small farms and with average yield of 1024 kg ha⁻¹.⁵ Production of common bean in Latin America is often affected by golden mosaic disease, resulting in yield losses from 40 to 100%. This pest is caused by bean golden mosaic virus (BGMV), transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* Gen., and its main symptom is the yellow-green mosaic of leaves.⁶

Because of the social and economic importance of this legume, a genetically modified (GM) common bean event was developed by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa). RNA interference (RNAi) was used to silence the *AC1* viral gene, preventing the appearance of symptoms and conferring resistance to BGMV.⁷ The Embrapa 5.1 event contains an intron-hairpin construct developed to induce post-transcriptional *AC1* viral gene silencing. This event has been approved for commercial cultivation and consumption by the Brazilian National Technical Commission on Biosafety (CTNBio) in 2011.

Previous work disclosed the molecular characterization of Embrapa 5.1, showing data about identification of the insertion, number of copies, stability, and expression of the transgene.⁸

The insert is not interrupting any gene, and it does not code for any new protein.⁸ Target analyses were used in recent compositional comparative experiment that evaluated Embrapa 5.1 common bean and non-GM counterpart, both cultivated under field conditions in three different locations. A compositional information databank was generated for common bean grains of five varieties grown in six different locations and five years. The study demonstrated that the GM common bean event was substantially equivalent to non-GM bean and that the amounts of nutritional components are within the range of values observed for several commercial bean varieties.⁹

Omics technologies have the potential for enabling comprehensive and quantitative assessment of metabolic changes in response to genetic modification.^{10,11} These large-scale profilings, such as transcriptomics, proteomics, and metabolomics, have been used to compare GM plants and their non-GM counterparts.^{12–15}

Advances in proteomics tools in combination with bioinformatics, including improved genetic information in databases, provide data that may be helpful in studying effects derived from genetic modification,^{16,17} plant stress response,^{8,19} and conventional genetic breeding.²⁰ Proteome analysis by two-dimensional electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry (MS) has been carried out to identify differentially expressed proteins and to complement the current targeted analytical approaches in GM crop assessment.^{21,22} Differential proteomics using gel-based methods consist of

Received: September 23, 2015

Revised: November 13, 2015

Accepted: November 17, 2015

Comparative Proteomic Analysis of two varieties of embrapa 5.1 common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their Non-GM counterparts

Geisi M. Balsamo¹, Pedro A. Valentim-Neto¹, Carla S. Mello¹, and Ana C. M. Arisi^{1*}

¹Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianópolis-SC, Brazil

Received: September 23, 2015 / Revised: November 13, 2015 / Accepted: November 17, 2015

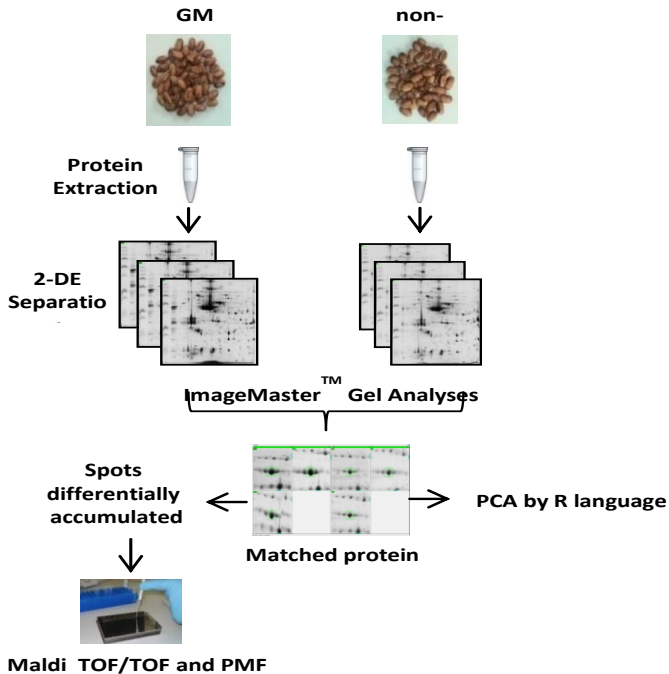


Figure 2.1 Draft of experimental design

ABSTRACT

The genetically modified (GM) common bean event Embrapa 5.1 was commercially approved in Brazil in 2011; it is resistant to golden mosaic virus infection. In the present work grain proteome profiles of two Embrapa 5.1 common bean varieties, Pérola and Pontal, and their non-GM counterparts were compared by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) followed by mass spectrometry (MS). Analyses detected 23 spots differentially accumulated between GM Pérola and non-GM Pérola and 21 spots between GM Pontal and non-GM Pontal, although they were not the same proteins in Perola and Pontal varieties, indicating that the variability observed may not be due the genetic transformation. Among them, eight proteins were identified in Pérola varieties, and four proteins were identified in Pontal. Moreover, we applied principal component analysis (PCA) on 2-DE data, and variation between varieties was explained in first two principal components. This work provides a first 2-DE-MS/MS-based analysis of EMBRAPA 5.1 common bean grains.

Keywords: *common bean, proteome, 2-DE, MS/MS, PCA, GMO.*

2.1 INTRODUCTION

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an important vegetal source of nutrients, mainly proteins, carbohydrates, fibers, minerals, and vitamins, for millions of people worldwide. Consumption of beans in Latin America represents a significant contribution to human nutrition, mainly to people of restricted economic conditions. They are consumed as a whole, representing a source of iron, phosphorus, magnesium and other minerals¹. In addition to its nutritional properties, common bean has been described as a functional food, mainly for its antioxidant capacity²⁻⁴.

In Brazil, 3.34 million tons of beans were produced in 2014/2015, mostly grown on small farms and with average yield 1024 kg ha⁻¹⁵. Production of common bean in Latin America is often affected by golden mosaic disease, resulting in yield losses from 40 to 100%. This pest is caused by bean golden mosaic virus (BGMV), transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* Gen., and its main symptom is the yellow-green mosaic of leaves⁶.

Because of the social and economic importance of this legume, a genetically modified (GM) common bean event was developed by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa). RNA interference (RNAi) was used to silence the *AC1* viral gene, preventing the appearance of symptoms and conferring resistance to BGMV.⁷ The Embrapa 5.1 event contains an intron-hairpin construct developed to induce post-transcriptional *AC1* viral gene silencing. This event has been approved for commercial cultivation and consumption by the Brazilian National Technical Commission on Biosafety (CTNBio) in 2011.

Previous work disclosed the molecular characterization of Embrapa 5.1, showing data about identification of the insertion, number of copies, stability, and expression of the transgene. The insert is not interrupting any gene, and it does not code any new protein.⁸ Target analyses were used in recent compositional comparative experiment that evaluated Embrapa 5.1 common bean and non-GM counterpart, both cultivated under field conditions in three different locations. A compositional information databank was generated for common bean grains of five varieties grown in six different locations and five years. The

study demonstrated that the GM common bean event substantially equivalent to non-GM bean and that the amounts of nutritional components are within the range of values observed for several commercial bean varieties.⁹

Omics technologies have the potential for enabling comprehensive and quantitative assessment of metabolic changes in response to genetic modification.^{10,11} These large-scale profilings, such as transcriptomics, proteomics and metabolomics have been used to compare GM plants and their non-GM counterparts.¹²⁻¹⁵

Advances in proteomics tools in combination with bioinformatics, including improved genetic information in databases, provide data that may be helpful in studying effects derived from genetic modification,^{16,17} plant stress response,^{18,19} and conventional genetic breeding.²⁰ Proteome analysis by two-dimensional electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry (MS) has been carried out to identify differentially expressed proteins and to complement the current targeted analytical approaches in GM crop assessment.^{21,22} Differential proteomics using gel-based methods consist of comparing the signal of an electrophoretic-isolated protein spot among different samples. A relative quantification is achieved through the gel image analysis.²³ Principal component analysis (PCA) is a multivariate analysis that transforms observed variables into a new set of uncorrelated variables, reducing the dimension through the design of principal components (PC).²⁴ PCA has been applied combined with proteomics as a complementary tool to proteome profile comparison.^{15,25,26}

In our previous study, leaf proteomic profiles of two Embrapa 5.1 common bean varieties, Pérola and Pontal, were compared in PCA plots. Separation between leaf proteomic profile of GM common bean variety and its near-isogenic counterpart was observed only when they were compared in pairs. Results showed higher similarity between GM variety and its counterpart than between two common bean varieties²⁵.

The goal of this work was to compare grain proteome profiles of two Embrapa 5.1 common bean varieties and their non-GM counterparts by performing 2-DE proteomic analysis and MS protein identification and to evaluate the grouping of proteome profiles by PCA.

2.2 MATERIAL AND METHODS

Plant Material. Grains of Embrapa 5.1 common bean ⁷ (*Phaseolus vulgaris* L.) derived from varieties Pérola and Pontal, both commercial varieties of Mesoamerican origin, and their non-GM varieties were cultivated and provided by Embrapa Arroz e Feijão (Rice and Bean Unit). The GM and non-GM near-isogenic lines, derived from Pérola 10-5-6-1-2-18-18-1-1 and BRS Pontal 104-3.3.2.1.1.5.1.1.1, were grown side by side in a greenhouse and harvested in 2011/2012 season in Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás State, Brazil (GPS 16°30'23.9"S 49°16'59.7"W). Twenty-three grains (around 5 g) were ground in liquid nitrogen using analytical mill and stored at -80 °C until protein extraction.

The presence of event Embrapa 5.1 was confirmed in all samples by an event-specific qPCR assay for Embrapa 5.1 GM common bean quantification²⁷.

Protein Extraction. Three protein extracts were prepared from a pool of grains (5g) for each group, Pontal, GM Pontal, Pérola, and GM Pérola. Samples were ground to a fine powder in liquid nitrogen using a mortar and pestle; approximately 150 mg of pooling grain was extracted with 0.5 mL extraction buffer (0.5 mol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8; 0.7 M saccharose; 100 mmol L⁻¹ EDTA; 1 mmol L⁻¹ PMSF; 0.1 g L⁻¹ CHAPS; 14 mmol L⁻¹ DTT; Roche protease inhibitor) by homogenization in a vortex. After centrifugation at 20000 g for 20 min at 4 °C, the upper phase was precipitated with 2 mL of solution containing pure acetone, 1.25 g L⁻¹ TCA and 8 mmol L⁻¹ DTT. Samples were kept for 1 h at -20 °C. Dried protein pellets were solubilized in 1 mL of DeStreak rehydration solution (GE Healthcare). Protein concentration was determined using 2-D Quant kit (GE Healthcare). Protein extraction and 2-DE separation procedures were conducted in parallel for GM and non-GM samples.

2-DE analyses. Isoelectric focusing was performed using Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). Approximately 350 µg of total protein was diluted in rehydration buffer containing 0.2 mL L⁻¹ IPG buffer pH 4-7 (GE Healthcare), in total 250 µL. Samples were loaded on 13 cm IPG strips 4-7 linear gradient pH (GE Healthcare) and incubated for 18 h at 25 °C.

Strips were focused using following steps: 50 V for 30 min, 500 V for 60 min, 1000 V for 60 min, 4000 V for 60 min, 8000 V for 140 min, and 8000 V for 30 min until a total of 21 kWh had been accumulated. After IEF, the strips were kept at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Before the SDS-PAGE procedure, proteins contained in the strips were reduced for 15 min with 10 g L^{-1} DTT in 5 mL of buffer containing 50 mmol L^{-1} Tris-HCl, pH 8.8; 6 mol L^{-1} urea; 0.2 g L^{-1} SDS; 3 mL L^{-1} glycerol; 2.5 mg L^{-1} bromophenol blue. Proteins in strips were immediately alkylated for 15 min with 25 g L^{-1} iodoacetamide in 5 ml of the same buffer. SDS-PAGE was performed in 12.5% polyacrylamide gel using SE 600 Ruby System (GE Healthcare). Precision PlusProtein Standards (Bio-Rad) were applied for estimation of protein molecular weight between 10 and 250 kDa. Gels with protein spots were stained by colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad) according to the previously described protocol²².

Image and Data Analysis. Gel Images were acquired using Image Scanner System II and LabScan 5.0 software (both GE Healthcare). Image analysis was performed by ImageMaster Platinum v.7.0 software (GE) using the following parameters for spot detection: saliency ≥ 100 , area ≥ 11 and smooth ≥ 6 . Relative spot volumes (% vol) were compared among six gels, each GM variety with its counterpart.

The spots were quantified by their relative volume (% vol), defined as the ratio of individual volume of each spot to the sum of all valid spots in the gel. Reproducible spots in three replicates of each variety (GM and non-GM) and presenting significant difference (ANOVA $p < 0.05$) were considered differentially accumulated, and they were included in the spectrometric analysis. A spot detected with percent volume > 0.05 in all three gels of the counterpart was considered a spot detected only in one group.

For PCA, 6 gels (3 GM and 3 non-GM of the same variety) or all 12 gels were compared. All spots that matched in 6 gels or in 12 gels were selected and their relative volume percentage (% vol) was log₂ transformed and normalized. All data were median-centred before the analysis. PCA was performed using R Language, package "stats", function "prcomp".

Protein In-Gel digestion, MALDI-TOF MS and MALDI-TOF/TOF analysis. Spots of differentially expressed proteins were individually excised from gel and submitted twice to a destaining procedure with a solution containing 50% acetonitrile (v/v) and 25 mM L⁻¹ NH₄HCO₃ for 30 min at 25 °C. The solution was replaced by pure acetonitrile and dried under vacuum. Excised spots were kept on ice for 30 min with 20 ng μL⁻¹ trypsin (Trypsin V5280 Promega) and then incubated at 37 °C for 18h. After digestion, peptides were mixed 1:1 with MALDI matrix solution (5 μg mL⁻¹ α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, 50% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid), laid in MTP 384 target plate (Bruker) and dried at room temperature. Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry was used to acquire data for protein identification of tryptic-digested spots.

MS and MS/MS spectra were obtained by Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker), and that was carried out with full automatic mode using FlexControl software. MS data were acquired in a positive ion reflection mode with accelerating voltage of 20 kV, and MS/MS analyses were performed in a positive ion LIFT reflection mode. The following main parameters were used: laser firing rate of 100Hz, mass range of 800 – 4000 Da; peak detection threshold for MS/MS of 1000 Da; mass threshold 95 Da; laser intensity of 25 – 50%; 2000 – 4000 shots accumulated for each spectrum; and intensity of 10⁴ accumulated for MS/MS precursors. The external calibration was performed using a peptide mix [M+H]⁺ ions of angiotensin I, angiotensin II, substance P, bombesin and adrenocorticotrophic hormone. Peak lists were created using FlexAnalysis 3.0 (Bruker).

Database searching was carried out by MASCOT software 2.4.00 (Matrix Science) using National Center of Biotechnological Information (NCBI) and non-redundant *P. vulgaris* database, downloaded from *Phytozome* Web site (Phytozome v9.1), and non-redundant *Viridiplantea* database, both publicly available. The following parameters were used for searches: carbamidomethylation of cysteine as fixed modification, methionine oxidation as variable modification; one trypsin missed cleavage, search error tolerance was set from 80 to 200 ppm and a peptide charge 1 H⁺. Protein identification was considered with

expectation value < 0.05 (E-value < 0.05). Conserved Domain Database (CDD), GeneOntology and, Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProtKB) databases were used to access related biological function and protein family.

2.3 RESULTS AND DISCUSSION

Two different approaches were applied to 2-DE data for grain proteome comparison of the two Embrapa 5.1 GM common bean varieties and their counterparts, identification by MS of differentially expressed proteins and PCA. Total soluble protein was measured in protein extracts, and the mean values were 29.4 mg g⁻¹ for non-GM Pérola, 35.5 mg g⁻¹ for GM Pérola, 28.3 mg g⁻¹ for non-GM Pontal, and 35.1 mg g⁻¹ for GM Pontal. Three 2-DE gels of Embrapa 5.1 common bean grain protein extracts were compared with three 2-DE gels of non-GM counterpart, six gels in Pérola analysis, and six gels in Pontal analysis (Figure 2.3.1). Total numbers of 256 matched spots between Pérola and GM Pérola gels and 422 matched spots between Pontal and GM Pontal gels were observed (Table 2.3.1), corresponding to 24, 30, 51, and 48 % of total number average of detected spots in Pérola, GM Pérola, Pontal, and GM Pontal gels, respectively.

Table 2.3.1 Total spot number in 2-DE gels (Coomassie Blue stained) of Pérola and Pontal Varieties Common Bean Grains

2-DE Gel	Pérola		Pontal	
	GM	non-GM	GM	non-GM
1	1001	1035	846	886
2	1120	921	900	907
3	1037	585	729	837
Total	1052 ± 61	847 ± 233	825 ± 87	876 ± 35
Matched spots in 6 gels	256		422	

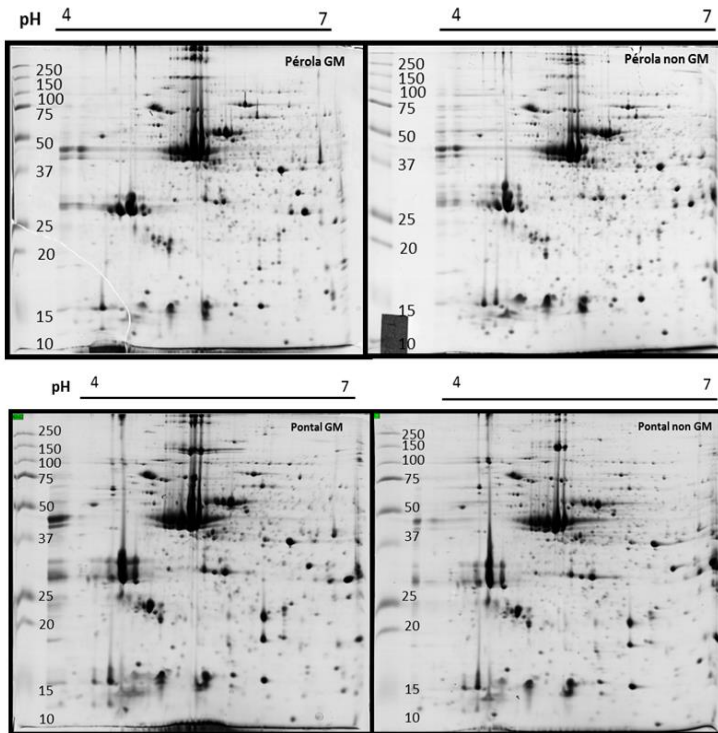


Figure 2.3.1 2-DE reference gels of Pérola, GM Pérola, Pontal, and GMPontal varieties

When GM Pérola and Pérola gels were compared, significant differences were found in the accumulation of 23 protein spots (Figure S2.1 and Table S2.1; Table 2.2), and 8 of those were identified by mass spectrometry (Figure 2.3.2). GM Pontal and Pontal gels presented 21 spots differentially accumulated (Table Figure S2.1 and Table S2.1; Table 2.3.2), and 4 protein spots were identified by mass spectrometry (Figure 2.3.2).

The proportion of protein spots identification in Pérola varieties (35%) was higher than in Pontal varieties (19%). In a pioneer common bean proteomic analysis, three extraction methods were compared and protein spot identification from *P. vulgaris* grain 2-DE gels using MS and MS/MS analysis was

performed. The authors were able to identify up to 70% of 50 excised major gel spots.²⁶ The percentage of protein identification was lower in our results probably because of the low peptide amount of the excised spots. Volume percentage (% vol) variation of the differentially accumulated spots was acquired by ImageMaster software using ANOVA, and data are presented for identified proteins (Figure 2.3.3).

Table 2.3.2 Differentially Accumulated Spots in 2-DE Analyses and Identified Proteins by Mass Spectrometry (MS or MS/MS)

	Differentially accumulated spots ^a		n° of identified proteins	
	Pérola	Pontal	Pérola	Pontal
down accumulated in GM variety		7	3	3
up accumulated in GM variety	0	13	3	1
Spot detected only in GM variety ^b		-	1	-
Spot detected only in non GM variety ^b		1	1	-
Total	3	21	8	4

^aReproducible spots in triplicate of each variety and presenting significant difference (ANOVA, $p < 0.05$) were considered differentially accumulated. ^bProteins detected only in one variety presented % vol ≥ 0.05 .

Among the differentially expressed proteins, 12 were identified in databases using MS and MS/MS approach (Table 2.3.2). Of the total, five proteins were identified in *P. vulgaris* database, two proteins in *Arabidopsis thaliana*, and two proteins in *Oryza sativa* japonica group; one was identified protein in *Zea mays*, one protein in *Triticum aestivum* and one protein in *Solanum lycopersicum* databases (Table 2.3.3). Molecular functions of the identified proteins were obtained using conserved domains database (Table 2.3.3). A lectin (spot 763) was down accumulated in GM Pérola. This protein can be active in stress response, for example against larvae of bruchid pests.³⁰

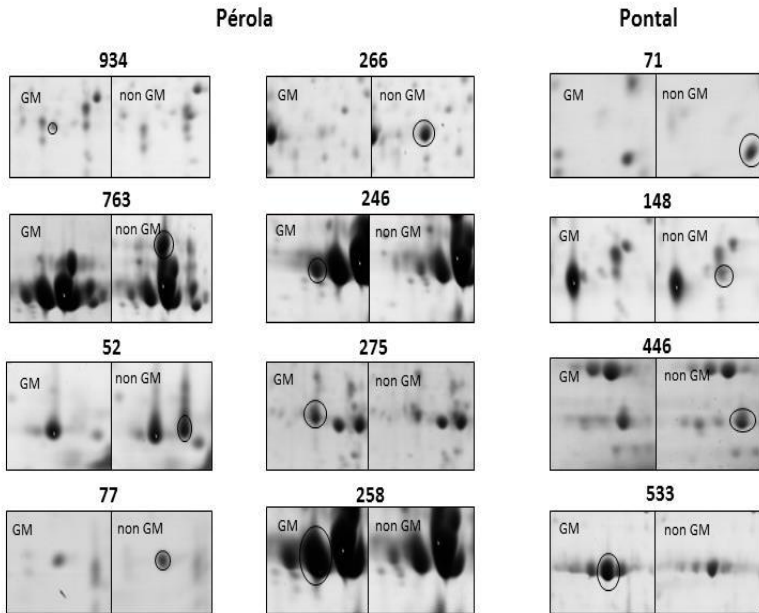


Figure 2.3.2 Identified spots differentially detected between GM and non-GM in Pérola and Pontal analyses. Those images were selected in ImageMaster software in one of the triplicate gels

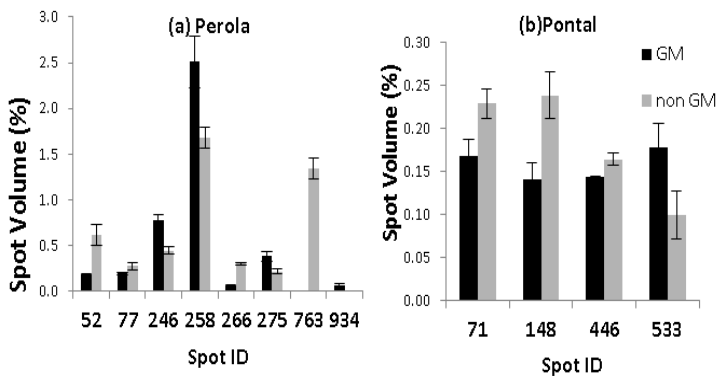


Figure 2.3.3 spot volume percentages (% vol) of identified proteins to (a) Pérola and (b) Pontal analyses from triplicate gels.

Likewise, spot 52 was less accumulated in GM Pérola gels, and it was identified as chain B-porcine pancreatic α -amylase, belonging to Lectin superfamily with α -amylase inhibitor function.³¹ Lectins and α -amylase inhibitors render bean seeds less palatable; on the other hand, they provide protective functions to plants due insecticidal properties.³² Spot 77, less accumulated in GM Pérola grains, was identified as a putative ATP synthase from *T. aestivum*.³³ A protein serine/threonine-protein kinase (spot 266) from *A. thaliana* database was less accumulated in GM Pérola.

A lectin with antifungal activity from *P. vulgaris* was high accumulated in GM Pérola (spot 246). The protein biological function is a defence response to fungi, especially to *Mycophaerella arachidicola*. This protein has a molecular function of noncovalent and selective interaction with carbohydrate including monosaccharides, oligosaccharides and polysaccharides.³⁴ Spot 258 had the highest % vol among identified protein spots, and it was up accumulated in GM Pérola. This spot was identified as a Lectin with a GeneBank accession number identical to spot 246. Experimental values of molecular weight were similar in both spots, but isoelectric point values presented difference of 0.2 units. Discrepancies in *pI* could be caused by post-translational modifications.²⁶

Spot 275 was up accumulated in GM Pérola, and it was identified as a nicotianamine synthase from tomato (*Solanum lycopersicum*). It is a sensor for the physiological iron status in plants, and it is related to intracellular iron transport.³⁵ A glutathione S-transferase (GST) isoform detected only in GM Pérola gels (spot 934) was identified in *P. vulgaris* database. The GST superfamily in plants has been subdivided in 8 classes.³⁶ They are mainly involved in detoxification, secondary metabolism, and response to stress situations, including response to pathogen attack and oxidative stress.^{37,38}

A heat shock protein (hsp) down accumulated in GM Pontal beans (spot 71) was identified by PMF. This class of proteins, chaperones, is involved in response to several adverse situations as heat, cold, drought and metal ions. In addition to stress response, some chaperones are recognized as crucial protein stability sensors.³⁹ Spot 148 was down regulated in GM Pontal gels, and it was identified by PMF as an *O. sativa*

hypothetical protein. Spot 446 was also detected in lower amount in GM Pontal grains; it was identified by PMF as ubiquitin – conjugating enzyme-like (E2) of the *O. sativa japonica* group. E2 is involved in protein turnover regulation⁴⁰. Spot 533 was detected in higher amount in GM Pontal grains and it was identified as pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase (PFP) in the *A. thaliana* database. It is a regulatory enzyme that participates in glycolysis and gluconeogenesis. In *Arabidopsis thaliana*, PFP is involved in salt and osmotic tolerance.⁴¹

In this work, grain proteome profiles from GM and non-GM common bean varieties showed differentially expressed proteins, involved in different function categories. These proteins were specific to the varieties comparison, so the variability observed may not be due to the genetic transformation. This result is consistent with previous works, which compared proteomes of MON810 GM maize varieties^{13,21,22} or wheat varieties.⁴² GM wheat lines were produced using an RNAi to silence ω -5 gliadin expression, a major wheat allergen. Proteomic analysis of these GM wheat lines revealed a decrease in the level of proteins other than ω -5 gliadins, and the same RNAi construct had different effects in the four GM wheat lines⁴².

It has been shown that proteomics analysis is an effective approach to evaluate changes in proteins of transgenic plants even as conventional genetic breeding plants.¹⁶ Profiling techniques such as proteomics offer the possibility to evaluate compositional changes broadly and non-selectively.^{43,44} However, natural variability can be found due to crop management practices, and also different local and season cultivation, as well as interactions between genotype and environment.⁴⁵ The consequences of genetic modification in GM maize were evaluated by transcriptomic, proteomic, and metabolomic analysis when GM and non-GM maize varieties were grown in different locations, in different seasons, and under different agricultural practices. PCA revealed that growing seasons and different locations had a stronger overall effect than the genetic modification.¹³

The grain nutritional compositions of Embrapa 5.1 common bean varieties and those of their non-GM counterparts were compared by substantial equivalence analysis. The authors concluded that different growth locations and distinct seasons can

have influence in chemical composition greater than that of the genetic modification itself.⁹ Embryo metabolic profiles of three Embrapa 5.1 common bean varieties and their non-GM counterparts were compared using high resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR). PCA was applied on data and suggested a natural grouping according to GM or non-GM origin. Flavonoid content was higher in GM embryo varieties, although they were within the range of natural variability in common bean.⁴⁶

Table 2.3.3 2-DE identified proteins by MS and MS/MS in Pérola and Pontal varieties, comparing GM and non-GM counterpart

Spot ID	GeneBank Accession	Theoretical Mr (kDa)/pI	Experimental Mr (kDa)/pI	Mascot Score ^a	E	Protein description ^b	Original organism	Peptide sequence (M/SY/S)	Fold change ^b GM/non-GM
52	1DHK_B	15.4/4.70	15/4.4	156	5.4e-012	Chain B, structure of porcine pancreatic alpha-amylase	<i>Phaseolus vulgaris</i>	K.SVFWVVDYDGG NAEVR.1	0.3
Down in GM Pérola									
77	F43650.1	18.2/9.78	16/9.5	25	0.038	Purine ATP synthase protein YMF19	<i>Triticum aestivum</i>	R.NQLLSHRGGER.S	0.7
266	NP_001154349.1	74.2/7.99	30/7.7	64	0.015	Serine/threonine - protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	*PMF	0.2
763	CAU29133.1	29.6/4.83	32/4.65	69	0.0029	Lectin	<i>Phaseolus vulgaris</i>	*PMF	
246	F84869.1	1.3/5.58	28/4.54	65	1.8e-005	Anthranilate synthase partial	<i>Phaseolus vulgaris</i>	SNDIYFNQR	1.7
up in GM Pérola									
275	NP_001296307.1	35.8/5.73	29/6.75	15	0.033	Nicotianamine synthase	<i>Solanum lycopersicum</i>	R.KLPVPSVFLDGLG AYVLPK.C	1.8
258	F84869.1	1.3/5.58	28/4.74	65	1.8e-005	Anthranilate synthase partial	<i>Phaseolus vulgaris</i>	SNDIYFNQR	1.5
934	AEX37959.1	24.8/5.84	22/8.18	105	3.7e-010	Glutathione transferase	<i>Phaseolus vulgaris</i>	K.LQFFGWFVLDGGS DYTLYESR.A R.KHYSGIWDDIISK PSWVK.K	only GM
Down in GM Pontal									
71	NP_001105352.1	17.1/7.85	17/9.5	61	0.026	17.0 KDa class III seed protein	<i>Zea mays</i>	*PMF	0.73
148	ABA97027.1	24.8/5.84	48/9.2	115	0.034	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	*PMF	0.59
446	NP_001042504.1	54.2/4.8	50/5.24	66	0.036	Ubiquitin-conjugating enzyme-like E2	<i>Oryza sativa japonica Group</i>	*PMF	0.87
533	NP_177781.1	68.3/6.81	75/7.77	60	0.032	Pyrophosphate-fructose-1-phosphate 1-phosphotransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	*PMF	1.8

^a Mascot score represents the score obtained in the matching with NCBInr database by MASCOT software.

^b Fold change expressed as ratio of mean spot volume in GM and non-GM gel.

*PMF: protein identification by Peptide mass fingerprint

In our grain proteome comparison, multivariate analysis was applied for normalized volume percentage of matched spots, and PCA plots were built using the first two principal components (PCs). Three gels of GM Pontal and three gels of Pontal varieties were compared by PCA and they presented 422 matched spots; the first component (PC1) explains 33% of total variation and the second component (PC2) corresponded to 22% (Figure 2.2.4a). Grain proteomic profiles from GM Pontal and Pontal were clearly separated by PC1. Three gels of GM Pérola and three gels of Pérola were analyzed, and they presented 256 matched spots, data set variation explained in the first and second components was 35% and 27%, respectively (Figure 2.2.4 b).

Proteomic profiles from GM Pérola and Pérola were separated only by PC2. A comparison among 12 gels from four common bean varieties was performed by PCA using the volume percentage of 191 matched spots, presented in all gels (Figure 2.2.5). Two groups were clearly separated by the first component: Pérola and GM Pérola from Pontal and GM Pontal. These results are in agreement with our previous work about leaf proteome of the same Embrapa 5.1 common bean varieties. We observed that GM and non-GM leaf proteome profiles were separated by PCA when Pérola and GM Pérola were compared separately from Pontal and GM Pontal.²⁵

In conclusion, our study provided first grain proteomic analysis with protein identification about the Embrapa 5.1 event. Some differentially expressed proteins were observed between GM and non-GM common bean grains (23 proteins for Pérola varieties and 21 proteins for Pontal varieties), although they were not the same proteins in Pérola and Pontal varieties. This indicates that the variability observed may not be due to the genetic transformation. If they were due to the transformation event or the cassette introduced, the different proteins observed would be expected to be the same, whether in the BRS Pontal or Pérola genetic background.

Several studies presented evidence that GM plants are nutritionally equivalent to their non-GM counterparts and can be safely used as food and feed.⁴⁷ Validation works are needed before omics technologies gain full recognition by regulatory authorities.⁴⁸ Our work contributed in this sense with new data about proteomic analysis of GM common bean.

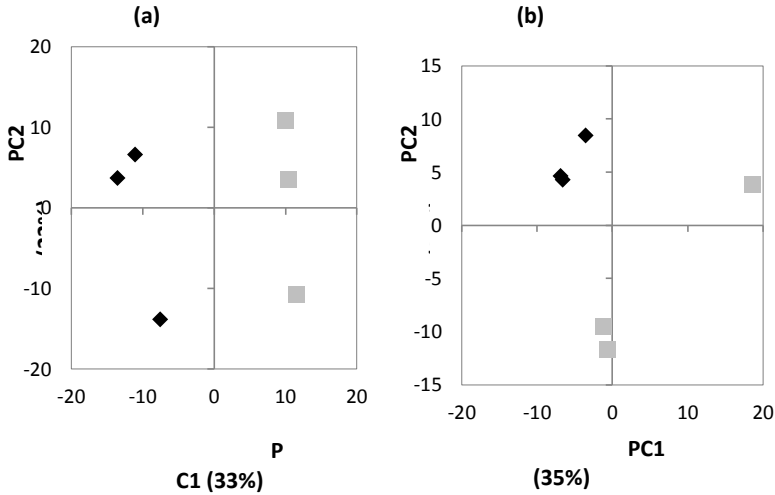


Figure 2.3.4 PCA score plots representing GM and non-GM comparison: (a) PCA plot of Pontal varieties (GM (squares) and non-GM (diamonds)). (b) PCA plot of Pérola varieties (GM (squares) and non-GM (diamonds)).

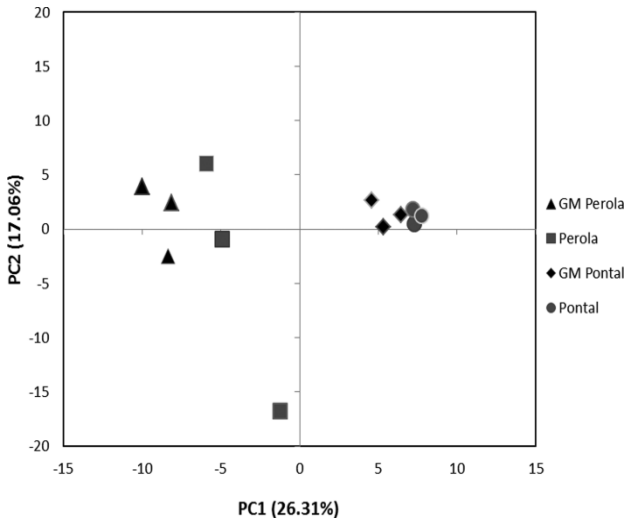


Figure 2.3.5 PCA score plots of matched spots volume (% vol) of 2-DE gels from grains of Pontal (circles), GM Pontal (diamonds), Pérola (squares), and GM Pérola (triangles) common beans.

AUTHOR INFORMATIONS

*(A.C.M.A.) Phone: +554837215382. E-mail: ana.arisi@ufsc.br.

Funding The work was financially supported by CNPq grant 470683/2012-0. GMB is the recipient of a CAPES PhD fellowship; PAVN, a CAPES PNPd fellowship; and ACMA, a CNPq PQ-2 fellowship.

Notes The authors declare no competing financial interest

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Josias Correa Faria from EMBRAPA for kindly providing the common bean grains. We are also thankful to CEBIME UFSC for MS facilities.

ABBREVIATION USED

2-DE, two-dimensional electrophoresis; BGMV, bean golden mosaic virus; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate;

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; DTT, dithiothreitol; Embrapa, Brazilian Agricultural Research Corporation; GM, genetically modified; GST, glutathione S transferase; MALDI, matrix-assisted laser desorption; MS, mass spectrometry; PCA, principal component analysis; PC, principal component; PMF, peptide mass fingerprint; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; TOF, time of flight.

SUPPLEMENTARY DATA

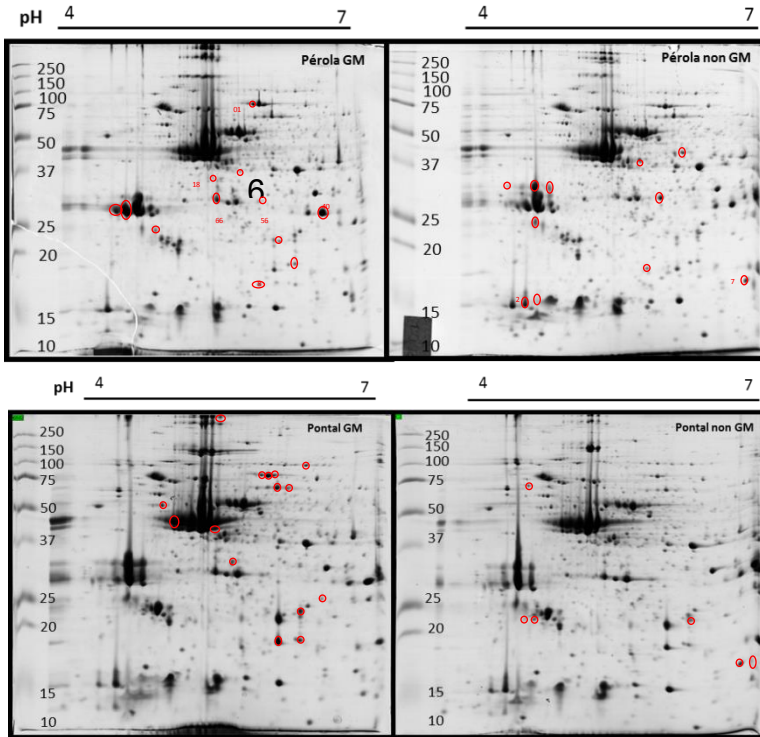


Figure S2.1 2-DE gels of Pérola, GM Pérola, Pontal and GM Pontal varieties showing spots differentially accumulated between GM and non-GM varieties and selected for MS analysis

Table S2.1 Normalized volume of differentially accumulated spots in Pontal and Pérola 2-DE analyses.

	Spot ID	M	Non GM	Fold Change	Anova
Pontal Analyses	71	2.0	2.1	1.4	1.5e-02
	109	2.7	2.8	1.4	5.6e-03
	112	1.4	2.0	1.4	4.2e-02
	148	2.9	2.4	1.7	6.9e-03
	154	3.5	2.8	1.4	3.6e-03
	160	4.8	2.5	1.3	4.5e-03
	165	3.1	4.2	1.4	2.3e-03
	194	1.6	1.6	1.5	3.4e-02
	291	1.6	2.4	1.6	2.9e-02
	382	2.7	6.8	1.5	1.5e-02
	408	2.3	2.4	1.2	9.1e-03
	446	12.3	2.3	1.1	5.9e-03
	502	8.6	2.9	1.8	2.2e-03
	510	3.0	6.8	1.5	2.1e-03
	513	2.7	7.5	1.2	3.2e-03
	533	1.7	1.7	1.8	2.7e-02
	534	1.8	8.1	1.9	2.1e-02
	535	5.6	81.9	1.9	1.3e-04
	550	2.3	1.9	1.4	1.5e-02
	639	1.9	4.5	2.8	1.3e-02
735	n.d.	4.6	-	3.2e-04	
Pérola Analyses	52	25.9	2.8	3.3	2.7E-03
	77	2.3	1.6	1.4	2.4E-02
	88	3.8	3.9	1.7	1.5E-03
	116	3.9	1.5	1.3	3.5E-02
	189	1.8	2.5	1.5	1.8E-02
	40	2.9	10.2	1.7	2.3E-03
	46	3.6	4.8	1.7	1.4E-03
	58	2.1	3.6	1.5	9.4E-03
	66	15.3	9.7	4.9	2.1E-05
	75	2.3	3.6	1.8	6.6E-03
	03	9.7	2.5	4.7	4.1E-03
	310	22.3	5.3	12.8	1.7E-04
	403	10.0	2.0	6.0	1.1E-02
	673	7.7	2.7	2.2	2.9E-03
	676	3.9	7.1	3.0	7.7E-04
	701	3.0	1.4	1.7	4.3E-02
	718	3.1	2.9	1.8	3.9E-03
	741	n.d.	3.5	-	1.0E-03
	749	n.d.	2.9	-	2.3E-03
	763	n.d.	7.5	-	3.8E-05
894	n.d.	5.0	-	2.2E-04	
934	5,7	n.d.	-	1,3E-04	
956	4,3	n.d.	-	4,2E-04	

2.4 REFERENCES

- (1) Broughton, W. J.; Hernandez, G.; Blair, M.; Beebe, S.; Gepts, P.; Vanderleyden, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil* 2003, 252, 55–128.
- (2) Hangen, L.; Bennink, M. R. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutr. Cancer* 2002, 44, 60–65.
- (3) Mojica, L.; Meyer, A.; Berhow, M. A.; Meljia, E. G. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have high antioxidant capacity, in vitro inhibition α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. *Food Res. Int.* 2015, 69, 38–48.
- (4) Lopez, A.; El-Naggar, T.; Duenas, M.; Ortega, T.; Estrella, I.; Hernandez, T.; Gomez-Serranillos, M. P.; Palomino, O. M.; Carretero, M. E. Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem.* 2013, 138, 547–555.
- (5) BRASIL, CONAB: Levantamento da safra de Grãos 2014/2015 no Brasil. At <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>, 2015.
- (6) Aragao, F. J. L.; Faria, J. C. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. *Nat. Biotechnol.* 2009, 27, 1086–1088.
- (7) Bonfim, K.; Faria, J. C.; Nogueira, E. O. P. L.; Mendes, E. A.; Aragao, F. J. L. RNAi-mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol. Plant–Microbe Interact.* 2007, 20, 717–726.
- (8) Aragao, F. J. L.; Nogueira, E. O. P. L.; Tinoco, M. L. P.; Faria, J. C. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the bean golden mosaic virus. *J. Biotechnol.* 2013, 166, 42–50.
- (9) Carvalho, J. L.; de Oliveira Santos, J.; Conte, C.; Pacheco, S.; Nogueira, E. O.; Souza, T. L.; Faria, J. C.; Aragão, F. J. Comparative analysis of nutritional compositions of transgenic RNAi-mediated virus-resistant bean (event EMB-PV0511) with its non-transgenic counterpart. *Transgenic Res.* 2015, 24, 813–819.
- (10) Ladics, G. S.; Bartholomaeus, A.; Bregitzer, P.; Doerrer, N. G.; Gray, A.; Holzhauser, T.; Jordan, M.; Keese, P.; Kok, E.; Macdonald, P.; Parrott, W.; Privalle, L.; Raybould, A.; Rhee, S. Y.; Rice, E.; Romeis, J.; Vaughn, J.; Wal, J.-M.; Glenn, K. Genetic

basis and detection of unintended effects in genetically modified crop plants. *Transgenic Res.* 2015, 24, 587–603.

(11) van Dijk, J. P.; de Mello, C. S.; Voorhijzen, M. M.; Hutten, R. C. B.; Arisi, A. C. M.; Jansen, J. J.; Buydens, L. M. C.; van der Voet, H.; Kok, E. J. Safety assessment of plant varieties using transcriptomics profiling and a one-class classifier. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2014, 70, 297–303.

(12) Barbosa, H. S.; Arruda, S. C. C.; Azevedo, R. A.; Arruda, M. A. Z. New insights on proteomics of transgenic soybean seeds: evaluation of differential expressions of enzymes and proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 402, 299–314.

(13) Barros, E.; Lezar, S.; Anttonen, M. J.; van Dijk, J. P.; Rohlig, R. M.; Kok, E. J.; Engel, K. H. Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Plant Biotechnol. J.* 2010, 8, 436–451.

(14) Ricoch, A. E.; Berge, J. B.; Kuntz, M. Evaluation of genetically engineered crops using transcriptomic, proteomic, and metabolomics profiling techniques. *Plant Physiol.* 2011, 155, 1752–1761.

(15) Gong, C. Y.; Li, Q.; Yu, H. T.; Wang, Z.; Wang, T. Proteomics insight into the biological safety of transgenic modification of rice as compared with conventional genetic breeding and spontaneous genotypic variation. *J. Proteome Res.* 2012, 11, 3019–3029.

(16) Gong, C. Y.; Wang, T. Proteomic evaluation of genetically modified crops: current status and challenges. *Front. Plant Sci.* 2013, 4, DOI: 10.3389/fpls.2013.00041

(17) Natarajan, S.; Luthria, D.; Bae, H.; Lakshman, D.; Mitra, A. Transgenic soybeans and soybean protein analysis: an overview. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 11736–11743.

(18) Zadraznik, T.; Hollung, K.; Egge-Jacobsen, W.; Meglic, V.; Sustar-Vozlic, J. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Proteomics* 2013, 78, 254–272.

(19) Ge, P.; Ma, C.; Wang, S.; Gao, L.; Li, X.; Guo, G.; Ma, W.; Yan, Y. Comparative proteomic analysis of grain development in two spring wheat varieties under drought stress. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 402, 1297–1313.

(20) Liu, Z.; Yang, X.; Fu, Y.; Zhang, Y.; Yan, J.; Song, T.; Rocheford, T.; Li, J. Proteomic analysis of early germs with high-

oil and normal inbred lines in maize. *Mol. Biol. Rep.* 2009, 36, 813–821.

(21) Balsamo, G. M.; Cangahuala-Inocente, G. C.; Bertoldo, J. B.; Terenzi, H.; Arisi, A. C. M. Proteomic analysis of four Brazilian MON810 maize varieties and their four non-genetically-modified isogenic varieties. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 11553–11559.

(22) Coll, A.; Nadal, A.; Rossignol, M.; Puigdomenech, P.; Pla, M. Proteomic analysis of MON810 and comparable non-GM maize varieties grown in agricultural fields. *Transgenic Res.* 2011, 20, 939–949.

(23) Oliveira, B. M.; Coorsen, J. R.; Martins-de-Souza, D. 2DE: the phoenix of proteomics. *J. Proteomics* 2014, 104, 140–150.

(24) Janes, K. A.; Yaffe, M. B. Data-driven modelling of signaltransduction networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006, 7, 820–828.

(25) Valentim-Neto, P. A.; Rossi, G. B.; Anacleto, K. B.; de Mello, C. S.; Balsamo, G. M.; Arisi, A. C. M. Leaf proteome comparison of two GM common bean varieties and their non-GM counterparts by principal component analysis. *J. Sci. Food Agric.* 2015, n/a.

(26) De La Fuente, M.; Borrajo, A.; Bermudez, J.; Lores, M.; Alonso, J.; Lopez, M.; Santalla, M.; De Ron, A. M.; Zapata, C.; Alvarez, G. 2- DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *J. Proteomics* 2011, 74, 262–267.

(27) Treml, D.; Venturelli, G. L.; Brod, F. C. A.; Faria, J. C.; Arisi, A. C. M. Development of an event-specific hydrolysis probe quantitative real-time polymerase chain reaction assay for Embrapa 5.1 genetically modified common bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 11994–12000.

(28) Candiano, G.; Bruschi, M.; Musante, L.; Santucci, L.; Ghiggeri, G. M.; Carnemolla, B.; Orecchia, P.; Zardi, L.; Righetti, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004, 25, 1327–1333.

(29) R Core Team. R: A language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2013.

(30) Lioi, L.; Sparvoli, F.; Galasso, I.; Lanave, C.; Bollini, R. Lectinrelated resistance factors against bruchids evolved through a number of duplication events. *Theor. Appl. Genet.* 2003, 107, 814–822.

- (31) Okutan, L.; Kongstad, K. T.; Jager, A. K.; Staerk, D. Highresolution α -amylase assay combined with high-performance liquid chromatography solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance spectroscopy for expedited identification of α -amylase inhibitors: proof of concept and alpha-amylase inhibitor in cinnamon. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 11465–11471.
- (32) Shade, R. E.; Schroeder, H. E.; Pueyo, J. J.; Tabe, L. M.; Murdock, L. L.; Higgins, T. J. V.; Chrispeels, M. J. Transgenic peaseeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Bio/Technology* 1994, 12, 793–796.
- (33) Gualberto, J. M.; Bonnard, G.; Lamattina, L.; Grienenberger, J. M. Expression of the wheat mitochondrial nad3-rps12 transcription unit – correlation between editing and messenger-RNA maturation. *Plant Cell* 1991, 3, 1109–1120.
- (34) Xia, L. X.; Ng, T. B. An antifungal protein from flageolet beans. *Peptides* 2005, 26, 2397–2403.
- (35) Douchkov, D.; Herbig, A.; Koch, G.; Mock, H. P.; Melzer, M.; Stephan, U. W.; Baumlein, H. Nicotianamine synthase: gene isolation, gene transfer and application for the manipulation of plant iron assimilation. *Plant Soil* 2002, 241, 115–119.
- (36) Basantani, M.; Srivastava, A. Plant glutathione transferases – a decade falls short. *Can. J. Bot.* 2007, 85, 443–456.
- (37) Chronopoulou, E.; Madesis, P.; Asimakopoulou, B.; Platis, D.; Tsaftaris, A.; Labrou, N. E. Catalytic and structural diversity of the fluazifop-inducible glutathione transferases from *Phaseolus vulgaris*. *Planta* 2012, 235, 1253–1269.
- (38) Oztetik, E. A tale of plant glutathione S-transferases: since 1970. *Bot. Rev.* 2008, 74, 419–437.
- (39) Klein, R. D.; Chidawanyika, T.; Tims, H. S.; Meulia, T.; Bouchard, R. A.; Pett, V. B. Chaperone function of two small heat shock proteins from maize. *Plant Sci.* 2014, 221, 48–58.
- (40) van Wijk, S. J. L.; Timmers, H. T. M. The family of ubiquitinconjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J.* 2010, 24, 981–993.
- (41) Lim, H.; Cho, M.-H.; Bhoo, S. H.; Hahn, T.-R. Pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase is involved in the tolerance of *Arabidopsis* seedlings to salt and osmotic stresses. *In Vitro Cell. Dev. Biol.: Plant* 2014, 50, 84–91.
- (42) Altenbach, S. B.; Tanaka, C. K.; Allen, P. V. Quantitative proteomic analysis of wheat grain proteins reveals differential

effects of silencing of omega-5 gliadin genes in transgenic lines. *J. Cereal Sci.* 2014, 59, 118–125.

(43) Kuiper, H. A.; Kok, E. J.; Engel, K. H. Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003, 14, 238–243.

(44) Kok, E. J.; Keijer, J.; Kleter, G. A.; Kuiper, H. A. Comparative safety assessment of plant-derived foods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2008, 50, 98–113.

(45) Davies, H. A role for “omics” technologies in food safety assessment. *Food Control* 2010, 21, 1601–1610.

(46) Choze, R.; Alcantara, G. B.; Alves, E. D.; Silva, L.; Faria, J. C.; Liao, L. M. Distinction between a transgenic and a conventional common bean genotype by H-1 HR-MAS NMR. *Food Chem.* 2013, 141, 2841–2847.

(47) Snell, C.; Bernheim, A.; Berge, J.-B.; Kuntz, M.; Pascal, G.; Paris, A.; Ricroch, A. E. Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: a literature review. *Food Chem. Toxicol.* 2012, 50, 1134–1148.

(48) Ricroch, A. E. Assessment of GE food safety using “-omics” techniques and long-term animal feeding studies. *New Biotechnol.* 2013, 30, 349–354.

CAPÍTULO III

Comparação do proteoma do grão de duas variedades de milho, com reduzido teor de flavonóides, *p1-ww*, e alto teor de flavonóides, *p1-rr*

Artigo publicado na *Food Biotechnology*
DOI:10.1080/08905436.2016.1166382

3 Proteome comparison of grains from two maize genotypes, with colorless kernel pericarp (*p1-ww*) and red kernel pericarp (*p1-rr*)

Geisi Melo Balsamo, Carla Souza de Mello, Ana Carolina Maisonnave Arisi

ABSTRACT

Maize genotypes, *P1-rr* (R) and *P1-ww* (W) have high and low flavonoid content, respectively. Grain proteome profiles of these maize genotypes were compared. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was performed from three soluble protein extracts of each maize genotype and 55 protein spots were differentially expressed using univariate analysis. Differentially expressed protein spots were analyzed by mass spectrometry – peptide mass fingerprint (MS-PMF) and 8 of them were identified on the *Zea mays* L. database. Additionally, grouping of proteomic data was evaluated by principal component analysis (PCA) using the 135 matched spots in all six analyzed gels. First component (PC1) represented 46.5% of total variation and second component (PC2) referred to 22.5%. This multivariate analysis showed the separation of the two maize genotypes proteome profiles using 2-DE data. The data presented in this study shows that 2-DE complemented with PCA is applicable to food analysis.

Keywords: proteome, two-dimensional electrophoresis, Principal Component Analysis, multivariate analysis, *Zea mays*.

3.1 INTRODUCTION

Maize (*Zea mays*) is an important cereal cultivated for food and feed purposes. Maize is widely studied because it has global and wide economic and social relevance in addition to important agronomic and genetic characteristics. Several features, such as a significant collection of mutant stocks, placed maize as one of the most systematically known genetic systems and a model to study plant biology. Considerable progress was acquired in maize biology research through availability of the maize genomic sequence of the B73 line, as well as accessibility of the genetic information in public databases (Schnable, 2012, Pechanova, Takac et al. 2013;)

Phlobaphenes (3-deoxyflavonoid pigments) are produced in maize by flavonoid pathway modulated through transcriptional regulation by *p1* gene. This gene encodes an R2R3-MYB transcription factor (Jiang, Gu et al. 2004) which regulates gene expression of phlobaphene pathway, resulting in red pericarp and red kernel pigmentation (Grotewold, Drummond et al. 1994). The P1 protein binds to promoters of flavonoid synthesis structural genes, such as chalcone synthase, chalcone flavanone isomerase, and dihydroflavonol reductase, which are encoded by *c2*, *chi* and *a1* genes, respectively (Sharma, Chai et al. 2012). Alleles of the *p1* gene confer differential tissue-specific expression of phlobaphenes accumulation in maize. They are classified based on their pigmentation patterns of pericarp and cob glumes, such as *P1-rr* (red pericarp and red cob glume) and *P1-ww* (white pericarp and white cob glume) (Styles and Ceska, 1989 , Robbins, Roy et al. 2013, Petroni, Pilu et al. 2014). These flavonoid pigments are important secondary metabolites in plants related to the response to pathogens, protection from UV radiation, pollination process and response to stress (Petroni and Pilu et al. 2014). In the context of the food science and food applications, the human consumption of foods containing specific classes of flavonoids have relevance to reduced risk of diet-linked chronic diseases such a cardiovascular diseases, cancer and obesity-linked diabetes. Therefore, knowledge about the flavonoid pathway regulation can provide the pathway for the development of functional food by breeding strategies (Tsuda, 2012).

Profiling techniques such as transcriptomics, proteomics and metabolomics have increasingly been suggested as non-targeted approaches for evaluation of new plant varieties. Proteomic analysis is a widely used profiling technique, which investigates differences among proteome profiles of several samples. Among the various methods available for qualitative and quantitative comparison of proteomes (van Wijk, 2001), two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) is a well-established technique in plant science (Lee, Han et al. 2010, Balsamo, Cangahuala-Inocente et al. 2011, Altenbach, Tanaka et al. 2014). 2-DE is a technique with great power of separation of proteins, high robustness, parallelism and unique ability to analyze complete set of proteins at high resolution (Rabilloud, Chevallet et al. 2010). 2-DE coupled with mass spectrometry (MS) is a genuine top-down analytical approach used in comparative (Dhar, Gupta et al. 2012, Oliveira, Coorsen et al. 2014, Pomastowski and Buszewski 2014; Sharma, Aggarwal et al. 2014).

Omics analyses generate huge amount of data, which corresponds to a set of proteins simultaneously expressed in determined biological sample. These data can be assessed by univariate statistics such as t-test when the purpose is to evaluate up- and down-accumulation of specific proteins. However, due to the prevailing limited amount of gels on 2-DE analysis, this univariate approach may lead to lack of degrees of freedom (Engkilde, Jacobsen, & Søndergaard, 2007). Multivariate statistics approaches are effective because they reduce complexity of data, predicting trends and being less affected by data structure (Grove et al., 2008). Among multivariate analyses, one of the most common methods for dimension reduction is principal component analysis (PCA). This is an unsupervised analysis used for transforming a set of observed variables into a new set of uncorrelated variables, leading to dimension reduction through design of new axes, called principal components (PC) (Janes & Yaffe, 2006). Proteomic analysis and PCA were combined to discriminate seed proteome of two traditional maize inbred lines contrasting in grain hardness (Pinheiro, Sergeant, Machado, Renaut, & Ricardo, 2013), to compare transgenic and non-transgenic plants (Geisi M. Balsamo, et al., 2011; Geisi Mello. Balsamo, Valentin-Neto, de Mello, & Arisi, 2015; Barros et al., 2010; Valentin-Neto et al., 2015; Zadraznik, Hollung, Egge-

Jacobsen, Meglic, & Sustar-Vozlic, 2013) and to evaluate common bean seeds (De La Fuente et al., 2011).

In this work, two maize genotypes having different flavonoid pigmentation (*P1-ww* and *P1-rr*) were selected in order to compare protein profiles using 2-DE. Statistical analysis were performed by analysis of variance (ANOVA) and by PCA. Differentially expressed proteins were identified by mass spectrometry - peptide mass fingerprint (MS-PMF).

3.2 MATERIAL AND METHODS

Plant material

Seeds of low flavonoid content (*P1-ww*, W, white 107H) and high flavonoid content maize (*P1-rr*, R, red 107H) were kindly provided by Maize Genetics Cooperation Stock Center. Both genotypes contain alleles of the *p1* maize gene: *P1 - ww* specifies white (colorless) kernel pericarp and cob glumes, due to lack of transcription of the *p1* gene and *P1 - rr* has red kernel pericarp and red cob glumes, due to expression of the *p1* gene.

Seeds of each genotype were placed separately on moistened germination paper and maintained in chamber for 72 h at 25 °C, with no light. Germinated seeds were transferred to soil and plants were cultivated side by side in a growth chamber at 30 °C in 14h-light and 10h-darkness photoperiod, for 5 months. Grains of each genotype were collected and kept at -80 °C until 2-DE procedures.

Protein extraction

Samples were prepared from a pool containing 5 g of grains, for each variety. Grains were ground to a fine powder in liquid nitrogen using analytical mill. Soluble total protein was precipitated using TCA (trichloroacetic acid) – acetone method with modifications (Damerval, Devienne, Zivy, & Thiellement, 1986). Approximately 300 mg of the each sample were homogenized with 2 mL of pure acetone containing 125 g L⁻¹ TCA and 1.25 g L⁻¹ Dithiothreitol (DTT).

Proteins precipitation was carried out at -20 °C for 1 h. After centrifugation at 10,000 g for 20 min at 4 °C, upper phase was discarded and protein pellets were washed with pure cold acetone containing 1.25 g L⁻¹ DTT. Dried protein pellets were

suspended in 700 μL of a solution containing 7 mol L⁻¹ urea, 2 mol L⁻¹ thiourea, 0.3 g L⁻¹ CHAPS, 0.2 mL L⁻¹ IPG buffer solution, pH 3-10, and 0.15 g L⁻¹ DTT. Tubes were maintained for 30 min at room temperature and homogenized in vortex. After centrifugation at 10,000 g for 30 min at 25 °C, supernatant was purified using 2D Clean-up kit and protein concentrations were determined using a 2D Quant kit (GE Healthcare). Three protein extracts were performed from the same pool of grains, for each genotype, representing technical replicates.

2-DE gel electrophoresis

Grain proteomic profiles were analyzed by Two-Dimensional Gel Electrophoresis (2-DE). Isoelectric focusing (IEF) was performed using 13 cm pH 3-10 linear IPG strips (GE Healthcare), strips were rehydrated for 18h with a solution containing 250 μg of total protein diluted in rehydration buffer containing 0.2 mL L⁻¹ IPG Buffer pH 3-10 (GE Healthcare), totally a volume of 250 μL . Strips containing samples were focused in Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing System (GE Healthcare) under the following conditions: step of 500 V until 500 Vh, voltage gradients of 1000 V and 8000 V until 14500 Vh, and a final step of 8000 V until 17800 Vh, up to a total of 34000 Vh. After IEF was completed, the strips were kept at -80 °C until required for the second dimension. Prior to applying to SDS-PAGE, the proteins in the IPG strips were subjected to reduction with 10 mg mL⁻¹ DTT in 5 mL of equilibration buffer (6 mol L⁻¹ urea, 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.8), 3 mL L⁻¹ glycerol, 0.2 g L⁻¹ SDS and 2.5 mg L⁻¹ bromophenol blue), followed by alkylation with 25 mg mL⁻¹ iodoacetamide in the same buffer. The sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out in three independent runs containing one gel from each genotype. Samples were named W1 and R1 in the first run, W2 and R2 in the second run and W3 and R3 in the third run. The strips were then loaded on top of 12.5% polyacrylamide gel; a molecular weight marker 10-250 kDa (Precision Plus Protein Standards, BioRad) was used. The second dimension SDS-PAGE gels were run in a SE 600 Ruby System (GE Healthcare) under 15 mA per gel for 30 min and 30 mA per gel for 3 h. The temperature was kept at 10 °C using a MultiTemp III Thermostatic Circulator (GE Healthcare). Protein spots were visualized by staining the gels

with 0.01 g L⁻¹ Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to protocol described previously (Candiano et al., 2004)

Image and data analysis

Gels were scanned with an Image Scanner System II and analyzed with ImageMaster™ Platinum v.7.0 software (both from GE Healthcare). The following parameters were used for spot detection: saliency ≥ 100 , area ≥ 11 and smooth ≥ 6 . The intensity of each spot in one gel was normalized as a proportion of the total protein intensity detected for the entire gel (relative volume). Relative spots volumes (% vol) were compared and analyzed. The gel containing higher number of detected protein spots in each run was selected as reference gel for comparative 2-DE analysis. Gels were grouped by genotype for analysis of the differentially expressed spots, considered by statistical difference according to ANOVA ($P < 0.05$). Exclusive spots were those present in three gels of one genotype and absent in the other genotype. Data of univariate analysis obtained by ANOVA were median-centered and matched spots among all gels were selected and log₂ transformed before multivariate analysis. PCA was performed using R Language (R Core Team, 2013). The function “prcomp” from “gdata” package was used.

MALDI-TOF MS analysis

Spots corresponding to proteins of interest were individually excised from gel and submitted two times to destaining procedure with a solution containing 50% acetonitrile (AcN) and 25 mmol L⁻¹ NH₄HCO₃ for 30 min at 25 °C. The solution was replaced by pure acetonitrile and dried under vacuum. Excised spots were kept on ice for 30 min with 20 ng μL^{-1} trypsin (Trypsin V5280, Promega), then incubated at 37 °C for 18h. After digestion, peptides were mixed 1:1 with MALDI matrix solution (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, 50% AcN and 1 g L⁻¹ trifluoroacetic acid), laid in a MTP 384 target plate (Bruker) and dried at room temperature. Mass spectrometry data of tryptic-digested spots was acquired by Autoflex III MALDI-TOF (Bruker) through matrix-assisted laser-desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). MS was carried out on manual mode by FlexControl™ software and spectra were

acquired in a positive ion reflection mode with accelerating voltage of 20 kV. The following main parameters were used: laser firing rate of 100 Hz, mass range of 800.0 – 4,000.0 Da, mass threshold 95 Da, laser intensity 25 – 65%, 2,000 – 4,000 shots accumulated for each spectrum. External calibration was performed using a peptide mixture $[M + H]^+$ ions of angiotensin I, angiotensin II, substance P, bombesin and adrenocorticotrophic hormone. Peak lists were analyzed using FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Protein identification was performed using Mascot and databases of *Zea mays* and *Oryza sativa* protein sequences (<http://www.uniprot.org>; <http://www.phytozome.net>). Only proteins with Expectation value lower than 0.05 (E-value < 0.05) were considered positive identification. Conserved Domain Database (CDD) (29), GeneOntology[®] and Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProtKB) databases were used to access the family of identified proteins using alignment in peptide sequence to related with conserved domains.

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

Three protein extracts of each maize genotype, low flavonoid content maize grains (W) and high flavonoid content maize grains (R), were prepared and protein concentration ranged from 2.75 to 4.55 mg g⁻¹, this low yield of soluble proteins was obtained after using 2D Clean-up Kit.

Stained gels obtained by SDS-PAGE (Figure 3.3.1) were subjected to comparative analysis on ImageMaster[™], revealing the total number of protein spots per gel of 525 ± 51 and 538 ± 38 for replicate gels of *P1-ww* and *P1-rr*, respectively (Table 3.3.1). Gel similarities among replicate gels were analyzed using scatter plots for matched spots among the same genotype (Table 3.3.1) and between different genotypes in the same run (Table 3.3.2).

Table 3.3.1. Total spot number, matched spots, slope and correlation coefficient (R^2) of scatter plots of 2-DE triplicates of colorless maize grains *P1-ww* (W1, W2 and W3) and red maize grains *P1-rr* (R1, R2 and R3).

Gel	Total spots	Matched spots	R^2	Slope
W1*	595	444	-	-
W2	474	404	0.95	0.93
W3	505	388	0.91	0.85
R1	533	361	0.95	1.12
R2*	587	455	-	-
R3	495	423	0.94	0.95

*Reference gel

Table 3.3.2 Matched spots, slope and correlation coefficient (R^2) of scatter plots of 2-DE, comparing in each run, colorless maize grains *P1-ww* (W1, W2 and W3) and red maize grains *P1-rr* (R1, R2 and R3).

Run	Gel	Total spot number	Matched spots	R^2	Slope
1	W1*	595	324	0.63	1.83
	R1	533			
2	W2	474	319	0.77	0.73
	R2*	587			
3	W3*	505	303	0.74	1.48
	R3	495			

* reference gel

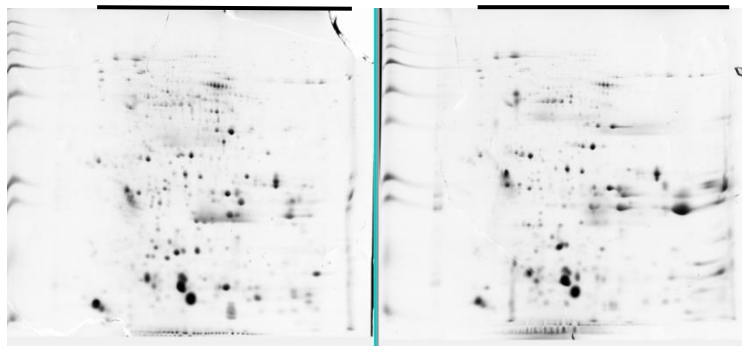


Figure 3.3.1 Representative 2-DE gels of protein extracts from maize grains: *P1-ww* has low flavonoid content and *P1-rr* has high flavonoid content.

Replicate gels of the same genotype had high correlation (Table 3.3.1). Comparing *P1-ww* and *P1-rr*, the slopes of the best-fit line varied from 0.73 to 1.83 and the correlation coefficients of scatter plots ranged from 0.63 to 0.77 (Table 3.3.2). Correlation between *P1-ww* and *P1-rr* in the scatter plots has shown low relationship in grain proteome profiles of different genotypes.

The proteomic analysis by ImageMaster™ and univariate analysis revealed 55 differentially expressed protein spots between *P1-ww* and *P1-rr* maize: 11 overexpressed proteins and 14 exclusive proteins in *P1-ww* maize; 17 overexpressed proteins and 13 exclusive proteins in *P1-rr* maize (Table 3.3.3). The 55 spots were analyzed by mass spectrometry and proteins were identified from their peptide mass fingerprint, and one identity could be assigned to 8 of 55 spots (Figure 3.3.2, Table 3.3.4). The comparison of spot volume percentage (%vol) of 8 identified proteins is presented in Figure 3.3.3.

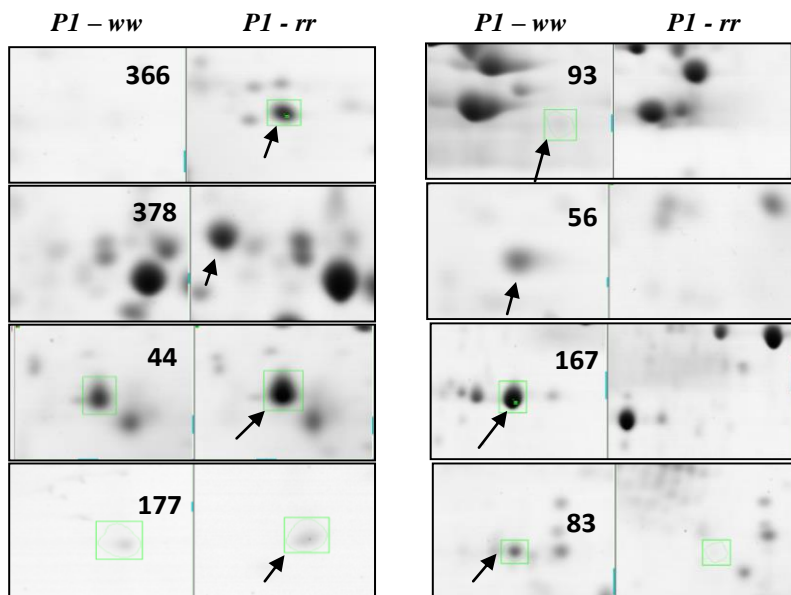


Figure 3.3.2. Identified protein spots differentially detected between *P1-rr* and *P1-ww* using 2-DE analysis. Identified spots are indicated with arrows. Images were selected in ImageMaster[®] software from one of the three gels.

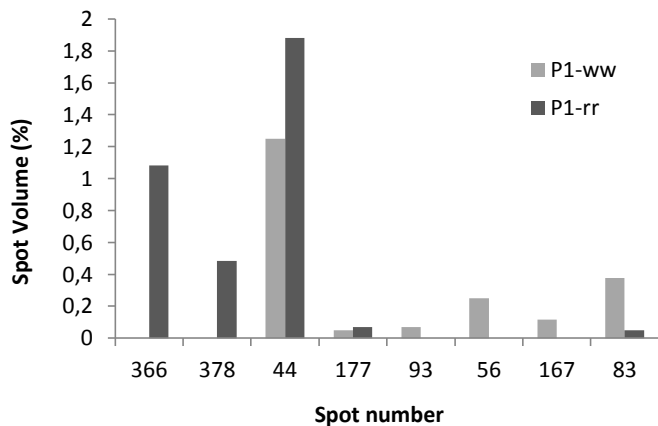


Figure 3.3.3 Spot volume percentage (% vol) of identified proteins calculated by ImageMaster software, using 2-DE gels data of *P1-ww* and *P1-rr* proteins extracts.

Among the identified proteins in *P1-rr*, exclusive spot 366 was a hypothetical protein belonging to the DNA polymerase III (subunits gamma and tau) family. Another hypothetical protein was also identified from exclusive spot 378, belonging to a family of proteins of unknown function, containing a region with number of highly conserved cysteine residues. Spot 44 was overexpressed in *P1-rr*, and it was identified as a protein mix containing hypothetical protein and putative oxidoreductase. Phlobaphene pathway is triggered by *p1* gene in *P1-rr* maize and this gene encodes a Myb transcription factor that binds to the promoter of the *a1* gene, which encodes NADPH reductase. This enzyme belongs to oxidoreductase protein family and reduces the flavanone C ring resulting in a flavan-4-ol, a phlobaphene precursor (Grotewold et al. 1994).

Table 3.3.3. Spots differentially accumulated in 2-DE gels by ImageMaster™ analysis and identified proteins by PMF of colorless maize grains (*P1-ww*) and red maize grains (*P1-rr*).

Differential accumulation*	Number of protein spots	Number of identified proteins
Overexpressed <i>P1-ww</i>	11	1
Overexpressed <i>P1-rr</i>	17	2
Exclusive <i>P1-ww</i>	14	3
Exclusive <i>P1-rr</i>	13	2
Total	55	8

*Reproducible spots in three replicates of each variety and presenting significant difference (ANOVA, $P < 0.05$) were considered differentially accumulated. Exclusive proteins presented %Vol ≥ 0.05 .

Protein spot 177 was overexpressed in *P1-rr* and corresponded to ribosomal large subunit pseudo uridine synthase-like, the only protein which was actually identified in *Oryza sativa* database instead of *Zea mays* database. Pseudo uridine synthase catalyzes the isomerization of specific uridines in an RNA molecule to pseudo uridine (5-ribosyluracil, psi) requiring no cofactors.

Spots 93, 56 and 167 were detected only in *P1-ww* gels. MS analysis enabled the identification of spot 56, exclusive in *P1-ww*,

as 16.9 kDa class I heat shock protein involved in response to stress and belonging to molecular chaperone multi-domains. A trigger role by chaperones is in protein refolding after heat shock and diverse forms of stress, including exogenous and endogenous stress (Klein et al. 2014). Spot 167 was identified as hypothetical protein of the Uridine Monophosphate Kinase (UMPkin) family due to ATP-binding specific site. A possible function is the catalysis of the reversible phosphoryl transfer from ATP to uridine or cytidine producing UMP or CMP. Overexpression of spot 83 in *P1-ww* was identified as phosphomethylpyrimidine kinase / thiamin - phosphate pyrophosphorylase. This enzyme catalyzes two consecutive phosphorylation steps in the thiamine biosynthesis pathway and leads to the synthesis of vitamin B1. Thiamine diphosphate (TDP) is an active cofactor form required for enzymes present on carbohydrate and amino acid metabolism in all living organisms (Tunc-Ozdemir et al. 2009).

Principal Component Analysis (PCA) was performed with 135 matched spots datasets of all six analyzed gels. The volume percentage of matched spots was \log_2 transformed and then submitted to PCA. First component (PC1) represented 46.5% of total variation and second component (PC2) referred to 22.5% (Figure 3.3.4). The first principal component separated gels between the two maize genotypes, W and R, whereas first and second component did not separate gels from different runs (1, 2 and 3).

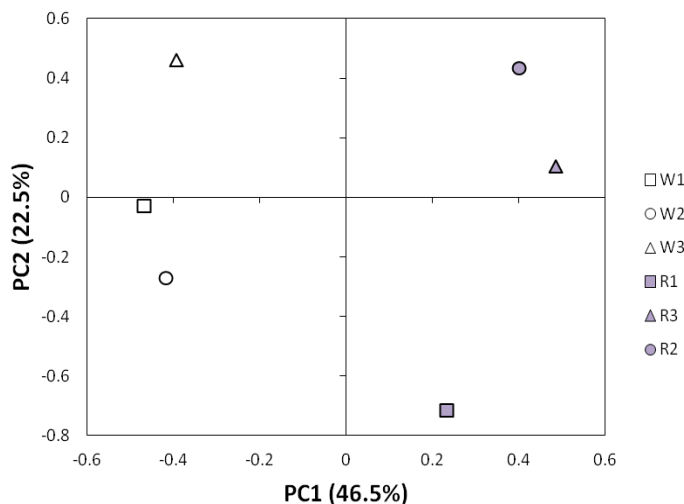


Figure 3.3.4 Principal Component Analysis plot of 2-DE matched protein spots (% vol) of *P1-ww* and *P1-rr* maize grains

2-DE is broadly used to measure the amount of protein spots in diverse organisms, comparing different groups and its replicates. PCA reduces the complexity of data and provides better visualization of possible connections between the variables. The basic idea is to reduce the dimension and find hidden structures in a dataset in order to describe these structures (Gottlieb et al. 2004). The data presented here shows that PCA is applicable to complement proteomic comparison of new plant genotypes. Previous study with two common bean varieties discriminated leaf proteome profiles of the genetically modified one and its counterpart by PCA analysis, showing PCA as an effective tool to compare proteomes of GM and non GM plant varieties (Balsamo et al. 2015; Valentim-Neto et al. 2015).

Proteins identified by MS-PMF in this work were related to responses to different kinds of stresses. Overall results suggested a relation between the difference in phlobaphene pathway, occurred in *P1-ww* and *P1-rr* genotypes, and proteins involved in stress response. The pigmented pericarp expressed by the *P1-rr* genotype was composed of several flavonoid compounds and antioxidants that are involved in resistance to maize *fusarium* diseases (Sampietro, Fauguel et al. 2013). A

previous study investigated the behavior of *P1-wr* and *P1-rr* under field conditions and natural fungal pathogen infection. Authors suggest the potential role of flavonoid pigments in maize pericarp in the reduction of *Fusarium* infection and fumonisin accumulation, depending on environmental conditions (Venturini, et al. 2015). Using RNA-sequencing, it was shown that the *p1* gene was a modulator of several thousand maize genes, that includes genes involved in primary metabolism and production of other compounds (Morohashi et al. 2012). Regulator genes in flavonoid pathway have been studied in the past, due its role in maize stress response, in plants and therewith production of bioactive pigments related to human health (Petroni et al. 2014; Sharma et al. 2012; Tsuda 2012). Additionally, one overexpressed protein identified in *P1-rr* has oxidoreductase function, possibly related to phlobaphene pathway. Furthermore, PCA analysis resulted in separation between the genotypes *P1-ww* and *P1-rr*, using data from matched protein spots from six 2-DE gels.

In conclusion, univariate analysis complemented by multivariate analysis was useful to compare proteome profiles of two maize genotypes with different pigmentation patterns, using 2-DE approach.

Table 3.3.4. List of differentially expressed proteins identified by MS-PMF of colorless maize grains (*PI-ww*) and red maize grains (*PI-rr*)

Expression	Spot I	Accession number GenBank	M _r (kDa)/pI theor. exper.	Mascot score expet.	e value	Protein/function family CDD ^b	Original organism
Only detected in <i>PI-rr</i>	366	DAA57073.1	34.7/5.07	12/7.7	74	0.002†	DNA polymerase III subunit gamma and tau <i>Zea mays</i>
	378	AFW81376	12.7/9.3	17/5.3	62	0.036	Hypothetical protein Unknown function <i>Zea mays</i>
overexpression in <i>PI-rr</i>	44	NP_00114105 DAA43267	38.1/5.96 29.2/6.66	14/5.11	74	0.002†	Putative oxidoreductase Hypothetical protein <i>Zea Mays</i>
	177	BAD53590	48.4/8.75	33/9.38	51	0.033	Pseudouridine synthase activity <i>Oryza sativa japona</i> group <i>Zea mays</i>
Only detected in <i>PI-ww</i>	56	ACG24803	17.05/6.77	15/6.89	70	0.006†	Stress Responder/ Molecule chaperone (small heat shock protein) <i>Zea mays</i>
	167	AEW69683.1	39.02/8.7	31/6.65	63	0.033	Hypothetical protein/ Uridin Monophosphate kinase (UMPK) <i>Zea mays</i>
Overexpression in <i>PI-ww</i>	83	ACG38327	36.72/8.25	18/5.06	71	0.004†	Thiamine monophosphate synthase <i>Zea mays</i>

Mascot score represents the score obtained in the matching with NCBItr database by MASCOT software.

^b CDD is a conserved domains database used by NCBItr to identify function of proteins.

Acknowledgments

The present work was financially supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology, Brazil, CNPq Project 470683/2012-0, and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) Ministry of Education, Brazil. G.M.B is the recipient of a CNPq doctoral fellowship and C.S.M. is the recipient of a CAPES doctoral fellowship.

There is no conflict of interest.

3.4 REFERENCES

- Altenbach, S. B., Tanaka, C. K., & Allen, P. V. (2014). Quantitative proteomic analysis of wheat grain proteins reveals differential effects of silencing of omega-5 gliadin genes in transgenic lines. *Journal of Cereal Science*, 59(2), 118-125.
- Balsamo, G. M., Cangahuala-Inocente, G. C., Bertoldo, J. B., Terenzi, H., & Arisi, A. C. M. (2011). Proteomic Analysis of Four Brazilian MON810 Maize Varieties and Their Four Non-Genetically-Modified Isogenic Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11553-11559.
- Balsamo, G. M., Valentin-Neto, P. A., de Mello, C. S., & Arisi, A. C. M. (2015). Comparative Proteomic Analysis of Two Varieties of Genetically Modified (GM) 281 Embrapa 5.1 Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Non-GM Counterparts.
- Barros, E., Lezar, S., Anttonen, M. J., van Dijk, J. P., Rohlig, R. M., Kok, E. J., et al. (2010). Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Plant Biotechnology Journal*, 8(4), 436-451.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., et al. (2004). Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9), 1327-1333.
- Damerval, C., Devienne, D., Zivy, M., & Thiellement, H. (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic-variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7(1), 52-54.

- De La Fuente, M., Borrajo, A., Bermudez, J., Lores, M., Alonso, J., Lopez, M., et al. (2011). 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Journal of Proteomics*, 74(2), 262-267.
- Dhar, R. S., Gupta, S. B., Singh, P. P., Razdan, S., Bhat, W. W., Rana, S., et al. (2012). Identification and characterization of protein composition in *Withania somnifera*-an Indian ginseng. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 21(1), 77-87.
- Engkilde, K., Jacobsen, S., & Søndergaard, I. (2007). Multivariate data analysis of proteome data. *Methods Mol Biol*, 355, 195-210.
- Gottlieb, D. M., Schultz, J., Bruun, S. W., Jacobsen, S., & Søndergaard, I. (2004). Multivariate approaches in plant science. *Phytochemistry*, 65(11), 1531-1548.
- Grotewold, E., Drummond, B. J., Bowen, B., & Peterson, T. (1994). THE MYB-HOMOLOGOUS P-GENE CONTROLS PHLOBAPHENE PIGMENTATION IN MAIZE FLORAL ORGANS BY DIRECTLY ACTIVATING A FLAVONOID BIOSYNTHETIC GENE SUBSET. *Cell*, 76(3), 543-553.
- Grove, H., Jorgensen, B. M., Jessen, F., Søndergaard, I., Jacobsen, S., Hollung, K., et al. (2008). Combination of Statistical Approaches for Analysis of 2-DE Data Gives Complementary Results. *Journal of Proteome Research*, 7(12), 5119-5124.
- Janes, K. A., & Yaffe, M. B. (2006). Data-driven modelling of signal-transduction networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 820-828.
- Jiang, C. H., Gu, J. Y., Chopra, S., Gu, X., & Peterson, T. (2004). Ordered origin of the typical two- and three-repeat Myb genes. *Gene*, 326, 13-22.
- Klein, R. D., Chidawanyika, T., Tims, H. S., Meulia, T., Bouchard, R. A., & Pett, V. B. (2014). Chaperone function of two small heat shock proteins from maize. *Plant Science*, 221, 48-58.
- Morohashi, K., Casas, M. I., Ferreyra, M. L. F., Mejia-Guerra, M. K., Pourcel, L., Yilmaz, A., et al. (2012). A Genome-Wide Regulatory Framework Identifies Maize Pericarp Color1 Controlled Genes (vol 24, pg 2745, 2012). *Plant Cell*, 24(9), 3853-3853.
- Oliveira, B. M., Coorssen, J. R., & Martins-de-Souza, D. (2014). 2DE: The Phoenix of Proteomics. *Journal of Proteomics*, 104, 140-150.

- Pechanova, O., Takac, T., Samaj, J., & Pechan, T. (2013). Maize proteomics: An insight into the biology of an important cereal crop. *Proteomics*, 13(3-4), 637-662.
- Petroni, K., Pilu, R., & Tonelli, C. (2014). Anthocyanins in corn: a wealth of genes for human health. *Planta*, 240(5), 901-911.
- Pinheiro, C., Sergeant, K., Machado, C. M., Renaut, J., & Ricardo, C. P. (2013). Two Traditional Maize Inbred Lines of Contrasting Technological Abilities Are Discriminated by the Seed Flour Proteome. *Journal of Proteome Research*, 12(7), 3152-3165.
- Pomastowski, P., & Buszewski, B. (2014). Two-dimensional gel electrophoresis in the light of new developments. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 53, 167-177.
- R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., & Lelong, C. (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of Proteomics*, 73(11), 2064-2077.
- Robbins, M. L., Roy, A., Wang, P.-H., Gaffoor, I., Sekhon, R. S., Buanafina, M. M. d. O., et al. (2013). Comparative proteomics analysis by DIGE and iTRAQ provides insight into the regulation of phenylpropanoids in maize. *Journal of Proteomics*, 93, 254-275.
- Sampietro, D. A., C. M. Fauguel, M. A. Vattuone, D. A. Presello and C. A. 355 N. Catalan (2013). Phenylpropanoids from maize pericarp: resistance factors to kernel infection and fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. *European Journal of Plant Pathology* 135(1): 105-358 113.
- Schnable, P. S. (2012). The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. *Science*, 337(6098),1040-1040.
- Sharma, M., Chai, C., Morohashi, K., Grotewold, E., Snook, M. E., & Chopra, S. (2012). Expression of flavonoid 3'-hydroxylase is controlled by P1, the regulator of 3-deoxyflavonoid biosynthesis in maize. *Bmc Plant Biology*, 12.
- Sharma, S., Aggarwal, R., Yadav, A., & Gupta, S. (2014). Protein mapping of *Chaetomium globosum*, a potential biological control agent through proteomics approach. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 23(3), 284-292.
- Styles, E. D., & Ceska, O. (1989). PERICARP FLAVONOIDS IN GENETIC STRAINS OF ZEA-MAYS. *Maydica*, 34(3), 227-237.

- Tsuda, T. (2012). Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(1), 159-170.
- Tunc-Ozdemir, M., Miller, G., Song, L., Kim, J., Sodek, A., Koussevitzky, S., et al. (2009). Thiamin Confers Enhanced Tolerance to Oxidative Stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 151(1), 421-432.
- Valentim-Neto, P. A., Rossi, G. B., Anacleto, K. B., de Mello, C. S., Balsamo, G. M., & Arisi, A. C. M. (2015). Leaf Proteome Comparison of Two GM Common Bean Varieties and Their Non-GM Counterparts by Principal Component Analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, n/a-n/a.
- Van Wijk, K. J. (2001). Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiology*, 126(2), 501-508.
- Venturini, G., S. L. Toffolatti, G. Assante, L. Babazadeh, P. Campia, E. Fasoli, D. Salomoni and A. Vercesi (2015). The influence of flavonoids in maize pericarp on fusarium ear rot symptoms and fumonisin accumulation under field conditions. *Plant Pathology* 64(3): 671-679.
- Zadraznik, T., Hollung, K., Egge-Jacobsen, W., Meglic, V., & Sustar-Vozlic, J. (2013). Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Proteomics*, 78, 254-272.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho apresentou-se uma abordagem de análise ampla e não direcionada como alternativa complementar às comparações atualmente utilizadas na avaliação de segurança de novas variedades vegetais. A análise proteômica através da técnica 2-DE/MS mostrou-se eficaz para detectar diferenças nas variedades analisadas.

O objetivo de uma comparação entre perfis de proteína é alcançado quando as etapas da técnica escolhida estiverem adequadamente padronizadas. Um dos fatores limitantes na técnica 2-DE é a reprodutibilidade, por isso uma rigorosa padronização deve ser feita desde a extração até a seleção dos parâmetros de identificação das proteínas no banco de dados. A análise dos géis de eletroforese e a manipulação adequada da grande quantidade de dados gerados representa uma etapa importante para a obtenção de resultados confiáveis. Além disso, a espectrometria de massa gera dados que nos direcionam aos bancos de dados de proteínas, onde as informações precisam ser bem avaliadas antes de serem aceitas.

O estudo do proteoma dos grãos das duas variedades de feijão comum Embrapa 5.1, Pérola e Pontal, resultou no primeiro artigo de proteômica 2-DE MS/MS com identificação de proteínas já publicado para os grãos desse evento GM. Os resultados da análise do feijão Embrapa 5.1 fornecem informações relevantes que poderão auxiliar em estudos futuros sobre a avaliação dessa cultura alimentar.

O trabalho de análise proteômica que comparou os dois fenótipos de milho com diferentes padrões de pigmentação *P1-ww* e *P1-rr*, permitiu observar o acúmulo diferencial de proteínas e identificar algumas delas. Além disso, as funções das proteínas identificadas relacionam-se principalmente à resposta ao stress, resultados que são esperados já que a via de produção de flobafenos, alterada nos milhos estudados, está ligada à defesa da planta.

Além disso, a utilização da análise de componentes principais (PCA) demonstrou ser uma ferramenta estatística útil para comparação de grãos de variedades vegetais através de dados sobre acúmulo de proteínas obtidos por eletroforese bidimensional.

APÊNDICE A – RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE DOUTORADO Capes/COFECUB - BEX 11320/13-3

Projeto: Papel das proteínas alvo do Óxido Nítrico em plantas submetidas ao estresse

Coordenador brasileiro: Hernán Terenzi

Coordenador francês: David Wendehenne

Período: 13/11/2013 – 01/04/2014

INTRODUÇÃO

O presente relatório descreve as atividades cumpridas no estágio doutoral (Sanduiche) realizado no INRA (*Institut National de La Recherche Agronomique* de Dijon), durante o período de 4 meses e 16 dias, 13/11/2013 – 01/04/2014.

A primeira etapa descrita no plano de trabalho, enviado à Capes, acordado para a viagem, consistiu na otimização da produção de duas proteínas recombinantes EPSP sintase de tabaco (*Nicotiana tabacum*). O objetivo principal foi produzir as proteínas e averiguar a atividade enzimática para posterior avaliação da S-nitrosilação de tais enzimas.

A 5-enol-piruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase) é uma enzima envolvida na rota metabólica do chiquimato, precursor da biosíntese dos aminoácidos aromáticos (Tirosina, Fenilalanina e Triptofano) e outros metabólitos secundários (Fitoalexinas, ácido salicílico, fenilpropanóides,...), todos envolvidos nas respostas de defesa de plantas (HERRMANN, 1995). A regulação da via chiquimato é bem conhecida em plantas, porém a regulação pós-traducional das proteínas desta via ainda não são bem descritas.

Segundo Astier e colaboradores (2012) a EPSP sintase foi identificada, através de espectrometria de massa, como uma proteína S-nitrosilada envolvida na resposta de defesa à criptogeína. A criptogeína é um elicitador das reações de defesa em plantas que é produzido pelo microrganismo *Phytophthora cryptogea*. Entre as reações desencadeadas pela criptogeína em plantas está a síntese de óxido nítrico, que regula processos biológicos através de modificações químicas em resíduos de aminoácidos, como a nitrosilação em proteínas do grupo tiól da cisteína (S-nitrosilação).

A S-nitrosilação foi identificada na EPSP sintase de tabaco (*Nicotiana tabacum*) por Astier e colaboradores (2012), e pode elucidar o envolvimento do óxido nítrico na regulação desta enzima em situação de estresse biótico e, conseqüentemente, os mecanismos de regulação da produção de metabólitos secundários na via do chiquimato.

I. Desenvolvimento das atividades de pesquisa popostas no cronograma

Na primeira parte do trabalho foram construídos os vetores com as seqüências de cDNA correspondentes às proteínas que seriam expressas: NtEPSPS1 (1556 pb), NtEPSPS2 (1538 pb) e AroA (1200 pb); e também foram executadas etapas de subclonagem em sistemas *E. coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando as seqüências em questão. As seqüências inicialmente clonadas, para NtEPSPS1 e NtEPSPS2, corresponderam à forma pre-madura das proteínas, ou seja, seqüências que codificariam as proteínas e que são expressas no citosol da célula vegetal (DELLA CIOPPA et al., 1986).

Sem sucesso na expressão das enzimas com os modelos executados em primeira instância, as seqüências para expressão das proteínas NtEPSPS1 e NtEPSPS2 foram substituídas pela forma madura, que expressa a proteína com atividade enzimática que está presente no cloroplasto. A diferença entre as formas pre-madura e madura são 72 aminoácidos, que correspondem ao sinal de endereçamento da proteína pré-madura ao cloroplasto.

a) Expressão de NtEPSPS1 e NtEPSPS2 em *Saccharomyces cerevisiae*

Com a finalidade de verificar uma atividade EPSP sintase nas proteínas NtEPSPS1 e NtEPSPS2, as seqüências de cDNA que codificam a forma pre-madura das proteínas foram inseridas em plasmídeo pENTR (separadamente), que posteriormente foram utilizados para transformar *E. Coli* (One Shot Chemically Competent - TOPO®) utilizando pENTR Directional TOPO Cloning Kit (PROMEGA®). O plasmídeo utilizado para a clonagem contém um fragmento que codifica 6 histidinas (6xHis) e 3 glicinas no N terminal, então as seqüências inseridas serão

expressas como proteínas-fusão contendo uma cauda histidina. As clonagens de NtEPSPS1 e NtEPSPS2, foram realizadas em tempos diferentes. Após a utilização do kit para transformação a solução contendo a *E. Coli* foi incubada em placas contendo meio LB/Canamicina, por 24h à 37°C. A confirmação das colônias transformadas foi realizada através do vetor contendo o cDNA, por técnica de PCR convencional, utilizando Kit GoTaq (PROMEGA®) e primers para amplificação M13 F/R. O resultado foi observado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo. Não foram observadas colônias positivas para a transformação com NtEPSPS1.

As colônias de *E. coli* transformadas com cDNA NtEPSPS2 forma pre-madura foram positivas. Foram incubadas 5 colônias (repicagem) separadamente em 3 mL de meio LB/kanamicina líquido, 24h à 37°C. Uma quantidade de 600 µL do inóculo foi submetida à extração de plasmídeo utilizando Qiaprep Miniprep System Kit (PROMEGA®). Procedeu-se a clonagem em *E. coli* da construção pENTR-EPSPS2 contida em um vetor para expressão em *Saccharomyces cerevisiae*, PDRGWfi, utilizando LR Clonase II Enzyme Mix.

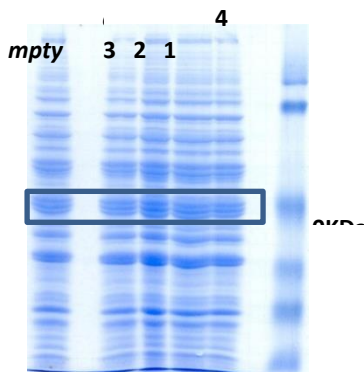
A bactéria contendo o plasmídeo foi incubada em placa contendo meio LB/ ampicilina, 24h à 37°C. As colônias foram confirmadas para a presença do plasmídeo clonado através de PCR convencional (Reação em Cadeia da Polimerase – GoTaq PROMEGA®). O resultado foi observado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídeo. As colônias positivas foram cultivadas em 3 mL de meio LB/ampicilina líquido, 24h 37°C. Procedeu-se a extração do plasmídeo das bactérias transformadas utilizando Qiaprep Miniprep System Kit (PROMEGA®), e em seguida o extrato foi utilizado para a transformação de células competentes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Após a transformação com o vetor contendo a sequência que codifica a EPSP2 forma pré madura a levedura foi incubada em placa contendo meio de cultura (ágar, 2% de glicose, 6,7 g/L de base nitrogenada para levedura sem aminoácidos, 0,77 g/L de complemento de aminoácido sem uracil) por 48h, 30°C. Foram positivas para a transformação 4 colônias verificadas por PCR (GoTaq – PROMEGA®), e então incubadas em 3 mL de meio líquido de mesma composição, por 24h à 30°C sob agitação.

O inóculo de 3 mL foi transferido para 200 mL de meio de cultura de mesma composição, e incubado com agitação por 24h à 30°C. Após centrifugação 5 000 g por 10 minutos, à temperatura ambiente, as leveduras foram ressuspendidas em 5 mL de tampão para extração de proteína total (Tris-HCl 25 mM, EGTA 0,5 mM, PMSF 2 mM, DTT 1 mM). As células foram rompidas em um equipamento de ruptura celular mecânica por alta pressão (2,5 atm) e, posteriormente centrifugadas à 16 000 g por 15 minutos à 4°C. A concentração de proteínas do sobrenadante foi medida conforme BRADFORD (1976).

Todas as etapas descritas foram realizadas em paralelo com a utilização do plasmídeo sem a sequência codificadora da proteína, chamado *empty*.

Os extratos de proteína total solúvel (15 µg) foram submetidas à SDS-PAGE em gel poliacrilamida 12% . Após a eletroforese, o gel foi corado com Comassie Brilliant Blue R 250 (Figura 1). Não foram observadas bandas diferentes entre os extratos de proteína provenientes das 4 extratos de levedura transformadas para NtEPSPS2, e a amostra *empty*. A massa da proteína NtEPSPS2 estaria na região dos 50 kDa.



Amostras de 1 – 4: replicatas do extrato de levedura contendo vetor de Expressão para NtEPSPS2; **empty:** extrato de levedura contendo apenas o vetor, sem a sequência codificadora EPSPS2

Figura 1. SDS-PAGE - Gel de poliacrilamida 12% com 15 µg de proteína solúvel obtida do cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* transformada com pDRGWFi - NtEPSPS2 e *empty*.

Segundo DELLA CIOPPA e colaboradores (1986) o precursor da EPSP sintase é produzido no citosol de células vegetais, como nas células de *Petunia hybrida*, e possui um peptídeo transitório N terminal com 72 aminoácidos. Ou seja, a proteína produzida na forma pré madura tem aproximadamente 55 kDa, já a forma madura possui aproximadamente 47kDa e apresenta atividade enzimática de EPSPS. A 47 kDa não possui o peptídeo transitório N terminal e está presente no plastídeo de células vegetais (cloroplasto).

Com o objetivo de observar a expressão e testar a atividade enzimática de EPSP sintase das proteínas NtEPSPS1 e NtEPSPS2, os plasmídeos utilizados nas transformações anteriores foram clonados novamente e todas as atividades repetidas, porém, as sequências de cDNA das proteínas prematuras foram substituídas pelas sequências de cDNA das proteínas EPSPS maduras, ou seja, sem a sequência que codifica o peptídeo transitório (72 aa).

As atividades de clonagem, confirmação de transformação e expressão de proteínas foram repetidas. O gel SDS-PAGE em poliacrilamida 12% foi feito com 15 µg de proteína solúvel dos cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* contendo NtEPSPS1, NtEPSPS2 e *empty*. O resultado positivo da está apresentado no gel corado com Comassie Brilliant Blue R 250 (Figura 2).

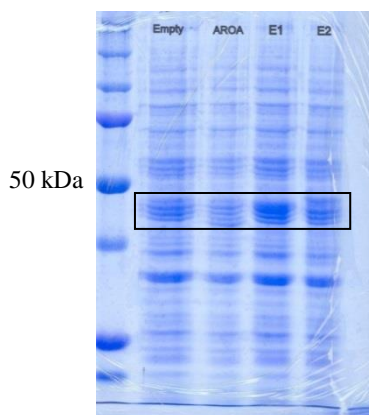


Figura 2. SDS-PAGE - Gel de poliacrilamida 12% com 15 µg de proteína total solúvel obtida de *Saccharomyces cerevisiae* transformada com pDRGWF_i – Nt EPSPS1 (E1), pDRGWF_i – Nt EPSPS2 (E2), pDRGWF_i – AroA e *empty*

Na Figura 2 é possível observar, comparando com o marcador de massa molar na região de 50 kDa, que para os extratos de NtEPSPS1 e NtEPSPS2 existe expressão diferencial em relação ao extrato *empty*.

Utilizou-se a técnica de *Western Blotting* com anticorpo anti-cauda de Histidina para a confirmação da expressão das proteínas EPSP Síntase, atividade apresentada no item 'c' do presente relatório.

b) Expressão de AroA em *Saccharomyces cerevisiae*

Utilizou-se uma abordagem por complementação de *E. coli* mutante em um gene que codifica a EPSP síntase, chamado AroA. O complemento foi clonado no mesmo vetor (*S. Cerevisiae* - pDRGWfi) para servir de controle nesse estudo. Após a transformação de *E. coli*, colônias positivas foram multiplicadas em 3 mL de meio líquido adequado e o plasmídeo foi extraído utilizando Qiaprep Miniprep System Kit (PROMEGA®). O plasmídeo pENTR - pDRGWfi contendo a sequência AroA foi clonado em células competentes de *S. Cerevisiae*. A sequência foi inserida juntamente com um fragmento que codifica 6 histidinas (6xHis) e 3 glicinas no N terminal.

Após a transformação da levedura com o vetor com a sequência que codifica EPSP síntase (AroA), o microrganismo foi cultivado em placa contendo meio de cultura 1,5% ágar, 2% de glicose, 6,7 g/L de base nitrogenada para levedura (sem aminoácidos), e 0,77 g/L de complemento de aminoácido sem uracil. A levedura foi incubada por 48h à 30°C. Foram multiplicadas também colônias transformadas com o plasmídeo pENTR-pDRGWFi vazio, para controle (*empty*).

Foram repivadas 5 colônias de cada placa e, individualmente, foram produzidas pré-culturas em 5 mL de meio líquido (2% de glicose, 6,7 g/L de base nitrogenada para levedura - sem aminoácidos, e 0,77 g/L de complemento de aminoácido sem uracil). Após a incubação por 24h à 30°C, foram centrifugados 3mL de cada tubo à 5 000 g por 5 minutos. Ao precipitado adicionou-se 600 µL de TE (Tris-EDTA). Aplicou-se o kit Pure Yield Plasmid Miniprep System (Promega®) e PCR (Kit GoTaq - PROMEGA®) para confirmar a transformação e

posteriormente enviar a sequência inserida para sequenciamento gênico.

Os 2 mL restantes do cultivo líquido foram adicionados à 200 mL do mesmo meio e incubados em agitação à 30°C, até atingir $DO_{600} = 1$. As culturas foram centrifugadas a 5 000 g, 10 min à temperatura ambiente. O precipitado foi solubilizado em 5 mL de tampão para extração de proteína total (Tris-HCl 25 mM, EGTA 0,5 mM, PMSF 2 mM, DTT 1 mM).

As células foram rompidas em equipamento de ruptura celular mecânica por alta pressão (2,5 atm) e, posteriormente centrifugadas 16 000 g, 15 minutos à 4°C. A concentração de proteína do sobrenadante foi medida conforme BRADFORD (1976).

A fração solúvel de proteína (10 µg) foi submetida à SDS-PAGE em gel poliacrilamida 12%. Após a corrida de eletroforese o gel foi corado com Comassie Brilliant Blue R 250 (Figura 3).

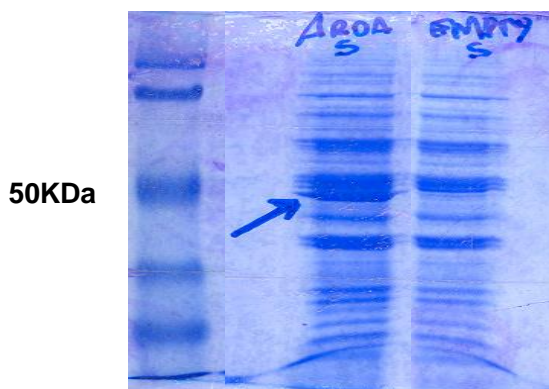


Figura 3. SDS-PAGE - Gel de poliacrilamida 12% com extrato de proteína solúvel (10 µg) de *Saccharomyces cerevisiae* transformada com pDRGWF_i - AroA e *empty*.

Observou-se uma banda distinta entre o extrato de proteína obtido na cultura de leveduras transformadas PDRGWF_i – AroA e o extrato obtido do cultivo *empty*, na região de 50 kDa. A massa molecular teórica para a proteína EPSPS – AroA é em torno de 48kDa.

c) Western Blotting com Anticorpo monoclonal anti HIS-Tag para detecção da fração solúvel das proteína expressas por *Saccharomyces cerevisiae* transformada (NtEPSPS1, NtEPSPS2 e AroA)

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, os polipeptídeos foram eletro-transferidos em cuba de transferência úmida para uma membrana de HPVDF (GE Healthcare, USA), por 1 hora à 80V. Em seguida procedeu-se a detecção da proteína expressa através da adição de anticorpo primário monoclonal anti-Histidina (diluição 1:25 000 em Tris-Buffer Saline acrescido de 5% de leite em pó desnatado). A membrana foi incubada no anticorpo primário *overnight*, sob agitação à 4°C. Após a lavagem com (Tris-Buffer Saline) TBS, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário e procedeu-se a revelação por quimioluminescência.

O resultado do *Western Blotting* está apresentado na Figura 4.

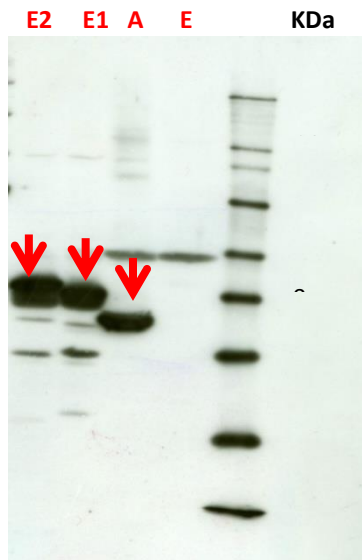


Figura 4. Western Blotting anti His-Tag do extrato de proteína solúvel total NtEPSPS1, NtEPSPS2, AroA e *empty*

É possível observar a expressão das proteínas contendo a porção His-Tag nas frações solúveis de NtEPSPS1, Nt EPSPS2 e AroA. O controle negativo é a fração de proteína total solúvel extraída da cultura de levedura contendo o vetor *empty*, que não apresentou detecção da cauda His-Tag.

d) Purificação das proteínas em coluna HisTrap FF (GE healthcare) a partir do extrato de proteína solúvel total de NtEPSPS1, NtEPSPS2 e AroA

As proteínas contendo 6 aminoácidos de Histidina (6xHis) foram purificadas por cromatografia de afinidade. As frações solúveis de proteína expressas em *Saccharomyces cerevisiae*, nos 3 experimentos descritos anteriormente, foram eluídas utilizando equipamento AKTA, em coluna contendo resina de níquel-sepharose, HisTrap FF, (Ni Sepharose™ High performance, GE Healthcare).

O tampão utilizado para eluição foi Na⁺ Phosphate Buffer (NaCl 500 mM, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 50 mM, PMSF 1mM) em adição de um gradiente de Imidazol, que atingiu a concentração final de 50%. Foram coletadas 14 frações de 2 mL para cada um dos extratos.

Para EPSPS1 e EPSPS2 o pico de absorvância do peptídeo retido correspondeu, em ambas as eluições, à fração 9. Para eluição do extrato solúvel AroA não foram observados picos de absorvância correspondente ao peptídeo retido na coluna.

As frações contendo a proteína purificada foram armazenadas a - 20 °C para posterior execução do Western Blotting, conforme item c deste relatório.

Após a revelação por quimioluminescência, observou-se a presença de proteína, com o fragmento de 6 histidinas, nas frações 9 de cada uma das amostras NtEPSPS1 e NtEPSPS2 (Figura 5).

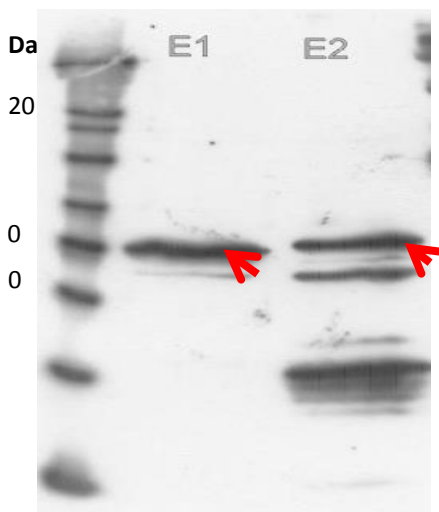


Figura 5. Western Blotting - anti His-Tag – das frações de proteína purificada, NtEPSPS1 (fração 9) e NtEPSPS2 (fração 9)

II. Fontes e Locais de desenvolvimento da pesquisa

O trabalho foi desenvolvido no *Institut National de La Recherche Agronomique, Université de Bourgogne, Agrosup, Dijon/França*, no departamento de Agroecologia, Laboratório *Mécanismes et gestion des interactions plante-micro-organismes*.

O trabalho foi realizado com a Equipe do Prof^o David Wendehenne, projeto “*NO et réponses de défense de la plante*”, com o acompanhamento direto pelo Dr. Olivier Lamotte.

III. Trabalhos e/ou publicações decorrentes da pesquisa

As análises realizadas durante o estágio de 4 meses foi a etapa inicial de um projeto. As publicações e trabalhos provenientes dos resultados obtidos serão submetidas quando os experimentos complementares forem concluídos.

VI Referências Bibliográficas

ASTIER J., et al. S-nitrosylation: Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for

S-nitrosylation in cryptogein signaling in tobacco cells. *Biochem. J.*, 447:249-260, 2012.

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

DELLA CIOPPA, G. et al.. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 83 pp 8673 – 8677, 1986.

HERRMANN, KM. The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compound. *The Plant Cell*, 7:907-919.