

# ANÁLISE PROTEÔMICA DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E ENDOSPERMA EM SEMENTES DE *Coffea arabica*

Livia L. KOSHINO<sup>1</sup>; Aretusa E. ANDRADE<sup>2</sup>; Luciano P. DA SILVA<sup>2</sup>; Carlos BLOCH JUNIOR<sup>2</sup>; Octávio L. FRANCO<sup>3</sup>; Mirian T. S. EIRA<sup>4</sup>; João B. TEIXEIRA<sup>2</sup>; Ângela MEHTA<sup>2</sup>, E-mail: amehta@cenargen.embrapa.br

<sup>1</sup> Universidade de Brasília, Brasília, DF; <sup>2</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF; <sup>3</sup> Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF; <sup>4</sup> Embrapa Café, Brasília, DF

## Resumo:

Durante o desenvolvimento da semente de café, proteínas vão sendo depositadas, predominantemente nos cotilédones e no endosperma. As proteínas de reserva 11S são as globulinas mais abundantes na semente de café agindo como fonte de nitrogênio nas reações de torra e garantindo o sabor e aroma característicos. Este estudo teve como objetivo analisar o perfil de proteínas expressas em endosperma e embrião zigótico de sementes de café. Proteínas foram extraídas da semente inteira, e também do endosperma e embrião de café, isoladamente. Em seguida, as proteínas foram analisadas por eletroforese bidimensional (2-DE) e posteriormente por espectrometria de massa. Os spots mais abundantes observados no gel de proteínas de semente inteira foram excisados, tripsinizados e identificados como subunidades da proteína 11S através de espectrometria de massa. Spots com o mesmo *pI* e massa molecular foram também observados no perfil de proteínas do endosperma e embrião, indicando que a proteína 11S é também muito expressa nesses tecidos. Foi possível identificar algumas destas proteínas, que mostraram identidade com a proteína de reserva 11S de café. Foi obtida uma cobertura de seqüência de peptídeos de aproximadamente 20% de toda a proteína 11S. Duas proteínas diferenciais presentes no endosperma foram também analisadas por espectrometria de massa e identificadas através de seqüenciamento *de novo* como uma globulina da mesma família da 11S (Cupin superfamily) e uma proteína alergênica (Pru ar 1).

Palavras chaves: 2-DE, espectrometria de massa, globulina

## PROTEOMIC ANALYSIS OF ZYGOTIC EMBRYOS AND ENDOSPERM IN SEEDS OF *Coffea arabica*

### Abstract:

During coffee seed development, proteins are deposited predominantly in cotyledons and in the endosperm. Reserve proteins of the 11S family are the most abundant globulins in coffee seeds and act as nitrogen source during roasting and guarantee the flavor and aroma. The objective of this study was to analyze the protein profile of endosperm and zygotic embryos of coffee seeds. Proteins were extracted from whole seed as well as from embryo and endosperm, separately. Total proteins were analyzed by bidimensional electrophoresis (2-DE) and by mass spectrometry. The most abundant spots observed in the gels of coffee seeds were excised, digested with trypsin and identified by mass spectrometry as subunits of the 11S globulin. Spots with the same *pI* and molecular mass were also observed in the protein profiles of coffee endosperm and embryo, indicating that the 11S protein is also highly expressed in these tissues. A peptide sequence coverage of approximately 20% of the 11S globulin was obtained. Two proteins observed in the endosperm profile were also identified as a Cupin superfamily protein and an allergenic protein (Pru ar 1).

Key words: 2-DE, mass spectrometry, globulin

### Introdução

O fruto de café contém tecidos especializados para a deposição de proteínas de reserva durante a maturação, as quais constituem a maior parte das proteínas encontradas nos grãos após o desenvolvimento. Recentemente, uma globulina bastante abundante foi purificada a partir de tecidos do endosperma contidos no grão de café e extraídos da cultivar Colombia (*C. arabica*) (Acuña et al., 1999). Esta proteína é formada por uma subunidade  $\alpha$  (ácida) e outra  $\beta$  (básica) com 33 e 24 KDa, respectivamente, derivada de um precursor 11S, que possui diversas isoformas. O conjunto dessas proteínas, dentre outras menos abundantes, é a principal fonte de peptídeos e aminoácidos, gerados durante a torra de café. A maturação do fruto até a formação do grão claramente favorece o desenvolvimento da alta qualidade no sabor do café (Montavon et al., 2003). Estudos em biologia molecular relacionados às estruturas constituintes dos grãos de café são de grande valor para melhorar sua qualidade, sabor e aroma visando sua comercialização e exportação.

O proteoma é o conjunto de todas as proteínas expressas pela célula em determinada condição biológica. O estudo do proteoma permite comparar condições experimentais e observar modificações pós-traducionais e diferenças quantitativas, como a abundância das proteínas, e qualitativas, relativas à massa e carga das proteínas. Uma das técnicas mais utilizadas na proteômica é a eletroforese bidimensional (2-DE). Com esta técnica, é possível analisar um grande número de proteínas ao mesmo tempo e com alto poder de resolução, uma vez que as proteínas são separadas pelo ponto isoelétrico e pela massa molecular.

Outra técnica muito utilizada para análises de proteínas expressas é a espectrometria de massa. Esta metodologia é empregada para a identificação dos *spots* de proteínas. Os peptídeos são obtidos clivando-se as proteínas com proteases específicas (tripsina) e as massas reveladas são comparadas com as massas de digestões teóricas de proteínas conhecidas contidas no banco de dados. Este método de identificação é conhecido como *fingerprinting* de massa de peptídeos. É também possível analisar os peptídeos através de seqüenciamento *de novo*.

Este estudo teve como objetivo analisar o perfil de proteínas expressas em endosperma e embrião zigótico de sementes de café.

## Material e Métodos

### Material vegetal

Frutos de *C. arabica* (Catuaí Vermelho) foram colhidos 225 dias após o plantio, correspondendo ao estágio verde-cana. Os frutos foram utilizados para isolar o embrião e o endosperma (**Figura 1**). Foram também utilizadas sementes inteiras após a desidratação dos frutos. Os diferentes tecidos foram macerados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer – 80° C.



Figura 1- Frutos no estágio verde cana (esquerda), sementes (centro) e embriões de café (direita).

### Extração de proteínas e eletroforese bidimensional

Proteínas de sementes inteiras, endospermas e embriões foram extraídas de acordo com de Mot & Vanderleyden (1989). A focalização isoeétrica das proteínas de café foi realizada utilizando o método descrito por de Mot & Vanderleiden (1989). A separação pela massa molecular foi realizada de acordo com Laemmli (1970) e a coloração dos géis foi realizada com nitrato de prata ou Coomassie blue.

### Espectrometria de massa

Os spots de proteína foram excisados dos géis, descorados e digeridos com tripsina de acordo com Shevchenko et al. (1996). Os peptídeos foram analisados em TOF-TOF Ultra Flex II (Bruker Daltonics) e a identificação foi realizada por seqüenciamento *de novo* ou *fingerprinting* de massa.

### Resultados e Discussão

Após a fecundação da planta, o processo de desenvolvimento da semente envolvendo a embriogênese e o desenvolvimento do endosperma se inicia, sendo que este tecido constitui a maior parte do volume celular no qual o embrião, medindo de 3 a 4 mm, está inserido.

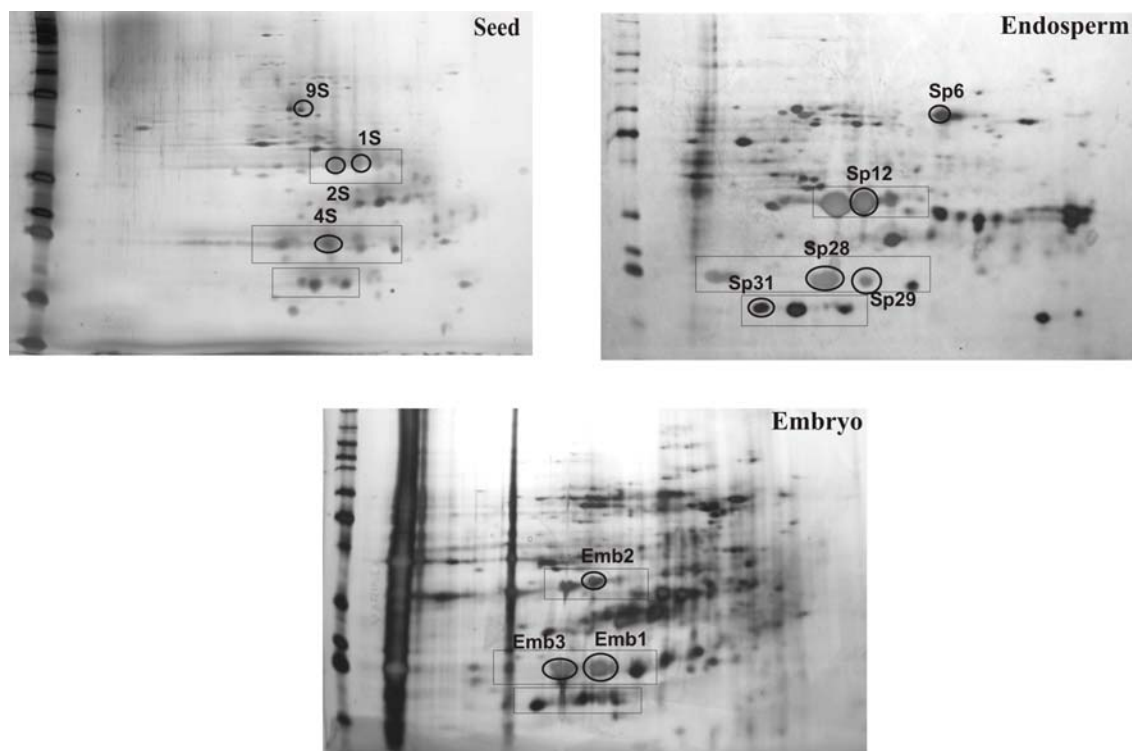


Figura 2- 2-DE de proteínas de semente, endosperma e embrião de café, conforme indicado.

A comparação dos mapas de proteínas de semente, embrião e endosperma analisados revelou perfis muito semelhantes. O mapa 2-DE da semente inteira revelou aproximadamente 70 proteínas. Os géis de embrião e endosperma revelaram aproximadamente 120 e 80 proteínas, respectivamente, evidenciando uma variedade maior de proteínas no embrião. Várias proteínas observadas na semente puderam ser observadas no embrião e endosperma (**Figura 2**). As principais proteínas observadas na semente (1S, 2S, 4S e 9S) foram excisadas do gel e analisadas por espectrometria de massa. As proteínas identificadas corresponderam à globulina 11S, anteriormente descritas por Acuña et al. (1999). Estes autores verificaram que a expressão dessa proteína era específica da região do endosperma. Proteínas de embrião (Emb1, Emb2 e Emb3) e de endosperma (Sp12, Sp28 e Sp29) foram também analisadas por espectrometria de massa e foram identificadas como a globulina 11S (**Figura 2**). A análise de espectrometria de massa das proteínas de semente, embrião e endosperma revelou uma cobertura de aproximadamente 20% do total da proteína 11S (**Figura 3**). Inesperadamente, esta proteína foi observada em grande quantidade no embrião. Yuffa et al. (1994) reportaram que a expressão dessa proteína ocorre em níveis baixos em embriões zigóticos e somáticos. Outras proteínas diferencialmente expressas no endosperma também foram identificadas através de sequenciamento *de novo* como uma globulina da mesma família da 11S (Cupin superfamily) (spot Sp6) (**Figura 4**) e uma proteína alergênica (Pru ar 1) (spot Sp31).

>gi|3641256|gb|AAC61983.1| 11S storage globulin [*Coffea arabica*]

MAHSHMISLSLYVLLFLGCLAQLGRPQPRLRGKTQCDIQKLNAAQEPSFRFPSEAGLTFEWDSSNNPEFGCAGVEFERNTVQPK  
 GLRLPHYSNVKFFVYVVEGTGVQGTVIPGCAETFESQGESFWGGQE QPGKQEGQE QGSKGGQEGRRQRFPDRHQKLRRFQK  
 GDVLIILLPGFTQWTYNDGDVPLVTVALLDVANEANQLDLQSRKFFLAGNPQQGGGK EGHQGGQQQHRNIFSGFDDQLLADAF  
 NVDLKI IQKLGPKDQRGSTVRAEKLQFLPEYSEQEQQPQQQEQQHGVRGRWRSNGL EETLCTVKLSENIGLPQEADV  
 NPRAGRITTVNSQK IPI LSSQLSAERGF LYSNAIFAPHWNINAH SALYVIRGNARIQVVDHKGNKVFDDDEVKQGQLIIVPQ  
 YFAVIKKAGNQGF EYVAFK TNDNAMIN PLVGRLSAFRAIPEEVLRS SFQISSEEAELKYGRQEALLLSEQSQQGKREVA

Figura 3- Sequência de aminoácidos da globulina 11S de café. As sequências em amarelo correspondem aos peptídeos identificados por sequenciamento *de novo* e os aminoácidos divergentes estão marcados em vermelho.

[gi4006897/emb/CAB16827.1](http://gi4006897/emb/CAB16827.1) globulin-like protein [*Arabidopsis thaliana*]

Length=499

Score = 34.6 bits (74), Expect = 0.56

Identities = 11/13 (84%), Positives = 11/13 (84%), Gaps = 0/13 (0%)

```
Query 1      FGVVEEGDIFAVQR 13
          F VEEGDIFAV R
Sbjct 328    FKVVEEGDIFAVPR 340
```

Figura 4- Alinhamento da proteína SP6 do endosperma.

## Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que a técnica de 2-DE acoplada à espectrometria de massa é uma abordagem eficiente para a identificação de proteínas expressas em diferentes tecidos. A identificação de um maior número de proteínas deverá ser realizada, visando a caracterização das proteínas expressas nos diferentes tecidos da semente de café. Estes estudos poderão revelar informações importantes, relacionadas com a qualidade e sabor do café.

## Referências Bibliográficas

Acuña, R.; Bassüner, R.; Beilinson, V.; Cortina, H.; Cadena-Gómez, G.; Montes, V. & Nielsen, N.C. (1999) Coffee seeds contain 11S storage proteins. *Physiologia Plantarum*, 105: 122-131.

De Mot, R. & Vanderleyden, J. (1989) Application of two dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. *Canadian Journal Microbiology* 35:960-967.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Montovan, P.; Duruz, E.; Rumo ,G.; Pratz,G.; (2003) Evolution of Green Coffee Protein Profiles with Maturation and Relationship to Coffee Cup, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:2328-34.

Shevchenko A; Wilm M; Vorm O; Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*. 68:850-858.

Yuffa, A. M.; De Garcia, E.G.; Nieto, M.S. (1994) Comparativa study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv. Catimor. *Plant Cell Reports* 13:197-202.