

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Sequenciamento, identificação e análise de proteínas**  
**do caule de mudas de *Eucalyptus grandis***

**Alexander de Andrade**

Tese apresentada, para obtenção do título de Doutor  
em Agronomia, Área de Concentração: Genética e  
Melhoramento de Plantas

**PIRACICABA**  
**2006**

**ALEXANDER DE ANDRADE**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Sequenciamento, identificação e análise de proteínas**  
**do caule de mudas de *Eucalyptus grandis***

**Orientador:**

**Prof. Dr CARLOS ALBERTO LABATE**

Tese apresentada, para obtenção do título de Doutor  
em Agronomia, Área de Concentração: Genética e  
Melhoramento de Plantas

**PIRACICABA**  
**2006**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Andrade, Alexander de

Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de  
*Eucalyptus grandis* / Alexander de Andrade. - - Piracicaba, 2006.  
120 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.  
Bibliografia.

1. Caule 2. Eletroforese 3. Espectrometria de massas 4. Eucalipto 5. Madeira  
6. Proteínas I. Título

CDD634.9734

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

**De todas as invenções, a mais preciosa é o sonho.  
Heinrich Heine (1797 – 1856).**

**A minha namorada Daniela pelas  
horas de incentivo, paciência,  
compreensão e carinho,  
Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, pela oportunidade e confiança em mim depositada, pela orientação e amizade.

A Dra. Mônica T. Labate pela amizade, sugestões e auxílio na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcio Lambais pela confiança e por ter permitido usar o seu laboratório para realizar a focalização isoelétrica.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo por ter permitido usar o seu laboratório para realizar a análise dos géis.

Aos professores do Departamento de Genética pelos ensinamentos.

Ao grupo proteoma formado pela Paola, Karen, Mateus e liderado pelo Prof. Labate pela colaboração na realização deste trabalho, constante troca de informações e agradável convivência.

Ao amigo Esteban por toda a ajuda e sugestões durante a realização deste trabalho e no decorrer do curso.

Ao amigo Simão por toda a ajuda durante a realização do gel 2D-PAGE.

Aos amigos do laboratório: Alex, Cris, Daniela, Daniele, David, Eduardo, Felipe, Fernanda, Gisele, Guilherme, Gunta, Inês, Juliana, Juliano, Leandro, Letícia, Lilia, Lívia, Luis, Mayra, Palmira, Raphael, Renan e Simone pela convivência e ajuda no decorrer do trabalho e do curso.

Aos amigos colegas e funcionários do curso de genética e melhoramento de plantas.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>11</b>
<b>ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 O gênero <i>Eucalyptus</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Importância econômica do eucalipto .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 O proteoma .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.1 Eletroforese bidimensional .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.2 Espectrometria de massas .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.2.1 MALDI “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization” .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.2.2 ESI “Electrospray Ionization” .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3.2.3 A evolução da espectrometria de massas .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3 Xilogênese .....</b>	<b>27</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Material vegetal .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Extração das proteínas .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.1 Método de extração fenólica .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.2 Método de extração ácida.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.3 Método de extração ácida modificado.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 Remoção dos ácidos nucleicos da amostra .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4 Quantificação das proteínas .....</b>	<b>39</b>
<b>3.5 Eletroforese bidimensional .....</b>	<b>40</b>
<b>3.5.1 Focalização isoeletrica (1° dimensão).....</b>	<b>40</b>
<b>3.5.2 SDS-PAGE (2° dimensão) .....</b>	<b>40</b>
<b>3.6 Detecção das proteínas .....</b>	<b>41</b>
<b>3.7 Obtenção e análise das imagens .....</b>	<b>41</b>
<b>3.8 Digestão das proteínas .....</b>	<b>42</b>
<b>3.9 Sequenciamento das proteínas .....</b>	<b>43</b>
<b>3.10 Análise das informações .....</b>	<b>44</b>

3.11 Relação entre proteínas e nível de transcritos .....	47
<b>4 RESULTADOS E DISCUSÕES .....</b>	<b>48</b>
4.1 Avaliação dos protocolos de extração de proteínas.....	48
4.2 Avaliação da separação das proteínas por eletroforese bidimensional .....	53
4.3 Avaliação da metodologia de digestão .....	57
4.4 Proteínas de <i>Eucalyptus grandis</i> identificadas .....	58
4.5 Perfil do proteoma da madeira.....	79
4.5.1 Metabolismo .....	80
4.5.1.1 Metabolismo dos aminoácidos .....	80
4.5.1.2 Metabolismo do nitrogênio.....	81
4.5.1.3 Metabolismo dos nucleotídeos .....	82
4.5.1.4 Metabolismo dos carboidratos .....	83
4.5.1.5 Metabolismo secundário .....	83
4.5.2 Energia .....	84
4.5.2.1 Fotossíntese .....	84
4.5.2.2 Transporte de elétrons.....	85
4.5.2.3 Associado ao ATP .....	86
4.5.2.4 Metabolismo da glicose .....	86
4.5.3 Processos celulares.....	88
4.5.3.1 Regulação intracelular.....	88
4.5.3.2 Divisão celular .....	89
4.5.3.3 Estresse .....	89
4.5.3.4 Redox .....	90
4.5.4 Transporte.....	91
4.5.4.1 Pequenas moléculas de transporte .....	91
4.5.5 Componentes estruturais .....	91
4.5.5.1 Metabolismo da lignina.....	91
4.5.5.2 Citoesqueleto.....	92
4.5.5.2.1 Actina.....	92
4.5.5.2.2 Tubulinas.....	93
4.5.6 Metabolismo macromolecular.....	93
4.5.6.1 Histona .....	93
4.5.6.2 Biossíntese de proteína .....	94



<b>4.5.6.3 Ribosomo .....</b>	<b>94</b>
<b>4.5.6.4 Degradação de proteínas.....</b>	<b>94</b>
<b>4.5.7 Função não definida.....</b>	<b>95</b>
<b>4.5.7.1 Proteínas prováveis .....</b>	<b>95</b>
<b>4.5.7.2 Proteínas que não apresentaram homologia.....</b>	<b>95</b>
<b>4.6 Correlação entre proteínas e nível de transcritos .....</b>	<b>96</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>101</b>

## RESUMO

### Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis*

Apesar da importância econômica e ambiental que a madeira representa como fonte natural e renovável de energia e fibras, pouco é conhecido sobre os processos celulares, moleculares e bioquímicos envolvidos com a sua formação. Usando metodologias proteômicas como 2D-PAGE e espectrometria de massas foi iniciada a análise do proteoma do caule de *Eucalyptus grandis* em diferentes estádios de desenvolvimento (5 meses, 3 anos e 6 anos). O presente trabalho baseou-se especificamente na idade de cinco meses. As plantas tiveram suas folhas, raízes e cascas removidas e seus caules foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido e as proteínas extraídas pelo método de extração fenólica. As proteínas foram separadas por eletroforese bidimensional em fitas IPG com gradiente de pH imobilizado linear de 4-7 na primeira dimensão e gel de poliacrilamida (12,5%) na segunda dimensão. A coloração dos géis foi realizada com coomassie G250. Foram detectados 438 *spots* e um total de 168 *spots* foram retirados do gel, digeridos com tripsina e submetidos ao sequenciamento por espectrometria de massas através do sistema LC-MS/MS. O sequenciamento por MS apresentou uma eficiência de 72,02% possibilitando a identificação de 121 *spots*, enquanto que 35 (20,83%) não apresentaram homologia com nenhuma base de dados. Entre as proteínas identificadas 22 foram representadas por mais de um *spot*, podendo indicar a ocorrência de eventos provenientes do splicing alternativo, modificações pós-traducional, variações alélicas de uma mesma proteína ou degradação da amostra. Entre os *spots* analisados, 22,02% estão relacionados com a produção de energia, (17,86%) metabolismo, (13,69%) processos celulares, (0,60%) transporte, (8,33%) componentes estruturais, (5,36%) metabolismo macromolecular, (4,17%) proteínas putativas, (20,83%) não apresentaram homologia com nenhuma base de dados e (7,14%) não demonstraram resultado. A comparação realizada entre o volume de 59 proteínas e os seus respectivos transcritos demonstrou que não existe correlação entre mRNA e as proteínas do caule. O método possibilitou uma rápida e

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

