

IMAGENS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA (IMS) COMO UMA FERRAMENTA INOVADORA PARA ESTUDOS MOLECULARES DE FRUTOS DE CAFÉ

Luciano P. SILVA¹, E-mail: paulinol@cenargen.embrapa.br; Felipe VINECKY¹; Éder A. BARBOSA¹; Alan C. ANDRADE¹; Carlos BLOCH JR.¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, NTBio, Brasília, DF.

Resumo:

O desenvolvimento do fruto de café é um processo que pode durar de algumas poucas semanas a mais do que um ano dependendo da espécie e se inicia com a antese até a completa maturação dos frutos. A espécie *Coffea arabica* requer de 6-8 meses para atingir a maturação. Devido a diversas florações poderem ocorrer em *C. arabica* em uma mesma estação produtiva, o crescimento dos frutos é assíncrono, com uma mesma planta podendo apresentar proporções variadas de frutos em diferentes estágios de desenvolvimento, o que pode prejudicar a qualidade final da bebida. Com exceção do grande número de estudos relacionados com o metabolismo da cafeína, muito pouco se sabe acerca de proteínas e vias metabólicas importantes para a qualidade da bebida de café. Dessa forma, estudos de expressão de proteínas associados com o perfil de distribuição das proteínas nos tecidos podem fornecer informações importantes para o melhor entendimento do envolvimento de macromoléculas durante o desenvolvimento do fruto de café. A obtenção de imagens moleculares a partir de íons detectados por meio de métodos de espectrometria de massa tem aberto uma nova fronteira no que diz respeito à detecção de moléculas em amostras de tecido. Esta metodologia denominada *imaging mass spectrometry* tem sido utilizada com sucesso para o mapeamento espacial de peptídeos e proteínas diretamente de amostras de diversos tecidos. No presente estudo, a distribuição espacial de macromoléculas durante diferentes estágios de desenvolvimento de frutos de café é apresentada. Adicionalmente, com a utilização de técnicas de cromatografia foi possível identificar uma proteína diferencialmente expressa e com prováveis modificações pós-traducionais em certas regiões do endosperma.

Palavras-chave: imagens moleculares, estágios de desenvolvimento, espectrometria de massa, fruto, proteína de transferência de lipídeos, *Coffea arabica*.

IMAGING MASS SPECTROMETRY AS AN INNOVATIVE TOOL TO STUDY COFFEE FRUIT DEVELOPMENT

Abstract:

The coffee fruit development covering the time between anthesis and full ripening is variable from few weeks to more than a year. *Coffea arabica* requires 6 to 8 months to mature. Due to several flowerings that may occur in *C. arabica* at each production season, fruit growth is asynchronous during development, with different proportions of various fruits developmental stages in the same plant, which may affect cup quality. Except for the large number of studies concerning caffeine metabolism in coffee, very few data are available concerning proteins and metabolic pathways important for coffee cup quality. Therefore, studies on protein expression associated with tissue localization may hold the key to a better understanding of the role of molecules during coffee fruit development. Molecular ion-images acquisition by mass spectrometric methods has opened a novel frontier on detection of molecules on tissue samples. This so called imaging mass spectrometry has been successfully used to perform direct spatial mapping of peptides and proteins in several tissue samples. In the present study, we show the spatial mapping of molecules during several developmental stages of coffee fruits. In addition, one differentially expressed protein of endosperms was identified using chromatographic procedures.

Key words: molecular images, developmental stages, mass spectrometry, fruit, lipid transfer protein, *Coffea arabica*.

Introdução

O desenvolvimento do fruto de café é um processo que pode durar de algumas poucas semanas a mais do que um ano dependendo da espécie e se inicia com a antese (desenvolvimento da flor) até a completa maturação dos frutos. A espécie *Coffea arabica* requer de 6-8 meses para atingir a completa maturação. Devido a diversas florações poderem ocorrer em *C. arabica* em uma mesma estação produtiva, o crescimento dos frutos é assíncrono, com uma mesma planta podendo apresentar proporções variadas de frutos em diferentes estágios de desenvolvimento, o que pode prejudicar a qualidade final da bebida de café (De Castro e Marraccini, 2006). Com exceção do grande número de estudos relacionados com o metabolismo da cafeína, muito pouco se sabe acerca de proteínas e vias metabólicas importantes para a qualidade da bebida de café. Dessa forma, estudos de expressão de proteínas associados com o perfil de distribuição das proteínas nos tecidos podem fornecer informações importantes para o melhor entendimento do envolvimento de macromoléculas durante o desenvolvimento do fruto de café. A obtenção de imagens moleculares a partir de íons detectados por meio de métodos de espectrometria de massa tem aberto uma nova fronteira no que diz respeito à detecção de moléculas em amostras de tecido. Esta metodologia denominada *imaging mass spectrometry* tem sido utilizada com sucesso para o mapeamento espacial de peptídeos e proteínas diretamente de amostras de diversos tecidos de animais (Brand et al., 2006). No presente estudo, a distribuição espacial de macromoléculas nos embriões durante diferentes estágios de desenvolvimento de frutos

de café é apresentada. Adicionalmente, com a utilização de técnicas de cromatografia foi possível identificar uma proteína diferencialmente expressa e com possíveis modificações pós-traducionais em certas regiões do endosperma.

Material e Métodos

Foram utilizados frutos de *C. arabica* cv. Mundo Novo, provenientes da área experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, coletados em diferentes estágios de desenvolvimento.

Os frutos foram mantidos em nitrogênio líquido até o momento da dissecação (separação de embrião e endosperma) e seccionamento em micrótomo manual visando à obtenção de cortes para os experimentos de espectrometria de massa. Extratos totais de proteínas também foram obtidos por meio da homogeneização dos frutos de café em uma solução de acetonitrila:água (1:1, v:v).

Embriões inteiros ou secções de endosperma (20-30 μ m de espessura) foram imersos em uma solução de matriz (10 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em acetonitrila:água:ácido trifluoroacético, 5:4:1, v:v:v) por 10 minutos e deixados secar a temperatura ambiente sobre uma lamínula de vidro. Após 20 minutos, os embriões e as secções de tecidos foram submetidas às análises em espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF (UltraFlex II, Bruker Daltonics, Alemanha) operando em modo linear positivo. Aquisição automatizada de espectros foi utilizada com intervalos de 100-200 μ m entre espectros adquiridos para formação de uma área bidimensional, com 30 disparos de laser em cada posição do mapa de distribuição espacial consistindo de milhares de espectros. O software FlexImaging foi utilizado para gerar as imagens moleculares baseadas na intensidade dos íons detectados na superfície dos tecidos vegetais em uma faixa de 2-20 kDa. As proteínas presentes nos extratos totais foram purificadas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu Class VP) em instrumento equipado com coluna de fase reversa C_{18} utilizando um gradiente linear de 0-65% de acetonitrila em 40 minutos a um fluxo de 1 mL/min. As massas moleculares dos componentes presentes nas frações eluídas por HPLC foram determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF. As frações apresentando componentes moleculares previamente identificados nas imagens moleculares foram submetidas a tratamento em condição redutora e alquilante com ditioltreitol (DTT) e iodoacetamida, respectivamente. A redução-alquilação foi seguida de digestão enzimática (tripsina imobilizada) em tampão bicarbonato de amônio 25 mM e o seqüenciamento dos peptídeos obtidos foi feito por meio de seqüenciamento *De novo* a partir de espectros MS/MS obtidos no modo de fragmentação de íon precursor LIFT/CID do MALDI-TOF/TOF.

Buscas por similaridades foram realizadas com as seqüências obtidas utilizando o programa FASTA 3 no ExPasy Molecular Server (<http://ca.expasy.org>) ou análises de tBlastn comparada com as seqüências depositadas na Base de Dados go Genoma Café (Vieira et al., 2006) (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/cafEST/>).

Resultados e Discussão

Apesar da presença de diversos componentes moleculares apresentando perfis de distribuição espacial semelhantes durante todos os estágios de desenvolvimento nos embriões de café (Figura 1d e 1e), outros componentes foram expressos somente em estágios específicos do desenvolvimento (Figuras 1c e 1f). Essas observações associadas com a possível colocalização entre certos componentes moleculares podem ser utilizadas como pontos de partida para estudos visando à elucidação de vias metabólicas importantes para o desenvolvimento do fruto de café e principalmente associados com a qualidade final da bebida. Por essa razão, componentes moleculares de endospermas de qualidade diferenciada (Bebida estritamente mole – EM vs dura - DU) foram comparados.

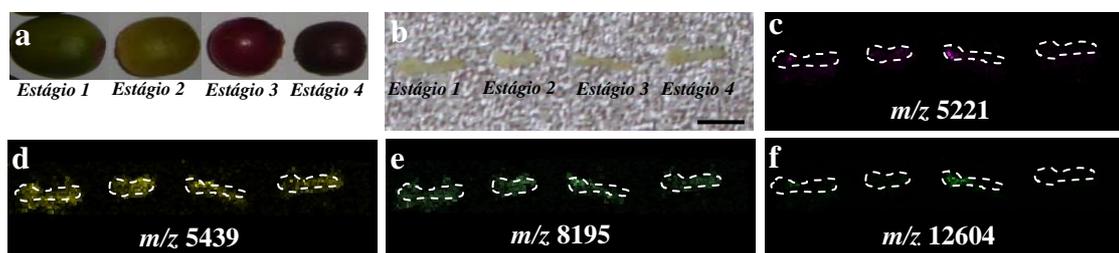


Figura 1 - (a) Frutos de café em diferentes estágios de desenvolvimento; (b) Fotografias dos embriões dos frutos de café mostrados em (a) Barra = 3 mm; (c-f) Imagens moleculares obtidas por meio de *imaging mass spectrometry* dos embriões dos frutos de café. As linhas pontilhadas em branco representam os contornos dos embriões.

A presença consistente de acréscimos sucessivos de 42 Da (alguma possível modificação pós-traducional) a um componente molecular detectado em m/z 9271 nas secções de endosperma de grãos de café de boa qualidade no estágio 4 de desenvolvimento (Figura 2) conduziu a estudos visando à determinação da identidade dessa proteína. Após uma abordagem proteômica clássica, esta proteína foi identificada como uma nova proteína de transferência de lipídeos (PTLs) apresentando alta similaridade com PTLs previamente identificadas em outras espécies (Figuras 3 e 4). Considerando que as PTLs apresentam um envolvimento crucial durante o desenvolvimento de frutos, pode ser inferido que tal proteína, assim como as modificações pós-traducionais associadas, poderiam estar envolvidas com alguma via metabólica importante que atue de maneira dependente da fase de desenvolvimento do fruto de café.

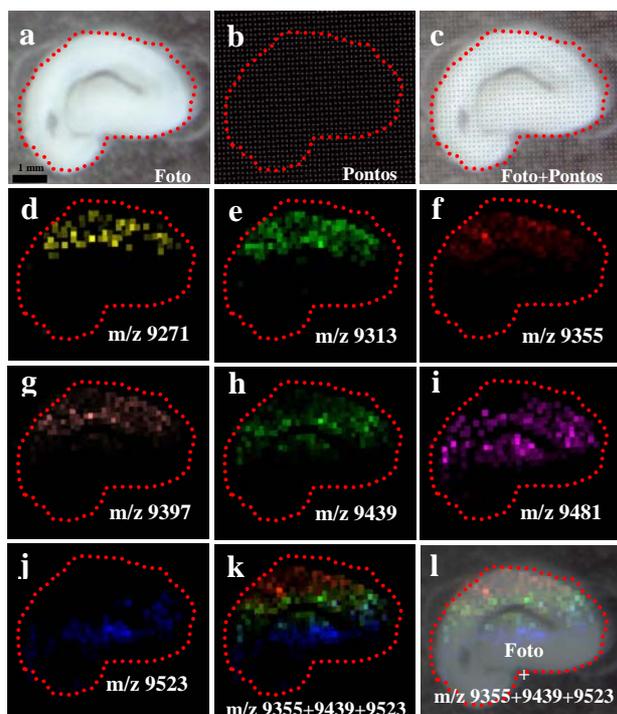


Figura - 2. (a) Seção transversal de endosperma de grão de café de boa qualidade (EM); (b) Área selecionada a qual foi ionizada no espectrômetro com respectivos pontos nos quais foram adquiridos espectros; (d-j) Imagens moleculares dos componentes detectados com um acréscimo de +42 Da. (k) Co-localização de alguns componentes moleculares detectados; (l) Comparação dos componentes co-localizados com a foto da seção de endosperma avaliada. As linhas pontilhadas em vermelho representam o contorno do endosperma.

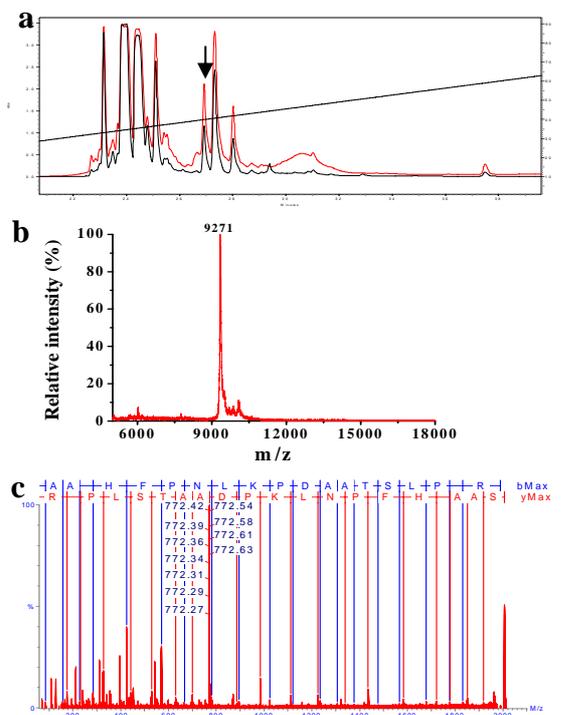


Figura 3 - (a) Cromatograma representando as frações obtidas a partir do extrato bruto do fruto de café de boa qualidade. A seta aponta a fração contendo a proteína de 9 kDa; (b) Espectro de massa correspondente à fração apontada pela seta em (a); (c) Espectro de MS/MS representativo ilustrando a abordagem de seqüenciamento *De novo* a partir de fragmentos trípticos visando à identificação da proteína.

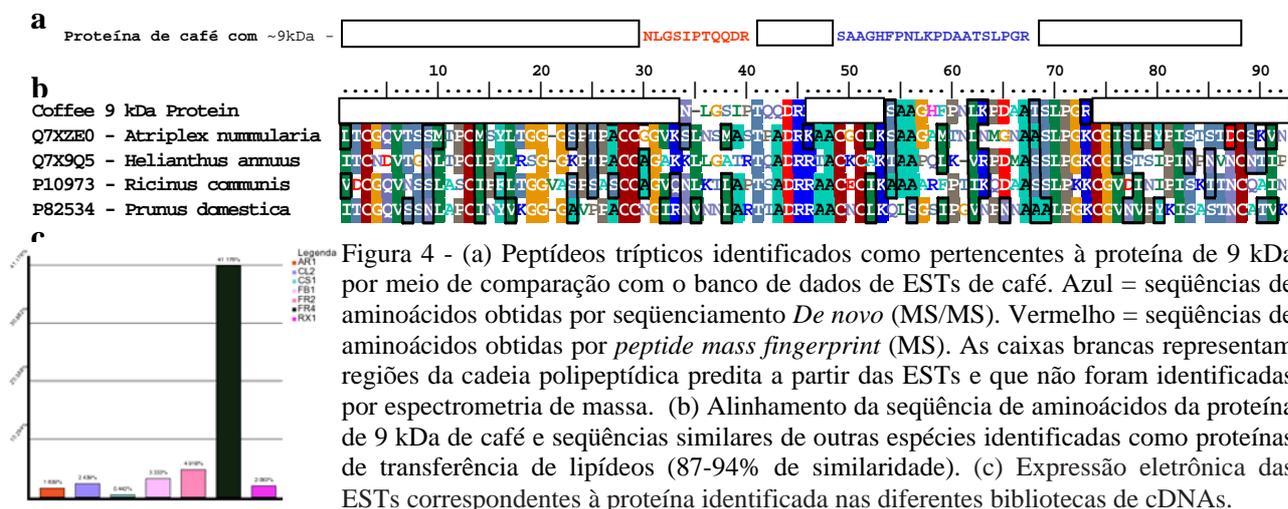


Figura 4 - (a) Peptídeos trípticos identificados como pertencentes à proteína de 9 kDa por meio de comparação com o banco de dados de ESTs de café. Azul = seqüências de aminoácidos obtidas por seqüenciamento *De novo* (MS/MS). Vermelho = seqüências de aminoácidos obtidas por *peptide mass fingerprint* (MS). As caixas brancas representam regiões da cadeia polipeptídica predita a partir das ESTs e que não foram identificadas por espectrometria de massa. (b) Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína de 9 kDa de café e seqüências similares de outras espécies identificadas como proteínas de transferência de lipídeos (87-94% de similaridade). (c) Expressão eletrônica das ESTs correspondentes à proteína identificada nas diferentes bibliotecas de cDNAs.

Conclusões

Os resultados obtidos com o presente estudo são promissores quanto à utilização da técnica de obtenção de imagens por meio de espectrometria de massa (*imaging mass spectrometry*) visando à avaliação do perfil de distribuição espacial de macromoléculas em situações específicas do desenvolvimento do fruto ou outras partes do café. Essa metodologia associada a técnicas clássicas de análise proteômica mostrou-se eficaz na identificação e avaliação da distribuição espacial de proteínas específicas nos frutos de café além de possibilitar a identificação de modificações pós-traducionais o que não seria possível por meio de outras técnicas de investigação da distribuição de proteínas em tecidos.

Agradecimentos

Suporte financeiro: CBP&D-Café; FINEP

Referências Bibliográficas

Brand, G.D., Leite, J.R.S.A., de Sa Mandel, S.M., Mesquita, D.A., Silva, L.P., Prates, M.V., Barbosa, E.A., Vinecky, F., Martins, G.R., Galasso, J.H., Kuckelhaus, S.A., Sampaio, R.N., Furtado Jr, J.R., Andrade, A.C., Bloch Jr, C. (2006) Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347:739-746.

De Castro, R. D., Marraccini, P. (2006) Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Brazilian Journal of Plant physiology*, 18:95-108.

Vieira, L.G.E.; Andrade, A.C., Colombo, C.A. et al (2006) Brazilian coffee genome Project: an EST-based genomic resource. *Brazilian Journal of Plant physiology*, 18:175-199.