



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DOUGLAS FABIANO GOMES

ANÁLISE PROTEÔMICA DE *Rhizobium tropici* PRF 81

DOUGLAS FABIANO GOMES

ANÁLISE PROTEÔMICA DE *Rhizobium tropici* PRF 81

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Mariangela Hungria

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G633a Gomes, Douglas Fabiano.
Análise proteômica de *Rhizobium tropici* PRF 81 / Douglas Fabiano Gomes. –
Londrina, 2011.
54 f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia agrícola – Teses. 2. *Rhizobium tropici* – Teses. 3.
Nitrogênio – Fixação – Teses. 4. Feijão – Inoculação – Teses. 5.
Microorganismos fixadores de nitrogênio – Teses. 6. Rizóbio – Teses. I.
Hungria, Mariangela. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

DOUGLAS FABIANO GOMES

ANÁLISE PROTEÔMICA DE *Rhizobium tropici* PRF 81

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Mariangela Hungria
EMBRAPA-Soja – Londrina - PR

Dra. Diva de Souza Andrade
IAPAR – Londrina - PR

Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista
EMBRAPA-Soja – Londrina - PR

Londrina, 25 de Fevereiro de 2011.

Dedico,

*Aos Meus pais que com amor me
educaram e proporcionaram esta
realização;*

*À minha linda esposa por tornar todos
os dias de minha vida especiais.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por preparar todas as coisas em minha vida, por colocar pessoas boas em meu caminho, pela família e esposa maravilhosos, pela saúde, paz, por iluminar cada passo meu, enfim, agradeço a Deus por tudo em minha vida.

À Dra Mariangela Hungria pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos, paciência, dedicação, confiança, pelo exemplo pessoal e profissional e, especialmente, pela amizade...MUITO OBRIGADO!!!

À Dra Diva de Souza Andrade, que acreditou e concedeu minha primeira oportunidade profissional, contribuindo diretamente para a minha formação, que, sem dúvidas, estas refletidas neste trabalho. Além disso, muito obrigado pela amizade e pelos conselhos valiosos.

À Dra Jesiane Stefania da Silva Batista, pela paciência, amizade, ensinamentos e pela contribuição direta, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Com amor, agradeço à minha esposa Juliana Marcolino Ribeiro, pelo apoio, incentivo, paciência, carinho e dedicação, que foram fundamentais para eu vencer mais esta etapa. Você é o motivo do meu esforço, você é meu exemplo de competência, honestidade, ética e persistência, você é o meu amor, obrigado!

Aos meus pais José Carlos e Maria José, pela educação, apoio, carinho, dedicação, por estarem ao meu lado e pelo incentivo incondicional em todas as minhas escolhas. Vocês são muito especiais, amo vocês e muito obrigado!

À minha irmã Keila, agradeço pela paciência, amizade e carinho. Tenho muito orgulho de você, muito obrigado!

Agradeço a Jonas Marcolino e Jacira Coca Lopes, que também considero como pais, pelo carinho, incentivo, apoio, confiança, conselhos e ensinamentos, os quais foram fundamentais para mais essa vitória.

Aos amigos (estagiários e funcionários) do Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa-Soja, muito obrigado pela paciência, amizade incentivo e pela ajuda. Todos vocês, direta ou indiretamente contribuíram muito para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigado aos colegas do curso de mestrado pela amizade e companheirismo, juntos estamos completando mais esta etapa, e por isso agradeço a todos vocês.

Aos professores do curso de mestrado em Biotecnologia, agradeço pela paciência e ensinamentos, que contribuíram muito para o meu crescimento pessoal e profissional e, conseqüentemente, para a execução deste trabalho.

Às instituições UEL, Embrapa e CAPES pela oportunidade de aprendizado.

A todos, MUITO OBRIGADO!

GOMES, Douglas Fabiano. **Análise proteômica de *Rhizobium Tropici* Prf 81**. 2011. 54 f. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

A estirpe PRF 81 (= SEMIA 4080) de *Rhizobium tropici* é utilizada no Brasil em inoculantes agrícolas para a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) desde 1998, devido à sua alta eficiência em fixar nitrogênio, elevada competitividade com estirpes nativas e capacidade de adaptar-se a diferentes condições de estresse. Neste contexto, o objetivo deste estudo consistiu em obter uma visão geral das respostas adaptativas ao estresse térmico apresentadas pela estirpe PRF 81. A partir da separação por eletroforese bidimensional foram identificados, por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF-TOF, 59 proteínas diferencialmente expressas na condição de estresse, representada pela expressão diferencial no crescimento *in vitro* a 35 °C em comparação com a temperatura de 28 °C. As proteínas diferencialmente expressas, *in vitro*, a 35 °C pela PRF 81 foram associadas às classes funcionais do COG (Clusters of Orthologous Groups) de metabolismo, processos celulares e sinalização e processamento e armazenamento de informações. Dentre as proteínas induzidas pela temperatura elevada, duas são, frequentemente, associadas ao estresse térmico, sendo elas as chaperonas DnaK e GroEL. Diversas proteínas responsivas ao estresse oxidativo também tiveram expressão diferencial na temperatura de 35 °C, revelando assim a diversidade de adaptações a condições de estresse apresentados por esta estirpe, sugerindo ainda um “cross-talk” entre os estresses térmico e oxidativo. Assim, através da análise proteômica diferencial, foi possível caracterizar as respostas ao calor apresentadas pela estirpe PRF 81.

Palavras-chave: *Rhizobium tropici*. Proteômica. Estresse. DnaK. GroEL. Fixação biológica do nitrogênio.

GOMES, Douglas Fabiano. **Proteomic analysis of *Rhizobium tropici* PRF 81**. 2011. 54 f. Dissertation. (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Rhizobium tropici strain PRF 81 (= SEMIA 4080) is commercially used in inoculants to the common bean crop in Brazil since 1998 due its high efficiency in fixing nitrogen, competitiveness against indigenous rhizobial populations and capacity of adaptation to stressful of tropical environments. The objective of this study was to obtain an overview of adaptative responses to heat stress of PRF 81, by analyzing the differentially expressed proteins when the bacterium was grown at 28°C and 35°C. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) revealed the differential expression of 59 proteins that were identified by MALDI-TOF/TOF-TOF. The *in vitro* up-regulated proteins were associated with functional classes of methabolism, cellular process and signaling and Information storage and processing of COG (Clusters of Orthologous Groups). Among the differentially expressed proteins, two are often related with heat stress; the DnaK and GroEL chaperones. Interestingly, several oxidative stress responsive proteins were up-regulated in 35°C, and these results reveal the diversity of adaptations presented by this thermo-tolerant strain to stress condicions, and suggests a cross talk between heat and oxidative stress. Therefore, the proteomics analysis allowed to characterize the responses to heat stress showed by PRF 81 strain.

Keywords: *Rhizobium tropici*. Proteomics. Heat stress. DnaK. GroEL.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação gráfica do processo de separação de proteínas por eletroforese bidimensional, onde, na primeira dimensão as proteínas são separadas de acordo com seus pI e na segunda dimensão por suas respectivas massas moleculares..... 21
- Figura 2** – Esquema representativo de um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF e seus componentes 23
- Figura 3** – Fluxograma das etapas para a identificação *in silico* de proteínas; A: Espectro de massas; B: Submissão dos dados de MS para a pesquisa em bancos de dados pelo programa MASCOT; C: Interface gerada pela busca no banco de dados; D: Informações da proteína identificada e dados da anotação desta no NCBI 25

Artigo

- Figura 1** – Perfil bidimensional do conteúdo protéico total de células de *Rhizobium tropici* estirpe PRF 81 indicando as proteínas diferencialmente expressas após a exposição a temperatura elevada (35 °C). Informações sobre cada proteína diferencialmente expressa estão disponibilizadas na Tabela 1..... 54

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1	FEIJOEIRO (<i>PHASEOLUS VULGARIS L.</i>)	11
1.2	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	11
1.2.1	Interação Rizóbio/Hospedeiro	14
1.2.2	A Simbiose <i>Rhizobium</i> -feijoeiro	15
1.3	ESTRESSES AMBIENTAIS E INSTABILIDADE GENÉTICA	16
1.4	ANÁLISE PROTEÔMICA	17
1.5	METODOLOGIAS PROTEÔMICAS	18
1.5.1	Preparação e Solubilização da Amostra	19
1.5.2	Eletroforese Bidimensional (2-DE)	19
1.5.3	Identificação das Proteínas	22
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
	REFERÊNCIAS	27
	ARTIGO: PROTEOMIC PROFILING OF <i>RHIZOBIUM TROPICI</i> PRF 81: IDENTIFICATION OF CONSERVED AND SPECIFIC RESPONSES TO HEAT STRESS	33
	<i>Summary</i>	34
	<i>Introduction</i>	35
	<i>Material and Methods</i>	36
	<i>Bacterial strain and growth conditions</i>	36
	<i>Total protein extraction</i>	36
	<i>2-D electrophoresis and visualization</i>	37
	<i>Gel image analysis and spot selection</i>	37
	<i>Sample preparation and MALDI-TOF mass spectrometry</i>	38
	<i>In silico protein identification</i>	38
	<i>Protein characterization</i>	38
	<i>Results and Discussion</i>	39

<i>2-D electrophoresis and differential spots selection</i>	39
<i>General proteome response to heat stress</i>	39
<i>Differential expression of the two-component response regulators (NtrX and ChvI)</i>	40
<i>Induced molecular chaperones DnaK and GroEL</i>	41
<i>Induction of chaperone-like proteins: Translation factors</i>	42
<i>Cross-talk between heat and oxidative stress</i>	43
<i>Concluding Remarks</i>	44
<i>Acknowledgment</i>	44
<i>References</i>	45

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 FEIJOEIRO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.)

O feijoeiro, originário do continente americano, foi domesticado separadamente em dois centros distintos de diversidade genética, de modo que os alelos estão distribuídos em dois grupos: o mesoamericano, ou grupo do norte (do México à região norte da América do Sul - México, América Central, Colômbia, norte do Peru) e o andino, ou grupo do sul (do sul do Peru ao norte da Argentina – Equador, Bolívia, Peru, Argentina) (CHACON et al., 2005; GEPTS e DEBOUCK, 1991). Essa leguminosa participa da alimentação de cerca de 500 milhões de pessoas na América latina e África, sendo bastante difundida em todo o território brasileiro como cultura de subsistência em pequenas propriedades, muito embora também seja cultivada por produtores com o emprego de tecnologias avançadas. Além disso, é considerada uma fonte proteica vegetal e de aminoácidos essenciais importante, representando de 20% a 28% das proteínas ingeridas pela população (EMBRAPA, 2005, 2006; VELASQUEZ, 1988).

Segundo dados da CONAB (2010), o Brasil continua como o maior produtor e consumidor mundial de feijão, de modo que a safra de 2010/2011 poderá chegar a 3,39 a 3,43 milhões de toneladas, com um aumento de 4,0% a 5,0% em relação à safra passada. A área cultivada deve crescer cerca de 0,6% a 1,3%, alcançando aproximadamente 4,61 milhões de ha. Entretanto, apesar dessa estimativa, a produtividade média desta leguminosa no Brasil para a safra 2010/2011 deverá ser de apenas 944 kg.ha⁻¹, quantidade que ainda é considerada baixa, onde os principais fatores que contribuem para esse cenário são a pequena adoção de tecnologias e o cultivo em solos marginais.

1.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

Embora o nitrogênio constitua aproximadamente 80% dos gases atmosféricos, nenhum animal ou planta consegue utilizá-lo diretamente do ar como nutriente, devido à tripla ligação entre os dois átomos que constituem a molécula. Constituinte de

ácidos nucleicos e proteínas, que são moléculas fundamentais para os processos biológicos, este nutriente é considerado um dos principais fatores limitantes para a agricultura. Deste modo, as fontes para o fornecimento desse nutriente às plantas são: 1) o solo, principalmente pela decomposição da matéria orgânica; 2) o processo de fixação não-biológica, resultante de descargas elétricas, combustão e vulcanismo; 3) os fertilizantes nitrogenados; e 4) o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N_2) (BRILL, 1979; POSTGATE e HILL, 1979; POSTGATE, 1982).

Com relação ao nitrogênio do solo, o reservatório presente na matéria orgânica é limitado, podendo esgotar-se rapidamente após alguns cultivos. Além disso, as condições de temperatura e umidade predominantes nos trópicos, portanto em parte do território brasileiro, aceleram os processos de decomposição da matéria orgânica, bem como de perdas de nitrogênio por transformações gasosas e por lixiviação, resultando em baixos teores desse nutriente nos solos de cultivo. Por essas razões os solos brasileiros são capazes de fornecer, em média, apenas 10 a 15 kg de $N \cdot ha^{-1} \cdot safra^{-1}$. Também deve-se considerar que a preservação da matéria orgânica com uma relação carbono/nitrogênio adequada é importante para a manutenção dos microrganismos do solo, sem os quais a sustentabilidade dos sistemas agrícolas torna-se inviável (HUNGRIA et al., 2001).

A fixação não-biológica, isto é, independente da ação de organismos vivos, resulta de processos naturais tais como as descargas elétricas, que são capazes de converter o nitrogênio atmosférico (N_2) em formas assimiláveis pelas plantas. Essa fonte contribui com, aproximadamente, 10% da entrada de nitrogênio na biosfera (NEWTON, 2000).

Os fertilizantes nitrogenados representam a fonte de nitrogênio assimilada com maior rapidez pelas plantas e estima-se que a produção industrial de amônia contribua com cerca de 25% da fixação anual de nitrogênio (NEWTON, 2000). Entretanto, essa fonte de nitrogênio apresenta um custo energético elevado, pois o processo industrial que transforma o N_2 em amônia (NH_3) requer: hidrogênio (derivado de gás de petróleo); catalisador contendo ferro; altas temperaturas ($300^\circ C$ a $600^\circ C$); e altas pressões (200 a 800 atm). Conseqüentemente, o gasto de fontes energéticas por tonelada de NH_3 sintetizada é bastante elevado e estimado em, aproximadamente, seis barris de petróleo. Além disso, a distribuição, o armazenamento e a aplicação dos fertilizantes também demandam fontes energéticas. A demanda energética relacionada aos fertilizantes nitrogenados é incrementada pela baixa eficiência de utilização dos fertilizantes pela plantas, sendo raramente superior a 50% (HUNGRIA et al., 1994, 1997, 2001). Isso significa que a metade do volume aplicado é perdida através dos processos de lixiviação (lavagem no perfil do solo por percolação, ou

escorrimento superficial) e transformação em formas gasosas, tanto pela desnitrificação (redução, pela ação dos microrganismos, para formas gasosas, N_2 e N_2O), como pela volatilização (perdas gasosas na forma de NH_3) (VANCE, 2001).

Outro problema no uso de fertilizantes nitrogenados está relacionado à degradação ambiental, pois a lixiviação resulta no acúmulo de formas nitrogenadas, particularmente nitrato, nas águas dos rios, lagos e lençóis subterrâneos, podendo atingir níveis tóxicos aos peixes e ao homem. Diversas doenças, como câncer e problemas respiratórios, têm sido associadas ao consumo de águas contaminadas com nitrato, e já representam um problema sério em alguns países da Europa. Já as perdas gasosas, particularmente na forma N_2O , são responsáveis, em grande parte, pelo efeito estufa (GRAHAM e VANCE, 2003). A análise crítica desses gastos indica que práticas agrícolas alternativas precisam ser buscadas, principalmente no Brasil, que importa fertilizantes nitrogenados para satisfazer a demanda interna.

Uma alternativa para aumentar a produtividade brasileira de feijão reside na maior exploração do processo da fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N_2) (FBN), realizada através da interação simbiótica entre bactérias especializadas (diazotróficas) e suas plantas hospedeiras específicas. Neste processo, o N_2 é aproveitado por alguns microrganismos procariotos (arqueobactérias e, principalmente, bactérias), graças à ação de um complexo enzimático denominado dinitrogenase, capaz de romper a tripla ligação da molécula N_2 e reduzi-la a amônia (NH_3), a mesma forma obtida no processo industrial.

O complexo enzimático da dinitrogenase é constituído de duas unidades proteicas: a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), ambas capazes de transportar elétrons. Durante a reação de redução do N_2 , a dinitrogenase é auxiliada por uma terceira molécula transportadora de elétrons, a ferridoxina, a qual, em sua forma reduzida, transfere um elétron para a unidade Fe-proteína, que doa um elétron para a outra unidade protéica, a MoFe-proteína, onde os elétrons são acumulados. Este processo ocorre até que oito transferências de elétrons sejam acumuladas, possibilitando a redução completa do N_2 a NH_3 . Os oito elétrons são necessários porque, obrigatoriamente, também ocorre a redução de prótons de hidrogênio (H^+) a H_2 (RUBIO e LUDDEN, 2008), sendo o processo representado pela seguinte reação: $N_2 + 8 e^- + 8 H^+ + 16 ATP \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$.

As bactérias fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas associam-se a diversas espécies de plantas em diferentes graus de especificidade, sendo que a maior contribuição e, por isso, a mais estudada, ocorre com bactérias que se associam simbioticamente com

diversas plantas da família Leguminosae (=Fabaceae). A FBN representa a principal via de incorporação do N_2 à biosfera, cerca de 65%. Em termos quantitativos, estima-se que 44 a 66 milhões de toneladas métricas de N_2 são fixados anualmente por leguminosas de importância agrícola, com outros 3 a 5 milhões de toneladas métricas sendo fixados por leguminosas em ecossistemas naturais, fornecendo cerca de metade de todo o nitrogênio utilizado na agricultura (DELWICHE, 1970; BURNS e HARDY, 1975; BRILL, 1979; POSTGATE e HILL, 1979; NEWTON, 2000; GRAHAM e VANCE, 2003).

Particularmente nas últimas duas décadas, os estudos sobre a simbiose diazotrofos-hopedeiro têm explorado a especificidade do reconhecimento entre os simbioss, a supressão das respostas imunes das plantas à invasão das bactérias, a troca de nutrientes entre os simbioss e a regulação da organogênese dos nódulos.

1.2.1 Interação Rizóbio/Hopedeiro

O estabelecimento da simbiose constitui um processo complexo que envolve a troca de sinais moleculares entre o microssimbionte e a planta hospedeira, muitos deles responsáveis pela especificidade da interação.

Uma das interações simbióticas mais bem estudadas é a realizada entre microrganismos fixadores de nitrogênio presentes no solo e plantas leguminosas. Neste caso, o início da interação ocorre quando as plantas liberam na rizosfera moléculas específicas, em geral misturas de flavonoides, que são reconhecidas pelos microssimbioss e atuam como compostos quimiotáticos, além de estimularem a multiplicação dos rizóbios e a expressão de genes responsáveis pela nodulação (REDMOND et al., 1986). Estes genes codificam fatores espécie-específicos, os fatores Nod, que são oligossacarídeos reconhecidos pelos receptores LysM, da planta hospedeira, que, por sua vez, enviam sinais de transdução requeridos para o processo de invasão da raiz através dos pelos radiculares e posterior desenvolvimento de um novo órgão radicular, o nódulo (RIELY et al., 2004; GEURTS et al., 2005).

Os nódulos são originados pelas modificações no periciclo e nas células corticais, de modo que após seu crescimento e diferenciação o microssimbionte inicia o processo de fixação biológica, onde o N_2 é convertido em amônia e transferido para as plantas hospedeiras, que por sua vez, disponibilizam para as bactérias fontes de carbono. Para que esta troca de nutrientes ocorra se faz necessário um mecanismo de transporte coordenado

entre ambas as partes (LODWIG et al., 2003). Esta troca de compostos pode ser interrompida por um mecanismo tipo “feedback”, ou seja, o processo para durante o período em que a planta tem nitrogênio suficiente para a manutenção de suas atividades (CAETANO-ANOLLÉZ e BAUER, 1988).

Após o estabelecimento da simbiose, o microrganismo permanece separado do citoplasma da célula vegetal por uma membrana denominada de simbiossoma ou membrana peribacteroidal, cuja função principal é a de regular o intercâmbio de nutrientes entre os simbiossomas.

1.2.2 A Simbiose *Rhizobium*-feijoeiro

Inicialmente, a simbiose com o feijoeiro era considerada bastante restrita, sendo relatado que apenas um grupo de bactérias classificadas, em 1932, como *Rhizobium phaseoli* era capaz de realizar o processo de FBN (FRED et al., 1932). Os avanços obtidos na área de caracterização fisiológica, bioquímica e genética conduziram à reclassificação dessas bactérias, após 52 anos, na espécie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (JORDAN, 1984).

Com as novas metodologias de biologia molecular e a coleta de rizóbios em vários locais do mundo observou-se que essa leguminosa pode ser bastante promíscua em suas associações simbióticas (HERNANDEZ-LUCAS et al., 1995; MICHIELS et al., 1998; MARTÍNEZ-ROMERO, 2003). Além disso, foi constatada variabilidade genética elevada entre os microssimbiontes do feijoeiro, levando à proposta, em 1991, da classificação destas em uma nova espécie, *R. tropici*, subdividida em dois tipos, A e B (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991). Em seguida, estudos com isolados mexicanos de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* constataram grande variabilidade entre as bactérias da América Central e as europeias, o que também conduziu à definição de outra espécie, *R. etli* (SEGOVIA et al., 1993). Outras duas espécies foram definidas por Amarger e colaboradores (1997), sendo elas *R. gallicum* (bv. *gallicum* e bv. *phaseoli*) e *R. giardinii* (bv. *giardinii* e bv. *phaseoli*). Por fim, novas espécies que estabelecem simbiose com o feijoeiro têm sido descritas, sendo algumas delas: *R. lusitanum* (VALVERDE et al., 2006), *R. endophyticum* (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2010), e *Rhizobium pisi* (RAMÍREZ-BAHENA et al., 2008) entre outras.

Além dessas espécies definidas, vários outros gêneros e espécies já foram isolados de nódulos de feijoeiro: *Bradyrhizobium* sp. (LANGE, 1961), *Rhizobium* sp. OR 191

(EARDLY et al., 1985) e *R. mongolense* (VAN BERKUM et al., 1998), em adição a prováveis novas espécies (EARDLY et al., 1995). Outras espécies de rizóbios são capazes de nodular o feijoeiro em condições de laboratório, mas ainda não foram isoladas desse hospedeiro em condições de campo (LOK et al., 2006).

Dentre os microrganismos diazotróficos, os pertencentes ao gênero *Rhizobium* desempenham papel importante no processo de FBN em simbiose com o feijoeiro. Em ensaios conduzidos a campo, na Região Sul e no Centro-Oeste, todos com rendimento de grãos superiores a 1.500 kg.ha⁻¹, a inoculação do feijão com estirpes da espécie *Rhizobium tropici*, SEMIA 4080 (=PRF 81), SEMIA 4088 (=H 12) e SEMIA 4077 (=CIAT 899), resultou em ganhos no rendimento de 78 a 1.101 kg.ha⁻¹ (HUNGRIA et al., 2000). Além da elevada eficiência em fixar nitrogênio, estas estirpes apresentam elevada competitividade e são tolerantes a diferentes condições de estresse, sendo essas características essenciais para a utilização destes microssimbiontes em inoculantes agrícolas.

1.3 ESTRESSES AMBIENTAIS E INSTABILIDADE GENÉTICA

Bactérias do gênero *Rhizobium* que estabelecem simbiose com o feijoeiro apresentam elevada instabilidade genética, caracterizada pelos rearranjos genéticos, deleções de plasmídios e mutações. Os rearranjos genéticos ocorrem devido à presença de sequências que atuam como sítios de recombinação no DNA cromossomal (FLORES et al., 1988). A deleção de plasmídeos pode afetar diretamente a FBN, isso porque nas linhagens de *Rhizobium* os genes responsáveis pela nodulação e fixação de nitrogênio estão alocados em um único replicon, denominado de plasmídeo simbiótico (*psym*). Outro evento genético que também pode alterar as propriedades simbióticas destes microrganismos são as mutações, entretanto, a menos que estas tenham um efeito competitivo, dificilmente assumem dominância em uma cultura.

A instabilidade genética das estirpes simbiotes do feijoeiro é acentuada quando expostas a condições de estresse (BERRY e ATHERLY, 1984; DJORDJEVIC et al. 1983; ZURKOWSKI et al., 1982). Dentre os fatores que contribuem para o aumento da instabilidade genética destes microssimbiontes destacam-se as temperaturas elevadas dos solos em regiões tropicais (DUDEJA e KHURANA, 1989), sendo este um dos principais

problemas para a FBN, juntamente com a salinidade e a acidez dos solos (DAY et al., 1978; HUNGRIA e FRANCO, 1993).

Diferentes estirpes de *Rhizobium* provenientes de solos de regiões tropicais, que estabelecem simbiose com feijoeiro variam quanto à tolerância às temperaturas elevadas (GITONGA et al., 1989; MERCANTE, 1993; SÁ et al., 1993). Dentre essas estirpes, a CIAT 899 de *Rhizobium tropici*, revelou elevada resistência em temperaturas de 35°C e 40°C, mantendo a eficiência do processo de fixação biológica do nitrogênio (MICHIELS et al., 1994; MARTÍNEZ-ROMERO, 1991), sendo esta uma importante característica de modo que as alterações ou perdas das propriedades simbióticas comprometem a utilização destas estirpes em inoculantes agrícolas.

O processo de nodulação das raízes de feijoeiro ocorre entre as temperaturas de 25 a 30 °C sendo que a eficiência deste processo é reduzida em temperaturas acima ou abaixo dessa faixa (HERNANDEZ-ARMENTA et al., 1989). Tem sido descrito que algumas estirpes de *Rhizobium* mantêm a eficiência do processo de nodulação na condição de 40°C durante o dia e 23°C à noite (HUNGRIA et al., 1993). Michiels e colaboradores (1994) estudaram diferentes espécies de *Rhizobium* quanto à adaptação destas às temperaturas elevadas através das análises das taxas de fixação, sobrevivência celular e síntese de proteínas. Nesse estudo, os autores observaram que *R. tropici* CIAT 899, em contraste com *R. leguminosarum* bv. phaseoli CNPAF 512, apresenta maior índice de sobrevivência celular e maior eficiência de FBN durante o ciclo de temperaturas 40°C e 23°C, dia e noite, respectivamente. A manutenção da eficiência dos processos de nodulação e fixação do nitrogênio pela estirpe CIAT 899 em temperaturas elevadas tem sido relacionada à maior estabilidade genética desta em relação as demais estirpes (MARTÍNEZ-ROMERO, 1991).

1.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

Por apresentarem grande importância ambiental e econômica, bactérias fixadoras de nitrogênio passaram a ser estudadas e selecionadas com o auxílio da genômica funcional. Neste sentido, a análise proteômica tem tido destaque, pois possibilita detectar adaptações metabólicas destes microssimbiontes em diferentes condições de cultivo através do estudo do perfil de expressão de suas proteínas.

Em 1975 foram realizados os primeiros estudos caracterizados como proteômicos, que empregaram a técnica de eletroforese bidimensional, desenvolvida, independentemente, por O'Farrel (1975), Klose (1975) e Scheele e Palade (1975), através dos quais foram obtidos os mapeamentos das proteínas da *Escherichia coli*, tecidos de rato e de pâncreas de *Cavia porcellus*, respectivamente. Entretanto, o termo proteoma foi sugerido pela primeira vez apenas em 1993 por Mark Wilkins e Keith Williams, que utilizaram como definição para este: a identificação sistemática das proteínas totais expressas por um genoma (LOPES, 1999).

A principal meta de estudos proteômicos consiste em obter uma visão global e integrada examinando, simultaneamente, as proteínas expressas em uma determinada condição, em vez de estudar as proteínas individualmente (GRAVES e HAYSTEAD, 2002). Contudo, é importante salientar que o objetivo destes estudos não é apenas o de identificar todas as proteínas, mas também o de estudar suas propriedades, seus níveis de expressão, suas funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e os mecanismos regulatórios (BLACKSTOCK e WEIR, 1999), sendo que para atingir estes objetivos é requerido o envolvimento de diferentes áreas, tais como a biologia molecular, a bioquímica e a bioinformática.

Uma questão importante na caracterização do proteoma de um organismo é a dinâmica que este apresenta, variando de acordo com o estado fisiológico das células e com os estímulos internos e externos. Deste modo, as proteínas podem sofrer modificações pós traducionais, translocação, ou ainda terem suas concentrações alteradas, devido á síntese ou degradação e, revelando assim, os processos em que estas estão envolvidas. Apesar das proteínas serem produtos da expressão de um gene, as modificações pós-traducionais permitem que elas ocorram em múltiplas formas nas células, de modo que estas modificações não podem ser observadas, nem mesmo previstas pelo estudo do genoma, que é sempre o mesmo em todas as células de um organismo (GRAVES e HAYSTEAD, 2002).

1.5 METODOLOGIAS PROTEÔMICAS

Os estudos proteômicos são caracterizados por diferentes etapas, sendo as mais comuns: 1) Preparação e solubilização da amostra; 2) Eletroforese bidimensional (2-DE); 3) Identificação das proteínas.

1.5.1 Preparação e Solubilização da Amostra

Na preparação, as amostras devem ser desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas para que haja a interrupção completa das interações moleculares para obter “spots” que representam os polipeptídeos individualmente.

Atualmente, existem descritos diversos métodos de obtenção de amostras proteicas para a análise por 2-DE. Esses métodos combinam o rompimento celular, inativação das proteases e solubilização das proteínas. Entretanto, deve-se prezar pela simplicidade visando aumentar a reprodutibilidade, reduzindo-se assim o número de “spots” artificiais decorrentes de perdas de parcelas da amostra e modificações por proteólise, agregação, precipitação ou alterações químicas (GÖRG et al., 2004), tornando-se essencial a padronização de todos os parâmetros experimentais, visto que um proteoma deve refletir as condições fisiológicas.

Na solubilização das amostras as proteínas são desnaturadas e reduzidas para a remoção das interações moleculares intra e interespecíficas e, assim, obter os polipeptídeos isolados. Este processo é realizado, usualmente, pela adição de uréia, que atua sobre as pontes de hidrogênio, tioureia, introduzida por Rabilloud (1997), que promove a interrupção das interações hidrofóbicas, e de detergentes não-iônicos e/ou zwitteriônicos, como o Triton X-100 e CHAPS, respectivamente, que são aplicados para prevenir interações hidrofóbicas entre proteínas, evitando assim perdas por agregação (GÖRK et al., 2004).

A redução e a prevenção da reoxidação, bem como da formação de ligações de dissulfeto são pontos críticos para a preparação da amostra promovendo o desdobramento completo dos peptídeos. Dentre os agentes redutores mais utilizados destacam-se o ditioneitol (DTT) e o dithioerythritol (DTE), que são aplicados em excesso, atingindo concentrações acima de 100 mM (HERBERT et al., 1998).

1.5.2 Eletroforese Bidimensional (2-DE)

A técnica de eletroforese bidimensional consiste de duas corridas eletroforéticas sequenciais, sendo a primeira denominada de focalização isoeletrica (IEF) e a segunda uma eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

(SDS-PAGE) (Figura 1). Na primeira dimensão, focalização isoeletrica, as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI) em tiras de 13, 24 ou até de 54 cm com gradiente de pH imobilizado (IPGs). De acordo com a faixa de pH, as tiras podem ser classificadas como: de larga faixa (pH de 3,0 a 12,0), média (pH de 4,0 a 7,0), curta (pH de 4,5 a 5,5) e ultra-curta (pH de 4,9 a 5,3).

Na focalização isoeletrica, os tempos e voltagens devem ser determinados de acordo com a amostra estudada, com a faixa de pH e com o comprimento da tira empregada, sendo que tempos muito curtos ou longos podem causar —streaking horizontal e, por isso, devem ser evitados. Outra variável importante que deve ser controlada é a temperatura, que não deve ser superior a 37 °C, pois pode ocasionar a carbamilação da uréia, nem menor que 10°C evitando, assim, a cristalização deste mesmo composto. Desta forma, a temperatura ótima para o processo é de 20 °C (GÖRG et al., 1991).

Outro processo fundamental para obter maior reprodutibilidade e resolução consiste no equilíbrio das tiras já focalizadas. Antes da realização da segunda corrida eletroforética, as tiras são equilibradas para promover a plena interação dos peptídeos com o SDS, para que estes sejam transferidos com sucesso da primeira para a segunda dimensão (GÖRG et al., 1988). A segunda dimensão é realizada em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), no qual as proteínas da tira, previamente distribuídas de acordo com seus pI, são separadas conforme suas massas moleculares.

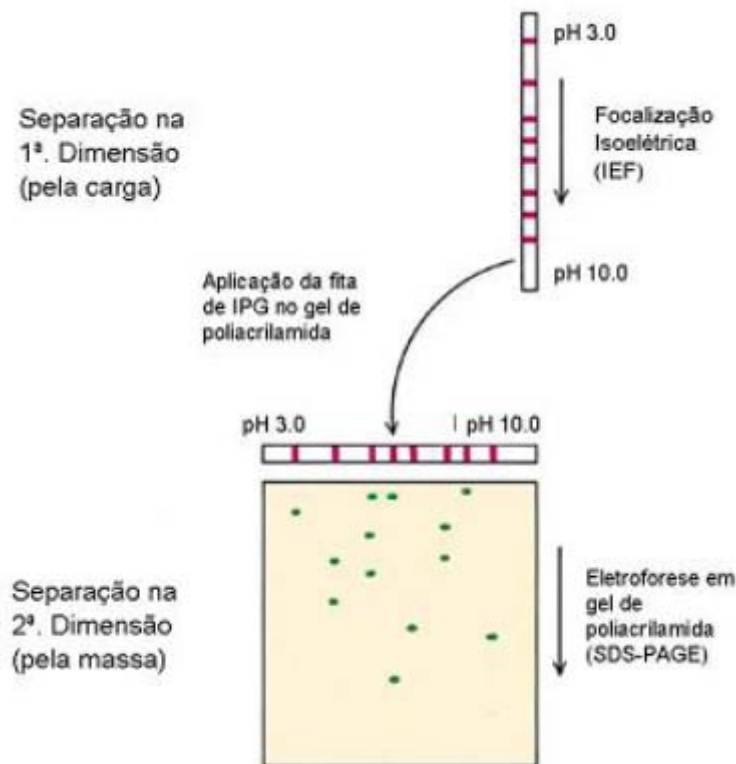


Figura 1 – Separação de proteínas por eletroforese bidimensional. Na primeira dimensão as proteínas são separadas de acordo com seus pI e na segunda dimensão por suas respectivas massas moleculares.

A eletroforese bidimensional é um método de separação eficiente porque permite separar centenas de proteínas simultaneamente, possibilitando a análise de amostras complexas. Ao final do processo, é obtido um mapa bidimensional (mapa-2D) da amostra, onde as proteínas são separadas com base em seus pontos isoelétricos (pI) na horizontal, e suas massas moleculares aparentes na vertical (WESTERMEIER e NAVEN, 2004). Além disso, tal procedimento fornece outras informações, que são: expressão, abundância relativa e modificações pós-traducionais (PANDEY e MANN, 2000; CASH, 1998; JUNGBLUT, 2001; HERBERT et al., 2001).

1.5.3 Identificação das Proteínas

A primeira metodologia voltada para a identificação das proteínas separadas por 2-DE foi o sequenciamento de aminoácidos por degradação da extremidade N-terminal das proteínas, desenvolvido por Edman em 1949 (EDMAN, 1949). Desde então, esta metodologia foi aprimorada, fato que contribuiu para a maior sensibilidade e simplificou as análises, levando ao desenvolvimento do primeiro banco de dados para proteínas. Uma vantagem desta técnica consiste da possibilidade de identificar proteínas separadas por 2-DE que encontram-se em poucas cópias nas células.

Atualmente, o método mais utilizado para a identificação de proteínas é a espectrometria de massas (MS), que por si só tem-se estabelecido como uma tecnologia indispensável para a interpretação das informações contidas nos genomas. Os espectrômetros de massa são instrumentos analíticos constituídos de uma fonte de íons, um analisador de massa que determina a razão massa/carga (m/z) dos analitos ionizados, e um detector, que registra os valores das razões m/z (Figura 2). Desde a introdução da MS nos estudos de proteínas, a abordagem mais utilizada para a caracterização e a identificação dessas é a impressão digital de peptídeos (PMF – “Peptide Mass Fingerprint”) (GEVAERT e VANDEKERCKHOVE, 2000). Por esta metodologia as proteínas de interesse são separadas do gel desnaturante, submetidas à digestão enzimática, em geral utilizando tripsina, que cliva especificamente a porção C-terminal adjacente aos resíduos de arginina e lisina, gerando um conjunto de peptídeos únicos, responsável pela especificidade da identificação (SHEVCHENKO et al., 1996; CAGNEY et al., 2003).

A ionização por eletropulverização (“electrospray ionization”- ESI) (WHITEHOUSE et al., 1985) e a ionização por dessorção a laser auxiliada por matrix (“matrix-assisted laser desorption/ionization” - MALDI) (KARAS e HILLENKAMP, 1988) são as duas tecnologias de ionização mais utilizadas. A ESI ioniza analitos presentes em soluções e, por isso, é facilmente acoplado a ferramentas de separação, tais como os cromatógrafos. A MALDI ioniza e sublima os peptídeos de uma matriz cristalina através de pulsos de laser. Tanto a ESI como a MALDI são técnicas brandas de ionização, o que resulta na formação de íons com baixa energia, possibilitando a ionização tanto de moléculas de baixa como de alta massa molecular.

O analisador de massas é o ponto chave da tecnologia de MS, uma vez que é o responsável pela sensibilidade e resolução, gerando informações precisas a cerca das razões

m/z dos peptídeos analisados. A MALDI, acoplada a um ou mais analisadores de massa do tipo tempo de voo (“time of flight” - TOF) (Figura 2), é a mais adaptada para a análise em larga escala de proteínas separadas através de eletroforese bidimensional (CANTÚ et al., 2008).

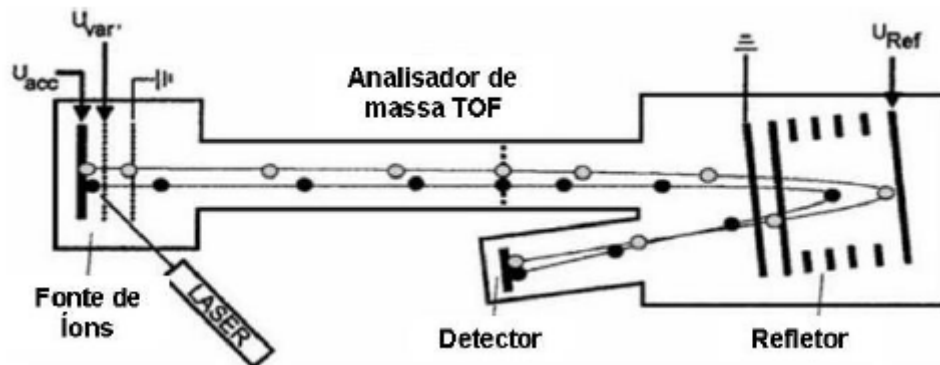


Figura 2 – Esquema representativo de um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF e seus componentes.

Em alguns casos, o PMF não é suficiente para a identificação da proteína, sendo necessária a utilização de analisadores sequenciais do tipo TOF-TOF, que podem resolver esse problema, pois é possível selecionar, isolar e sequenciar um dos peptídeos ionizados presente na mistura. Através dos picos de massa gerados em uma análise TOF, um valor de m/z é selecionado e levado para uma câmara de colisão, enquanto os outros são desviados do tubo de voo. Nessa câmara, ocorre a dissociação induzida por colisão, onde o íon é colidido com um gás inerte, causando, assim, a sua fragmentação, cujo espectro é denominado de MS/MS. A m/z do íon fragmentado (ou parental), gerada pelo primeiro analisador, é considerada na identificação bem como os valores de m/z dos fragmentos gerados pelo segundo analisador (CANTÚ et al., 2008).

O perfil de massas dos peptídeos obtido (Figura 3 A) é comparado com “fingerprints” virtuais obtidos por clivagens teóricas de proteínas depositadas em bancos de dados com o auxílio de “softwares”, tais como o ProFound, MSFit, Sequest e Mascot. Tanto o Sequest como o Mascot correlacionam espectros de massas de fragmentação de peptídeos com sequências de aminoácidos de proteínas registradas em bancos de dados (CHAMRAD et al., 2004). Além disso, esses “softwares” também têm a capacidade de usar sequências de nucleotídeos para fazer tal correlação. Para isso, primeiramente são simuladas as sequências

potenciais das proteínas correspondentes àquelas sequências de nucleotídeos encontradas nos bancos de genes, utilizando-se o código genético universal. Posteriormente, é simulada a fragmentação destas sequências. De forma geral, estes programas têm como objetivo encontrar a sequência de aminoácidos, em um determinado banco de dados, que melhor descreva os fragmentos encontrados em um espectro. As sequências “candidatas” são pesquisadas nos bancos de dados de acordo com a massa do peptídeo intacto e com o espectro de fragmentação obtido para cada proteína (CANTÚ et al., 2008).

A pesquisa no Mascot envolve o cálculo de fragmentos teoricamente preditos para todos os peptídeos de um banco de dados de acordo com a massa do íon precursor, previamente determinada. A probabilidade de o valor de m/z de um fragmento teoricamente obtido coincidir, de maneira randômica, com o valor de m/z de um fragmento obtido experimentalmente é calculada e expressa como sendo o negativo do logaritmo desse número “score”. Assim, quanto maior for o valor obtido, menor é a probabilidade de que esse resultado seja fruto de uma coincidência. Esse “software” fornece, para cada busca submetida, um valor limite, a partir do qual o valor obtido indica que a determinação possui probabilidade inferior a 5% de ser um evento randômico (PERKINS et al., 1999) (Figura 3 C).

A partir da identificação de um “spot”, podem ser aplicadas várias outras ferramentas de bioinformática que permitem prever características diversas da proteína, como domínios, localização celular, predição de peptídeos sinais, interação com outras proteínas, propriedades físico-químicas, dentre outros, de modo que as proteínas diferencialmente expressas passam a ser estudadas quanto às suas funções nas células, permitindo assim uma visão geral das respostas dos organismos frente às diferentes condições ambientais e experimentais a que eles são expostos.

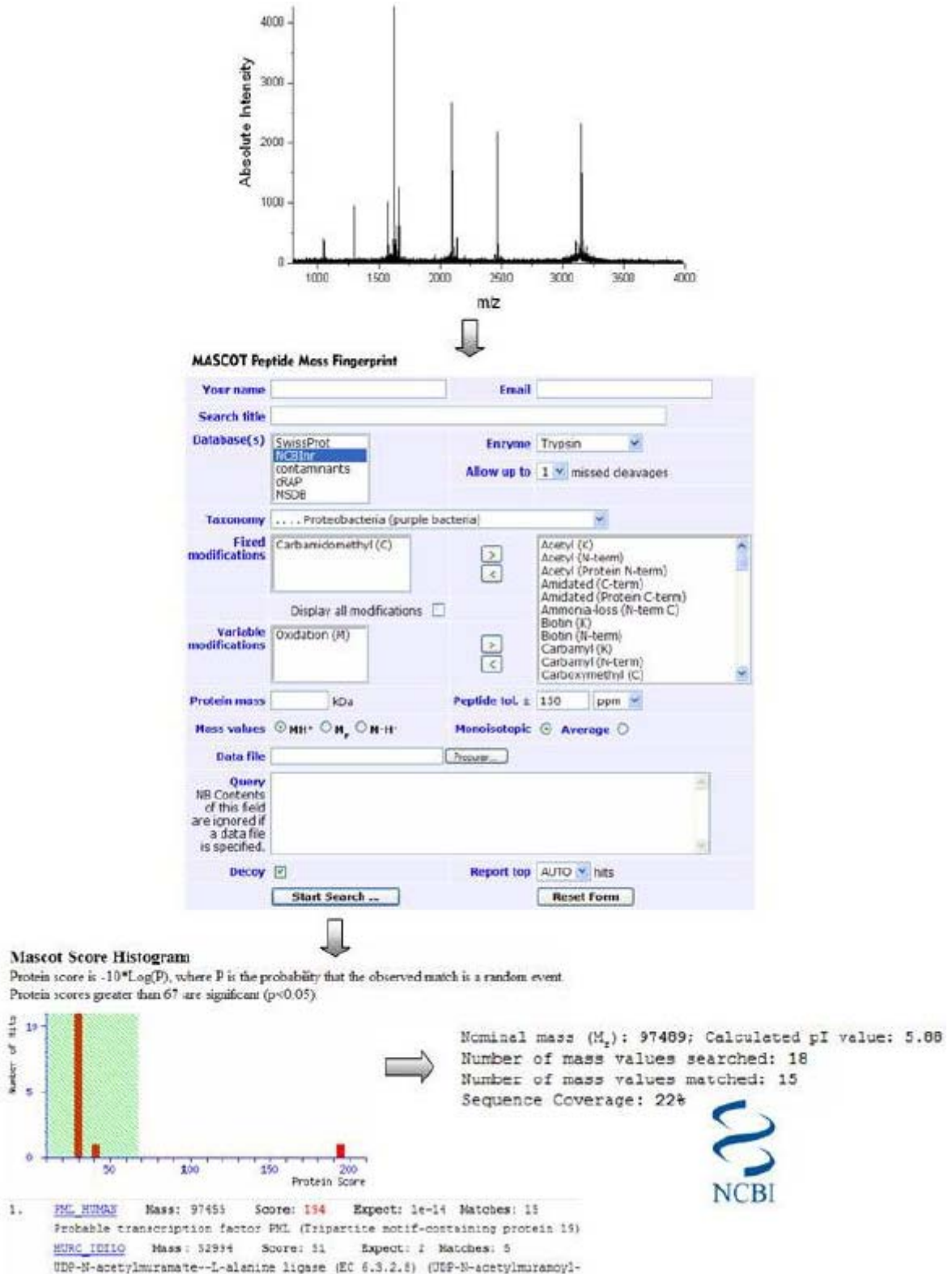


Figura 3 – Fluxograma das etapas para a identificação *in silico* de proteínas; A: Espectro de massas; B: Submissão dos dados de MS pelo programa MASCOT; C: Interface gerada pela busca no banco de dados; D: Informações da proteína identificada e dados da anotação desta no NCBI.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar o perfil de proteínas expressas *in vitro* por *Rhizobium tropici* estirpe PRF 81.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o protocolo para extração eficiente do conteúdo proteico total (proteínas citoplasmáticas e periplasmáticas) de *R. tropici*, de modo a obter perfis bidimensionais reprodutíveis e com resolução elevada.
- Estudar as respostas induzidas, *in vitro*, pelo estresse de temperatura elevada na estirpe PRF 81 através da análise proteômica diferencial.

REFERÊNCIAS

- AMARGER, N., MACHERET, V., LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 996-1006, 1997.
- BERRY, J.O., ATHERLY A.G. Induced plasmid-genome rearrangements in *Rhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, v. 157, p. 218-224. 1984.
- BLACKSTOCK, W.P., WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends Biotechnology**, v. 17, p. 121-127, 1999.
- BRILL, W.J. Nitrogen fixation: basic to applied. **American Scientist**, v.67, p.458-466, 1979.
- BURNS, R.C., HARDY, R.W.F. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. **Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics**, v. 21, p. 186, 1975.
- CAETANO-ANOLLÉZ G., BAUER W.D. Feedback regulation of nodule formation in alfalfa. **Planta**, v. 57, p. 175 - 546, 1988.
- CAGNEY, G., AMIRI, S., PREMAWARADENA, T., LINDO, M., EMILI, A. In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. **Proteome Science**, v. 1, p. 1-15, 2003.
- CANTÚ M.D., EMANUEL C., WULFF N.A., PALMA M. S. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.
- CASH, F. Review: Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. **Analytical Chimica Acta**, v. 372, p. 121-145, 1998.
- CHACON, M.I., PICKERSGILL, B., DEBOUCK, D.G. Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and the Andean cultivated races. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p. 432-444, 2005.
- CHAMRAD, D.C., KORTING, G., STUHLER, K., MEYER, H.E., KLOSE, J., BLUGGEL, M. Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. **Proteomics**, v. 4, p. 619-628. 2004.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Feijão total (1º, 2º e 3º safra) – Brasil – Série histórica**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/9graos_10.11.pdf. Acesso em: set/2010.
- DAY, J. M., ROUGHLEY, R. J., EAGLESHAM, A. R. J., DYE, M., WHITE, S.P. Effect of high soil temperature on nodulation of cowpea *Vigna unguiculata*. **Annals of Applied Biology** v. 88, p. 476-481, 1978.
- DELWICHE, C.C. The nitrogen cycle. **Scientific American**, v.223, p.136-147, 1970.
- DJORDJEVIC, M.A., ZURKOWSKI, W., SHINE, J., ROLFE, B.G.. Sym plasmid transfer to various symbiotic mutants of *Rhizobium trifolii*, *R. leguminosarum*, and *R. meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 156, p. 1035-1045, 1983.

- DUDEJA, S.S., KHURANA, A.L. Persistence of *Bradyrhizobium* sp. (Cajanus) in a sandy loam soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, p. 709-713, 1989.
- EARDLY, B.D., HANNAWAY, D.B., BOTTOMLEY, P.J. Characterization of rhizobia from ineffective alfalfa nodules: ability to nodulate bean plants [*Phaseolus vulgaris* (L.)]. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 1422-1427, 1985.
- EARDLY, B.D., WANG, F.S., WHITTAM, T.S., SELANDER, R.K. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 507-512, 1995.
- EDMAN, P. A method for the determination of the amino acid sequence of peptides. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 22, p. 475-483, 1949.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de pesquisa de arroz e feijão). **A cultura do feijoeiro**. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br>>. Acesso em: janeiro/2005.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Agência de informação – feijão**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnpia.embrapa.br/Agencia4/AG01/Abertura.html>>. Acesso em: abril/2006.
- FLORES, M., GONZÁLEZ, V., PARDO, M.A., LEIJA, A., MARTINEZ, E., ROMERO, D., PINERO, D., D'ÁVILA, G., PALACIOS, R. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 1191-1196, 1988.
- FRED, E.B., BALDWIN, I.L., McCOY, E. **Root nodule bacteria of leguminous plants**. Wisconsin: The University of Wisconsin Press, p. 343, 1932.
- GEPTS, P., DEBOUCK, D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). (In: VAN SCHOONHOVEN, A.; VOYSEST, O., eds.). **Common beans: research for crop improvement**. p.7-53. 1991.
- GEVAERT, K.,VANDEKERCKHOVE, J. Protein identification methods in proteomics. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1145-1154, 2000.
- GEURTS R., FEDOROVA E., BISSELING T. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 346-352, 2005.
- GITONGA, N.M., WIDDWSON, D., KEYA, S.O. Interactions of *Phaseolus vulgaris* with thermotolerant isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli from Kenyan soils. **MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 5, p. 493-504, 1989.
- GÖRG, A., POSTEL, W., GÜNTHER, S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 9, p. 531-546, 1988.
- GÖRG A., POSTEL W., FRIEDRICH C., KUICK R., STRAHLER J. R., HANASH S. M. Temperature-dependent spot positional variability in two-dimensional polypeptide patterns. **Electrophoresis**, v. 12, p. 653-658, 1991.

- GÖRG A., WEISS W., DUNN M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-85, 2004.
- GRAHAM, P.H., VANCE, C.P. Legumes: Importance and constraints to greater utilization. **Plant Physiology**, v.131, p. 872-877, 2003.
- GRAVES, P.R., HAYSTEAD, T.A.J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 39-63, 2002.
- HERBERT B.R., MOLLOY M.P., GOOLEY A.A., WALSH B.J., BRYSON W.G., WILLIAMS K.L. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. **Electrophoresis**. v. 19, p. 845-51, 1998.
- HERBERT, B.R., LARRY, J.L., PACKER, N.H., GOOLEY, A.A., PEDERSON, S.K. What place for polyacrilamide in proteomics? **Trends in Biotechninology**, v. 19, 2001.
- HERNANDEZ-ARMENTA, R., WIEN, H.C., EAGLES, A.R.J. Maximum temperature for nitrogen fixation in common bean. **Crop Science**, v. 29, p. 1260-1265, 1989.
- HERNANDEZ-LUCAS, I., SEGOVIA, L., MARTÍNEZ-ROMERO, E., PUEPPKE, S.G., Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulates *Phaseolus vulgaris* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p. 2775-2779, 1995.
- HUNGRIA, M., FRANCO, A.A. New source of high temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris*. **Plant and Soil**, v. 149, p. 103-109, 1993.
- HUNGRIA, M., VARGAS, M.A.T., SUHET, A.R., PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. (In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M., eds.) **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p.9-89, 1994.
- HUNGRIA, M., VARGAS, M.A.T., ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro: (In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M., eds.) **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p. 189-294, 1997.
- HUNGRIA, M., ANDRADE, D.S., CHUEIRE, L.M.O., PROBANZA, A., GUTTIERREZ-MAÑERO, F.J., MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.32, p.1515-1528, 2000.
- HUNGRIA, M., CAMPO, R. J., MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, (Embrapa Soja. Circular Técnica 35/ Embrapa Cerrados. Circular Técnica 13) 48 p, 2001.
- JORDAN, D.C. Rhizobiaceae Conn 1938. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore-London: Williams & Wilkins Co., v. 1, p. 235-244, 1984.
- JUNGBLUT, P.R., Proteome analysis of bacterial pathogens. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 831-840, 2001.
- KARAS, M.L., HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, p.2299-2301, 1988.

- KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. **Human Genetic**, v.26, p. 231-243, 1975.
- LANGE, R.T. Nodule bacteria associated with the indigenous Leguminosae of south-western Australia. **Journal of General Microbiology**, v. 26, p. 351-359, 1961.
- LODWIG E.M., HOSIE A.H.F., BORDES A., FINDLAY K., ALLAWAY D., KARUNAKARAN R. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume - *Rhizobium* symbiosis. **Nature**, v. 6, p. 422-722, 2003.
- LOK, E.H., O'HARA, G., DELL, B. Nodulation of the legume *Pterocarpus indicus* by diverse strains of rhizobia. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 18, p.188-194, 2006.
- LOPEZ, M.F. Proteome analysis I. Gene products are where the biological action is. **Journal of Chromatography B**, v.722, p.191-202, 1999.
- LÓPEZ-LÓPEZ, A., ROGEL, M.A., ORMEÑO-ORRILLO, E., MARTÍNEZ-ROMERO, J., MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 322-327, 2010.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E., SEGOVIA, E., MERCANTE, F. M., FRANCO, A. A., GRAHAM, P. H., PARDO, M. A., *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 417-426, 1991.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil**, v.252, p.11-23, 2003.
- MERCANTE, F.M. **Uso de *Leucaena leucocephala* na obtenção de *Rhizobium* tolerante à temperatura elevada para inoculação do feijoeiro.** Itaguaí - Rio de Janeiro, UFRJ, Inst. de Agronomia, 126p. (Dissertação, Mestrado em Ciência do Solo). 1993.
- MICHIELS, J., VERRETH, C., VANDERLEYDEN, J. Effects of Temperature Stress on Bean-Nodulating *Rhizobium* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1206-1212, 1994.
- MICHIELS, J., DOMBRECHT, B., VERMEIREN, N., XI, C., LUYTEN, E., VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v.26, p.193-205, 1998.
- NEWTON, W.E. Nitrogen fixation in perspective. (In: PEDROSA, F.O., HUNGRIA, M., YATES, M.G., NEWTON, W.E., eds.) **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity.** Dordrecht: Kluwer, p.3-8, 2000.
- O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.
- PANDEY, A., MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.

PERKINS, D.N., PAPPIN, D.J., CREASY, D.M., COTTRELL, J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, p. 3551-3567, 1999.

POSTGATE, J.R., HILL, S. Nitrogen fixation. (In: LYNCH, J.M.; POOLE, N.J., eds.) **Microbial ecology, a conceptual approach**. Oxford: Blackwell, p.191-213, 1979.

POSTGATE, J.R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge University Press, p. 252, 1982.

RABILLOUD, T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, p. 758-760, 1998.

RAMÍREZ-BAHENA, M.H., GARCÍA-FRAILE, P., PEIX, A., VALVERDE, A., RIVAS, R., IGUAL, J.M., MATEOS, P.F., MARTÍNEZ-MOLINA, E., VELÁZQUEZ, E. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 58, p. 2484-2490, 2008.

REDMOND J. W., BATLEY M., DJORDJEVIC M. A., INNES R. W., KUEMPEL P. L., ROLFE B. G. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. **Nature**, v. 5, p. 323-632, 1986.

RIELY B. K., ANE J. M., PENMETSA R. V., COOK D. R. Genetic and genomic analysis in model legumes bring Nod-factor signaling to center stage. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 408–13, 2004.

RUBIO L.M., LUDDEN P.W. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 93-111, 2008.

SÁ, N.M.H., SCOTTI, M.R.M.L., PAIVA, E., FRANCO, A.A., DOBEREINER, J., Selection and characterization of *Rhizobium* sp. strains stable and efficient in the fixation of nitrogen in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista de Microbiologia**, v. 24, p. 38-48, 1993.

SCHEELE, G.A., PALADE, G.E. Studies on the guinea pig pancreas. Parallel discharge of exocrine enzyme activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250. p. 2660-2670, 1975.

SEGOVIA, L., YOUNG, J.P.W., MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 374-377, 1993.

SHEVCHENKO, A., JENSEN, O.N., PODTELEJNIKOV, A.V., SAGLIOCCO, F., WILM, M., VORM, O., MORTENSEN, P., SHEVCHENKO, A., BOUCHERIE, H., MANN, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Largescale identification of yeast proteins from two dimensional gels. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 93, p. 14440-14445, 1996.

VALVERDE, A., IGUAL, J. M., PEIX, A., CERVANTES, E., VELÁZQUEZ, E. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2631-2637, 2006.

- VAN BERKUM, P., BEYENE, D., BAO, G., CAMPBELL, T. A., EARDLY, B.D. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 13-22, 1998.
- VANCE, C.P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant Physiology**, v. 127, p. 390–397 2001.
- VELAZQUEZ, Y.A., KLUSON, R.A., SCRÖDER, E.C. *Rhizobium* inoculation of *Phaseolus vulgaris* in Lajas, Porto Rico. **Journal of Agriculture of the University of Porto Rico**, v. 19, p. 427-436, 1988.
- WESTERMEIER, R., NAVEN, T. Part III: Course Manual, Step 9: In-gel digestion. (In: WESTERMEIER, R; NAVEN, T. Ed.) **Proteomics in practice. A laboratory Manual of Proteome Analysis**. Wiley-VCH, p. 261, 2004.
- WHITEHOUSE C.M., DREYER, R.N., YAMASHITA, M., FENN, T.B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. **Analytical Chemistry**, v. 57, p.675-679, 1985.
- ZURKOWSKI, W. Molecular mechanism for loss of nodulation properties of *Rhizobium trifolii*. **Journal of Bacteriology**, v. 150, p. 999-1007. 1982.

ARTIGO

Submetido à Molecular & Cellular Proteomics

**PROTEOMIC PROFILING OF *RHIZOBIUM TROPICI* PRF 81: IDENTIFICATION
OF CONSERVED AND SPECIFIC RESPONSES TO HEAT STRESS**

**Douglas Fabiano Gomes, Jesiane Stefania Silva Batista, Aline Luiza Schiavon, Diva de
Souza Andrade, Mariangela Hungria**

E-mails: douglasfgomes@yahoo.com.br; micro_jesi@yahoo.com.br;
aline.schiavon@yahoo.com.br; diva@iapar.br; hungria@cnpso.embrapa.br

PROTEOMIC PROFILING OF *RHIZOBIUM TROPICI* PRF 81: IDENTIFICATION OF CONSERVED AND SPECIFIC RESPONSES TO HEAT STRESS

**Douglas Fabiano Gomes^{1,2}, Jesiane Stefania Silva Batista^{1,3}, Aline Luiza Schiavon^{1,3},
Diva de Souza Andrade⁴, Mariangela Hungria^{1,2}**

List of abbreviations

N, Nitrogen; 2DE, Bidimensional electrophoresis; MALDI, Matrix assisted laser desorption ionization ; TOF, Time of flight, COG, Clusters of Orthologous Groups; BNF, Biological nitrogen fixation; TY, Tryptone-yeast extract medium; HCCA, α -cyano- 4-hydroxy-cinnamic acid; PMF, Peptide mass fingerprint; MS, Mass spectrometry; EPS, Exopolysaccharides; IPG, Immobilized pH gradient; ROS, Reactive oxygen species; Bfr, Bacterioferritin; Bcp, Bacterioferritin comigratory protein.

Summary

Rhizobium tropici strain PRF 81 (= SEMIA 4080) has been used in commercial inoculants for application to common-bean crops in Brazil since 1998, due to its high efficiency in fixing nitrogen, competitiveness against indigenous rhizobial populations and capacity to adapt to stressful tropical conditions, representing a key alternative to application of N-fertilizers. The objective of our study was to obtain an overview of adaptive responses to heat stress of PRF 81, by analyzing differentially expressed proteins when the bacterium is grown at 28°C and 35°C. Two-dimensional gel electrophoresis (2DE) revealed up-regulation of fifty-nine spots that were identified by MALDI-TOF/TOF-TOF. Differentially expressed proteins were associated with metabolism, cellular processes and signaling, information storage and processing functional COG categories. Among the up-regulated proteins, we found some related to conserved heat responses, such as molecular chaperones DnaK and GroEL, and other related proteins, such as translation factors EF-Tu, Ef-G and IF2. Interestingly, several oxidative stress-responsive proteins were also up-regulated, and these results reveal the diversity of adaptation mechanisms presented by this thermotolerant strain and suggest a cross-talk between heat and oxidative stresses.

Keywords: Biological nitrogen fixation. NtrX. ChvI. DnaK. GroEL. Oxidative stress. Translation factors.

¹Embrapa Soja, Caixa Postal 231, 86001-970 Londrina, PR, Brazil;

²Universidade Estadual de Londrina, Dept. of Biotechnology, Caixa Postal 6001, 86055-990, Londrina, PR, Brazil; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-MCT), Brasília, Brazil;

³ Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL), Av. Juscelino Kubitschek 1626, 86.020-000, Londrina, PR, Brazil;

⁴ Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), Cx Postal 481, CEP 86001-970, Londrina.

Introduction

In most agricultural soils, nitrogen (N) is the main limiting nutrient and, accordingly, it is often supplied to crops as chemical fertilizers. Significant losses of N-fertilizers occur either by leaching—resulting in eutrophication of rivers, lakes, aquifers or by denitrification—contributing to global warming (1). However, estimates indicate that up to 60% of the N needs of legume crops may be obtained from the biological nitrogen fixation (BNF) process (2,3), with significant economic benefits to farmers while mitigating environmental impacts.

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important food legume in South and Central America and in East Africa. It can establish symbiotic relationships with a variety of described and still-to-be-described rhizobial species (4). An important limitation to the BNF process involving common bean is the high genetic instability of the symbiotic plasmid of the rhizobial strains, as reported for *Rhizobium phaseoli* and *R. etli*. This instability has been attributed to genomic rearrangements, plasmid deletions and mutations, which are intensified under stressful conditions (5,6). Abiotic stresses such as high soil temperatures, in addition to water deficit, salinity and soil acidity comprise the main factors causing genetic instability (7,8).

Among common-bean rhizobia, *R. tropici* is recognized for tolerance of environmental stresses, including high temperatures (7,8,9). Within this species, strain PRF 81 (=4080) is known for high capacity in fixing N₂, competitiveness against other rhizobia, and tolerance of environmental stresses; it has been used in commercial inoculants in Brazil since 1998 (10,11).

Mechanisms of response to stresses are usually highly conserved among bacterial species, and designed for rapid adaptation to environmental and metabolic changes. These conserved responses comprise the expression of molecular chaperones, such as DnaK (and its assistants DnaJ and GrpE), GroEL (and its assistant GroES), and also of small heat-shock proteins (12). All are polypeptide-binding proteins implicated in protein folding, protein targeting to membranes, renaturation, and in the control of protein-protein interactions. In addition to conserved responses, some bacterial species also possess specific metabolic adaptations to stressful conditions.

Recently, a draft genome of *R. tropici* strain PRF 81 revealed several probable genes that may be related to its outstanding symbiotic and saprophytic abilities and also its adaptability to environmental stresses (13); elucidation of the whole genome of the

strain is now in progress (<http://www.bnf.lncc.br>). However, elucidating biological implications of a given genome require understanding of gene expression, therefore proteomic studies, complementary to the structural genome, are critical.

Despite the ecological, evolutionary and economic importance of *R. tropici*, no proteomic studies have been reported. In addition, the intriguing tolerance to high temperature of *R. tropici* strains is far from being understood. In this context, our objective with this study was to report the first proteomic study of *R. tropici*, focusing on the determination of adaptive responses to heat stress.

Material and Methods

Bacterial strain and growth conditions

Rhizobium tropici PRF 81 (=SEMIA 4080), isolated from a Brazilian soil in the state of Paraná, shows high capacity for fixing N₂, competitiveness against other rhizobia and high tolerance to environmental stresses; it has been used in commercial inoculants in Brazil since 1998 (10). More information about the strain, including genetic characterization, is given elsewhere (10, 13,14). The strain is deposited at the “Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria Culture Collectio” at Embrapa Soja (<http://www.bmrc.lncc.br>).

The strain was pre-cultured in 10-mL aliquots of tryptone-yeast extract medium (TY), at 80 rpm and 28°C, in the dark. The pre-cultures were then transferred to Erlenmeyer flasks containing TY medium and bacteria were grown under two treatment conditions: control (28°C) and with heat stress (35°C). Cells were incubated until the exponential phase of growth was reached (optical density of 0.6 at 600 nm), with low agitation (80 rpm) to minimize the production of extra-cellular polysaccharides, which can interfere in 2-D gel electrophoresis.

Total protein extraction

Cultures were centrifuged at 5,000×g, at 4°C and cells were carefully washed with a solution containing 3 mM KCl; 1.5 mM KH₂PO₄; 68 mM NaCl; and 9 mM NaH₂PO₄. Washed cells were resuspended in 600 μL of a buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1.5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0.5 mM DTT; and 0.5 mM PMSF. Aliquots of 150 μL were stored in ultrafreezer (−80°C) until the analyses.

For whole-cell protein extraction, aliquots were resuspended in lysis buffer containing 9.5 M urea; 2% CHAPS; 0.8% v/v Pharmalyte 4-7; and 1% DTT, and submitted to forty cycles of freezing in liquid N₂ and thawing at 37°C, as described by (15). The lysates were separated from particulate material by centrifugation at 14,000×g for 90 min, at 4°C. Total-protein was purified with phenol and the concentration was determined by Bradford's method (16).

2-D electrophoresis and visualization

For IEF, lysates were dissolved with DeStreak buffer (GE Healthcare) to a final concentration of 300 µg of protein and 2% v/v IPGphor in 250 µL of solution. IPG-strips (pH 4–7, 13 cm, GE Healthcare) were rehydrated with the protein solution and covered with cover fluid (GE Healthcare). Loaded strips were submitted to focalization in an Ettan IPGphor IEF system (GE Healthcare) for 1 h at 200 V, 1 h at 500 V, a gradient step to 1,000 V for 1 h, a gradient step to 8,000 V for 2 h 30 min, and fixed at 8,000 V for 1 h 30 min. The final Vh was fixed at 24,800. After focusing, strips were equilibrated first for 20 min in 5 mL of TE buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.8; 6 M urea; 30% v/v glycerol; 2% w/v SDS; and 0.2% v/v of a 1% solution of bromophenol blue) supplemented with 50 mg DTT and then in TE buffer with 175 mg iodoacetamine, also for 20 min.

2-D electrophoresis was performed on a 12% polyacrylamide gel in a Ruby SE 600 vertical electrophoresis system (GE Healthcare). The run was carried out for 30 min at 15 mA/gel and 240 min at 30 mA/gel, using the Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (Amersham Biosciences) to provide standards. For each strain, the extraction and gel electrophoresis were run in triplicate. Gels were fixed overnight with an ethanol-acetic acid solution before being stained with Coomassie Blue PhastGel™ R-350 (GE Healthcare) and scanned (ImageScanner LabScan v5.0).

Gel image analysis and spot selection

Spots were identified in the high-resolution digitized gel images and analyzed by Image Master 2D Platinum v 5.0 software (GE Healthcare), according to relative volume (%vol). Detection was carried out automatically and spot selection was performed manually. After background subtraction and spot-volume normalization, protein differential expression was confirmed statistically upon Student's t-test ($p < 0.05$).

Sample preparation and MALDI-TOF mass spectrometry

Protein spots showing significant changes in mean normalized volume were excised and processed as described by (17). Digestion was achieved with trypsin (Gold Mass Spectrometry Grade, Promega, Madison, WI) at 37°C overnight.

Tryptic peptides (1 μ L) were mixed with saturated solution of α -cyano- 4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA) in 50% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). The mixture was spotted onto a MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) sample plate and allowed to crystallize at room temperature. The same procedure was used for the standard peptide calibration mix (Bruker Daltonics). For mass spectra acquisition, a MALDI-TOF-MS (MALDI-time-of-flight in tandem) Autoflex Spectrometer (Bruker Daltonics) was operated in the reflector for MALDI-TOF peptide mass fingerprint (PMF) and in the “LIFT” mode for MALDI-TOF/TOF in the fully manual mode, using FlexControl software.

In silico protein identification

PMFs and MS/MS ion spectra generated were searched against the public database NCBI nr (National Center for Biotechnology Information non-redundant), using Mascot software (Matrix Science). For protein searches, performed in the Proteobacteria taxonomic group, monoisotopic masses were used, considering a peptide tolerance of 150 ppm and allowance of one missed cleavage. When MS/MS was carried out, a tolerance of 0.3 Da was acceptable. Carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine were considered fixed and variable modifications, respectively.

Identifications were validated only when the Mowse (molecular weight search) score was significant, above the recommended cutoff of 52 for PMFs. Searches on the Decoy database (Mascot) were done and both decoy score and false discovery rates were considered for the identification. The spectrometry datasets are available at PRIDE (<http://ebi.ac.uk/pride/>) with the experiment accession number 14817.

Protein characterization

A set of bioinformatics tools was used for improved characterization of identified proteins. The proteins were fitted into COG (Clusters of Orthologous Groups) categories according to their functional inference, using the COGnitor program

(<http://www.ncbi.nih.gov/COG>) (18). Software packages PSORT-B (19) and PSLpred (20) were used for prediction of subcellular localization.

Results and Discussion

2-D electrophoresis and differential spots selection

Several compounds, such as salts, nucleic acids and polysaccharides, may interfere with electrophoretic separation, resulting in streaky 2-D patterns, and thus should be removed. *R. tropici* PRF 81 produces high amounts of exopolysaccharides (EPS) *in vitro* and interference with electrophoretic resolution was overcome with a final wash step of the whole protein extract with phenol. In addition, to improve separation resolution, we employed IPG strips with a pH range of 4.0 to 7.0 in the first-dimension electrophoresis, to achieve better protein resolution than with broader-range (pH 3.0 to 10.0) strips (data not shown), in which the proteins remained concentrated in the central part of the gel (pH 5.0 to 7.0).

Using the computer-assisted gel-image analysis software, the majority of the molecular masses associated with the spots ranged between 14 and 97 kDa (Figure 1). The volume of each spot was normalized as a percent of the total volume of all detected spots in the gel. This procedure was followed for all gels and the values generated for each spot were compared between the control (28°C) and the experimental (35°C) treatment, and only well-defined spots present in the three replicates and showing statistically significant differences ($p < 0.05$) were selected. A significant difference in several relative spot volumes indicated that the elevated temperature led to changes in the proteome of *R. tropici* PRF 81.

General proteome response to heat stress

In comparison to other common-bean rhizobial species, *R. tropici* is known for its genetic stability and adaptation to stressful conditions (8,9), and, although PRF 81 is an outstanding strain in terms of these properties (10,11,14), little is known of the molecular determinants of its heat tolerance. In order to obtain an overview of the heat responses, we analyzed the cytoplasmic and periplasmic contents and identified the whole-cell protein expression changes when the cells were grown at 35°C. Fifty-nine significantly induced proteins were identified by mass spectrometry, distributed across fifteen COG functional

categories; six fit into the category of general prediction (R), one was classified in the category of unknown function (S) and only one was assigned as “not in COG” (Table 1).

Among the differentially expressed proteins, twenty-five were related to metabolic functions, the majority of them associated with amino acid transport and metabolism (group E) (Table 1), corroborating the proteomic reference map of *Bradyrhizobium japonicum* strain CPAC 15, a microsymbiont of soybean (21), and indicating high metabolic activity even under stressful conditions. Also within this category, it is worth mentioning that NocP, an opine permease ATP-binding protein, was differentially expressed under high temperature. Opine is a compound released by crown-gall tumors produced by *Agrobacterium* (= *Rhizobium*) (22), and genes related to its metabolism were detected in the draft genome of PRF 81 and now confirmed at the translational level in our study.

In relation to cellular processes and signaling, thirteen proteins were identified, in categories D, T, O, M and N (Table 1). Two of these proteins are known to be correlated with heat tolerance, DnaK and GroEL molecular chaperones (12,23). Two proteins also found in this group were thioredoxin and bacterioferritin comigratory proteins (Bcp), which have been characterized as oxidative-stress responsive.

Still considering the COG classification, thirteen induced proteins comprised a set related to information storage and processing (Table 1), including transcription regulators and translation factors. The translation factors can act as chaperones in response to heat stress, and more details of this function are discussed below. Interesting was also the differential expression of VirD4, a TraG-like protein that plays an important role in conjugative transfer showing high similarity to *Agrobacterium*, also reported in the draft genome of strain PRF 81 (14).

Differential expression of the two-component response regulators (NtrX and ChvI)

Two-component systems are composed by a sensor kinase protein that transmits the environmental stimulus to a response regulator protein via phosphorylation. The phosphorylated regulator modulates the expression of the target genes required for the appropriate changes, mediating rapid metabolic responses for adaptation to new conditions (24). Interestingly, these two up-regulated proteins in our study (NtrX and ChvL) are the response-regulator components.

NtrX has also been found to be expressed in *Gluconacetobacter diazotrophicus* (25), *Sinorhizobium* (= *Ensifer*) *meliloti* (26), and *Mesorhizobium loti* (27).

This protein is recognized to be involved in N metabolism and symbiotic fixation, probably acting as a transcriptional activator of genes related to nitrate metabolism (28, 29).

The second, ChvI, characterized in several bacteria such as *Sinorhizobium meliloti* (30) and *Agrobacterium tumefaciens* (31), acts in translation regulation of enzymes related to the biosynthesis of the succinoglycan exopolysaccharide (EPSI). In addition to this role, this two-component system signaling is critical for the viability of free-living *S. meliloti* strains (32), by acting in biofilm formation, motility, nutrient utilization and cell protection (33,34,35). It has been reported that the succinoglycan may form a diffusion barrier, protecting against oxidative stress (36), suggesting that, in *R. tropici* PRF81, in addition to participating in symbiosis signaling, the succinoglycan EPSI plays an important role in heat-stress protection.

Induced molecular chaperones DnaK and GroEL

Temperature is especially harmful to cells because it can damage the structure of macromolecules. Many of the molecular chaperons—such as DnaK and GroEL—are highly conserved in evolution (37), preventing and repairing harmful effects. As reported in other proteomic studies (38,39,40), DnaK and GroEL were significantly induced in PRF 81 at high temperature.

DnaK is classified according its molecular weight in the Hsp70 chaperone group, the most versatile chaperone system. In addition to a main role in *de novo* folding, DnaK has various other functions, including protein transport (41) and in the increased stability of RNA polymerase σ^{32} factor (RpoH), an important component of the heat-shock response in several organisms (42,43,44). At optimal temperature, σ^{32} factor is rapidly degraded, but if temperature is raised, σ^{32} stability increases due to its interaction with DnaK chaperone (45). Therefore, in response to a sudden increase in temperature, the levels of σ^{32} in the cell rise, leading to the regulation of transcription of genes encoding other heat-shock proteins, which also contribute to heat tolerance. (46).

As described for *Escherichia coli* (47), *Bacillus cereus* (48) and *Acinetobacter baumannii* (49), in *R. tropici* PRF 81 the molecular chaperone GroEL was up-regulated under high temperature. The differential expression of GroEL is critical to thermotolerance, since the chaperone can routinely rescue more than 80% of a denatured protein population (50). Essentially, GroEL modulates its affinity for folding intermediates

through the binding and hydrolysis of ATP, and the highly coordinated binding and releasing of substrate proteins may lead to recovery of the functional state of the proteins (51).

Induction of chaperone-like proteins: Translation factors

Besides the main function of ensuring gene expression accuracy by transporting the correct codons in the translation process, elongation and initiation factors can also act as chaperones in response to heat stress (52,53). In our study, three elongation factors (EF-Tu, Ef-G and Ef-Ts) and one initiation factor (IF-2) were up-regulated when *R. tropici* PRF 81 was grown at 35°C (Table 1), indicating the probable involvement of these factors in protein folding and protection, contributing to the thermotolerance of PRF 81.

EF-Tu is highly homologous to cellular GTP-proteins, occupying a key position in translation (54). EF-Tu interacts with GTP, aminoacyl-tRNA, ribosomes, and a second factor, EF-Ts, which mediates GDP/GTP exchange on EF-Tu. In addition, (55) observed that EF-Tu protein may also act as a molecular chaperone, protecting proteins against thermal damage. Studying heat responses, (56) reported that large quantities of EF-Tu molecules in cells might constitute a reservoir of chaperone-like molecules that prevent the aggregation of non-native proteins until permissive renaturation conditions are restored. The shift of the activities of transport aminoacyl-tRNA to the aminoacyl ribosome site and as chaperone of EF-Tu is dependent on the binding of this factor with GTP or GDP.

Considering the efficiency of chaperone activity, (52) showed that the elongation factor EF-Tu when bonded with GDP had greater capacity of stimulating renaturation of enzymes than when interacting with GTP. In contrast, (57) found that EF-Tu bonded with GDP is less active than when it is bonded with GTP in catalyzing protein renaturation. Still, in that study, the authors reported that the EF-Ts elongation factor plays a similar role as GTP, suggesting that in the presence of these cofactors—EF-Ts or GTP—EF-Tu can perform several rounds of protein renaturation. These divergent studies indicate that the EF-Tu chaperonin activity is dependent on the specific protein in which the protection will be promoted. Interestingly, in our study, both elongation factors—EF-Tu and EF-Ts—were up-regulated under heat stress, corroborating previous results reported by (57).

Both the elongation factor EF-G and the initiation factor EF2 were also found to act as chaperone proteins (53). These factors are involved in the translocation of ribosomes on mRNA and in the binding of initiator tRNA to the 30 S ribosomal subunit, respectively (58). EF-G bound to GDP, instead of to GTP, seems to be more active in the

formation of stable complexes with unfolded proteins, assisting in protein folding and renaturation (47). Finally, the chaperone properties of EF-Tu, EF-G, and IF2 suggest that translation factors are ancestral protein-folding factors that appeared before chaperones and protein-disulfide isomerases (53).

Cross-talk between heat and oxidative stress

Some proteins are well known for their roles in cell protection during exposure to stressful conditions. In a previous study, (59) showed the participation of thioredoxin in the reactivation of proteins damaged by oxidative stress or other conditions that cause the generation of reactive oxygen species (ROS). Prokaryotes contain several systems capable of direct repair of some covalent modifications of proteins, and one of the most frequent modifications caused by oxidative stress is the oxidation of free sulfhydryl groups (-SH), forming disulfide bonds (S-S). In this case, thioredoxin transfers reducing power to damaged proteins, restoring their reduced state (60). Finally, thioredoxin was synthesized under high-temperature conditions, confirming its induction as a response to stress in general (61); it is induced also in the early stages of symbiotic interaction in *B. japonicum* (62) and in *G. diazotrophicus* (63).

Both bacterioferritin (Bfr), a protein related to inorganic ion transport, and bacterioferritin comigratory protein (Bcp), a peroxiredoxin protein, were up-regulated in our study. These proteins have been related to oxidative stress responses, similarly to thioredoxin. The former, Bfr, acts indirectly in defense mechanisms against oxidative damage effects inside the cell, since it transports inorganic ions, for example Fe²⁺, resulting in the decomposition of the peroxides over-produced during the oxidative stress (59). The latter, Bcp, has a protective role in the defensive response to oxidative stress, possibly via up-regulation of total and reduced glutathione levels (64).

Interestingly, when (65) studied oxidative stress responses from a proteomic perspective, they observed the induction of several heat-responsive proteins, such as GroEL and GroES, as a reflection of regulation of heat-shock protein biosynthesis during bacterial oxidative stress. We also found up-regulation of several proteins responsive to oxidative stress, such as isocitrate dehydrogenase, which plays a key role in NADPH recycling under oxidative stress (66,67), also the flavoprotein WrbA, a quinone oxidoreductase with redox activity (68,69), among others. In total, these results suggest cross-talk between heat stress and oxidative stress.

Concluding Remarks

Although most of the proteins involved in responses to heat are highly conserved, the regulatory mechanisms vary among bacterial species. In our study, we have shown differential expression of some conserved heat-responsive proteins, such as DnaK and GroEL. However, we have also reported the up-regulation of proteins involved in a variety of metabolic pathways, including translation factors and oxidative stress-responsive proteins, indicating that the responses of *R. tropici* strain PRF 81 to heat stress go beyond the induction of heat-shock proteins.

Strain PRF 81 is known for its high efficiency in fixing nitrogen, and in our study two component response regulators (NtrX and ChvI) were induced during the heat stress. These proteins act in the regulation of the nitrogen-fixation-gene expression and in the regulation of the succinoglycan exopolysaccharide (EPSI) production, respectively, showing that, even under stress conditions, PRF 81 retains nitrogen-fixing and symbiosis-establishment potential, which are essential characteristics for agricultural inoculants.

Finally, this proteomic experiment provides valuable protein-expression information relevant to the ongoing genome sequencing of strain PRF 81 (<http://www.bnf.lncc.br>), and contributes to our still-poor knowledge of the molecular determinants of the thermotolerance exhibited by *R. tropici* species. It is a useful reminder that *R. tropici* is an important species of agronomic interest for its capacity to fix nitrogen under tropical stressful conditions, and also demonstrates high resemblance in many genes, and now also confirmed in many proteins, to those in pathogenic strains of the genus *Agrobacterium*.

Acknowledgments

The work was partially supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil)/MCT/MAPA (577933/2008) and CPNq-Universal (470162/2009). MALDI-TOF was acquired with resources from Fundação Araucária, in a common project coordinated by Dr. Fábio Pedrosa, at the Federal University of Paraná. D.F. Gomes acknowledges an MSc fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) and J.S.S. Batista (DTI), A.L. Schiavon (IC) and M. Hungria (PQ-1A) fellowships from CNPq. The authors thank Dr. Allan R. J. Eaglesham for suggestions on the manuscript.

References

- 1 Vance, C.P. (2001) Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition: plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol* 127, 390-397
- 2 Graham, P.H., Vance, C.P. (2003) Legumes: Importance and constraints to greater utilization. *Plant Physiol* 131, 872-877
- 3 Saravanan, V.S., Madhaiyan, M., Osborne, J., Thangaraju, M., Sa, T.M. (2008) Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: their possible role in plant growth promotion. *Microb. Ecol* 55, 130–140
- 4 Ribeiro, R.A., Barcellos, F.G., Thompson, F.L., Hungria, M. (2009) Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. *Res. Microbiol* 160, 297-306
- 5 Djordjevic, M.A., Zurkowski, W., Shine, J., Rolfe, B.G. (1983) Sym plasmid transfer to various symbiotic mutants of *Rhizobium trifolii*, *R. leguminosarum*, and *R. meliloti*. *J. Bacteriol* 156, 1035-1045
- 6 Berry, J.O., Atherly A.G. (1984) Induced plasmid-genome rearrangements in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol* 157, 218-224
- 7 Hungria, M., Franco, A.A. (1993) New source of high temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris*. *Plant Soil* 149, 103-109
- 8 Hungria, M., Vargas, M.A.T. (2000) Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Res* 65, 151-164
- 9 Martínez-Romero, E., Segovia, E., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham, P.H., Pardo, M.A. (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. System. Bacteriol* 41, 417-426
- 10 Hungria, M., Andrade, D.S., Chueire, L.M.O., Probanza, A., Guttierrez-Mañero, F.J., Megías, M. (2000) Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol. Biochem* 32, 1515-1528
- 11 Hungria, M., Campo, R.J., Mendes, I.C. (2003) Benefits of inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biol. Fertil. Soil* 39, 88-93
- 12 Wagner, M.A., Zahrl, D., Rieser, G., Koraimann, G. (2009) Growth phase and cell division dependent activation and inactivation of the σ^{32} regulon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 191, 1695–1702
- 13 Pinto F.G.S., Chueire L.M.O., Vasconcelos. A.T.R., Nicolas M.F., Almeida L. G.P., Souza R.C., Menna P., Barcellos F.G., Megías M., Hungria M. (2009) Novel genes related to nodulation, secretion systems, and surface structures revealed by a genome draft of *Rhizobium tropici* strain PRF 81. *Funct Integr Genomics* 9, 263-270

- 14 Pinto, F.G.S., Hungria, M., Mercante, F.M. (2007) Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol. Biochem* 39, 1851-1864
- 15 Lery, L.M., Coelho, A., Von Kruger, W.M., Gonçalves, M.S., Santos, M.F., Valente, R.H. (2008) Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. *Proteomics* 8, 1631-1644
- 16 Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem* 72, 248-254
- 17 Chaves, D.F.S., Souza, E.M., Monteiro, R.A., Pedrosa, F.O. (2009) A two-dimensional electrophoretic profile of the proteins secreted by *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *J. Proteomics* 73, 50-56
- 18 Tatusov, R.L., Galperin, M., Natale, D.A., Koonin, E.V. (2000) The COG database: a tool for genome scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* 28, 33-36
- 19 Gardy, J.L., Laird, M.R., Chen, F., Rey, S., Walsh, C.J., Ester, M., Brinkman, F.S. (2005) PSORTb v.2.0: Expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics* 21, 617-623
- 20 Bhasin, M., Garg, A., Raghava, G.P.S. PSLpred: prediction of subcellular localization of bacterial proteins. *Bioinformatics* 21, 2522-2524
- 21 Batista, J.S.S., Torres, A.R., Hungria, M. (2010) Towards a two-dimensional proteomic reference map of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15: spotlighting —hypothetical proteins. *Proteomics* 10, 3176-3189
- 22 Montoya, A.L., Chilton, M.D., Gordon, M.P., Sciaky, D., Nester, E.W. (1977) Octopine and nopaline metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumor cells: role of plasmid genes. *J. Bacteriol* 129, 101–107
- 23 Rodriguez, F., Arsene-Ploetze, F., Rist, W., Rudiger, S., Schneider-Mergener, J., Mayer, M.P., Bukau, B. (2008) Molecular basis for regulation of the heat shock transcription factor σ^{32} by the DnaK and DnaJ chaperones. *Molecular Cell* 32, 347–358
- 24 Potvin, E., Sanschagrín, F., Levesque, R.C. (2008) Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* 32, 38–55
- 25 Meletzus, D., Zellermann, E.-M., Kennedy, C. (1998) Identification and characterization of the ntrcBC and ntrYX genes in *Acetobacter diazotrophicus*. In: Elmerich C, Kondorosi A., Newton W.E. (Eds), *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 125-126
- 26 Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J et al. (2001) Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc. Natl. Acad. Sci* 98, 9877-9882

- 27 Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S. et al. (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* 7, 331-338
- 28 Ishida, M.L., Assumpção, M.C., Machado, H.B., Benelli, E.M., Souza, E.M., Pedrosa, F.O. (2002) Identification and characterization of the two component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*. *Braz. J. Med. Biol. Res* 35, 651-661
- 29 Pawlowski, K., Klosse, U., De Bruijn, F.J. (1991) Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism, *Mol. Gen. Genomics* 231, 124-138
- 30 Chen, E.J., Sabio, E.A., Long, S.R. (2008) The periplasmic regulator ExoR inhibits ExoS/ChvI two-component signaling in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* 69, 1290 - 1303.
- 31 Yuan, Z.C., Liu, P., Saenkham, P., Kerr, K., Nester, E.W. (2008) Transcriptome profiling and functional analysis of *Agrobacterium tumefaciens* reveals a general conserved response to acidic conditions (pH 5.5) and a complex acid-mediated signaling involved in *Agrobacterium*-plant interactions. *J Bacteriol* 190, 494-507
- 32 Cheng, H.P., Walker, G.C. (1998) Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. *J. Bacteriol* 180, 20-26
- 33 Fujishige, N.A., Kapadia, N.N., De Hoff, P.L., Hirsch, A.M. (2006) Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol. Ecol* 56, 195-206
- 34 Wells, D.H., Chen, E.J., Fisher, R.F., Long, S.R. (2007) ExoR is genetically coupled to the ExoS-ChvI two-component system and located in the periplasm of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol* 64, 647-664
- 35 Yao, S.Y., Luo, L., Har, K.J., Becker, A., Rüberg, S., Yu, G.Q., Zhu, J.B., Cheng, H.P. (2004) *Sinorhizobium meliloti* ExoR and ExoS proteins regulate both succinoglycan and flagellum production. *J. Bacteriol* 186, 6042-6049
- 36 Davies, B.W., Walker, G.C. (2007) Identification of novel *Sinorhizobium meliloti* mutants compromised for oxidative stress protection and symbiosis. *J. Bacteriol* 189, 2110-2113
- 37 Gupta, R.S. (1995) Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10, and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 15, 1-11
- 38 Movahedi, S., Waites, W. (2000) A two-dimensional protein gel electrophoresis study of the heat stress response of *Bacillus subtilis* cells during sporulation. *J. Bacteriol* 182, 4758-4763
- 39 Münchbach, M., Nocker, A., Narberhaus, F. Multiple Small Heat Shock Proteins in Rhizobia. *Journal of Bacteriology* 181, 83-90
- 40 Janakiraman, A., Fixen, K.R., Gray, A.N., Niki, H., Goldberg, M.B. (2009) A Genome-Scale Proteomic Screen Identifies a Role for DnaK in Chaperoning of Polar Autotransporters in *Shigella*. *Journal of Bacteriology* 191, 6300-6311

- 41 Hartl F.U., Hayer-Hartl, M. (2009) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 574 – 581
- 42 Bukau, B. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* heat shock response. *Mol. Microbiol* 9, 671–680
- 43 Georgopoulos, C., Liberek, K., Zylicz, M., Ang, D. (1994) *The Biology of heat shock proteins and molecular chaperones*: Monograph 26, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, pp. 209–249
- 44 Yura, T. (1996) Regulation and conservation of the heat-shock transcription factor sigma32. *Genes Cells* 1, 277-284
- 45 Gamer, J., Multhaup, G., Tomoyasu, T., Mccarty, J.S., Rudiger, S., Schonfeld, H.J., Schirra, C., Bujard, H., Bukau, B.A. (1996) A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates the activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor sigma32. *Embo J* 15, 607-617
- 46 Gross, C.A. (1996) Function and regulation of the heat shock proteins. In: Neidhard, F.C. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella*. ASM Press. Washington, DC, pp. 1382-1399
- 47 Fayet, O., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C. (1989) The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol* 171, 1379-1385
- 48 Periago, P.M., Van Schaik, W., Abee, T., Wouters, J.A. (2002) Identification of proteins involved in the heat stress response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl. Environ. Microbiol* 68, 3486–3495
- 49 Cardoso, K., Gandra, R.F., Wisniewski, E.S., Osaku, C.A., Kadowaki, M.K., Felipach-Neto, V., Haus, L.F.A., Simão, R.C.G. (2010) DnaK and GroEL are induced in response to antibiotic and heat shock in *Acinetobacter baumannii*. *J. Med. Microbiol* 59, 1061-1068
- 50 Goloubinoff, P., Christeller, J.T., Gatenby, A.A., Lorimer, G.H. (1989) Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature* 342, 884–89
- 51 Sigler, P.B., Xu, Z., Rye, H.S., Burston, S.G., Fenton, W.A., Horwich, A.L. (1998) Structure and function in GroEL mediated protein folding. *Annu. Rev. Biochem* 67, 581–608
- 52 Caldas, T.D., Yaagoubi, A., Richarme, G. (1998) Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *J. Biol. Chem* 273, 11478–11482
- 53 Caldas, T., Laalami, S., Richarme, G. (2000) Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-G and initiation factor IF2. *J. Biol. Chem* 275, 855–860
- 54 Brot N. Translation. In: Weissbach H, Pestka S., (eds.). (1977) *Molecular Mechanisms of Protein Synthesis*, pp. 375–411, Academic Press, New York

- 55 Hendrick, J.P., Hartl, F.U. (1993) Molecular chaperone functions of heat shock proteins, *Annu Rev Biochem* 62, 349–384
- 56 Jacobson, G.R., Rosenbuch, J.P. (1976) Abundance and membrane association of elongation factor Tu in *E. coli*. *Nature* 261, 23–26
- 57 Kudlicki, W., Coffman, A., Kramer, G., Hardesty, B. (1997) Renaturation of rhodanese by translational elongation factor (EF) Tu. Protein refolding by EF-Tu flexing. *J. Biol. Chem* 272, 32206–32210
- 58 Grunberg-Manago, (1996) *M Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, 2nd ed., pp. 1432–1457, ASM Press, Washington, DC
- 59 Fernando, M.R., Nanri, H., Yoshitake, S., Nagato-Kuno, K., Minakami, S. (1992) Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cells. *Eur. J. Biochem* 209, 917–922
- 60 Cabisco, E., Tamarit, J. Ros, J. (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Internatl. Microbiol* 3, 3–8
- 61 Scharf, C., Riethdorf, S., Ernst, H., Engelmann, S., Volker, U. Hecker, M. (1998) Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol* 180, 1869–1877
- 62 Batista, J.S.S., Hungria, M. (2010) Proteomics reveals differential expression of PhyR-EcfG regulators and other proteins related to a variety of metabolic pathways by genistein-induced *Bradyrhizobium japonicum* strains. *Submitted*
- 63 Santos, M.F., Pádua V.L.M., Nogueira E.M., Hemerly, A.S., Domont G.B. (2010) Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. *J. Proteomics* 73, 917-931
- 64 Kang, G., Park, E., Kim, K., Lim, C. (2009) Overexpression of bacterioferritin comigratory protein (Bcp) enhance viability and reduced glutathione level in the fission yeast under stress. *J. Microbiol* 47, 60-67
- 65 Lenco, J., Pavkova, I., Hubalek, M., Stulik, J. (2006) Insights into the oxidative stress response in *Francisella tularensis* LVS and its mutant DiglC1 + 2 by proteomics analysis. *FEMS Microbiol. Lett* 246, 47–54
- 66 Marino, D., González, E.M., Frendo, P., Puppo, A., Arrese-Igor, C. (2007) NADPH recycling systems in oxidative stressed pea nodules: a key role for the NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Planta* 225, 413-421
- 67 Brown, S.M., Upadhyay, R., Shoemaker, J.D., Lodge, J.K. (2010) Isocitrate dehydrogenase is important for nitrosative stress resistance in *Cryptococcus neoformans*, but oxidative stress resistance is not dependent on glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Eukaryotic Cell* 9, 971-980
- 68 Patridge, E.V., Ferry, J.G. (2006) WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD(P)H: quinone oxidoreductase. *J. Bacteriol* 188, 3498–3506

- 69 Andrade. S.L.A., Patridge, E.V., Ferry, J.G., Einsle, O. (2007) Crystal structure of the NADH:quinone oxidoreductase WrbA from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 189, 9101–9107

Table 1 – Identified proteins of *Rhizobium tropici* PRF 81 whole cell extracts up-regulated after growth at high temperature (35°C). Matched peptides masses and MS/MS combined results are available in PRIDE (<http://ebi.ac.uk/pride/>) under the experiment accession number 14817.

Spot ID	NCBI ID	Gene	Protein description	Organism	T. pI	E. pI	T. mass	E. mass	Cellular location
Metabolism									
C - Energy production and conversion									
1	gi 46909738	<i>icd</i>	Isocitrate dehydrogenase	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	5.9	5.96	45320	49000	Cytoplasmic
2	gi 222087461	<i>sucC</i>	Succinyl-coa synthetase beta subunit protein	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	4.98	4.96	42028	46000	Cytoplasmic
3	gi 86359524	<i>acnA</i>	Aconitate hydratase	<i>Rhizobium etli</i>	5.48	5.69	97180	98000	Cytoplasmic
4	gi 116254139	<i>atpD</i>	F0F1 ATP synthase subunit beta	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	5.03	4.88	50885	56000	Cytoplasmic
E- Amino acid transport and metabolism									
5	gi 1245379	<i>glnA</i>	Glutamine synthetase I	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	5.2	5.33	52287	61000	Cytoplasmic
6	gi 15887731	<i>argB</i>	Acetylglutamate kinase	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5.16	5.41	31083	30000	Cytoplasmic
7	gi 89258357		Putative periplasmic substrate binding protein	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	5.84	5.78	28188	24000	Periplasmic
8	gi 222109054	<i>nocP</i>	Opine permease ATP-binding protein	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	6.98	5.22	28288	20000	Inner Membrane
9	gi 222087066	<i>pepF</i>	Oligoendopeptidase F protein	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	5.32	5.33	68989	76000	Cytoplasmic
10	gi 222087908	<i>asd</i>	Aspartate-B-semialdehyde dehydrogenase protein	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	5.46	5.59	37925	45000	Cytoplasmic
11	gi 222084786	<i>argD</i>	Diaminobutyrate--pyruvate aminotransferase protein	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	5.63	6.35	42909	43000	Cytoplasmic
12	gi 114765810	<i>ilvE</i>	Branched-chain amino acid aminotransferase	<i>Pelagibaca bermudensis</i>	5.31	5.68	32142	35000	Cytoplasmic
F- Nucleotide transport and metabolism									
13	gi 86146888	<i>pyrH</i>	Uridylate Kinase	<i>Vibrio sp.</i>	5.08	5.82	26284	33000	Cytoplasmic
G - Carbohydrate transport and metabolism									
14	gi 222085874	<i>eno</i>	Phosphopyruvate hydratase	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	4.84	4.95	45120	53000	Cytoplasmic
15	gi 282887091		Alpha amylase catalytic region	<i>Burkholderia sp.</i>	6.26	5.03	64245	34000	Cytoplasmic
16	gi 241206422		Transaldolase	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	5.32	6.12	35091	29000	Cytoplasmic
17	gi 11493200	<i>pgm</i>	Phosphoglucomutase	<i>Rhizobium tropici</i>	5.16	5.38	58641	72000	Cytoplasmic

18	gi 222084905	<i>aglA</i>	Alpha-glucosidase protein	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	4.84	4.86	62592	65000	Cytoplasmic
H - Coenzyme transport and metabolism									
19	gi 222086485		ABC transporter	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	5.23	5.21	38975	42000	Periplasmic
20	gi 296105270		Biotin protein ligase	<i>Enterobacter cloacae</i>	5.23	5.42	35255	28000	Cytoplasmic
I - Lipid transport and metabolism									
21	gi 299768808		Acyl-coa dehydrogenase	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5.37	4.66	65994	40000	Cytoplasmic
22	gi 282888281		3-Oxoacyl-(acyl-carrier-protein (ACP)) synthase III domain protein	<i>Burkholderia</i> sp.	6.27	5.74	38552	35000	Cytoplasmic
23	gi 159186213	<i>pcaF</i>	Beta-ketoadipyl coa thiolase	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5.51	6.37	41850	46000	Cytoplasmic
P - Inorganic ion transport and metabolism									
24	gi 222087891	<i>bfr</i>	Bacterioferritin	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	4.81	4.94	16860	19000	Cytoplasmic
25	gi 87199081		Tonb-dependent receptor	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	5.82	5.01	87810	75000	Extra Cellular
Cellular processes and signaling									
D - Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning									
26	gi 222086436	<i>ftsZ2</i>	Cell division protein	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	5.21	5.39	63014	81000	Cytoplasmic
27	gi 50121473	<i>kicB</i>	Condesin subunit F	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	4.7	4.78	50717	57000	Cytoplasmic
T - Signal transduction mechanisms									
28	gi 117926246		Protein tyrosine phosphatase	<i>Magnetococcus</i> sp	6.29	5.28	18731	19000	Cytoplasmic
29	gi 222087232	<i>prkA</i>	Serine protein kinase protein	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	5.42	5.69	74417	84000	Cytoplasmic
30	gi 116252038	<i>ntrX</i>	Putative two component response regulator Nitrogen assimilation regulatory protein	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	9.15	5.66	30427	34000	Cytoplasmic
31	gi 159184131	<i>chvI</i>	Two component response regulator	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5.56	5.85	27253	30000	Cytoplasmic
O - Posttranslational modification, protein turnover, chaperones									
32	gi 222087564	<i>trxA</i>	Thioredoxin	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	4.83	4.85	34469	39000	Cytoplasmic
33	gi 118590060	<i>bcp</i>	Bacterioferritin comigratory protein	<i>Stappia aggregata</i>	5.63	5.37	16749	22000	Cytoplasmic
34	gi 58826564	<i>dnaK</i>	Dnak	<i>Rhizobium tropici</i>	4.91	5.37	68393	74000	Cytoplasmic
35	gi 222085003	<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	5.03	5.11	57836	69000	Cytoplasmic

M - Cell wall/membrane/envelope biogenesis									
36	gi 86359655		Putative metalloendopeptidase protein	<i>Rhizobium etli</i>	5.36	4.89	49514	29000	Periplasmic
37	gi 222085864	<i>omp1</i>	Outer membrane lipoprotein	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	5.26	5.66	84589	90000	Extra Cellular
N - Cell motility									
38	gi 18033179	<i>virD4</i>	VirD4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6.82	5.24	73380	69000	Cytoplasmic
Information storage and processing									
J - Translation, ribosomal structure and biogenesis									
39	gi 222085858	<i>tsf</i>	Translation elongation factor Ts	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	5.15	5.14	32268	40000	Cytoplasmic
40	gi 227821753	<i>fusA</i>	Elongation factor G	<i>Rhizobium sp.</i>	5.17	5.3	77966	89000	Cytoplasmic
41	gi 86355771	<i>pnp</i>	Polynucleotide phosphorylase/polyadenylase	<i>Rhizobium etli</i>	5.2	5.19	77491	89000	Cytoplasmic
42	gi 294624706	<i>infB</i>	Translation initiation factor IF-2	<i>Xanthomonas fuscans</i>	5.89	5.76	83626	75000	Cytoplasmic
43	gi 218672404	<i>tufB1</i>	Elongation factor EF-Tu protein	<i>Rhizobium etli</i>	4.87	5.31	31884	48000	Cytoplasmic
K - Transcription									
44	gi 89056301		LysR family transcriptional regulator	<i>Jannaschia sp.</i>	5.57	4.48	32077	28000	Cytoplasmic
45	gi 159184760		AraC family transcriptional regulator	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	7.11	5.74	27498	25000	Cytoplasmic
46	gi 222081230		Transcriptional regulator protein	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	6.38	5.6	98220	98000	Cytoplasmic
47	gi 190895600		Probable transcriptional	<i>Rhizobium etli</i>	6.91	5.42	42937	85000	Cytoplasmic
48	gi 222106418		Transcriptional regulator GntR family	<i>Agrobacterium vitis</i>	5.82	5.78	26366	49000	Cytoplasmic
49	gi 222106466		Transcriptional regulator ROK family	<i>Agrobacterium vitis</i>	7.03	5.14	41156	42000	Cytoplasmic
50	gi 222082875		Transcriptional regulator, MarR family	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	5.46	5.57	18141	22000	Cytoplasmic
L - Replication, recombination and repair									
51	gi 222084927		ATP-dependent RNA helicase protein	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	9.17	5.36	69955	67000	Cytoplasmic
Poorly characterized									
R - General function prediction only									
52	gi 222086102	<i>sufC</i>	FeS assembly ATPase SufC	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	5.08	4.95	27375	32000	Inner Membrane
53	gi 222082138	<i>cpo</i>	Chloride peroxidase protein	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	7.88	6.37	34965	32000	Periplasmic
54	gi 186472508	<i>wrbA</i>	Flavoprotein WrbA	<i>Burkholderia phymatum</i>	6.19	5.91	20930	26000	Cytoplasmic
55	gi 170699364		NADPH-dependent FMN reductase	<i>Burkholderia ambifaria</i>	6.71	6.31	8539	17000	Periplasmic
56	gi 194431754	<i>dkgA</i>	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase A	<i>Shigella dysenteriae</i>	6.22	5.15	19399	23000	Cytoplasmic
57	gi 222085370		Ferredoxin reductase protein	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	5.88	5.65	43777	53000	Cytoplasmic
S - Function Unknown									
58	gi 222149801		Hypothetical protein Avi_3814	<i>Agrobacterium vitis</i>	5.03	5.01	24632	29000	Periplasmic
NO related COG									
59	gi 209547526		Hypothetical protein Rleg2_5527	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	6.02	5.89	33584	44000	Cytoplasmic

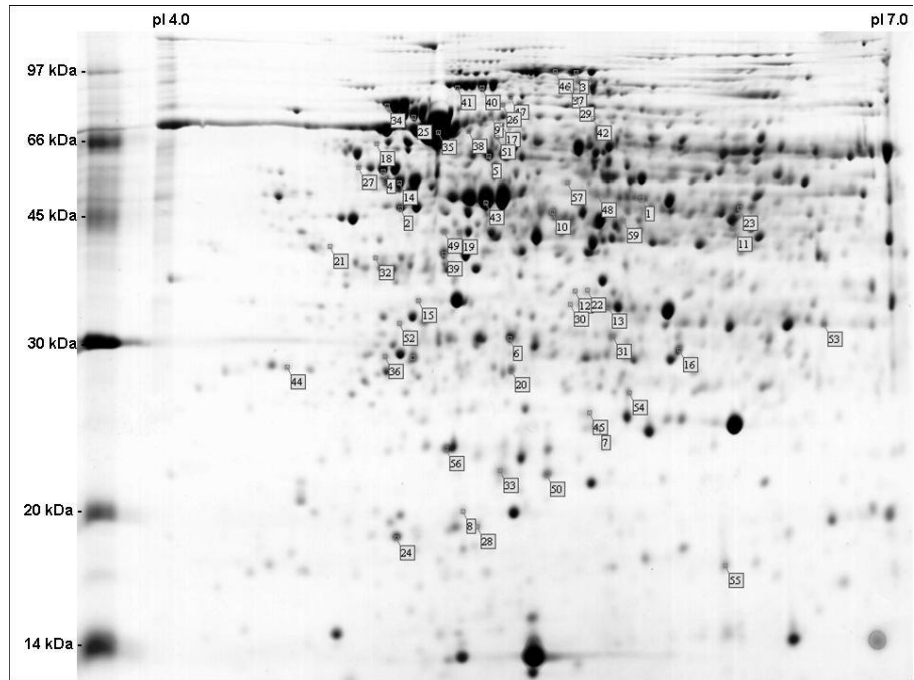


Figure 1 – 2-DE protein profile of *Rhizobium tropici* whole cell extract under adaptative heat stress. More information about differential expressed proteins assigned is available in Table 1.