

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATO DE SOUZA PINTO LEMGRUBER

ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Herbaspirillum seropedicae*

**CURITIBA
2009**

RENATO DE SOUZA PINTO LEMGRUBER

ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Herbaspirillum seropedicae*

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Bioquímica como requisito parcial à conclusão do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador:

**Prof^o Dr^o Luciano Fernandes Huergo
(Dept^o de Bioquímica e Biol. Molecular)**

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ana Claudia Bonatto (Dept^o de Genética)

**CURITIBA
2009**

SUMÁRIO

RESUMO	III
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	1
1.1.1 Objetivo geral.....	1
1.1.2 Objetivos específicos	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	2
2.2 <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</i>	3
2.3 GLUTAMINA SINTETASE	3
2.3.1 Assimilação de amônio.....	4
2.4 PROTEÍNAS PII.....	6
2.5 PROTEOMA.....	8
2.6 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.....	8
2.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	9
3 MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 BACTÉRIA.....	10
3.2 MEIOS DE CULTIVO	10
3.2.1 Meios de cultura	10
3.2.2 Antibiótico utilizado para seleção	11
3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	11
3.4 PREPARO DA AMOSTRA PARA A ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.....	12
3.5 ISOELETROFOCALIZAÇÃO (IEF) DAS PROTEÍNAS.....	13
3.6 EQUILÍBRIO DAS TIRAS DE GRADIENTE DE pH IMOBILIZADO	13
3.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE)	14
3.8 COLORAÇÃO DOS GÉIS.....	14
3.9 ANÁLISE DOS GÉIS.....	14
3.10 PREPARO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA	15
3.11 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA ATRAVÉS DO MALDI TOF/TOF.....	16
3.12 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	16
3.13 IMUNODETECÇÃO.....	17
3.13.1 Transferência	17
3.13.2 Tratamento da membrana.....	18
3.14 COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA GLUTAMINA SINTETASE.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 GÉIS BIDIMENSIONAIS DAS ESTIRPES SMR1, LNGLNKDEL (<i>GLNK</i>) E LNGLNB (<i>GLNB</i>).....	19
4.2 IMUNODETECÇÃO.....	26
4.3 ESPECTRO DOS PEPTÍDEOS DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA GLUTAMINA SINTETASE	26
4.4 ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE VOLUME DAS ISOFORMAS DA GS NAS ESTIRPES SMR1, LNGLNKDEL(<i>GLNK</i>) E LNGLNB(<i>GLNB</i>).....	30
4.5 COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA GLUTAMINA SINTETASE.....	35
5 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	47

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica endofítica encontrada colonizando plantas como milho, trigo, arroz e cana-de-açúcar. O objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência de possíveis modificações pós-traducionais e variações de expressão da enzima glutamina sintetase de *H. seropedicae* em resposta aos níveis de amônio no meio de cultivo. Nos experimentos realizados, as estirpes SMR1, LN $glnKdel(glnK)$ e LN $glnB(glnB)$ foram cultivadas em meio NFbHP-malato contendo 2mmol/l ou 20mmol/l de NH₄Cl, como fonte de nitrogênio. Após o cultivo, as células foram coletadas, rompidas por sonicação e as proteínas solúveis foram fracionadas por eletroforese bidimensional. Os géis foram corados com Coomassie Blue Coloidal, as imagens foram digitalizadas e analisadas pelo programa ImageMaster 2D Platinum v.6.01. Três bandas com aproximadamente a mesma massa molecular, mas com pI diferentes foram retirados dos géis das estirpes estudadas e digeridas com tripsina, e os peptídeos obtidos analisados por um Espectrômetro de Massas do tipo MALDI-ToF/ToF. A análise revelou que essas bandas correspondiam a isoformas da enzima glutamina sintetase, o que foi confirmado por imunodeteção com anticorpos anti-GS, revelando quatro bandas com aproximadamente mesma massa, mas com pI diferente. A análise da variação de volume das isoformas da GS entre a estirpe selvagem e os mutantes revelou que as isoformas adenililada e desadenililada apresentaram padrão de variação (% volume) diferente do selvagem na estirpe mutante LN $glnKdel(glnK)$. Já a nova isoforma de GS, com pI mais ácido, apresentou padrão de variação diferente em relação ao selvagem na estirpe mutante LN $glnB(glnB)$. Esses resultados indicam que as proteínas PII participam da regulação da proteína glutamina sintetase em *H. seropedicae*. Além disso, a presença de duas outras isoformas da enzima glutamina sintetase, além das isoformas adenililada e desadenililada, sugere que o controle fino da atividade dessa enzima é de fundamental importância para o metabolismo nitrogenado e energético de *Herbaspirillum seropedicae*.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*. Proteoma. Eletroforese bidimensional. Espectrometria de Massas. Glutamina sintetase

1 INTRODUÇÃO

A determinação do genoma de um organismo possibilita a identificação e localização de todos os seus genes, e inferir sobre todas as possíveis proteínas que possam ser codificadas por esse organismo. Entretanto, as proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais como fosforilação, metilação, acetilação e clivagem proteolítica entre outras e, além destes motivos, a estrutura final e função das diversas proteínas não podem ser definidas com base apenas nas seqüências dos genes que as codificam (CAHILL *et al.*, 2001). Adicionalmente o conhecimento estrutural do genoma não permite, via de regra, concluir sob quais condições fisiológicas determinadas, as proteínas serão expressas. Por estas razões, o estudo do genoma funcional é valioso para tais fins.

Através dos estudos de proteômica é possível identificar quais proteínas são expressas em determinadas condições fisiológicas, além de possibilitar comparações entre diferentes condições, permitindo identificar quais proteínas são importantes para o organismo em um determinado momento.

Suas atividades específicas, como estado de modificação, associação com outras biomoléculas e os níveis de expressão são essenciais para a descrição de sistemas biológicos (AEBERSOLD, 2003).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Determinar a ocorrência de possíveis modificações pós-traducionais e variações de expressão da enzima glutamina sintetase de *H. seropedicae* em resposta aos níveis de amônio no meio de cultivo, nas estirpes SMR1, LNglN~~Kdel~~(*glnK*) e LNglNB(*glnB*).

1.1.2 Objetivos específicos

- Separar as proteínas solúveis das estirpes SMR1, LNglN~~Kdel~~(*glnK*) e LNglNB(*glnB*) de *H. seropedicae* cultivadas em meio NFbHPN, em

condições de limitação (2mmol/l) e excesso (20mmol/l) de amônio por eletroforese bidimensional;

- Identificar as isoformas da proteína glutamina sintetase nos géis bidimensionais através de espectrometria de massas MALDI-ToF/ToF e imunodeteção;
- Determinar variações quantitativas (% Volume) na expressão das isoformas da enzima glutamina sintetase nas diferentes condições.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O elemento nitrogênio é parte essencial de vários compostos químicos como proteínas e ácidos nucleicos, que são a base de todas as formas de vida. O nitrogênio molecular, N_2 , representa aproximadamente 80% da atmosfera terrestre, no entanto não pode ser utilizado diretamente pela maioria dos seres vivos (HUBBELL & KIDDER, 2003).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o processo pelo qual o N_2 é transformado a NH_3 , forma metabolicamente utilizável. As bactérias diazotróficas convertem o N_2 atmosférico a NH_3 , o qual pode ser utilizado na síntese de biomoléculas que contenham nitrogênio, o produto nitrogenado resultante da FBN é disponibilizado para as plantas, por meio de associações com as bactérias fixadoras de nitrogênio (BURRIS, 1991).

O elemento nitrogênio é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento de plantas, no entanto poucos organismos são capazes de realizar a FBN. Dentre esses, encontramos grupos de bactérias como as Firmibactérias, Cyanobactérias, Actinomicetos, bactérias verdes sulfurosas e nas subdivisões de Proteobactérias (DIXON & KAHN, 2004). Entre as proteobactérias pode-se citar os microrganismos fixadores *Bradyrhizobium japonicum*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Rhodobacter capsulatus* e *Sinorhizobium meliloti* (DIXON & KAHN, 2004).

2.2 *Herbaspirillum seropedicae*

A espécie *Herbaspirillum seropedicae* foi identificada por BALDANI e colaboradores em 1986. Pertence ao gênero *Herbaspirillum*, que recebeu essa denominação por apresentar bactérias pequenas, em forma de espiral, encontradas em associação com plantas herbáceas na cidade de Seropédica. São gram negativas, geralmente vibrióides e às vezes helicoidais. *H. seropedicae* geralmente contém dois flagelos polares, diâmetro de 0,6 a 0,7 μ m e tamanho variando de 1 a 5 μ m conforme o meio de crescimento (BALDANI *et al.*, 1986).

Esse microrganismo é capaz de realizar a fixação biológica do gás nitrogênio (N₂) presente na atmosfera, convertendo-o em amônia (NH₃), um nutriente importante para as plantas. Esse processo é de fundamental importância para os vegetais, pois os mesmos não podem assimilar diretamente o nitrogênio do ar (PEDROSA, 2005).

2.3 GLUTAMINA SINTETASE

Existem três tipos diferentes de glutamina sintetase, denominadas GSI, GSII e GSIII (SILMAN *et al.*, 1995). A forma mais comum de GS (GSI) é uma enzima dodecamérica com subunidades idênticas de aproximadamente 55 kDa, codificada pelo gene *glnA* (MERRICK & EDWARDS, 1995). GSI é a forma de GS predominante nos procariotos. A regulação pós-traducional da atividade catalítica da GS por adenililação ocorre na maioria dos procariotos. Um aumento no nível intracelular de nitrogênio leva a uma redução progressiva da atividade da enzima pela adição de um grupamento AMP a um resíduo de tirosina, em cada subunidade (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Estudos têm demonstrado uma segunda modificação covalente de GSI por ADP-ribosilação em *Rhodospirillum rubrum* (WOEHLE *et al.*, 1990), *Streptomyces griseus* (PENYIGE *et al.*, 1994) e *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC 6803 (SILMAN *et al.*, 1995), porém a importância fisiológica dessas modificações ainda não é conhecida.

Uma segunda forma de GS (GSII) tem sido descrita em bactérias que se associam com plantas como *Bradyrhizobium* e *Agrobacterium* (MERRICK & EDWARDS, 1995). GSII é codificada pelo gene *glnII*, sendo uma enzima octamérica

de subunidades idênticas de massa aproximadamente igual a 36 kDa (MERRICK & EDWARDS, 1995).

A terceira forma de GS (GSIII) foi inicialmente descrita em *Bacteroides fragilis*. GSIII é uma enzima hexamérica com subunidades com massa aproximadamente de 75kDa, porém ainda não foi extensivamente caracterizada (MERRICK & EDWARDS, 1995).

As características dos três tipos funcionais de glutamina sintetase encontradas em procariotos estão resumidas na tabela abaixo:

Enzima	Gene	Massa Molecular da subunidade (em kDa)	Número de subunidades	Modificações covalentes descritas	Distribuição em Procariotos
GS I	<i>glnA</i>	55	12	Adenililação; ADP-ribosilação	Quase Universal
GS II	<i>glnII</i>	36	8	Não caracterizado	<i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Frankia</i> spp.
GS III	<i>glnA</i>	75	6	Não caracterizado	<i>Bacteroides</i> , <i>Butyrivibrio</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Gleocapsa</i> , <i>Pseudoanabaena</i> spp.

TABELA 01 – Tipos diferentes de GS nos procariotos. Retirado de Merrick & Edwards (1995).

2.3.1 Assimilação de amônio

Em muitos procariotos a reação chave para a assimilação de nitrogênio é catalisada pela proteína glutamina sintetase que catalisa a formação da glutamina a partir de NH_3 e glutamato, com a hidrólise de um ATP (PENYIGE *et al*, 1994).

Devido a esse papel central na biossíntese de glutamina, que é uma importante doadora de nitrogênio para diversos compostos, a enzima glutamina sintetase está sujeita a um controle tanto a nível transcricional quanto pós-traducional (ANTONYUK, 2007).

A assimilação de nitrogênio nos procariotos pode ocorrer por duas vias (ARCONDÉGUY, 2001):

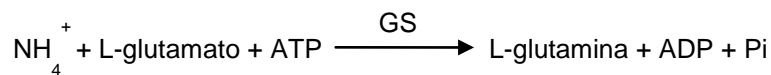
a) Glutamina sintetase (GS) (reação 1) e Glutamato sintase (GOGAT) (reação 2) e

b) Glutamato desidrogenase (GDH) (reação 3)

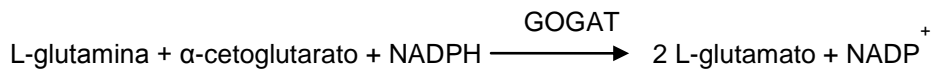
A enzima GS converte glutamato e amônio em glutamina e a enzima GOGAT transfere um grupamento amido da glutamina para o α -cetoglutarato produzindo duas moléculas de glutamato. A reação global é a produção de glutamato a partir de amônia e α -cetoglutarato (MERRICK e EDWARDS, 1995).

A via GDH é utilizada quando as células crescem na presença de alta concentração de amônio, enquanto a via GS/GOGAT ocorre em condições limitantes de nitrogênio (MERRICK e EDWARDS, 1995).

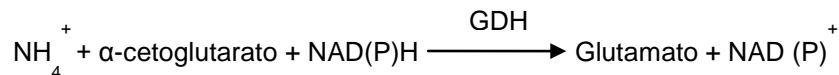
REAÇÃO 1



REAÇÃO 2



REAÇÃO 3



O gene *glnA*, que codifica para GS, faz parte do operon *glnAntrBC* em *H. seropedicae* (PEDROSA *et al.*, 2001) e em *E. coli* (REITZER & MAGAZANIK, 1985). Já em *Rhodospirillum rubrum* e em *Azospirillum brasilense* o gene *glnA* é cotranscrito com o gene *glnB* (JOHANSSON & NORDLUND, 1996; De ZAMAROCZY *et al.*, 1993).

A glutamina sintetase (GS) é altamente regulada, tanto a nível transcricional quanto pós-traducional. Em *E. coli*, a regulação da GS ocorre por meio de mecanismos diferentes: a concentração intracelular da enzima é regulada em resposta à disponibilidade de nitrogênio celular e o controle da atividade da GS é feito por inibição alostérica e modificação covalente (REITZER, 2003).

Em *E. coli*, a regulação alostérica de GS é controlada por alanina, glicina, serina, triptofano, histidina, carbamil fosfato, glucosamina-6-fosfato, CTP, AMP

(ATKINSON *et al*, 1994; REITZER, 2003). O controle pós-traducional ocorre pela adição de um grupamento AMP a um resíduo de tirosina (MERRICK & EDWARDS, 1995). Em altas concentrações de nitrogênio, GS é adenililada pela enzima bifuncional adenililtransferase (ATase) (ARCONDÉGUY *et al*, 2001; MERRICK & EDWARDS, 1995), produto do gene *glnE* (MERRICK & EDWARDS, 1995). Em condições limitantes de nitrogênio o grupamento AMP é removido, pela enzima ATase, tornando a enzima GS ativa novamente (ARCONDÉGUY *et al*, 2001).

2.4 PROTEÍNAS PII

Diversos organismos podem perceber as variações na disponibilidade de nitrogênio através de proteínas transdutoras de sinal do tipo PII (NINFA & JIANG, 2005).

Estas proteínas estão presentes em bactérias, arqueas e plantas, auxiliando na assimilação coordenada de nitrogênio e carbono pela regulação de enzimas transdutoras de sinal, em resposta a diversos estímulos (NINFA & ATKINSON, 2000). As proteínas PII são pequenas proteínas que controlam a atividade de enzimas transdutoras de sinal (NINFA & ATKINSON, 2000; NINFA & JIANG, 2005).

Em *Herbaspirillum seropedicae*, duas proteínas PII foram identificadas, a proteína GlnB e a proteína GlnK, apresentando 78% de identidade de aminoácidos entre elas (BENEILLI *et al*, 1997). A proteína GlnB é codificada pelo gene *glnB* (LIU & MAGASANIK, 1993) e possui expressão constitutiva (BENEILLI *et al.*, 1997), enquanto que a expressão da proteína GlnK é aumentada sob condições limitantes de amônio (NOINDORF, 2002). O gene *glnK* é co-transcrito com o gene *orf1* e *amtB* (NOINDORF, 2006).

A regulação da proteína glutamina sintetase nas proteobactérias envolve as proteínas PII. Em *E. coli*, as proteínas PII são covalentemente modificadas pela proteína GlnD (UTase) por uridililação em resposta aos níveis de nitrogênio intracelular. Sob condições limitantes de nitrogênio, a concentração intracelular de glutamina diminui. Nestas condições a enzima GlnD catalisa a uridililação das proteínas PII. As proteínas PII uridililadas promovem a desadenililação de glutamina sintetase estimulando a atividade de desadenililação da enzima ATase (NINFA & ATKINSON, 2000; NINFA & JIANG, 2005).

Quando os níveis de amônio são altos, a concentração intracelular de glutamina aumenta, a glutamina se liga a enzima GlnD promovendo a desuridililação das proteínas PII. As proteínas PII desuridililadas interagem com a ATase estimulando a adenililação da GS (NINFA & ATKINSON, 2000; NINFA & JIANG, 2005).

Em *Herbaspirillum seropedicae*, foi mostrado que GlnD uridilila GlnB e GlnK (*in vitro*) em uma reação dependente de 2-cetoglutarato e ATP e inibida por glutamina (BONATTO *et al*, 2007)

A regulação geral da atividade de Glutamina sintetase, dependente das proteínas PII em *E. coli* é mostrada na FIG. 01, modificada de Noindorf, 2006.

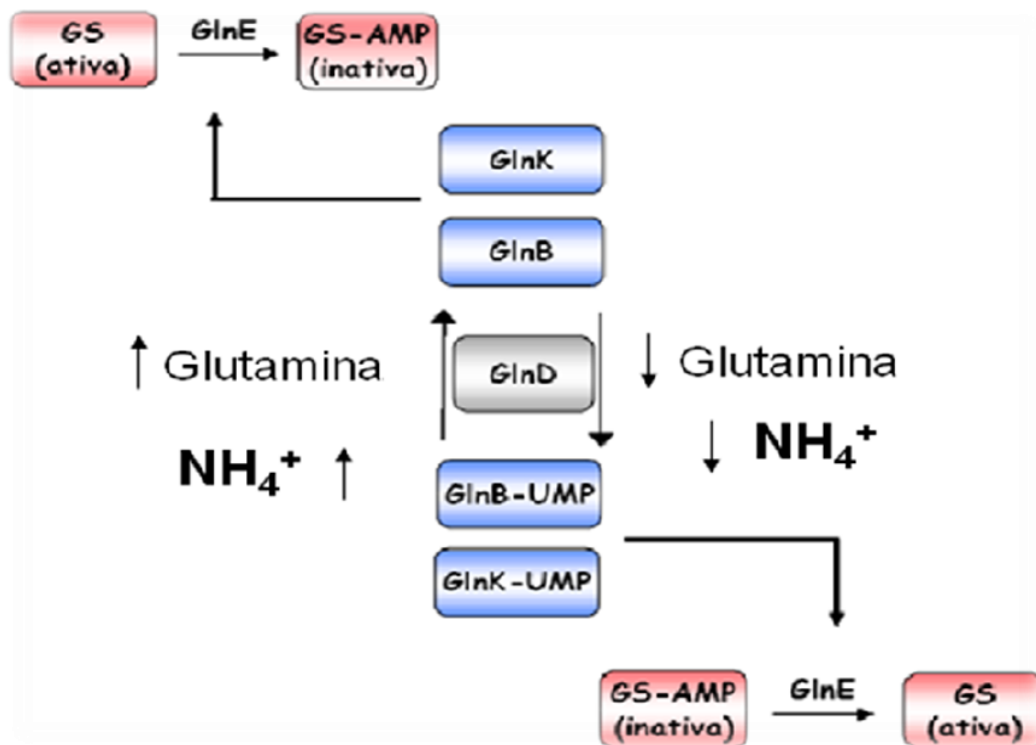


FIGURA 01: Cascata reguladora da proteína Glutamina sintetase pelas proteínas PII em *E. coli*. Em condições de excesso de nitrogênio a proteína GlnD possui atividade de enzima removedora de UMP, desuridililando GlnB e GlnK. GlnB e GlnK não-uridililadas interagem com GlnE, estimulando a inativação da GS por adenililação. Em condições limitantes de nitrogênio a proteína GlnD catalisa a adição do grupamento UMP às proteínas PII. GlnB-UMP e GlnK-UMP interagem com GlnE, estimulando a desadenililação da GS, a qual passa a catalisar a produção de glutamina.

2.5 PROTEOMA

O termo Proteoma refere-se a todas as proteínas expressas de um dado genoma (WILKINS & HOCHSTRASSER, 1997; HAYNES & YATES, 2000). Entretanto, este termo também pode ser usado em um sentido mais restrito, para se referir ao conjunto de proteínas que está sendo expresso num dado momento da vida da célula (ABBOT, 1999).

Um único genoma pode gerar um número muito grande de proteomas, dependendo do estágio do ciclo de crescimento, temperatura, resposta ao estresse, disponibilidade de nutrientes, condições patológicas e diferenças entre estirpes (CAHILL *et al.*, 2001).

A Proteômica tem como objetivo estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e mecanismos regulatórios (BLACKSTOCK & WEIR, 1999).

A investigação de modificações pós-traducionais pode mostrar como estas influenciam na estrutura e função das proteínas, regulando a atividade protéica (PANDEY & MANN, 2000), devido a isso, a estrutura final e a função das várias proteínas não podem ser definidas com base apenas nas sequências nucleotídicas dos genes que as codificam (CAHILL *et al.*, 2001).

2.6 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

A eletroforese bidimensional é um método de separação eficiente porque as proteínas em uma amostra são separadas simultaneamente fornecendo informações úteis sobre ponto isoelétrico, massa molecular, expressão, abundância relativa, modificações pós-traducionais, verificadas pela alteração da mobilidade eletroforética e uma figura estática (fotografia do gel) dos compostos separados, que permite uma comparação qualitativa e quantitativa entre duas ou mais amostras (PANDEY & MANN, 2000). Variações em um único aminoácido podem resultar na mudança de posição de uma proteína em um gel bidimensional (JUNGBLUT, 2001).

Na eletroforese bidimensional as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) por focalização isoelétrica (IEF) na primeira dimensão. Essa técnica é atualmente feita em tiras IPGs (Immobilised pH Gradients) que possuem, em uma das faces, um gradiente de pH imobilizado numa matriz de

poliacrilamida. E, na segunda dimensão, de acordo com sua massa molecular por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS – PAGE) (O`FARREL, 1975).

2.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é a técnica que requer a gaseificação e ionização da amostra, aceleração da molécula carregada por um campo elétrico, dispersão dos íons de acordo com a relação massa/carga (m/z), detecção dos íons e registro do sinal (YATES, 1998). O sistema que torna possível a detecção de proteínas ou peptídeos é o MALDI-ToF/ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight). Nele, uma matriz de ácido orgânico (HCCA – ácido α -ciano-4-hidroxianímico) que se cristaliza juntos aos peptídeos, absorve energia de feixes de laser de nitrogênio no comprimento de onda de 337nm e a converte em energia térmica, que é transferida às macromoléculas da amostra que são ionizadas. A massa das moléculas analisadas é medida pelo tempo-de-vôo desde a ionização até a detecção, sendo que, quanto mais leve o íon, mais rapidamente é feito o percurso (AEBERSOLD & GOODLET, 2001).

O espectrômetro de massas permite a obtenção do mapa peptídico (peptide mapping) ou impressão digital de peptídeos (peptide fingerprint). Nesse tipo de estudo, uma molécula protéica já isolada por eletroforese bidimensional ou cromatografia líquida é clivada sítio-especificamente por enzimas e uma lista dos peptídeos originados é obtida por espectrometria de massa (MATTE *et al.*, 2003). Os fragmentos protéicos formados dependem da seqüência dos aminoácidos da proteína em estudo e da enzima utilizada. A tripsina, normalmente utilizada para digestão das proteínas, faz clivagem específica C-terminal adjacente a resíduos de arginina e lisina, gerando um conjunto de peptídeos únicos cujas massas são determinadas por espectrometria de massas e que podem ser considerados como impressão digital daquela molécula. O padrão de peptídeos obtidos é comparado com o banco de dados que contem o padrão teórico de clivagem das proteínas preditas pelo genoma. Assim, as proteínas são identificadas (CAGNEY *et al.*, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BACTÉRIA

As estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* utilizadas foram:

Estirpe	Característica	Referência
SmR1	Estirpe selvagem, Sm ^R , Nif ⁺	SOUZA <i>et al.</i> , 2000
LNglNkdel(<i>glnK</i>)	SmR1 contendo deleção em fase de 192 nucleotídeos do gene <i>glnK</i>	NOINDORF, 2006
LNglNB(<i>glnB</i>)	SmR1 contendo <i>glnB</i> ::Tc ^R	NOINDORF, 2006

3.2 MEIOS DE CULTIVO

3.2.1 Meios de cultura

As estirpes SMR1, LNglNkdel(*glnK*) e LNglNB(*glnB*) de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio líquido NFb-malato (MACHADO *et al.*, 1991) a 30°C, sob agitação de 120 rpm.

O meio NFb-malato tem a seguinte composição:

	Gramas
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂	0,02
Ácido nitrilo-triacético	0,056
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,02
Ácido málico	5,0
Biotina	1,0 · 10 ⁻⁴

Solução de Oligoelementos	10mL
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \times 10^{-3}\text{g}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,35 \times 10^{-3}\text{g}$
H_3BO_3	$2,8 \times 10^{-3}\text{g}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$8,0 \times 10^{-3}\text{g}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,4 \times 10^{-3}\text{g}$
Água destilada q.s.p	950ml

A solução de fosfatos possui a seguinte composição:

K_2HPO_4	17,8g
KH_2PO_4	159,5g
Água destilada q.s.p	1000ml

3.2.2 Antibiótico utilizado para seleção

Os antibióticos e concentrações utilizadas foram:

- Estreptomicina (Sm) – 80 $\mu\text{g/ml}$
- Tetraciclina (Tc) - 10 $\mu\text{g/ml}$

3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para o cultivo das células, primeiramente foi feito um pré-inóculo em um frasco de 60ml contendo 20ml de meio malato líquido, 1,0ml da mistura de fosfatos, 400 μl de NH_4Cl (20mmol/l), 20 μl de antibiótico estreptomicina para as estipes SMR1 e LNglNkdel(*glnK*) e estreptomicina e tetraciclina para a estirpe LNglNB(*glnB*) e 200 μl de um cultivo em meio malato semi-sólido onde o microrganismo era estocado. A incubação no *shaker* foi feita a 30 °C com agitação a 120rpm por aproximadamente 16h. Posteriormente, 100 μl desse pré-inóculo foram acrescentados a 20ml de meio NFbHP-malato em frasco de 60ml e incubados nas

condições já descritas. Para o preparo do meio de cultivo foram misturados 20ml de NFb-Malato, 1,0ml de solução de fosfatos e 40 μ l de NH₄Cl (2mmol/l), para o meio em menor concentração de nitrogênio, ou 400 μ l de NH₄Cl (20mol/l), para o meio em maior concentração de nitrogênio, mais 20 μ l de estreptomicina (80 μ g/ml) para as estirpes SMR1 e LNglNkdel(*glnK*) e 20 μ l de estreptomicina (80 μ g/ml) com 20 μ l de Tetraciclina (10 μ g/ml) para a estirpe LNglNB(*glnB*). A coleta das células foi realizada quando a DO₆₀₀ atingida era de aproximadamente 1,0.

3.4 PREPARO DA AMOSTRA PARA A ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

Após o crescimento das células, o cultivo foi centrifugado por 10 min, a 4°C e 5000rpm em centrífuga Eppendorf 5804 R, rotor A-4-44. As células do precipitado foram ressuspensas em 2,0ml de uma solução para lavar (3,0mM KCl, 1,5mM KH₂PO₄, 68mM NaCl, 9,0mM NaH₂PO₄) e o volume final completado para 10ml com a mesma solução, em seguida centrifugadas novamente nas mesmas condições anteriores e novamente mais uma etapa de lavagem e centrifugação. Posteriormente, as células lavadas foram ressuspensas em 600 μ l de tampão próprio (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5mM DTT) e foi adicionado 1,0% de PMSF (*Phenylmethylsulphonyl Fluoride*), um inibidor de proteases, aliqüotadas em tubos eppendorf e armazenadas a -70 °C até o momento do uso.

As células de *H. seropedicae* (200 μ l) foram misturadas com 500 μ l de tampão de lise (7M uréia, 2M tiouréia, 4% CHAPS, 2% Pharmalyte) e rompidas por sonicação com 5 pulsos de 20s cada no sonicador “Ultrasonic Processor XL Heat Systems”, em banho de gelo, com intervalos de 1min entre cada pulso. Após a sonicação, a mistura foi centrifugada por 10min a 13400rpm em centrífuga “Eppendorf mini spin”. A quantidade de proteínas na solução sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando BSA como padrão.

Em seguida, foi utilizado um volume da amostra correspondente a 550 μ g de proteína e completado o volume até 250 μ l com tampão de reidratação (7M uréia, 2M tiouréia, 0,5% CHAPS, 0,2% tampão IPG, 15mM DTT e traços de azul de bromofenol).

3.5 ISOELETROFOCALIZAÇÃO (IEF) DAS PROTEÍNAS

A isoeletrofocalização das proteínas foi realizada em equipamento IPGphor da GE Healthcare. A IEF foi conduzida em tiras IPG. A faixa de pH utilizada foi a de pH 4 a 7, em tiras de 13 cm ou 18 cm.

Para tiras IPG (pH 4 a 7) 13 cm, alíquotas de 250 μ l da solução foram aplicadas em um suporte próprio para a realização da isoeletrofocalização de tamanho correspondente às tiras. As tiras foram posicionadas com o gel voltado para baixo e cobertas com 800 μ l de óleo mineral (*"Dry Strip Cover Fluid"*). O tempo de reidratação do gel foi de 12h a 20°C e a isoeletrofocalização prosseguiu até um total de 20kVh.

Para tiras IPG (pH 4 a 7) 18 cm, alíquotas de 340 μ L da solução foram aplicadas em um suporte próprio (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray 18-24cm*), as tiras foram posicionadas com o gel voltado para baixo e cobertas com 2ml de óleo mineral (*"Dry Strip Cover Fluid"*) e deixadas durante toda a noite para a reidratação (aproximadamente 16h). Posteriormente, as tiras foram transferidas para um suporte adequado para a isoeletrofocalização (18-24cm), reposicionadas com o gel voltado para cima e cobertas com 2mL de óleo mineral (*"Dry Strip Cover Fluid"*,) e um eletrodo próprio foi colocado no lado catódico e anódico das tiras. Um papel filtro embebido em água destilada foi posicionado entre cada eletrodo e a tira.

3.6 EQUILÍBRIO DAS TIRAS DE GRADIENTE DE pH IMOBILIZADO

Após a isoeletrofocalização, as tiras foram colocadas em um tubo de ensaio e equilibradas duas vezes de 15min cada, em 5ml de tampão de equilíbrio (50mM Tris-HCl pH 8,8, 6mM uréia, 30% (p/v) glicerol, 2%(p/v) SDS e traços de azul de bromofenol) contendo 50mg DTT, num primeiro momento, e 200mg de iodoacetamida, num segundo momento.

3.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese das proteínas presentes nas tiras IPG foi feita em gel de poliacrilamida 11,0% na presença de SDS (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli, 1970.

A eletroforese foi realizada em géis de 18 cm x 16 cm em cuba tipo “*Hoefler SE 600 Ruby*” da GE Healthcare. As tiras equilibradas foram posicionadas horizontalmente no topo do gel, mantendo pleno contato com este. O padrão de peso molecular (MW) foi colocado para posterior calibração do gel. Em seguida as tiras foram cobertas com 1ml de solução de agarose morna (0,5% agarose, 1% SDS e traços de azul de bromofenol). Após a solidificação da agarose (aproximadamente 1 min), o gel foi inserido na cuba de eletroforese. O tampão de corrida continha 0,3% de Tris base, 1,44% de glicina e 0,1% de SDS. A corrida foi feita limitando-se a corrente a 45mA/gel em voltagem de 300V e com potência máxima de 50W até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel. A temperatura foi mantida a 10°C por meio de refrigeração com circulador termostático Multitemp II.

3.8 COLORAÇÃO DOS GÉIS

Os géis bidimensionais foram visualizados por meio de coloração com *Coomassie Blue Coloidal* (PATTON, 2002; WESTERMEIER & NAVEN, 2002).

As proteínas foram fixadas ao gel durante 1h pela solução de fixar (1,0% (v/v) de ácido o-fosfórico e 20% (v/v) de metanol). Após essa etapa, os géis foram corados, durante a noite, com uma mistura de 400ml da solução para corar A (2,375%(v/v) ácido o-fosfórico e 10%(w/v) sulfato de amônio), junto à 20ml da solução B (2,5% Coomassie G-250) e 100ml de metanol. Os géis foram armazenados em solução de ácido acético 2% à 4°C.

3.9 ANÁLISE DOS GÉIS

Para analisar a imagem dos géis bidimensionais, após a coloração, estes foram digitalizados utilizando um sistema de fotodocumentação UVP. As imagens foram analisadas através do programa ImageMaster 2D Platinum v.6.01.

As proteínas foram detectadas automaticamente e manualmente, por exclusão ou adição de um spot. Os géis foram calibrados de acordo com o gradiente de pH utilizado na tira e de acordo com o gradiente de massa molecular obtido com o padrão de peso molecular (MW).

Os spots dos géis foram comparados utilizando-se o volume relativo, que corresponde a porcentagem de volume do spot em relação ao volume total de todos os spots, para verificar a diferença de expressão das isoformas da proteína glutamina sintetase.

As proteínas foram retiradas dos géis, para análise por espectrometria de massas, utilizando-se uma ponteira plástica de 1000 μ l com a ponta cortada e foram colocadas em uma placa contendo 96 poços.

3.10 PREPARO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA

Os fragmentos do gel foram submetidos a um tratamento de descoloração e desidratação, as proteínas foram digeridas com tripsina e os peptídeos formados foram misturados com a matriz HCCA para a análise.

A descoloração dos fragmentos do gel foi feita com 150 μ l de uma solução 25mmol/l de bicarbonato de amônio e 50% de acetonitrila. A placa foi deixada em agitação em vortex por 20min. A operação foi repetida até descoloração completa dos géis.

Em seguida, os fragmentos de gel foram desidratados com o acréscimo de 40 μ l de acetonitrila 100%, deixados por aproximadamente 5min a temperatura ambiente e o procedimento foi repetido. Posteriormente à retirada da acetonitrila, a placa contendo os fragmentos do gel foi colocada no vácuo por 20min até a completa secagem dos mesmos.

Em seguida, foi adicionado a cada poço, contendo um fragmento do gel, 10 μ l de tripsina (10 μ g/ml em tampão 40mmol/l de bicarbonato de amônio e 10% de acetonitrila) e deixados por 10min na geladeira. Então, a placa foi deixada por um período de 16h em estufa à 37°C para que ocorresse a digestão trípica.

Os peptídeos (1 μ l) resultantes foram misturados com a matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxiamínico) (1 μ l) e colocados diretamente num poço de uma placa própria para a espectrometria de massas (MTP 384 massive MS target T da Bruker), onde os peptídeos se cristalizaram junto à matriz.

3.11 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA ATRAVÉS DO MALDI ToF/ToF

As análises espectrométricas de massa dos peptídeos da digestão trípica foram feitas através do espectrômetro de massas do tipo Maldi-ToF/ToF “Autoflex” da Bruker Daltonics.

A placa contendo os peptídeos cristalizados junto à matriz foi inserida no espectrômetro de massas e, antes da obtenção dos espectros, foi feita a calibração com o padrão de peptídeos “*Peptide calibration standard*” da Bruker Daltonics. Foram acumulados pulsos de laser, em 4 passos de 50 pulsos em diferentes pontos da amostra. Os espectros foram convertidos em uma lista de massas monoisotópicas utilizando o algoritmo SNAP do programa “*Flex Analysis*”.

3.12 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Através do programa “*Flex Analysis*”, foi gerada a lista de massa molecular monoisotópica dos peptídeos para cada proteína e retirado os contaminantes de queratina e tripsina, por comparação com uma lista de massa contendo os valores dos peptídeos dos contaminantes.

Com o auxílio do programa computacional “*Protein Prospector v.5.3.2*”, essas massas peptídicas foram comparadas com o banco de dados das massas de todos os peptídeos trípticos gerados pelas proteínas anotadas pelo programa genopar. O resultado da comparação foi uma lista das proteínas candidatas (dadas por suas ORFs) classificadas em ordem decrescente de correspondência. Os parâmetros utilizados para confirmar ou excluir as proteínas candidatas foram o score gerado para cada proteína candidata, a quantidade de peptídeos experimentais que foram correspondentes aos peptídeos teóricos da proteína encontrada no banco de dados, a porcentagem que esses peptídeos cobriram do total da seqüência genômica da proteína identificada (Cb) e a comparação entre os valores experimentais e teóricos de pI e MW. Foi aceito como proteína identificada àquela que teve maior valor de score, cobertura mínima de 20% e boa correspondência entre os valores experimentais e teóricos de pI e MW.

3.13 IMUNODETECÇÃO

A isoeletrofocalização das proteínas da estirpe SMR1 cultivada em 20mmol/l de NH_4Cl se deu em tira de pH (4 a 7) de 18 cm. A estirpe SMR1 em condição de 20mmol/l de NH_4Cl foi submetida a imunodeteccção com anticorpo Anti-GS de *E. coli*, gentilmente cedido por Huergo (2006), imediatamente após o término da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para a realização do experimento, a metodologia utilizada seguiu aquela previamente utilizada por Huergo (2006), com algumas modificações.

Foram utilizados 100 μg de proteína total, que foram separadas em gel bidimensional e transferidas para uma membrana de PVDF (Hybond ECL – GE Healthcare).

Os tampões de transferência requeridos foram preparados a partir de duas soluções estoques: Tris (0.5mol/l, pH 10.4) e Ácido capróico (0.4mol/l). No ânodo 1 foram misturados 150ml de Tris, com 50ml de metanol e 50ml de água destilada (Tampão A1). No ânodo 2 foram misturados 12,5ml de Tris, com 50ml de metanol e 187,5ml de água destilada (Tampão A2). No cátodo foram misturados 12,5ml de Tris, com 25ml do ácido capróico (0.4mol/l), 50ml de metanol e 162,5ml de água destilada (Tampão C).

3.13.1 Transferência

A membrana de PVDF foi previamente ativada em metanol e lavada com água destilada. A placa de ânodo foi inicialmente coberta com duas camadas de papel filtro previamente imersos no tampão A1. Uma camada de papel filtro contendo tampão A2 foi colocada acima, seguida da membrana previamente imersa no tampão A2. O gel foi então colocado sobre a membrana, sempre tomando o devido cuidado para evitar bolhas de ar no sistema. Quatro camadas de papel filtro com tampão C foram colocadas sobre o gel. Uma pipeta de vidro foi utilizada para comprimir o sistema de transferência e expelir eventuais bolhas de ar. A placa do cátodo foi colocada sobre as folhas de papel filtro, o sistema foi conectado a uma fonte de eletroforese a 80mA por 1h e meia.

3.13.2 Tratamento da membrana

O tratamento da membrana foi realizado em tampão TBST (Tris pH 7.6 2,42g/L; NaCl 8g/L; Tween 20 1mL/L). Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado 5% em TBST durante toda a noite à 4°C. A membrana foi lavada com TBST por 5min e, em seguida, foi adicionado 50 ml de solução com o anticorpo primário em leite 1% TBST (Diluição do anticorpo primário – 1/10.000), que foi deixado sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora. Após incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada por 15 minutos com TBST, seguido de três lavagens por 5 minutos. A membrana, então, foi incubada com 50ml de solução contendo o anticorpo secundário (anti IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase – GE Healthcare) na diluição de 1/5.000 a temperatura ambiente por 1 hora. Novamente a membrana foi lavada com TBST por 15min, seguido de três lavagens por 5 minutos. Finalmente, a membrana foi submetida à etapa de revelação utilizando o sistema ECL Plus (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. Os sinais foram revelados utilizando um sistema de fotodocumentação UVP.

3.14 COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA GLUTAMINA SINTETASE

A sequência de aminoácidos da proteína Glutamina sintetase (*glnA*) de *H. seropedicae* foi comparada com as α -Proteobactérias *Rhodospirillum rubrum*, *Azospirillum brasilense*, *Sinorhizobium meliloti* e *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC 6803 com a β -Proteobactéria *Azoarcus* sp. BH72 e com a γ -Proteobactéria *Escherichia coli*, utilizando o programa Bio Edit Sequence Alignment Editor versão 7.0.5.3 (HALL, 1999).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 GÉIS BIDIMENSIONAIS DAS ESTIRPES SMR1, LN $glnK$ del (*glnK*) e LN $glnB$ (*glnB*)

Sabe-se que em *E. coli* as proteínas da família PII desempenham um papel chave no controle da enzima GS, regulando sua expressão e modificação pós-traducional através de adenililação reversível (Introdução item 2.4). O estudo aqui apresentado procurou saber se as proteínas PII também estariam envolvidas na regulação da expressão e modificação pós-traducional da proteína glutamina sintetase em *H. seropedicae*.

A análise proteômica diferencial das estirpes SMR1, LN $glnK$ del(*glnK*) e LN $glnB$ (*glnB*) de *H. seropedicae*, cultivadas em baixa ou alta concentração de amônio (NH₄Cl), foi feita a partir das triplicatas biológicas de géis bidimensionais mostrados nas figuras abaixo. Análises por espectrometria de massas dos pontos protéicos retirados dos géis bidimensionais revelou a presença de três pontos protéicos referentes à proteína glutamina sintetase, e que possivelmente sejam referentes a diferentes isoformas. Duas isoformas da enzima GS de *H. seropedicae* já haviam sido descritas por Chaves *et al* (2007), quando trabalharam com géis bidimensionais na faixa de pH 3 a 10 (13 cm).

Cada isoforma presente nos géis 2D foi numerada com um “Spot ID” único. Nas figuras abaixo, está representado na abscissa a faixa de pH utilizada e na ordenada o padrão de peso molecular em kDa. As três isoformas da proteína glutamina sintetase visualizadas estão destacadas no gel.

A Figura 2 (a, b e c) representa a triplicata biológica da estirpe selvagem, SMR1, cultivada em 2mmol/l de NH₄Cl.

A Figura 3 (a, b e c) representa a triplicata biológica da estirpe selvagem, SMR1, cultivada em 20mmol/l de NH₄Cl.

A Figura 4 (a, b e c) representa a triplicata biológica da estirpe mutante LN $glnK$ del(*glnK*), cultivada em 2mmol/l de NH₄Cl.

A Figura 5 (a, b e c) representa a triplicata biológica da estirpe mutante LN $glnK$ del(*glnK*), cultivada em 20mmol/l de NH₄Cl.

A Figura 6 (a, b e c) representa a triplicata biológica da estirpe mutante LN $glnB$ (*glnB*), cultivada em 2mmol/l de NH₄Cl.

A Figura 7 (a, b e c) representa a triplicata biológica da estirpe mutante LNglNB(*glnB*), cultivada em 20mmol/l de NH_4Cl .

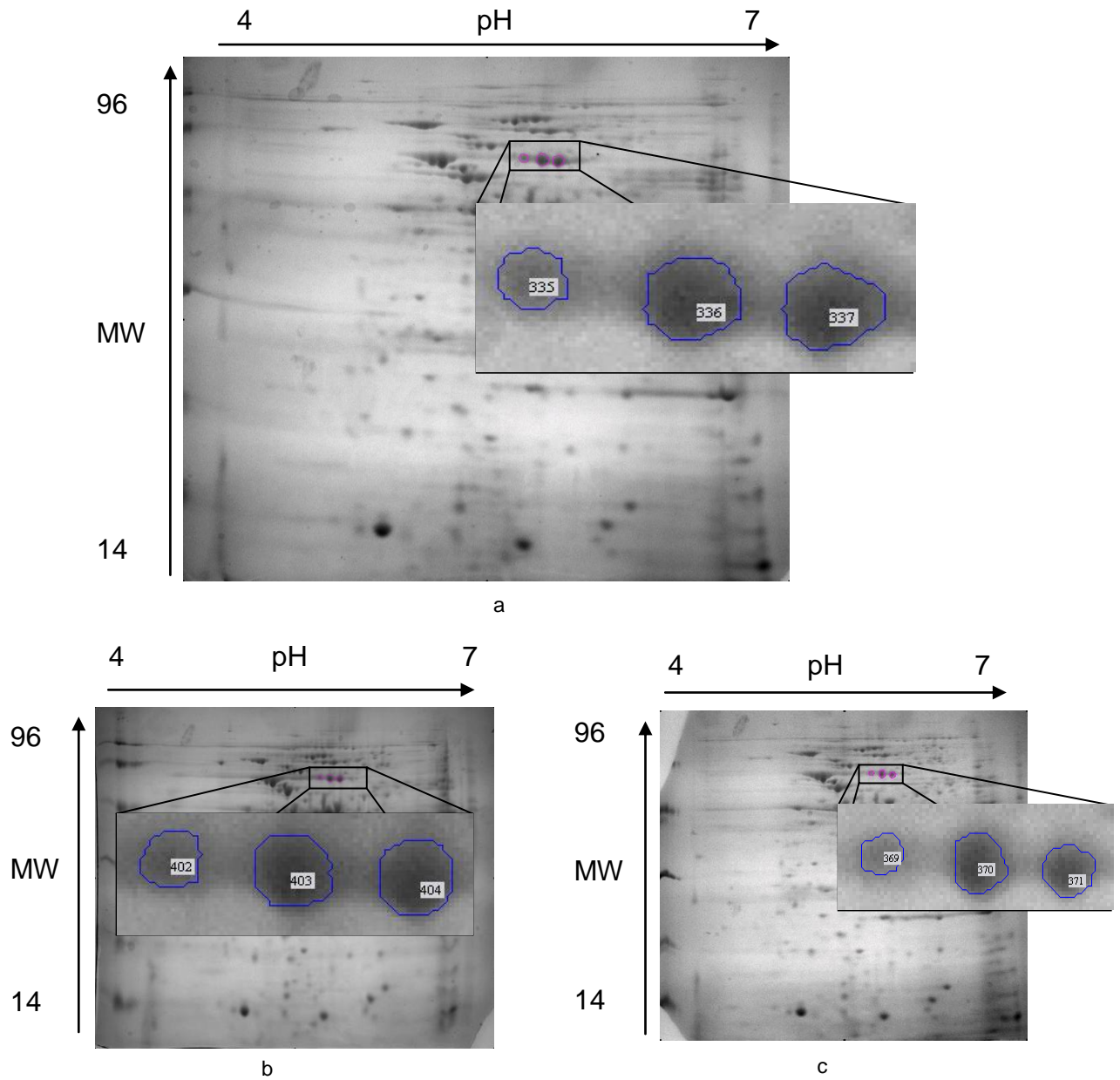


FIGURA 02 (a, b e c): Gel bidimensional da estirpe SMR1 cultivada na presença de 2mmol/l de NH_4Cl . Os pontos protéicos correspondentes as isoformas da proteína glutamina sintetase estão destacados na figura.

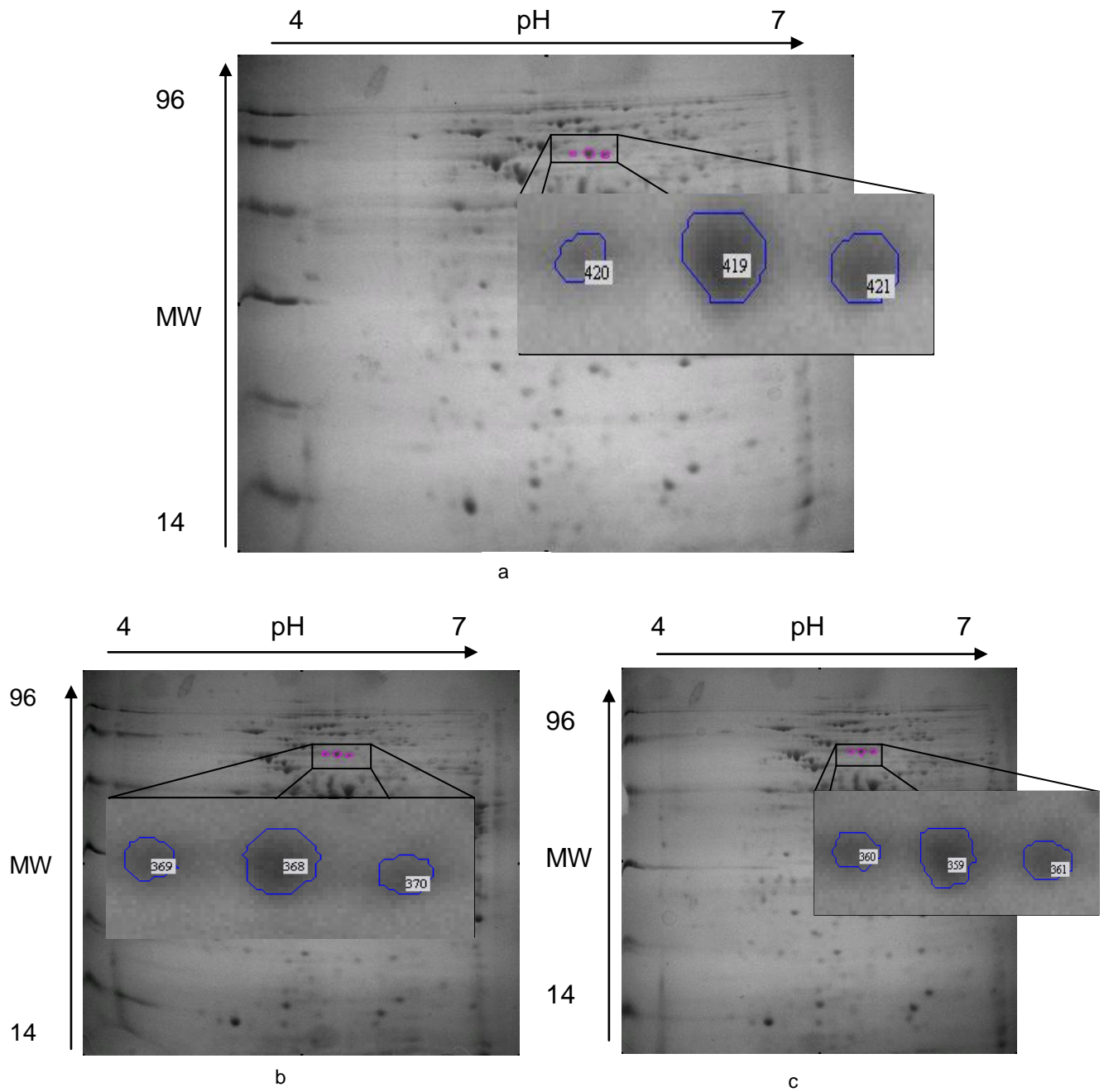


FIGURA 03 (a, b e c): Gel bidimensional da estirpe SMR1 cultivada na presença de 20mmol/l de NH_4Cl . Os pontos protéicos correspondentes as isoformas da proteína glutamina sintetase estão destacados na figura.

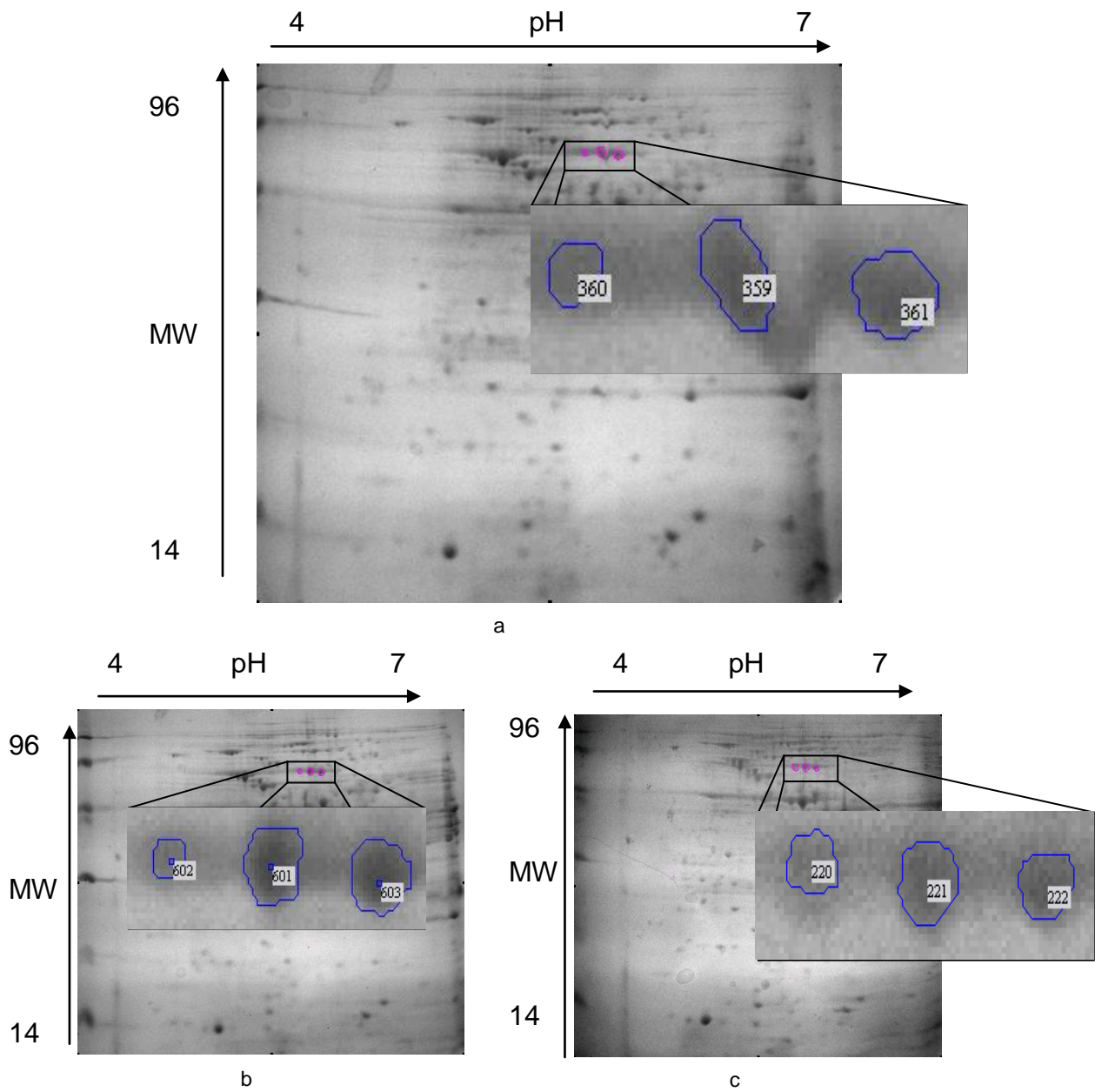


FIGURA 04 (a, b e c): Gel bidimensional da estirpe LN*glnKdel(glnK)* cultivada na presença de 2mmol/l de NH_4Cl . Os pontos protéicos correspondentes as isoformas da proteína glutamina sintetase estão destacados na figura.

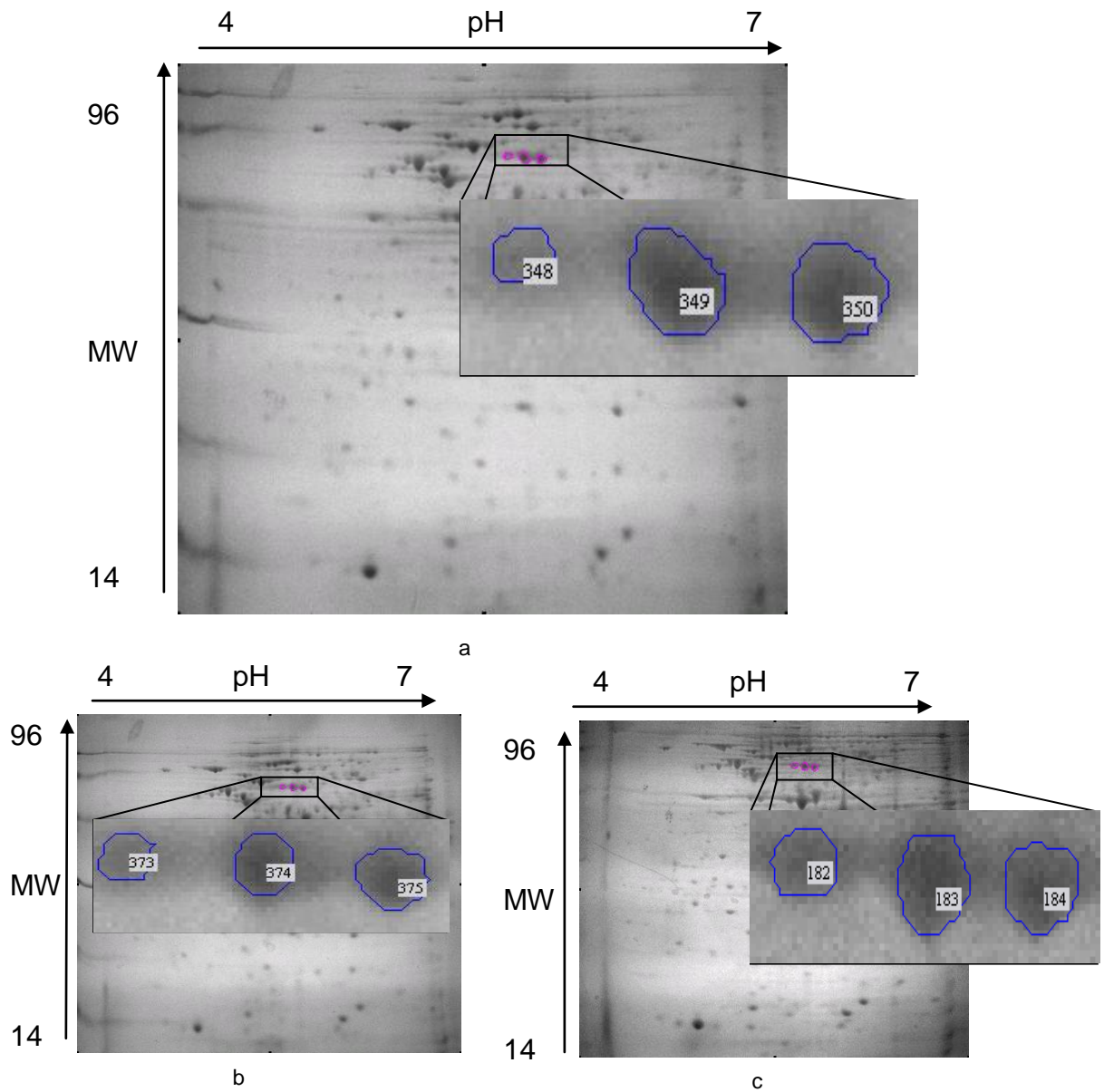


FIGURA 05 (a, b e c): Gel bidimensional da estirpe LNgInKdel(*glnK*) cultivada na presença de 20mmol/l de NH_4Cl . Os pontos protéicos correspondentes as isoformas da proteína glutamina sintetase estão destacados na figura.

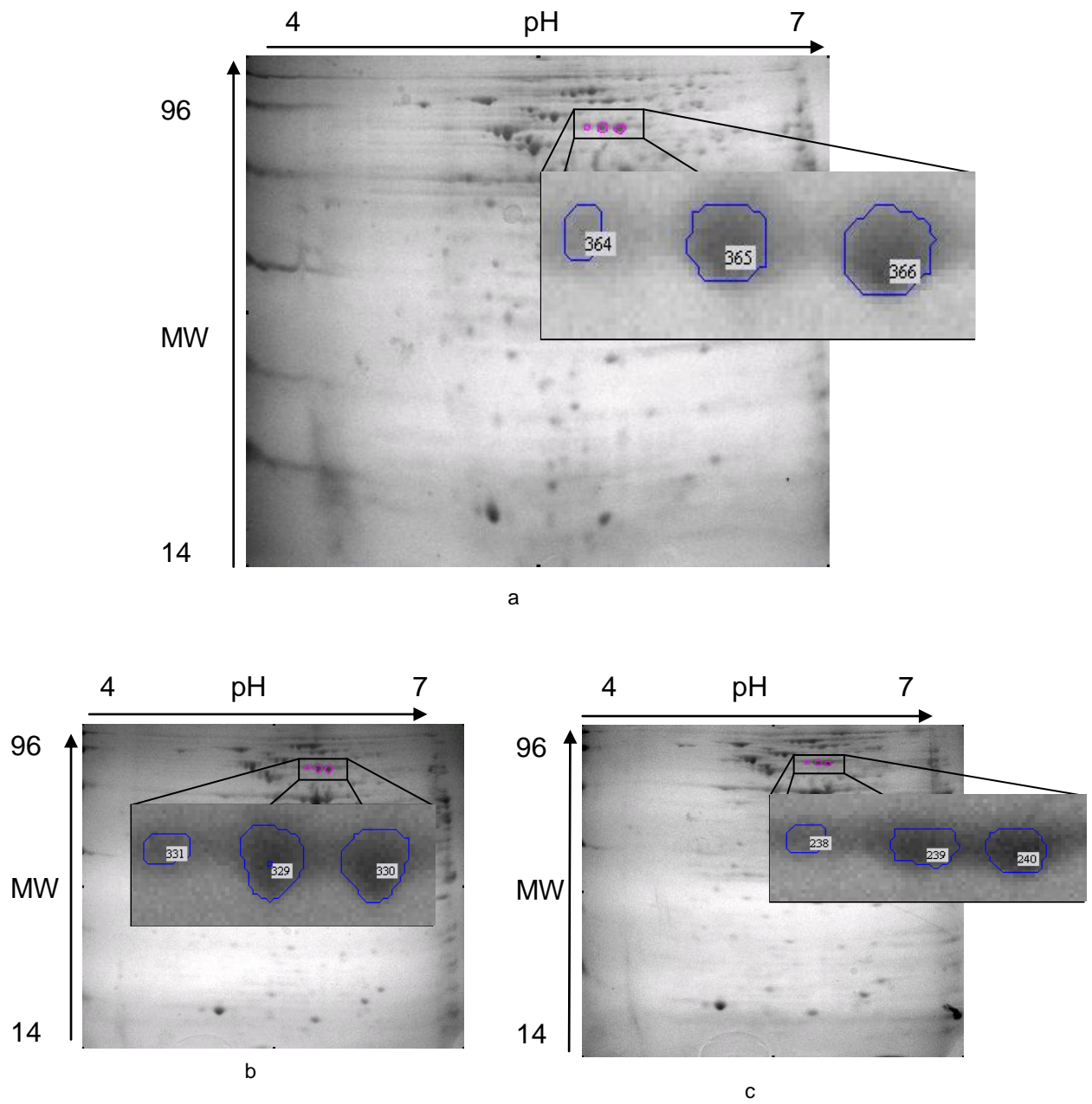


FIGURA 06 (a, b e c): Gel bidimensional da estirpe LNgInB(*glnB*) cultivada na presença de 2mmol/l de NH_4Cl . Os pontos protéicos correspondentes as isoformas da proteína glutamina sintetase estão destacados na figura.

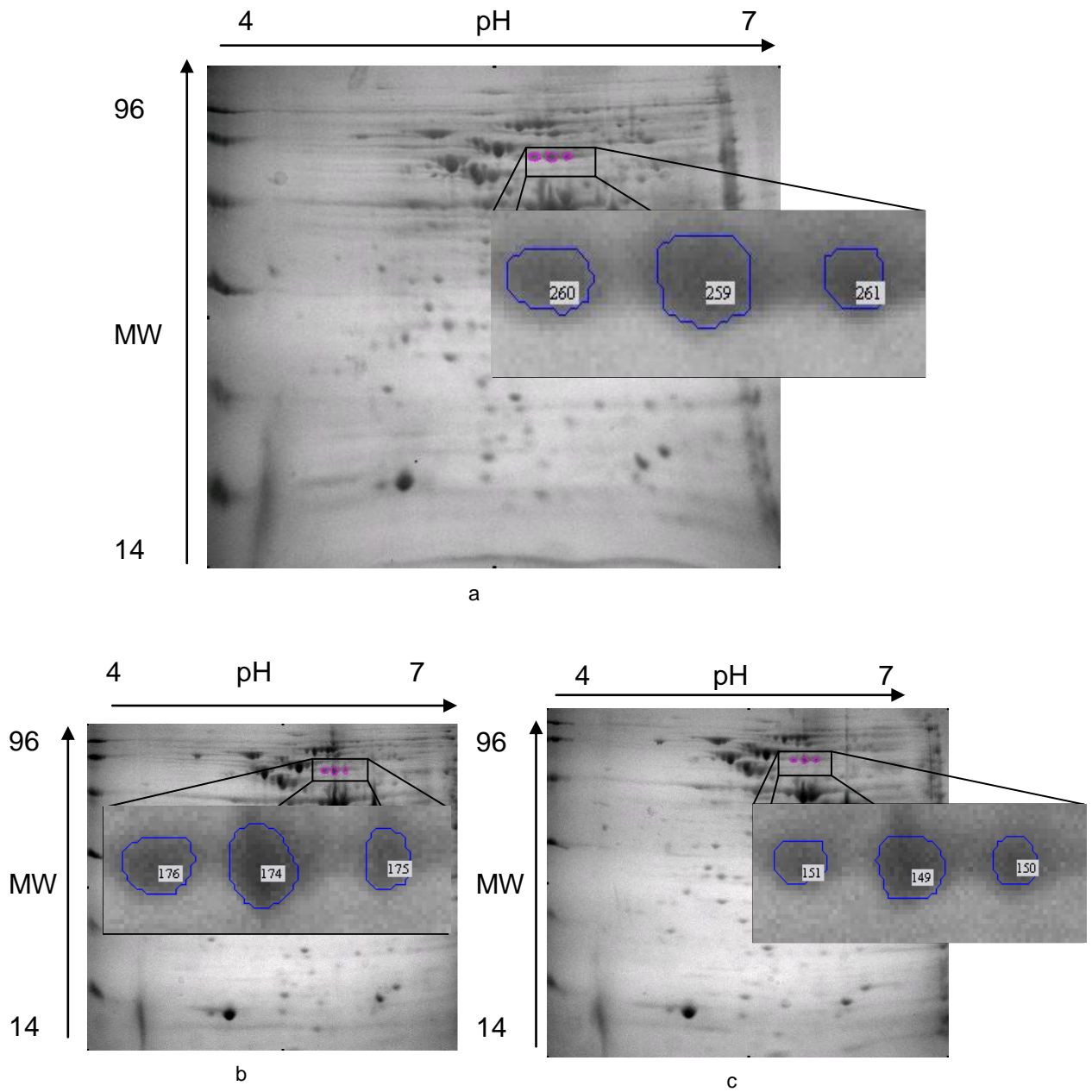


FIGURA 07 (a, b e c): Gel bidimensional da estirpe LN $glnB(glnB)$ cultivada na presença de 20mmol/l de NH_4Cl . Os pontos protéicos correspondentes as isoformas da proteína glutamina sintetase estão destacados na figura.

4.2 IMUNODETECÇÃO

Para confirmar a presença da terceira isoforma da proteína glutamina sintetase foi realizado imunodeteccção com anticorpo Anti-GS de *E. coli* em um gel bidimensional (pH 4 a 7, 18 cm) da estirpe SMR1 cultivada em 20mmol/l de NH_4Cl .

A imunodeteccção resultou em apenas quatro pontos, que apresentaram reação contra o anticorpo Anti-GS, no gel da estirpe SMR1 cultivada em 20mmol/l de NH_4Cl .

Esses quatro pontos protéicos representam isoformas da proteína glutamina sintetase de aproximadamente mesma massa, mas com variações de pI.

As isoformas representadas em 1, 2 e 3 são aquelas resolvidas nos géis bidimensionais pH (4 a 7) 13cm.

A isoforma 4, com pH mais básico, só foi bem resolvida utilizando gel bidimensional pH (4 a 7) 18cm.

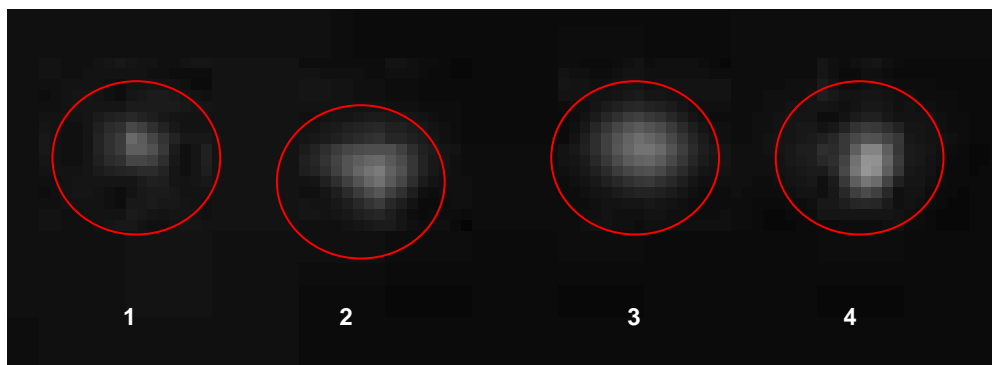


FIGURA 08 - Imunodeteccção por anticorpo Anti-GS de *E. coli* do gel bidimensional da estirpe SMR1 cultivada em 20mmol/l de NH_4Cl , com 100 μg de proteína total, separadas por tiras IPG (4 a 7) 18cm.

4.3 ESPECTRO DOS PEPTÍDEOS DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA GLUTAMINA SINTETASE

Os pontos protéicos destacados nos géis bidimensionais foram digeridos com tripsina e os espectros das isoformas proteína glutamina sintetase foram obtidos por espectrometria de massa através do programa de computador Flex Control e analisados pelo programa Flex Analysis.

Nas figuras 21 e 22 são apresentados os espectros das isoformas da proteína glutamina sintetase na estirpe SMR1 cultivada em 20mmol/l de NH_4Cl . Para

cada figura, o primeiro espectro se refere à nova isoforma, com pH mais ácido, cuja modificação pós-traducional ainda é desconhecida, o segundo espectro da isoforma adenililada e o terceiro espectro da isoforma desadenililada, como discutido na sequência. Na abscissa está representada a relação massa/carga e na ordenada a intensidade relativa de cada pico. Não foi obtido espectro da quarta isoforma, com pH mais básico, da GS revelada por imunodeteção, pois a mesma, não se encontrava resolvida nos géis bidimensionais pH (4 a 7) 13cm.

De acordo com o que foi sugerido por Chaves *et al* (2007), a proteína glutamina sintetase de *H. seropedicae* sofre modificação pós-traducional por adenililação no resíduo de Tyr-400, localizado no peptídeo resultante da digestão trípica cuja massa é de 1355 Da (DL^YHLPPEEDK). O grupamento AMP acrescenta uma massa de 329 Da (CHAVES *et al*, 2007), gerando um peptídeo cuja massa é de 1684 Da.

Como mostrado na figura 21, a modificação pós-traducional por adenililação também está presente na terceira isoforma apresentada neste trabalho, sugerindo que nesta isoforma a reação de adenililação e de uma possível segunda modificação pós traducional podem ocorrer simultaneamente.

Em *R. rubrum* a modificação por adenililação e por ADP-ribosilação são reações exclusivas e não ocorrem simultaneamente (WOEHLE *et al*, 1990).

A figura 22 evidencia uma segunda região do espectro das isoformas apresentadas. O primeiro espectro está representando o pico cuja massa corresponde a 1990 Da e, que por estar presente somente na primeira isoforma, pode se referir ao pico com modificação. Infelizmente as análises por espectrometria de massas foram insuficientes para determinar a identidade da possível modificação pós-traducional da nova isoforma da GS.

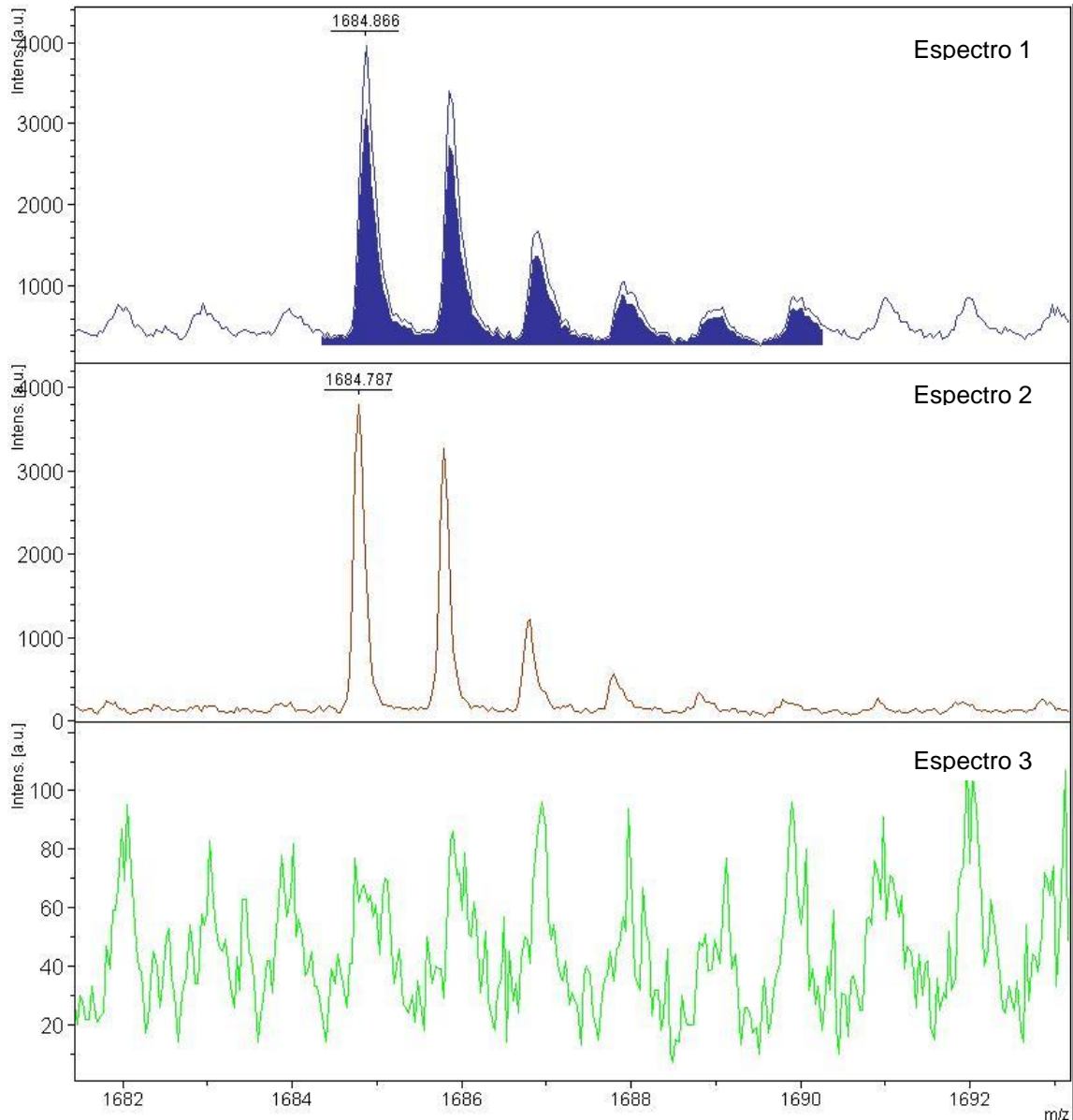


FIGURA 09: Espectros das isoformas da proteína glutamina sintetase da estirpe SMR1 cultivada em 20mmol/l de NH_4Cl , evidenciando a região do espectro de massa 1684 Da. Os spots foram retirados dos géis e digeridos com tripsina.

Espectro 1 – Isoforma com pH mais ácido;

Espectro 2 – Isoforma adenilada;

Espectro 3 – Isoforma desadenilada.

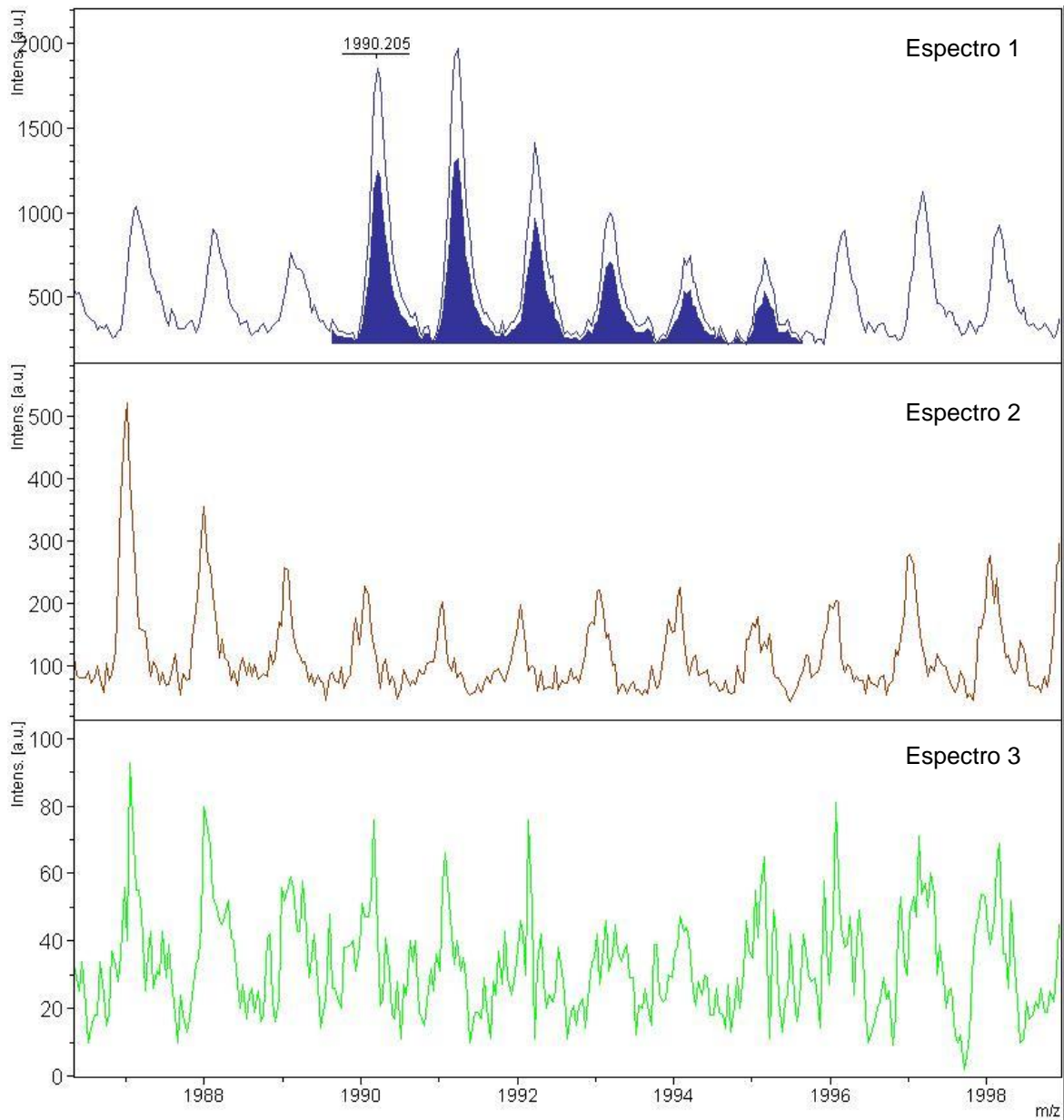


FIGURA 10: Espectros das isoformas da proteína glutamina sintetase da estirpe SMR1 cultivada em 20mmol/l de NH_4Cl , evidenciando a região de massa de 1990 Da. Os spots foram retirados dos géis e digeridos com tripsina.

Espectro 1 – Isoforma com pH mais ácido;

Espectro 2 – Isoforma adenililada;

Espectro 3 – Isoforma desadenililada.

4.4 ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE VOLUME DAS ISOFORMAS DA GS NAS ESTIRPES SMR1, LNglNkdel(*glnK*) e LNglNB(*glnB*)

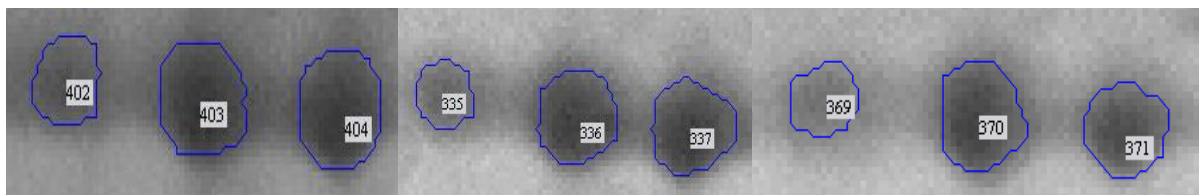
O programa utilizado para se fazer a análise quantitativa dos pontos protéicos foi o ImageMaster 2D Platinum v.6.01. Após a identificação de cada ponto protéico pelo seu ID correspondente automaticamente e manualmente, para melhor delineamento do ponto protéico identificado pelo programa, o volume relativo de cada ponto protéico foi calculado.

Os dados apresentados abaixo mostram as imagens (Figuras 11, 12 e 13) das isoformas obtidas das triplicatas dos géis de cada estirpe e em cada condição estudada e, nas respectivas tabelas 1, 2 e 3, o volume relativo de cada isoforma no gel. O gel de referência, aquele com maior quantidade de pontos protéicos bem definidos, para cada condição é aquele cujo nome está marcado em vermelho. Em cada figura, a isoforma adenililada está representada pelo spot central, enquanto que a isoforma desadenililada está representada pelo spot à direita. O spot representado à esquerda se refere à nova isoforma encontrada nos géis. A quarta isoforma, com pH mais básico, identificada por imunodeteção não se apresentava resolvida nos géis pH (4 a 7) 13 cm corados com Comassie coloidal.

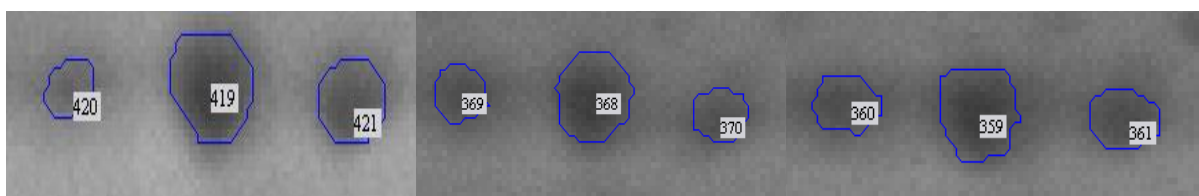
O gráfico 01 indica a média dos spots de cada isoforma nas diferentes estirpes e o desvio padrão.

Nome dos Géis	Spot ID	% Vol
SmR1 2mmol/l 1	402	13
	403	44
	404	43
SmR1 2mmol/l 2	335	14
	336	39
	337	47
SmR1 2mmol/l 3	369	17
	370	41
	371	42
SmR1 20mmol/l 1	420	15
	419	49
	421	36
SmR1 20mmol/l 2	369	17
	368	56
	370	27
SmR1 20mmol/l 3	360	15
	359	62
	361	23

TABELA 01: Spot ID dos pontos protéicos encontrados na triplicata dos géis SMR1 cultivados em 2mmol/l ou 20mmol/l de NH_4Cl , referentes as isoformas da proteína glutamina sintetase e seus respectivos volumes (em %). Os géis referenciais são aqueles destacados em vermelho.



a



b

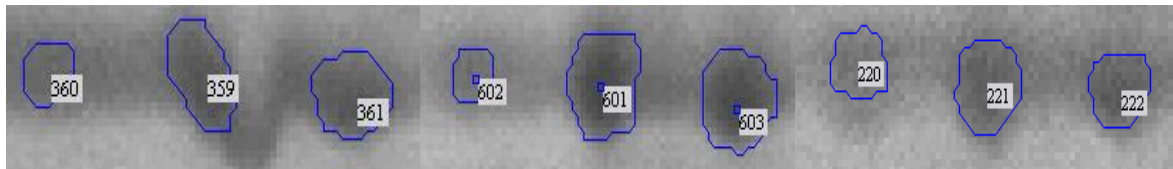
FIGURA 11: Imagem da triplicata dos géis bidimensionais evidenciando as isoformas da proteína glutamina sintetase na estirpe SMR1.

Em a, SMR1 cultivada em 2mmol/l de NH_4Cl .

Em b, SMR1 cultivada em 20mmol/l de NH_4Cl .

Nome dos Géis	Spot ID	% Vol
GlnK 2mmol/l 1	360	10
	359	45
	361	45
GlnK 2mmol/l 2	602	10
	601	46
	603	44
GlnK 2mmol/l 3	220	11
	221	43
	222	46
GlnK 20mmol/l 1	348	8
	349	48
	350	44
GlnK 20mmol/l 2	373	12
	374	46
	375	42
GlnK 20mmol/l 3	182	16
	183	42
	184	42

TABELA 02: Spot ID dos pontos protéicos encontrados na triplicata dos géis *glnK* cultivados em 2mmol/l ou 20mmol/l de NH₄Cl, referentes as isoformas da proteína glutamina sintetase e seus respectivos volumes (em %). Os géis referenciais são aqueles destacados em vermelho.



a



b

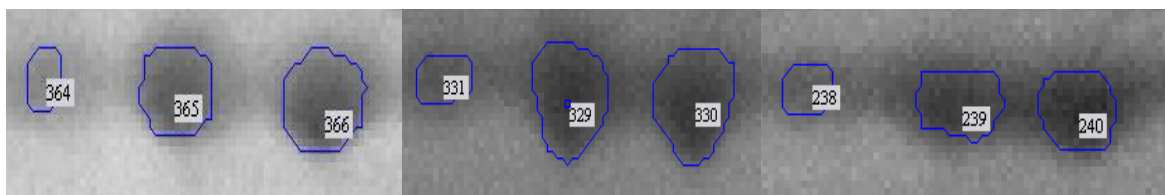
FIGURA 12: Imagem da triplicata dos géis bidimensionais evidenciando as isoformas da proteína glutamina sintetase na estirpe *glnK*.

Em a, *glnK* cultivada em 2mmol/l de NH₄Cl.

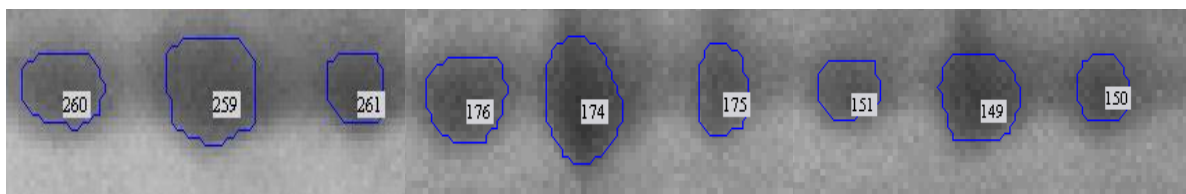
Em b, *glnK* cultivada em 20mmol/l de NH₄Cl.

Nome dos Géis	Spot ID	% Vol
GlnB 2mmol/l 1	364	7
	365	41
	366	52
GlnB 2mmol/l 2	331	12
	329	43
	330	45
GlnB 2mmol/l 3	238	10
	239	39
	240	51
GlnB 20mmol/l 1	260	23
	259	61
	261	16
GlnB 20mmol/l 2	176	27
	174	52
	175	21
GlnB 20mmol/l 3	151	19
	149	63
	150	18

TABELA 03: Spot ID dos pontos protéicos encontrados na triplicata dos géis *glnB* cultivados em 2mmol/l ou 20mmol/l de NH_4Cl , referentes as isoformas da proteína glutamina sintetase e seus respectivos volumes (em %). Os géis referenciais são aqueles destacados em vermelho.



a



b

FIGURA 13: Imagem da triplicata dos géis bidimensionais evidenciando as isoformas da proteína glutamina sintetase na estirpe *glnK*.

Em a, *glnK* cultivada em 2mmol/l de NH_4Cl .

Em b, *glnK* cultivada em 20mmol/l de NH_4Cl .

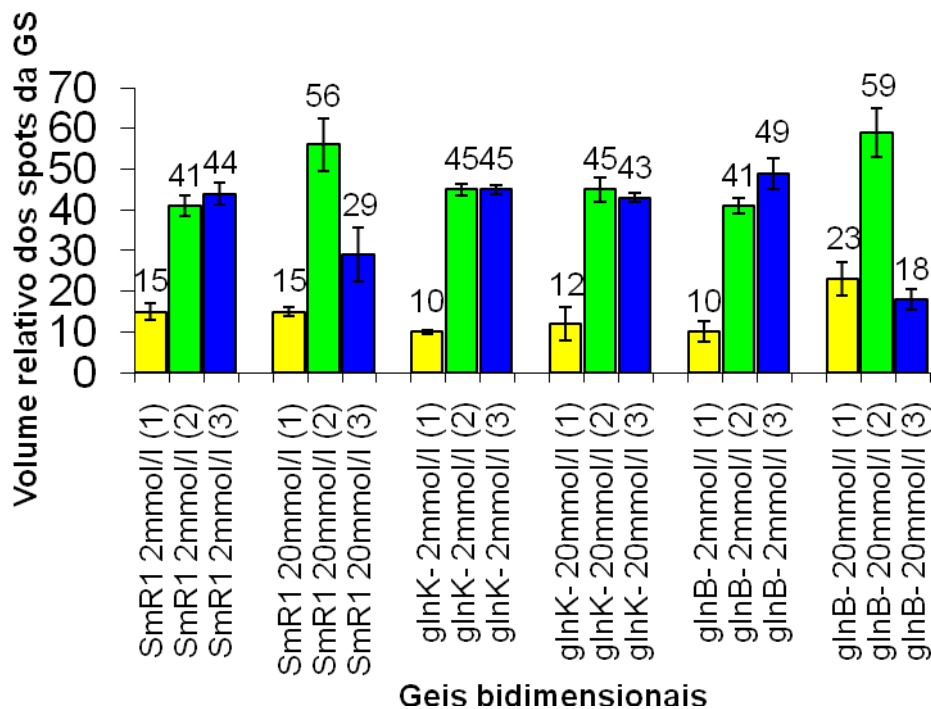


GRÁFICO 01 – Análise do volume das isoformas da proteína glutamina sintetase nas estirpes SMR1, LNglNkdel(*glnK*) e LNglNB(*glnB*)
Média da % de Volume na triplicata em cada condição, com o desvio padrão, para cada spot da GS apresentado nas três estirpes.

- (1) – Spot da GS com pH mais ácido, correspondente a nova isoforma.
- (2) – Spot da GS com grupamento AMP (Adenililada).
- (3) – Spot da GS sem grupamento AMP (Desadenililada).

Foi aplicado o teste “t” ao nível de 5% de significância, utilizando-se o programa Assistat Versão 7.5 Beta (SILVA, 1996; SILVA & AZEVEDO, 2002; SILVA & AZEVEDO, 2006; SILVA & AZEVEDO, 2009), para validação dos resultados de variação (% Volume) entre os spots da GS apresentados (ANEXO I).

Os dados mostrados no gráfico 01 indicam que na estirpe selvagem SMR1 e no mutante *glnB* ocorre variação de volume das isoformas adenililada e desadenililada como esperado (Introdução item 2.3). Esse resultado sugere que a proteína GlnB não participa da regulação de adenililação e desadenililação da GS. Esse resultado está de acordo com dados já descritos por Benelli (1997), em que o mutante *glnB* apresentou padrão de adenililação de GS inalterado.

Já no mutante *glnK*, essa variação de volume entre a isoforma adenililada e desadenililada não é observada. Este resultado sugere que a proteína GlnK pode participar da regulação da proteína glutamina sintetase em *H. seropedicae*.

Enquanto isso, a análise da terceira isoforma (mais ácida) mostrou que tanto na estirpe selvagem, SMR1 quanto no mutante *glnK* não houve variação de volume quando crescido em baixa ou alta concentração de amônio, enquanto que no mutante *glnB*, essa isoforma apresentou um aumento significativo de volume quando a bactéria foi crescida em alta concentração de amônio.

4.5 COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA GLUTAMINA SINTETASE

A comparação de sequências da proteína glutamina sintetase pode ajudar a revelar aminoácidos conservados em diferentes espécies de organismos, dando um indício de possíveis resíduos de ligação de modificações pós-traducionais.

A sequência de aminoácidos da proteína Glutamina sintetase (*glnA*) de *H. seropedicae* (Hs) foi comparada com as α -Proteobactérias *Rhodospirillum rubrum* (Rr), *Azospirillum brasilense* (Ab), *Sinorhizobium meliloti* (Sm) e *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC 6803 (Cs), com a β -Proteobactéria *Azoarcus* sp. BH72 (Az) e com a γ -Proteobactéria *Escherichia coli* (Ec), utilizando-se o programa Bio Edit Sequence Alignment Editor versão 7.0.5.3 (HALL, 1999).

```

Hs  MARTAAEVLKMKVDNEVKFVDFRFADTRGKEQHVSVPVSHFDIDKFESGHAFDGSSIAGWKGI--ASDM 68
Rr  -MSDVKTILEMIKENDVKFVDFRFTDPKQKWOHTAQYVTTIDEESLVEGIMFDGSSIAGWKDIN--ESDM 67
Ec  --MSAEHVLITMLNEHEVKFVDLRFDTKQKEQHVTIPAHQVNAEFFEKGKIMFDGSSIGWKGIN--ESDM 66
Sm  ---MTLDDLSTFAREKGVKVFMSYTDLEGG-QRAKLVPAEAIADMQKGGAGFAG--FATWFDLTPAHPDL 64
Cs  MARTPQEVLKWIQDENIKIIDLKFIDTFGIWQHCSFYDQLDENSFTEGIPFDGSSIRGWKAIN--ESDM 68
Ab  -MSDISKVFEDLIKEHDVKYVVDLRFDTPRGKLLHHTAQHVSTIDEDVFEDGIMFDGSSIAGWKAIN--ESDM 67
Az  --MNAQDVMKMIQENEVRFVDLRFDTTRGKEQHVGLPVSAFEEDHFEHGHFVDGSSIAGWKGIQ--ASDM 66

Hs  LLIPDPNTANIDPFMEETTLFMQCDVIEPSDGGKGYDRDPRSIAKRAEAYLKSSGLGDTAYFGPEPEFFTF 138
Rr  ILKPDLSAFMDPFSAPQLVLFCDVLEPSTGQPYERCPRSIAKKALSYLASTGIGDTSYFGPEAEFFTF 137
Ec  VLMPDASTAVIDPFADSTLIIRSILLEPGTLQGYDRDPRSMSKRAEDYLRSTGIADTVLFGPEPEFFTF 136
Sm  FALPDASAVIQLPWKKDVAVVAADCIMDDAP---VEQAPRVVLKKLVAEAAQEGLR--VKTGVEPEFFTF 129
Cs  CMVPDENTATIDPFCKEPTLSMICSLEKERTGEWYNRDPRTIAAKAAEYLRGTGIADTVYFGPEAEFFTF 138
Ab  ILQLDPTTAVMDPFSAPQTLNLCVYEPSTGQPYARCPRGIAKAAEKYMASAGIGDTAYFGPEAEFFTF 137
Az  ILLPDAASAYIDPFDETTLVLACDVIEPSDGGKGYDRDPRSIAKRAEAYLKSTGIGDTAIFGPEPEFFTF 136

Hs  DGVRWGADMSGSFVKIDSEEAWSSTGAKIEGGNSGH RPTVKGGYFPVPPVDSFQDMRSEMSLIIESLIGIP 208
Rr  DDVRFDVSMNRVMYEVDSSEEGPYVTGKIFDEGNYGH RPPKGGYFPVPPVDSAQDLRAEMLSTMAEIGMP 207
Ec  DDIREGSSISGSHVAIDDIIEGAWNSSTQYEGGNKGH RPAVKGGYFPVPPVDSAQDIRSEMMLVMEQMLV 206
Sm  S-----PDGSKISDTFDTAEKPE-----CYDQQAIMRRYDVITAEICDYMLELGNK 173
Cs  DDIREGQTENSSYYFADSVIEGRWNTGREEEGNLYG KPGYKQGYFPVAPTDTAQDIRTEMLLTMAAFGVP 208
Ab  DDVRFKVMNKVSYEFDSEEGPYTSDKDYEDGNLGH RPGVKKGGYFPVAPVDSGSLRAEMLSVLAEMGVP 207
Az  DAVEWSVDMSGVYSKIIISEEAWSSTADKFEGGNTGH RPKVKKGGYFPVPPVDSLNDIRAAAMVLALEAAGIP 206

```

Hs	VEVHHHEVAGAGQNELGTFKSTLVERADWTQTMKYVWVNVVAHTYGKTATFMPKPLVGDNGSGMHVHQS	VW	278
Rr	VEKHHHEVAPS-QHELGVRENTLIEAADDQKYKYVVMVAHAYGKTATFMPKPIAGDNGSGMHVHQS	IW	276
Ec	VEAHHHEVATAGONEVATRENTMTKKADEIQIYKYVHNVAHRFGKTATFMPKPMFGDNGSGMHCHMSLS		276
Sm	PYQNDHEDANG-QFEMNWEYDDALRTADKHSFFKFMVKSIAEKHGLRATFMPKPKFGLTGNCGCHCHISVW		242
Cs	IEKHHHEVASGGQNELGIFKFDKLVNSADNLMYKYVTKNVAKKYGKTVTFMPKPIFNDNGSGMHVHQS	IW	278
Ab	VEKHHHEVAAS-QHELGIKFDTLVRTGDNMQYYKYVHNVAHAYGKTATFMPKPVFGDNGSGMHMHQS	IW	276
Az	VEVHHHEVANAGQCEIIGTKFSTLTKRADWTQTLKYIVHNVAHQYGKTATFMPKPIVGDNGSGMHVHQS	IW	276
Hs	KDG--KPLFAG-DGYAGLSEFALYYIGGIKHKAKALNAITNPGTNSYKRL-VPGFEAPVKLAYSARNRSA		344
Rr	KDG--KPLFAG-SGYADLSEMALYYIGGIKHKAKALNAFTNPSTNSYKRL-IPGFEAPVLLAYSARNRSA		342
Ec	KNG--VNLFAG-DKYAGLSEQALYYIGGIKHKAKALNALANPTTNSYKRL-VPGYEAPVMLAYSARNRSA		342
Sm	DLAGEVNAFADNKAEFGLSAEGRHFTGGIMKHASALAAVNTNPTVNSYKRLINAPRTISGATWAPNSVTWTG		312
Cs	KDG--QPLFAG-DKYAGFSQMGWLWYIGGILKHAPALLAFTNPPTNSYKRL-VPGFEAPVNLAYSQGNRSA		344
Ab	KEG--QPLFAG-NQYADLSELALYYIGGIKHKAKALNAFTNPPTNSYKRL-VPGYEAPVLLAYSARNRSA		342
Az	KDG--QNLFAG-NGYAGLSETALYYIGGIKHKARALNAITNPATNSYKRL-VPHYEAPTKLAYSARNRSA		342
Hs	SIRIPHVA-NPKGRRIETFRFPDPLANPYLCFSALLMAGLDGVQNKIHPGEAATKDL	Y	HLPPEEDKLIPTV 413
Rr	SCRIPYVA-SPKGRVEVRFPDAAANPYLAFAAMMAGIDGIENKIHPGDFMDKNL	Y	DLPPEELMGIPTV 411
Ec	SIRIPVVS-SPKARRIEVRFPDPAANPYLCFAALLMAGLDGIKNIHPGEAMDKNL	Y	DLPPEEAKEIPOV 411
Sm	NNRTHMVR-VPGPGRFELRLPDGAVNPYLLQAIITIAAGLSGVRSKADPGRHYDIDM	Y	KDG-HKVTDAFKL 380
Cs	SVRIPLSGGNPKAKRLEFRCPDATSNPYLAFAAMLCAIDGINKQIDPGEPLDVDI	Y	DLSPEELAKIPST 414
Ab	SCRIPYVA-SPKGRVEVRFPDPSANPYLAFAALLMAGLDGIQNKIHPGEAMDKNL	Y	DLPAAELAKVPTV 411
Az	SIRIPYVA-NPKGRRIESRFPDPAANPYLCFAALLMAGLDGIQNKIHPGDFADKNL	Y	DLPPEEDALIPTV 411
Hs	CSSLDEALEHLDKDREFLTRGGVFTDSMIDAYIDLKMQ-EVQRFRTTHPIEFDMYYSL		471
Rr	CGSLREALDSLNADEFLKKGCVFTDDMIDGYVALKWE-EVYNLEHAPHPPIEYKMYYSV		469
Ec	AGSLEALNELDLDFEFLKAGGVFTDEAIDAYIALRRE-EDDRVRMTPHPVEFELYYSV		469
Sm	PLNLLDALREYNRDEFLQEQALG---REFSAAYLKQKQ-EWNTYCSQFTEWEHQTTLDV		435
Cs	PGSLEAALAELEKDEFLTGTGVFSPDFVESWIEYKLDNEVNPMLRPHPHYEFSLYYDC		473
Ab	CGSLREALDSLKADSAFLQKGDVFTKDMIESYIDLRT-ELLAFETMHPPIEYKMYYSV		469
Az	CTSLDQALEYLDKDFEFLTRGGVFSNDFIDAYIELKME-EVNRLRVTHPVEFDLYYSL		469

FIGURA 14: A sequência de aminoácidos da proteína Glutamina sintetase (*glnA*) de *H. seropedicae* (Hs) foi comparada com as α -Proteobactérias *Rhodospirillum rubrum* (Rr), *Azospirillum brasilense* (Ab), *Sinorhizobium meliloti* (Sm) e *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC 6803 (Cs), com a β -Proteobactéria *Azoarcus* sp. BH72 (Az) e com a γ -Proteobactéria *Escherichia coli* (Ec), utilizando-se o programa Bio Edit Sequence Alignment Editor versão 7.0.5.3 (HALL, 1999).

Como já mencionado, foi sugerido por Chaves *et al* (2007) que a proteína glutamina sintetase de *H. seropedicae* sofre modificação pós-traducional por adenilação no resíduo de Tyr-400. Como pode ser visto na comparação das sequências entre as bactérias apresentadas, esse resíduo, destacado em vermelho, é conservado em todas as bactérias comparadas.

Partindo deste conhecimento, a comparação da sequência entre as bactérias busca encontrar possíveis resíduos alvos de alguma outra modificação pós-traducional, tendo como base a bibliografia apresentada para a proteína glutamina sintetase.

De acordo com Woehle *et al* (1990) e Silman *et al* (1995) as bactérias *R. rubrum*, *C. synechocystis* apresentam uma terceira modificação da GS por ADP-ribosilação *in vitro*. Liu e Kahn (1994) mostraram que a proteína glutamina sintetase III de *S. meliloti* é modificada por ADP-ribosilação *in vivo*.

Penyige *et al* (2009) em um estudo realizado com gel bidimensional e espectrometria de massas mostrou que a proteína glutamina sintetase de *Streptomyces coelicolor* M145 também é modificada por ADP-ribosilação.

O aminoácido receptor da ADP-ribosilação ainda é incerto nas bactérias estudadas, mas de acordo com o estudo feito *in vitro* por Moss *et al* (1990), na bactéria *E. coli*, o sítio de ligação da ADP-ribosilação foi o Arg-172, destacado em verde. Este resíduo não é tão conservado como o identificado para adenililação, além disso, o resíduo de arginina 172 possui uma localização pouco acessível a uma eventual proteína catalisadora da adição/remoção de um radical químico, como pode ser visto na figura a seguir, originada da proteína glutamina sintetase de *Salmonella typhimurium* (St), cuja sequência de aminoácidos possui 94% de identidade com a proteína glutamina sintetase de *Herbaspirillum seropedicae* (Hs) (ANEXO II).

Como pode ser visto na figura 24, o resíduo de Tyr-400, em vermelho, está localizado mais na superfície, quando comparado com o resíduo de Arg-172, em verde, que está localizado em uma região menos acessível a uma possível proteína reguladora.

Embora diversos trabalhos sugiram uma terceira modificação da proteína glutamina sintetase por ADP-ribosilação, em *H. seropedicae* não foi possível até o momento demonstrar que essa nova modificação tenha sido por ADP-Ribosilação.

Além disso, uma procura no genoma de *H. seropedicae* não revelou nenhuma possível ORF anotada como ADP-Ribosiltransferase (Dado não mostrado).

Outra possível modificação da proteína glutamina sintetase se deve a oxidação. Levine *et al* (1981) em um estudo feito com a proteína glutamina sintetase de *E. coli* comenta que a proteína pode ser inativada por oxidação, um processo que precede à degradação proteolítica da enzima. Em outro estudo Levine (1983a), Levine (1983b) e Farber & Levine (1986) comentaram que a oxidação se deve a introdução de um grupo carbonila em um resíduo de histidina, podendo ocorrer *in vivo*. Martin *et al* (1997) mostraram que a proteína glutamina sintetase de *Anabaena*

variabilis também está sujeita a inativação por oxidação, não sendo devido a um mecanismo regulatório de assimilação de nitrogênio.

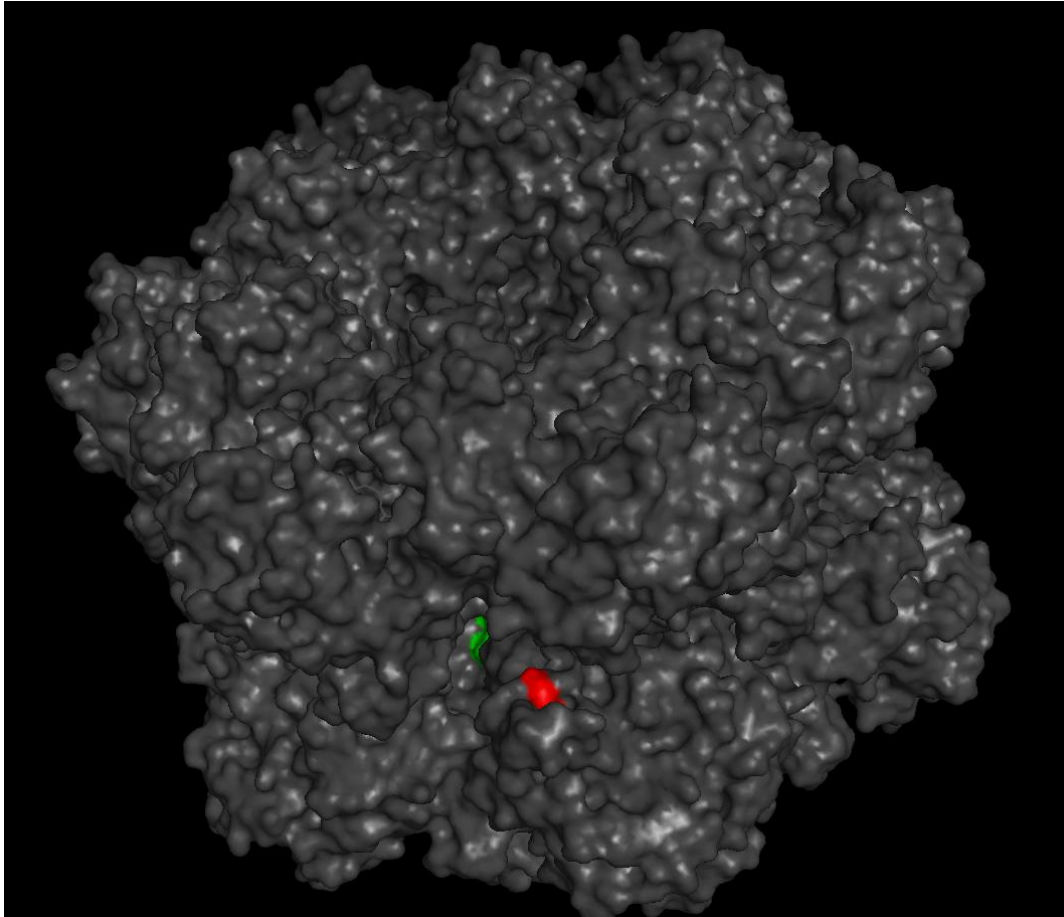


FIGURA 15: Estrutura tridimensional da proteína glutamina sintetase de *Salmonella typhimurium*, retirada do programa RSCB Protein Data Bank e analisada utilizando-se o programa PyMOL.

Em vermelho, onde está localizado o resíduo de Tyr-400.

Em verde, onde está localizado o resíduo de Arg-172.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que a concentração de amônia modifica o padrão de expressão das isoformas da proteína Glutamina sintetase nas estirpes SMR1, LN $glnK$ del(*glnK*) e LN $glnB$ (*glnB*) de *Herbaspirillum seropedicae*.

Quatro isoformas da proteína glutamina sintetase estão presentes na estirpe SMR1 de *Herbaspirillum seropedicae* detectadas por imunodeteccção.

As isoformas possuem aproximadamente mesma massa molecular, mas com pI ligeiramente diferentes.

A proteína GlnK parece interferir na regulacção de adenililacção da GS.

A proteína GlnB parece interferir na regulacção da isoforma mais ácida da GS.

A presenca de duas outras isoformas da enzima glutamina sintetase, além das isoformas adenililada e desadenililada, sugere que o controle fino da atividade dessa enzima é de fundamental importância para o metabolismo nitrogenado e energético de *Herbaspirillum seropedicae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOT, A. A post-genomic challenge learning to read patterns of protein synthesis. **Nature**, v. 402, p. 715-720, 1999.

AEBERSOLD, R. Constellations in a celular universe. **Nature**, v.422, p. 115-116, 2003.

AEBERSOLD, R.; GOODLET, D.R. Mass spectrometry in proteomics. **Chem. Rev.**, v.101, p.269-295, 2001.

ANTONYUK, L. P. Glutamine synthetase of the Rhizobacterium *Azospirillum brasiliense*: Specific features of catalysis and regulation. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.43, n.3, p.244-249, 2007.

ARCONDÉGUY, T; JACK, R; MERRICK, M. PII Signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 01, p. 80-105, mar., 2001.

ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; WEISS, R. L. A.; NINFA, A. J. Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI ou NtrC). **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 11, p. 28288 – 28293, nov., 1994.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen.nov, sp. nov., a root-associate nitrogen-fixing bacterium, **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.36, n.1 p.86-93, 1986.

BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Evidence for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4623-4626, 1997.

BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. Reviews: **TIBTECH**, v.17, p.121-127, 1999.

BONATTO, A. C.; COUTO, G. H.; SOUZA, E. M.; ARAÚJO, L. M.; PEDROSA, F. O.; NOINDORF, L.; BENELLI, E. M. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**, v. 55, p. 293–299, 2007.

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

BURRIS, R.H. Minireview: Nitrogenases. **J. Biol. Chem.**, v.266, p.9339-9342, 1991.

CAHILL, D.J.; NORDHOFF, E.; O'BRIEN, J.; KLOSE, J.; EICKHOFF, H.; LEHRACH, H. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S.R.; DUNN, M.J.(Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. BIOS Scientific Publishers Limited, p. 1-22, 2001.

DIXON, R.; KAHN, D.. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nature Rev.**, v. 2, p. 621-631, 2004.

FARBER, J. M.; LEVINE, R. L. Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation: Probable cation binding site in glutamine synthetase. **The journal of biological chemistry**, v. 261, n. 10, p. 4574 – 4578, 1986.

FU, H.; BURRIS, R.H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, v.171, p.3168-3175, 1989.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. **Microbiology and molecular biology reviews**, n. 01, v. 66, p. 39-63, mar, 2002.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAYNES, P. A.; YATES, J. R. Proteome profiling – pitfalls and progress. **Yeast**. v. 17, p. 81-87, 2000.

HUBBEL, D.H.; KIDDER, G. Biological nitrogen fixation. **IFAS Extension**: University of Florida, SL16, 2003.

HUERGO, L. F. **Regulação do metabolismo de nitrogênio em *Azospirillum brasiliense***. Curitiba, 2006. 169f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Di IANNI, C. L.; VILLAFRANCA, J. J. Identification of Amino Acid residues modified by pyridoxal 5' – Phosphate in *Escherichia coli* Glutamine synthetase. **The journal of biological chemistry**, v. 264, n. 15, p. 8686 – 8691, 1989.

JUNGBLUT, P.R. Proteome analysis of bacterial pathogens. **Microbes Infect.**, v.3, p831-840, 2001.

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

LEVINE, R. L.; OLIVER, C. N.; FULKS, R. M.; STADTMAN, E. R. Turnover of bacterial glutamine synthetase: Oxidative inactivation precedes proteolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, n. 4, p. 2120 – 2124, apr., 1981.

LEVINE, R. L. Oxidative Modification of Glutamine synthetase: I Inactivation is due to loss of one histidine residue. **The journal of biological chemistry**. v. 258, n. 19, p. 11823 - 11827, 1983a.

LEVINE, R. L. Oxidative Modification of Glutamine synthetase: II Characterization of the ascorbate model system. **The journal of biological chemistry**. v. 258, n. 19, p. 11828 - 11833, 1983b.

LIU J.; MAGASANIK B. The *glnB* region of the *Escherichia coli* chromosome. **J. Bacteriol.**, v.175, p.7441-7449, 1993.

LIU, Y.; KAHN, M. L. ADP-Ribosylation of *Rhizobium meliloti* glutamine synthetase III *in Vivo*. **The journal of biological chemistry**, v.270, n.4, p.1624-1628, 1995.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. de O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian J. Microbiol.** v. 37, p. 549-553, 1991.

MARTIN, G.; HAEHNEL, W.; BÖGER, P. Oxidative Inactivation of Glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 3, p. 730 – 734, fev., 1997.

MATTE, A.; SIVARAMAN, J.; EKIEL, I; GEHRING, K; JIA, Z.; CYGLER, M. Contribution of structural genomics to understanding the biology of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.185, p.3884-4992, 2003.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p. 604-622, 1995.

MOSS, J.; WATKINS, P. A.; STANLEY, S. J.; PURNELL, M. R.; KIDWELL, W. R. Inactivation of glutamine synthetase by and NAD:Arginine ADP-Ribosyltransferase. **The journal of biological chemistry**, v.259, n.8, p.5100-5104, 1984.

NAKAMURA, K; STADTMAN, E. R. Oxidative inactivation of glutamine synthetase subunits. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 2011 – 2015, abril, 1984.

NINFA, A. J.; JIANG, P. PII Signal transduction proteins: sensors of α -ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism, **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.168–173, 2005.

NINFA, A.; ATKINSON, M. R. PII signal transduction protein, **Trends in Microbiology**, v.8, n.4, p. 172-179, 2000.

NOINDORF, L. **Clonagem, sequenciamento e caracterização dos genes *glnK* e *amtB* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2002. 102 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NOINDORF, L. **Caracterização do operon *orf1glnKamtB* e do gene *amtH* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2006. 138p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

OETJEN, J; REXROTH, S.; REINHOLD-HUREK, B. Mass spectrometric characterization of the covalent modification of the dinitrogenase Fe-Protein in *Azoarcus* sp. BH72. **The FEBS Journal**, v. 276, p. 3618 – 3627, 2009.

O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Biol. Chem.**, v.250, p.4007-4021, 1975.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, p.837-846, 2000.

PATTON, W.F. Detection technologies in proteome analysis. **J. Chromatography B**, v.771, p.3-31, 2002.

PEDROSA, F. de O. Sequenciada bactéria que produz "adubo natural". Genoma mapeado por cientistas paranaenses trará economia de milhões para a agricultura brasileira. **Ciência Hoje On-line**, 2005. Disponível em: <http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/3234> Acesso em 03 de Agosto de 2009.

PEDROSA, F.O.; BENELLI, E.M.; YATES, M.G.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R.A.; KLASSEN, G.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; CHUBATSU, L.S.; RIGO, L.U. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Biotechnology**, v.91, p.189-195, 2001.

PENYIGE, A.; KÁLMÁNCZHELYI, A.; SIPOS, A.; ENSIGN, J. C.; BARABAS, G. Modification of glutamine synthetase in *Streptomyces griseus* by ADP-Ribosylation and adenylation. **Biochemical and biophysical research communications**, v.204, n.2, p.598-605, 1994.

PENYIGE, A.; KESERU, F. F.; SCHMELCZER, I.; SZIRÁK, K.; BARABÁS, G.; BIRÓ, S. Analysis and identification of ADP-Ribosylated proteins of *Streptomyces coelicolor* M145, **The journal of Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 549 – 556, oct., 2009.

PERSUHN, D. C. **Análise funcional do sistema NTR de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2001. 107p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

REITZER, L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.**, vol. 57, p. 155 – 176, 2003.

REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 82, n. 7, p. 1979 – 1983, 1985.

SILMAN, N. J.; CARR, N. G.; MANN, N. H. ADP-Ribosylation of glutamine synthetase in the *Cyanobacterium synechocystis* sp. Strain PCC 6803. **Journal of bacteriology**, p.3527-3533, 1995.

SILVA, F. de A. S. & AZEVEDO, C. A. V. de. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance**. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, F. de A. S. & AZEVEDO, C. A. V. de. **A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software**. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN

AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, p.393-396, 2006.

SILVA, F. de A. S. & AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.1, p71-78, 2002.

SILVA, F. de A. S. **The ASSISTAT Software: statistical assistance.** In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural Engineers, p.294-298, 1996.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v.146, p.1407-1418, 2000.

STADTMAN, E. R. The story of glutamine synthetase regulation. **The journal of biological chemistry**, v. 276, n. 48, p. 44357 – 44364, nov., 2001.

WESTERMEIER, R; NAVEN, T. Proteomics in practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis, **Wiley-VCH**, 2002.

WOEHLET, D. L.; LUEDDECKE, B. A.; LUDDEN, P. W. ATP-dependent and NAD-dependent modification of glutamine synthetase from *Rhodospirillum rubrum* *in Vitro*. **The journal of biological chemistry**, v. 265, n.23, p.13741-13749, 1990.

WILKINS, M. R.; HOCHSTRASSER, D. F. Thinking BigProteome studies in a post-genome era, 1997. Disponível em: <http://www.abrf.org/ABRFNews/1996/December1996/Proteome.html> Acesso em: 03 de Agosto de 2008.

YATES, J. R. Mass spectrometry and the age of the proteomic. **Journal of mass spectrometry**, v. 33, p. 1-19, 1998.

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> <Acesso em 29 de Outubro de 2009>

<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do> <Acesso em 11 de Novembro de 2009>

<http://www.pymol.org/> <Acesso em 11 de Novembro de 2009>

<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>

ANEXOS

ANEXO I

SmR1 2mnoI/ GS1	13	SmR1 20mmol/ GS1	15
SmR1 2mnoI/ GS1	14	SmR1 20mmol/ GS1	17
SmR1 2mnoI/ GS1	17	SmR1 20mmol/ GS1	15

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	1.50000	1.50000	0.5294 ns
Resíduo	4	11.33333	2.83333	
Total	5	12.83333		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 1, 4 F-krit(5%) = .0011 F = .5294 $p > .10000$

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	14.66667 a
2	15.66667 a

DMS = 3.82075

MG = 15.16667

CV% = 11.09836

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste "t" ao nível de 5% de probabilidade.

Para cálculo dos valores críticos de F e da probabilidade de F calculado, o Assistat utiliza o Algoritmo 724 (Abernathy, Roger W. & Smith, Robert P. Algorithm 724: Program to calculate F-percentiles. ACM Trans. Math. Softw. 19, No.4, 481-483 (1993).

SIGLAS E ABREVIações

F.V. = Fonte de variação

S.Q. = Soma de quadrado

F = Estatística do teste F

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

G.L. = Graus de liberdade

Q.M. = Quadrado médio

MG = Média geral

SmR1 2mmol/l GS2	44	SmR1 20mmol/l GS2	49
SmR1 2mmol/l GS2	39	SmR1 20mmol/l GS2	56
SmR1 2mmol/l GS2	41	SmR1 20mmol/l GS2	62

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	308.16667	308.16667	12.6644 *
Resíduo	4	97.33333	24.33333	
Total	5	405.50000		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 1, 4 7.7086 F = 12.6644 p = .02361

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	41.33333	b
2	55.66667	a

DMS = 11.19696

MG = 48.50000

CV% = 10.17089

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste "t" ao nível de 5% de probabilidade.

Para cálculo dos valores críticos de F e da probabilidade de F calculado, o Assistat utiliza o Algoritmo 724 (Abernathy, Roger W. & Smith, Robert P. Algorithm 724: Program to calculate F-percentiles. ACM Trans. Math. Softw. 19, No.4, 481-483 (1993).

SIGLAS E ABREVIações

F.V. = Fonte de variação

S.Q. = Soma de quadrado

F = Estatística do teste F

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

G.L. = Graus de liberdade

Q.M. = Quadrado médio

MG = Média geral

SmR1 2mmol/l GS3	43	SmR1 20mmol/l GS3	36
SmR1 2mmol/l GS3	47	SmR1 20mmol/l GS3	27
SmR1 2mmol/l GS3	42	SmR1 20mmol/l GS3	23

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	352.66667	352.66667	13.7403 *
Resíduo	4	102.66667	25.66667	
Total	5	455.33333		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 1, 4 F-krit(5%) = 7.7086 F = 13.7403 p = .02071

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	44.00000 a
2	28.66667 b

DMS = 11.49963

MG = 36.33333

CV% = 13.94375

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste "t" ao nível de 5% de probabilidade.

Para cálculo dos valores críticos de F e da probabilidade de F calculado, o Assistat utiliza o Algoritmo 724 (Abernathy, Roger W. & Smith, Robert P. Algorithm 724: Program to calculate F-percentiles. ACM Trans. Math. Softw. 19, No.4, 481-483 (1993).

SIGLAS E ABREVIações

F.V. = Fonte de variação

S.Q. = Soma de quadrado

F = Estatística do teste F

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

G.L. = Graus de liberdade

Q.M. = Quadrado médio

MG = Média geral

<i>glnK</i> 2mmol/l GS1	10	<i>glnK</i> 20mmol/l GS1	08
<i>glnK</i> 2mmol/l GS1	10	<i>glnK</i> 20mmol/l GS1	12
<i>glnK</i> 2mmol/l GS1	11	<i>glnK</i> 20mmol/l GS1	16

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	4.16667	4.16667	0.5102 ns
Resíduo	4	32.66667	8.16667	
Total	5	36.83333		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 1, 4 F-krit(5%) = .0011 F = .5102 $p > .10000$

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	10.33333 a
2	12.00000 a

DMS = 6.48667

MG = 11.16667

CV% = 25.59168

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste "t" ao nível de 5% de probabilidade.

Para cálculo dos valores críticos de F e da probabilidade de F calculado, o Assistat utiliza o Algoritmo 724 (Abernathy, Roger W. & Smith, Robert P. Algorithm 724: Program to calculate F-percentiles. ACM Trans. Math. Softw. 19, No.4, 481-483 (1993).

SIGLAS E ABREVIações

F.V. = Fonte de variação

S.Q. = Soma de quadrado

F = Estatística do teste F

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

G.L. = Graus de liberdade

Q.M. = Quadrado médio

MG = Média geral

<i>glnK</i> 2mmol/l GS2	45	<i>glnK</i> 20mmol/l GS2	48
<i>glnK</i> 2mmol/l GS2	46	<i>glnK</i> 20mmol/l GS2	46
<i>glnK</i> 2mmol/l GS2	43	<i>glnK</i> 20mmol/l GS2	42

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	0.66667	0.66667	0.1143 ns
Resíduo	4	23.33333	5.83333	
Total	5	24.00000		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 1, 4 F-krit(5%) = .0011 F = .1143 $p > .10000$

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	44.66667 a
2	45.33333 a

DMS = 5.48223

MG = 45.00000

CV% = 5.36718

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste "t" ao nível de 5% de probabilidade.

Para cálculo dos valores críticos de F e da probabilidade de F calculado, o Assistat utiliza o Algoritmo 724 (Abernathy, Roger W. & Smith, Robert P. Algorithm 724: Program to calculate F-percentiles. ACM Trans. Math. Softw. 19, No.4, 481-483 (1993).

SIGLAS E ABREVIações

F.V. = Fonte de variação

S.Q. = Soma de quadrado

F = Estatística do teste F

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

G.L. = Graus de liberdade

Q.M. = Quadrado médio

MG = Média geral

<i>glnK</i> 2mmol/l GS3	45	<i>glnK</i> 20mmol/l GS3	44
<i>glnK</i> 2mmol/l GS3	44	<i>glnK</i> 20mmol/l GS3	42
<i>glnK</i> 2mmol/l GS3	46	<i>glnK</i> 20mmol/l GS3	42

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	8.16667	8.16667	7.0000 ns
Resíduo	4	4.66667	1.16667	
Total	5	12.83333		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 1, 4 F-krit(5%) = 7.7086 F = 7 p = .05724

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	45.00000 a
2	42.66667 a

DMS = 2.45173

MG = 43.83333

CV% = 2.46416

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste "t" ao nível de 5% de probabilidade.

Para cálculo dos valores críticos de F e da probabilidade de F calculado, o Assistat utiliza o Algoritmo 724 (Abernathy, Roger W. & Smith, Robert P. Algorithm 724: Program to calculate F-percentiles. ACM Trans. Math. Softw. 19, No.4, 481-483 (1993).

SIGLAS E ABREVIações

F.V. = Fonte de variação

S.Q. = Soma de quadrado

F = Estatística do teste F

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

G.L. = Graus de liberdade

Q.M. = Quadrado médio

MG = Média geral

<i>glnB</i> 2mmol/l GS1	07	<i>glnB</i> 20mmol/l GS1	23
<i>glnB</i> 2mmol/l GS1	12	<i>glnB</i> 20mmol/l GS1	27
<i>glnB</i> 2mmol/l GS1	10	<i>glnB</i> 20mmol/l GS1	19

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	266.66667	266.66667	23.8806 **
Resíduo	4	44.66667	11.16667	
Total	5	311.33333		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 = p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 1, 4 F-krit(1%) = 21.1977 F = 23.8806 p = .00812

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	9.66667 b
2	23.00000 a

DMS = 7.58509

MG = 16.33333

CV% = 20.45912

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste "t" ao nível de 5% de probabilidade.

Para cálculo dos valores críticos de F e da probabilidade de F calculado, o Assistat utiliza o Algoritmo 724 (Abernathy, Roger W. & Smith, Robert P. Algorithm 724: Program to calculate F-percentiles. ACM Trans. Math. Softw. 19, No.4, 481-483 (1993).

SIGLAS E ABREVIações

F.V. = Fonte de variação

S.Q. = Soma de quadrado

F = Estatística do teste F

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

G.L. = Graus de liberdade

Q.M. = Quadrado médio

MG = Média geral

<i>glnB</i> 2mmol/l GS2	41	<i>glnB</i> 20mmol/l GS2	61
<i>glnB</i> 2mmol/l GS2	43	<i>glnB</i> 20mmol/l GS2	52
<i>glnB</i> 2mmol/l GS2	39	<i>glnB</i> 20mmol/l GS2	63

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	468.16667	468.16667	24.4261 **
Resíduo	4	76.66667	19.16667	
Total	5	544.83333		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 1, 4 F-krit(1%) = 21.1977 F = 24.4261 p = .0078

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	41.00000 b
2	58.66667 a

DMS = 9.93739

MG = 49.83333

CV% = 8.78523

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste "t" ao nível de 5% de probabilidade.

Para cálculo dos valores críticos de F e da probabilidade de F calculado, o Assistat utiliza o Algoritmo 724 (Abernathy, Roger W. & Smith, Robert P. Algorithm 724: Program to calculate F-percentiles. ACM Trans. Math. Softw. 19, No.4, 481-483 (1993).

SIGLAS E ABREVIações

F.V. = Fonte de variação

S.Q. = Soma de quadrado

F = Estatística do teste F

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

G.L. = Graus de liberdade

Q.M. = Quadrado médio

MG = Média geral

<i>glnB</i> 2mmol/l GS3	52	<i>glnB</i> 20mmol/l GS3	16
<i>glnB</i> 2mmol/l GS3	45	<i>glnB</i> 20mmol/l GS3	21
<i>glnB</i> 2mmol/l GS3	51	<i>glnB</i> 20mmol/l GS3	18

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	1441.50000	1441.50000	139.5000 **
Resíduo	4	41.33333	10.33333	
Total	5	1482.83333		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 1, 4 F-krit(1%) = 21.1977 F = 139.5 $p < .00100$

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	49.33333 a
2	18.33333 b

DMS = 7.29658

MG = 33.83333

CV% = 9.50113

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste "t" ao nível de 5% de probabilidade.

Para cálculo dos valores críticos de F e da probabilidade de F calculado, o Assistat utiliza o Algoritmo 724 (Abernathy, Roger W. & Smith, Robert P. Algorithm 724: Program to calculate F-percentiles. ACM Trans. Math. Softw. 19, No.4, 481-483 (1993).

SIGLAS E ABREVIações

F.V. = Fonte de variação

S.Q. = Soma de quadrado

F = Estatística do teste F

CV% = Coeficiente de variação em %

DMS = Diferença mínima significativa

G.L. = Graus de liberdade

Q.M. = Quadrado médio

MG = Média geral

ANEXO II

Hs MARTAAEVLKMKVDNEVKFVDFRFADTRGKEQHVSVPVSHFDIDKFESGHAFDGSSIAGWKGEASDMLL 70
St --MSAEHVLTMLEHEVKFVDLRFDTIKGKEQHVTIPEAHQVNAEFEECKMFDGSSIGWKGINESDMVL 68

Hs IPDPNTANIDPFMEETTLFMQCDVIEEESDGKGYDRDPRSIAKRAEAYLKSSGLGDTAYFGPEPEFFIFDG 140
St MPDASTAVIDPFFADSTLIIRCDILEFGTLOGYDRDPRSIAKRAEDYLRATGIADTVLFGPEPEFFLFD 138

Hs VRWGADMVSGSFVKIDSEEAWSSTGAKIEGGNSGHRPTVKGGYFPVPPVDSFQDMRSEMSLIIIESLGIPVE 210
St IRFGASISGSHVAIDDIEGAWNSSTKYEGGNKGHRPGVKGGYFPVPPVDSAQDIRSEMCLVMEQMGLVVE 208

Hs VHHHEVAGAGQNELGTFKSTLVERADWTQTMKYVIWNVAHTYGKTATFMPKPLVGDNGSGMHVHQSVWKD 280
St AHHHEVATAGQNEVATRFNTMTKKADEIQIYKYVWHNVAHRFGKTATFMPKPMFGDNGSGMHCMSLAKN 278

Hs GKNLEAGDGYAGLSEFALYYIGGIKHKAKALNAITNPGTNSYKRLVPGYEAPVKLAYSARNRSASIRIPH 350
St GTNLESQDKYAGLSEQALYYIGGVIKHAKAINALANPTNSYKRLVPGYEAPVMLAYSARNRSASIRIPV 348

Hs VANPKGRRRIETRFDPPIANPYLCFSALLMAGLDGVQNKIHPGEAATKDLYHLPPEEDKLIPTVCSSLDEA 420
St VASPKARRIEVRFDPDPAANPYLCFALLMAGLDGIKNIHPGEAMDKNLYDLPPEEAKETIQVAGSLEEA 418

Hs LEHLDKDREFLTRGGVFTDSMIDAYIDLKMQEVQRFRTMTHPIEFDMYYSL 471
St LNALDLDRFLKAGGVFTDEAIDAYIALRREEDDRVMTPHPVFEFELYYSV 469