

DANIELA FOJO SEIXAS CHAVES



ANÁLISE PROTEÔMICA DAS ESTIRPES *SELVAGEM*, *ntrC*⁻ E *nifA*⁻ DE *Herbaspirillum seropedicae*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

CURITIBA

2004

DANIELA FOJO SEIXAS CHAVES

**ANÁLISE PROTEÔMICA DAS ESTIRPES SELVAGEM, *ntrC* e
nifA DE *Herbaspirillum seropedicae***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

CURITIBA

2004

**ANÁLISE PROTEÔMICA DAS ESTIRPES SELVAGEM, *ntrC* e
nifA DE *Herbaspirillum seropedicae***

Dissertação aprovada pela comissão examinadora formada pelos professores abaixo assinados, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.



Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa (Orientador)

Depto. de Bioquímica – UFPR



Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Depto. de Bioquímica – UFPR



Prof. Dr^a. Maria Berenice Reynaud Steffens

Depto. de Bioquímica – UFPR



Prof. Dr^a. Roseli Wassem

Depto. de Genética – UFPR

Curitiba, 12 de Março de 2004

Orientadores:

Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

Dra. Rose Adele Monteiro

AGRADECIMENTOS

É com muito carinho que escrevo esta sessão de agradecimentos, pois as pessoas que aqui menciono tornaram possível a realização deste trabalho, fizeram parte do meu dia a dia neste período e significaram muito para minha formação.

Ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa agradeço por ter me aceitado no grupo de fixação de nitrogênio, pela orientação deste trabalho e por todos os recursos disponibilizados.

À Rose Adele Monteiro pela paciência, amizade, sugestões e ajuda constantes.

Ao professor Emanuel Maltempo de Souza pelo seu grande interesse, pela sua participação durante todo o trabalho e pelas inúmeras e valiosas sugestões.

À professora Maria Berenice Reynauld Steffens pelas excelentes aulas de Bioquímica que despertaram um interesse especial por esta disciplina.

À professora Leda Satie Chubatsu pela suas sugestões práticas e objetivas.

À professora Roseli Wassem pelo entusiasmo com o qual aceitou realizar a leitura desta dissertação.

À professora Giseli Klassen pelo auxílio nos experimentos da nitrogenase.

A todos os professores do grupo pelo bom convívio e ajuda incondicional.

À Roseli Prado pela sua paciência e ajuda constantes no preparo de soluções, material e tudo o que fosse necessário.

À Dona Julieta sempre disposta a auxiliar em tudo que fosse necessário.

À Dra. Glacy Therezinha Zancan pelo seu exemplo de dedicação e constantes esforços na busca de um ideal.

Ao Augusto, da bioinformática, pela instalação de diversos softwares e ajuda na utilização de novos programas.

Aos colegas e amigos Ana Paula, Helisson, Lysângela, Giovana, Patrícia, Humberto, Karen, Marco, Michele, Marcelo, Luíza, Carol, Steffan, Andréa, André, Ana Cláudia, Juliana, Luciano, Lílian, Cláudio e todos os integrantes do grupo pelo agradável convívio diário e cooperação.

Ao Valter pela amizade e pelo auxílio na montagem e instalação de novos equipamentos.

Ao Michael Murgu, da Amersham Biosciences pelas análises no Maldi-ToF.

À Coordenação de Pós-Graduação, em nome da Dra. Maria Benigna e Dra. Fany Reicher e ao suporte financeiro da CAPES.

À Dona Marilza pela ajuda diversas vezes.

Aos meus pais Alaídes e Ricardo pela grande torcida, amor e por ter sempre incentivado o estudo. Ao meu irmão Igor pelo grande amigo que sempre foi e é.

Ao meu marido Leonardo pelo carinho, paciência, incentivo constante e amor.

Aos meus sogros Adolfo e Ilone pela torcida e pelo carinho que sempre demonstraram.

Ficam aqui registrados em papel meus sinceros agradecimentos, mas muito mais importante, ficam guardadas em um local muito especial, todas essas pessoas que marcaram de forma tão singular esta etapa de minha vida . Muito obrigada.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE TABELAS, ESQUEMAS E FIGURAS</u>	VIII
<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	X
<u>RESUMO</u>	XI
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	1
<u>1.1 PROTEOMA</u>	1
<u>1.2 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL</u>	5
<u>1.3 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA</u>	9
<u>1.4 MÉTODOS DE COLORAÇÃO</u>	10
<u>1.5 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS</u>	11
<u>1.6 ESTADO DA ARTE DA ANÁLISE PROTEÔMICA DE MICRORGANISMOS</u>	12
<u>1.7 FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO</u>	13
<u>1.8 NITROGENASE</u>	15
<u>1.9 ASSIMILAÇÃO DA AMÔNIA E REGULAÇÃO DA SÍNTESE E ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE EM ENTEROBACTÉRIAS</u>	17
<u>1.10 REGULAÇÃO DOS GENES <i>nif</i></u>	20
<u>1.11 <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</i></u>	23
<u>1.12 REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</i></u>	24

<u>1.13 JUSTIFICATIVA</u>	29
<u>2. OBJETIVOS</u>	30
<u>2.1 OBJETIVO GERAL</u>	30
<u>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	30
<u>3. MATERIAIS E MÉTODOS</u>	31
<u>3.1 REAGENTES</u>	31
<u>3.2 ESTIRPES UTILIZADAS</u>	31
<u>3.3 MEIOS DE CULTIVO</u>	31
<u>3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO</u>	33
<u>3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE</u>	34
<u>3.6 PREPARO DA AMOSTRA PARA ELETROFORESE BIDIMENSIONAL</u>	35
<u>3.7 ISOELETROFOCALIZAÇÃO (IEF)</u>	36
<u>3.8 EQUILÍBRIO DAS TIRAS DE GRADIENTE DE pH IMOBILIZADO</u>	37
<u>3.9 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE)</u>	37
<u>3.10 VISUALIZAÇÃO DOS GÉIS</u>	38
<u>3.11 CAPTURA DAS IMAGENS</u>	39
<u>3.12 ANÁLISE DOS GÉIS</u>	39
<u>3.13 RETIRADA DE PROTEÍNAS DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS</u>	40
<u>3.14 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA</u>	40

<u>3.15 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA ATRAVÉS DE MALDI-ToF</u>	41
<u>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	43
<u>4.1 ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO</u>	43
<u>4.2 PROTEÍNAS DETECTADAS EM CADA CONDIÇÃO</u>	43
<u>4.3 EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA</u>	46
<u>4.4 ANÁLISES COMPARATIVAS DA ESTIRPE SMR1 NA FAIXA DE PH 3 A 10</u>	46
<u>4.5 ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE ESTIRPES EM TIRAS IPG PH 3 A 10</u>	50
<u>4.6 ANÁLISES COMPARATIVAS NA FAIXA DE PH 4 A 7</u>	54
<u>4.7 DISCUSSÃO DAS ANÁLISES COMPARATIVAS</u>	58
<u>4.8 MÉTODOS DE COLORAÇÃO</u>	62
<u>4.9 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS</u>	64
<u>5. CONCLUSÕES</u>	66
<u>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	68
<u>APÊNDICE I: PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DE GÉIS BIDIMENSIONAIS DE HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</u>	82

LISTA DE TABELAS, ESQUEMAS E FIGURAS

FIGURA 1.	Abordagem Proteômica por Meio de Eletroforese Bidimensional	6
FIGURA 2.	Alguns dos Processos Fisiológicos Ativados pela Proteína NtrC em Baixas Concentrações de Íons Amônio	25
FIGURA 3.	Regulação da Fixação de Nitrogênio em <i>H. seropedicae</i>	28
TABELA 1.	Número Total de Pontos Protéicos Detectados em Cada Condição Para Todas as Estirpes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	45
FIGURA 4.	Efeito da Concentração de Proteína sobre a Resolução de Géis Bidimensionais	47
FIGURA 5.	Géis Bidimensionais da Estirpe Selvagem SMR1	49
FIGURA 6.	Gel Artificial de Referência da Estirpe SMR1	51
FIGURA 7.	Diferenças Quantitativas de Expressão Quantitativa na Estirpe SMR1 na Condição de Fixação de Nitrogênio	52

FIGURA 8. Proteínas Induzidas na Estirpe Selvagem Cultivada em Baixo Amônio	53
FIGURA 9. Diferença Quantitativa de Expressão na Estirpe Mutante DCP286A (<i>NtrC</i>)	55
FIGURA 10. Géis Bidimensionais da Estirpe Mutante SMR54 e da Estirpe Selvagem SMR1	56
FIGURA 11. Comparação do Padrão Eletroforético de Proteínas da Estirpe Selvagem SMR1 Realizados em Diferentes Faixas pH	57
FIGURA 12. Proteínas Induzidas na Estirpe SMR1 Cultivada em Condição de Fixação de Nitrogênio	59
FIGURA 13. Proteínas Reprimidas na Condição de Fixação de Nitrogênio na Estirpe Selvagem SMR1	60
FIGURA 14. Eletroforetograma Protéico para a Estirpe SMR1 Visualizados por Meio de Diferentes Métodos de Coloração	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CAF	Fragmentação quimicamente assistida
CHAPS	Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato
Da	Dalton
DTT	Ditiotreitol
ESI	Ionização por "Eletronspray"
GDH	Glutamato desidrogenase
GOGAT	Glutamato sintase
GS	Glutamina sintetase
HCCA	Ácido ciano-4-hidroxicinamínico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IEF	Isoeletrofocalização
IPG	Gradiente de pH Imobilizado
kDa	Quilodalton
Km	Kanamicina
kPa	Quilopascal
LC	Cromatografia líquida
mA	Miliamper
MALDI-TOF	do inglês: " <i>matrix assisted laser desorption ionization time of flight</i> "

	Ionização desaborção a laser assistida por matriz – Tempo de Voo
MM	Massa molecular
MS	Espectrometria de massa
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
ORF	Região codificadora de proteína
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pI	Ponto isoelétrico
PMF	do inglês: " <i>peptide mass fingerprint</i> " Impressão digital de peptídeos
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Sm	Estreptomicina
TEMED	N,N-Tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético
UMP	Uridina monofosfato
Vhr	Voltagem/hora
VhT	Voltagem/hora total
Vn	Volume normalizado

RESUMO

O termo "proteoma" refere-se ao conjunto de proteínas expressas por uma célula em uma determinada condição fisiológica. Foi realizada análise proteômica da estirpe selvagem (SMR1) e das estirpes mutantes SMR54 (*nifA*⁻) e DCP286A (*ntrC*⁻) de *Herbaspirillum seropedicae*. As proteínas foram fracionadas por meio de eletroforese bidimensional. A isoeletrofocalização foi realizada em tiras com gradiente imobilizado de pH nas faixas de pH 4 a 7 e pH 3 a 10 e a eletroforese na presença de SDS foi realizada em géis de poliacrilamida 12,5%. Foram realizadas análises da estirpe selvagem na condição de fixação de nitrogênio cultivada em baixo amônio (2mmol/L de NH₄Cl) ou em alto amônio (20mmol/L de NH₄Cl). Para as estirpes mutantes, incapazes de fixar nitrogênio, foram realizadas análises na condição de baixo amônio e alto amônio. Na estirpe selvagem (SMR1) ocorreu indução de 25 proteínas na condição de fixação de nitrogênio quando comparada com a mesma estirpe cultivada em alto amônio (20mmol/L de NH₄Cl). Em condição de alto amônio foram induzidas 12 proteínas na estirpe mutante SMR54 (*nifA*⁻) e não ocorreu indução de nenhuma proteína na estirpe mutante DCP286A. Em condição de baixo amônio 3 proteínas foram induzidas na estirpe selvagem, 8 no mutante SMR54 e nenhuma no mutante DCP286A quando comparados com a estirpe selvagem nas mesmas condições. Um grande número de proteínas foi reprimido na condição de fixação de nitrogênio e baixa amônia na estirpe SMR1 e nos mutantes nas duas condições estudadas. As proteínas reprimidas no mutante SMR54 foram reprimidas também no mutante DCP286A porém, no último ocorreu repressão de um número maior de proteínas. Vinte e nove proteínas induzidas na estirpe SMR1 em condição de fixação de nitrogênio ou no mutante SMR54 cultivado em alto amônio (20mmol/L de NH₄Cl) foram submetidas a espectrometria de massa utilizando MALDI-ToF, entretanto, os dados provenientes das massas trípticas não foram suficientes para sua identificação.

1. INTRODUÇÃO

1.1 PROTEOMA

O termo "proteoma" foi proposto em 1993 por Mark Wilkins e Keith Williams para referir-se à identificação sistemática do complemento protéico total do genoma (BLACKSTOCK & WEIR, 1999; LOPEZ, 1999), ou seja, se refere ao conjunto de proteínas que são expressas pelo genoma de um organismo ou tipo celular (HAYNES & YATES, 2000). Entretanto, este termo pode também ser usado em um sentido menos universal, para referir-se ao conjunto de proteínas que está sendo expresso num dado momento da vida da célula (ABBOT, 1999).

As proteínas são muito ricas em informação biológica. Suas atividades específicas, estado de modificação, associação com outras biomoléculas e os níveis de expressão são essenciais para a descrição de sistemas biológicos (AEBERSOLD, 2003).

O seqüenciamento do genoma tem sido prioridade da pesquisa em Biologia Molecular nos últimos anos. Atualmente, já são conhecidos mais de 87 genomas bacterianos e existem 125 em progresso (MATTE *et al.*, 2003). A quantidade de informação disponível em banco de dados é praticamente duplicada a cada 12 meses (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Genome/org.html). Entretanto, essa imensa quantidade de informação, por si só, revela muito pouco a respeito de como as proteínas operam nos organismos (WILKINS & HOCHSTRASSER, 1996). Contrariamente ao genoma, que funciona como repositório estático da informação

genética e cujo conteúdo não muda com o tempo, o proteoma é altamente dinâmico. Um único genoma pode gerar um número muito grande de proteomas, dependendo de variáveis como estágio do ciclo de crescimento, disponibilidade de nutrientes, temperatura, resposta ao estresse, condições patológicas e diferenças entre estirpes (CAHILL *et al.*, 2001).

Após a seqüência completa do genoma de um organismo ter sido determinada, quadros de leitura aberta ou ORFs (*Open Reading Frames*), nas seqüências de nucleotídeos podem ser preditas, identificando todas as prováveis proteínas codificadas. A confiabilidade das ORFs preditas é baixa para genes pequenos ou genes com pouca ou nenhuma homologia com outros genes conhecidos. Entre estas ORF's, muitas codificam para proteínas ditas hipotéticas, cuja comprovação da existência está baseada unicamente em análises computacionais das seqüências genômicas e suas funções são desconhecidas (CASH 2002). Aproximadamente 30% das ORF's de organismos já seqüenciados codificam para proteínas hipotéticas, cuja comprovação de existência requer seu aparecimento físico. A confirmação de um produto gênico através da análise proteômica é um passo importante complementar à anotação do genoma (PANDEY & MANN, 2000). Em um estudo proteômico realizado por CASH e colaboradores (1998) com *Hemophilus influenzae* foram observadas, entre as proteínas mais abundantes, os produtos de 19 ORFs hipotéticas demonstrando, portanto, a importância desta análise para o conhecimento detalhado do genoma e a funcionalidade dos genes anotados.

As proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais como fosforilação, metilação, acetilação e clivagem proteolítica entre outras. Por este motivo, a

estrutura final e função das diversas proteínas não podem ser definidas com base apenas nas seqüências nucleotídicas dos genes que as codificam (CAHIL *et al.*, 2001). Em bactérias, um único gene pode codificar para uma ou mais proteínas em um gel bidimensional devido às modificações pós-traducionais e pós-transcricionais (WILKINKS *et al.*, 1996). Até mesmo para organismos pouco complexos, como o *Mycoplasma genitalium*, existem 24% mais proteínas do que genes (ABBOT, 1999).

O grande número de informações obtidas pelo seqüenciamento do genoma sugere possíveis modos de expressão dos genes, mas não provê dados sobre eventuais modificações pós traducionais nem do controle da atividade em resposta a condições particulares. Estes problemas podem ser resolvidos estudando a expressão gênica através dos níveis de RNAm ou dos níveis protéicos (DUNN, 2003). Análise do RNAm fornece informações a respeito da função gênica, porém este é um modo indireto, tendo em vista que os RNAm são os intermediários na expressão da informação genética (entre DNA e proteína) e não as entidades funcionais em si. Além disso, diversos estudos demonstraram que há baixa correlação entre a abundância de RNAm na célula e proteínas (OLIVER, 2000). Adicionalmente, estudos de RNAm não fornecem informações a respeito de modificações pós-traducionais (MANN & JENSEN, 2003).

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). Uma descrição completa do proteoma de um organismo fornece, não apenas um catálogo do conjunto de proteínas que está sendo expresso pelo genoma, mas também dados de expressão celular sob condições definidas e a distribuição dessas

proteínas na célula (CASH, 1998). Portanto, o passo do genoma para o proteoma é um passo do nível da informação genética para a função celular. As concentrações de proteínas que são alteradas em determinadas condições fisiológicas mostram quais funções sofrem modificações (JUNGBLUT, 2001).

1.1.1 Tipos de Estudos Proteômicos

Existem diversos tipos de estudos proteômicos. A abordagem proteômica clássica é o estudo da expressão protéica global (*Expression proteomics*), que envolve a criação de mapas quantitativos das proteínas expressas de extratos de células ou tecidos. Os perfis protéicos dos proteomas expressos sob diferentes condições fisiológicas são comparados. Informações deste tipo de estudo podem permitir a identificação de proteínas de transdução de sinal ou identificar proteínas específicas de estados patológicos e estados fisiológicos diversos (GRAVES & HAYSTEAD, 2002). Normalmente, a separação das proteínas é feita por eletroforese bidimensional e a identificação através de espectrometria de massa (JOCELYN & ILAG, 2002).

A disponibilidade de seqüências genômicas tem permitido um estudo mais detalhado do proteoma da *Escherichia coli* utilizando técnicas como microarranjos de proteínas, bloqueio sistemático de genes e eletroforese bidimensional. Utilizando os dados do genoma é possível realizar análises proteômicas "in silico" (MATTE *et al.*, 2003). Programas como o "Proteogest" são capazes de realizar a digestão trípica de um proteoma e analisar os peptídeos resultantes. Desta maneira são geradas estatísticas descritivas para o proteoma intacto ou proteoliticamente digerido

(CAGNEY *et al.*, 2003). O conhecimento de tais dados pode auxiliar no planejamento de proteomas experimentais.

Em estudos denominados como "*Shotgun Proteomics*" uma mistura de proteínas é digerida com uma protease específica; os peptídeos resultantes são separados por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e analisados por espectrometria de massa (SCHWARTZ *et al.*, 2002; HANCOCK *et al.*, 2002).

1.2 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

Existem duas etapas principais na análise proteômica: a primeira etapa consiste em isolar e separar as proteínas de um sistema biológico, geralmente utilizando eletroforese bidimensional ou cromatografia líquida multidimensional acoplada a espectrometria de massa (LC-LC-MS/MS) e a segunda etapa consiste na identificação das proteínas separadas, geralmente por espectrometria de massa e bioinformática (CAGNEY *et al.*, 2003; ABBOT, 1999) (FIGURA 1).

Atualmente a eletroforese bidimensional é o modo mais direto para mapear o proteoma de um organismo (LOPEZ, 1999; CAHILL *et al.*, 2001). Este procedimento foi pioneira e independentemente descrito por O'FARREL (1975) e KLOSE (1975). Na eletroforese bidimensional as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) por focalização isoelétrica (IEF) na primeira dimensão e de acordo com sua massa molecular por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS – PAGE) na segunda dimensão (O'FARREL, 1975).

O'FARREL realizou a separação de proteínas de *Escherichia coli* combinando isoeletofocalização (IEF) em poliacrilamida realizada em tubos de ensaio na

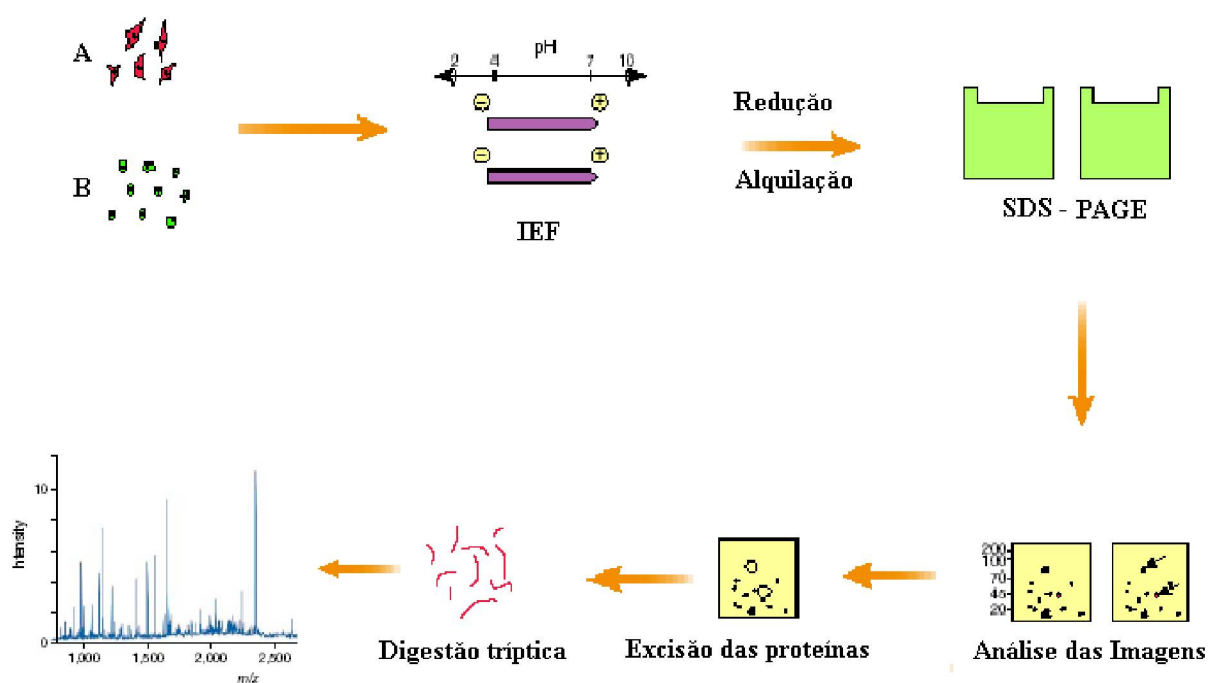


FIGURA 1: ABORDAGEM PROTEÔMICA POR MEIO DE ELETROFORESE

BIDIMENSIONAL. Células ou tecidos em diferentes condições (A e B) são

coletadas e as proteínas solubilizadas. A IEF separa as proteínas de acordo com o

ponto isoelétrico. Após esta etapa as proteínas são reduzidas, alquiladas e é feita a

segunda dimensão (SDS-PAGE) que separa as proteínas conforme o peso

molecular. As análises das imagens são feitas utilizando programas

computacionais. As proteínas de interesse são removidas do gel bidimensional,

digeridas com tripsina e submetidas a análises espectrométricas para posterior

identificação através de seqüências disponíveis em bases de dados (modificado de PANDEY & MANN, 2000).

presença de anfolinas com sistema descontínuo e SDS-PAGE de LAEMMLI para a segunda dimensão (1970).

O desenvolvimento das tiras IPGs (*Immobilised pH Gradients*), nas quais um determinado gradiente de pH é imobilizado em uma matriz de poliacrilamida, permitiu melhor reprodutibilidade dos géis de isoeletrofocalização e resolveu alguns problemas que ocorriam quando a IEF era feita segundo O'FARREL. Esta técnica foi aprimorada por GÖRG e atualmente é o método mais utilizado para a realização da primeira dimensão (revista por DUNN & GÖRG, 2001)

1.2.1 Vantagens da eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional é um método de separação eficiente porque todas as proteínas em uma amostra são separadas simultaneamente fornecendo informações úteis sobre ponto isoelétrico, massa molecular, expressão, abundância relativa e modificações pós-traducionais, verificadas pela alteração da mobilidade eletroforética (PANDEY & MANN, 2000). Variações em um único aminoácido podem resultar na mudança de posição de uma proteína em um gel bidimensional (JUNGBLUT, 2001)

Proteínas de transdução de sinal, que sofrem modificações covalentes, são de particular interesse. A eletroforese bidimensional de amostras marcadas com ³²P pode ser usada para identificar proteínas contendo grupos fosfato. Anticorpos

específicos para fosfotreonina, fosfoserina e fosfotirosina podem ser utilizados para localizar proteínas fosforiladas em géis bidimensionais (WILKINS & HOCHSTRASSER, 1996).

1.2.2 Limitações da eletroforese bidimensional

Alguns dos fatores que dificultam a análise proteômica são as modificações pós-traducionais das proteínas e o baixo número de moléculas por célula (JUNGBLUT, 2001). Diversos estudos demonstraram que apenas as proteínas mais abundantes da célula são identificadas por meio de eletroforese bidimensional. Em um estudo no qual mais de 150 proteínas de células de levedura foram identificadas através desta técnica, não foi identificada nenhuma proteína com valores de preferência de códon menores que 0,1, um valor arbitrário que indica proteínas com baixo número de cópias (HAYNES & YATES, 2000). Valores calculados de preferência de códon indicaram que dos 6000 genes de levedura, metade apresentaram valores inferiores a 0,1 e são, provavelmente, não detectáveis em géis bidimensionais sem algum passo de enriquecimento prévio (GYGI *et al.*, 2000; HERBERT *et al.*, 2001).

Proteínas responsáveis pela manutenção e reprodução celular representam aproximadamente 80% das proteínas de um determinado tecido ou organismo (WILKINS & HOCHSTRASSER) e podem estar presentes em concentrações até 10000 vezes superiores às proteínas de baixo número de cópias que normalmente realizam funções importantes na célula como função enzimática, receptores e proteínas de transdução de sinal (ABBOT, 1999). Também é problemática a separação de proteínas grandes (com MM superior a 100000 Da), proteínas

extremamente ácidas ou básicas ($pI < 3,5$ ou $pI > 9,5$) e proteínas de membranas (SHEN & SMITH, 2002; HERBERT *et al.*, 2001).

Diversos procedimentos podem ser adotados para contornar tais limitações, dentre eles, o pré-fracionamento da amostra, utilização de faixas estreitas de pH para realização da IEF, fracionamento sub-celular e/ou remoção das proteínas mais abundantes da amostra (HANCOCK *et al.*, 2002).

1.3 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

A possibilidade de identificar rapidamente um grande número de proteínas através de espectrometria de massa (MS) foi um enorme avanço na área da proteômica. Em 2002, John B. Feen e Koichi Tanaka receberam o prêmio Nobel em química pelo aprimoramento das técnicas de ionização brandas utilizadas em ionização por eletronspray (ESI) e ionização por remoção a laser assistida por matriz (MALDI), respectivamente. Estas técnicas são consideradas brandas pela sua capacidade de gerar íons a partir de macromoléculas não voláteis sem ou com muito pouca fragmentação da molécula analisada.

A espectrometria de massa determina a massa molecular através da relação carga/massa (m/z) de íons gerados a partir da molécula analisada. Atualmente MALDI e ESI são as tecnologias utilizadas para ionização das proteínas e sua subsequente identificação (KÖPKE, 2003). O equipamento MALDI, acoplado a um analisador de massas tipo tempo de voo (ToF), é normalmente utilizado para a realização da impressão digital de peptídeos (PMF) de proteínas e outras moléculas (AEBERSOLD & GOODLET, 2001).

A tripsina, normalmente utilizada para a 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 massa (SHEVCHENKO *et al.*, 1996; CAGNEY *et al.*, 2003) e que podem ser considerados como impressão digital daquela molécula (QUADRONI & JAMES, 2001).

1.4 MÉTODOS DE COLORAÇÃO

Há uma grande variedade de métodos de coloração que podem ser utilizados para visualizar as proteínas separadas através de eletroforese bidimensional. Os métodos de coloração mais utilizados são *Coomassie Brilliant Blue*, prata e fluorescência. *Coomassie* possui sensibilidade para detectar de 30 a 100ng de proteína sendo menos sensível que a coloração com prata e os métodos de fluorescência (PATTON, 2002). A coloração com prata possui sensibilidade para detectar 0,1ng de proteína por ponto protéico presente no gel bidimensional. Entretanto prata apresenta certas desvantagens, como a falta de linearidade e o problema de gerar coloração negativa em regiões com altas concentrações de proteínas, devido à saturação (DUNN, 2003). A coloração por fluorescência é atualmente a melhor alternativa devido a sua alta sensibilidade e linearidade, além de ser totalmente compatível com espectrometria de massa (PATTON, 2002; KÖPKE, 2003).

Adicionalmente as proteínas podem ser detectadas através de técnicas de auto-radiografia. Para isto é necessário que a amostra seja constituída de proteínas marcadas radioativamente *in vivo*, utilizando por exemplo, os isótopos ^{35}S , ^{14}C , ^3H , ou, no caso de fosfoproteínas, ^{32}P .

1.5 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A identificação de uma proteína através dos valores das massas moleculares de seus peptídeos é realizada por comparação "in silico" através de pesquisa em banco de dados disponíveis como o Mascot, PepTident, ProFound, Ms-Fit, MultIdent, TagIdent, ou CombSearch.

O programa ProFound faz uso de um algoritmo computacional que compara as massas determinadas para peptídeos proteolíticos com as massas calculadas para todas as clivagens enzimaticamente possíveis dos produtos de cada ORF predita pela seqüência genômica de organismos presentes em base de dados. A proteína é identificada baseando-se na avaliação dessa comparação. Este programa está disponível na Internet (<<http://prowl.rockefeller.edu>>). As diversas bases de dados utilizadas são o "Genbank", o "SwissProt Database", o "Protein Database" e o "EMBL".

A identificação é fortemente influenciada pela quantidade de proteína na amostra, grau de modificação pós-traducional, qualidade das buscas automáticas e presença da proteína nos bancos de dados (KÖPKE, 2003). O conhecimento do genoma de um organismo é de grande importância para permitir a identificação exata das proteínas pelo padrão de peptídeos.

1.6 ESTADO DA ARTE DA ANÁLISE PROTEÔMICA DE MICRORGANISMOS

As bactérias respondem a condições de estresse ambiental através de modificações nos padrões de expressão gênica. Muitos investigadores têm verificado este fenômeno através do uso de eletroforese bidimensional. Esta abordagem pode ser utilizada mesmo com pouca informação a respeito da identidade das proteínas, servindo como um sistema de análise para ajudar em investigações futuras. Muitos dos estudos iniciais com esta abordagem foram usados para formar um catálogo das proteínas sintetizadas e de seus padrões de síntese em condições definidas, sem informações a respeito de sua identidade (CASH, 2002).

Projetos de caracterização proteômica em ampla escala já têm sido desenvolvidos com vários microrganismos, dentre eles: *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Ochrobactrum anthropi*, *Salmonella entérica*, *Spiroplasma melliferum*, *Synechocystitis spp*, *Dictyostelium discoideum* e *Rhizobium leguminosarum* (HAYNES & YATES, 2000).

A análise proteômica também pode ser utilizada para revelar mecanismos de interação entre bactéria e planta. NATERA e colaboradores (2000) utilizaram eletroforese bidimensional para identificar proteínas diferencialmente expressas durante a interação simbiótica entre a bactéria *Sinorhizobium meliloti* e a leguminosa *Melilotus alba*. Mapas 2D de nódulos de plantas controle de *M.alba* (tipo selvagem), da bactéria *S. meliloti* em cultura e bacteróides de *S.meliloti* foram realizados e os mapas proteômicos resultantes foram comparados (NATERA *et al.*, 2000).

O estudo de BASTELAERE e colaboradores (1993) foi o primeiro a demonstrar que a presença de exsudatos de raízes modifica a expressão gênica de bactérias associadas. Através de análises comparativas usando géis bidimensionais foi detectada a indução de proteínas em *Azospirillum brasilense* na presença de exsudatos de trigo, milho, feijão e alfafa.

Mudanças importantes da expressão gênica e do comportamento de bactérias Gram-negativas são reguladas pelas homoserinolactonas (AHL), moléculas sinalizadoras do tipo "quorum sensing". Com a análise proteômica foi possível demonstrar que o hospedeiro eucariótico *Medicago truncatula* foi capaz de detectar concentrações micromolares de AHL de bactérias simbióticas (*S.meliloti*) e patogênicas (*Pseudomonas aeruginosa*). *M.truncatula* respondeu de maneira global com significativas mudanças no nível de mais de 150 proteínas (ROLFE *et al.*, 2003).

GUERREIRO e colaboradores (2000) utilizaram análise proteômica para estudar os efeitos pleiotrópicos de mutações em genes regulatórios (*nolR*) ou genes estruturais envolvidos na síntese de polissacarídeos (*pssA*) em *Rhizobium leguminosarum*. Utilizando géis bidimensionais foi possível observar que a mutação levou à indução de um grande número de proteínas sugerindo que a PssA possa interagir com estas e/ou possuir funções regulatórias.

1.7 FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

O elemento nitrogênio é parte essencial de muitos compostos orgânicos como proteínas e ácidos nucleicos que constituem a base de todas as formas de vida. O nitrogênio molecular, N₂, representa aproximadamente 80% da atmosfera

terrestre, entretanto, este não pode ser utilizado diretamente pela maioria dos seres vivos (HUBBELL & KIDDER, 2003). Previamente à sua incorporação em um sistema biológico ele deve ser combinado com o elemento hidrogênio para formar NH_3 em um processo denominado de fixação de nitrogênio (BRILL, 1977).

Vários organismos procariotos são capazes de realizar a fixação de nitrogênio em um processo denominado de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (BURRIS, 1991). Microrganismos fixadores de nitrogênio são encontrados em diversos habitats, sendo que os que mais contribuem em termos de quantidade de nitrogênio fixado por ano na agricultura, são os encontrados em raízes de plantas (ALI *et al.*, 2000).

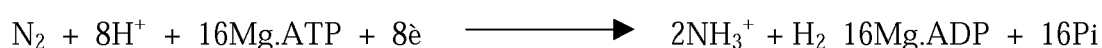
A disponibilidade de nitrogênio fixado é normalmente o fator limitante no crescimento de microrganismos, plantas e animais (BURRIS, 1991). Também na agricultura a produtividade é usualmente limitada pela quantidade de nitrogênio fixado disponível. A fixação biológica de nitrogênio contribui com aproximadamente a metade do total de nitrogênio fixado na agricultura global, sendo o restante derivado de fertilizantes nitrogenados produzidos quimicamente através da síntese de amônia pelo processo de Haber-Bosch (SMITH, 2002). Este processo envolve a adição de átomos de hidrogênio para redução do nitrogênio molecular e queima de combustíveis fósseis como o petróleo e gás natural, fazendo com que o custo dos fertilizantes nitrogenados seja muito alto (BRILL, 1977), além de depender de quantidades limitadas das reservas mundiais destes combustíveis (DILWORTH, 1974).

Bactérias diazotróficas podem contribuir substancialmente para a nutrição de nitrogênio da planta. Diversas bactérias fixadoras de nitrogênio colonizam o interior

da planta e algumas vivem em seu interior, podendo fixar o nitrogênio e transferi-lo diretamente para os tecidos vegetais. Em cultivos de cana de açúcar a fixação biológica de nitrogênio pode contribuir com até 150kg de nitrogênio fixado por ano por hectare de terra cultivada. Devido à fixação biológica de nitrogênio, culturas de cana de açúcar têm sido cultivadas por séculos no Brasil sem necessidade de adição de grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados (DOBEREINER *et al.*, 2000).

1.8 NITROGENASE

A fixação biológica de nitrogênio é o processo de redução do N₂ a NH₃ catalisado pelo complexo enzimático da nitrogenase. A redução de N₂ a NH₃ pela nitrogenase requer grande quantidade de energia obtida por hidrólise de MgATP a MgADP + Pi. Na ausência de nitrogênio fixado, a enzima funciona como uma hidrogenase dependente de ATP e reduz prótons a H₂ (THORNELEY, 2001). A estequiometria da reação catalisada pela nitrogenase pode ser assim representada (BURRIS, 1991):



O complexo da nitrogenase é formado por duas metaloproteínas: a proteína ferro ou dinitrogenase redutase e a proteína molibdênio-ferro ou dinitrogenase. A

proteína ferro é um homodímero constituído de duas subunidades gama idênticas, γ_2 , com massa molecular entre 57 e 72 kDa e contendo um núcleo 4Fe-4S ancorado entre as duas subunidades. A proteína molibdênio-ferro é uma proteína tetramérica, $\alpha_2\beta_2$, com massa molecular entre 200 e 250 kDa, contendo 2 átomos de molibdênio e aproximadamente 33 átomos de ferro. Ela contém dois grupamentos metalosulfúricos: o grupamento P [8Fe – 7S] e o grupamento Mo [7Fe: 9S] (SMITH, 2002). Os dois componentes da nitrogenase podem ser separados, mas isoladamente não são capazes de reduzir o nitrogênio (KIM & REES, 1994). A nitrogenase é versátil (BURRIS, 1991), além do nitrogênio ela reduz uma variedade de substratos que contém tripla ligação terminal carbono-carbono ou carbono-nitrogênio, como o acetileno, ácido cianídrico, óxido nitroso, cianetos e isocianetos (EADY & POSTGATE, 1974).

Devido ao alto custo energético da reação catalisada pela nitrogenase a fixação biológica do nitrogênio é um processo rigidamente regulado, tanto na síntese quanto na atividade da enzima nitrogenase. O amônio inibe a atividade da nitrogenase in vivo em diversos microrganismos fixadores de nitrogênio entretanto, o mecanismo de inibição difere de um organismo para outro (FU & BURRIS, 1989).

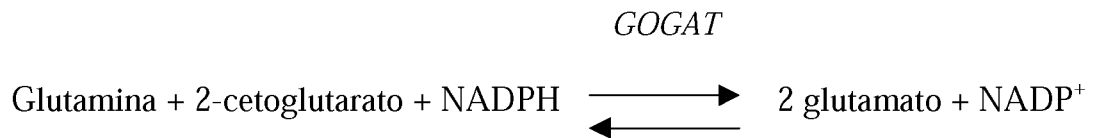
Em *Rhodospirillum rubrum* observa-se que ocorre inibição reversível da atividade desta enzima em resposta aos níveis de amônio celular e energia. A inibição pós-traducional da atividade da nitrogenase tem sido denominada de "switch-off" (desligamento) ou inibição a curto prazo (ZHANG *et al.*, 1993). Esta inibição envolve uma mono-ADP-ribosilação reversível da dinitrogenase redutase em resposta à adição de nitrogênio fixado, ausência de luz, anaerobiose e outros estímulos. Duas enzimas estão envolvidas neste mecanismo de regulação: a

enzima dinitrogenase redutase ADP-ribosil transferase (DRAT) e a dinitrogenase redutase (DRAG). A DRAT catalisa a transferência do grupamento ADP-ribosil para um resíduo de arginina da dinitrogenase redutase enquanto que a enzima DRAG remove este grupamento ADP-ribosil restaurando a atividade da enzima em um processo denominado "switch on" (ZHANG *et al.*, 1993). Este mecanismo de regulação da atividade da nitrogenase foi observado também em *Rhodobacter capsulatus*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum* e *Azotobacter chroococcum* (FU & BURRIS, 1989).

1.9 ASSIMILAÇÃO DA AMÔNIA E REGULAÇÃO DA SÍNTESE E ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE EM ENTEROBACTÉRIAS

A amônia é a fonte de nitrogênio preferida pelas bactérias. Ela é convertida diretamente em glutamina e glutamato que são os principais doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas. Existem duas vias principais através das quais a amônia pode ser assimilada: a via glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT) e a via glutamato desidrogenase (GDH) (ARCONDÉGUY, 2001).

A enzima GS converte glutamato e amônio em glutamina e a enzima GOGAT transfere um grupamento amida da glutamina para o 2-cetoglutarato produzindo duas moléculas de glutamato. A reação global é a produção de glutamato a partir de amônia e 2-cetoglutarato (MERRICK & EDWARDS, 1995). A via GS/GOGAT é mais apropriada para assimilação de amônia em condições limitantes de nitrogênio (REITZER, 2003).



A via da glutamato desidrogenase (GDH) catalisa a aminação redutiva do 2-cetogluturato pela amônia resultando na formação de glutamato através de uma reação dependente de NADPH (MERRICK & EDWARDS, 1995). Apesar desta via ser mais eficaz energeticamente é ineficiente para células em condições limitantes de nitrogênio, devido à baixa afinidade da enzima glutamato desidrogenase pela amônia (ARCONDÉGUY, 2001).



A glutamina sintetase (GS) é altamente regulada, tanto a nível transcricional quanto pós-traducional. Sua regulação 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.

Em enterobactérias o gene *glnA*, que codifica para GS, faz parte do operon *glnAntrBC*. A expressão do operon *glnAntrBC* é regulada pelo sistema Ntr em resposta a flutuações nos níveis de amônio intracelular. O gene *glnA* é transcrito a

partir de dois promotores: o promotor *glnAp1* e o promotor *glnAp2*. O promotor *glnAp1* é reconhecido pela RNA polimerase contendo σ^{70} que é responsável pela expressão de níveis basais de GS quando há presença de nitrogênio fixado. O promotor *glnAp2* é reconhecido pela RNA polimerase contendo σ^{54} e é responsável por altos níveis de expressão do operon *glnAntrBC*. A expressão da GS a partir do promotor *glnAp2* é controlada através da disponibilidade de nitrogênio. A transcrição a partir do promotor *glnAp2* é dependente da proteína ativadora NtrC na sua forma fosforilada. NtrC-P ativa a transcrição a partir de promotores *glnAp2* e reprime a transcrição a partir de promotores *glnAp1* em condições limitantes de nitrogênio. Regulação da transcrição a partir do promotor *glnAp2* é obtida através do controle da concentração intracelular de NtrC-P (NINFA *et al.*, 1995).

A atividade da GS sofre inibição alostérica pelos compostos nitrogenados triptofano, histidina, carbamil fosfato, glucosamina – 6 – fosfato, CTP, AMP, alanina e glicina (ATKINSON *et al.*, 1994). Em enterobactérias GS sofre regulação por modificação covalente reversível em resposta aos níveis de nitrogênio. Em altas concentrações de nitrogênio GS é adenililada pela enzima bifuncional adenililtransferase (Atase), produto do gene *glnE* (NINFA *et al.*, 1995). A GS possui 12 subunidades idênticas de aproximadamente 55 kDa codificadas pelo gene *glnA*. A adição de um resíduo de AMP a cada subunidade da enzima leva a uma redução progressiva de sua atividade (MERRICK & EDWARDS, 1995). Em condições limitantes de nitrogênio o grupamento AMP é removido tornando a enzima ativa novamente (ARCONDÉGUY, 2001).

A proteína Utase/UR e P_{II} fazem parte de uma cascata que regula a expressão de *glnA* e a atividade de GS respectivamente. A forma não modificada de

P_{II} é um sinal intracelular de excesso de nitrogênio influenciando a Atase para adenililar (e inativar) a enzima GS e também atuando juntamente com NtrB para defosforilar (e inativar) o ativador transcricional NtrC, necessário para a transcrição de *glnA* (NINFA *et al.*, 1995). NtrB possui atividade de fosfatase apenas na presença da proteína P_{II} (ATKINSON *et al.*, 1994). Portanto, na presença de nitrogênio fixado, a enzima GS está em sua forma inativa, *glnA* está sendo expresso em níveis basais e os outros genes *ntr* não estão sendo expressos (BUENO *et al.*, 1985).

Em condições limitantes de nitrogênio fixado P_{II} é convertida a P_{II} -UMP pela enzima Utase/UR, influenciando a Atase a ativar a GS inativa através da remoção do grupamento AMP e permitindo o acúmulo do ativador transcricional NtrC-P (NINFA *et al.*, 1995). Portanto, em condições limitantes de nitrogênio ocorre: aumento da atividade específica da GS, da síntese da GS e da expressão dos genes *ntr* (REITZER, 2003).

1.10 REGULAÇÃO DOS GENES *nif*

Nas bactérias capazes de crescer diazotroficamente a fixação do nitrogênio atmosférico pode ser a rota principal de assimilação deste composto. Devido à sensibilidade da nitrogenase ao oxigênio e à grande demanda energética desta reação, a fixação biológica de nitrogênio ocorre somente quando é necessária e quando as condições são favoráveis. O modo primário de regulação é via controle da transcrição dos genes responsáveis pela fixação biológica do nitrogênio (genes *nif*) (ARCONDÉGUY, 2001). Os genes *nif* são necessários para a síntese e

atividade do complexo enzimático da nitrogenase. Estes genes estão sujeitos a regulação pelos genes regulatórios de nitrogênio (*ntr*), genes *ntrA* (*rpoN*), *ntrB* e *ntrC*, que exercem controle geral em operons sujeitos a regulação por nitrogênio (DRUMMOND *et al.*, 1983).

A transcrição dos genes *nif* é dependente de uma forma alternativa da RNA polimerase contendo o fator σ^{54} e são ativados pela proteína NifA (FISCHER, 1994). Ativação da transcrição de genes dependentes da RNA polimerase- σ^{54} sempre requer um ativador transcricional. Devido a este requerimento a expressão destes genes pode ser completamente bloqueada quando as condições não favorecem a fixação de nitrogênio (REITZER, 2003). A proteína NifA possui uma estrutura modular típica de proteínas ativadoras de promotores dependentes de σ^{54} . O domínio N-terminal está envolvido em funções regulatórias e possui baixa similaridade entre proteínas NifA de diversos organismos. O domínio central possui dois sítios potenciais para ligação de nucleosídeos trifosfato e o domínio C-terminal possui um motivo hélice-volta-hélice envolvido na ligação ao DNA (FISCHER, 1994).

Para ativar a transcrição dos genes *nif*, NifA se liga a motivos palindrômicos (TGT-N₁₀-ACA) que estão localizados de 100 a 200pb à montante de promotores *nif* e faz contato com a RNA polimerase- σ^{54} através da formação de uma alça no DNA. Em muitos casos a formação da alça é assistida pelo fator de integração do hospedeiro (IHF) que se liga a um sítio situado entre o sítio de ligação de NifA e o promotor. Para ativar a transcrição NifA catalisa a isomerização do complexo fechado entre a RNA polimerase- σ^{54} e o promotor *nif* em complexo aberto, em uma reação dependente da hidrólise de nucleosídeos trifosfato (BERGER *et al.*, 1995).

O modo de ativação da transcrição dos genes *nif* é comum a um grande número de bactérias fixadoras de nitrogênio, enquanto que a regulação da transcrição e atividade de NifA difere de um organismo a outro (ARSENE *et al.*, 1996). Em *Klebsiella pneumoniae* e *Azotobacter vinelandii*, NifL controla a atividade de NifA. Quando as condições não são adequadas para a fixação de nitrogênio, NifL seqüestra a proteína NifA em um complexo proteína-proteína inibindo a ativação dos promotores *nif* mediados por NifA (RAMIREZ *et al.*, 2002).

A proteína regulatória de nitrogênio, NtrC, ativa a transcrição pela enzima RNA polimerase- σ^{54} (PORTER *et al.*, 1995). NtrC é composta por três domínios funcionais: o domínio N-terminal, o domínio C-terminal e o domínio central. O domínio N-terminal contém o sítio de fosforilação e é o domínio regulatório; o domínio C-terminal contém um motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA e o domínio central é o domínio de ativação transcricional. O domínio central é composto por 240 resíduos de aminoácidos e altamente conservado entre os ativadores transcricionais da RNA polimerase σ^{54} -holoenzima (YAN & KUSTU, 1999).

A proteína NtrC catalisa a isomerização dos complexos fechados entre a polimerase e o promotor em complexos abertos transcricionalmente produtivos, em uma reação dependente da hidrólise de um nucleosídeo trifosfato (ATP ou GTP). NtrC é capaz de se ligar ao sítio de ligação no DNA apenas na forma fosforilada, que é capaz de ativar a transcrição. Oligômeros de NtrC-P, provavelmente octâmeros, são requeridos para a atividade ATPásica (WYMAN *et al.*, 1997). O controle da atividade de NtrC em resposta aos níveis de nitrogênio é mediado por NtrB que atua como doador de grupo fosfato para NtrC (KERN *et al.*, 1999).

NtrC é uma proteína ativadora de diversos genes, dentre eles, um transportador de amônia (AmtB), *glnA*, permeases de aminoácidos e enzimas catabólicas. NtrC também ativa transcrição de genes que codificam para proteínas regulatórias: NtrB, NtrC, GlnK e a proteína Nac (FIGURA 2). A proteína de assimilação de nitrogênio (Nac) ativa a transcrição de genes dependentes da RNA polimerase- σ^{70} enquanto que NtrC ativa a transcrição de genes dependentes da RNA polimerase- σ^{54} (FIGURA 2). Aparentemente NtrC exerce controle sobre praticamente 2% dos genes de *Escherichia coli* (aproximadamente 75 proteínas) (ZIMMER *et al.*, 2000).

1.11 *Herbaspirillum seropedicae*

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foi primeiramente isolada na cidade de Seropédica, Rio de Janeiro, por BALDANI e colaboradores (1986). Pertence ao gênero *Herbaspirillum*, que recebeu essa denominação por apresentar bactérias pequenas em forma de espiral encontradas em associação com plantas herbáceas. São gram negativas, geralmente vibríóides e às vezes helicoidais. *H. seropedicae* geralmente possui 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).

É um diazotrofo endofítico, membro da subclasse β de proteobactérias e encontrado em associação com diversas gramíneas de interesse na agricultura (REIS *et al.*, 2000). Já foi isolado de raízes de milho, trigo, sorgo, arroz e cana de açúcar e de raízes, caules e folhas de milho e arroz (OLIVARES *et al.*, 1996). São

organismos aeróbicos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico em condições de microaerofilia (0,04 a 0,2kPa) (FU & BURRIS, 1989).

OLIVARES e colaboradores (1996), por meio de experimentos nos quais *Herbaspirillum* era inoculado em solo desprovido de raízes, demonstraram que *H. seropedicae* é endofítico obrigatório. Em contraste a diazotrofos da rizosfera, que necessitam competir com a microflora do solo por fontes de carbono, diazotrofos endofíticos como *H.seropedicae* podem ser encontrados no interior de tecidos das plantas em um ambiente mais uniforme e protegido o que explica sua alta contribuição na fixação biológica do nitrogênio (OLIVARES *et al.*, 1996).

Esta bactéria, além de converter o dinitrogênio atmosférico em amônio, é capaz de produzir promotores do crescimento vegetal como o ácido indolacético, giberilinas e citoquininas (REIS *et al.*, 2000).

1.12 REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM *Herbaspirillum seropedicae*

A enzima nitrogenase de *Herbaspirillum seropedicae* sofre inibição rápida e reversível de sua atividade quando íons amônio e outras fontes de nitrogênio como L-glutamato, L-serina, L-cisteína, metilamina e amônia são adicionadas a culturas fixando nitrogênio (KLASSEN, 1997).

A regulação da fixação de nitrogênio neste organismo envolve a proteína ativadora transcricional NifA e o sistema de regulação geral de nitrogênio (Ntr) (PEDROSA *et al.*, 2001) (FIGURA 3). O promotor *nifA*, ativo em condições de

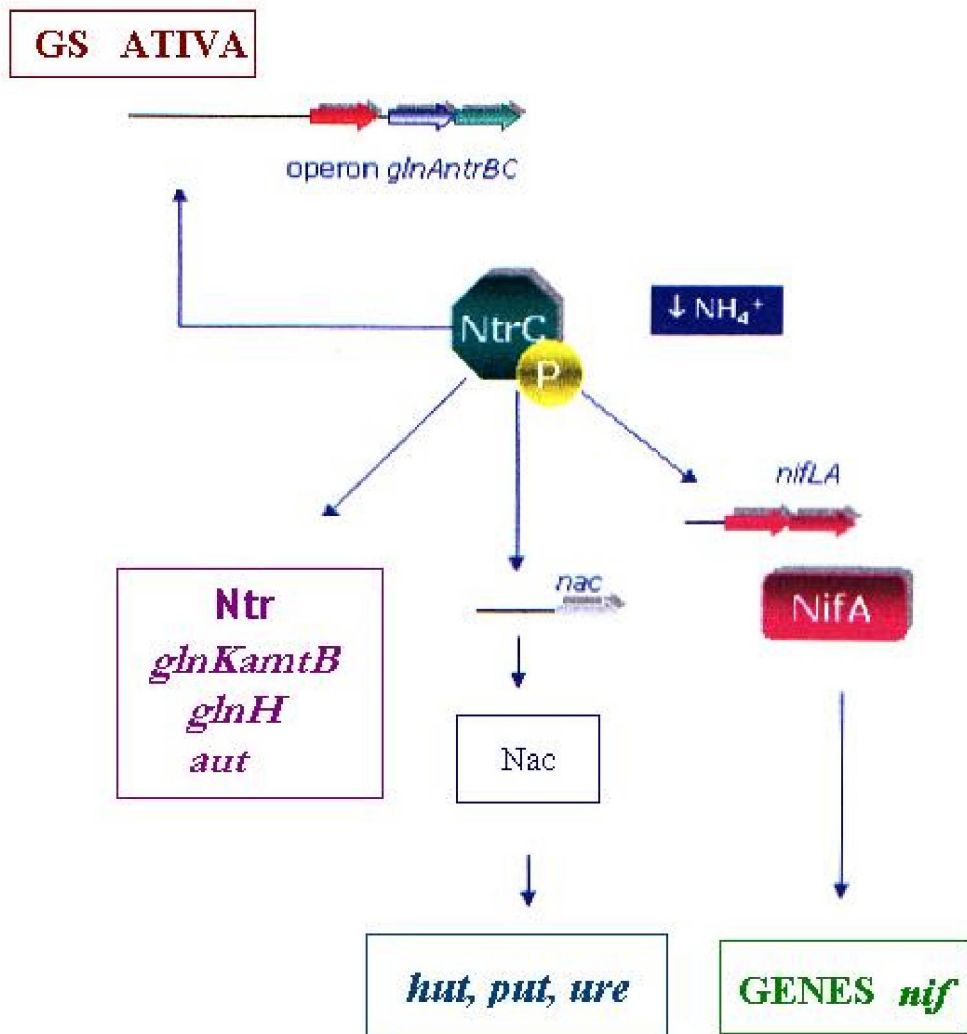


FIGURA 2: ALGUNS DOS PROCESSOS FISIOLÓGICOS ATIVADOS PELA PROTEÍNA NTRC EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE ÍONS AMÔNIO (Adaptado de PERSUHN, 2001)

fixação de nitrogênio, é do tipo -24/-12 (SOUZA *et al.*, 2000) e a expressão a partir deste promotor é dependente da proteína NtrC e RpoN (σ^N).

Experimentos "in vitro" demonstraram que a ativação do promotor *nifA* pela proteína NtrC foi estimulada pelo fator de integração do hospedeiro (IHF), uma proteína que auxilia no dobramento do DNA. Por outro lado, IHF prejudicou a ativação do promotor *nifA* pela proteína NifA. Portanto IHF atua positivamente na ativação dependente de NtrC e negativamente na ativação por NifA no promotor *nifA* (WASSEM *et al.*, 2000). O promotor do gene *nifA* é reprimido por nitrogênio fixado, mas não por oxigênio (SOUZA *et al.*, 2000) (FIGURA 3).

A atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* é controlada por oxigênio, íons amônio e pela proteína P_{II}. Provavelmente a proteína P_{II} participa na sinalização do status de nitrogênio para a proteína NifA (BENELLI *et al.*, 1997). MONTEIRO e colaboradores (1999) demonstraram que o domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* possui função regulatória, agindo de maneira análoga à proteína NifL de *Klebsiella pneumoniae*, em um mecanismo auto-inibitório que inativa a proteína quando na presença de altas concentrações de íons amônio.

Em *H. seropedicae* o gene *glnA*, que codifica para GS, faz parte do operon *glnAntrBC* (PEDROSA *et al.*, 2001). PERSUHN e colaboradores (2000) demonstraram que em condições limitantes de nitrogênio a expressão do gene *glnA* é dependente de NtrC, enquanto que na presença de excesso de nitrogênio a expressão de *glnA* ocorre a partir de promotores σ^{70} .

A proteína P_{II} de *H. seropedicae* não está envolvida no controle da enzima GS através de adenililação/desadenililação, mas é essencial para a expressão dos genes de fixação de nitrogênio. Sua função é provavelmente similar ao gene *glnB*

de *Azospirillum brasilense*: funcionar como molécula sinalizadora de limitação de nitrogênio para a proteína NifA (BENEILLI *et al.*, 1997).

Mutantes dos genes *ntrB* e *ntrC* de *H. seropedicae* apresentaram baixa atividade de GS, foram deficientes no controle da atividade de GS através de adenililação/desadenililação e falharam em desreprimir a síntese da nitrogenase. Adicionalmente mutantes *ntrC* foram incapazes de utilizar nitrato como fonte de nitrogênio. Estes resultados indicam que o sistema Ntr está envolvido na regulação da expressão do gene *glnA*, controle da atividade de GS e regulação da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* (PERSUHN *et al.*, 2000; PEDROSA *et al.*, 2001).

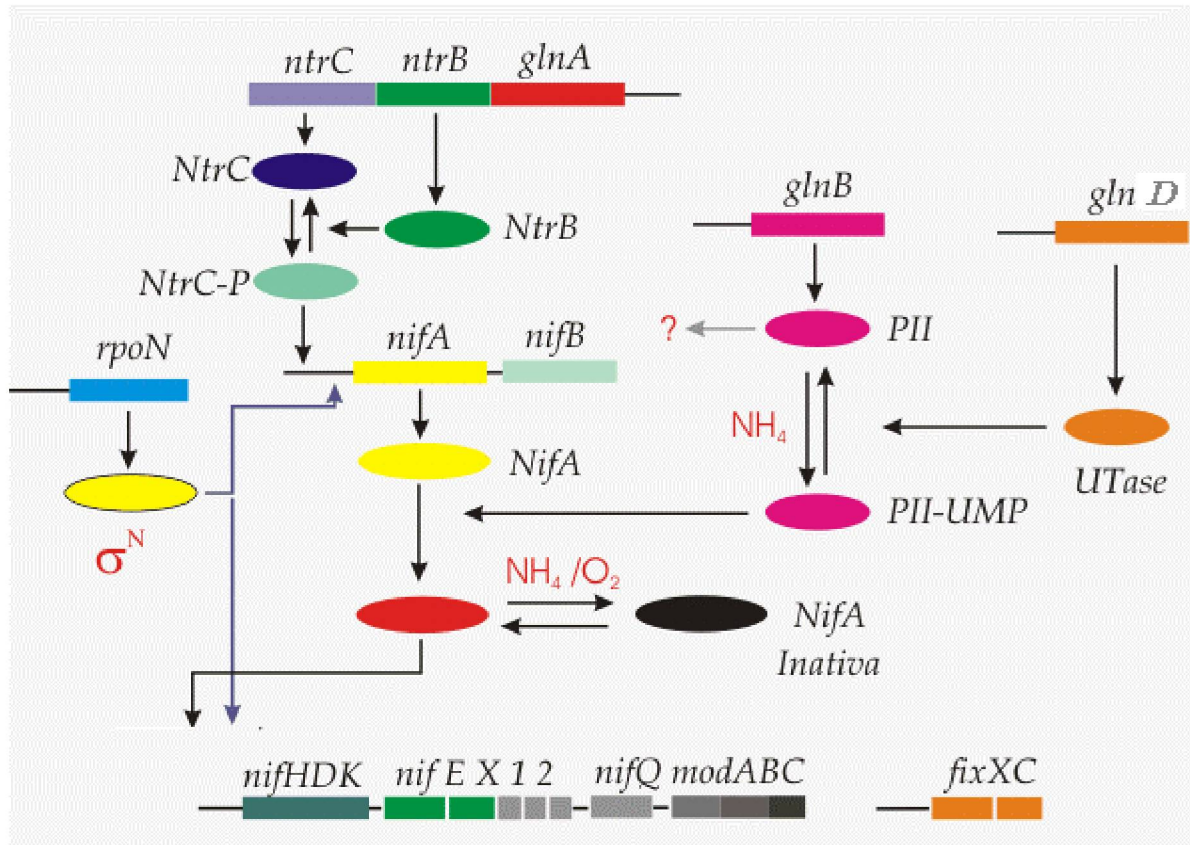


FIGURA 3: REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM *Herbaspirillum seropedicae*. (www.genopar.com.br)

1.13 JUSTIFICATIVA

O genoma da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* já foi seqüenciado e está atualmente sendo anotado. Dados de estudos proteômicos podem ser utilizados para confirmação de ORFs preditas pelo seqüenciamento. Através dos dados fornecidos pelo genoma será possível identificar proteínas expressas diferencialmente. Portanto, a análise proteômica juntamente com os dados do genoma possibilitará o entendimento detalhado da biologia deste microrganismo.

A análise comparativa da expressão protéica em condições de fixação e não fixação de nitrogênio, por meio de eletroforese bidimensional possibilitará a visualização e identificação de proteínas envolvidas no processo de fixação de nitrogênio, assunto que tem sido alvo de estudos deste laboratório há mais de 19 anos.

Adicionalmente, a análise comparativa entre as estirpes selvagem (SMR1) e as estirpes mutantes SMR54 (*nifA*⁻) e DCP286A (*ntrC*⁻), em diferentes condições fisiológicas, possibilitará a identificação de proteínas diretamente e/ou indiretamente controlada pelos genes *nifA* e *ntrC*, além de seu envolvimento na regulação da fixação de nitrogênio.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar análise proteômica das estirpes selvagem (SMR1) e das estirpes mutantes SMR54 (*nifA*) e DCP286A (*ntrC*) de *Herbaspirillum seropedicae* em diferentes condições fisiológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estabelecer um protocolo adequado para o fracionamento de proteínas por eletroforese bidimensional;
2. Identificar proteínas diferencialmente expressas em condições fisiológicas diversas: alta concentração de amônio, baixa concentração de amônio e em condições de fixação de nitrogênio;
3. Identificar proteínas diferencialmente expressas entre estirpes diferentes sob as mesmas condições fisiológicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

O pharmalyte, tampão IPG e uréia foram obtidos da Amersham Biosciences. Os diversos reagentes utilizados para solubilização e dosagem de proteínas, assim como os reagentes utilizados para preparo das soluções utilizadas na eletroforese de proteínas, foram obtidos de diferentes fornecedores (Life Technologies, Merck, Gibco BRL, Sigma, Invitrogen e Promega). Os reagentes utilizados para o preparo das amostras analisadas por espectrometria de massa foram obtidos da Merck, Sigma e Bio-Rad. A tripsina foi adquirida da Promega.

3.2 ESTIRPES UTILIZADAS

Foram utilizadas as seguintes estirpes de *Herbaspirillum seropedicae*:

SMR1 : Sm^R, Nif⁺ (SOUZA *et al*, 1995)

SMR54 : Sm^R, Km^R, Nif⁻, *nifA* : : Km (SOUZA *et al*, 1995)

DGP286A: Sm^R, Km^R, *ntrC* : : Tn5-B20 (PERSUHN, 2001)

3.3 MEIOS DE CULTIVO

O meio de cultivo utilizado para crescimento da estirpe SMR1 e das estirpes mutantes, SMR54 (*NifA*⁻) e DCP286A (*NtrC*⁻) de *H. seropedicae*, foi o NFb-Malato cuja composição é a seguinte:

MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
CaCl ₂	0,02g
NTA	0,056g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,02g
Biotina	1x10 ⁻⁴ g
Malato	5g
Solução de oligoelementos	10mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2,0 x 10 ⁻³ g
MnSO ₄ .H ₂ O	2,35 x 10 ⁻³ g
H ₃ BO ₃	2,8 x 10 ⁻³ g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	8,0 x 10 ⁻³ g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2,4 x 10 ⁻³ g
Água destilada q.s.p	950mL

A solução de oligoelementos foi preparada individualmente e foram adicionados 2mL de cada oligoelemento totalizando 10mL de solução para 1000mL de meio NFb-malato. Os componentes foram dissolvidos em água destilada e a solução foi autoclavada durante 20 minutos a 1atmosfera.

No momento do uso foram adicionados 50mL de solução de fosfatos a 950mL de meio NFb-malato. O meio com fosfatos é denominado NFbHP-malato. A solução de fosfatos possui a seguinte composição:

K ₂ HPO ₄	17,8g
KH ₂ PO ₄	159,5g
Água destilada q.s.p	1000mL

A mistura de fosfatos foi autoclavada durante 20 minutos a 1atmosfera.

O meio LB (Luria-Broth), que foi adicionado no momento do uso, possui a seguinte composição:

Triptona	10g
Extrato de levedura	5g
Cloreto de sódio	10g
Água destilada q.s.p	1000mL

Os componentes foram dissolvidos em água destilada, o pH ajustado para \pm 6,8 e autoclavados durante 20 minutos a 1atmosfera.

3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para o cultivo das estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* foi utilizado o meio NFbHP-malato suplementado com 1% de LB e 20mmol/L ou 2mmol/L de

NH₄Cl. Para a estirpe SMR1 foi utilizado o antibiótico estreptomicina (80µg/mL) e para as estirpes SMR54 e DCP286A foi utilizado o antibiótico kanamicina (100µg/mL). As estirpes foram cultivadas a 30°C sob agitação de 120rpm.

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE

Para determinar a atividade da nitrogenase na estirpe selvagem, SMR1, foram feitos inóculos em frascos com capacidade para 500mL contendo 100mL de meio NFbHP-malato e 2 mmol/L de NH₄Cl. As células foram cultivadas durante 16 horas até atingir uma D.O_{600nm} de aproximadamente 1,4. As culturas foram centrifugadas durante 5 min a 5000rpm em centrífuga "*Hitachi*" e a solução sobrenadante foi descartada. O precipitado foi ressuspenso em 100mL de meio NFbHP-Malato isento de amônia e contendo fosfato nas mesmas concentrações descritas anteriormente. O volume foi distribuído em 5 frascos de 60mL (20mL/frasco). Os frascos foram colocados em agitador de água a 32°C sob agitação de 110rpm durante 4 horas.

A atividade de nitrogenase foi determinada através do método de redução do acetileno a etileno (DILWORTH, 1966). O acetileno é utilizado como substituto artificial do N₂ e o produto da redução pela nitrogenase (etileno) pode ser detectado rapidamente e com grande sensibilidade por cromatografia gasosa.

Após o período de 4 horas, os frascos foram vedados com rolha de borracha e foram injetados 4mL de acetileno gasoso (correspondente a 1/10 do volume da fase gasosa). Os frascos voltaram ao agitador de água e permaneceram durante 1 hora sob agitação de 110rpm. Foram então retirados 0,5mL da fase gasosa de

cada frasco para análise de quantidade de etileno formado através de cromatografia gasosa. O equipamento utilizado foi o cromatógrafo Varian 3400 equipado com coluna Porapak N, detector de ionização de chama e como gás de arraste o nitrogênio super seco. A temperatura da coluna foi de 120°C e a do detector 200°C.

A atividade específica da nitrogenase foi expressa em nanomoles de etileno formados por minuto, por miligrama de proteína. Para cálculo do etileno formado foi utilizado etileno padrão, no qual para cada 0,5mL correspondem 2,16 nanomoles de etileno. A dosagem de proteínas foi feita em duplicata pelo método de BRADFORD (1976).

3.6 PREPARO DA AMOSTRA PARA ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

As células das estirpes SMR1, DCP286A e SMR54 de *Herbaspirillum seropedicae* foram coletadas por centrifugação em centrífuga Hitachi (Himac CR 21) a 5000g durante 10min. Em seguida foram lavadas uma vez em solução contendo 3,0mmol/L KCl, 1,5mmol/L KH₂PO₄, 68mmol/L NaCl e 9,0mmol/L NaH₂PO₄. O precipitado foi ressuspenso em 600µL de tampão contendo 10mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 1,5mmol/L MgCl₂, 10mmol/L KCl, 0,5mmol/L DTT e 0,5mmol/L PMSF. A amostra foi aliquoteada (150µL/tubo de 2mL) e armazenada em congelador -70°C até o momento do uso.

Para realizar a lise das células, tubos contendo 150µL de amostra foram descongelados e foram adicionados 450µL de tampão de lise (9,5mol/L uréia, 2% (p/v) CHAPS, 0,8% (p/v) Pharmalyte pH 3-10 e 1% (p/v) DTT) (GÖRG *et al*). As

amostras foram sonicadas em banho de gelo (3 x 20 segundos, sonicador "*Ultrasonic Processor XL Heat Systems*) e em seguida centrifugadas por 2 minutos a 13.800 rpm em centrífuga "*Eppendorf mini spin*". A solução sobrenadante foi utilizada para realizar a isoeletrofocalização.

3.7 ISOELETROFOCALIZAÇÃO (IEF)

A isoeletrofocalização das proteínas foi realizada em equipamento IPGphor da Amersham Biosciences. A IEF foi conduzida em tiras IPG. Estas tiras continham um gradiente imobilizado de pH em gel de poliacrilamida fixado em plástico, fornecido pela Amersham Biosciences. As faixas de pH utilizadas foram pH 3 – 10 linear e pH 4 – 7 linear em tiras de 13 cm.

Previamente à isoeletrofocalização a amostra foi misturada com solução de rehidratação (8mol/L uréia, 0,5% CHAPS, 0,2% de tampão IPG, 15mmol/L DTT e traços de azul de bromofenol) (GÖRG *et al.*) para completar o volume total de 250µL.

As tiras IPG foram rehidratadas em um suporte de tamanho correspondente à tira. A solução foi aplicada no suporte e em seguida foi removido o plástico protetor. As tiras foram posicionadas com o gel voltado para baixo e foram cobertas com 1mL de óleo mineral ("*Dry Strip Cover Fluid*"). A rehidratação foi feita no equipamento IPGphor a 20°C durante 12 horas. A isoeletrofocalização foi iniciada logo após o término da rehidratação e ocorreu em três etapas de 500Vhr, 1000Vhr e 14500Vhr, totalizando 16000VhT. Após a IEF as tiras foram imediatamente equilibradas ou armazenadas em congelador -70°C para posterior utilização.

3.8 EQUILÍBRIO DAS TIRAS DE GRADIENTE DE pH IMOBILIZADO

Após a isoeletrofocalização as tiras foram equilibradas duas vezes de 15 minutos cada em 5mL de tampão de equilíbrio, contendo 50mmol/L Tris-HCl, 6mol/L uréia, 30% (p/v) glicerol e 2% (p/v) SDS em 50mmol/L de tampão Tris-HCl, pH 8,8 e 50µl de solução de azul de bromofenol 0,25% (p/v). Ao primeiro passo, foram adicionados 50mg de DTT ao tampão de equilíbrio e ao segundo passo foram adicionados 200mg de iodoacetamida ao mesmo tampão.

Após os dois passos de equilíbrio as tiras foram lavadas com água destilada, submersas por alguns minutos em tampão de corrida (LAEMMLI, 1970) e imediatamente submetidas à segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

3.9 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 na presença de SDS (SDS-PAGE), utilizando a metodologia descrita por LAEMMLI (1970). Foi preparado gel de separação na concentração de 12,5% de poliacrilamida e não foi utilizado gel de empilhamento.

A eletroforese foi realizada em géis de 18 cm x 16 cm em cuba tipo "*Hoefler SE 600 Ruby*" da Amersham Biosciences. As tiras IPG foram mergulhadas por alguns minutos no tampão de corrida e em seguida posicionadas horizontalmente no topo do gel, mantendo pleno contato com este. As tiras foram cobertas com 2mL

de solução de agarose morna (0,5% agarose, 1% SDS e traços de azul de bromofenol) e foi deixado solidificar por aproximadamente 5 minutos. A corrida foi feita limitando-se a corrente a 30 mA/gel até o azul de bromofenol atingir o limite inferior do gel. A temperatura foi mantida a 20°C por meio de refrigeração com circulador termostático Multitemp II.

3.10 VISUALIZAÇÃO DOS GÉIS

Os géis bidimensionais foram visualizados por meio de coloração com *Coomassie Blue* ou com prata.

Os géis corados com *Coomassie* permaneceram pelo menos 12 horas em solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* (LAEMMLI, 1970) e foram descorados em solução de 65% água destilada, 25% metanol e 10% ácido acético em bandeja específica para descoloração de géis (Bio-Rad, *Gel Destainer*, Modelo 556).

Para coloração com prata os géis bidimensionais permaneceram durante 1 hora em 50% metanol, 12% ácido acético e 0,5mL formaldeído 37%, seguidas por 2 x 20 min em etanol 50%, 20 min em etanol 30%, 1 minuto em 0,2g/L tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 3 lavagens com água destilada durante 20 segundos, 10 min em nitrato de prata 2g/L, 0,75mL de formaldeído 37%, 10 min em 60g/L de carbonato de sódio (Na_2CO_3), 0,5mL formaldeído 37% com 4mg de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 2 lavagens com água destilada durante 2 minutos.

3.11 CAPTURA DAS IMAGENS

As imagens dos géis bidimensionais foram digitalizadas utilizando o scanner "Biochemi UVP".

3.12 ANÁLISE DOS GÉIS

As análises dos géis bidimensionais foram feitas no Programa Imagemaster™ 2D, versão 2002.01, adquirido da Amersham Biosciences.

A subtração do fundo foi feita utilizando o modo "no spot". A detecção de pontos protéicos foi feita automaticamente seguida de correções manuais. O volume dos pontos protéicos detectados foi normalizado utilizando o modo de normalização de volume total de pontos protéicos, no qual o volume de cada ponto é dividido pelo volume total dos pontos detectados e multiplicado por 100. Para a realização das análises comparativas foi utilizado filtro para considerar apenas pontos protéicos com volume normalizado igual ou superior a 0,03.

As imagens de géis resultantes de uma estirpe em uma mesma condição fisiológica foram sobrepostas e foi criado um gel de referência artificial representativo de todos os outros realizados a partir da mesma estirpe e na mesma condição (ESQUEMA 1). Os géis representativos de cada condição foram comparados para verificar diferença de expressão. Para considerar uma proteína como induzida ou reprimida o critério utilizado foi o aparecimento ou desaparecimento da proteína do gel. Para considerar como diferença quantitativa de expressão, foram considerados aumento ou diminuição de pelo menos duas vezes o volume normalizado.

3.13 RETIRADA DE PROTEÍNAS DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS

A retirada de proteínas para posterior análise por espectrometria de massa foi feita com auxílio de uma ponteira de 1000 μ L, estéril, com a ponta cortada. As proteínas foram retiradas e armazenadas em tubos de 2mL ou placas de 96 poços em congelador -70°C até o momento da análise.

3.14 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA

O preparo das amostras para análise por meio de MALDI-ToF foi feito conforme o seguinte protocolo, modificado de WESTERMEIER (2002).

Para remoção dos corantes os pedaços de gel contendo as proteínas foram transferidos para tubos de 500 μ L e receberam 30 μ L de solução 75mmol/L de bicarbonato de amônio em etanol 40%. A suspensão foi agitada em vortex e deixada em repouso durante 10 minutos. Este procedimento foi repetido até total descoloração do gel, o que exigiu 8 repetições para pedaços levemente corados e 10 repetições para géis corados mais intensamente.

Para realizar a desidratação dos fragmentos de géis foram feitas 3 lavagens com 25 μ L de acetonitrila 100% e em seguida os géis foram secados em sistema de centrifugação a vácuo durante 25 minutos.

Na etapa de digestão enzimática os géis foram reidratados com solução contendo tripsina (10 μ g/mL) em 50mmol/L de tampão bicarbonato de amônio pH 8,0. A solução com enzima foi aplicada fria (4°C), as amostras permaneceram em banho

de gelo durante 45 minutos e em seguida foram colocadas em estufa 37°C durante 12 horas. Após este período a solução com enzima foi removida e foi adicionado tampão bicarbonato de amônio pH 8,0 em quantidade suficiente para cobrir completamente os pedaços de géis. Nesta etapa as amostras foram congeladas a -70°C e enviadas em caixas contendo gelo seco para São Paulo, onde foram feitas as etapas de extração dos peptídeos e análise espectrofotométrica por MALDI-ToF.

Para extração dos peptídeos, produtos da digestão com tripsina, foram adicionados 20µL de solução bicarbonato de amônio 50mmol/L aos pedaços de géis, seguidos de ultrassom durante 10 minutos. Em seguida foram adicionados 20µL de ACN 5% e TFA 1/1 às amostras e estas foram colocadas em banho de ultrassom por 10 minutos. A solução sobrenadante foi coletada e o procedimento de adição de ACN 5% , TFA 1/1 e banho de ultrassom foi repetido 2 vezes, sendo que em cada passo foi feita coleta da solução sobrenadante. Após esse período a solução foi evaporada em sistema à vácuo. Foram adicionados 0,3µL de amostra à lâmina do MALDI, juntamente com 0,3µL de matriz (5mg HCCA/mL de solução ACN 5% e TFA 1/1) e foram feitas as análises espectrométricas.

3.15 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA ATRAVÉS DE MALDI-ToF

As análises espectrométricas dos peptídeos resultantes da digestão com tripsina foram feitas em equipamento Ettan Maldi-Tof/Pro (Amersham Biosciences), no CAT-CEPIT (Centro de Tecnologia Aplicada) do Instituto Butantan, São Paulo. O

método de aquisição utilizado foi o modo de detecção tipo refletor para íons com polaridade positiva.

3.16 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Para a identificação das proteínas foi utilizado o sítio ProFound (disponível em: <<http://www.proteomics.com/prowl-cgi/ProFound.exe>>) juntamente com os valores das massas trípticas obtidas pelas análises espectrométricas em MALDI-Tof e os valores de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM) calculados pelo programa Imagemaster. A tolerância para a MM foi de $\pm 10\%$ e os valores de pI foram especificados conforme a faixa de pH utilizada para isoeletfocalização (pH 4 – 7 ou pH 3 – 10). A base de dados escolhida foi NCBIInr e grupo taxonômico das proteobactérias. Foram consideradas as modificações de resíduos de cisteína pelo tratamento com iodoacetamida.

Foram também utilizados os sítios MASCOT (disponível em: <<http://www.matrixscience.com/cgi/>>) e TagIdent (disponível em: <<http://us.expasy.org/tools/tagident.html>>). A busca pelo sítio MASCOT foi feita utilizando os valores provenientes de PMF e a base de dados NCBIInr, enquanto que a busca pelo sítio TagIdent foi realizada utilizando os valores calculados de pI e MM, a base de dados Swiss-Prot e a palavra chave nitrogênio. Para ambas buscas foi utilizado o grupo taxonômico das bactérias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO

A primeira etapa do trabalho consistiu em estabelecer um conjunto de condições que possibilitassem boa resolução e reprodutibilidade de géis bidimensionais de *Herbaspirillum seropedicae*. Foram testados diferentes métodos para preparo da amostra, concentrações de proteína e protocolos de isoelectrofocalização. A partir destes experimentos foi estabelecido um protocolo que descreve o conjunto de condições otimizadas (APÊNDICE I).

4.2 PROTEÍNAS DETECTADAS EM CADA CONDIÇÃO

Para comparação entre géis bidimensionais resultantes de amostras de diferentes condições fisiológicas e diferentes estirpes, foram utilizadas apenas proteínas com volume normalizado (Vn) igual ou superior a 0,03. Essa medida foi adotada para produzir resultados mais confiáveis, tendo em vista que existe grande dificuldade para realizar comparação de proteínas cujo volume normalizado é inferior ao valor estipulado. A tabela 1 mostra o número de proteínas detectadas em cada condição para todas as estirpes de *H. seropedicae* analisadas.

É difícil prever quantas proteínas estão representadas nos pontos protéicos detectados pois frequentemente produtos protéicos de múltiplos genes podem

migrar para as mesmas coordenadas de um gel bidimensional. GYGI e colaboradores (2000) verificaram os produtos de 6 genes presentes em um mesmo ponto fracamente corado de um gel bidimensional da estirpe YPH499 de levedura. Outros pesquisadores (ZHANG & CHAIT, 2000; HANCOCK *et al.*, 2002) também verificaram a presença de múltiplas proteínas em apenas um ponto protéico. A utilização de faixas mais estreitas de pH para a isoeletrofocalização e o pré-fractionamento das amostras pode contribuir na diminuição da co-migração de proteínas em géis bidimensionais.

A presença da mesma proteína em localizações diferentes do gel também é observada. Tal fato ocorre devido à modificações pós-traducionais, que podem alterar o ponto isoelétrico e a massa molecular da proteína. GIOMETTI e colaboradores (2002) observaram que a proteína MJ0324 de *Methanococcus janaschii*, identificada como fator de alongamento, foi encontrada em diversas regiões do gel, apresentando variações tanto no ponto isoelétrico quanto na massa molecular. LEE e colaboradores (2003) observaram que 7 proteínas de *Neospora caninum* estiveram presentes em múltiplas regiões do gel. HESKETH e colaboradores (2002) observaram que 110 proteínas foram detectadas em vários pontos de géis bidimensionais.

Modificações do pI das proteínas são decorrentes da fosforilação, acetilação e adição de grupos glicosídicos. Modificações da massa molecular podem ser devido à proteólise limitada da proteína (nos casos em que a MM encontrada é menor que a esperada) ou formação de agregados de uma mesma proteína ou associação com outras proteína quando a MM observada é superior à esperada (WILDGRUBER *et al.*, 2002; GIOMETTI *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2003; HESKETH *et al.*, 2002).

	Detecção sem filtro	Detecção com filtro (*Vn ≥ 0,03)
pH 3 a 10		
SMR1 20mmol/L NH ₄ Cl	350 ± 47	284 ± 23
SMR1 fix**	305 ± 38	252 ± 18
SMR1 2mmol/L NH ₄ Cl	244 ± 32	220 ± 25
SMR54 20mmol/L NH ₄ Cl	271 ± 31	233 ± 14
SMR54 2mmol/L NH ₄ Cl	99 ± 38	94 ± 37
DCP286A 20mmol/L NH ₄ Cl	236 ± 21	210 ± 27
DCP286A 2mmol/L NH ₄ Cl	123 ± 42	118 ± 38
pH 4 a 7		
SMR1 referência (20mmol/L NH ₄ Cl)	211 ± 18 365 (750µg)	176 ± 19 290 (750µg)
SMR1 fix**	187 386 (750µg)	174 304 (750µg)
SMR1 2mmol/L NH ₄ Cl	263	211
SMR54 20mmol/L NH ₄ Cl	217	186

*Vn = Volume normalizado

** fix = amostras na condição de fixação de nitrogênio

TABELA 1: NÚMERO TOTAL DE PONTOS PROTÉICOS DETECTADOS EM CADA CONDIÇÃO PARA TODAS AS ESTIRPES DE *H. seropedicae*.

A concentração de proteína para as condições nas quais ela não está indicada entre parênteses foi de 600µg.

4.3 EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

O número máximo de pontos protéicos detectados na faixa de pH 3 a 10 foi 350 para a estirpe selvagem SMR1 nas condições de referência (20mmol/L de NH_4Cl). Na tentativa de detectar um número maior de pontos protéicos desta estirpe a quantidade de proteína foi aumentada de 600 $\mu\text{g/gel}$ para 1mg/gel. Nesta condição foi possível detectar um número maior de proteínas entretanto, estes géis ficaram extremamente saturados, o que dificulta as análises comparativas (FIGURA 4). O'FARREL (1975), CHANG e colaboradores (2003) e OLIVER (2000) relataram que geralmente, quanto menor a quantidade de proteína, melhor a resolução dos géis bidimensionais. HESKETH e colaboradores (2002), na tentativa de detectar um número maior de pontos protéicos, também aumentaram a concentração de proteína e igualmente observaram uma significativa redução da resolução dos géis.

4.4 ANÁLISES COMPARATIVAS DA ESTIRPE SMR1 NA FAIXA DE pH 3 a 10

As análises comparativas da estirpe selvagem de *H.seropedicae* (SMR1) foram realizadas utilizando amostras com $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ aproximadamente igual a 1,04. Foram feitas comparações entre amostras crescidas em 20mmol/L de NH_4Cl (alta amônia), 2mmol/L de NH_4Cl (baixa amônia) e amostras que foram submetidas à desrepressão da nitrogenase e teste de redução de acetileno para confirmar que estavam fixando nitrogênio.

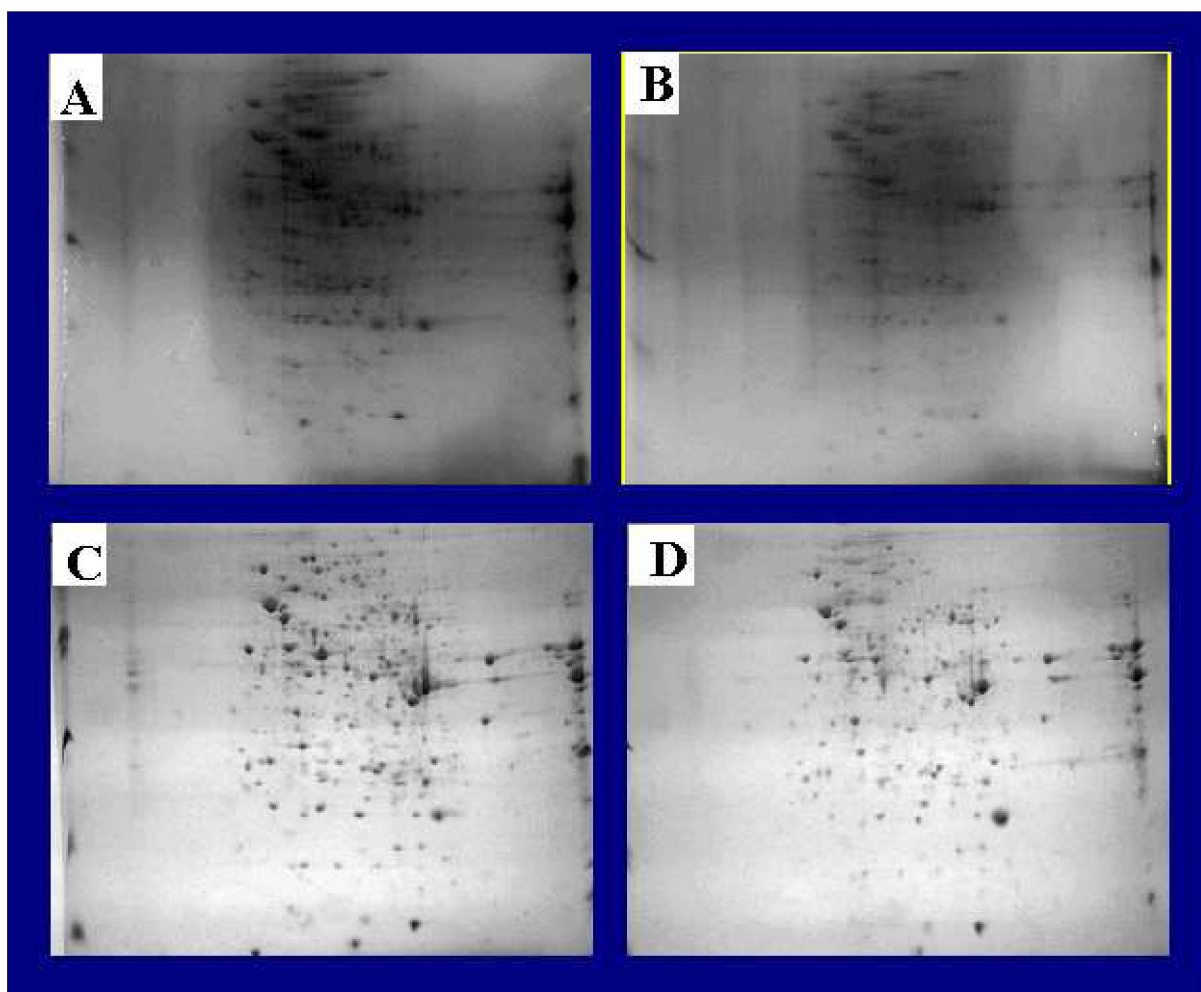


FIGURA 4: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA SOBRE A RESOLUÇÃO DE GÉIS BIDIMENSIONAIS.

Figuras A e B: géis contendo 1mg de proteína. Figuras C e D: géis contendo 600µg de proteína. Os géis A e C são da estirpe SMR1 cultivada na condição de referência e os géis B e D são da mesma estirpe sob condição de fixação de nitrogênio.

Para todas as análises comparativas realizadas na faixa de pH 3 a 10 foram feitos pelo menos três géis bidimensionais para cada estirpe em cada condição, utilizando duas amostras diferentes. Em todos os géis foram utilizadas 600µg de proteína e a coloração foi feita por *Coomassie*. A partir de quatro géis da estirpe selvagem, SMR1, cultivada em alto amônio (FIGURA 5), foi obtido um gel artificial que representa a média dos géis nestas condições (FIGURA 6). Neste gel foram detectados 316 pontos protéicos com volume normalizado maior ou igual a 0,03. Este procedimento foi repetido para todas as estirpes nas condições fisiológicas avaliadas.

As análises comparativas entre culturas cultivadas em alto amônio e culturas cultivadas em condição de fixação de nitrogênio, demonstraram que 25 proteínas foram induzidas pela condição de fixação de nitrogênio enquanto 71 foram reprimidas. Quarenta e nove proteínas presentes nas duas condições tiveram seus níveis de expressão alterados, sendo que para 12 delas ocorreu aumento da expressão protéica e para 37 ocorreu diminuição dos níveis de expressão na condição de fixação de nitrogênio.

Comparando culturas cultivadas em alto amônio com culturas cultivadas em baixo amônio, foram detectadas 48 proteínas reprimidas nas condições de baixo amônio e 3 proteínas que foram induzidas nesta condição (FIGURA 8). Sessenta proteínas apresentaram diferença quantitativa de expressão. Na condição de baixa amônia quarenta proteínas tiveram diminuição dos níveis de expressão enquanto que 20 proteínas tiveram seus níveis de expressão aumentados.

A partir da comparação de géis bidimensionais resultantes de amostras obtidas em condição de fixação de nitrogênio e amostras obtidas em baixo

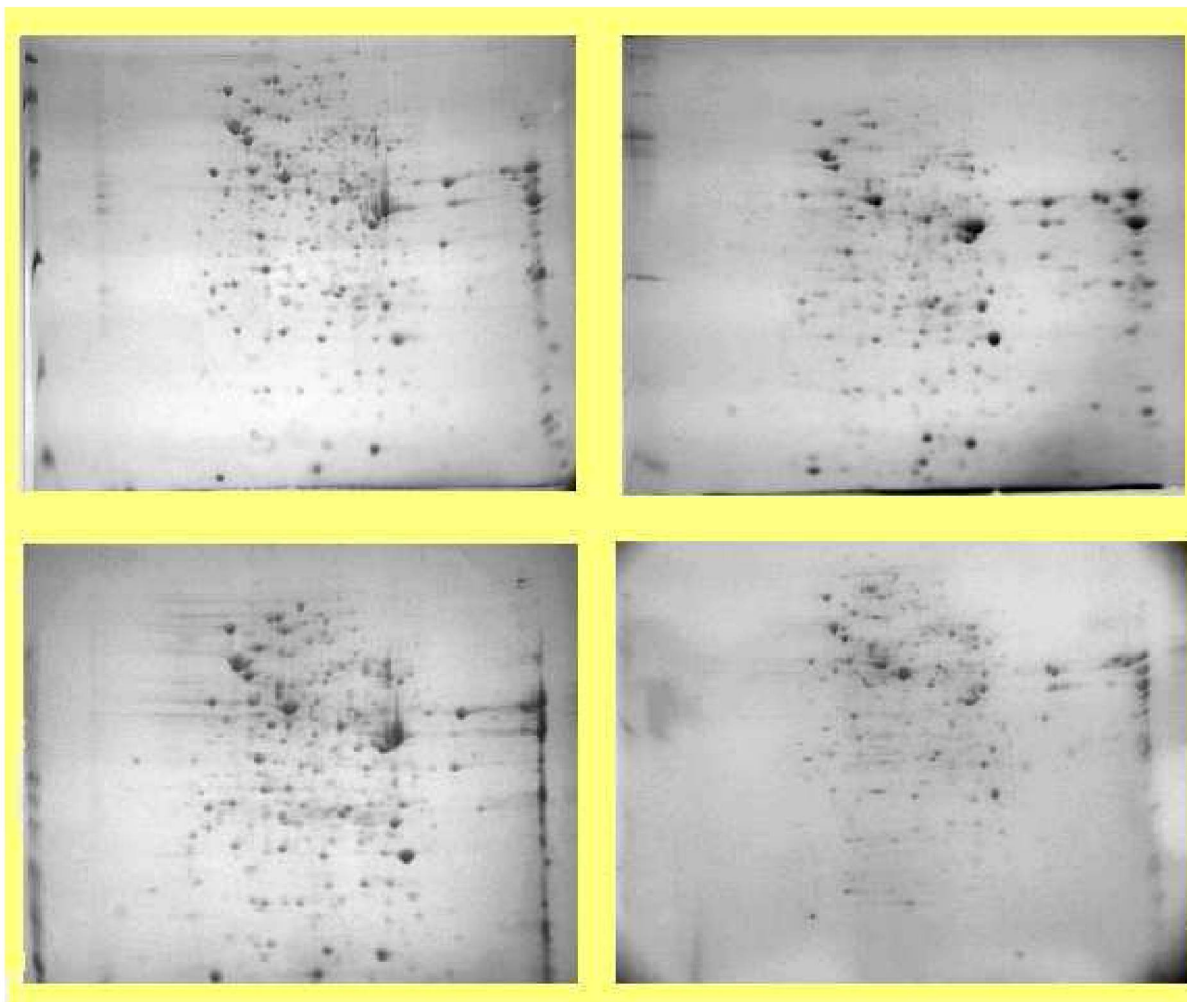


FIGURA 5: GÉIS BIDIMENSIONAIS DA ESTIRPE SELVAGEM SMR1

Imagem dos 4 géis que foram utilizados para criação do gel de referência artificial da estirpe SMR1 cultivada em 20mmol/L de NH_4Cl . Todos os géis continham 600 μg de proteína que foram isoeletrofocalizadas na faixa de pH 3 a 10, em tiras IPG de 13 cm e submetidas a SDS-PAGE 12,5%.

amônio, foram detectadas cinquenta e sete proteínas reprimidas na condição de baixo amônio e 21 proteínas induzidas nesta condição. As proteínas que foram induzidas em baixo amônio estiveram presentes no gel de referência. Quarenta e três proteínas apresentaram diferença quantitativa nos níveis de expressão, sendo que 15 tiveram seus níveis de expressão aumentados e 28 apresentaram diminuição dos níveis de expressão na condição de baixa amônia.

4.5 ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE ESTIRPES EM TIRAS IPG pH 3 a 10

O perfil de expressão protéica da estirpe selvagem SMR1 foi comparado com aquele das estirpes mutantes DCP286A (*ntrC*) e SMR54 (*nifA*). A partir das análises comparativas entre as estirpes SMR1 e DCP286A cultivadas em 20mmol/L de NH₄Cl foram detectadas 70 proteínas reprimidas no mutante. Nenhuma proteína foi induzida neste mutante na condição de alta amônia, porém ocorreu aumento nos níveis de expressão de 32 proteínas e diminuição dos níveis de expressão de 23 (FIGURA 9).

Comparando as mesmas estirpes cultivadas em 2mmol/L de NH₄Cl detectou-se que 157 proteínas estavam reprimidas no mutante e que uma proteína induzida nesta estirpe. Cinquenta e seis proteínas apresentaram diferenças quantitativas de expressão, houve aumento dos níveis de expressão de 32 proteínas e diminuição dos níveis de expressão de 24.

A partir das análises comparativas entre a estirpe SMR1 e o mutante SMR54 (*nifA*⁻) cultivados em 20mmol/L de amônia observou-se que 57 proteínas foram reprimidas e 12 foram induzidas no mutante SMR54.

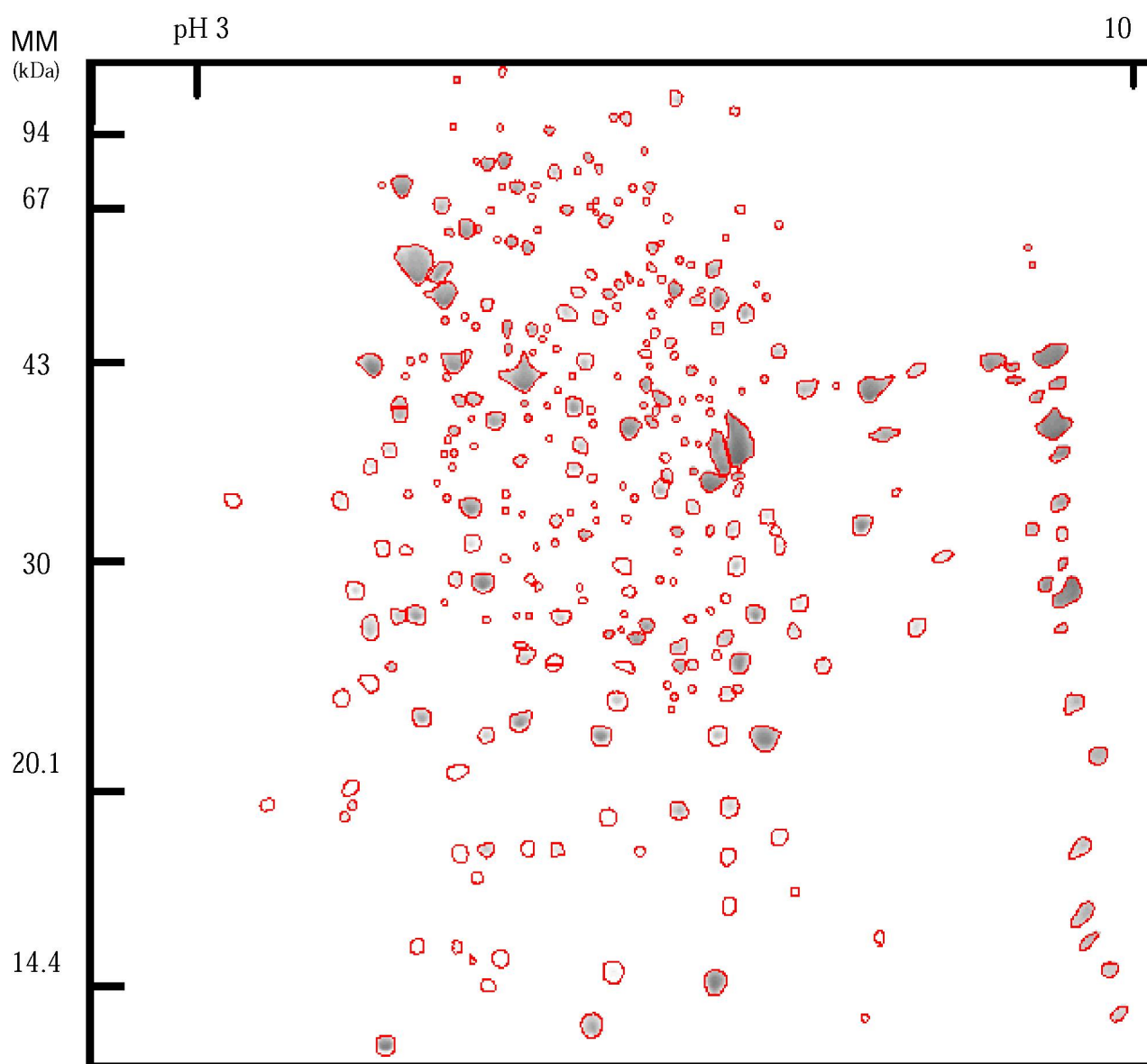


FIGURA 6: GEL ARTIFICIAL DE REFERÊNCIA DA ESTIRPE SMR1

Gel representativo de todos os géis de referência feitos utilizando 600µg de proteína. A isoeletrofocalização foi feita em tiras IPG, pH 3 a 10, 13 cm e SDS-PAGE foi realizada em géis de poliacrilamida 12,5%. Neste gel foram detectados 316 pontos protéicos com $V_n \geq 0.03$.

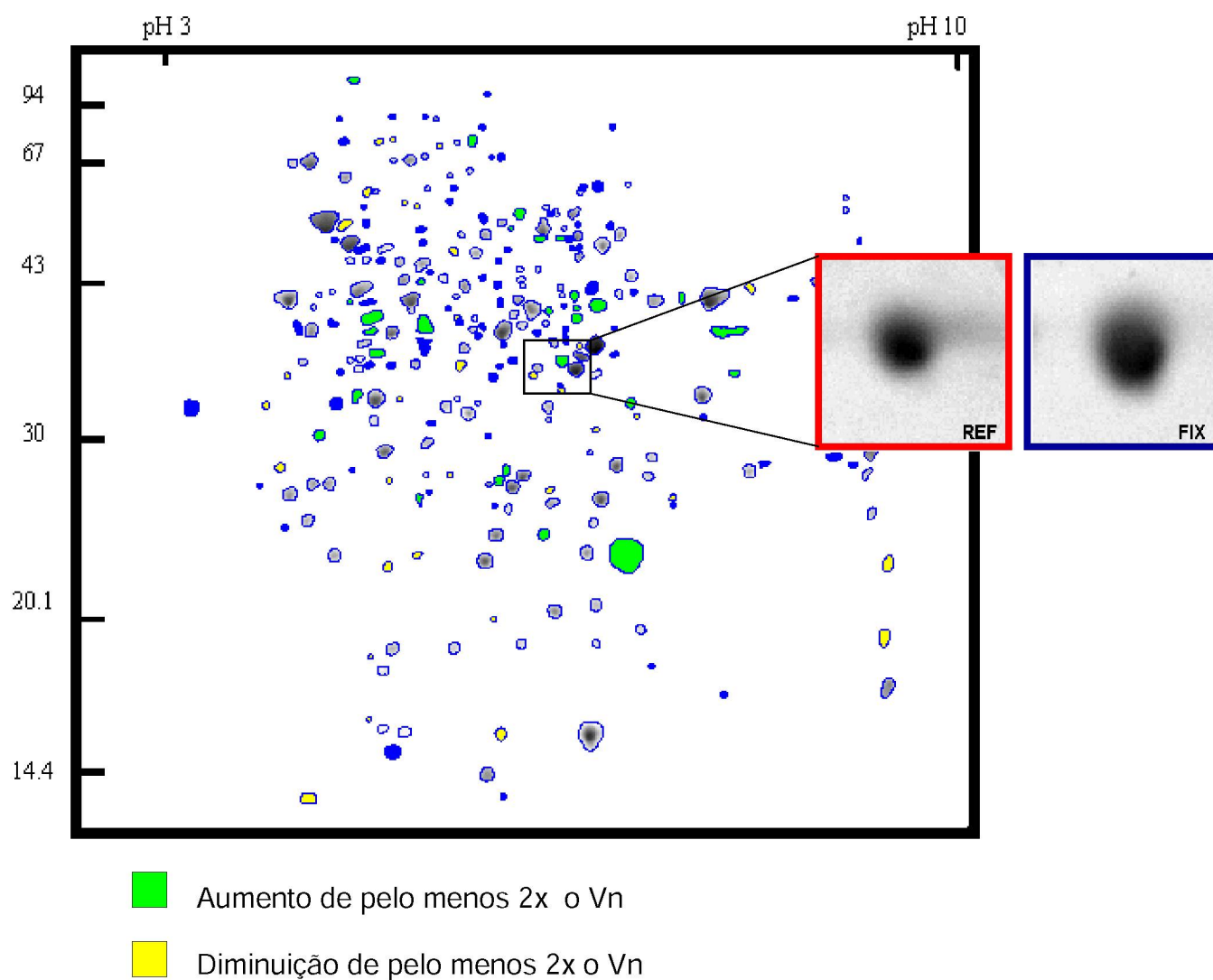


FIGURA 7: DIFERENÇAS QUANTITATIVAS DE EXPRESSÃO NA ESTIRPE SMR1 NA CONDIÇÃO DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO. Gel da estirpe selvagem SMR1 em condição de fixação de nitrogênio. As proteínas foram isoeletrofocalizadas em tiras IPG, 13 cm, pH 3 a 10 e a segunda dimensão foi realizada em SDS-PAGE 12,5%. O gel foi corado com *Coomassie*.

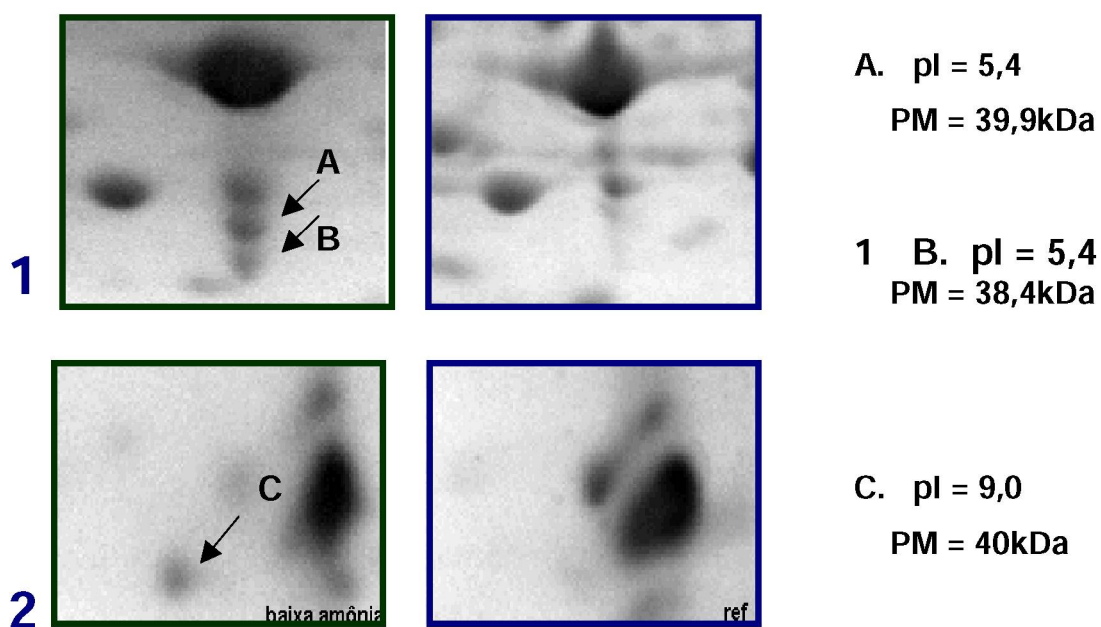
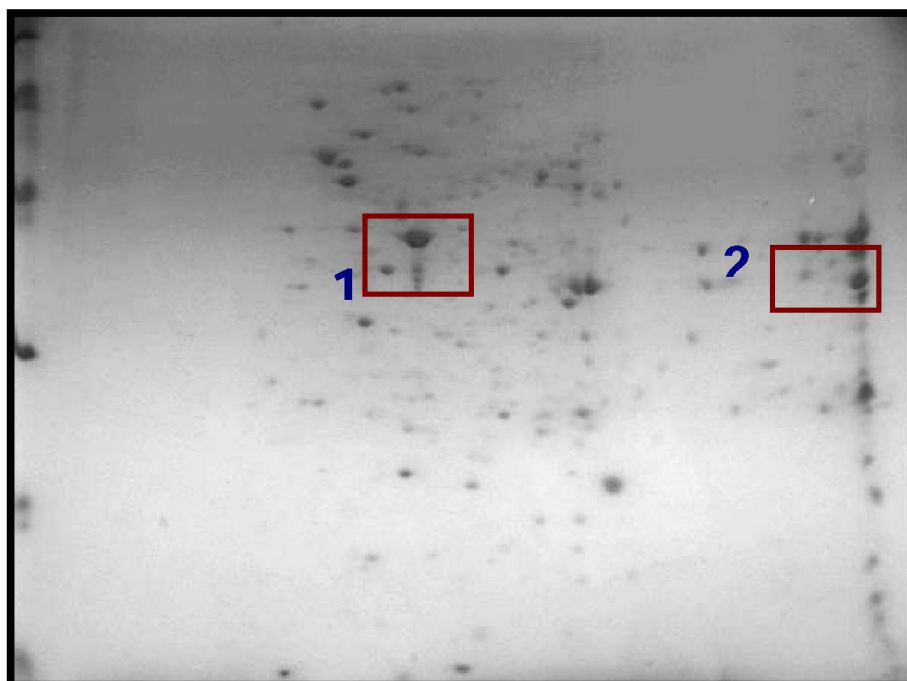


FIGURA 8: PROTEÍNAS INDUZIDAS NA ESTIRPE SELVAGEM CULTIVADA EM BAIXO AMÔNIO. As proteínas A, B e C foram induzidas na estirpe SMR1 cultivada em condição de baixo amônio quando comparada com a mesma estirpe cultivada em alto amônio. A isoeletrofocalização foi realizada em tiras IPG de 13 cm, pH 3 – 10 e SDS-PAGE em géis de poliacrilamida 12,5%.

Nesta estirpe, cinquenta e seis proteínas tiveram seus níveis de expressão alterados sendo que 37 apresentaram aumento de expressão e 19 apresentaram diminuição dos níveis de expressão.

Um fenômeno singular foi observado nos géis bidimensionais da estirpe SMR54 (*nifA*⁻) cultivada em baixa amônia: nenhum dos géis realizados apresentou proteínas na faixa de pH superior a 8,0 o que não ocorreu para nenhuma das outras estirpes nas condições analisadas (FIGURA 10). Nas condições experimentais, foi possível observar que neste mutante ocorreu repressão de pelo menos 100 proteínas e indução de 8. A resolução dos géis desta estirpe cultivada em baixa amônia foi inferior aos demais géis obtidos, portanto, análises de expressão quantitativa não foram realizadas.

4.6 ANÁLISES COMPARATIVAS NA FAIXA DE pH 4 a 7

O perfil de expressão protéica das estirpes SMR1 e SMR54 (*nifA*⁻) foram também analisados em géis bidimensionais na faixa de pH 4 a 7 (FIGURA 11). Nestes géis foram detectados virtualmente os mesmos pontos protéicos e as análises comparativas levaram a resultados similares aos descritos anteriormente portanto, os resultados destas análises não serão descritos. Um gel da estirpe SMR54 na faixa de pH 4 a 7 foi utilizado para retirada de proteínas induzidas no mutante e identificação por espectrometria de massa (MS).

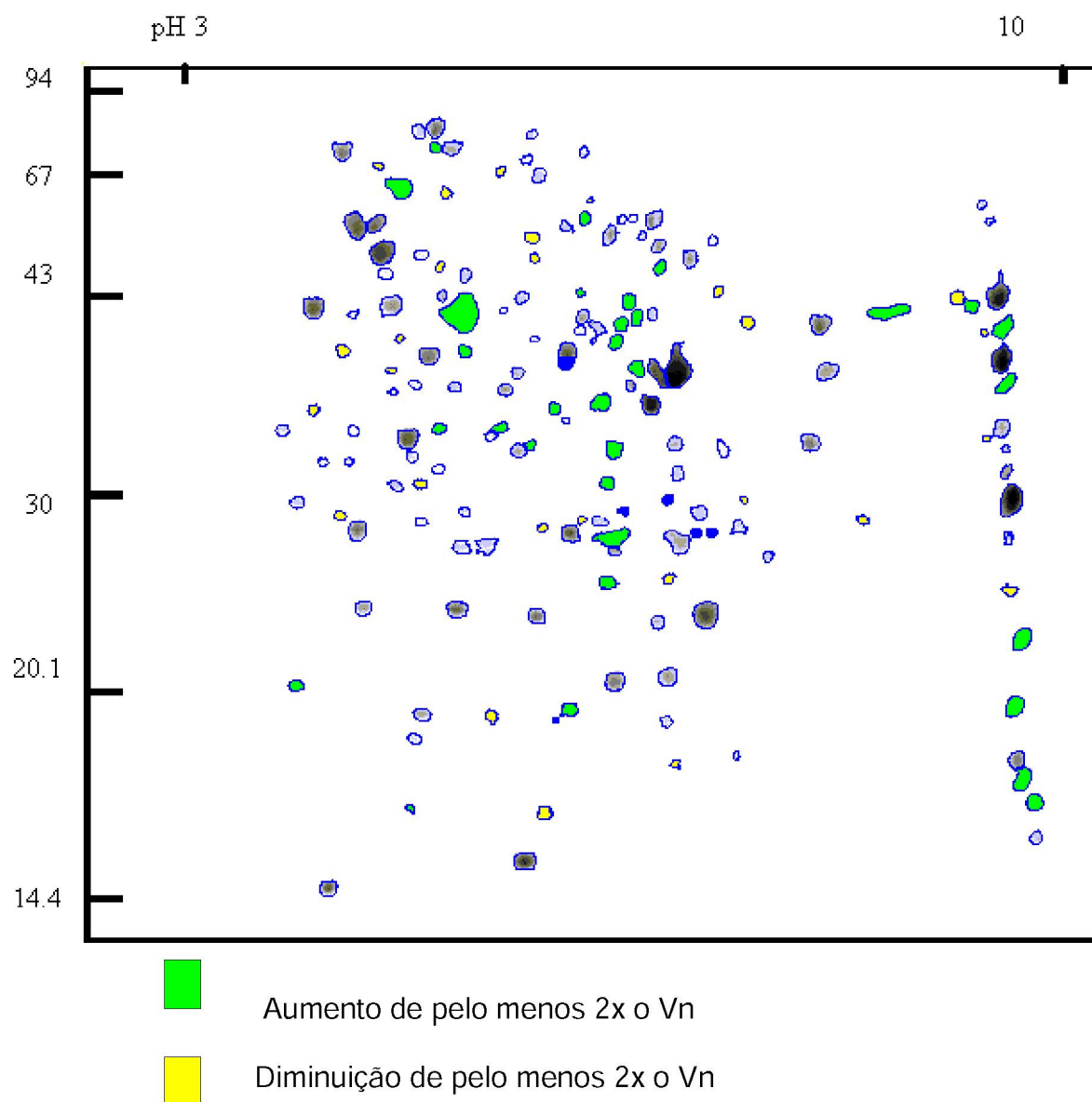


FIGURA 9: DIFERENÇA QUANTITATIVA DE EXPRESSÃO NA ESTIRPE MUTANTE DCP286A (*ntrC*). Gel da estirpe mutante DCP286A cultivada em alta amônia. As proteínas foram isoeletrofocalizadas em tiras IPG, 13 cm pH 3 a 10 e a segunda dimensão foi realizada em SDS-PAGE 12,5%. O gel foi corado com *Coomassie*.

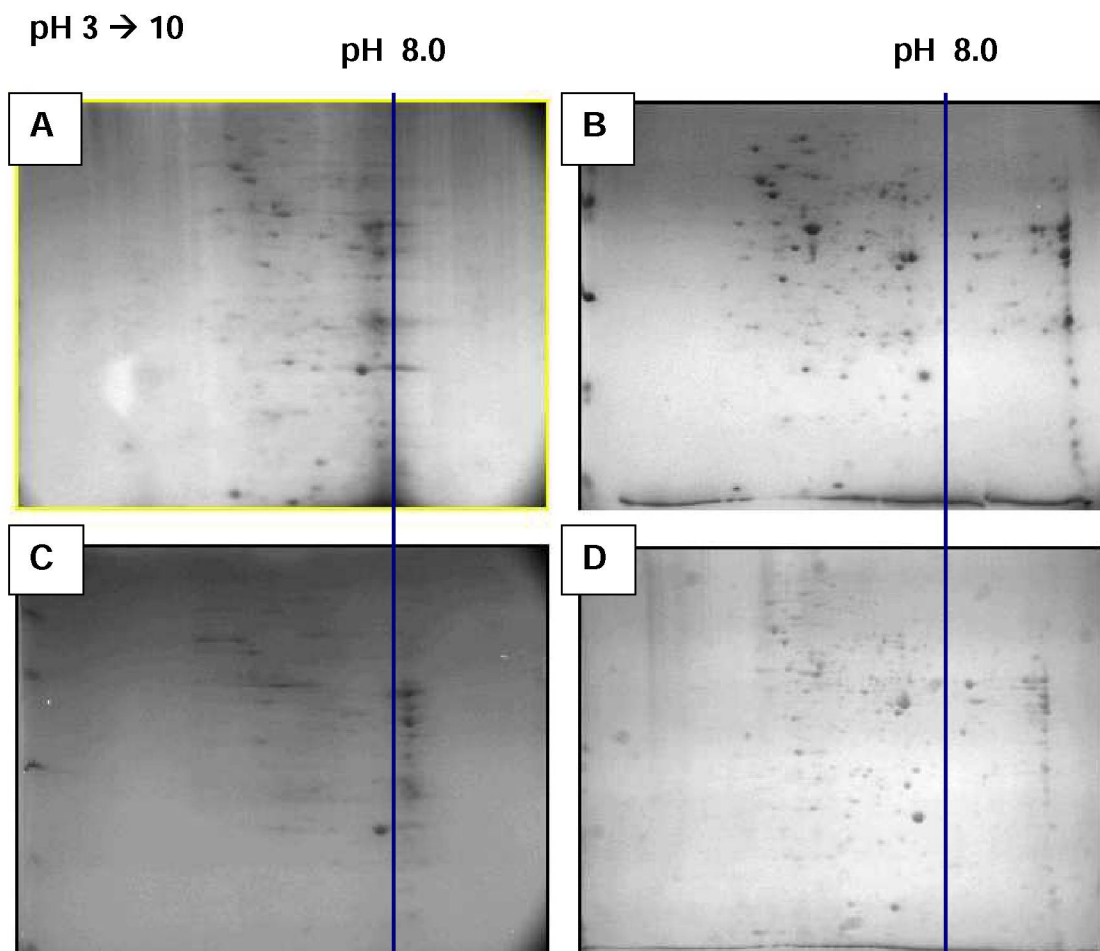
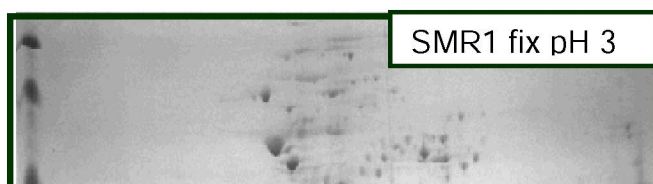
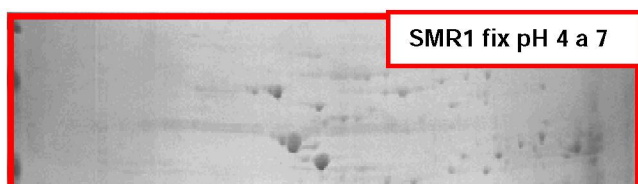


FIGURA 10: GÉIS BIDIMENSIONAIS DA ESTIRPE MUTANTE SMR54 E DA ESTIRPE SELVAGEM SMR1. A e C: Padrão eletroforético das proteínas do mutante SMR54 crescida em baixa amônia; B: Gel da estirpe SMR1 crescida em baixo amônio; D: Gel da estirpe SMR54 cultivada em alto amônio. Todas as amostras foram isoeletrofocalizadas em tiras IPG de 13cm, pH 3–10 e a segunda dimensão foi feita em SDS-PAGE 12,5%.



4.7 DISCUSSÃO DAS ANÁLISES COMPARATIVAS

As análises comparativas da estirpe SMR1 de *H.seropedicae* demonstraram que ocorreu indução de proteínas na condição de fixação de nitrogênio, tanto em relação à condição de referência quanto em relação à condição de baixa amônia. Treze das proteínas que foram induzidas na condição de fixação de nitrogênio estiveram também ausentes nos mutantes DCP286A (*ntrC*⁻) e SMR54 (*nifA*⁻), que não expressam os genes *nif* (FIGURA 12). Tais dados sugerem que essas proteínas estão envolvidas no processo de fixação de nitrogênio. Os valores de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM) calculados pelo programa Imagemaster foram utilizados para buscar prováveis proteínas por meio do sítio TagIdent. Devido ao grande número de proteínas (mais de 100) que aparecem como candidatas para cada proteína quando a pesquisa é feita utilizando apenas os dados de pI e MM, foi feita uma busca tendenciosa colocando nitrogênio como palavra chave. Desta maneira apareceram na lista apenas as proteínas relacionadas ao metabolismo de nitrogênio. Estiveram presentes subunidades e cofatores do complexo da nitrogenase, dentre elas NifD, NifH, NifK, NifN e NifV.

Um grande número de proteínas foi reprimido na condição de fixação de nitrogênio quando comparada à condição de referência. Estas proteínas apresentaram MM superior a 60 kDa e pI entre 4,0 e 7,0 aproximadamente (FIGURA 13). Em condições de baixa amônia 3 proteínas foram induzidas na estirpe selvagem SMR1 em relação à mesma estirpe cultivada em alta amônia, enquanto que um grande número de proteínas foi reprimido na estirpe selvagem de *H. seropedicae* cultivada em baixo amônio.

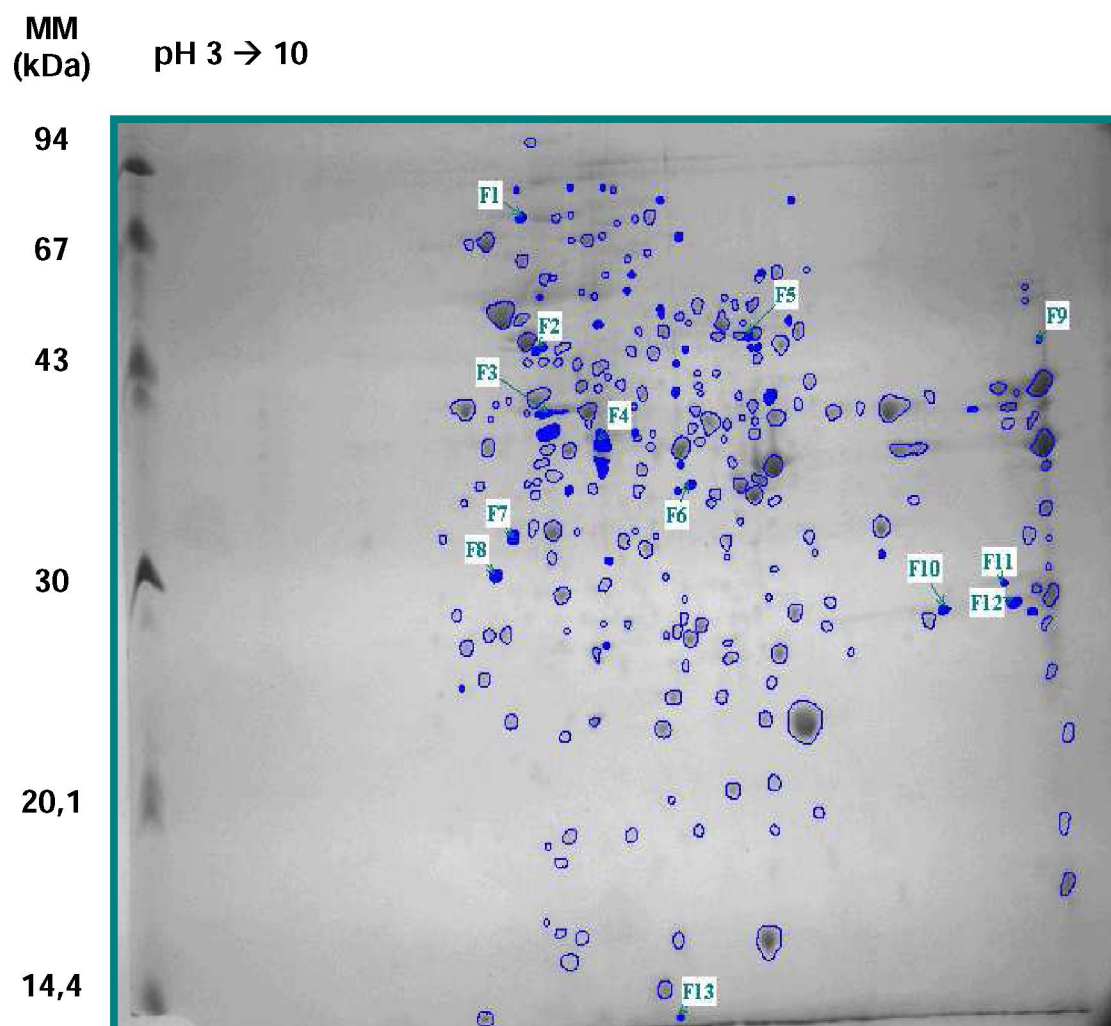


FIGURA 12: PROTEÍNAS INDUZIDAS NA ESTIRPE SMR1 CULTIVADA EM CONDIÇÃO DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO. Padrão bidimensional da estirpe selvagem de *H.seropedicae* em condição de fixação de nitrogênio. A isoeletrofocalização foi feita em tiras IPG, 13 cm, pH 3 a 10 utilizando 600µg de proteína e o gel foi corado com *Coomassie*. Os pontos assinalados "F1" a "F13" são proteínas que foram induzidas pela condição de fixação de nitrogênio e que estiveram ausentes também nas estirpes mutantes DCP286A (*ntrC*) e SMR54 (*nifA*).

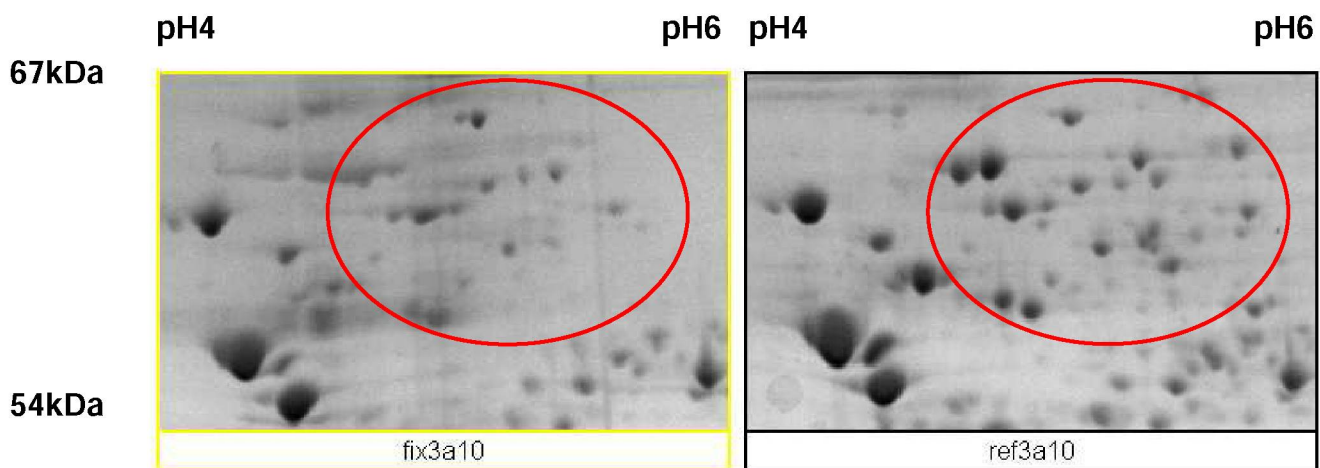


FIGURA 13: PROTEÍNAS REPRIMIDAS NA CONDIÇÃO DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO NA ESTIRPE SELVAGEM SMR1. Os géis foram feitos a partir de amostras da estirpe selvagem SMR1 em condição de fixação de nitrogênio e em alta amônia. As proteínas foram isoeletrofocalizadas em tiras IPG, 13 cm pH 3 a 10 e SDS-PAGE foi realizada em géis de poliacrilamida 12,5%. Ambos géis foram corados com *Coomassie*.

As análises comparativas entre a estirpe selvagem e as estirpes mutantes revelaram dados bastante interessantes. Nenhuma das estirpes mutantes expressa os genes da fixação de nitrogênio devido à ausência da proteína ativadora transcricional dos genes *nif*, a proteína NifA. As análises comparativas realizadas com amostras cultivadas em 20mmol/L de NH₄Cl revelaram que um grande número de proteínas foram reprimidas nas estirpes mutantes, mesmo em condições nas quais não ocorre expressão dos genes *nif* na estirpe selvagem. Todas as proteínas que foram reprimidas no mutante SMR54 (*nifA*⁻) foram também reprimidas no mutante DCP286A (*ntrC*⁻), porém neste mutante houve repressão de um número maior de proteínas. Curiosamente também ocorreu indução de proteínas no mutante SMR54 na condição de alta amônia.

A condição de baixa amônia (2mmol/L de NH₄Cl) levou à repressão de um grande número de proteínas nas estirpes mutantes. Na estirpe DCP286A nenhuma proteína foi induzida quando as células foram cultivadas em baixa amônia. Surpreendentemente na estirpe SMR54 ocorreu indução de 8 proteínas nesta condição. Portanto no mutante DCP286A (*ntrC*⁻) não ocorreu indução de proteínas em nenhuma das condições testadas, apenas repressão de um grande número de proteínas. No mutante SMR54 (*nifA*⁻) ocorreu indução de proteínas nas duas condições testadas em comparação com a estirpe selvagem SMR1.

No mutante DCP286A era esperada a repressão de um grande número de proteínas tendo em vista que a proteína NtrC funciona como ativadora transcricional não somente dos genes *nif*, mas também de diversos outros genes, como o transportador de amônia (AmtB), a enzima glutamina sintetase, permeases de aminoácidos e enzimas catabólicas. Em *Escherichia coli* aparentemente a proteína

NtrC exerce controle de praticamente 2% dos genes, o que representa aproximadamente 75 proteínas (ZIMMER *et al.*, 2000). Mutantes *ntrC*⁻ de *H. seropedicae* apresentaram diminuição da expressão e atividade da GS (glutamina sintetase) (PERSUHN, 2001). O sistema Ntr de *H. seropedicae* é importante para a captação de íons amônio e assimilação de glutamina. A proteína NtrC de *H. seropedicae* está envolvida na expressão do operon *glnKamtB* deste microrganismo (PERSUHN, 2001).

Tais dados devem ser melhor investigados. Isoeletrofocalização utilizando faixas mais estreitas de pH correspondentes às regiões nas quais ocorreram maiores diferenças de expressão, pode ser utilizada para confirmar esses resultados. É de grande importância a identificação das proteínas que foram induzidas e reprimidas nos mutantes para poder identificar os produtos gênicos que estão sujeitos a regulação direta e indireta pelas proteínas NifA e NtrC de *H. seropedicae*.

4.8 MÉTODOS DE COLORAÇÃO

Géis bidimensionais corridos nas mesmas condições contendo as mesmas amostras foram corados por dois métodos e comparados. Verificou-se diferença significativa entre dois géis idênticos (FIGURA 14). Algumas proteínas só foram reveladas pela coloração com prata enquanto outras, que se apresentaram com alta intensidade com *Coomassie*, não foram visualizadas por prata. Por outro lado o método da prata apresentou coloração negativa para as bandas com maiores

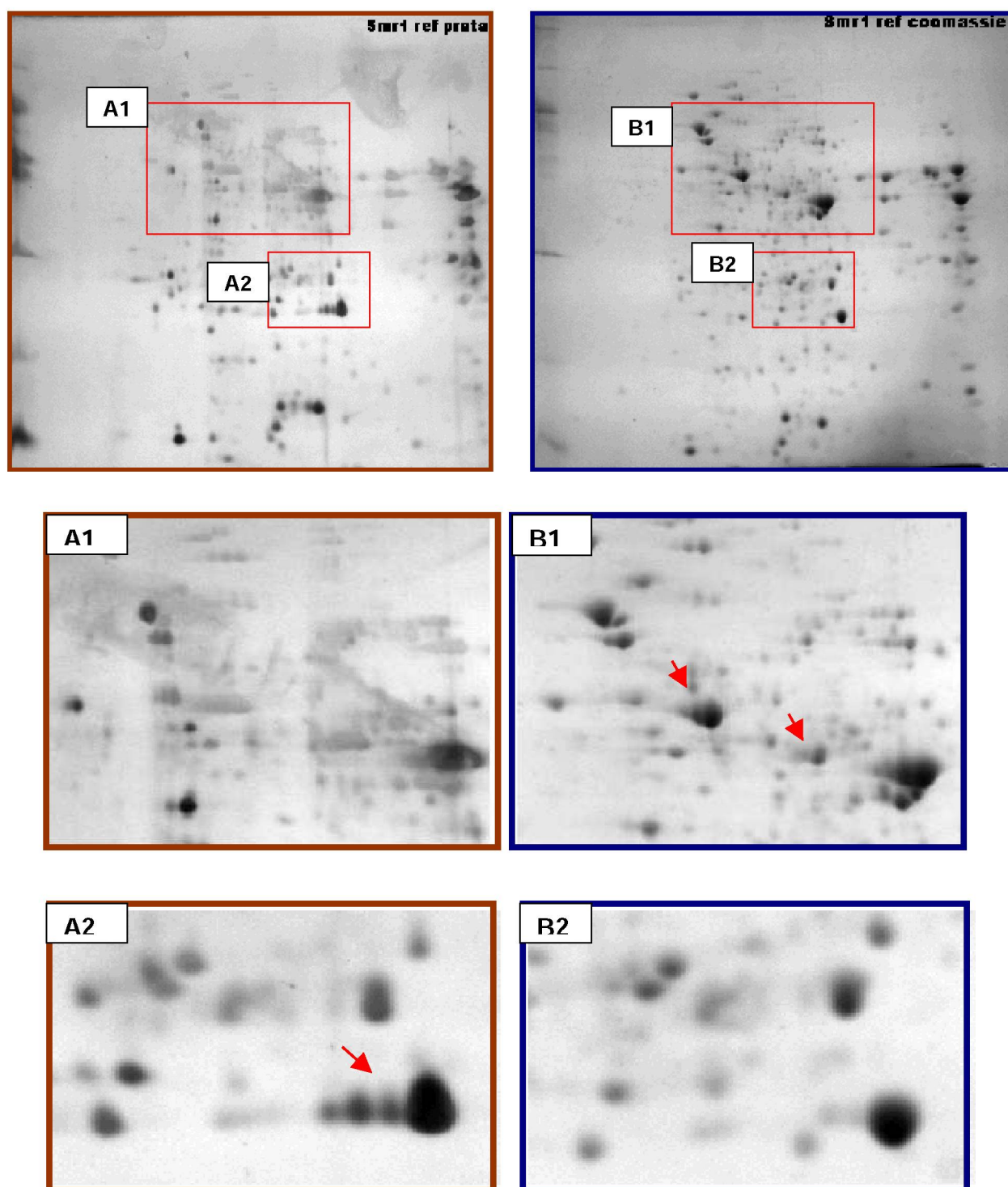


FIGURA 14: ELETROFORETOGRAMA PROTÉICO PARA A ESTIRPE SMR1 VISUALIZADOS POR MEIO DE DIFERENTES MÉTODOS DE COLORAÇÃO. Gel A: Gel da estirpe SMR1 cultivada em alta amônia utilizando 100 μ g de proteína corado com prata. Gel B: Gel da mesma amostra utilizando 500 μ g de proteína corado com *Coomassie*. Os géis foram isoeletrofocalizados em tiras IPG de 13 cm, pH 3 a 10 e a segunda dimensão, SDS-PAGE, foi realizada em géis de 12,5% de poliacrilamida.

concentrações de proteína, o que dificulta muito a quantificação e as análises comparativas de expressão. Por este motivo os géis utilizados nas análises comparativas foram todos corados com *Coomassie*.

GIOMETTI e colaboradores (2002) também observaram este fenômeno. Estes pesquisadores relataram que o uso de apenas uma abordagem para detectar proteínas em géis bidimensionais pode fazer com que um estudo proteômico exclua até mesmo proteínas abundantes, como as proteínas da camada S (*S-layer*) de *Methanococcus janaschii*, que não foram visualizadas pelo método da prata.

4.9 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS

Proteínas induzidas na estirpe selvagem SMR1 em condição de fixação de nitrogênio e na estirpe mutante SMR54 (*nifA*) cultivada em alta amônia foram submetidas a análises espectrométricas por MALDI-ToF. Foram obtidos espectros de impressão digital (PMF) para 15 amostras enviadas para São Paulo.

Utilizando os valores das massas de peptídeos trípticos (PMF) provenientes das análises por MALDI-ToF juntamente com valores de pI e MM não foi possível chegar a um consenso sobre a identidade das proteínas. Por meio do programa ProFound foram obtidas listas diferentes de proteínas em análises sucessivas. O uso de outros sítios como o Mascot e TagIdent também resultou em identificações não conclusivas.

Muitas vezes é necessária uma combinação de métodos para identificar corretamente a proteína. GYGI e colaboradores (2000) identificaram 9 de 12

proteínas de *Sinorhizobium meliloti* aleatoriamente escolhidas e retiradas de géis bidimensionais utilizando PMF através de MALDI-ToF juntamente com composição de aminoácidos. Estes pesquisadores verificaram que a composição de aminoácidos foi mais específica na identificação de proteínas. WILKINS e colaboradores (1996) também chegaram à conclusão que, para proteínas com funções idênticas, houve maior conservação na seqüência de aminoácidos do que nas massas de peptídeos trípticos ou ponto isoelétrico.

As buscas das proteínas de *H. seropedicae* em base de dados podem ser refinadas a partir de dados provenientes de fragmentação assistida quimicamente (CAF-PSD), nas quais podem ser obtidas seqüências parciais dos peptídeos analisados para confirmação da identidade da proteína.

A identificação utilizando apenas valores provenientes das massas trípticas dos peptídeos sem dados do genoma, somente funciona para proteínas cuja seqüência é muito bem conservada entre organismos. A maioria dos estudos nos quais houve sucesso, a identificação das proteínas foi realizada utilizando os dados provenientes de PMF juntamente com dados do genoma do organismo através do uso de programas como o PROQUEST ou MS-Fit (GIOMETTI *et al.*, 2002; SMOLKA *et al.*, 2003; HESKETH *et al.*, 2002).

O genoma de *H. seropedicae* já foi seqüenciado e está sendo anotado. Estas informações poderão ser utilizados para identificar as proteínas diferencialmente expressas desta bactéria.

5. CONCLUSÕES

1. Foi desenvolvido um protocolo que permite boa resolução e reprodutibilidade de géis bidimensionais de proteína de *Herbaspirillum seropedicae*;
2. Na estirpe selvagem (SMR1) ocorreu indução de 25 proteínas e repressão de 71 na condição de fixação de nitrogênio quando comparada com a mesma estirpe cultivada em alta amônia (20mmol/L de NH₄Cl);
3. Na estirpe selvagem (SMR1) em condição de baixa amônia ocorreu repressão de 48 proteínas e indução de 3 quando comparada com a mesma estirpe cultivada em alta amônia (20mmol/L de NH₄Cl);
4. Na estirpe mutante DCP286A (*ntrC*) foram reprimidas 70 proteínas na condição de alta amônia e 157 na condição de baixa amônia (2mmol/L de NH₄Cl) quando comparada com a estirpe selvagem (SMR1) nas mesmas condições;
5. Nenhuma proteína foi induzida na estirpe mutante DCP286A (*ntrC*) em nenhuma das condições fisiológicas testadas;
6. Na estirpe mutante SMR54 (*nifA*) 57 proteínas foram reprimidas na condição de alta amônia e aproximadamente 100 na condição de baixa amônia

(2mmol/L de NH_4Cl) quando comparada com a estirpe selvagem (SMR1) nas mesmas condições;

7. Na estirpe mutante SMR54 (*nifA*) foram induzidas 12 proteínas na condição de alta amônia e 8 em baixa amônia quando comparada com a estirpe selvagem SMR1 nas mesmas condições;
8. Apenas os valores das massas tríplicas provenientes dos peptídeos submetidos a análises espectrométricas não foram suficientes para identificar as proteínas de *Herbaspirillum seropedicae* utilizando base de dados de outros microrganismos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOT, A. News briefing: A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. **Nature**, v.402, p.715-720, 1999.
- AEBERSOLD, R.; GOODLET, D.R. Mass spectrometry in proteomics. **Chem. Rev.**, v.101, p.269-295, 2001.
- AEBERSOLD, R. Constellations in a cellular universe. **Nature**, v.422, p.115-116, 2003.
- ALI, A.; SHEIKH, S.; HUSSAIN, S.; QAMAR, I.A.; KHAN, B.R. Breeding food and forage legumes for enhancement of nitrogen fixation. **Science Vision**, v.6, p.49-57, 2000
- ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. P_{II} Signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.65, p.80-105, 2001.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by P_{II} in *Azospirillum brasilense*: Evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **J. Bacteriol.**, v.178, p.4830-4838, 1996.

- ATKINSON, M.R.; KAMBEROV, E.S.; WEISS, R.L.A.; NINFA, A.J. Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* P_{II} signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). **J. Biol. Chem.**, v.269, n11, p.28288-28293, 1994.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen.nov, sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.36, n.1 p.86-93, 1986.
- BASTELAERE, E.V.; MOT, R.D.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J. Differential gene expression in *Azospirillum spp.* by plant root exudates: Analysis of protein profiles by two-dimensional gel electrophoresis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.112, p.335-342, 1993.
- 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;
- BERGER, D.K; NARBERHAUS, F.; LEE, H-S.; KUSTU, S. In vitro studies of the domains of the nitrogen fixation regulatory protein NifA. **J. Bacteriol.**, v.177, p.191-199, 1995.
- BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Reviews: TIBTECH.**, v.17, p.121-127, 1999.

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.

BRILL, W.J. Biological nitrogen fixation. **Sci. American**, v.236, p.68-81, 1977.

BUENO, R.; PAHEL, G.; MAGASANIK, B. Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.164, p.816-822, 1985.

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

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.

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, 2001. p.1-22.

CASH, F. Review: Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. **Anal. Chimica Acta**, v.372, p.121-145, 1998.

CASH, P. Proteomics: the protein revolution. **Biologist**, v.49, p.58-62, 2002.

CHANG, J.; REMMEN, H,V.; CORNELL, J.; RICHARDSON, A.; WARD, W, F.
Comparative proteomics: characterization of a two-dimensional gel electrophoresis system to study the effect of aging on mitochondrial proteins..
Mech. Ageing Dev., v.124, p.33-41, 2003.

DILWORTH, M. J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Bioch. Biophys. Acta**, v.127, p.285-294, 1966.

DILWORTH, M.J. Dinitrogen fixation. **Ann. Rev. Plant Physiology**, v.25, p.81-114, 1974.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.; REIS, V.M. The role of biological nitrogen fixation to bio-energy programmes in the tropics. **EMBRAPA**, 2000.

DRUMMOND, M.; CLEMENTS, J.; MERRICK, M.; DIXON, R. Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. **Nature**, v.301, p.302-307, 1983.

DUNN, M. **Proteome Analysis**. Disponível em: <<http://www.chemsoc.org/chembytes/ezone/1998/dunn.htm>> Acesso em: 10 fev. 2003.

DUNN, M.J.; GÖRG, A. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis for proteome analysis. In: PENNINGTON, S.R.; DUNN, M.J (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. BIOS Scientific Publishers Limited, 2001. p.43-63.

EADY, R.R.; POSTGATE, J.R. Nitrogenase. **Nature**, v.249, p.805-810, 1974.

FISCHER, H.M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiol. Rev.**, v.58, p.352-386, 1994.

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

GIOMETTI, C.S.; REICH, C.; TOLLAKSEN, S.; BAGNIGG, G.; LIM, H.; ZHU, W.; YATES, J.; OLSEN, G. Global analysis of a "simple" proteome: *Methanococcus jannaschii*. **J. Chromatography. B**, v.782, p.227-243, 2002.

GÖRG, A.; BOGUTH, G.; DREWS, O.; HARDER, A.; OBERMAIER, C.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. **Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis**. A Laboratory Manual. Disponível em: <<http://www.weihenstephan.de/blm/deg>> Acesso em 10 dez. 2002.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. Molecular biologist's guide to proteomics.

Microbiol. Mol. Biol. Rev., v.66, p.39-63, 2002.

GUERREIRO, N.; KSENZENKO, V.N.; DJORDJEVIC, M.A.; IVASHINA, T.V.;

ROLFE, B.G. Elevated levels of synthesis of over 20 proteins results after mutation of the *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide synthesis gene *pssA*. **J. Bacteriol.**, v.182, p.4521-4532, 2000.

GYGI, S.P.; CORTHALS, G.L.; ZHANG, Y.; ROCHON, Y.; AEBERSOLD, R.

Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.97, p.9390-9395, 2000.

HANCOCK, W.S.; WU, S.L.; STANLEY, R.; GOMBOCZ, E.A. Publishing large

proteome datasets: scientific policy meets emerging technologies. **Trends Biotech.**, v.20, p.S39-S44, 2002.

HAYNES, P.; YATES, J, R. Review article: Proteome profiling – pitfalls and progress.

Yeast, v.17, p.81-87, 2000.

HERBERT, B.R.; LARRY, J.L.; PACKER, N.H.; GOOLEY, A.A.; PEDERSON, S.K.

What place for polyacrilamide in proteomics? **Trends Biotech.**, v.19, 2001.

HESKETH, A.R; CHANDRA, G.; SHAW, A.D.; ROWLAND, J.J.; KELL, D.B.; BIBB,

M.J.; CHATER, K.F. Primary and secondary metabolism, and post-translational

- protein modifications as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicor*. **Mol. Microbiol.**, v.46, p.917-932, 2002.
- HUBBEL, D.H.; KIDDER, G. Biological nitrogen fixation. **IFAS Extension**: University of Florida, SL16, 2003.
- JOCELYN, H.; ILAG, L. Dividing and conquering proteomics. **Proteomics**, p.96-98, 2002.
- JUNGBLUT, P.R. Proteome analysis of bacterial pathogens. **Microbes Infect.**, v.3, p.831-840, 2001.
- KAMBEROV, E.S.; ATKINSON, M.R.; NINFA, J. The *Escherichia coli* P_{II} signal transduction protein is activated upon binding 2-Ketoglutarato and ATP. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.17797-17807, 1995.
- KERN, D.; VOLKMAN, B.F.; LUGINBÜHL, P.; NOHAILE, M.J.; KUSTU, S.; WEMMER, D.E. Structure of a transiently phosphorylated switch in bacterial signal transduction. **Nature**, v.402, p.894-898, 1999.
- KIM, J.; REES, D. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v.33, p.389-397, 1994.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.**, v.43, p.887-891, 1997.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. **Humangenetik**, v.26, p.231-243, 1975.

KÖPKE, A. **Proteomics – a new drug discovery tool.** Disponível em: <<http://www.wita-proteomics.com>> Acesso em: 01 nov. 2003.

LAEMMLI, U.K. SDS-PAGE. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LEE, C-L.; HSIAO, H-H.; LIN, C-W.; WU, S-P.; HUANG, S-Y.; WU, C-Y.; KHOO, K-H. Strategic shotgun proteomics approach for efficient construction of an expression map of targeted protein families in hepatoma cell lines. **Proteomics**, v.3, p.2472-2486, 2003.

LOPEZ, M,F. Proteome analysis I. Gene products are where the biological action is. **J. Chromatography B**, v.722, p.191–202, 1999.

MANN, M.; JENSEN, O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nature Biotech.**, v.21, p.255-261, 2003.

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.3994-4002, 2003.

MERRICK, M.J.; EDWARDS, R.A. Nitrogen Control in Bacteria. **Microbiol. Rev.**, v.59, p.604–622, 1995.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S.
Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Letters**, v.447, p.283-286, 1999.

NATERA, S.H.; GUERREIO, N.; DORDJEVIC, M.A. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. **Mol. Plant Microbe Interact**, v.13, p.995-1009, 2000.

NINFA, A.J.; KAMBEROV, E.S.; FENG, J.; NINFA, E.G. Control of nitrogen assimilation by the Nri – NRII two-component system of enteric bacteria. In: HOCH, A; SILHAVY, T.J (Ed.). **Two-Component Signal Transduction**. ASM Press, Washington, D.C, 1995. p.67-88.

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

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.

Ocurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum spp.* in roots, stems, and leaves, predominantly of gramineae. **Biol. Fertil Soils**, v.21, p.197-200, 1996.

OLIVER, S. Guilt-by-association goes global. **Nature**, v.403, p.601-603, 2000.

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.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.

PERSUHN, D.C.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.; YATES, M.G.; RIGO, L.U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.192, p.217-221, 2000.

- PERSUHN, Darlene Camati. Análise funcional do sistema ntr de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 2001. 107p. Tese (Doutorado Ciências-Bioquímica) Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná.
- PORTER, S.C.; NORTH, A.K; KUSTU, S. Mechanisms of transcriptional activation by NtrC. In: HOCH, A; SILHAVY, J. (Ed.). **Two-Component Signal Transduction**. ASM Press, Washington, D.C, 1995. p.147-158.
- QUADRONI, M.; JAMES, P. Enhancing high-throughput proteome analysis: the impact of stable isotope labeling. In: PENNINGTON, S.R; DUNN, M.J (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. BIOS Scientific Publishers Limited, 2001. p.151-169.
- RAMIREZ, F.R.; LITTLE, R.; DIXON, R. Mutant forms of the *Azotobacter vinelandii* transcriptional activator NifA resistant to inhibition by the NifL regulatory protein. **J. Bacteriol.**, v.184, p.6777-6785, 2002.
- REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Revs. Plant Sci.**, v.19, p.227-247, 2000.
- REITZER, L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.57, p.155-176, 2003.

ROLFE, B.G.; MATHESISUS, U.; DJODJERVIC, M.; WEINMAN, J.; HOCART, C.; WEILLER, G.; BAUER, W.D. Proteomic analysis of legume-microbe interactions. **Comparative and Functional Genomics**, v.4, p.225-228, 2003.

SCHWARTZ, H.; MITULOVIC, G.; SOEST, R.V.; GILS, M.; VERBERKMOES, N.; HETTICH, R. Rapid analysis of bacterial, yeast and plant proteomes using 2-D nano LC/MS/MS. **PharmaGenomics**, p.20-24, 2002.

SHEN, Y.; SMITH, R.D. Proteomics based on high-efficiency capillary separations. **Electrophoresis**, v.23, p.3106-3124, 2002.

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: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.93, p.14440-14445, 1996.

SMITH, B.E. Nitrogenase reveals its inner secrets. **Science**, v.297, p.1654-1655, 2002.

SMOLKA, M.B.; MARTINS, D.; WINCK, F.V.; SANTORO, C.E.; CASTELLARI, R.R.; FERRARI, F.; GRUM, I.J.; GALEMBECK, E.; FILHO, .D.C.; MACHADO, M.A.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C. Proteome analysis of the plant pathogen

Xylella fastidiosa reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. **Proteomics**, v.24 , p.224-237, 2003.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; RIGO, L.U.; MACHADO, H.B. 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.

THORNELEY, N.F.; LOWE, D.J. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. **Biochem. J.**, v.215, p.393-403, 1983.

WASSEM, R.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer - dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.**, v.35, p.756-764, 2000.

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, 2004. p.261.

WILDGRUBER, R.; REIL, G.; DREWS, O.; PARLAR, H.; GORG, A. Web-based two-dimensional database of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using immobilized pH gradient from pH 6 to pH 12 and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Proteomics**, v.2, p.727-732, 2002.

WILKINS, M.R.; HOCHSTRASSER, D.F. **Thinking bigproteome studies in a post-genome era.** Disponível em: <<http://www.abrf.org/Proteome.html>> Acesso em 02 set. 2003.

WYMAN, C.; ROMBEL, I.; NORTH, A.K.; BUSTAMANTE, C.; KUSTU, S. Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. **Science**, v.275, p.1658-1661, 1997.

YAN, D.; KUSTU, S. "Switch I" mutant forms of the bacterial enhancer-binding protein NtrC that perturb the response to DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.96, p.13142-13146, 1999.

ZHANG, Y.; BURRIS, R.H.; LUDDEN, P.; ROBERTS, G.P. Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v.175, n°21, p.6781-6788, 1993.

ZHANG, W.; CHAIT, B.T. Profound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. **Analytical Chemistry**, v.72, p.2482-2489, 2000.

ZIMMER, D.P.; SOUPENE, E.; LEE, H.L.; WENDISH, V.F.; KHODURKSY, A.B.; PETER, B.J.; BENDER, R.A.; KUSTU, S. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.97, p.14674-14679, 2000.

**APÊNDICE I: PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DE GÉIS
BIDIMENSIONAIS DE *Herbaspirillum seropedicae***

1.0 PREPARO DA AMOSTRA

- Centrifugar as culturas a 5000g durante 10 minutos
- Lavar o precipitado uma vez, a 5000g durante 10min em solução contendo 3,0mmol/L de KCl, 1,5 mmol/L de KH_2PO_4 , 68 mmol/L de NaCl e 9,0mmol/L de NaH_2PO_4
- Ressuspender o precipitado em 600 μL de tampão contendo 10mmol/L de Tris-HCl pH 8,0, 1.5mmol/L de MgCl_2 , 10mmol/L de KCl, 0,5 mmol/L de DTT e 0,5mmol/L de PMSF;
- Aliquotar a amostra em 100 μL ou 150 μL /tubo e armazenar em congelador -70°C até o momento do uso
- Descongelar um tubo no momento do uso e adicionar 450 μL de tampão de lise (9,5mol/L de uréia, 2% (p/v) de CHAPS, 0,8% de (p/v) Pharmalyte pH 3-10 e 1% (p/v) DTT). Os tampões de lise e rehidratação devem ser preparados no momento do uso ou, alternativamente, armazenados em congelador -70°C , sem DTT. DTT deve ser pesado e adicionado no momento do uso e cada tubo deve ser descongelado apenas uma vez
- Sonicar em banho de gelo 3 pulsos de 20 segundos com pelo menos 30 segundos de intervalo entre cada pulso. Verificar que a amostra esteja translúcida. Podem ser necessários pulsos de sonicação adicionais dependendo da amostra

- Centrifugar durante 2 minutos e utilizar o sobrenadante para dosar proteína e aplicar na primeira dimensão (IEF)

1.1 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

- Deve ser feita pelo método de Bradford em duplicata ou triplicata (método de Lowry é incompatível com a composição do tampão de lise)

1.2 ISOELETROFOCALIZAÇÃO (IEF) EM IPGphor

- Rehidratação: no próprio equipamento IPGphor, a 20°C durante 12 horas
- Isoeletrofocalização: 3 etapas de 500Vhr, 1000Vhr e 14500Vhr, totalizando 16000VhT.

O tempo da IEF (descontando o tempo da rehidratação) pode variar de pouco menos de 8 horas até 10 horas dependendo da amostra. O azul de bromofenol vai migrando em direção ao anodo e desaparece antes do final da IEF.

1.3 ISOELETROFOCALIZAÇÃO EM MULTIPHOR II

- Rehidratação: em bandeja de rehidratação por um período de 12h a 16h, temperatura ambiente
- Isoeletrofocalização: 3 fases de 150V, 300V e 3500V com aumento gradual da voltagem totalizando 17000Vh

Após a primeira dimensão as tiras podem ser equilibradas ou armazenadas para uso posterior em congelador -70°C (sem equilibrar). Após a etapa de equilíbrio não podem ser congeladas novamente.

1.4 EQUILÍBRIO DAS TIRAS

- Colocar as tiras em tubo de ensaio (1 tira por tubo)
- Utilizar para cada tira 5mL de tampão de equilíbrio (50mmol/L Tris-HCL, 6M de uréia, 30% (p/v) de glicerol e 2% (p/v) de SDS em 0,05mol/L de tampão Tris-HCl, pH 8,8, 50 μl de solução de azul de bromofenol 0,25% (p/v).
- Adicionar 50mg de DTT a cada 5mL de tampão de equilíbrio e manter durante 15 minutos sob agitação.
- Remover a solução e adicionar 200mg de iodoacetamida para cada 5mL de tampão de equilíbrio e manter sob agitação por 15 minutos.

- Lavar com água destilada e imergir no tampão de corrida por alguns minutos

1.5 SDS-PAGE EM Hoefer SE 600 Ruby

- Posicionar as tiras no topo do gel de poliacrilamida
- Cobrir cada tira com aproximadamente 2mL de solução de agarose morna (0,5% de agarose, 1% de SDS e traços de azul de bromofenol). Esperar solidificar por aproximadamente 3 ou 4 minutos
- Condições de corrida: - limitar a corrente a 30mA/gel
- utilizar o sistema de refrigeração a 20°C

1.6 COLORAÇÃO DOS GÉIS

- Lavar 3 vezes durante 20 segundos com água destilada para retirar o excesso de anfólitos
- Corar os géis (*Coomassie Brilliant Blue*, prata ou outro)
- Armazenar os géis em 2% Acido Acético a 4°C

1.7 CAPTURA DAS IMAGENS

- Captar as imagens dos géis em *UVP Bioimaging Systems* ou outro scanner no qual seja possível digitalização de imagem de géis molhados
- Para capturar a imagem, utilizar zoom 100% quando possível
- Não utilizar a opção "*Enhanced resolution*" pois esta atrapalha as análises posteriores no software Imagemaster
- Utilizar extensões .tif ou .gel para o nome de arquivo

1.8 ANÁLISE DOS GÉIS

- Análise das imagens pode ser feita através do software Imagemaster™ 2D ou outro similar

1.9 EXCISÃO DAS PROTEÍNAS

- Cortar a ponta de um ponteira de 1000µL estéril e utilizar para retirar as proteínas selecionados
- Armazenar as proteínas em tubos pequenos (0,5mL) ou placas de 96 poços em congelador -70°C até o momento da digestão com tripsina

2.0 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA

- Transferir os pedaços de gel com a proteína para tubos de 500µL

- **Descoloração das Proteínas:** adicionar 30 μ L de solução 75mmol/L de bicarbonato de amônio em etanol 40% ao pedaço de gel
- Vortexar e deixar em repouso durante 10 min
- Repetir este procedimento até a total descoloração do gel. Podem ser necessárias 8 ou até mesmo mais repetições dependendo da intensidade da coloração e tamanho do pedaço de gel com a proteína
- **Desidratação:** lavar 3 vezes com 25 μ L de acetonitrila 100%
- **Secagem:** secar em sistema de vácuo durante 25min
- **Digestão Enzimática:** rehidratar com solução de enzima fria, 10 μ g/mL em 50mmol de tampão bicarbonato de amônio
- Deixar as amostras em banho de gelo durante 45 minutos
- Colocar em estufa 37°C durante 12h
- Remover a solução de enzima e adicionar 20 μ L de tampão bicarbonato
- **Extração:** adicionar 20 μ L de bicarbonato de amônio 50mmol/L
- Colocar em banho de ultra-som por 10 minutos
- Adicionar 20 μ L de acetonitrila 5% TFA (1:1)
- Colocar em banho de ultra-som por 10 minutos
- Transferir o sobrenadante para um tubo separado. Repetir o procedimento três vezes
- Adicionar 10 μ L de acetonitrila e colocar em banho de ultra-som. Juntar o sobrenadante aos anteriores