

ALESSANDRA CIPRANDI

**ANÁLISE PROTEÔMICA DA RESPOSTA AO ARSÊNIO
E DO EXOPROTEOMA DE *Chromobacterium violaceum***

BELÉM

2011

ALESSANDRA CIPRANDI

**ANÁLISE PROTEÔMICA DA RESPOSTA AO ARSÊNIO
E DO EXOPROTEOMA DE *Chromobacterium violaceum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva

BELÉM

2011

ALESSANDRA CIPRANDI

**ANÁLISE PROTEÔMICA DA RESPOSTA AO ARSÊNIO
E DO EXOPROTEOMA DE *Chromobacterium violaceum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Patologia das Doenças Tropicais.

Aprovado pela Banca Examinadora em 06 de julho de 2011.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva - Orientador

Dr. Agenor Valadares Santos - LPDNA, UFPA

Prof. Dr. Alberdan Silva Santos - Faculdade de Química, UFPA

Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves - Departamento de Genética, UFPA

Dr. Marcelo de Oliveira Lima - Instituto Evandro Chagas

Para Helena Kuklenski
(*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Artur Silva e à profa. Paula Schneider, pela acolhida no LPDNA, orientação, confiança e oportunidade de realizar esse trabalho;

Ao prof. Evonnildo Gonçalves, pelas sugestões, discussões, incentivo e amizade;

Ao Dr. Agenor Valadares, pela colaboração e auxílio na espectrometria de massas;

Ao amigo Wanderson Marques, pela colaboração, apoio e companhia;

À profa. Kelly Dantas e sua equipe, do Departamento de Química pela atenção e disponibilização de equipamentos;

Ao prof. Adriano Pimenta e sua equipe, pela atenção com que me receberam no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, da Universidade Federal de Minas Gerais;

Ao prof. Vasco Azevedo, da UFMG, pelas sugestões e incentivo;

Aos colegas da Proteômica-LPDNA, Rafael Baraúna, Sávio e Luiz Cláudio; aos demais colegas do LPDNA, Leonardo Dall'Agnol, Mariana, Luís, Diego, Hivana, Rommel, Louise; e em especial à Silvanira, Soraya e Vagner, que sempre me ajudaram e incentivaram;

Ao Instituto de Ciências Biológicas da UFPA, pela infraestrutura necessária para a conclusão deste trabalho;

Ao Programa de Pós-graduação do Núcleo de Medicina Tropical, aos professores desse programa e aos seus funcionários, em especial à Socorro e Marta;

À CAPES e Eletronorte, pelo apoio financeiro;

Aos meus amigos, que me incentivaram nas dificuldades e se alegraram com meus sucessos, especialmente à Nádia, Daniela, Alexandre, Lilliana e Neuma;

Aos meus amores, João, Maria Isabel, Bianca, Carolina e Stephan, pela força, paciência, torcida, amor e apoio incondicionais;

Ao Criador, por sua belíssima obra.

“The theory says a lot, but does not really bring us any closer to the secret of the Old One. I, at any rate, am convinced that He does not throw dice.”

Albert Einstein

RESUMO

A *Chromobacterium violaceum* é uma beta-proteobactéria Gram-negativa comum da microbiota tropical e um patógeno oportunista para animais e humanos. A infecção causada pela *C. violaceum* apresenta alta taxa de mortalidade, mas os mecanismos da patogenicidade ainda não foram caracterizados. Como outros microorganismos ambientais, essa bactéria está exposta a condições externas muito variáveis, que exigem grande adaptabilidade e sistemas de proteção eficientes. Entre esses sistemas encontra-se um operon *arsRBC* de resistência ao arsênio, metaloide danoso à saúde humana associado a lesões de pele, doenças neurológicas e câncer. O objetivo deste trabalho foi investigar as alterações na expressão proteica de *C. violaceum* ATCC 12472 na presença do arsenito e caracterizar as diversas proteínas secretadas pela bactéria. As proteínas da *C. violaceum* foram analisadas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. A análise proteômica revelou que o arsenito induz um aumento na quantidade das proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, reparo do DNA e metabolismo energético. Entre as proteínas secretadas, foram identificados fatores de virulência (metalopectidases, colagenase e toxinas), transportadores, proteínas de proteção contra estresses e com potencial aplicação biotecnológica. Os resultados mostraram que a *C. violaceum* possui um arsenal molecular de adaptação que a torna capaz de conservar suas atividades celulares e provocar lesões em outros organismos.

Palavras-chave: 2D-DIGE, arsênio, *Chromobacterium violaceum*, proteoma, exoproteoma.

ABSTRACT

Chromobacterium violaceum is a Gram-negative beta-proteobacterium found in tropical ecosystems and it is an opportunistic pathogen for animals and humans. *C. violaceum* infection is associated with a high mortality rate, but little is known about the molecular basis of pathogenicity mechanisms. As an environmental microorganism, *C. violaceum* is exposed to diverse external conditions, which require great adaptability and effective protection systems. *C. violaceum* possesses an arsenic resistance operon *arsRBC*. Arsenic is a toxic metalloid associated with skin lesions, neurological diseases and cancer. The aim of this study was to investigate changes in protein pattern in presence of arsenite and characterize secreted proteins of *C. violaceum* ATCC 12472. The proteins from *C. violaceum* were analyzed by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Proteomic analysis revealed that arsenite induces an increase of proteins involved in oxidative stress response, DNA repair and energetic metabolism. Among the secreted proteins were identified virulence factors (metallopeptidases, collagenase and toxins), transporters, and proteins involved in stress response and potentially useful. The results show novel insights into the adaptive response of *C. violaceum*.

Keywords: 2D-DIGE, arsenic, *Chromobacterium violaceum*, proteome, exoproteome.

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1.1: Colônias violetas em LB-ágar (A) e micrografia eletrônica da <i>C. violaceum</i> (B).....	17
Figura 1.2: Fórmula estrutural da violaceína.....	18
Figura 1.3: Componentes principais de um espectrômetro de massas.....	28
Figura 1.4: Estratégias para identificação e caracterização de proteínas por métodos baseados em MS.....	30

2 CAPÍTULO I - Análise proteômica da resposta da *Chromobacterium violaceum* ao arsênio

Figura 2.1: Ciclo biogeoquímico do arsênio.....	41
Figura 2.2: Mapa do consumo de água contendo mais de 10 µg/L de arsênio pela população mundial.....	43
Figura 2.3: Esquema dos diversos processos microbianos envolvidos na bioquímica do arsênio.....	48
Figura 2.4: Perfil bidimensional das proteínas de <i>C. violaceum</i>	61
Figura 2.5: Imagens da 2D-DIGE de proteínas de <i>C. violaceum</i>	62
Figura 2.6: Proteínas diferenciais de <i>C. violaceum</i> em resposta ao arsênio.....	64
Figura 2.7: Espectro de massas dos peptídeos trípticos do <i>spot</i> 900 (A), e o resultado do PMF apresentado pelo MASCOT (B).....	66
Figura 2.8: Alterações metabólicas induzidas pelo arsenito em <i>C. violaceum</i>	69

3 CAPÍTULO II - Análise do proteoma extracelular de *Chromobacterium violaceum*

Figura 3.1: Esquema dos envelopes celulares de bactérias Gram-positivas (A) e Gram-negativas (B).....	79
---	----

Figura 3.2: Esquema dos tipos de transporte transmembrana em bactérias Gram- negativas.....	81
Figura 3.3: Classificação funcional das proteínas secretadas preditas pelo SurfG+.....	91
Figura 3.4: Mapa proteico das proteínas extracelulares de <i>C. violaceum</i>	92
Figura 3.5: Classificação funcional das exoproteínas de <i>C. violaceum</i> de acordo com as classes COG.....	98

LISTA DE TABELAS

2 CAPÍTULO I - Análise proteômica da resposta da *Chromobacterium violaceum* ao arsênio

Tabela 2.1: Desenho experimental da marcação das amostras para a DIGE..... 57

Tabela 2.2: *Spots* diferenciais entre amostras de *C. violaceum* tratadas e não-tratadas com arsênio..... 63

Tabela 2.3: Proteínas de *C. violaceum* diferencialmente expressas em resposta ao arsênio identificadas por MS..... 65

3 CAPÍTULO II - Análise do proteoma extracelular de *Chromobacterium violaceum*

Tabela 3.1: Proteínas extracelulares de *C. violaceum* identificadas por MS/MS.. 93

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2D – Bidimensional
- 2DE – Eletroforese Bidimensional
- 3-HIBADH – 3-Hidroxi-isobutirato Desidrogenase
- ABC – *ATP-Binding Cassette*
- ACAD – Acil-CoA Desidrogenase
- AHL – N-Acil-homoserina Lactona
- As – Arsênio
- As(III) – Arsenito
- As(V) – Arsenato
- ATP – Adenosina Trifosfato
- CBM – *Carbohydrate-binding Module*
- CCA – Arseniato de Cobre e Cromo
- CHAPS – (*[(3-Cholamidopropyl- dimethylammonio]-1-propanesulfonate*)
- CHCA – Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
- CID – *Collision-Induced Dissociation* (Dissociação Induzida por Colisão)
- CoA – Coenzima A
- COG – *Clusters of Orthologous Groups*
- Cpi – *Chromobacterium pathogenicity islands*
- CvP – Profago de *C. violaceum*
- DIGE – *Differential in Gel Electrophoresis* (Eletroforese Diferencial em Gel)
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- DO – Densidade Óptica
- dpi – *Dots per Inch* (Pontos por Polegada)
- DTT – Ditioneitol
- ECAH – Enoil-CoA Hidratase
- EF-Tu – Fator de alongamento Tu
- ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
- ESI – Eletrodispersão
- FAD – Flavina Adenina Dinucleotídeo
- FMN – Flavina Mononucleotídeo

FT-ICR – *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance* (Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier)

GGT – γ -Glutamilttransferase

Grx – Glutaredoxina

GSH – Glutathiona

GST – Glutathiona-S-transferases

GTP – Guanosina trifosfato

h – Hora(s)

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

Hsp – *Heat Shock Protein*

ICAT – *Isotope Coded Affinity Tagging* (Marcação Isotópica de Afinidade Codificada)

IEF – Focalização Isoelétrica

kDa – Kilodáton

LB – Luria-Bertani

LC – Cromatografia Líquida

LIT – *Linear Ion Trap* (Armadilha de Íons)

LPS – Lipopolissacarídeo

m/z – Razão Massa por Carga

MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz).

MFP – *Membrane Fusion Protein*

min – Minuto(s)

mL – Mililitros

MM – Massa Molecular

MP – *Moonlighting Protein*

mRNA – RNA mensageiro

MRP – *Multidrug Resistance-Associated Protein*

MS – *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)

MS/MS – Análises Sucessivas de Massas (*Tandem MS*)

NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADP – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

ng – Nanograma(s)

NL – Não linear

nm – Nanômetro(s)

OMF – *Outer Membrane Factor*
OMP – *Outer Membrane Protein*
ORF – *Open Reading Frame*
pb – Pares de Bases
PC – *Phytochelatin* (Fitoquelatina)
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
pH – Potencial Hidrogeniônico
PHA – Poli-hidroxialcanoatos
pI – Ponto Isoelétrico
PMF – *Peptide Mass Fingerprinting*
Prx – Peroxiredoxinas
PSD – *Post Source Decay* (Decaimento Pós-Fonte)
Q – Quadrupolo
RNA – Ácido Ribonucleico
rpm – Rotações por Minuto
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
(Eletroforese em Gel de Poliácridamida com Desnaturante)
SOD – Superóxido Dismutase
SSB – Proteína Ligante de DNA Fita Simples
SST – Sistema de Secreção Tipo
Tat – *Two-arginine*
TOF – *Time-Of-Flight* (Tempo de Vôo)
TPS – *Two Partner Secretion* (Secreção dois parceiros)
Trx – Tioredoxina
Vh – Volts-hora
v/v – Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1	<i>Chromobacterium violaceum</i>	16
1.1.1	Características	16
1.1.2	Potencial Biotecnológico	18
1.1.3	Patogenicidade	20
1.1.4	Adaptação ao Ambiente	22
1.2	PROTEÔMICA	24
1.2.1	Definição e Importância	24
1.2.2	Técnicas em Proteômica	25
1.2.2.1	Eletroforese Bidimensional.....	25
1.2.2.2	Espectrometria de Massas.....	26
1.2.2.3	Quantificação da Expressão Diferencial.....	29
1.2.3	Aplicações	31
1.3	OBJETIVOS E ESTRUTURA DO TRABALHO	33
1.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
2	CAPÍTULO I - Análise Proteômica da Resposta da <i>Chromobacterium violaceum</i> ao Arsênio	38
2.1	INTRODUÇÃO	40
2.1.1	Ciclo Biogeoquímico do Arsênio	40
2.1.2	Toxicidade do Arsênio	42
2.1.3	Biorremediação do Arsênio	45
2.1.4	Bioquímica do Arsênio	47
2.1.5	Resistência ao Arsênio em <i>C. violaceum</i>	52
2.2	OBJETIVOS	54
2.2.1	Objetivo Geral	54
2.2.2	Objetivos Específicos	54
2.3	METODOLOGIA	55
2.3.1	Crescimento das Bactérias e Tratamento com Arsenito	55
2.3.2	Extração das Proteínas	55
2.3.3	Eletroforese Bidimensional	56
2.3.4	Detecção das Proteínas	57
2.3.5	2D-DIGE	57

2.3.6	Digestão com Tripsina	58
2.3.7	Espectrometria de Massas	59
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
2.5	CONCLUSÕES.....	70
2.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
3	CAPÍTULO II - Análise do Proteoma Extracelular de <i>Chromobacterium violaceum</i>	76
3.1	INTRODUÇÃO.....	78
3.1.1	Importância das Proteínas Secretadas por Bactérias	78
3.1.2	Estrutura do Envelope Celular Bacteriano	78
3.1.3	Sistemas de Transporte em Bactérias Gram-negativas	80
3.1.4	Ferramentas de Análise de Proteínas Secretadas	83
3.1.5	Exoproteoma de <i>C. violaceum</i>	84
3.2	OBJETIVOS.....	86
3.2.1	Objetivo Geral	86
3.2.2	Objetivos Específicos	86
3.3	METODOLOGIA.....	87
3.3.1	Linhagem Bacteriana e Condições de Cultivo	87
3.3.2	Obtenção das Proteínas Extracelulares	87
3.3.3	Eletroforese Bidimensional	88
3.3.4	Digestão com Tripsina	88
3.3.5	Espectrometria de Massas	89
3.3.6	Ferramentas de Bioinformática	90
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
3.4.1	Análise <i>in silico</i> das Proteínas Extracelulares de <i>C. violaceum</i>	91
3.4.2	Análise Proteômica das Proteínas Extracelulares de <i>C. violaceum</i>	92
3.4.3	Análise Funcional das Proteínas Extracelulares de <i>C. violaceum</i>	98
3.5	CONCLUSÕES.....	104
3.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
4	CONCLUSÃO GERAL	111
	APÊNDICE A - Proteínas Extracelulares de <i>C. violaceum</i> Preditas pelo SurfG+	112
	APÊNDICE B – Mapa proteico das Proteínas Extracelulares de <i>C. violaceum</i>	120

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Chromobacterium violaceum*

1.1.1 Características

A bactéria *Chromobacterium violaceum* é conhecida desde 1880, quando Bergonzini descreveu uma contaminação de cor violeta em amostras de ovoalbumina (DURÁN; MENCK, 2001). Desde então, ela têm sido isolada em várias partes do mundo e despertado interesse pelas aplicações do seu pigmento violeta, a violaceína, e pelas infecções oportunistas graves que pode causar. No Brasil, a *C. violaceum* foi isolada pela primeira vez na estação de tratamento de água de Manaus, em 1976 (DURÁN; MENCK, 2001).

A *C. violaceum* é uma bactéria Gram-negativa da família Neisseriaceae, classe Beta Proteobacteria. É um bacilo não-formador de esporos, reto ou ligeiramente curvo, com extremidades arredondadas, isolados ou em arranjos aos pares ou em cadeias curtas (Figura 1.1). Apresenta um único flagelo polar e até quatro flagelos laterais. Cresce em ágar sangue, chocolate e *MacConkey*, formando colônias convexas, lisas e de cor violeta forte, embora existam algumas variantes sem cor (BROWN; STEIN; MORRELL, 2006). Os resultados dos testes bioquímicos para identificação são: oxidase variável, catalase positivo, ausência de CO₂, urease negativo, indol negativo, fermentação de glicose, ágar triplice açúcar alcalino/ácido e motilidade positivo (ANVISA, 2004).

Encontrada na natureza no solo e na água, a *C. violaceum* é anaeróbica facultativa, saprófita e habita regiões tropicais e subtropicais, entre as latitudes 35°S e 35°N. No Brasil, ela está presente em três ecossistemas principais: Floresta Amazônica, Cerrado e Floresta Atlântica (LIMA-BITTENCOURT *et al.*, 2007). Sua temperatura ideal de crescimento está entre 20 e 37°C, mas alguns isolados de ambientes aquáticos na Região Amazônica podem crescer em temperaturas de 44°C (DALL'AGNOL *et al.*, 2008).

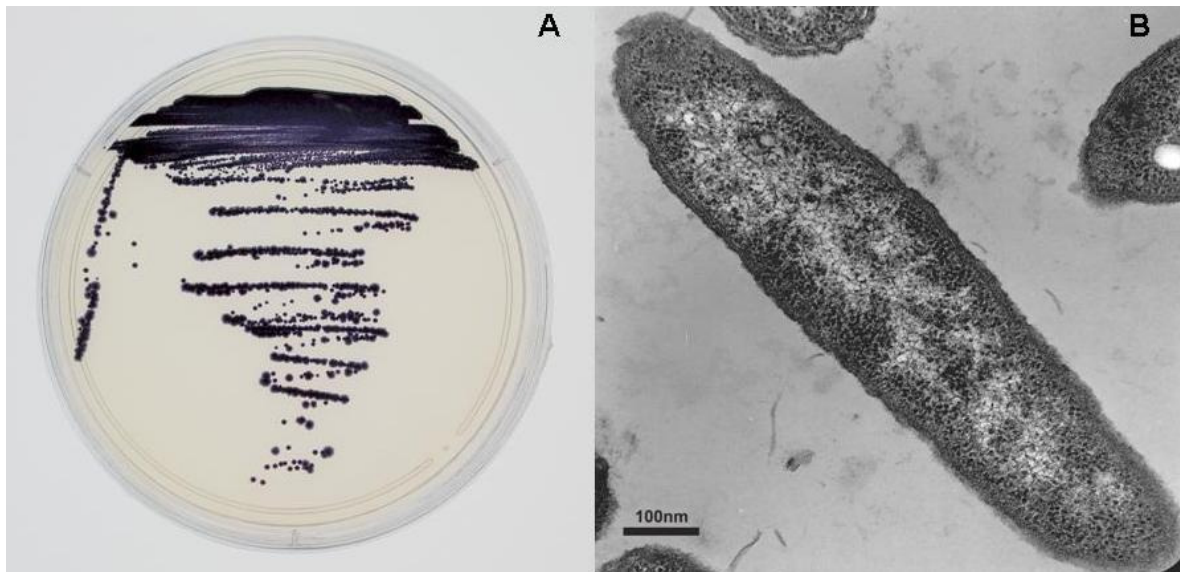


Figura 1.1: Colônias violetas em LB-ágar (A) e micrografia eletrônica da *C. violaceum* (B). (A micrografia foi realizada pela profa. Edilene Oliveira, Laboratório Biologia Estrutural, UFPA.)

Em 2003, foi publicado o genoma da *C. violaceum* ATCC 12472, executado pelos 25 laboratórios participantes do então pioneiro Projeto Genoma Brasileiro¹. O sequenciamento revelou detalhes da complexidade molecular que sustenta a versatilidade da bactéria, assim como aumentou o interesse no potencial biotecnológico da mesma (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003).

O genoma da *C. violaceum* consiste em um único cromossomo circular de 4.751.080 pb, apresentando 4.431 ORFs de tamanho médio de 954 pb. Dessas, 756 correspondem a proteínas hipotéticas (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003).

O metabolismo energético da *C. violaceum* é muito versátil, tornando-a capaz de enfrentar condições ambientais diversas. Ela conta com um aparato eficiente de produção de energia, que inclui as vias de síntese e degradação dos 20 aminoácidos, purinas e pirimidinas, uma variedade de vitaminas e cofatores, lipídeos e polissacarídeos. Além disso, ela pode viver tanto em ambientes aeróbicos quanto em condições anaeróbicas, quando ela pode usar nitrato ou fumarato como aceptores finais de elétrons (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003).

¹ <http://www.brgene.Incc.br/cviolaceum/>

A bactéria possui uma extensa variedade de proteínas transportadoras, a maioria pertencente à classe 1 (como as porinas), classe 2 (como a família de transportadores droga-metabólito) e classe 3 (como as famílias ABC e SST3). Para condições adversas do ambiente, a *C. violaceum* conta com sistemas de proteção ativados por estresse oxidativo (dissulfito-oxidase, glutationa peroxidase, aldolase), choque térmico (DnaJ-DnaK-GrpE, GroEL-GroES e outras Hsp) e radiação ultravioleta (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003).

1.1.2 Potencial Biotecnológico

Além da versatilidade metabólica, a análise do genoma da *C. violaceum* revelou seu potencial biotecnológico, exemplificado pelas suas habilidades na síntese de compostos medicinais, destoxificação ambiental, biomineração, biocontrole e biossíntese de plástico biodegradável e celulose (CAREPO *et al.*, 2004).

A característica fenotípica mais notável da *C. violaceum* é a violaceína, um pigmento violeta insolúvel em água e solúvel em álcool. Sua estrutura química, 3-[1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, foi elucidada em 1958 (DURÁN; MENCK, 2001) e é mostrada na Figura 1.2. A biossíntese da violaceína, operada por enzimas codificadas pelo operon *vio*, tem como precursor o aminoácido triptofano e utiliza o oxigênio molecular (ANTÔNIO; CRECZYNSKI-PASA, 2004).

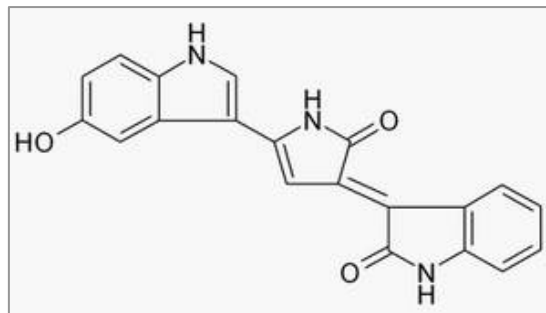


Figura 1.2: Fórmula estrutural da violaceína.

A função da violaceína para a bactéria ainda não foi esclarecida. O pigmento não é essencial para a sobrevivência ou para a patogenicidade da bactéria. A baixa solubilidade em água e o alto coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 1,7 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\lambda = 577 \text{ nm}$) sugeriram que a violaceína estaria envolvida na proteção contra a radiação visível (ANTÔNIO; CRECZYNSKI-PASA, 2004). O pigmento pode ainda ter importante papel na defesa contra o estresse oxidativo, devido às suas propriedades antioxidantes (KONZEN *et al.*, 2006).

O grande interesse na *C. violaceum* vem das atividades biológicas da violaceína. Já foram descritas atividades antibacteriana, antifúngica, antimicobacteriana, tripanossomicida, citotóxica e antiviral (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003). Muitas informações sobre o uso da violaceína e moléculas derivadas em algumas dessas atividades estão protegidas por patentes (DURÁN; MENCK, 2001).

A *C. violaceum* produz ainda outros metabólitos com atividades farmacológicas relevantes, como potenciadores de antibióticos β -lactâmicos, antibióticos (arfamenina B, aerocianidina, aerocavina, monobactama SB-26), antitumorais (depsipeptídeo FK228) e inibidores enzimáticos (DURÁN; MENCK, 2001).

A produção de seis quitinases extracelulares faz da *C. violaceum* uma candidata para biocontrole de fungos (CHERNIN *et al.*, 1998). A bactéria também pode acumular até 65% do seu peso com poli-hidroxialcanoatos (PHA), polímeros produzidos como reserva de carbono e energia quando alguns nutrientes estão escassos. Os PHAs tem propriedades físicas semelhantes ao polipropileno e são fontes de plástico biodegradável (STEINBUÈCHEL *et al.*, 1993). A produção de celulose foi caracterizada na *C. violaceum*, sendo os genes responsáveis pela biossíntese organizados em dois operons *bcs* (RECOUVREUX *et al.*, 2008).

A biomineração é outra área de aplicação da *C. violaceum*. Ela tem um operon *hcnABC* relacionado com a produção de HCN e cianeto, que pode interagir com uma série de metais formando complexos estáveis e hidrossolúveis (CAREPO *et al.*, 2004). A *C. violaceum* foi capaz de solubilizar 15% do ouro e cobre de pedaços de placas de circuito integrado em sete dias (FARAMARZI *et al.*, 2004).

A *C. violaceum* pode ainda participar de processos de destoxificação ambiental. A análise do genoma revelou a presença da enzima dehalogenase ácida, que reduz a toxicidade de compostos halogenados carcinogênicos. Está presente também um operon *cyn* codificando uma cianase, enzima que transforma o cianato

tóxico em dióxido de carbono e amônio, compostos úteis para a bactéria (CAREPO *et al.*, 2004).

1.1.3 Patogenicidade

A *C. violaceum* é uma bactéria saprófita e normalmente não é patogênica. No entanto, ela pode se tornar um patógeno oportunista para animais e humanos e causar infecções – raras, mas associadas com alta taxa de mortalidade (BETTS; CHAUDHURI; PALLEN, 2004).

A infectividade da bactéria é baixa, já que as águas do rio Negro, onde ela é abundante, é fonte de água potável para a população local, sem que ocorra uma ampla infecção dessa população (BRITO *et al.*, 2004). Alguns relatos correlacionam a infecção por *C. violaceum* com condições de imunodeficiência, como indivíduos infectados com HIV ou doença granulomatosa crônica, mas foram descritos casos de infecção em pessoas que não estavam imunodeprimidas (DURÁN; MENCK, 2001).

O primeiro caso de infecção por *C. violaceum* foi descrito em 1905 por Wooley e ocorreu em búfalos nas Filipinas. Em humanos, o primeiro caso de infecção foi na Malásia, descrito por Lesslar em 1927 (DÍAZ PÉREZ; GARCÍA; RODRIGUEZ VILLAMIZAR, 2007).

A infecção começa tipicamente com a exposição da pele lesada a água ou solo contaminado e apresenta um período de incubação de 3 a 14 dias (DÍAZ PÉREZ; GARCÍA; RODRIGUEZ VILLAMIZAR, 2007). As apresentações clínicas são: celulite, linfadenite, lesões cutâneas e abscessos viscerais (mais comumente no fígado, rim e pulmão), podendo ocorrer infecção do trato urinário, gastroenterite, osteomielite, sinusite e meningite. O quadro evolui geralmente para sepse severa e óbito em 24 a 72 h. A rápida evolução e o tratamento ineficaz com antibióticos resultam numa taxa de fatalidade de mais de 60% (DE SIQUEIRA *et al.*, 2005). O diagnóstico da infecção é feito por cultura de sangue ou fluidos de abscessos e identificação bioquímica (CHANG *et al.*, 2007), embora haja estudos para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico por PCR (SCHOLZ *et al.*, 2006).

A *C. violaceum* é sensível aos antimicrobianos gentamicina e ciprofloxacino e apresenta resistência a vários antibióticos (DURÁN; MENCK, 2001). Beta-lactamases e genes de resistência a múltiplas drogas são alguns dos mecanismos de resistência da bactéria a antibióticos comuns, como ampicilinas, cefalosporinas, rifampicina, puromicina, tetraciclina, e eritromicina (FANTINATTI-GARBOGGINI *et al.*, 2004). Embora tenha base genética para resistência ao cloranfenicol (FANTINATTI-GARBOGGINI *et al.*, 2004), cepas isoladas da Amazônia e de amostras clínicas mostram-se sensíveis ao antibiótico (DALL'AGNOL *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2007; DÍAZ PÉREZ; GARCÍA; RODRIGUEZ VILLAMIZAR, 2007).

Aproximadamente 150 casos de infecção foram relatados ao redor do mundo principalmente no sudeste da Ásia, Oceania e Estados Unidos (DE SIQUEIRA *et al.*, 2005). No Brasil, ocorreram três casos de infecção por *C. violaceum*. O primeiro foi em 1984, em um homem jovem que teve contato com água de rio no sul do Brasil (DE SIQUEIRA *et al.*, 2005). Em 2000, a bactéria foi identificada no sangue de outro homem jovem no interior de São Paulo, que foi a óbito por septicemia severa (MARTINEZ *et al.*, 2000). Em 2004, outros três casos de septicemia associados a *C. violaceum* foram descritos em três irmãos adolescentes na Bahia, dos quais um sobreviveu após tratamento com oxacilina e meropenem (DE SIQUEIRA *et al.*, 2005).

Os fatores de virulência de *C. violaceum* foram encontrados através de dados do genoma, mas ainda não foram caracterizados molecularmente. Esses fatores são os sistemas de secreção tipo II (*pili* tipo IV) e tipo III, membros da família RTX de exoproteínas que incluem toxinas citolíticas (hemolisinas e leucotoxinas), metaloproteases e lipases, além da endotoxina (LPS) componente da parede celular (BRITO *et al.*, 2004).

O sistema de secreção tipo III (SST3) é utilizado por bactérias patogênicas Gram-negativas para injetar proteínas do seu citoplasma diretamente para o citoplasma de uma célula-alvo eucariótica (BETTS; CHAUDHURI; PALLEEN, 2004). Os genes que codificam esse sistema na *C. violaceum* estão arranjados em duas ilhas de patogenicidade, chamadas Cpi-1 e Cpi-2 (de *Chromobacterium pathogenicity islands*), homólogas às ilhas de patogenicidade de *Salmonella sp.* Spi-1 e Spi-2 e ao SSTT de *Yersinia pestis* (BETTS; CHAUDHURI; PALLEEN, 2004). No entanto, alguns genes presentes nessas espécies patogênicas estão ausentes em *C. violaceum*, o que pode explicar a baixa infectividade desse organismo

(BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003). Alguns prováveis efetores (proteínas injetadas no hospedeiro) foram identificados por homologia com sistemas relacionados e correspondem a chaperonas e proteínas envolvidas na reorganização do citoesqueleto, regulação do tráfego de vacúolos e vias de apoptose da célula eucariótica (BETTS; CHAUDHURI; PALLEEN, 2004).

A *C. violaceum* apresenta alguns dos genes do sistema de secreção tipo II homólogos aos de *Pseudomonas aeruginosa*, que podem ser resultado de transferência gênica horizontal. Esses genes codificam a maquinaria *pili* tipo IV (proteínas de membrana, proteínas ligadoras de nucleotídeos, enzimas, reguladores e adesinas) e é importante para motilidade, adesão e agregação bacteriana, bem como na colonização de hospedeiros e comportamento colonial complexo em biofilmes (BRITO *et al.*, 2004).

As cepas não-pigmentadas de *C. violaceum* são patogênicas para humanos e conseqüentemente tem sido estabelecido que a patogenicidade não depende da produção de violaceína. Nove por cento das cepas não são pigmentadas e sua virulência é comparável às cepas pigmentadas (CHANG *et al.*, 2007).

1.1.4 Adaptação ao Ambiente

Como outros micro-organismos de vida livre, a *C. violaceum* está exposta a condições ambientais variáveis, como temperatura, pH, radiação, abundância de nutrientes e compostos tóxicos. A bactéria precisa responder rapidamente a alterações dessas condições e se adaptar a elas, através da transcrição de genes específicos e ativação de sistemas de proteção. Isolados ambientais de *C. violaceum* apresentam grande variedade fenotípica e genética, indicando a grande capacidade de adaptação dessa bactéria (DALL'AGNOL *et al.*, 2008).

No genoma de *C. violaceum*, há vários genes envolvidos em processos de detoxificação, como catalase, peroxidases, superóxido dismutase, glutathione-S-transferase e aldolases (BRITO *et al.*, 2004). A proteção contra as espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, radical hidroxila e hidroperóxidos orgânicos) é feita pelos reguladores transcricionais SoxRS e OxyR, envolvidos na expressão da superóxido dismutase, porinas, peroxidase e proteína

ligante de DNA (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003).

Em situações de escassez de nutrientes, a bactéria conta com genes que codificam proteínas envolvidas na utilização de peptídeos e no metabolismo de ferro, proteínas ligantes de DNA, chaperonas e a lipoproteína OmlA, que protege o envelope celular. Outros genes estão envolvidos no controle do pH, da pressão osmótica (expressão de transportadores e osmoprotetores), temperatura (14 proteínas de choque térmico), resistência ao alumínio e proteção contra radiação ultravioleta (HUNGRIA *et al.*, 2004).

A *C. violaceum* apresenta também um mecanismo de comunicação celular chamado sistema sensor de quorum (*quorum sensing*), que consiste na produção de moléculas sinalizadoras autoindutoras, as N-acil-homoserina-lactonas (AHL), em resposta ao aumento da população de células. As AHLs, por sua vez, regulam a expressão de vários genes, relacionados com a biossíntese de pigmentos, antibióticos e fatores de virulência, parada do crescimento celular e a formação de biofilmes (MOROHOSHI *et al.*, 2008).

A N-hexanoil-homoserina lactona regula a biossíntese de violaceína, a produção e degradação de cianeto e a produção da elastase, quitinases e outras enzimas extracelulares (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003). Uma cepa modificada geneticamente de *C. violaceum* é utilizada em testes biológicos para detecção de AHLs produzidas por outras bactérias Gram-negativas (BLOSSER; GRAY, 2000).

1.2 PROTEÔMICA

1.2.1 Definição e Importância

A dinâmica das biomoléculas numa célula depende do fluxo de informação entre elas: a informação do DNA é transcrita em mRNA, do mRNA é traduzida em proteína, que por sua vez gera metabólitos, interage com outras moléculas e participa de redes regulatórias. No final do século passado, um grande desenvolvimento nas técnicas de sequenciamento de DNA em grande escala levou à produção crescente de dados de genomas de diversos organismos – atualmente, já existem 974 genomas procarióticos sequenciados².

Esse acúmulo de sequências de DNA em bancos de dados não foi suficiente, no entanto, para desvendar as funções biológicas (PANDEY; MANN, 2000). Até 40% das proteínas anotadas em um genoma tem funções desconhecidas (ZHAO; POH, 2008), o que reforça a necessidade do estudo do mRNA, proteínas e metabólitos, gerando campos de pesquisa em grande escala denominados “ômicas”: transcriptômica, proteômica, metabolômica, interatômica e assim por diante (ZHANG; LI; NIE, 2010).

Um proteoma é o conjunto de proteínas expressas num determinado organismo, célula, organela ou fluido fisiológico em uma determinada situação biológica. Esse termo foi proposto em 1995 por Wasinger e colaboradores para proteínas de *Mycoplasma genitalium* e se refere ao complemento proteico do genoma (WASINGER *et al.*, 1995).

Ao contrário do genoma, que é uma informação estática, por seu caráter permanente, o proteoma é extremamente dinâmico e dependente do estágio de desenvolvimento e diferenciação celular e das condições ambientais (BISCH, 2004). Além disso, não há uma relação linear entre um gene e a proteína expressa, já que modificações das proteínas não são aparentes no DNA, tais como modificações pós-traducionais, localização dos produtos gênicos, meia-vida e interações proteína-proteína (PANDEY; MANN, 2000). Até mesmo a quantidade relativa da proteína

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/gpstat.html>. Acessado em 10 abr 2011.

pode ser inferida a partir dos níveis de mRNA somente para proteínas de alto número de cópias, o que corresponde a apenas 30% dos genes transcritos (WASINGER, 2006).

A análise do proteoma total é desafiadora, devido à sua grande e desconhecida complexidade. O número de proteínas num proteoma é muito maior que o número de genes no genoma – um gene particular pode gerar múltiplas proteínas distintas, como resultado de processamento alternativo de transcritos primários, presença de polimorfismos e alterações pós-traducionais. Ainda, a variedade de propriedades físico-químicas e o intervalo de concentração de diferentes proteínas dentro de um proteoma excedem o intervalo dinâmico e o poder de análise de qualquer método ou instrumento analítico único, exigindo o desenvolvimento de técnicas analíticas cada vez mais robustas (DOMON; AEBERSOLD, 2006).

1.2.2 Técnicas em Proteômica

O fluxo de trabalho geral da proteômica é constituído das seguintes etapas: isolamento das proteínas a partir de sua fonte biológica; separação das proteínas, feita por eletroforese bidimensional (2DE) ou cromatografia líquida (LC) na proteômica tradicional; digestão enzimática das proteínas (usualmente com tripsina), resultando numa mistura de peptídeos; análise dos peptídeos por espectrometria de massas (MS) e análise dos dados de MS com ferramentas de bioinformática para identificação das proteínas na amostra (DOMON; AEBERSOLD, 2006).

1.2.2.1 Eletroforese Bidimensional

A eletroforese bidimensional foi desenvolvida em 1975, por O'Farrell, e desde então vem sendo melhorada significativamente. A técnica consiste no acoplamento de uma focalização isoeletrica (IEF), na primeira dimensão, e uma SDS-PAGE, na segunda dimensão. A utilização de duas características distintas, ponto isoeletrico

(pI) e massa molecular (MM), permite a separação de até 2000 polipeptídeos em um gel, em concentrações de 1 ng por *spot* (GÖRG; WEISS; DUNN, 2004).

A grande vantagem da 2DE é o fornecimento de um mapa geral mostrando o nível de expressão relativo, isoformas e modificações pós-traducionais das proteínas intactas (GÖRG; WEISS; DUNN, 2004). A 2DE tem resolução suficiente para separar os diferentes estados modificados de uma proteína e informar sobre a proporção relativa entre eles, acrescentando importantes dados no estudo da fisiologia de determinado organismo ou de uma dada via bioquímica (MANN; JENSEN, 2003).

A 2DE não apresenta sensibilidade e resolução suficientes para avaliar proteínas pouco abundantes, sendo o amplo intervalo dinâmico das proteínas em amostras biológicas, de até 10^6 vezes, uma grande limitação. As proteínas que apresentam pI ou MM extremos ou baixa solubilidade, como as proteínas de membrana, também não são analisadas adequadamente pela 2DE (WASINGER, 2006). Algumas estratégias foram propostas para contrapor essas limitações, entre elas o uso de vários intervalos pequenos de gradientes de pH na IEF e pré-fracionamento da amostra (GÖRG; WEISS; DUNN, 2004).

As principais etapas experimentais da 2DE são: preparação de amostra e solubilização das proteínas, separação por 2DE, detecção das proteínas e análise computacional.

Técnicas independentes de gel, como a cromatografia líquida multidimensional (geralmente troca catiônica acoplada com fase reversa), são utilizadas com o objetivo de melhorar a detecção de proteínas pouco abundantes ou pouco solúveis, além de permitirem a automação, pela possibilidade de acoplamento com o espectrômetro de massas. No entanto, o método de 2DE acoplado com a MS ainda é amplamente usado para análise proteômica (HAN *et al.*, 2010).

1.2.2.2 Espectrometria de Massas

A sequência de aminoácidos é o elo de ligação entre uma proteína e seu gene codificante e, em princípio, entre a fisiologia celular e a genética (DOMON; AEBERSOLD, 2006). Até a metade dos anos 90, a degradação de Edman era a

técnica de escolha para a determinação das sequências de aminoácidos de polipeptídeos, que deviam estar altamente purificados. Com o desenvolvimento de técnicas “brandas” de ionização e vaporização, aplicáveis a macromoléculas como polipeptídeos, a MS conquistou importante espaço na determinação da sequência de aminoácidos, devido à alta precisão e sensibilidade (detecção de femtomoles de amostra) na determinação da massa molecular de compostos biológicos (DOMON; AEBERSOLD, 2006).

O espectrômetro de massas é um instrumento que produz íons gasosos de uma amostra e separa-os de acordo com sua razão massa por carga (m/z). Eles são utilizados para medir a massa molecular de um polipeptídeo ou para determinar sua sequência de aminoácidos e modificações presentes (DOMON; AEBERSOLD, 2006). O espectrômetro de massas é constituído de três componentes principais: fonte de íons, analisador de massas e detector, conforme mostrado na Figura 1.3.

Duas técnicas de ionização são utilizadas para biomoléculas: ionização por eletrodispersão (ESI) e ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). Na fonte MALDI, a amostra de peptídeos é co-cristalizada com uma matriz, geralmente um ácido orgânico aromático (como o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e o ácido sinapínico), que absorve luz ultravioleta de um laser e transfere essa energia para a amostra, propiciando sua ionização (geralmente com uma única carga) e dessorção (GRAHAM; GRAHAM; MCMULLAN, 2007). É uma técnica muito sensível e apresenta maior tolerância à presença de contaminantes, como sais e detergentes (DOMON; AEBERSOLD, 2006).

Na ESI, a amostra líquida passa por um capilar muito estreito e submetido a alto potencial elétrico, saindo como um *spray* de gotículas carregadas que se repelem e ficam cada vez menores, até as moléculas serem ionizadas (geralmente com múltiplas cargas) e dessolvatadas (GRAHAM; GRAHAM; MCMULLAN, 2007). A ESI é tipicamente acoplada com a cromatografia multidimensional nos estudos proteômicos.

Os analisadores de massas diferem quanto à resolução, exatidão e sensibilidade. Nos analisadores por tempo de voo (TOF), a m/z de um íon é deduzida por seu tempo de voo através de um tubo de comprimento definido sob vácuo. Os analisadores TOF apresentam boa resolução e exatidão e aceitam íons da fonte MALDI ou ESI, podendo ser acoplados a outros analisadores (DOMON; AEBERSOLD, 2006).

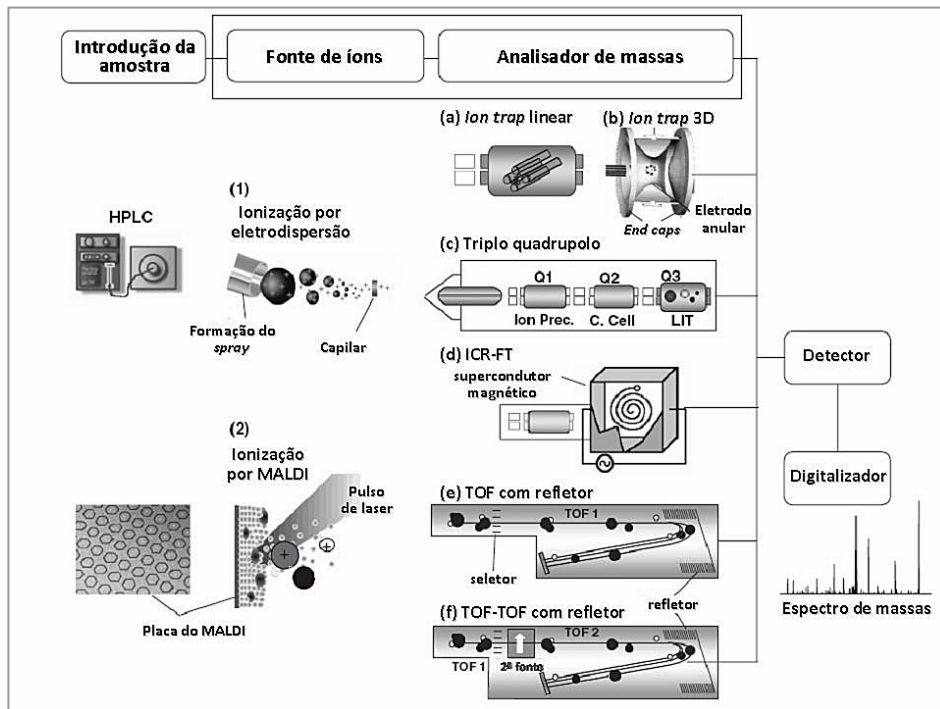


Figura 1.3: Componentes principais de um espectrômetro de massas. (Adaptado de: CANÃS *et al.*, 2006)

Os analisadores quadrupolos (Q) são constituídos de quatro eletrodos submetidos a corrente e voltagem específicos, que somente permitem a passagem de íons com determinada m/z . Na armadilha de íons (*linear ion trap*, LIT), os íons são aprisionados entre eletrodos e liberados segundo seus m/z com o aumento da voltagem; apresenta boa sensibilidade e rapidez. Outros analisadores de massas são o *orbitrap* e o analisador por ressonância ciclôtrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR), que apresentam resolução, precisão e sensibilidade muito altas (DOMON; AEBERSOLD, 2006).

Os diferentes analisadores de massas podem ser acoplados em diversas combinações formando equipamentos híbridos, como TOF-TOF, Q-Q-TOF, Q-Q-LIT, Q-Q-Q, LIT-ICR. Esses equipamentos são capazes de análises sucessivas de massas (*tandem MS* ou MS/MS), que permite a determinação da sequência de aminoácidos de um peptídeo. Na MS/MS, um peptídeo é ionizado e selecionado segundo a m/z desejada; esse íon passa por uma célula de colisão, preenchida com gás inerte, onde será fragmentado gerando uma série de novos íons. Esse processo é chamado de dissociação induzida por colisão (CID) (HAN; ASLANIAN; YATES JR 3RD, 2008). Esses dados são analisados em conjunto e a sequência de

aminoácidos pode ser determinada. A análise de fragmentos de íons pode ainda ser feito pela técnica decaimento pós-fonte (PSD), na qual a fragmentação ocorre espontaneamente após o peptídeo ter sido desorvido da matriz e acelerado no campo elétrico, por ter recebido grande quantidade de energia irradiada pelo laser (BISCH, 2004).

Os valores das massas dos peptídeos tripticos de uma proteína, determinados experimentalmente, são únicos para uma determinada proteína, como uma “impressão digital” (*peptide mass fingerprinting*, PMF). Esses valores são comparados com valores de massas pré-calculadas, de peptídeos ou fragmentos obtidos pela aplicação das regras de clivagem específica às sequências primárias de proteínas de um banco de dados, por ferramentas de bioinformática como o MASCOT³ (GRAHAM; GRAHAM; MCMULLAN, 2007). Dessa forma, a proteína é identificada e pode ser caracterizada com a análise conjunta de dados de MS/MS.

Essa estratégia faz parte da proteômica *bottom-up* (Figura 1.4), que consiste na identificação das proteínas a partir dos peptídeos gerados por digestão proteolítica (GRAHAM; GRAHAM; MCMULLAN, 2007). Em outra abordagem *bottom-up*, chamada proteômica *shotgun*, a amostra complexa de proteínas é digerida e os peptídeos gerados são analisados por LC-MS (DOMON; AEBERSOLD, 2006).

Outra estratégia de proteômica que vem sendo desenvolvida é a *top-down* (Figura 1.4), na qual as proteínas intactas são identificadas por MS, sem digestão proteolítica da amostra. Essa técnica só é possível com espectrômetros de alta resolução como o ICR-FT (GRAHAM; GRAHAM; MCMULLAN, 2007).

1.2.2.3 Quantificação da Expressão Diferencial

Um dos grandes avanços trazidos pela proteômica foi a possibilidade de analisar e comparar um grande grupo de proteínas expressas em diferentes situações. A análise das alterações da expressão proteica entre duas ou mais amostras pode ser feita pelas técnicas de 2DE e MS com o uso de marcadores específicos.

³ <http://www.matrixscience.com/>

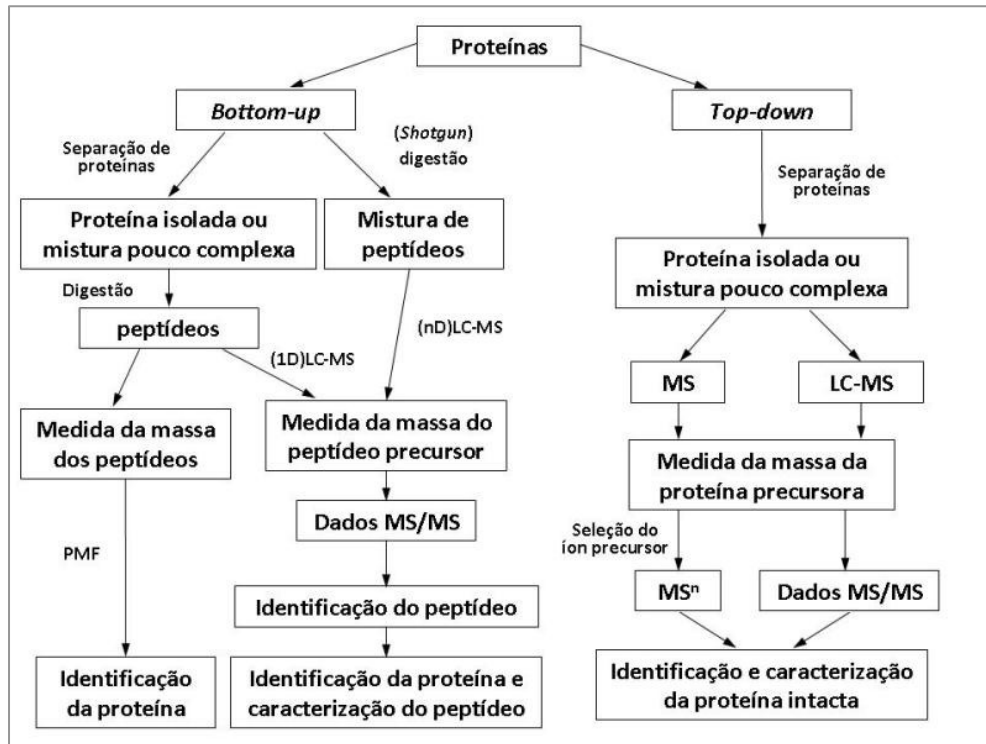


Figura 1.4: Estratégias para identificação e caracterização de proteínas por métodos baseados em MS. (Adaptado de: HAN; ASLANIAN; YATES JR 3RD, 2008)

Uma das metodologias quantitativas é a marcação isotópica de afinidade codificada (ICAT), na qual duas amostras têm suas proteínas marcadas separadamente com um marcador isotópico diferente, um “leve”, contendo átomos de hidrogênio, e um “pesado”, contendo átomos de deutério. As amostras são então misturadas, digeridas com tripsina e os peptídeos marcados são enriquecidos. A mistura de peptídeos marcados é analisada por espectroscopia de massas, na qual as abundâncias relativas das versões leve e pesada dos peptídeos podem ser comparadas (GRAHAM; GRAHAM; MCMULLAN, 2007). Uma modificação da técnica é a marcação metabólica, onde os marcadores isotópicos são incorporados durante o crescimento do organismo (GRAHAM; GRAHAM; MCMULLAN, 2007).

Análises diferenciais podem também ser feitas pela comparação do perfil na 2DE. No entanto, os géis podem apresentar distorções e diferenças, mesmo sendo produzidos em condições idênticas, devido tanto à preparação das amostras como a variações nas condições da eletroforese (concentração de acrilamida no gel, campo elétrico, pH e temperatura) (BISCH, 2004).

Para contornar esses problemas, Unlü e colaboradores desenvolveram a técnica DIGE (eletroforese diferencial em gel) (UNLÜ; MORGAN; MINDEN, 1997).

Nela, cada amostra de proteína é marcada com um fluoróforo diferente, depois misturadas e separadas no mesmo gel por 2DE. As imagens do gel são obtidas com a excitação e detecção de luz no comprimento de onda específico de cada fluoróforo, depois sobrepostas e normalizadas (GÖRG; WEISS; DUNN, 2004).

1.2.3 Aplicações

Os estudos proteômicos, pela sua abordagem mais ampla na investigação dos sistemas biológicos, se prestam para aumentar as informações sobre a síntese e degradação de proteínas em situações específicas, modificações pós-traducionais e interações entre proteínas (HAN *et al.*, 2010).

O tipo mais comum de estudo proteômico é a comparação do perfil de proteínas produzidas em duas ou mais condições experimentais, a fim de caracterizar a resposta ao estímulo ambiental. Entre essas condições, estão variações de temperatura, fontes nutricionais, choque osmótico e estresse químico, como a presença de metais pesados (HAN *et al.*, 2010). O termo metalômica foi proposto para a investigação das alterações no transcriptoma, proteoma e metaboloma induzidas por metais (HAFERBURG; KOTHE, 2010).

As modificações pós-traducionais alteram as propriedades físico-químicas das proteínas e, conseqüentemente, suas funções biológicas, localização celular e interações com outras biomoléculas. Esse processamento da cadeia polipeptídica pode ser uma proteólise ou a adição de um grupo químico, como fosfato, metila, acetila, sulfato ou glicídeo.

As estratégias para estudo das modificações pós-traducionais são baseadas em separação das proteínas da amostra complexa por 2DE e identificação por MS, ou enriquecimento de proteínas ou peptídeos modificados por métodos bioquímicos ou imunológicos, seguido de MS (MANN; JENSEN, 2003). Um exemplo é o fosfoproteoma, no qual proteínas fosforiladas podem ser visualizadas no gel 2D na revelação por *immunoblotting*, ou enriquecidas por imunoprecipitação com a utilização de anticorpos anti-fosfoaminoácido.

Na biotecnologia industrial, a análise proteômica de micro-organismos é aplicada no monitoramento de alterações celulares durante a produção de proteínas

heterólogas, na identificação de passos limitantes de velocidade nas vias metabólicas, no desenvolvimento de cepas mais eficientes na produção de bioprodutos e na busca de novas enzimas e promotores. A caracterização de proteomas extracelulares pode fornecer novas informações sobre a fisiologia bacteriana, aplicáveis no estudo de patógenos ou na produção de proteínas recombinantes (HAN *et al.*, 2010).

Metaproteômica é um campo emergente que visa analisar proteínas de comunidades microbianas mistas, aumentando o entendimento do funcionamento dessas comunidades e possíveis aplicações biotecnológicas, como biorremediação e identificação de biomarcadores (ZHAO; POH, 2008).

A integração de dados de genômica e proteômica é cada vez mais necessária, podendo ser feita durante a anotação do genoma. As técnicas de proteogenômica são utilizadas para corrigir anotações de genomas, validar genes preditos, revelar novos genes, identificar proteínas hipotéticas e corrigir códons de início e parada (ARMENGAUD, 2009). Além disso, a espectrometria de massas é útil no mapeamento global das modificações pós-traducionais e na confirmação da predição do peptídeo-sinal em proteínas secretadas (GUPTA *et al.*, 2007).

1.3 OBJETIVOS E ESTRUTURA DO TRABALHO

O presente trabalho apresenta a aplicação das técnicas de análise proteômica para o estudo da bactéria *Chromobacterium violaceum*, abordando dois aspectos: a resistência ao arsênio e a interação com o ambiente através de proteínas secretadas.

No Capítulo I, será apresentada a análise diferencial do proteoma de *C. violaceum* em resposta ao arsênio. A poluição ambiental por esse metaloide é um problema de saúde pública em várias partes do mundo: a exposição ao arsênio está associada a efeitos maléficos sobre a saúde humana. Os mecanismos de resistência ao arsênio são amplamente encontrados em micro-organismos e as proteínas expressas pelo operon *ars* são bem estudadas, mas pouco se sabe sobre a resposta celular global que determina a resistência ao metalóide. O objetivo do trabalho foi investigar as alterações na expressão proteica de *C. violaceum* ATCC 12472 na presença do arsenito.

No Capítulo II, será apresentada a análise do exoproteoma ou proteoma extracelular de *C. violaceum*. As proteínas secretadas pelas bactérias apresentam importantes funções remotas na nutrição, comunicação celular e destoxificação. Essas funções podem ser entendidas através da análise do exoproteoma, o proteoma das proteínas secretadas. Uma vez que proteínas secretadas desempenham uma variedade de funções importantes na sobrevivência bacteriana no ambiente, o trabalho teve como objetivo caracterizar as diversas proteínas secretadas pela *C. violaceum* ATCC 12472.

O estudo dessas proteínas aumentará nosso entendimento sobre a interação e adaptação da bactéria ao meio ambiente, favorecendo a exploração do seu potencial biotecnológico, e sobre os determinantes para sua patogenicidade.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde, Módulo V - Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Brasília: ANVISA, 2004.

ANTÔNIO RV, CRECZYNSKI-PASA TB. Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*. Genet Mol Res. 2004 Mar;31;3(1):85-91.

ARMENGAUD J. A perfect genome annotation is within reach with the proteomics and genomics alliance. Curr Opin Microbiol. 2009 Jun;12(3):292-300

BETTS HJ, CHAUDHURI RR, PALLEN MJ. An analysis of type-III secretion gene clusters in *Chromobacterium violaceum*. Trends Microbiol. 2004 Nov;12(11):476-82.

BISCH, PM. Genômica Funcional: Proteômica. In: Luís Mir. (Org.). Genômica. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004, v. 1, p. 139-162.

BLOSSER RS, GRAY KM. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. J Microbiol Methods. 2000 Mar;40(1):47-55.

BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003;100(20):11660-5.

BRITO CF, CARVALHO CB, SANTOS F, GAZZINELLI RT, OLIVEIRA SC, AZEVEDO V, TEIXEIRA SM. *Chromobacterium violaceum* genome: molecular mechanisms associated with pathogenicity. Genet Mol Res. 2004 Mar 31;3(1):148-61.

BROWN KL, STEIN A, MORRELL DS. Ecthyma gangrenosum and septic shock syndrome secondary to *Chromobacterium violaceum*. J Am Acad Dermatol. 2006 May;54(5 Suppl):S224-8.

CAÑAS B, LÓPEZ-FERRER D, RAMOS-FERNÁNDEZ A, CAMAFEITA E, CALVO E. Mass spectrometry technologies for proteomics. Brief Funct Genomic Proteomic. 2006 Feb;4(4):295-320.

CAREPO MS, AZEVEDO JS, PORTO JI, BENTES-SOUSA AR, BATISTA JDA S, SILVA AL, SCHNEIDER MP. Identification of *Chromobacterium violaceum* genes with potential biotechnological application in environmental detoxification. Genet Mol Res. 2004 Mar 31;3(1):181-94.

CHANG CY, LEE YT, LIU KS, WANG YL, TSAO SM. *Chromobacterium violaceum* infection in Taiwan: a case report and literature review. J Microbiol Immunol Infect. 2007 Jun;40(3):272-5.

CHERNIN LS, WINSON MK, THOMPSON JM, HARAN S, BYCROFT BW, CHET I, WILLIAMS P, STEWART GS. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. J Bacteriol. 1998 Sep;180(17):4435-41.

DALL'AGNOL LT, MARTINS RN, VALLINOTO AC, RIBEIRO KT. Diversity of *Chromobacterium violaceum* isolates from aquatic environments of state of Pará, Brazilian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008 Nov;103(7):678-82.

DE SIQUEIRA IC, DIAS J, RUF H, RAMOS EA, MACIEL EA, ROLIM A, LABUR L, VASCONCELOS L, SILVANY C. *Chromobacterium violaceum* in siblings, Brazil. Emerg Infect Dis. 2005 Sep;11(9):1443-5.

DÍAZ PÉREZ JA, GARCÍA J, RODRIGUEZ VILLAMIZAR LA. Sepsis by *Chromobacterium violaceum*: first case report from Colombia. Braz J Infect Dis. 2007 Aug;11(4):441-2.

DOMON B, AEBERSOLD R. Mass spectrometry and protein analysis. Science. 2006 Apr 14;312(5771):212-7.

DURÁN N, MENCK CF. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. Crit Rev Microbiol. 2001;27(3):201-22.

FANTINATTI-GARBOGGINI F, ALMEIDA R, PORTILLO VDO A, BARBOSA TA, TREVILATO PB, NETO CE, COELHO RD, SILVA DW, BARTOLETI LA, HANNA ES, BROCCHI M, MANFIO GP. Drug resistance in *Chromobacterium violaceum*. Genet Mol Res. 2004 Mar 31;3(1):134-47.

FARAMARZI MA, STAGARS M, PENSINI E, KREBS W, BRANDL H. Metal solubilization from metal-containing solid materials by cyanogenic *Chromobacterium violaceum*. J Biotechnol. 2004 Sep 30;113(1-3):321-6.

GÖRG A, WEISS W, DUNN MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics. 2004 Dec;4(12):3665-85.

GRAHAM RLJ, GRAHAM C, MCMULLAN G. Microbial proteomics: a mass spectrometry primer for biologists. Microb Cell Fact. 2007 Aug 15;6:26.

GUPTA N, TANNER S, JAITLY N, ADKINS JN, LIPTON M, EDWARDS R, ROMINE M, OSTERMAN A, BAFNA V, SMITH RD, PEVZNER PA. Whole proteome analysis of post-translational modifications: applications of mass-spectrometry for proteogenomic annotation. Genome Res. 2007 Sep;17(9):1362-77.

HAFERBURG G, KOTHE E. Metallomics: lessons for metalliferous soil remediation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010 Jul;87(4):1271-80.

HAN MJ, LEE SY, KOH ST, NOH SG, HAN WH. Biotechnological applications of microbial proteomes. *J Biotechnol.* 2010 Feb 15;145(4):341-9.

HAN X, ASLANIAN A, YATES JR 3RD. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* 2008 Oct;12(5):483-90.

HUNGRIA M, NICOLÁS MF, GUIMARÃES CT, JARDIM SN, GOMES EA, VASCONCELOS AT. Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. *Genet Mol Res.* 2004 Mar 31;3(1):102-16.

KONZEN M, DE MARCO D, CORDOVA CA, VIEIRA TO, ANTÔNIO RV, CRECZYNSKI-PASA TB. Antioxidant properties of violacein: possible relation on its biological function. *Bioorg Med Chem.* 2006 Dec 15;14(24):8307-13.

LIMA-BITTENCOURT CI, ASTOLFI-FILHO S, CHARTONE-SOUZA E, SANTOS FR, NASCIMENTO AM. Analysis of *Chromobacterium sp.* natural isolates from different Brazilian ecosystems. *BMC Microbiol.* 2007 Jun 21;7:58.

MANN M, JENSEN ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol.* 2003 Mar;21(3):255-61.

MARTINEZ R, VELLUDO MA, SANTOS VR, DINAMARCO PV. *Chromobacterium violaceum* infection in Brazil. A case report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000 Mar-Apr;42(2):111-3.

MOROHOSHI T, KATO M, FUKAMACHI K, KATO N, IKEDA T. N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol Lett.* 2008 Feb;279(1):124-30.

O'FARRELL PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975 May 25;250(10):4007-21.

PANDEY A, MANN M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* 2000 Jun 15;405(6788):837-46.

RECOUVREUX DO, CARMINATTI CA, PITLOVANCIV AK, RAMBO CR, PORTO LM, ANTÔNIO RV. Cellulose biosynthesis by the beta-proteobacterium, *Chromobacterium violaceum*. *Curr Microbiol.* 2008 Nov;57(5):469-76.

SCHOLZ HC, WITTE A, TOMASO H, AL DAHOUK S, NEUBAUER H. Detection of *Chromobacterium violaceum* by multiplex PCR targeting the *prgI*, *spaO*, *invG*, and *sipB* genes. *Syst Appl Microbiol.* 2006 Jan;29(1):45-8.

STEINBUÈCHEL A, DEBZI EM, MARCHESSAULT RH, TIMM A. Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993 Jul;39(4-5):443-9.

UNLÜ M, MORGAN ME, MINDEN JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis. 1997 Oct;18(11):2071-7.

WASINGER VC, CORDWELL SJ, CERPA-POLJAK A, YAN JX, GOOLEY AA, WILKINS MR, DUNCAN MW, HARRIS R, WILLIAMS KL, HUMPHERY-SMITH I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis. 1995 Jul;16(7):1090-4.

WASINGER, V. Holistic Biology of Microorganisms: Genomics, Transcriptomics, and Proteomics. In: I. Humphery-Smith and M. Hecker (ed.). Microbial Proteomics: Functional Biology of Whole Organisms. New York: Wiley, 2006. cap. 1, p. 3-14.

ZHANG W, LI F, NIE L. Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. Microbiology. 2010 Feb;156(Pt 2):287-301.

ZHAO B, POH CL. Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. Proteomics. 2008 Feb;8(4):874-81.

CAPÍTULO I

Análise Proteômica da Resposta da *Chromobacterium violaceum* ao Arsênio

RESUMO

A *Chromobacterium violaceum* é uma β -proteobactéria amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, que possui um operon *arsRBC* de resistência ao arsênio. A poluição ambiental por esse metaloide é um problema de saúde pública em várias partes do mundo devido aos seus efeitos maléficos sobre a saúde humana, desde lesões de pele até desordens neurológicas e câncer. Os mecanismos de resistência ao arsênio são amplamente encontrados em microorganismos; as proteínas expressas pelo operon *ars* são bem estudadas, mas pouco se sabe sobre a resposta celular total que determina a resistência ao metaloide. O objetivo desse trabalho foi investigar as alterações na expressão proteica na presença de arsenito. Para isso, foi utilizada a técnica de eletroforese de fluorescência diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE). Os resultados mostraram 26 proteínas cujas abundâncias foram modificadas após o tratamento com arsenito, sendo 23 aumentadas. Os *spots* diferenciais foram submetidos à análise por MS e MS/MS. Foram identificados 10 *spots*, correspondendo a oito proteínas: três delas relacionadas à resposta ao estresse oxidativo (superóxido dismutase, glutationa-S-transferase e glutaredoxina), uma proteína ligante de DNA fita simples do sistema de reparo do DNA, duas enzimas do metabolismo de lipídeos (acil-CoA desidrogenase e enoil-CoA hidratase), uma do metabolismo de aminoácidos (3-hidroxi-isobutirato desidrogenase) e uma do metabolismo de coenzimas (riboflavina sintase). Esses resultados indicam que a resposta da bactéria ao metaloide envolve o combate ao estresse oxidativo e várias vias do metabolismo celular.

Palavras-chave: 2D-DIGE, arsênio, biorremediação, *Chromobacterium violaceum*, proteoma.

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Ciclo Biogeoquímico do Arsênio

O arsênio é um metaloide amplamente distribuído pela superfície da Terra, representando o 20º elemento mais abundante (LIÈVREMONT; BERTIN; LETT, 2009). Ele pode ocorrer em quatro estados de oxidação: As^{5+} , As^{3+} , As^0 e As^{3-} , dos quais o arsenato (As(V)) e o arsenito(As(III)) são as formas mais importantes biologicamente (ROSEN, 2002). A espécie mais abundante em determinado local depende das condições físico-químicas locais, principalmente do potencial redox e do pH, e sofre influência dos processos biológicos.

A especiação do arsênio determina sua solubilidade e mobilidade. Em ambientes aeróbicos (oxidantes), o arsenato é o mais estável, enquanto o arsenito predomina em ambientes anaeróbicos moderadamente redutores (MALIK *et al.*, 2009). Em solução aquosa, ambos aparecem como oxianions protonados, como os arsenatos AsO_4^{3-} , $HAsO_4^{2-}$, $H_2AsO_4^-$ e os arsenitos $As(OH)_3$, $As(OH)_4^-$, AsO_2OH^{2-} e AsO_3^{3-} . Em pH de 3 a 9, o arsenito se apresenta como a espécie neutra H_3AsO_3 e o arsenato pode existir negativamente carregado como $H_2AsO_4^-$ e $HAsO_4^{2-}$. As formas inorgânicas do arsênio são as mais frequentes em suprimentos de água e consideradas as mais tóxicas (WANG; ZHAO, 2009).

As formas orgânicas do arsênio são produzidas por diversos organismos e podem ser encontradas em seus produtos de degradação, em águas e solos. A arsenobetaina é a espécie mais comum de organoarsênio em animais marinhos e os arsenoaçúcares são as principais espécies de arsênio encontradas em plantas (WANG; ZHAO, 2009). Além destas, ocorrem no ambiente espécies metiladas voláteis, como ácido monometilarsenioso, ácido monometilarsônico, ácido dimetilarsenioso, trimetilarsina e óxido de trimetilarsina (BARRA *et al.*, 2000).

O ciclo biogeoquímico do metaloide envolve processos físico-químicos de oxidação-redução, precipitação-solubilização e adsorção-dessorção, bem como mecanismos biológicos, especialmente microbiológicos (LIÈVREMONT; BERTIN; LETT, 2009). O arsênio presente na atmosfera, pedosfera, hidrosfera e biosfera

pode ter origem natural ou antropogênica, como mostrado no esquema do ciclo biogeoquímico do metaloide na Figura 2.1.

Os processos naturais são os principais responsáveis pela presença do arsênio na água e solo. Sua origem natural encontra-se em mais de 200 minerais diferentes, os mais comuns são arsenopirita (FeAsS), orpimento (As_2S_3) e realgar (AsS). O desgaste de rochas é responsável pela liberação do arsênio na biosfera e hidrosfera e sua presença na atmosfera é devida a processos de erosão pelo vento, emissões vulcânicas e processos de volatilização. A concentração de arsênio em aquíferos depende das características geológicas locais e pode variar de 0,2 a 2,0 $\mu\text{g/L}$ em águas superficiais a mais de 1000 $\mu\text{g/L}$ em águas subterrâneas (LIÈVREMONT; BERTIN; LETT, 2009).

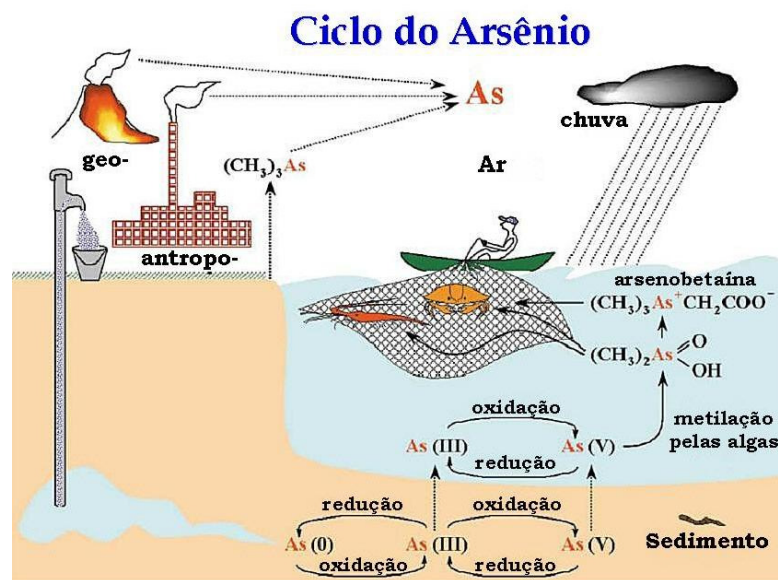


Figura 2.1: Ciclo biogeoquímico do arsênio. (Adaptado de: MUKHOPADHYAY; ROSEN, 2002)

Algumas atividades humanas podem aumentar a concentração de arsênio na água e no solo. A principal delas é o uso do conservante de madeira arseniato de cobre e cromo (CCA), que corresponde a 90% do uso do arsênio. Outras são mineração e fusão de minérios, combustão de carvão, indústria farmacêutica e de produção de vidro, inseticidas, fertilizantes, herbicidas, aditivos para ração animal e semicondutores (MATEOS *et al.*, 2006).

Uma vez liberado no ambiente, o arsênio pode ser captado e transformado por organismos aquáticos, entrando na cadeia alimentar como compostos organoarsênicos, por exemplo, a arsenobetaina (MATEOS *et al.*, 2006). Os organismos vivos desenvolveram diferentes estratégias para contrapor a toxicidade do arsênio, que vão desde a devolução do metaloide ao meio ambiente, sequestro em vacúolos intracelulares até transformações para formas menos tóxicas (TSAI; SINGH; CHEN, 2009).

Apesar da toxicidade, as diferentes formas do arsênio são metabolizadas por um grande número de micro-organismos, capazes de reduzir, oxidar e/ou metilar esses compostos. Essa atividade pode afetar a especiação e mobilidade do metaloide, como a liberação do arsênio de sedimentos ou minerais por bactérias que respiram o metaloide e volatilização por outros micro-organismos que podem metilá-lo anaerobicamente (WANG; ZHAO, 2009).

2.1.2 Toxicidade do Arsênio

A observação do efeito do arsênio sobre a saúde humana e relatos de seu uso são feitos há mais de 2000 anos. O arsênio foi o agente envenenador de escolha na Idade Média e é referido como a causa da morte de grandes nomes como Napoleão Bonaparte (os níveis de arsênio nos seus cabelos estavam mais de 1000 vezes acima dos níveis tolerados) (ROSEN, 1999).

Os compostos orgânicos de arsênio foram os primeiros agentes antimicrobianos sintetizados especificamente para o tratamento de doenças infecciosas, valendo o prêmio Nobel para Paul Ehrlich em 1908, pela síntese do salvarsan (usado no tratamento da doença do sono). Nos séculos XVIII e XIX, fórmulas como a solução de Fowler (As_2O_3) eram indicadas para uma grande variedade de doenças, de dermatoses a sífilis. A redução no uso desses compostos começou quando foram relatados as primeiras correlações entre a ingestão de arsênio e casos de câncer de pele, em 1888 (GONTIJO; BITTENCOURT, 2005).

Atualmente, a exposição ao arsênio na água potável é um problema de saúde pública que afeta várias partes do mundo (Figura 2.2). De acordo com as Normas para Qualidade da Água Potável da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2001), o

arsênio inorgânico é um carcinógeno humano e sua concentração na água potável deve ser inferior a $10 \mu\text{g/L}$, valor limite máximo também adotado pelas normas brasileiras de qualidade da água para consumo humano (BRASIL, 2004).

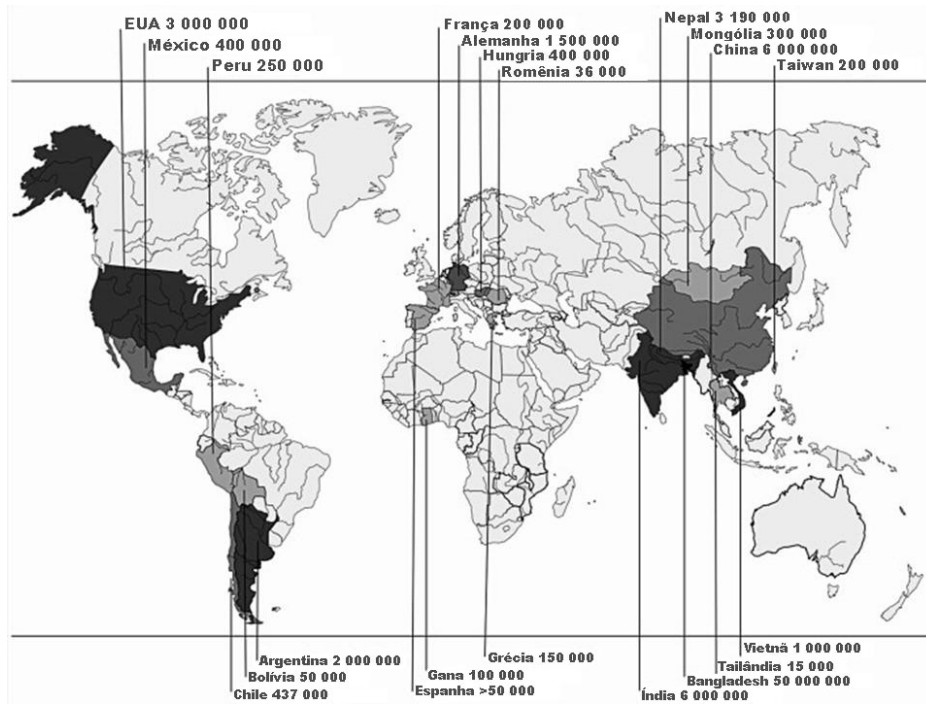


Figura 2.2: Mapa do consumo de água contendo mais de $10 \mu\text{g/L}$ de arsênio pela população mundial. As regiões mais escuras indicam um número maior de pessoas contaminadas. (Fonte: LIÈVREMONT; BERTIN; LETT, 2009)

O arsênio lidera a lista de prioridades de substâncias perigosas da Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças dos Estados Unidos (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2007). Segundo a Organização Mundial da Saúde, casos de efeitos adversos à saúde provocados pelo arsênio foram relatados em Bangladesh, China, Índia e Estados Unidos, e os níveis de arsênio na água potável encontrava-se acima dos limites estabelecidos na Argentina, Austrália, Chile, Hungria, México, Peru e Tailândia (WHO, 2001).

O pior caso de contaminação humana por arsênio ocorreu em Bangladesh, afetando milhões de pessoas - já foram relatados pelo menos 100.000 casos de lesões de pele causadas pelo arsênio. O primeiro caso foi identificado em 1983, e em 1993, foi confirmada a contaminação de origem geológica das águas subterrâneas com arsênio, com a exposição de 40 milhões de pessoas a níveis

tóxicos do metaloide (SMITH; LINGAS; RAHMAN, 2000). Apesar da adoção de tecnologias de tratamento de água, a contaminação com arsênio em águas subterrâneas em Bangladesh continua sendo um problema – entre 35 e 77 milhões de habitantes ainda estão em risco de beber água contaminada e estima-se que deverão ocorrer por volta de 200.000 mortes por câncer (KHAN *et al.*, 2009; WHO, 2001).

No Brasil, as fontes de contaminação arsênio estão relacionadas com a mineração, realizada por séculos sem a preocupação com os rejeitos da atividade, como na Serra do Navio, AP e no Quadrilátero Ferrífero, MG (BORBA; FIGUEIREDO; CAVALCANTI, 2004; SANTOS *et al.*, 2003).

A exposição humana ao arsênio é feita tipicamente por ingestão, principalmente ingestão direta de água contaminada. A ingestão de alimentos, de origem vegetal ou animal, produzidos em solo contaminado com arsênio ou cozidos em água contaminada também contribui para a exposição. As outras vias de exposição são: inalação, contato dérmico e via parental, através da prática agrícola, industrial ou médica (KHAN *et al.*, 2009).

Em humanos, o arsênio se concentra na pele, sistema nervoso e sangue e seu metabolismo envolve a redução e a metilação oxidativa do arsenato (PLATANIAS, 2009). A biodisponibilidade depende do pH e potencial redox do meio e de fatores do organismo como idade, sexo, peso, estado nutricional e genética (KHAN *et al.*, 2009).

A severidade dos efeitos está relacionada à forma química do arsênio, tempo de exposição e dose. As espécies inorgânicas são mais tóxicas que as orgânicas, sendo o arsenito mais tóxico que o arsenato (KHAN *et al.*, 2009). O arsenito é capaz de inibir mais de 200 enzimas em células humanas, pois se liga fortemente aos grupamentos tiois dos resíduos de cisteína e ao nitrogênio imidazólico dos resíduos de histidinas (MATEOS *et al.*, 2006). O arsenato é um análogo estrutural do fosfato e compete com ele em muitas reações de fosforilação, interferindo no metabolismo energético das células (LIÈVREMONT; BERTIN; LETT, 2009).

O envenenamento agudo por altas doses de arsênio é relativamente pouco comum; no entanto, longa exposição a baixas concentrações na água potável representa um considerável perigo à saúde (MALIK *et al.*, 2009). As primeiras alterações são observadas na pele – modificações na pigmentação e

hiperqueratose. Câncer é um fenômeno tardio e usualmente requer mais de 10 anos para se desenvolver (WHO, 2001).

O arsênio está associado a vários tipos de tumores sólidos incluindo câncer de pulmão, próstata, bexiga, rins e pele. A localização geográfica, fatores genéticos e níveis de exposição têm importante papel na carcinogênese associada ao arsênio. Outras doenças crônicas foram associadas à exposição ao arsênio, como diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, neuropatias, alterações de memória e da regulação hormonal (PLATANIAS, 2009).

Apesar da toxicidade, alguns compostos de arsênio ainda são usados como agentes terapêuticos, como o melarsoprol, no tratamento de estágios avançados da doença do sono (BHATTACHARJEE; ROSEN; MUKHOPADHYAY, 2009). O trióxido de arsênio apresenta efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo* e é utilizado no tratamento da leucemia promielocítica aguda. O mecanismo de ação proposto é a indução de apoptose, por elevação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e modulação do sistema tioredoxina (PLATANIAS, 2009).

2.1.3 Biorremediação do Arsênio

Atualmente, a remediação do arsênio em água e solo é feita por diversos tratamentos físico-químicos: coagulação, filtração, adsorção, precipitação com ferro ou sulfato, troca iônica e osmose reversa (TSAI; SHINGH; CHEN, 2009). Entretanto, esses processos apresentam limitações, entre elas o alto custo dos materiais, alto requerimento de energia e problemas relacionados com o descarte do sedimento (WANG; ZHAO, 2009).

As tecnologias usadas na remoção do arsênio apresentam eficiência ainda mais baixa na retirada do arsenito, que é menos móvel que o arsenato. Esse último apresenta mobilidade maior e geralmente se adsorve mais fortemente em superfícies minerais (KHAN *et al.*, 2009). Por conta dessa diferença na mobilização das formas do metaloide, é necessária uma etapa inicial de oxidação do arsenito em arsenato por oxidantes químicos (oxigênio, ozônio, peróxido de hidrogênio, hipoclorito), aumentando ainda mais os custos dos processos (LIÈVREMONT; BERTIN; LETT, 2009).

Os metais são direta ou indiretamente envolvidos em todos os aspectos do crescimento e metabolismo dos micro-organismos, como na geração de energia e aquisição de nutrientes. Essas atividades metabólicas influenciam a especiação do metal e dessa forma sua solubilidade, mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade, tendo um importante papel no ciclo desses metais na natureza (GADD, 2010).

Por isso, micro-organismos podem ser aplicados na recuperação, imobilização ou destoxificação de poluentes metálicos (GADD, 2010). A biorremediação surge como uma tecnologia economicamente viável e sem acúmulo de resíduos, atuando, portanto, com baixo impacto no ambiente (HAFERBURG; KOTHE, 2010).

Os bioprocessos para tratamento de águas e solos contaminados estão sendo desenvolvidos, mas ainda não alcançaram uma escala industrial. A duração do processo é o principal obstáculo para implantação da técnica. A implementação de bioprocessos depende de vários fatores tais como a composição do afluente, a composição microbiana, as condições operacionais e uma eventual poluição residual. A relação custo-eficácia dos bioprocessos depende também desses parâmetros (LIÈVREMONT; BERTIN; LETT, 2009).

Na natureza, os micro-organismos respondem de diferentes modos ao arsênio. Dependendo da espécie, as respostas podem ser quelação, compartimentalização, exclusão ou imobilização do metaloide. O conhecimento da fisiologia e metabolismo microbianos tem grande importância no desenvolvimento de sistemas de tratamento adequados a diferentes situações ambientais (LIÈVREMONT; BERTIN; LETT, 2009).

Na biorremediação do arsênio, são empregados bioprocessos de mobilização ou imobilização por adsorção, precipitação, biometilação, complexação e oxidação-redução, realizados por atividade microbiana (WANG; ZHAO, 2009). Os processos mais comuns empregam bactérias oxidantes ou redutoras de sulfato, ferro e manganês, resultando na precipitação do arsênio na forma de hidróxidos, sulfetos ou adsorvidos em óxidos de ferro e manganês. Outros processos envolvem a redução ou oxidação do arsênio, produzindo arsenato ou arsenito, respectivamente, que são removidos por adsorção, precipitação ou complexação com sulfeto (LIÈVREMONT; BERTIN; LETT, 2009). Pode ainda ocorrer bioacumulação de arsênio por bioadsorção direta na biomassa microbiana e seus bioprodutos (WANG; ZHAO, 2009).

A biorremediação apresenta a vantagem de remover eficientemente a forma menos móvel, o arsenito. A pré-oxidação pode ser feita pelas próprias bactérias,

como as β -proteobactérias *Gallionella ferruginea* e *Leptothrix ochracea*, que foram capazes de remover 80% do arsenito de água subterrânea, por adsorção direta e coprecipitação nos óxidos de ferro produzidos por elas (KATSOYIANNIS; ZOUBOULIS, 2004). O arsenito pode ainda ser quelado por proteínas intracelulares ou peptídeos contendo tiois, como a glutationa (GSH) e a fitoquelatina (PC), e sequestrado num vacúolo (TSAI; SINGH; CHEN, 2009).

Além dos micro-organismos, plantas podem ser usadas para estabilizar ou remover arsênio do solo. Foi mostrado que algumas pteridófitas podem acumular grandes quantidades de arsênio. É uma tecnologia de baixo custo, causa mínima perturbação ambiental e gera baixa quantidade de resíduo contaminado (WANG; ZHAO, 2009).

Entender todos os níveis moleculares e genéticos do metabolismo do arsênio contribuirá no desenvolvimento de novas abordagens de biorremediação. Estratégias de engenharia genética, evolução dirigida e estudos de metagenômica podem ser aplicados para melhorar a tolerância ao arsênio e a capacidade de acumulação de micro-organismos (TSAI; SINGH; CHEN, 2009).

2.1.4 Bioquímica do Arsênio

Alguns íons metálicos, como ferro e zinco, são importantes em muitos processos celulares, agindo como cofatores enzimáticos ou componentes estruturais. No entanto, outros metais são tóxicos em todas as concentrações, fazendo com que as células desenvolvam sistemas de resistência e destoxificação e empreguem uma variedade de mecanismos para se livrar dessas toxinas (BUSENLEHNER; PENNELLA; GIEDROC, 2003).

O arsênio entra nas células através de transportadores existentes para moléculas análogas, já que as células não desenvolveram um transportador específico (PÁEZ-ESPINO *et al.*, 2009). O arsenato é estruturalmente semelhante ao fosfato e utiliza os transportadores de fosfato (Pit e Pst em *Escherichia coli*), enquanto o arsenito é captado através de aquagliceroporinas, canais multifuncionais que transportam solutos como glicerol e ureia (GlpF em *E. coli*, Fps1p em *Saccharomyces cerevisiae*, AQP9 e AQP7 em mamíferos) (ROSEN, 2002). Uma vez

dentro da célula, o arsênio pode passar por processos de oxidação, redução e metilação, como mostrado na Figura 2.3.

A metilação do arsênio gera arsina e metil-arsênios através da redução do arsenato e subsequente adição oxidativa de grupos metila. As formas metiladas do arsênio são voláteis e prontamente liberadas no ambiente (GADD, 2010). Pouco é conhecido sobre as arsênio metilases bacterianas, há apenas um relato de ArsM de *Rhodopseudomonas palustris*, que produz compostos mono-, di- e trimetilarsênico (MESSENS; SILVER, 2006).

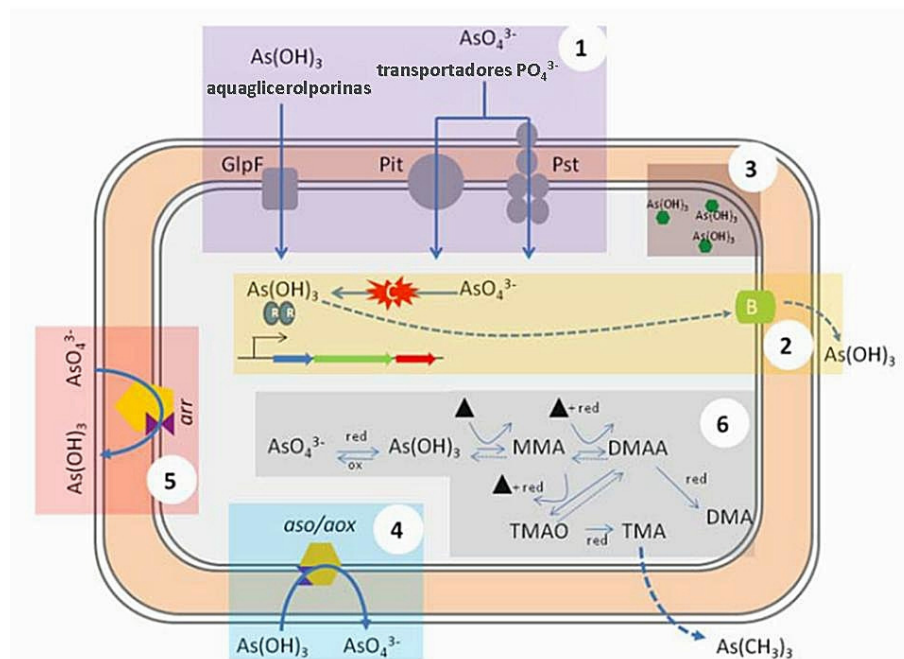


Figura 2.3: Esquema dos diversos processos microbianos envolvidos na bioquímica do arsênio. (1) Entrada do arsênio na célula; (2) redução do arsenato e expulsão do arsenito; (3) complexação do arsenito; (4) oxidação do arsenito; (5) redução dissimilatória; (6) metilação. MMA: metilarsina; DMAA: ácido dimetilarsínico; DMA: dimetilarsina; TMAO: óxido de trimetilarsina; TMA: trimetilarsina. (Adaptado de PÁEZ-ESPINO *et al.*, 2009)

As bactérias que oxidam o arsênio estão distribuídas por mais de 30 espécies, entre quimiolitotróficas (como *Agrobacterium sp.*, *Rhizobium sp.*) e heterotróficas (como *Cenibacterium arsenoxidans*, *Alcaligenes faecalis*), além de arqueias. A oxidação ocorre por ação da enzima arsenito oxidase Aso (ou Aox), membro da família das dimetilsulfóxido redutases e localizada no espaço periplasmático, em associação com a cadeia respiratória (SILVER; PHUNG, 2005). Nos microorganismos autotróficos, o arsenito serve como doador de elétrons para reduzir

oxigênio ou nitrato, produzindo energia para fixar CO₂ em material orgânico celular. Nos heterotróficos, a oxidação do arsenito é uma reação de destoxificação (LIÈVREMONT; BERTIN; LETT, 2009; WANG; ZHAO, 2009).

Do mesmo modo, a redução do arsênio pode gerar energia para o micro-organismo ou atuar como sistema de destoxificação. No primeiro caso, a chamada redução dissimilatória é parte da respiração anaeróbica em algumas bactérias (*Chrysiogenes arsenatis*, *Bacillus selenitireducens*, *Shewanella sp.*, entre outras), onde o arsenato age como acceptor final de elétrons. No segundo caso, o arsenato é reduzido a arsenito que é o substrato para uma bomba de efluxo, num sistema de destoxificação codificado pelo operon *ars* (PÁEZ-ESPINO *et al.*, 2009).

A arsenato redutase respiratória é composta por duas subunidades, ArrA e ArrB, responsáveis pela redução do arsenato e pela condução dos elétrons para a cadeia respiratória, respectivamente (MESSENS; SILVER, 2006). Em bactérias Gram-positivas, ambas são ligadas à membrana celular, nas Gram-negativas elas são periplasmáticas (SILVER; PHUNG, 2005).

O sistema de resistência ao arsênio codificado pelo operon *ars* é amplamente distribuído entre os micro-organismos – mais que o operon *trp*, de biossíntese de triptofano (SILVER; PHUNG, 2005). Os operons *ars* são encontrados em plasmídeos, mas versões cromossomais têm sido encontradas em mais de 50 organismos, entre arqueias, bactérias, leveduras e protistas (STOLZ *et al.*, 2006).

Em bactérias Gram-negativas, os operons *ars* plasmidiais codificam três proteínas: uma arsenato-redutase ArsC, uma bomba de efluxo ArsB e um regulador ArsR. Já os operons *ars* encontrados em cromossomos dessas bactérias codificam as três proteínas e duas adicionais, uma ATPase ArsA e uma metalochaperona ArsD. Nas bactérias Gram-positivas, os operons *ars* apresentam os cinco genes, *arsRABCD*, tanto nos plasmídeos quanto nos cromossomos (MUKHOPADHYAY; ROSEN, 2002).

As arsenatos redutases ArsC são pequenas enzimas citosólicas, de 13 a 16 kDa. Elas convertem o arsenato em arsenito, espécie que é expulsa da célula ou sequestrada em compartimentos intracelulares, como arsenito livre ou conjugado com GSH ou outros tiois (ROSEN, 2002).

A enzima possui uma tríade de resíduos de arginina, que inicialmente ligam o arsenato. Esse arsenato forma então uma ligação covalente com um resíduo de cisteína (Cys12) da enzima e com uma glutatona reduzida, formando um

intermediário Cys12-S-As-S-G. Uma glutaredoxina (Gtx) reduz a glutathiona e inicia uma cascata de reduções que chega até o arsenato, liberado como arsenito. Alternativamente, o arsenato ligado na Cys12 pode ser reduzido numa cascata de reduções de resíduos de cisteínas da ArsC (Cys82 e Cys89), com elétrons doados por uma tioredoxina (Trx) (MESSENS; SILVER, 2006).

Esses diferentes mecanismos de reação dividem as arsenato-redutases em três famílias que evoluíram independentemente – suas sequências de aminoácidos têm menos de 20% de similaridade (LI; KRUMHOLZ, 2007). A redutase tipo I é dependente de Gtx e foi isolada inicialmente do plasmídeo R773 de *E. coli*, sendo encontrada em bactérias Gram-negativas (LÓPEZ-MAURY; FLORENCIO; REYES, 2003).

A redutase tipo II é dependente de Trx e é encontrada em bactérias Gram-positivas, como no plasmídeo pl258 de *Staphylococcus aureus* e em *Bacillus subtilis*, e em algumas bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas sp.*. Essas redutases são relacionadas às tirosina-fosfato fosfatases de baixa massa molecular e não mostram similaridade significativa com as redutases tipo I (SILVER; PHUNG, 2005).

A terceira família é representada pela Acr2p de *S. cerevisiae*, um homodímero que apresenta o mesmo mecanismo de reação que as redutases do tipo I, dependente de Gtx. A Acr2p apresenta homologia com a família Cdc25 de proteínas fosfatases envolvidas no controle do ciclo celular (MESSENS; SILVER, 2006).

O arsenito captado do meio ambiente ou resultante da redução do arsenato pode ser transportado para fora da célula ou para o interior de um vacúolo através de transportadores específicos. A célula converte arsenato em arsenito, forma mais tóxica para a célula, antes de expulsá-lo, provavelmente porque o sistema de destoxificação do arsenito surgiu primeiro, quando a atmosfera primordial ainda não era oxidante. Apenas quando a atmosfera tornou-se oxidante surgiu a forma oxidada arsenato, e fosfatases existentes poderiam ter evoluído para a função redutase do arsenato (ROSEN, 2002).

Três famílias de transportadores de arsenito já foram descritas (ROSEN, 1999). A primeira é representada pela ArsB, presente no operon *ars* dos plasmídeos R773 de *E. coli* e pl258 de *S. aureus*. A ArsB é uma proteína integral de membrana de 45 kDa com 12 segmentos transmembrana, que usa o potencial de membrana para expulsar arsenito e antimônio da bactéria (LÓPEZ-MAURY; FLORENCIO; REYES,

2003). A ArsB pode se ligar à ArsA formando um complexo ArsAB, que funciona como uma bomba carreadora de arsenito movida a ATP. A ArsA é uma proteína de 63 kDa com atividade ATPásica, alostericamente ativada por arsenito ou antimonito (ROSEN, 1999).

A segunda família de transportadores de arsenito é representada pela YqcL de *B. subtilis* e Acr3p de *S. cerevisiae* (ROSEN, 1999). Elas são proteínas integrais de membrana de 45 kDa com 10 segmentos transmembrana, específicas para arsenito, diferente das ArsB (LÓPEZ-MAURY; FLORENCIO; REYES, 2003).

A resistência ao arsênio em eucariotos é conferida por membros do subgrupo MRP (*multidrug resistance-associated protein*) da superfamília ABC de transportadores ligados a ATPases. Essa família de transportadores pode exportar arsênio conjugado com GSH na forma $As(GS)_3$ (ROSEN, 2002). A *S. cerevisiae* possui a Ycf1p, uma bomba vacuolar acoplada a ATP que apresenta homologia com a MRP1 humana. A Ycf1p atua paralelamente ao Acr3p e não é específica, promovendo a resistência ao arsenito, antimonito e cádmio, por acumular conjugados de GSH em vacúolos (ROSEN, 1999).

O operon *ars* com cinco componentes apresenta o gene *arsA* expresso juntamente com o *arsD*, sugerindo que esses genes podem ter sido inseridos num operon *arsRBC* (LIN; WALMSLEY; ROSEN, 2006). A proteína ArsD é uma proteína citosólica de 13 kDa capaz de se ligar ao arsenito. Ela foi originalmente descrita como um repressor transcricional sensível a metais, que controlaria a máxima expressão do operon *ars* para evitar a superexpressão tóxica da ArsB (ROSEN, 1999). Estudos posteriores mostraram que a ArsD atua como uma metalochaperona, transferindo o arsenito para a ArsA e aumentando sua atividade ATPásica (LIN; WALMSLEY; ROSEN, 2006).

A regulação da expressão do operon *ars* é feita pelo repressor sensível ao arsênio ArsR, uma proteína de 13 kDa que é codificada pelo primeiro gene do operon (ROSEN, 1999). A ArsR pertence à família SmtB/ArsR de repressores sensíveis a metais que respondem a metais de transição, metais pesados e metaloides (QIN *et al.*, 2007).

A ArsR apresenta-se como um dímero que forma um motivo de ligação ao DNA e uma sequência conservada ELCVCDLC, na qual os três resíduos de cisteína se ligam ao arsenito (QIN *et al.*, 2007). O operon é reprimido quando a ArsR está especificamente ligada ao operador/promotor; a ligação do metal à proteína inibe

fortemente a interação dela com o DNA, provavelmente por provocar uma mudança conformacional (BUSENLEHNER; PENNELLA; GIEDROC, 2003).

Uma sexta proteína, ArsH, é encontrada no operon *ars* de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, transposon Tn2502 do plasmídeo pYV de *Yersinia sp.*, *P. putida*, *Shigella flexneri* e outras bactérias Gram-negativas. Embora seja necessária para a resistência ao arsênio em algumas espécies, sua função ainda não foi descoberta (PÁEZ-ESPINO *et al.*, 2009).

O efeito da expressão do operon *ars* é cumulativo: algumas espécies de micro-organismos tem múltiplos operons *ars* e genes *arsC* em tandem, o que lhes confere maior resistência ao metaloide (STOLZ *et al.*, 2006). A organização dos genes no operon *ars* também difere entre os organismos, o que altera a quantidade relativa das proteínas expressas e o perfil de resistência (AZEVEDO *et al.*, 2008).

Outras bactérias apresentam operons atípicos, como a *A. ferrooxidans* que tem um operon *arsRC* e um *arsBH* (QIN *et al.*, 2007). A cianobactéria *Synechocystis sp.* apresenta um operon *arsBHC* e uma *ArsR* expressa constitutivamente em baixos níveis, ao contrário de outras *ArsR* que são autorreguladas (LÓPEZ-MAURY; FLORENCIO; REYES, 2003). A *Comamonas sp.* possui um operon *arsRPBC* no plasmídeo CNB1, no qual o gene *arsP* codificaria uma redutase tipo II. Essa bactéria é capaz de crescer com 160 mM arsenato (ZHANG *et al.*, 2007).

2.1.5 Resistência ao Arsênio em *C. violaceum*

O genoma de *C. violaceum* revelou a presença de um operon *ars* do tipo *arsRBC* (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003). A análise dos genes desse operon mostrou que a *ArsC* apresenta similaridade com as redutases do tipo II. A *ArsR* de *C. violaceum* não contém os resíduos de cisteína conservados no domínio de ligação a metal, colocando-a no grupo de reguladores atípicos, como o presente em *A. ferrooxidans* (CAREPO *et al.*, 2004).

A funcionalidade do operon *ars* foi confirmada por Rocha e colaboradores, que demonstraram que a bactéria é capaz de crescer na presença de 1 mM de arsenato e 100 µM de arsenito (ROCHA, 2007). Essa reduzida resistência da *C. violaceum*, em

comparação com outras bactérias, foi atribuída ao arranjo dos genes no operon *arsRCB*, quando o mais comum é o arranjo *arsRBC* (ROCHA, 2007).

O gene *arsR* tem um nível basal de expressão, que foi aumentado 4 vezes com 0,125 μM de arsenito, com um pico de indução (53 vezes) a 5 μM (AZEVEDO *et al.*, 2008). Foi observado, ainda, que quando a cultura de *C. violaceum* era pré-induzida com 10 μM de arsenito, ocorreu uma tolerância maior ao tratamento com 100 μM de arsenito (AZEVEDO *et al.*, 2008; ROCHA, 2007).

A proposta desse trabalho é estudar os mecanismos de resistência ao arsênio em *C. violaceum* através de análise proteômica. Embora o mecanismo de resistência mediado pelo operon *ars* já seja bem descrito em outros organismos, pouco se conhece sobre a adaptação das diversas funções celulares à presença do metaloide.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar as alterações no proteoma da *C. violaceum* após exposição ao arsenito.

2.2.2 Objetivos Específicos

- Obter o mapa bidimensional das proteínas de *C. violaceum* na presença e ausência de arsenito;
- Avaliar a alteração no número e na quantidade relativa de proteínas expressas pelas bactérias tratadas com arsenito em relação às que não foram tratadas;
- Identificar as proteínas intracelulares que tiveram sua expressão alterada pelo arsenito;
- Determinar quais são os sistemas celulares afetados pelo tratamento com arsenito.

2.3 METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Polimorfismo do DNA (LPDNA) do Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

2.3.1 Crescimento das Bactérias e Tratamento com Arsênio

A *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, linhagem que teve o seu genoma sequenciado pelo Projeto Genoma Brasileiro (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003), foi utilizada neste trabalho. O crescimento bacteriano foi feito em meio de cultura Luria-Bertani (LB) contendo 0,1 mg/mL de ampicilina, a 28°C com agitação de 200 rpm, de acordo com Azevedo *et al.*, 2008. Uma alíquota de 100 µL do pré-inóculo foram diluídos em 10 mL de novo meio de cultura contendo 10 µM de arsenito de sódio e cultivado por 16 h. Após esse período, 500 µL desse inóculo foram diluídos em 50 mL de novo meio de cultura, em frasco de 250 mL, contendo 100 µM de arsenito de sódio e cultivado até atingir a metade da fase exponencial, o que foi verificado pela medida da densidade óptica (DO) a 720 nm (DEMOSS; HAPPEL, 1959) até $DO_{720} = 1,00$. Como controle, a bactéria foi crescida nas mesmas condições em meio de cultura sem arsenito.

2.3.2 Extração das Proteínas

As bactérias tratadas e não-tratadas com arsenito foram recolhidas por centrifugação do meio de cultura a 5000 rpm, por 10 min, a 4°C. O meio líquido foi descartado, o precipitado de bactérias foi lavado três vezes com 50 mM Tris-HCl pH 7,5 e depois ressuspendido em 1 mL de tampão de lise, constituído de ureia 42%,

tiourea 15%, CHAPS 4% , Tris-HCl 12,5 mM pH 7,5, DTT 1,5% e coquetel de inibidores de proteases (GE Healthcare).

A suspensão foi mantida no gelo e as bactérias rompidas em sonicador (Bandelin Sonoplus), em 5 ciclos de 10 s, com intervalos de mesmo tempo, em 60% da potência máxima. O lisado foi centrifugado por 40 min, a 14000 rpm, a 4°C. As proteínas solúveis foram armazenadas a -70°C até o uso.

2.3.3 Eletroforese Bidimensional

As amostras de proteínas foram quantificadas com o *kit 2D Quant* (GE Healthcare). O volume do extrato correspondente a 600 µg de proteína foi submetido à precipitação com metanol/clorofórmio. As proteínas foram dissolvidas em 340 µL de solução de reidratação, contendo ureia 42%, tiourea 15%, CHAPS 2%, solução de anfólitos (pH 3-10 NL e pH 4-7) 1%, DTT 1,5% e azul de bromofenol 0,002%. Essa solução foi usada para reidratar as tiras de gel para IEF (pH 3-10NL ou pH 4-7, 18 cm, GE Healthcare) durante 16 h, segundo protocolo da GE Healthcare.

A IEF foi feita na cuba *Ettan IPGphor* (GE-Healthcare) com a seguinte programação de voltagem: 500 V por 1 h, 1000 V por 1 h, gradiente até 10.000 V por 3 h e 10.000 V até 60 kVh. Após a IEF, as tiras de gel foram equilibradas por 15 min com tampão com SDS (ureia 36%, Tris-HCl 50 mM pH 8,8, glicerol 30%, SDS 2%) contendo agente redutor (DTT 2%), e depois por mais 15 min com o mesmo tampão contendo agente alquilante (iodoacetamida 2,5%).

Cada tira equilibrada com SDS foi, então, transferida para o topo de um gel de poliacrilamida homogêneo 15%, de 24 X 20 X 0,15 cm, e selada com 0,5% agarose em tampão de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS). O padrão de massa molecular *LMW-SDS Marker Kit* (GE Healthcare) foi também aplicado no topo do gel em um papel de filtro. A SDS-PAGE foi feita no sistema vertical *Ettan DALTsix* (GE-Healthcare) a 15°C. A eletroforese transcorreu com potência inicial de 2,5 W por gel durante 30 min, e depois 20 W por gel, até o corante azul de bromofenol alcançar o fim do gel.

2.3.4 Detecção das Proteínas

As proteínas foram coradas com azul de *Coomassie* coloidal (NEUHOFF *et al.*, 1988). Os géis foram digitalizados usando o *ImageScanner* (GE Healthcare), com resolução de 300 dpi, e as imagens foram analisadas com o *software ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare).

2.3.5 2D-DIGE

Cento e vinte microgramas de proteínas precipitadas com metanol/clorofórmio foram solubilizadas em 40 μ L de tampão de amostra contendo ureia 42%, tiourea 15%, CHAPS 4%, Tris-HCl 30 mM pH 9.

O desenho experimental está mostrado na Tabela 2.1. A reação de marcação utilizou 50 μ g de proteínas de cada uma das 3 amostras de *C. violaceum* tratada com arsenito (grupo A - A1, A2 e A3) e 3 amostras de *C. violaceum* não tratada (grupo C – C1, C2 e C3). Após adição de 400 pmol de Cy3 ou Cy5, a reação ocorreu durante 30 min, no gelo e no escuro. Como controle interno, uma mistura de todas as amostras dos grupos tratado e controle, totalizando 50 μ g de proteína, foi marcada com Cy2 como descrito anteriormente.

Tabela 2.1: Desenho experimental da marcação das amostras para a DIGE.

<i>Marcação</i>	<i>Cy3</i>	<i>Cy5</i>	<i>Cy2</i>
<i>Gel</i>			
1	C1	A1	C1+A1+C2+A2+C3+A3
2	A2	C2	C1+A1+C2+A2+C3+A3
3	C3	A3	C1+A1+C2+A2+C3+A3

A reação de marcação foi parada com a adição de 1 μ L de 10 mM lisina por 10 min. As amostras pareadas (Tabela 2.1), e diferencialmente marcadas, foram misturadas e diluídas com tampão de reidratação como descrito no item 2.3.3. A

eletroforese bidimensional foi realizada como descrito no item 2.3.3, em tiras de gel para IEF com pH de 4 a 7, todas as etapas realizadas no escuro.

As imagens dos géis foram adquiridas no *Ettan DIGEImager* (GE Healthcare), nos seguintes comprimentos de onda de excitação e emissão: 488 (laser azul) e 520 nm para o Cy2, 532 (laser verde) e 580 nm para o Cy3 e 633 (laser vermelho) e 670 nm para o Cy5. A exposição foi ajustada de modo a não saturar o sinal e a resolução foi de 100 μm .

A análise das imagens foi feita com o software *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare). A detecção dos *spots* foi feita automaticamente. Após a adição manual de *landmarks* em todos os géis, os *spots* foram emparelhados e comparados automaticamente, com posterior confirmação manual. Foram considerados *spots* diferenciais aqueles com média de razão entre os volumes de $\pm 1,3$ vezes. O teste ANOVA foi usado para avaliar a significância, com $p < 0,05$. O software *ImageQuant* (GE Healthcare) foi utilizado para gerar as imagens coloridas dos géis sobrepostos.

2.3.6 Digestão com Tripsina

Os *spots* diferenciais foram cortados dos géis preparativos (três de cada condição, corados com azul de *Coomassie* coloidal) com o robô *SpotPicking Ettan* (GE Healthcare) e armazenados em microplacas de 96 poços a -20°C . A digestão foi feita de acordo com o protocolo de Shevchenko *et al.* (2006), com algumas modificações. Os *spots* foram descorados com 3 lavagens de 200 μL de 50 mM bicarbonato de amônio/acetonitrila 1:1 (v/v), em agitador orbital. Os *spots* descorados foram incubados com 50 μL de acetonitrila por 5 min e depois secos a temperatura ambiente. Dez microlitros de solução de tripsina modificada 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Promega) foram adicionados sobre cada *spot*, que foi mantido no gelo por 40 min. Para iniciar a reação, foram adicionados 20 μL de 50 mM bicarbonato de amônio e a microplaca levada para estufa a 37°C , por 16 h.

Os peptídeos foram extraídos com 30 μL de 5% ácido fórmico/acetonitrila 1:2 (v/v), em duas lavagens de 30 min no agitador orbital, seguidos de 5 min no banho de ultrassom. A solução de peptídeos foi concentrada em liofilizador (LabConco), até

o volume aproximado de 10 μL , e dessalinizados em ZipTip (MilliPore), segundo as instruções do fabricante.

2.3.7 Espectrometria de Massas

Para identificação das proteínas por PMF, 0,5 μL da solução de peptídeos e 0,5 μL de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) 10 mg/mL foram misturados na placa metálica do espectrômetro de massas MALDI-TOF AXIMA-CRF (Shimadzu). Os espectros foram obtidos no modo positivo refletido. Os parâmetros de aquisição foram: taxa de repetição do laser de 5 Hz, 20 kV de voltagem de aceleração, intervalo de m/z de 500 a 4000 Da, 200 *shots* foram acumulados por espectro. O espectrômetro de massas foi calibrado com os peptídeos bradicinina (fragmento 1-7), ACTH (fragmento 18-39), P14R e angiotensina II (ProteoMass Peptide – Protein MALDI-MS Calibration Kit, Sigma). Os espectros foram processados com o *software* de aquisição *MALDI-MS Application* (Shimadzu). A relação de massas dos peptídeos e de seus fragmentos foi utilizada para identificação das proteínas por PMF, com o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), utilizando o genoma de *C. violaceum* depositado no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/NCBI/nr>). Os parâmetros da busca foram: outras proteobactérias como grupo taxonômico, massa monoisotópica, tolerância de 0,5 Da, uma clivagem perdida, carbamidometilação de cisteína como modificação fixa, oxidação da metionina como modificação variável.

Para identificação das proteínas por MS/MS, 0,5 μL da solução de peptídeos e 0,5 μL de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) 10 mg/mL foram misturados na placa metálica MTP AnchorChip 600/384 (Bruker Daltonics) do espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF AutoFlex III (Bruker Daltonics). Os espectros foram obtidos no modo positivo refletido. Os parâmetros de aquisição foram: taxa de repetição do laser de 50 Hz, 25 kV de voltagem de aceleração, intervalo de m/z de 1000 a 4000 Da. O espectrômetro de massas foi calibrado com o *Peptide Calibration Standard II* (Bruker Daltonics). Os espectros foram processados com o *software* de aquisição *FlexControl* (Bruker Daltonics). A relação de massas

dos peptídeos e de seus fragmentos foi utilizada para identificação das proteínas por PMF, com o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), utilizando o genoma de *C. violaceum* depositado no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/NCBI/nr>). Os parâmetros da busca foram: tipo de busca, *peptide mass fingerprint*; enzima, tripsina; modificação fixa, carbamidometilação (Cys); modificação variável, oxidação (Met); valores de massas, monoisotópica; clivagens perdidas, 1; tolerância de massa do peptídeo, 0,5 Da. A análise estatística foi determinada pela probabilidade baseada no *Mowse score* dado pelo MASCOT, sendo considerado significativo $p < 0,05$.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eletroforese 2D foi utilizada para analisar as proteínas da *C. violaceum*. O perfil eletroforético das proteínas da bactéria, realizado num gel de amplo intervalo de pH, é mostrado na Figura 2.4. Num gel 2D típico, corado com azul de *Coomassie* coloidal, foram detectados aproximadamente 300 *spots*, a maioria com pI entre 4 e 7 e MM entre 14 e 66 kDa.

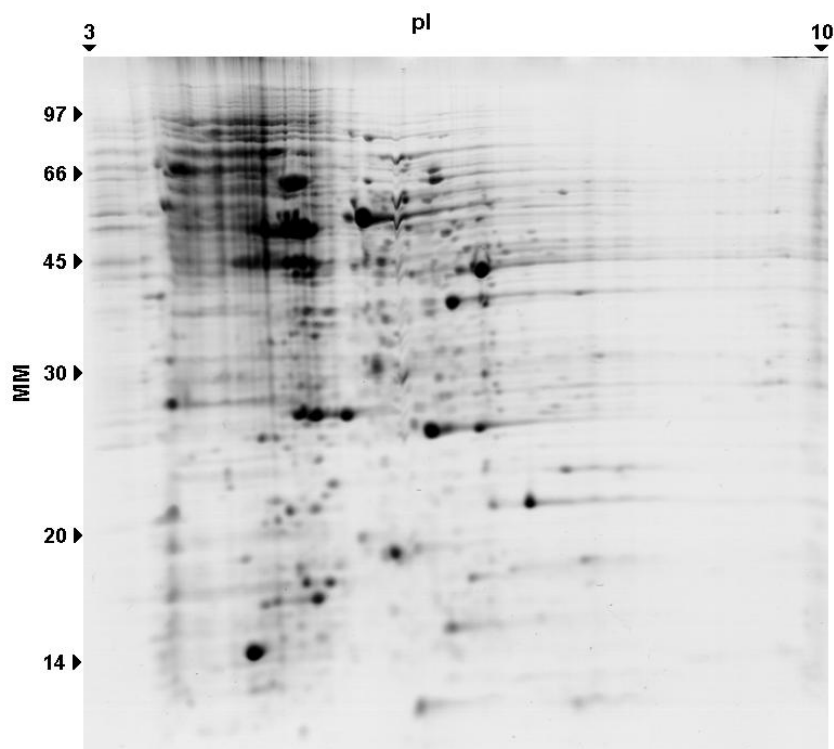


Figura 2.4: Perfil bidimensional das proteínas de *C. violaceum*. As proteínas solúveis em CHAPS foram separadas em tira de gel com intervalo de 3 a 10 NL na IEF e em gel 15% na SDS-PAGE, e coradas com azul de *Coomassie* coloidal.

A 2D-DIGE foi utilizada para analisar a expressão diferencial da *C. violaceum* em resposta ao arsênio. As proteínas da amostra controle e tratada com arsênio foram marcadas com os fluoróforos Cy3 e Cy5, conforme esquema da Tabela 1, e separadas por 2DE num mesmo gel. Para melhor separação das proteínas, foram utilizados géis com intervalo de pH de 4 a 7. A análise diferencial das imagens detectou 2348 spots comuns nos géis 1, 2 e 3 (Figura 2.5).

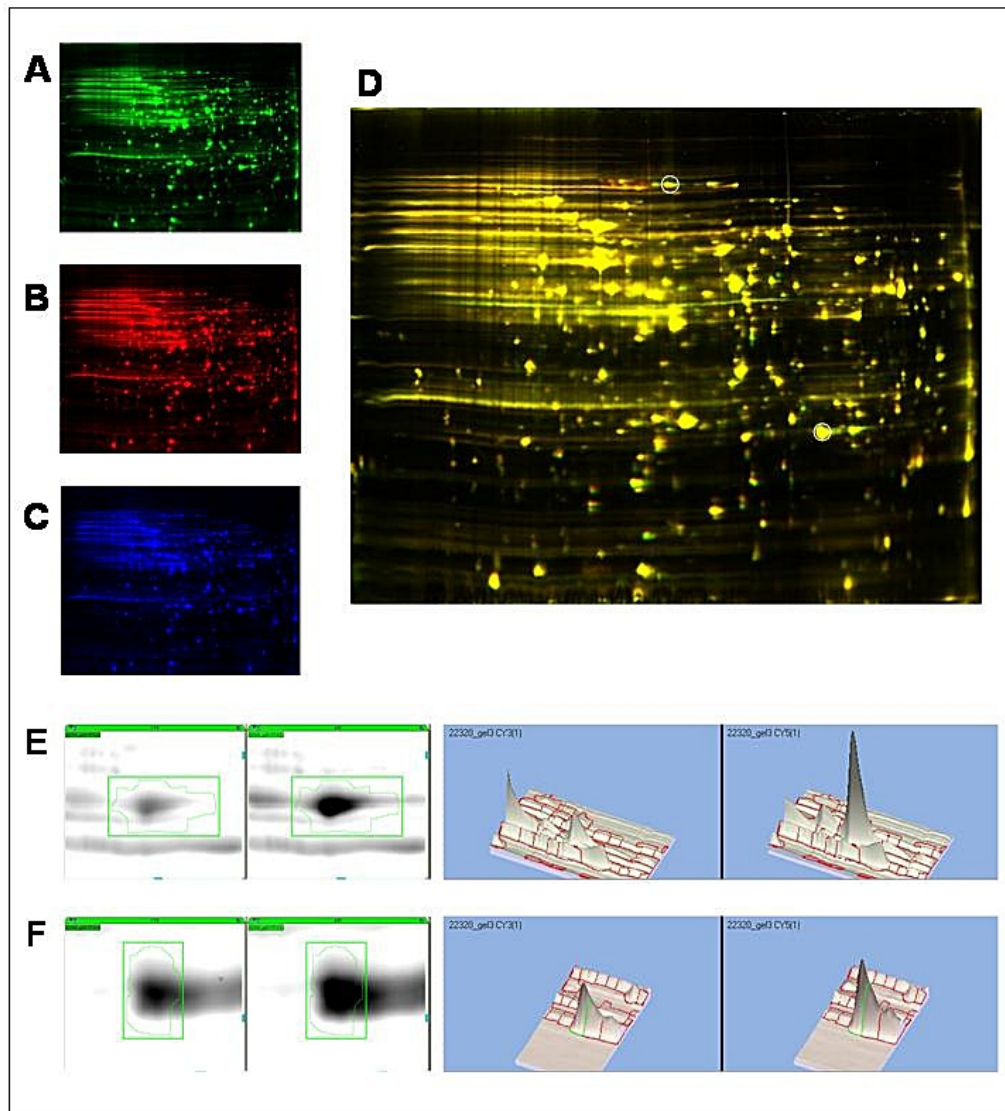


Figura 2.5: Imagens da 2D-DIGE de proteínas de *C. violaceum*. (A) Amostra tratada com arsênio marcada com Cy3; (B) amostra controle marcada com Cy5; (C) mistura de todos controles e tratados (padrão interno) marcada com Cy2, separadas em tira de gel com intervalo de 4 a 7 na IEF e em gel 15% na SDS-PAGE. (D) Sobreposição de (A) e (B), mostrando em amarelo os *spots* comuns, em verde os *spots* mais abundantes na amostra tratada com arsênio e em vermelho *spots* mais abundantes na amostra não-tratada. (E) e (F) Detalhe da análise dos *spots* diferenciais circulado em (D), com a representação tridimensional.

A análise estatística indicou 26 *spots* diferencialmente expressos, sendo 23 aumentados e 3 reduzidos, conforme mostrado na Tabela 2.2 e Figura 2.6.

Tabela 2.2: *Spots* diferenciais entre amostras de *C. violaceum* tratadas e não-tratadas com arsenito.

Match ID ^a	Ars/Ctr ^b	p ^c
70	1,38	0,017
71	1,67	0,010
72	1,90	0,007
73	1,35	0,003
74	2,40	0,001
100	-1,83	0,003
178	-1,41	0,002
488	1,41	0,016
521	1,58	0,031
552	1,35	0,014
607	-1,47	0,047
678	1,48	0,003
684	1,49	0,009
709	1,34	0,017
749	1,35	0,001
891	1,45	0,026
900	1,31	0,030
901	1,71	0,001
905	1,54	0,011
907	1,59	0,010
909	1,59	0,017
977	1,73	0,0001
1026	1,53	0,002
1450	1,32	0,015
1453	1,81	0,027
1454	1,30	0,035

a. *Match ID* = número do pareamento de *spots* atribuído pelo programa *ImageMaster Platinum*;

b. *Ars/Ctr* = razão entre os volumes relativos dos *spots* da amostra tratada com arsênio (*Ars*) e amostra controle(*Ctr*);

c = p-valor calculado pelo teste Anova.

Depois de determinados os *spots* diferenciais, foram produzidos géis preparativos, que foram comparados com o gel da DIGE (Figura 2.6). Os *spots* diferenciais foram cortados, digeridos com tripsina e submetidos à análise por MS e MS/MS. A Figura 2.7 apresenta um exemplo dos resultados obtidos por PMF. Foram identificadas oito proteínas em 10 *spots*, sendo dois identificados por PMF, quatro por MS/MS e quatro por PMF e MS/MS (Tabela 2.3).

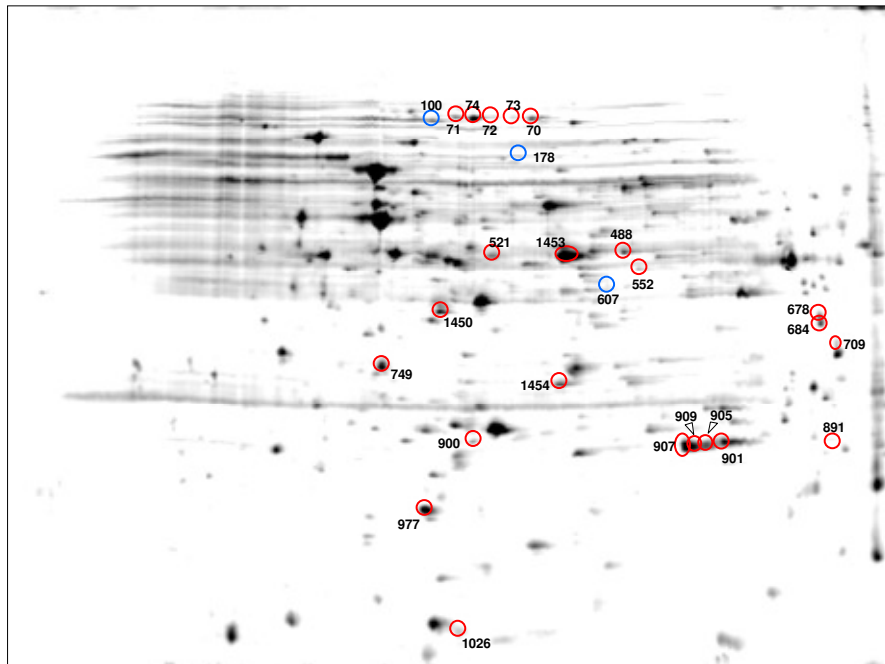


Figura 2.6: Proteínas diferenciais de *C. violaceum* em resposta ao arsênio. As proteínas circuladas em vermelho tiveram sua expressão aumentada, e as circuladas em azul, diminuída. Gel da amostra tratada com arsênio, com intervalo de pH de 4 a 7.

Os spots 907 e 909, identificados como a enzima superóxido dismutase (SOD), apresentam mesma MM e uma pequena diferença no pI, que pode ser devida a modificações pós-traducionais. O mesmo acontece com os spots 891 e 901, identificados como uma proteína da família das glutathione-S-transferases (GST).

O spot 749 teve duas proteínas com *score* significativo, uma glutaredoxina (Grx) de *Psychromonas sp.* e uma proteína da família das peroxiredoxinas/glutaredoxinas de *C. violaceum*. Esse resultado não é inesperado, considerando que foi possível sequenciar apenas um fragmento na MS e que a identidade entre as sequências dessas proteínas é de 62%.

Tabela 2.3: Proteínas de *C. violaceum* diferencialmente expressas em resposta ao arsênio identificadas por MS.

SPOT	RefSeq^a	PROTEÍNA	MM / pI teóricos	SCORE^b	Identificação
<i>Replicação, recombinação e reparo</i>					
977	NP_901559	Proteína de ligação a DNA fita simples	17,11 / 5,25	94	PMF
<i>Modificação pós-traducional, turnover proteína, chaperonas</i>					
749	NP_901706	Proteína da família Peroxiredoxina/Glutaredoxina	26,97 / 5,09	68	MS/MS
891	NP_899959	Proteína da família Glutathione S-transferase	22,60 / 5,91	248	MS/MS
901	NP_899959	Proteína da família Glutathione S-transferase	22,60 / 5,91	89	PMF + MS/MS
<i>Metabolismo e transporte de íons inorgânicos</i>					
907	NP_902174	Superoxide dismutase	21,63 / 5,87	77	PMF + MS/MS
909	NP_902174	Superoxide dismutase	21,63 / 5,87	148	MS/MS
<i>Metabolismo e transporte de coenzimas</i>					
900	NP_902057	Subunidade alfa da riboflavina sintase	22,28 / 5,34	107	PMF
<i>Metabolismo e transporte de lipídeos</i>					
488	NP_901754	Acil-CoA desidrogenase	42,00 / 5,64	85	PMF + MS/MS
1454	NP_901753	Enoil-CoA hidratase	29,40 / 6,34	88	PMF + MS/MS
<i>Metabolismo e transporte de aminoácidos</i>					
709	NP_901751	3-Hidroxi-isobutirato desidrogenase	30,10 / 6,24	68	MS/MS

a. RefSeq = Número de acesso do banco de dados NCBI.

b. Score = *Mowse score* atribuído pelo MASCOT.

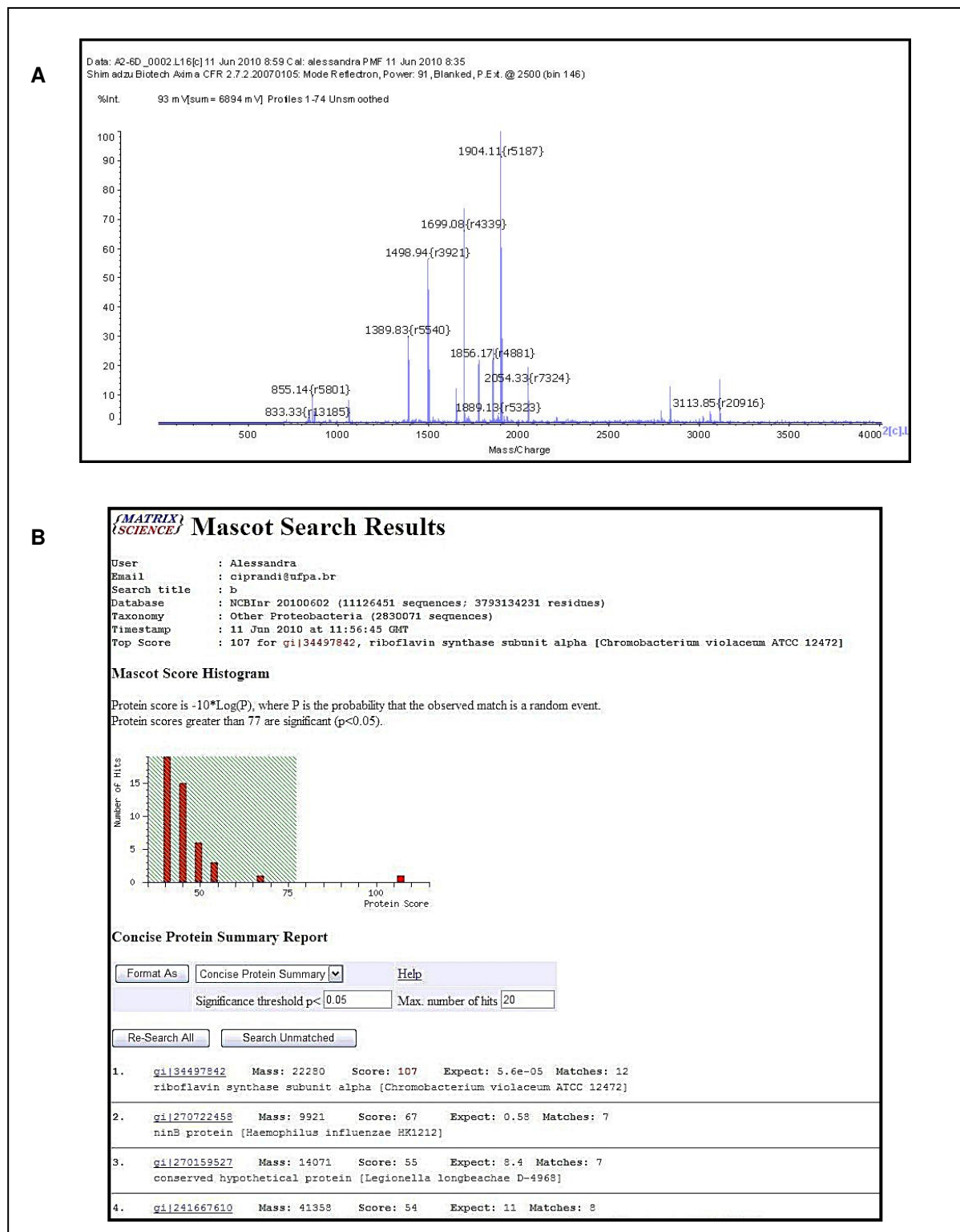


Figura 2.7: Espectro de massas dos peptídeos trípticos do *spot* 900 (A), e o resultado do PMF apresentado pelo MASCOT (B).

Essas três proteínas, SOD, GST e Grx estão diretamente envolvidas na resposta celular ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre com a elevação das EROs, que podem causar peroxidação de lipídeos, danos ao DNA e oxidação de proteínas (KOHÁRYOVÁ; KOLÁROVÁ, 2008). A SOD converte o íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é reduzido a H_2O pelas peroxidases, como as peroxiredoxinas (Prx) dependentes do sistema tioredoxina (RABILLOUD *et al.*, 2002).

A indução dessas enzimas está de acordo com a geração de ERO provocada pelo arsênio dentro da célula e já foi reportada em outras bactérias, como em *Comamonas sp.* (ZHANG *et al.*, 2007), *Herminiimonas arsenicoxydans* (CLEISS-ARNOLD *et al.*, 2010) e *Leptospirillum ferriphilum* (LI; KRUMHOLZ, 2010). O arsênio perturba o equilíbrio redox da célula por mecanismos como a ativação da NADPH oxidase, a inibição da glutathiona-peroxidase e a ligação a grupos tiois de proteínas regulatórias (DAI *et al.*, 1999; PLATANIAS, 2009).

Para manter o ambiente interno redutor, as células contam com o sistema glutaredoxina, no qual os elétrons do NADPH são utilizados para reduzir proteínas oxidadas através dos intermediários Grx ou GSH (VLAMIS-GARDIKAS, 2008). As GSTs são enzimas que catalisam a conjugação da GSH com agentes tóxicos e participam da regeneração de proteínas S-tioladas por estresse oxidativo (SHEEHAN *et al.*, 2001). Elas são classificadas pela homologia na parte N-terminal e nos resíduos conservados do sítio ativo (ALLOCATI *et al.*, 2009).

Uma proteína da família GST de *C. violaceum* teve sua expressão aumentada pelo tratamento com arsenito. A GST CV_0289 pertence à classe beta, específica de bactérias, apresentando 49% identidade com a GST de *Proteus mirabilis*, sequência modelo da classe. Essa enzima pode auxiliar na resposta ao estresse oxidativo provocado pelo arsênio.

Ainda para contrapor o estresse causado pelo arsênio, a *C. violaceum* aumentou a expressão de uma proteína ligante de DNA fita simples (*single-stranded DNA-binding protein*, SSB), a CV_1889. As SSBs tem várias funções durante a replicação, o reparo e a recombinação do DNA; elas são essenciais para o reparo do DNA por excisão de nucleotídeos e ressíntese da fita e na resposta SOS (MEYER; LAINE, 1990). A CV_1889 faz parte das vias de reparo de DNA por recombinação e SOS da *C. violaceum* (DUARTE *et al.*, 2004), e o aumento na quantidade dessa

proteína pode ser importante para auxiliar no controle dos danos causados ao DNA pelo estresse oxidativo devido ao arsênio.

Além do equilíbrio redox, do metabolismo de enxofre (GSH, Grx) e da integridade do material genético, os efeitos do arsênio atingem vias metabólicas importantes para a manutenção da célula. Duas enzimas do metabolismo de lipídeos, acil-CoA desidrogenase (ACAD) e enoil-CoA hidratase (ECAH), uma do metabolismo de aminoácidos, 3-hidroxi-isobutirato desidrogenase (3-HIBADH), e uma do metabolismo de coenzimas, a riboflavina sintase, tiveram sua expressão aumentada em resposta ao arsênio.

O metabolismo de ácidos graxos sofreu uma ativação após o tratamento da *C. violaceum* com arsênio. Duas enzimas da β -oxidação tiveram sua expressão aumentada, a ACAD e a ECAH. Elas catalisam, respectivamente, o primeiro e segundo passos do ciclo de reações que liberam acetil-CoA e elétrons, carregados pelas coenzimas NADH e FADH₂. Esses compostos são encaminhados para oxidação no ciclo do ácido cítrico ou do glicoxalato e para a cadeia transportadora de elétrons para geração de energia.

A atividade das enzimas da β -oxidação é baixa na ausência de ácidos graxos e seus genes são regulados pelo fator transcricional FadR, pelo cAMP, por acil-CoA de cadeia longa e pela fase do ciclo celular (DIRUSSO; BLACK; WEIMAR, 1999). Podem existir outros fatores que influenciam a expressão das enzimas, como no caso do envolvimento da ECAH com a tolerância ao estresse salino em *E. coli* (KAPARDAR *et al.*, 2010) e com a síntese de PHA em *Ralstonia eutropha* (PEPLINSKI *et al.*, 2010).

A resposta dessas enzimas ao arsênio pode ser devida a um ajuste metabólico ao desvio do NADH e NADPH destinados a cadeia transportadora de elétrons para o reparo de proteínas e nucleotídeos oxidados. A bactéria busca ativar vias que liberam elétrons para as reações de reparo e tenta manter sua geração de energia.

A riboflavina sintase catalisa o passo final da síntese da riboflavina (vitamina B2), cujos precursores são GTP e ribulose-5-fosfato. A riboflavina é precursor das coenzimas FMN e FAD, que compõe flavoproteínas essenciais para o metabolismo energético, reações de oxirredução e vias biossintéticas, inclusive da violaceína (BALIBAR; WALSH, 2006). Já foi mostrado que a via de biossíntese de riboflavina responde ao estresse por superóxido (VITRESCHAK *et al.*, 2002), ao ferro, cobre, zinco e à depleção de fosfato (KNEGT *et al.*, 2008). Em *C. violaceum*, a expressão

da subunidade alfa da riboflavina sintase foi aumentada por influência do arsênio ou do estresse oxidativo provocado por ele, e pode estar atendendo à necessidade de coenzimas para reações de oxirredução. A via de síntese da riboflavina também consome ribulose-5-fosfato, que é formado no ciclo das pentoses-fosfato para geração de NADPH.

A *C. violaceum* tratada com arsenito aumentou sua produção de 3-HIBADH, uma enzima chave no metabolismo da valina que catalisa a oxidação reversível de 3-hidroxi-isobutirato a metilmalonato semialdeído. Essa reação dependente de NADP e pode ter como substrato a L-serina, D-treonina e outros derivados de 3-hidroxiácidos (YAO *et al.*, 2010). Sua função pode ser entendida em conjunto com as outras enzimas de vias oxidativas que tiveram sua expressão aumentada, sugerindo que há um esforço global do metabolismo bacteriano para suprir as reações redox de reparo com equivalentes redutores obtidos da oxidação de aminoácidos e ácidos graxos (Figura 2.8).

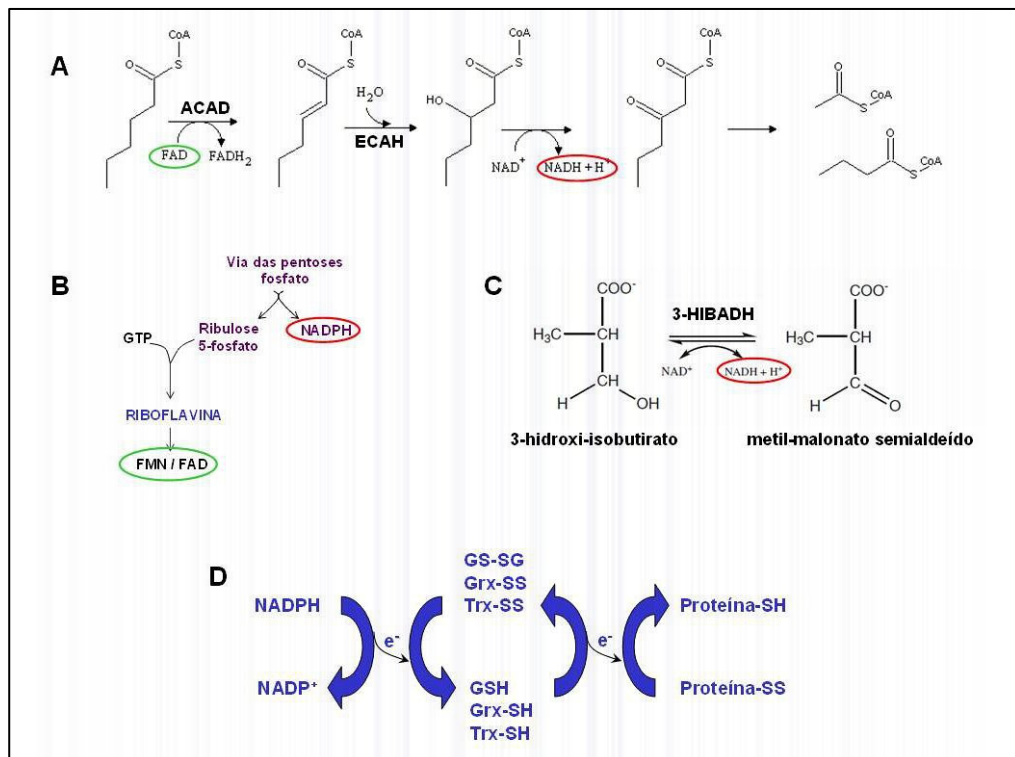


Figura 2.8: Alterações metabólicas induzidas pelo arsenito em *C. violaceum*. A exposição ao arsenito induziu o aumento da expressão de enzimas da beta oxidação dos ácidos graxos (A), biossíntese de riboflavina(B) e metabolismo de aminoácidos (C), resultando no aumento da produção de equivalentes redutores (em vermelho) e coenzimas (em verde). (D) Esquema da resposta celular à oxidação de proteínas devido ao estresse oxidativo.

2.5 CONCLUSÕES

A *C. violaceum* altera sua expressão proteica em resposta ao arsenito. Essa resposta foi caracterizada por análise proteômica, que mostrou 26 proteínas alteradas e identificou oito delas. Três foram proteínas de resposta ao estresse oxidativo: superóxido dismutase, glutathione-S-transferase e glutaredoxina. Uma proteína ligante de DNA fita simples do sistema de reparo do DNA foi mais expressa em resposta ao arsenito, assim como duas enzimas do metabolismo de lipídeos (acil-CoA desidrogenase e enoil-CoA hidratase), uma do metabolismo de aminoácidos (3-hidroxi-isobutirato desidrogenase) e uma do metabolismo de coenzimas (riboflavina sintase).

Os resultados mostraram que a resposta da bactéria ao arsênio envolve várias outras proteínas além daquelas expressas pelo operon *ars* e que estão relacionadas com diferentes processos celulares, como metabolismo energético e estresse oxidativo. Esses resultados sugerem que a resposta da bactéria ao metaloide envolve primariamente o combate ao estresse oxidativo.

Este é o primeiro estudo proteômico da resistência da *C. violaceum* a metais e metaloides e mostra a complexidade da adaptação da bactéria a uma condição de estresse.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Department of Health and Human Services, Public Health Service Public Health Statement: Arsenic. Atlanta, 2007, GA: U.S.; 2000. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/>

ALLOCATI N, FEDERICI L, MASULLI M, DI ILIO C. Glutathione transferases in bacteria. FEBS J. 2009 Jan;276(1):58-75.

AZEVEDO JS, SILVA-ROCHA R, SILVA A, PEIXE CAREPO MS, CRUZ SCHNEIDER MP. Gene expression of the arsenic resistance operon in *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. Can J Microbiol. 2008 Feb;54(2):137-42.

BALIBAR CJ, WALSH CT. In vitro biosynthesis of violacein from L-tryptophan by the enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*. Biochemistry. 2006 Dec 26;45(51):15444-57.

BARRA CM, SANTELLI RE, ABRÃO JJ, DE LA GUARDIA M. Especificação de arsênio - uma revisão. Química Nova, 2000 Jan;23(1):58-70.

BHATTACHARJEE H, ROSEN BP, MUKHOPADHYAY R. Aquaglyceroporins and metalloids transport: implications in human diseases. Handb Exp Pharmacol. 2009;(190):309-25.

BORBA RP, FIGUEIREDO BR, CAVALCANTI JA. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). REM: Rev. Esc. Minas. 2004;57(1):45-51.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.º 518, de 25 de março de 2004. Norma de qualidade da água para consumo humano. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 mar. 2004.

BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003;100(20):11660-5.

BUSENLEHNER LS, PENNELLA MA, GIEDROC DP. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2003 Jun; 27(2-3):131-43.

CAREPO MS, AZEVEDO JS, PORTO JI, BENTES-SOUSA AR, BATISTA JDA, SILVA AL, SCHNEIDER MP. Identification of *Chromobacterium violaceum* genes with potential biotechnological application in environmental detoxification. Genet Mol Res. 2004 Mar 31;3(1):181-94.

CLEISS-ARNOLD J, KOECHLER S, PROUX C, FARDEAU ML, DILLIES MA, COPPEE JY, ARSÈNE-PLOETZE F, BERTIN PN. Temporal transcriptomic response during arsenic stress in *Herminiimonas arsenicoxydans*. BMC Genomics. 2010 Dec 17;11:709.

DAI, J., WEINBERG, R. S., WAXMAN, S., AND JING, Y. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. Blood, 93: 268–277, 1999.

DEMOSS RD, HAPPEL ME. Nutritional requirements of *Chromobacterium violaceum*. J Bacteriol. 1959 Feb;77(2):137-41.

DIRUSSO CC, BLACK PN, WEIMAR JD. Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. Prog Lipid Res. 1999 Mar;38(2):129-97.

DUARTE FT, CARVALHO FM, BEZERRA E SILVA U, SCORTECCI KC, BLAHA CA, AGNEZ-LIMA LF, BATISTUZZO DE MEDEIROS SR. DNA repair in *Chromobacterium violaceum*. Genet Mol Res. 2004 Mar 31;3(1):167-80.

GADD GM. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology. 2010 Mar;156(Pt 3):609-43.

GONTIJO B, BITTENCOURT F. Arsênio: uma revisão histórica. An. Bras. Dermatol. 2005 Feb;80(1):81-5.

HAFERBURG G, KOTHE E. Metallomics: lessons for metalliferous soil remediation. Appl Microbiol Biotechnol. 2010 Jul;87(4):1271-80.

KAPARDAR RK, RANJAN R, GROVER A, PURI M, SHARMA R. Identification and characterization of genes conferring salt tolerance to *Escherichia coli* from pond water metagenome. Bioresour Technol. 2010 Jun;101(11):3917-24.

KATSOYIANNIS IA, ZOUBOULIS AI. Application of biological processes for the removal of arsenic from groundwaters. Water Res. 2004 Jan;38(1):17-26.

KHAN NI, OWENS G, BRUCE D, NAIDU R. Human arsenic exposure and risk assessment at the landscape level: a review. Environ Geochem Health. 2009 Apr;31 Suppl 1:143-66.

KNEGT FH, MELLO LV, REIS FC, SANTOS MT, VICENTINI R, FERRAZ LF, OTTOBONI LM. *ribB* and *ribBA* genes from *Acidithiobacillus ferrooxidans*: expression levels under different growth conditions and phylogenetic analysis. Res Microbiol. 2008 Jul-Aug;159(6):423-31.

KOHÁRYOVÁ M, KOLÁROVÁ M. Oxidative stress and thioredoxin system. Gen Physiol Biophys. 2008 Jun;27(2):71-84.

- LI B, LIN J, MI S, LIN J. Arsenic resistance operon structure in *Leptospirillum ferriphilum* and proteomic response to arsenic stress. *Bioresour Technol.* 2010 Dec;101(24):9811-4.
- LI X, KRUMHOLZ LR. Regulation of arsenate resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* G20 by an arsRBCC operon and an arsC gene. *J Bacteriol.* 2007 May;189(10):3705-11.
- LIÈVREMONT D, BERTIN PN, LETT MC. Arsenic in contaminated waters: biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie.* 2009 Oct;91(10):1229-37.
- LIN YF, WALMSLEY AR, ROSEN BP. An arsenic metallochaperone for an arsenic detoxification pump. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Oct 17;103(42):15617-22.
- LÓPEZ-MAURY L, FLORENCIO FJ, REYES JC. Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC 6803. *J Bacteriol.* 2003 Sep;185(18):5363-71.
- MALIK AH, KHAN ZM, MAHMOOD Q, NASREEN S, BHATTI ZA. Perspectives of low cost arsenic remediation of drinking water in Pakistan and other countries. *J Hazard Mater.* 2009 Aug 30;168(1):1-12.
- MATEOS LM, ORDÓÑEZ E, LETEK M, GIL JA. *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. *Int Microbiol.* 2006 Sep;9(3):207-15.
- MESSENS J, SILVER S. Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *J Mol Biol.* 2006 Sep 8;362(1):1-17.
- MEYER RR, LAINE PS. The single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 1990 Dec;54(4):342-80.
- MUKHOPADHYAY R, ROSEN BP. Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ Health Perspect.* 2002 Oct;110 Suppl 5:745-8.
- NEUHOFF V, AROLD N, TAUBE D, EHRHARDT W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 1988 Jun;9(6):255-62.
- O'FARRELL PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975 May 25;250(10):4007-21.
- PÁEZ-ESPINO D, TAMAMES J, DE LORENZO V, CÁNOVAS D. Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals.* 2009 Feb;22(1):117-30.

PEPLINSKI K, EHRENREICH A, DÖRING C, BÖMEKE M, STEINBÜCHEL A. Investigations on the microbial catabolism of the organic sulfur compounds TDP and DTDP in *Ralstonia eutropha* H16 employing DNA microarrays. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010 Nov;88(5):1145-59.

PLATANIAS LC. Biological responses to arsenic compounds. *J Biol Chem.* 2009 Jul 10;284(28):18583-7.

QIN J, FU HL, YE J, BENCZE KZ, STEMLER TL, RAWLINGS DE, ROSEN BP. Convergent evolution of a new arsenic binding site in the ArsR/SmtB family of metalloregulators. *J Biol Chem.* 2007 Nov 23;282(47):34346-55.

RABILLOUD T, HELLER M, GASNIER F, LUCHE S, REY C, AEBERSOLD R, BENAHMED M, LOUISOT P, LUNARDI J. Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site. *J Biol Chem.* 2002 May 31;277(22):19396-401.

ROCHA, RS. Caracterização molecular e funcional do operon de resistência ao arsênio *arsRCB* de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. 2007. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém.

ROSEN BP. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* 2002 Oct 2;529(1):86-92.

ROSEN BP. Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol.* 1999 May;7(5):207-12.

SANTOS ECO, JESUS IM, BRABO ES, FAYAL KF, SÁ FILHO GC, LIMA MO, MIRANDA AMM, MASCARENHAS AS, CANTO DE SÁ LL, SILVA AP, CÂMARA VM. Exposição ao mercúrio e ao arsênio em Estados da Amazônia: síntese dos estudos do Instituto Evandro Chagas/FUNASA. *Rev. Bras. Epidemiol.* 2003; 6(2): 171-85.

SHEEHAN D, MEADE G, FOLEY VM, DOWD CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 2001 Nov 15;360(Pt 1):1-16.

SHEVCHENKO A, TOMAS H, HAVLIS J, OLSEN JV, MANN M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc.* 2006;1(6):2856-60.

SILVER S, PHUNG LT. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Feb;71(2):599-608.

SMITH AH, LINGAS EO, RAHMAN M. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bulletin of the World Health Organization.* 2000; 78 (9): 1093-1103.

STOLZ JF, BASU P, SANTINI JM, OREMLAND RS. Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60:107-30.

TSAI SL, SINGH S, CHEN W. Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. *Curr Opin Biotechnol.* 2009 Dec;20(6):659-67.

VITRESCHAK AG, RODIONOV DA, MIRONOV AA, GELFAND MS. Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jul 15;30(14):3141-51.

VLAMIS-GARDIKAS A. The multiple functions of the thiol-based electron flow pathways of *Escherichia coli*: Eternal concepts revisited. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Nov;1780(11):1170-200.

WANG S, ZHAO X. On the potential of biological treatment for arsenic contaminated soils and groundwater. *J Environ Manage.* 2009 Jun;90(8):2367-76.

WHO. Arsenic in drinking water. Fact Sheet N. 210, 2001. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.who.int/inf-fs/en/fact210.html>.

YAO T, XU L, YING H, HUANG H, YAN M. The catalytic property of 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *Bacillus cereus* on 3-hydroxypropionate. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010 Mar;160(3):694-703.

ZHANG Y, MA YF, QI SW, MENG B, CHAUDHRY MT, LIU SQ, LIU SJ. Responses to arsenate stress by *Comamonas* sp. strain CNB-1 at genetic and proteomic levels. *Microbiology.* 2007 Nov;153(Pt 11):3713-21.

CAPÍTULO II

Análise do Proteoma Extracelular de *Chromobacterium violaceum*

RESUMO

A *C. violaceum* é uma β -proteobactéria encontrada no ambiente de regiões tropicais que pode potencialmente produzir vários compostos úteis na detoxificação ambiental, biomineração, controle de pragas, e terapêutica. Essa bactéria é um patógeno oportunista para animais e humanos e causa uma infecção que acomete vários tecidos e evolui rapidamente para óbito. Os dados do genoma da *C. violaceum* mostraram possíveis candidatos a fatores de virulência, mas ainda esses ainda não foram caracterizados molecularmente. Uma importante forma de interação das bactérias com o ambiente é a secreção de proteínas. As proteínas secretadas são fundamentais na aquisição de nutrientes, na proteção contra estresses e no estabelecimento de doença, atuando nos processos de adesão celular, colonização e modulação das respostas celulares do hospedeiro. Este trabalho teve como objetivo analisar o exoproteoma de *C. violaceum*, para obter um maior entendimento sobre seus mecanismos de patogenicidade e sua adaptabilidade a condições ambientais variáveis. A ferramenta de bioinformática SurfG+ foi utilizada para prever a localização celular das proteínas codificadas pelo genoma de *C. violaceum*, sendo identificadas 433 proteínas extracelulares, a maioria de função desconhecida. As proteínas secretadas pela bactéria *C. violaceum* foram analisadas por 2DE. O perfil de proteínas obtido mostrou 338 spots, 84 foram identificados por MS/MS como 33 proteínas diferentes. Entre elas estavam proteínas que atuam no transporte e captação de aminoácidos e carboidratos e na proteção contra estresse oxidativo. Foram identificadas proteínas que auxiliam na patogênese, como proteínas flagelares, metalopeptidases, colagenase e toxinas, e outras que podem ser utilizadas em bioprocessos, como a quitinase e a quitosanase. Várias proteínas hipotéticas foram identificadas, mostrando o modo único como a *C. violaceum* se adapta aos diferentes ambientes onde vive.

Palavras-chave: bactéria Gram-negativa, *Chromobacterium violaceum*, exoproteoma, proteína extracelular, secretoma.

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Importância das Proteínas Secretadas por Bactérias

A secreção de proteínas é uma das principais formas de interação das bactérias com seu ambiente. As proteínas lançadas no meio extracelular apresentam várias funções, atuando na sobrevivência celular, na proteção contra estresses e na colonização de hospedeiros (KAAKOUSH *et al.*, 2010).

Entre as proteínas importantes para a sobrevivência do micro-organismo estão aquelas envolvidas na aquisição de nutrientes, como transportadores e enzimas degradativas – proteínas com potencial uso biotecnológico. Outras proteínas têm papel essencial no desenvolvimento de associações, desde biofilmes até relações mutualistas ou patogênicas com outros organismos hospedeiros maiores (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009).

Uma atenção especial tem sido dada para proteínas secretadas que atuam no estabelecimento de doença, nos processos de adesão celular, colonização e modulação das respostas celulares do hospedeiro (VAN ULSEN; TOMMASSEN, 2006). O estudo dessas proteínas contribui para o entendimento da patogênese e na descoberta de novos alvos terapêuticos.

3.1.2 Estrutura do Envelope Celular Bacteriano

As bactérias são cercadas por um ambiente imprevisível e frequentemente hostil. Para sobreviver, elas desenvolveram envelopes celulares complexos que as protegem, permitem a passagem seletiva de nutrientes para dentro e produtos de excreção para fora da célula, e agem como superfície para reações metabólicas (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010).

As bactérias Gram-negativas e Gram-positivas apresentam diferenças na estrutura do envelope celular que determinam a utilização de diferentes vias de transporte de proteínas para fora da célula. As bactérias Gram-positivas apresentam

uma membrana citoplasmática e uma espessa parede celular de peptideoglicano sobreposta a ela. Já nas Gram-negativas, a membrana citoplasmática é protegida por uma camada fina de peptideoglicano e por uma membrana lipídica externa sobreposta a este. Desvaux e cols. (2009) sugeriram que os termos bactéria *monodérmica* (uma bicamada lipídica) e bactéria *didérmica* (duas bicamadas lipídicas) seriam mais apropriados que *Gram-positivas* e *Gram-negativas*. Um esquema dos envelopes celulares de Gram-positivas e Gram-negativas é mostrado na Figura 3.1.

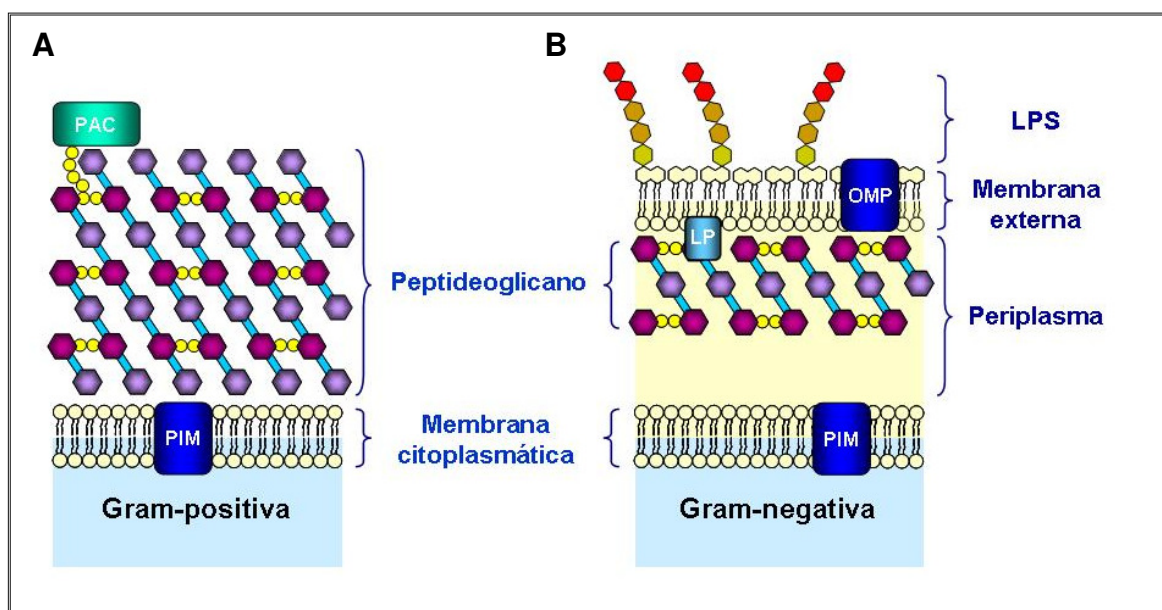


Figura 3.1: Esquema dos envelopes celulares de bactérias Gram-positivas (A) e Gram-negativas (B). PIM: proteína integral de membrana; PAC: proteína ancorada covalentemente; OMP: proteína de membrana externa; LPS: lipopolissacarídeo; LP: lipoproteína. Adaptado de SILHAVY; KAHNE; WALKER (2010).

O envelope celular das bactérias Gram-negativas é composto por três camadas: a membrana externa, a parede celular de peptideoglicano e a membrana citoplasmática ou interna. As membranas interna e externa delimitam um compartimento aquoso chamado periplasma, que abriga enzimas degradativas, chaperonas e proteínas ligadoras de açúcares e aminoácidos (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010).

A membrana externa serve como uma barreira protetora e é constituída de uma bicamada lipídica composta por fosfolípídeos na face interna e lipopolissacarídeos

(LPS) na face externa, além de lipoproteínas ancoradas na face interna e proteínas transmembrana de conformação β -barril (OMP). A parede celular de peptidoglicano rígida é presa na membrana externa pela lipoproteína mureína. A membrana interna, uma bicamada fosfolipídica, concentra as funções de produção de energia, biossíntese de lipídeos, secreção de proteínas e transporte (DÍAZ-MEJÍA *et al.*, 2009; SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010).

3.1.3 Sistemas de Transporte em Bactérias Gram-negativas

O transporte ativo através de uma bicamada lipídica é denominado translocação. O termo exportação é utilizado para a translocação da molécula para fora do citoplasma, enquanto a secreção ocorre quando a molécula atinge o exterior da célula. Em bactérias Gram-positivas, secreção e exportação são sinônimos, mas em Gram-negativas a exportação leva a proteína somente até o periplasma, e a secreção requer uma segunda translocação através da membrana externa (DESVAUX *et al.*, 2009).

Em bactérias Gram-negativas, as proteínas podem ser secretadas por seis classes de sistemas de transporte, designados como sistema de secreção tipo I (SST1) a VI (SST6) e esquematizados na Figura 3.2. O transporte pelos sistemas tipos I, III, IV e VI levam a proteína do citosol até o exterior em uma etapa, enquanto os sistemas tipo II e V são processos em dois passos, pois fazem a translocação somente através da membrana externa, deixando a exportação da proteína para o periplasma a cargo das vias de secreção universais Sec e Tat (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009). Essas vias de secreção podem não estar presentes no mesmo organismo, e a contribuição de cada via no transporte de proteínas varia entre os organismos (DESVAUX *et al.*, 2010).

O SST1 exporta proteínas não-enoveladas que apresentam um sinal de secreção não clivável na extremidade C-terminal (BLEVES *et al.*, 2010). O sistema é constituído por um transportador tipo ABC (*ATP-binding cassette*) na membrana interna, uma proteína de membrana externa OMF (*Outer Membrane Factor*, como a TolC) e uma proteína de fusão periplasmática MFP (*Membrane Fusion Protein*) (YEN; BHATTACHARYA; STATHOPOULOS, 2008). Os transportadores ABC atuam

no reconhecimento dos substratos e conferem especificidade ao sistema (VAN ULSEN; TOMMASSEN, 2006). As proteínas secretadas por esse sistema são geralmente muito ácidas e ricas em sequências repetidas, e incluem vários fatores de virulência como metaloproteases, adesinas, glicanases, colicina V (toxina antibacteriana), α -hemolisina e LapA (envolvida na formação de biofilme em *Pseudomonas putida*) (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009).

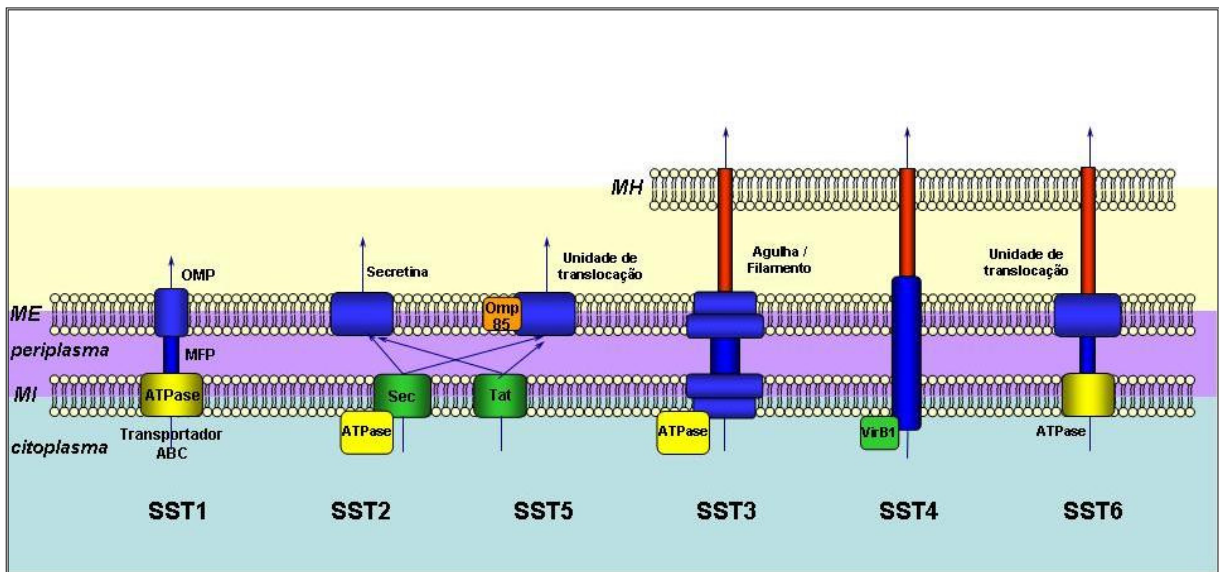


Figura 3.2: Esquema dos tipos de transporte transmembrana em bactérias Gram-negativas. MH: membrana da célula hospedeira; ME: membrana externa; MI: membrana interna; OMP: proteína de membrana externa; MFP: proteína de fusão de membranas. Adaptado de TSENG; TYLER; SETUBAL (2009).

O sistema de transporte tipo II (SST2) é encontrado em todas as proteobactérias e está envolvido na interação dos micro-organismos com seu ambiente biótico ou abiótico, secretando toxinas e enzimas como pectinases, elastases e celulasas (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009). É um processo em dois passos que transloca proteínas do periplasma para o exterior através das secretinas (BLEVES *et al.*, 2010).

O transporte do citosol para o periplasma é feito pelas vias Sec ou Tat. A via Sec é uma via de translocação ubíqua, por vezes referida como *Via de Secreção Geral*. As proteínas exportadas por essa via apresentam na sua extremidade N-terminal uma sequência hidrofóbica chamada peptídeo-sinal, que é reconhecida pela via Sec quando a proteína está no seu estado não-enovelado. O transporte utiliza

ATP e o gradiente de prótons como fonte de energia (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009). A via Tat (*Two-arginine*) exporta proteínas no estado enovelado que apresentam um peptídeo-sinal básico no N-terminal, e usa apenas o gradiente de prótons para impulsionar o transporte (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009).

O sistema de transporte tipo III (SST3) é encontrado em bactérias que interagem com hospedeiros animais ou vegetais. Ele leva proteínas diretamente para o citosol da célula hospedeira eucariótica, em um único passo, através de uma estrutura denominada injetossoma (BLEVES *et al.*, 2010). A montagem do injetossoma é ativada por contato com o hospedeiro e é semelhante ao flagelo, composto por uma série de anéis basais nas membranas interna e externa, conectados ao poro central da agulha, filamento ou *pilus* (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009). O transporte é dependente de ATP e chaperonas. As proteínas são transportadas na forma não-enovelada e apresentam sinal de secreção não clivável N-terminal (BLEVES *et al.*, 2010). Elas são chamadas de *efetores*, por modular várias funções do hospedeiro, e determinam o tropismo e especificidade de hospedeiro dos patógenos (DENG *et al.*, 2010).

O sistema de transporte tipo IV (SST4), homólogo aos sistemas de conjugação, é constituído por 11 proteínas (incluindo ATPases) que formam um canal através do envelope celular, terminando numa estrutura tipo *pilus* comunicante com a célula-alvo (VAN ULSEN; TOMMASSEN, 2006). É responsável pela secreção de DNA, proteínas e complexos DNA-proteína (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009).

Como o SST2, o sistema de transporte tipo V (SST5) é um processo em dois passos, dependente da via Sec, que transporta proteínas do periplasma para o exterior. Está envolvido na secreção de um grande número de proteínas, entre elas grandes fatores de virulência como adesinas, hemolisinas, proteínas de aquisição de ferro, proteases, e citolisinas (YEN; BHATTACHARYA; STATHOPOULOS, 2008). O SST5 apresenta três subclasses: SST5a ou autotransportadores, SST5b ou tipo dois parceiros (*Two Partner Secretion*, TPS) e SST5c.

Os autotransportadores, identificados em todas as bactérias Gram-negativas patogênicas, são proteínas modulares que apresentam um domínio translocador C-terminal que forma um poro de estrutura β -barril na membrana externa, por onde o domínio N-terminal (peptídeo-sinal) e o domínio de passagem (*passenger*) atravessam (VAN ULSEN; TOMMASSEN, 2006). O sistema de secreção dois parceiros funciona de forma semelhante, mas é composto de duas proteínas: TpsA

(proteína efetora) e TpsB (proteína que forma um poro na membrana externa para passagem da TpsA) (VAN ULSEN; TOMMASSEN, 2006). A subclasse SST5c apresenta o mesmo mecanismo, mas a proteína secretada adota uma conformação trimérica (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009).

O sistema de transporte tipo VI (SST6) tem estrutura semelhante ao injetossoma e potencialmente pode introduzir efetores diretamente numa célula hospedeira. O SST6 é encontrado principalmente em proteobactérias, planctomicetos e acidobactérias e pode contribuir na adaptação ao ambiente e na formação de biofilmes (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009).

3.1.4 Ferramentas de Análise de Proteínas Secretadas

As proteínas secretadas sempre despertaram grande interesse devido a sua importância na interação da bactéria com seu ambiente. Com o desenvolvimento de técnicas de estudo em grande escala de genomas e proteomas, vem crescendo o número de trabalhos dedicados às proteínas secretadas. Tjalsma e cols. (2000) propuseram o termo *secretoma*, para a análise das proteínas secretadas em conjunto com a maquinaria de secreção e seus substratos, inclusive não-proteicos. Mais tarde, Desvaux e cols. (2009) diferenciaram secretoma de *exoproteoma*, termo proposto para o conjunto de exoproteínas – todas as proteínas presentes no ambiente extracelular, não necessariamente translocadas.

Uma vez que a maquinaria de secreção reconhece motivos específicos na sequência da proteína a ser secretada, vários programas de análise computacional foram desenvolvidos para predição da localização celular de proteínas. Esses programas podem detectar peptídeos-sinal que encaminham para a via Sec (como SignalP, Phobius e PSORTb) ou Tat (TatP e TAT-FIND) (DESVAUX *et al.*, 2010). Algumas proteínas são secretadas sem um peptídeo-sinal aparente, sendo apenas referidas como secretadas por via não-clássica e preditas com base em características estruturais pelo programa SecretomeP (BENDTSEN *et al.*, 2005). Os diferentes programas podem ser usados para análise de dados de genomas inteiros e podem ser combinados (BARINOV *et al.*, 2009; VIRATYOSIN *et al.*, 2008), gerando informações valiosas sobre a localização das proteínas de um organismo.

A predição computacional de proteínas secretadas é uma importante ferramenta em estudos de grande escala, para contornar limitações nos métodos experimentais, como sensibilidade das técnicas e contaminação cruzada de compartimentos celulares (VIRATYOSIN *et al.*, 2008). Esses dois conjuntos de dados, computacionais e experimentais, são complementares, já que os dados experimentais demandam intensa análise computacional, e os computacionais, por sua vez, necessitam de dados empíricos para a construção de uma base de conhecimento para predições cada vez mais acuradas (GREENBAUM *et al.*, 2001).

As técnicas de análise proteômica, 2DE ou LC combinados com MS, têm sido utilizadas no estudo das proteínas extracelulares. Em bactérias, os trabalhos pioneiros se concentraram na Gram-positiva *Bacillus subtilis* (ANTELMANN *et al.*, 2001; TJALSMA *et al.*, 2000) e nas Gram-negativas *Helicobacter pylori* (BUMANN *et al.*, 2002) e *Pseudomonas syringae* (GUTTMAN *et al.*, 2002). Diversas abordagens têm sido empregadas desde então, como a identificação de exoproteínas imunogênicas (BARBEY *et al.*, 2009; MARIAPPAN *et al.*, 2010) e a identificação de proteínas com potencial uso em biomineração (BOBADILLA FAZZINI *et al.*, 2011).

A análise proteômica vem aumentando o entendimento da estrutura e utilização das vias de secreção e das proteínas secretadas, além de contribuir para o melhoramento dos métodos de predição computacionais.

3.1.5 Exoproteoma de *C. violaceum*

A *C. violaceum* é uma bactéria normalmente encontrada no ambiente de regiões tropicais e considerada um patógeno oportunista para animais e humanos. A infecção causada por ela atinge vários tecidos, provocando desde lesões cutâneas e abscessos viscerais até sepse severa, que evolui rapidamente para óbito. O tratamento com antibióticos é geralmente ineficaz, dada a resistência que a *C. violaceum* apresenta a vários antibióticos, levando a uma alta taxa de mortalidade (FANTINATTI-GARBOGGINI *et al.*, 2004).

Os mecanismos de patogenicidade da *C. violaceum* não são bem compreendidos ainda. A análise de dados do genoma revelou genes que codificam

fatores de virulência conhecidos, como os SST2 e SST3, toxinas citolíticas (hemolisinas e leucotoxinas), metaloproteases e lipases (BRITO *et al.*, 2004).

Os genes que codificam o SST3 estão arranados em duas ilhas de patogenicidade, Cpi-1 e Cpi-2. A Cpi-1 contém genes para o aparato de translocação (*cipABCD*), chaperonas (*cicA*, *cnvB*) e reguladores transcricionais (*cilA*, *civF*), mas os genes que codificam os componentes da agulha estão em um ponto distante no cromossomo (BETTS; CHAUDHURI; PALLEEN, 2004). A Cpi-2 apresenta uma disposição dos genes incomum, com os genes para o aparato de translocação opostos aos do aparato de secreção, e múltiplas cópias do gene homólogo a EspA/SseB, componente estrutural do *pilus* (*cseB1B2*; *cseB3B4*) (BETTS; CHAUDHURI; PALLEEN, 2004). Alguns prováveis efetores foram identificados, mas ainda não caracterizados molecularmente.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar o exoproteoma de *C. violaceum*, para obter um maior entendimento sobre os mecanismos de patogenicidade e sobre a notável capacidade de adaptação dessa bactéria a condições ambientais variáveis.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

Analisar as proteínas extracelulares de *Chromobacterium violaceum* cultivada em meio quimicamente definido.

3.2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a predição *in silico* das proteínas extracelulares de *C. violaceum*;
- Analisar o número e a quantidade relativa das proteínas extracelulares;
- Identificar as exoproteínas;
- Determinar quais as funções das proteínas secretadas e a importância para a bactéria.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Linhagem Bacteriana e Condições de Cultivo

A bactéria *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 foi pré-cultivada em 10 mL de meio quimicamente definido [Na_2HPO_4 1,29%, KH_2PO_4 0,25%, NH_4Cl 0,1%, CaCl_2 0,002%, MgSO_4 0,02%, glicose 2,4%, Tween 80 0,05%, solução de vitaminas (*MEM Vitamin Solution*, Invitrogen) 4%, solução de aminoácidos essenciais (*MEM Essential Aminoacids*, Invitrogen) 1% e solução de aminoácidos não-essenciais (*MEM Non-Essential Aminoacids*, Invitrogen) 1%] a 28°C, com agitação de 140 rpm, por 16 h. Para isolamento das proteínas extracelulares, a *C. violaceum* foi cultivada em 1 L de meio quimicamente definido até atingir a metade da fase exponencial ($\text{DO}_{720} = 0,8$). Foram realizadas três replicatas biológicas.

3.3.2 Obtenção das Proteínas Extracelulares

O meio de cultura foi centrifugado por 20 min a 4000 rpm, a 4°C, e o sobrenadante foi filtrado em membrana de poro de 0,22 μm . As proteínas foram extraídas por partição em três fases (PAULE *et al.*, 2004). O sobrenadante clarificado, mantido no gelo, recebeu 30% de sulfato de amônio e o pH foi ajustado para 4,0. Em seguida, foi adicionado n-butanol no mesmo volume do filtrado e a mistura foi agitada no vórtex. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 1 h e centrifugada posteriormente a 2000 rpm por 10 min, para a separação das três fases. O precipitado interfacial foi coletado e ressuspensionado em Tris 20 mM pH 7,4 com coquetel de inibidores de proteases (GE Helthcare). A suspensão foi então dialisada por 48 h contra água ultrapura, utilizando uma membrana de diálise com fator de exclusão de 12 kDa (Sigma). A concentração de proteínas foi determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1972).

3.3.3 Eletroforese Bidimensional

As proteínas extracelulares (180 µg) foram submetidas à precipitação com metanol/clorofórmio e depois dissolvidas em solução de reidratação (ureia 42%, tiourea 15%, CHAPS 2%, solução de anfólitos pH 3-10NL 1%, DTT 1,5% e azul de bromofenol 0,002%). Essa solução foi usada para reidratar as tiras de gel para IEF (pH 3-11NL, 18 cm, GE Healthcare). A IEF foi feita na cuba *Ettan IPGphor* (GE-Healthcare) com a seguinte programação de voltagem: 100 V por 1 h, 500 V por 2 h, 1000 V por 2 h, gradiente até 10.000 V durante 3 h, 10.000 V até 60.000 Vh e gradiente até 500 V durante 4 h. Após a IEF, as tiras de gel foram equilibradas por 15 min com tampão com SDS (ureia 36%, Tris-HCl 50 mM pH 8,8, glicerol 30%, SDS 2%) contendo agente redutor (DTT 2%), e depois por mais 15 min com o mesmo tampão contendo agente alquilante (iodoacetamida 2,5%). Cada tira equilibrada com SDS foi, então, transferida para o topo de um gel de poliacrilamida homogêneo 15% e a SDS-PAGE foi feita no sistema vertical *Ettan DALTsix* (GE-Healthcare) a 15°C. A eletroforese transcorreu com potência inicial de 2,5 W por gel durante 30 min, e depois 20 W por gel, até o corante azul de bromofenol alcançar o fim do gel.

As proteínas foram coradas com azul de *Coomassie* coloidal (NEUHOFF *et al.*, 1988). Os géis foram digitalizados usando o *ImageScanner* (GE Healthcare) e as imagens foram analisadas com o *software ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare).

3.3.4 Digestão com Tripsina

Os *spots* foram cortados do gel com o *SpotPicking Ettan* (GE Healthcare) e a digestão trípica foi feita de acordo com o protocolo de (HAVLIS *et al.*, 2003). Os *spots* foram lavados com 350 µL de água por 5 min, depois com 190 µL de acetonitrila por 20 min e completamente secos em concentrador a vácuo. Cinco microlitros de solução de tripsina modificada 3,33 µg/mL (Promega) foram adicionados sobre cada *spot*, que foi mantido no gelo por 60 min. Após esse tempo,

o excesso de tripsina foi removido e a digestão ocorreu em banho a 58°C por 30 min. A reação foi interrompida com adição de 1 µL de ácido fórmico 10% por 10 min. Os peptídeos foram extraídos com 30 µL de ácido fórmico 5% / acetonitrila 50% (v/v) por ultrassonicação por 10 min, sendo a extração repetida mais uma vez. As soluções de peptídeos foram concentradas até cerca de 10 µL, dessalinizadas em ZipTip (MilliPore) e estocados a -20°C.

3.3.5 Espectrometria de Massas

Meio microlitro da solução de peptídeos e 0,5 µL de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) 10 mg/mL foram misturados na placa metálica MTP AnchorChip 600/384 (Bruker Daltonics) do espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF AutoFlex III (Bruker Daltonics). Os espectros foram obtidos no modo positivo refletido. Os parâmetros de aquisição foram: taxa de repetição do laser de 50 Hz, 25 kV de voltagem de aceleração, intervalo de m/z de 500 a 4000 Da. O espectrômetro de massas foi calibrado com o *Peptide Calibration Standard II* (Bruker Daltonics). Os espectros foram processados com o *software* de aquisição *FlexControl* (Bruker Daltonics). A relação de massas dos peptídeos e de seus fragmentos foi utilizada para identificação das proteínas, com o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), utilizando o genoma de *C. violaceum* depositado no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/NCBI/nr>). Os parâmetros da busca foram: tipo de busca, *peptide mass fingerprint*; enzima, tripsina; modificação fixa, carbamidometilação (Cys); modificação variável, oxidação (Met); valores de massas, monoisotópica; clivagens perdidas, 1; tolerância de massa do peptídeo, 0,5 Da. A análise estatística foi determinada pela probabilidade baseada no *Mowse score* dado pelo MASCOT, sendo considerado significativo $p < 0,05$.

3.3.6 Ferramentas de Bioinformática

A predição da localização celular das proteínas de *C. violaceum* foi feita utilizando o programa SurfG+ (BARINOV *et al.*, 2009). O programa SecretomeP, disponível *online* em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>, foi utilizado para avaliar a secreção por via não clássica. O banco de dados COG (*Clusters of Orthologous Groups*) (TATUSOV *et al.*, 2001) foi utilizado para classificação funcional das proteínas preditas e identificadas por MS/MS. A comparação entre sequências proteicas foi feita com o BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Análise *in silico* das Proteínas Extracelulares de *C. violaceum*

A ferramenta de bioinformática SurfG+ foi utilizada para prever a localização celular das proteínas codificadas pelo genoma de *C. violaceum*. Foram encontradas 433 proteínas classificadas como extracelulares, listadas no Apêndice A. Essa alta proporção de proteínas secretadas - aproximadamente 10% das ORFs - reforça a versatilidade da bactéria para adaptar-se a uma variedade de diferentes ambientes e se relacionar com outros organismos.

A classificação funcional das proteínas secretadas mostrou que a maioria delas tem função desconhecida ou apenas predita (Figura 3.3). Muitas delas não apresentaram nenhuma similaridade com outras proteínas conhecidas, sendo exclusivas de *C. violaceum*. Um quarto das proteínas foi relacionado com metabolismo, incluindo o transporte de biomoléculas, e entre aquelas relacionadas com processos celulares estavam alguns conhecidos fatores de virulência, como metalopeptidases e hemolisinas, que podem colaborar para a septicemia grave causada pela bactéria.

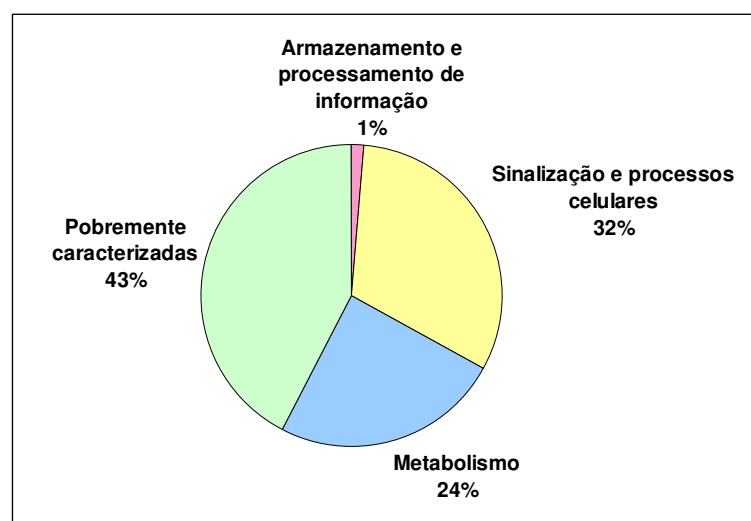


Figura 3.3: Classificação funcional das proteínas secretadas preditas pelo SurfG+.

3.4.2 Análise Proteômica das Proteínas Extracelulares de *C. violaceum*

As proteínas secretadas pela bactéria *C. violaceum* foram analisadas por 2DE. O perfil de proteínas obtido apresentou 338 *spots*, distribuídos no intervalo de massa molecular entre 8 e 92 kDa (Figura 3.4 e Apêndice B).

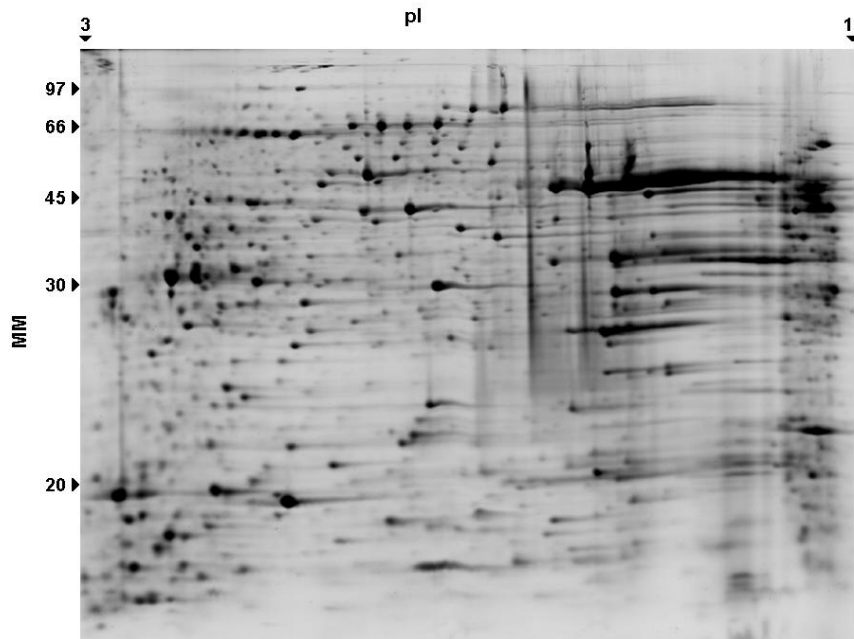


Figura 3.4: Mapa proteico das proteínas extracelulares de *C. violaceum*. A 2DE foi feita em tiras de gel para IEF de pH 3 a 11NL e gel da SDS-PAGE 15%. As proteínas foram coradas com azul de Coomassie coloidal.

Todos os *spots* foram digeridos com tripsina e analisados por MS/MS. Foram identificados 84 *spots*, correspondendo a 33 proteínas, mostradas na Tabela 3.1. Vários *spots* corresponderam à mesma proteína com pI e MM distintos, o que pode ser devido a modificações pós-traducionais, como adição de grupos prostéticos e processamento proteolítico. As modificações pós-traducionais podem explicar também a diferença encontrada entre as MM teóricas e experimentais. Essas diferenças foram encontradas em outros exoproteomas, como em *Streptococcus suis* (WU; ZHANG; LU, 2008), *Herbaspirillum seropedicae* (CHAVES *et al.*, 2009) e *Rhodococcus equi* (BARBEY *et al.*, 2009).

Tabela 3.1: Proteínas extracelulares de *C. violaceum* identificadas por MS/MS.

SPOT ^a	RefSeq ^b	LOCUS_TAG	PROTEÍNA	MM / pI TEÓRICO	MM EXPERIM.	PEP. ^c	SCORE ^d	FRAÇÃO CELULAR		COG ^g
								SurfG ^e	SecP ^f	
449	NP_900767	CV_1097	Proteína ligadora componente do transportador ABC de dipeptídeos	59,20 / 9,25	43,66	3	99	E	+	E
489	AAQ59673	CV_2001	Colagenase	91,63 / 6,3	38,51	3	67	C	+	O
504	NP_901379	CV_1709	Proteína associada ao gancho flagelar FlgK	48,16 / 5,12	36,99	3	129	C	+	N
508	NP_903601	CV_3931	Quitosanase	38,67 / 8,99	36,87	2	66	E	-	G
521	AAQ59115	CV_1440	Proteína transmembrana hidrolase	47,68 / 8,09	34,48	3	105	E	-	R
555	AAQ58040	CV_0362	Hemolisina termolábil dependente de lectina	44,70 / 9,24	30,25	2	93	C	+	R
565	NP_900767	CV_1097	Proteína ligadora componente do transportador ABC de dipeptídeos	59,20 / 9,25	29,09	4	294	E	-	E
566	NP_901671	CV_2001	Colagenase	91,63 / 6,3	29,39	3	108	C	+	O
567	NP_903409	CV_3739	Peroxidase	22,32 / 6,36	28,90	3	258	C	-	P
571	NP_902993	CV_3323	Proteína ligante de carboidrato	42,57 / 9,00	28,68	3	220	E	-	S
573	NP_901671	CV_2001	Colagenase	91,63 / 6,3	28,28	4	216	C	+	O
575	NP_900020	CV_0350	Proteína de bainha de fago	49,40 / 5,57	27,77	2	266	C	-	R
576	NP_903409	CV_3739	Peroxidase	22,32 / 6,36	27,84	2	136	C	-	P
577	NP_901039	CV_1369	Proteína hipotética CV_1369	38,06 / 8,59	27,81	4	431	E	-	S
578	NP_903647	CV_3977	Proteína hipotética CV_3977	18,05 / 6,30	27,88	3	307	C	+	S
579	NP_900019	CV_0349	Proteína hipotética CV_0349	13,60 / 5,31	27,70	6	505	C	-	S
580	NP_903894	CV_4224	Proteína hipotética CV_4224	32,18 / 9,42	27,70	3	364	C	+	S
582	NP_901380	CV_1710	Proteína associada ao gancho flagelar FlgL	32,22 / 4,80	27,56	2	205	C	+	N
584	NP_902946	CV_3276	Proteína hipotética CV_3276	20,72 / 8,65	27,66	1	97	E	-	S
589	NP_902664	CV_2994	Proteína associada ao gancho flagelar FliD	47,91 / 8,90	26,89	2	177	C	+	N
591	NP_903777	CV_4107	Proteína hipotética CV_4107	61,34 / 7,60	26,34	2	131	PSE	-	S
592	NP_901110	CV_1440	Proteína transmembrana hidrolase	47,68 / 8,09	26,55	2	284	E	-	R
593	NP_903647	CV_3977	Proteína hipotética CV_3977	18,05 / 6,30	26,27	1	76	C	+	S
594	NP_900767	CV_1097	Proteína ligadora componente do transportador ABC de dipeptídeos	59,20 / 9,25	26,44	3	187	E	-	E
595	NP_901110	CV_1440	Proteína transmembrana hidrolase	47,68 / 8,09	26,31	2	253	E	-	R
595	NP_902993	CV_3323	Proteína ligante de carboidrato	42,57 / 9,00	26,31	1	115	E	-	S
597	NP_901380	CV_1710	Proteína associada ao gancho flagelar FlgL	32,22 / 4,80	26,04	2	218	C	+	N

Continuação da Tabela 3.1:

SPOT ^a	RefSeq ^b	LOCUS_TAG	PROTEÍNA	MM / pI TEÓRICO	MM EXPERIM.	PEP. ^c	SCORE ^d	FRAÇÃO CELULAR		COG ^g
								SurfG ^e	SecP ^f	
601	NP_900020	CV_0350	Proteína de bainha de fago	49,40 / 5,57	25,25	3	346	C	-	R
606	NP_902681	CV_3011	Flagelina	38,40 / 5,61	24,89	1	85	C	+	N
609	NP_901380	CV_1710	Proteína associada ao gancho flagelar FlgL	32,22 / 4,80	24,54	1	70	C	+	N
611	NP_902174	CV_0867	Superoxido dismutase	21,63 / 5,87	24,01	3	222	E	+	P
614	NP_901376	CV_1706	Proteína da haste do corpo basal flagelar FlgG	27,72 / 4,83	23,67	1	88	C	+	N
615	NP_901376	CV_1706	Proteína da haste do corpo basal flagelar FlgG	27,72 / 4,83	23,16	2	176	C	+	N
615	NP_902563	CV_2893	Proteína hipotética CV_2893	21,80 / 9,14	23,16	1	86	E	-	S
617	NP_900767	CV_1097	Proteína ligadora componente do transportador ABC de dipeptídeos	59,20 / 9,25	22,57	5	404	E	-	E
618	NP_902681	CV_3011	Flagelina	38,40 / 5,61	22,57	1	164	C	+	N
619	NP_903858	CV_4188	Fator de alongamento Tu	43,21 / 5,11	22,40	4	341	C	-	J
622	NP_901039	CV_1369	Proteína hipotética CV_1369	38,06 / 8,59	22,17	2	42	E	-	S
623	NP_900020	CV_0350	Proteína de bainha de fago	49,40 / 5,57	21,83	3	422	C	-	R
625	NP_901671	CV_2001	Colagenase	91,63 / 6,3	21,58	5	323	C	+	O
628	NP_901110	CV_1440	Proteína transmembrana hidrolase	47,68 / 8,09	21,41	3	399	E	-	R
631	NP_901110	CV_1440	Proteína transmembrana hidrolase	47,68 / 8,09	19,82	2	69	E	-	R
634	NP_901110	CV_1440	Proteína transmembrana hidrolase	47,68 / 8,09	19,00	1	67	E	-	R
635	NP_900020	CV_0350	Proteína de bainha de fago	49,40 / 5,57	19,29	3	384	C	-	R
636	NP_903176	CV_3506	Protease	39,25 / 8,64	19,26	1	90	E	-	R
637	NP_900767	CV_1097	Proteína ligadora componente do transportador ABC de dipeptídeos	59,20 / 9,25	19,26	4	293	E	-	E
638	NP_901671	CV_2001	Colagenase	91,63 / 6,3	18,99	5	293	C	+	O
639	NP_902664	CV_2994	Proteína associada ao gancho flagelar FliD	47,91 / 8,90	18,68	6	580	C	+	N
639	NP_902681	CV_3011	Flagelina	38,40 / 5,61	18,68	1	84	C	+	N
640	NP_903777	CV_4107	Proteína hipotética CV_4107	61,34 / 7,60	18,27	2	183	PSE	-	S
641	NP_902681	CV_3011	Flagelina	38,40 / 5,61	18,34	1	97	C	+	N
642	NP_899893	CV_0223	Proteína hipotética CV_0223	24,07 / 9,00	17,79	4	307	C	+	H
643	NP_903858	CV_4188	Fator de alongamento Tu	43,21 / 5,11	17,54	4	370	C	-	J

Continuação da Tabela 3.1:

SPOT ^a	RefSeq ^b	LOCUS_TAG	PROTEÍNA	MM / pI TEÓRICO	MM EXPERIM.	PEP. ^c	SCORE ^d	FRAÇÃO CELULAR		COG ^g
								SurfG ^e	SecP ^f	
644	NP_901671	CV_2001	Colagenase	91,63 / 6,3	17,58	5	300	C	+	O
645	NP_901085	CV_1415	γ-glutamyltransferase	59,84 / 9,00	17,33	4	306	E	-	E
646	NP_902681	CV_3011	Flagelina	38,40 / 5,61	16,81	1	93	C	+	N
647	NP_901110	CV_1440	Proteína transmembrana hidrolase	47,68 / 8,09	16,70	3	331	E	-	R
648	NP_903777	CV_4107	Proteína hipotética CV_4107	61,34 / 7,60	16,59	2	176	PSE	-	S
650	NP_900094	CV_0424	Proteína hipotética CV_0424	24,99 / 4,98	15,52	2	82	C	-	R
651	NP_903777	CV_4107	Proteína hipotética CV_4107	61,34 / 7,60	15,42	3	420	PSE	-	S
652	NP_903647	CV_3977	Proteína hipotética CV_3977	18,05 / 6,30	15,10	1	84	C	+	S
653	NP_900079	CV_0409	Proteína da bainha da cauda de bacteriófago	50,75 / 6,30	14,95	2	194	C	-	R
655	NP_903647	CV_3977	Proteína hipotética CV_3977	18,05 / 6,30	14,76	3	259	C	+	S
656	NP_901110	CV_1440	Proteína transmembrana hidrolase	47,68 / 8,09	14,76	2	368	E	-	R
657	NP_900767	CV_1097	Proteína ligadora componente do transportador ABC de dipeptídeos	59,20 / 9,25	14,62	6	517	E	-	E
659	NP_902993	CV_3323	Proteína ligante de carboidrato	42,57 / 9,00	14,16	2	133	E	-	S
662	NP_901110	CV_1440	Proteína transmembrana hidrolase	47,68 / 8,09	13,93	5	399	E	-	R
663	NP_902664	CV_2994	Proteína associada ao gancho flagelar FliD	47,91 / 8,90	13,91	7	467	C	+	N
664	NP_900080	CV_0410	Proteína do centro da cauda de bacteriófago	19,34 / 5,74	13,68	4	264	C	-	R
665	NP_900767	CV_1097	Proteína ligadora componente do transportador ABC de dipeptídeos	59,20 / 9,25	13,59	4	229	E	-	E
665	NP_902060	CV_2390	Subunidade beta da riboflavina sintase	16,49 / 5,03	13,59	4	113	C	-	H
665	NP_900010	CV_0340	Proteína de montagem da fibra da cauda	21,24 / 5,70	13,59	2	82	C	+	R
667	NP_901373	CV_1703	Proteína de modificação do bastão do corpo basal flagelar	23,61 / 5,27	12,92	1	296	C	+	N
667	NP_901110	CV_1440	Proteína transmembrana hidrolase	47,68 / 8,09	12,92	1	163	E	-	R
670	NP_903777	CV_4107	Proteína hipotética CV_4107	61,34 / 7,60	12,71	2	297	PSE	-	S
672	NP_901110	CV_1440	Proteína transmembrana hidrolase	47,68 / 8,09	12,71	5	436	E	-	R
673	NP_903910	CV_4240	Quitinase	58,53 / 8,69	12,43	5	460	E	-	G
674	NP_903777	CV_4107	Proteína hipotética CV_4107	61,34 / 7,60	12,35	3	369	PSE	-	S
675	NP_900767	CV_1097	Proteína ligadora componente do transportador ABC de dipeptídeos	59,20 / 9,25	12,03	4	303	E	-	E

Continuação da Tabela 3.1:

SPOT ^a	RefSeq ^b	LOCUS_TAG	PROTEÍNA	MM / pI TEÓRICO	MM EXPERIM.	PEP. ^c	SCORE ^d	FRAÇÃO CELULAR		COG ^g
								SurfG ^e	SecP ^f	
676	NP_901110	CV_1440	Proteína transmembrana hidrolase	47,68 / 8,09	12,10	1	92	E	-	R
679	NP_903777	CV_4107	Proteína hipotética CV_4107	61,34 / 7,60	11,48	3	357	PSE	-	S
681	NP_902681	CV_3011	Flagelina	38,40 / 5,61	10,93	1	105	C	+	N
687	NP_903647	CV_3977	Proteína hipotética CV_3977	18,05 / 6,30	10,36	4	461	C	+	S
688	NP_901110	CV_1440	Proteína transmembrana hidrolase	47,68 / 8,09	10,34	2	261	E	-	R
699	NP_901110	CV_1440	Proteína transmembrana hidrolase	47,68 / 8,09	49,90	2	179	E	-	R
701	NP_903999	CV_4329	Proteína ligadora de substrato – Sistema de transporte ABC de oligopeptídeos	59,55 / 9,15	44,55	3	243	E	-	E
709	NP_902563	CV_2893	Proteína hipotética CV_2893	21,80 / 9,14	9,75	1	116	E	-	S
714	NP_903777	CV_4107	Proteína hipotética CV_4107	61,34 / 7,60	10,42	1	121	PSE	-	S
722	NP_900019	CV_0349	Proteína hipotética CV_0349	13,60 / 5,31	14,99	2	90	C	-	S
725	NP_902563	CV_2893	Proteína hipotética CV_2893	21,80 / 9,14	15,62	1	165	E	-	S

a. Numeração dos *spots* de acordo com a Figura B1 no Apêndice B.

b. RefSeq = Número de acesso do banco de dados NCBI.

c. Pep. = peptídeos fragmentados para análise por MS/MS.

d. Score = *Mowse score* atribuído pelo MASCOT.

e. (E) extracelular, (C) citoplasmática, (PSE) possivelmente exposta a superfície celular segundo predição do SurfG.

f. (+) secretada por via não clássica, (-) não secretada segundo predição do *SecretomeP*.

g. Classes do *Clusters of Orthologous Groups* (COG) de proteínas: (C) Produção e conversão de energia; (D) Controle do ciclo celular, divisão celular e partição de cromossomo; (E) Metabolismo e transporte de aminoácidos; (F) Metabolismo e transporte de nucleotídeos; (G) Metabolismo e transporte de carboidratos; (H) Metabolismo e transporte de coenzimas; (I) Metabolismo e transporte de lipídeos; (J) Tradução, biogênese e estrutura ribossomal; (K) Transcrição; (L) Replicação, recombinação e reparo; (M) Biogênese de envelope, membrana e parede celular; (N) Motilidade celular; (O) Modificação pós-traducional, renovação de proteínas, chaperonas; (P) Metabolismo e transporte de íons inorgânicos; (Q) Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários; (R) Função geral predita; (S) Função desconhecida; (T) Mecanismos de transdução de sinal; (U) Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular; (V) Mecanismos de defesa.

Entre as proteínas identificadas, apenas 12 foram preditas como extracelulares pelo SurfG+; 20 proteínas foram preditas como citosólicas e 1 como possivelmente exposta a superfície celular (Tabela 3.1). Para prever a secreção por via não-clássica, as sequências das proteínas identificadas foram submetidas ao método SecretomeP, encontrando-se que 13 apresentaram características de exportação por via não-clássica. Oito proteínas (25%) foram preditas como citosólicas em todos os métodos de predição utilizados: fator de alongamento Tu, subunidade beta da riboflavina sintase, peroxidase, as proteínas de bacteriófago CV_0350, CV_0409 e CV_0410 e as proteínas hipotéticas CV_0349 e CV_0424.

Essas proteínas podem ter sido liberadas por um mecanismo ainda desconhecido, de modo a desempenhar uma função no meio extracelular. Tais proteínas que têm múltiplas funções independentes e não-relacionadas são conhecidas como *moonlighting proteins* (MP) (JEFFERY, 2003). A função “extra” das MP não pode ser predita por homologia e muitas delas são enzimas altamente conservadas, como as das vias glicolítica e ciclo do ácido cítrico, e constitutivamente expressas em altos níveis (HUBERTS; VAN DER KLEI, 2010).

O fator de alongamento Tu (EF-Tu) é uma MP comumente encontrada em exoproteomas (BARBEY *et al.*, 2009; CHAVES *et al.*, 2009; MARIAPPAN *et al.*, 2010). É uma das mais abundantes proteínas bacterianas (5 - 10% das proteínas intracelulares), geralmente com massa molecular entre 40 e 45 kDa e pI em torno de 5, podendo ser fosforilada ou metilada (JONAK, 2007). Sua cadeia polipeptídica é termolábil, o que pode explicar o aparecimento do EF-Tu em dois spots no gel. O EF-Tu tem um papel importante na biossíntese de proteínas, mas já foi encontrado associado à membrana em *Escherichia coli* (YOUNG; BERNLOHR, 1991) e em *Mycobacterium leprae*, onde foi capaz de ligar-se à fibronectina, uma glicoproteína de matriz extracelular (DALLO *et al.*, 2002).

A riboflavina sintase catalisa o passo final da síntese da riboflavina e não foi ainda caracterizada como uma MP. Aparece como um fator de virulência em *Salmonella enterica*, *M. leprae* (FISCHER; BACHER, 2008) e *H. pylori* (CROSSLEY *et al.*, 2007), por fornecer riboflavina para redutases férricas extracelulares que aumentam a biodisponibilidade do ferro.

3.4.3 Análise Funcional das Proteínas Extracelulares de *C. violaceum*

A classificação funcional das proteínas extracelulares de *C. violaceum* (Figura 3.5 e Tabela 3.1) mostrou representantes das quatro categorias COG: armazenamento e processamento de informação, sinalização e processos celulares, metabolismo e pobremente caracterizadas. Mais da metade pertenceu à última categoria, enquanto uma única proteína foi encontrada estar envolvida no processamento da informação.

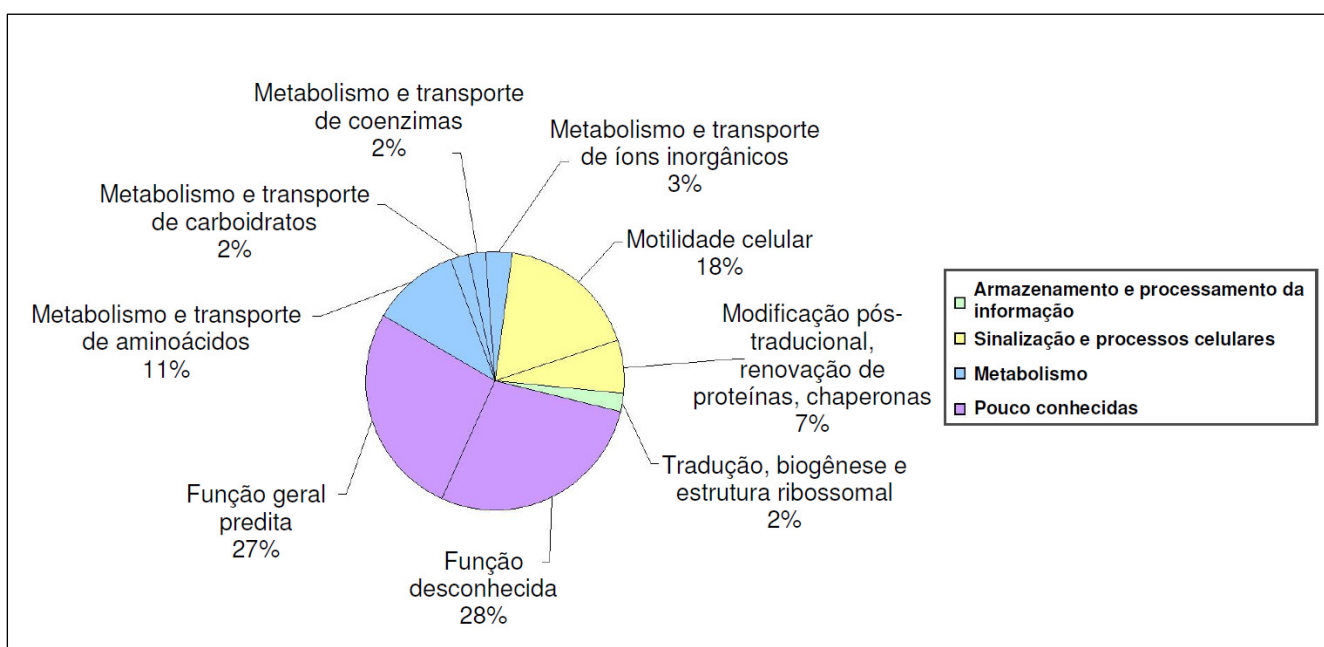


Figura 3.5: Classificação funcional das exoproteínas de *C. violaceum* de acordo com as classes COG.

Como na classificação funcional das proteínas extracelulares preditas, 25% das exoproteínas identificadas foram relacionadas com metabolismo, aproximadamente metade delas fazendo parte do sistema de transportadores ABC. Dados do genoma de *C. violaceum* revelaram que 12% das ORFs são de potenciais transportadores, e 24% destes são de transportadores ABC, envolvidos na aquisição de nutrientes e resistência a drogas (GRANGEIRO *et al.*, 2004).

O sistema de transporte de oligopeptídeos da família ABC é composto por uma proteína ligadora de oligopeptídeo extracelular (OppA), duas proteínas

transmembrana formando um poro e duas ATPases (MONNET, 2003). As proteínas ligadoras de substrato são periplasmáticas e responsáveis pela alta afinidade, especificidade e direcionalidade do transporte (HIGGINS, 2001).

Duas proteínas ligadoras de substrato foram encontradas no exoproteoma: uma proteína ligadora componente do sistema de transporte ABC de oligopeptídeos e uma do transportador ABC de dipeptídeos. Essas proteínas captam oligopeptídeos que servirão como fonte de aminoácidos para a célula. Elas podem ainda agir como sinalizadores intracelulares, além de participarem de processos de adesão e como chaperonas moleculares (MONNET, 2003).

Outra proteína relacionada com o metabolismo de aminoácidos é a γ -glutamyltransferase (GGT), que hidrolisa a ligação γ -glutamilamida da glutathione. Essa enzima periplasmática atua na reciclagem da cisteína e no metabolismo da GSH (BOANCA; SAND; BARYCKI, 2006). Para ter atividade hidrolítica, a GGT passa por um processamento pós-traducional autocatalítico, no qual o precursor de 60 kDa é clivado em duas subunidades, de 20 e 40 kDa, que formam a enzima ativa como um heterodímero $\alpha 2\beta 2$ (BOANCA; SAND; BARYCKI, 2006).

A GGT é um fator de virulência em *H. pylori*, induzindo apoptose e modulando inflamação (BOANCA; SAND; BARYCKI, 2006). Além de sua atuação na patogênese, essa enzima é biotecnologicamente interessante pelo seu uso em testes diagnósticos e na indústria de alimentos, como glutaminase (CASTELLANO *et al.*, 2010).

Duas proteínas que atuam no metabolismo de carboidratos foram identificadas: quitosanase e quitinase. Quitosanases são enzimas que degradam quitosana, a quitina desacetilada encontrada na parede celular de alguns fungos e algas verdes (JOHNSEN; HANSEN; STOUGAARD, 2010). Este trabalho mostra que a quitosanase de *C. violaceum*, ainda não caracterizada bioquimicamente, é expressa constitutivamente, ao contrário da maioria das quitosanases bacterianas, que são induzíveis. Assim, essa enzima pode ter aplicação biotecnológica, pois produz quitooligosacarídeos com potenciais atividades antitumoral e antimicrobiana de grande interesse nas indústrias farmacêutica e alimentícia (SHIMOSAKA *et al.*, 2000).

Quitinases são enzimas que degradam a quitina, polímero componente do exoesqueleto de artrópodos e da parede celular de fungos. Chernin e cols. (1998) detectaram seis atividades quitinolíticas em *C. violaceum*, todas dependentes de

indução por quitina e AHL. No entanto, os autores ponderam que outra quitinase pode estar presente, cuja atividade não foi detectada com o substrato sintético utilizado (CHERNIN *et al.*, 1998). A quitinase identificada neste trabalho, assim como a quitosanase descrita acima, foi expressa sem a indução da quitina e apresenta potencial aplicação no controle biológico de insetos e fungos.

Outras três proteínas identificadas apresentam motivo de ligação à quitina, mas suas funções são desconhecidas. A proteína ligante de carboidrato CV_3323 apresenta um domínio ligante de quitina (*carbohydrate-binding module*, CBM), responsável por reconhecer o polissacarídeo e posicionar a enzima para a reação (BORASTON *et al.*, 2004). Esse mesmo domínio foi encontrado também na proteína transmembrana hidrolase CV_1440, similar a quitinases e lisozimas de outras bactérias, e na proteína hipotética CV_1369, que apresentou identidade de 48% com uma quitinase de *Streptomyces clavuligerus*. Todas são exportadas por via dependente de peptídeo-sinal e podem atuar no metabolismo ou no transporte de carboidratos. Elas podem ainda ter uma nova função ainda não descrita, considerando a quitinase de *Legionella pneumophila*, capaz de promover a persistência desse patógeno no pulmão (DEBROY *et al.*, 2006).

Classificada na categoria de metabolismo de coenzimas, a proteína hipotética CV_0223 faz parte da superfamília das corismato liases que catalisam o primeiro passo da via de síntese da ubiquinona a partir do corismato. Essa via produz vários compostos com diversas funções no metabolismo celular, como aminoácidos aromáticos, quinonas, vitaminas, pigmentos e sideróforos (HOLDEN *et al.*, 2002).

Como bactéria que vive no ambiente, a *C. violaceum* deve contar com sistemas eficientes de proteção contra estresses. Duas exoproteínas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo foram identificadas: superóxido dismutase (SOD) e peroxidase. Elas são responsáveis pela destoxificação do íon superóxido e do peróxido de hidrogênio, respectivamente, ambos causadores de lesões no DNA, inativação de enzimas e alteração no metabolismo (IMLAY, 2008).

A SOD-Fe extracelular converte o O_2^- , produzido por irradiação ultravioleta da superfície da água, a O_2 e H_2O_2 . A presença da enzima no meio extracelular é importante porque o íon superóxido não atravessa membranas, devendo ser detoxificado no local de produção (FRIDOVICH, 1995).

A peroxidase CV_3739 pertence à família peroxiredoxina (Prx), que não apresenta o grupo heme, mas dois resíduos de cisteína conservados agindo na

conversão do H_2O_2 em H_2O (RHEE; CHAE; KIM, 2005). É uma das proteínas preditas como citosólica, mas já foi descrita no exoproteoma de *H. seropedicae* (CHAVES *et al.*, 2009) e de *Campylobacter concisus* (KAAKOUSH *et al.*, 2010). Apesar do peróxido de hidrogênio poder atravessar membranas, a presença da enzima no meio extracelular pode ser importante na destoxificação.

Entre as exoproteínas identificadas, há um grande grupo envolvido na motilidade celular, todas fazendo parte do aparato flagelar. O flagelo é uma organela locomotora formada por três partes contendo diversas proteínas: o corpo basal, que serve como âncora na membrana interna; o gancho, um encaixe flexível; e o filamento, que gera o impulso para mover a bactéria (ALDRIDGE; KARLINSEY; HUGHES, 2003). Além das proteínas estruturais, várias outras auxiliam na montagem do flagelo, quando as proteínas envolvidas são translocadas através do canal central do corpo basal e filamento, num aparato semelhante ao SST3 (TERASHIMA; KOJIMA; HOMMA, 2008).

A *C. violaceum* tem 67 genes flagelares, em 7 grupos (PEREIRA *et al.*, 2004). Seis proteínas flagelares foram detectadas no exoproteoma: as proteínas da haste do corpo basal FlgG e FlgD, as proteínas associadas ao gancho FlgL, FlgK e FliD e a flagelina (FlaD). A FliD e FlgD apresentaram grande diferença nas MM experimentais e teóricas, o que pode ser devido à degradação das auxiliares de montagem de flagelo. Diferenças na MM foi encontrada também para a flagelina, o que pode ser devido à modificações como fosforilação e glicosilação, já descritas em *P. aeruginosa* e *Halobacterium halobium* (MCCARTER, 1995).

Além de sua função na motilidade, o flagelo pode contribuir para a patogenicidade por funcionar como aparato de secreção de proteínas não-flagelares e outras funções adicionais, como adesão celular (LEPKA; WILHARM, 2010).

Outra proteína da categoria de sinalização e processos celulares é a colagenase. Essa metaloprotease degrada o colágeno, principal componente da matriz extracelular e tecido conectivo em mamíferos. Sua ação facilita a invasão do hospedeiro por um patógeno e o estabelecimento da infecção, podendo estar associada com necrose tecidual e efeitos citopáticos (HAN *et al.*, 2008). Além da participação em mecanismos de patogenicidade, as colagenases têm aplicações na clínica, na pesquisa biomédica e indústria alimentícia. O colágeno e seus fragmentos peptídicos também são biomateriais interessantes, na composição de alimentos,

bebidas, medicamentos, cosméticos e outros produtos de cuidados com a saúde (WATANABE, 2004).

Alguns isolados de *C. violaceum* mostram atividade hemolítica, e seu genoma contém 13 ORFs relacionadas à hemolisinas (BRITO *et al.*, 2004). A hemolisina termolábil dependente de lecitina identificada nesse trabalho é similar à de *Vibrio parahaemolyticus* (SHINODA *et al.*, 1991) e de *L. pneumophila* (FLIEGER *et al.*, 2004). Elas têm atividade fosfolipásica A e são toxinas citolíticas por causar destruição dos lipídeos da membrana celular.

A protease extracelular CV_3506, de função desconhecida, apresenta um domínio da família das deuterolisinas metaloproteases dependentes de zinco (M35). Ela apresenta 56% de identidade com a AsaP1 de *Aeromonas salmonicida*, que apresenta atividade caseinolítica e é um fator de virulência (ARNADOTTIR *et al.*, 2009). As metalopeptidases são fatores de virulência comumente produzidos pelas bactérias e as metaloproteases dependentes de Zn já foram identificadas no exoproteoma em *L. pneumophila* (GALKA *et al.*, 2008) e *Burkholderia cepacia* (MARIAPPAN *et al.*, 2010).

A proteína CV_4107 é uma lipoproteína possivelmente exposta à superfície, na face externa da membrana, segundo previsão do SurfG+. Faz parte da família M30 de metalopeptidases contendo zinco, mas não apresenta homologia com outras proteínas e sua função é desconhecida.

Diversas proteínas hipotéticas de função desconhecida foram encontradas no exoproteoma de *C. violaceum*. A proteína extracelular CV_2893 não mostra motivos conservados nem similaridade com qualquer outra proteína. A proteína CV_4224 pertence à superfamília Tryp_SPc de enzimas tipo tripsina e apresenta 35% de identidade com uma quimiotripsina de *Rhodobacteriales bacterium*. Com 93% de identidade com um efector do SST4, o Hcp1, de *Lutiella nitroferrum*, a proteína CV_3977 pode ser um fator de virulência de *C. violaceum*. Essas proteínas únicas podem ser fundamentais na adaptação da bactéria aos diversos ambientes que habita e na patologia que causa.

A proteína CV_3276 pertence à superfamília Ycel, com um domínio de ligação a poliisoprenóides. Na bactéria marinha *Saccharophagus degradans*, esse domínio aparece junto com dois módulos ligadores de carboidrato na proteína Sde-1182, possivelmente envolvida na captação de nutrientes (VINCENT *et al.*, 2010).

Entre as proteínas previstas como citoplasmáticas identificadas no exoproteoma, há uma série de proteínas relacionadas com bacteriófagos. Estas podem alcançar o meio extracelular através das holinas, proteínas que formam poros na membrana como parte do processo de lise celular por bacteriófagos (TJALSMA *et al.*, 2004).

O genoma de *C. violaceum* contém quatro profagos de diferentes origens, chamados CvP1 a CvP4. Os profagos, como genomas virais integrados, conferem à bactéria hospedeira a habilidade de produzir uma variedade de exotoxinas, fatores de colonização e bacteriocinas, entre outros produtos gênicos úteis (DE ALMEIDA *et al.*, 2004).

As proteínas CV_0350, uma proteína da bainha da cauda de fago tipo Mu, e CV_0340, proteína de montagem da fibra da cauda, fazem parte da CvP1, sendo essa última predita como secretada por via não-clássica. A proteína hipotética CV_0349 também faz parte da CvP1, mas não apresenta homologia com proteínas de fagos, sendo uma proteína conservada de função desconhecida.

A CV_0409, proteína da bainha da cauda de fago, e a CV_0410, proteína do centro da cauda de fago tipo P2, fazem parte da CvP2, que pode apresentar atividade bacteriocina (DE ALMEIDA *et al.*, 2004). A proteína hipotética CV_0424 apresenta 60% de identidade com a proteína de fibra da cauda de fago CV_2114 e também faz parte da CvP2.

As proteínas descritas dão uma visão geral do que a *C. violaceum* secreta para o ambiente e de sua importância para a bactéria. Alguns *spots* não puderam ser identificados devido a limitações das técnicas utilizadas, assim como peptídeos, proteínas de baixa abundância e aquelas que não foram expressas nas condições de cultivo adotadas.

Vários fatores de virulência foram identificados, concordando com as infecções disseminadas causadas pela bactéria. Não foi identificada, no entanto, nenhuma das proteínas preditas como efetores do SST3 por Betts e cols. (2004), provavelmente porque sua expressão somente é ativada por contato com uma célula hospedeira.

Sete proteínas pertencentes às ilhas de patogenicidade Cpi1 (CV_2615 a CV_2642) e Cpi2 (CV_2574 a CV_2614) foram preditas como proteínas extracelulares pelo SurfG+, incluindo proteínas de invasão, hipotéticas e uma proteína ligadora de carboidrato. Entre os possíveis efetores SST3, dois foram

previstos como proteínas de membrana (CV_2274 e CV_2619) e os outros como citoplasmáticos.

3.5 CONCLUSÕES

As proteínas secretadas são fundamentais para a interação das bactérias com seu ambiente. Dessa forma, o estudo dessas proteínas é essencial para o entendimento de processos como patogênese e formação de comunidades microbianas e para o desenvolvimento de suas potenciais aplicações terapêutica e biotecnológica.

Este primeiro estudo do exoproteoma *C. violaceum* mostrou uma série de ferramentas moleculares fundamentais para a adaptação à variedade de condições externas às quais está exposta, tais como proteínas de transporte, que atuam na captação de aminoácidos e carboidratos necessários para a nutrição da bactéria, e proteção contra estresse oxidativo, com a SOD e PRX.

Como um patógeno oportunista, possui ainda um arsenal de proteínas que auxiliam no processo de invasão e lesão de um organismo hospedeiro, como proteínas flagelares, metalopeptidases, colagenase, toxinas e algumas proteínas citoplasmáticas de dupla função, as MP, que podem participar da patogênese. O estudo dessas proteínas pode apontar os caminhos terapêuticos para a grave septicemia causada pela *C. violaceum*.

Algumas proteínas extracelulares da bactéria podem ter aplicação na produção de compostos úteis, como a quitosanase e a corismato liase; outras, podem ser utilizadas em bioprocessos como controle de insetos com a quitinase.

Este trabalho identificou várias proteínas classificadas como hipotéticas no exoproteoma. Algumas delas não apresentam similares conhecidas e mostram, portanto, o modo único como a bactéria se adapta aos diferentes ambientes onde vive. Ainda mais, este trabalho valida os dados do genoma, confirmando a expressão e a localização das proteínas aqui identificadas e mostrando o valor da análise proteômica no estudo integrado da bactéria *C. violaceum*.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRIDGE P, KARLINSEY J, HUGHES KT. The type III secretion chaperone FlgN regulates flagellar assembly via a negative feedback loop containing its chaperone substrates FlgK and FlgL. *Mol Microbiol.* 2003 Sep;49(5):1333-45.

ANTELMANN H, TJALSMA H, VOIGT B, OHLMEIER S, BRON S, VAN DIJL JM, HECKER M. A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Res.* 2001 Sep;11(9):1484-502.

ARNADOTTIR H, HVANNDAL I, ANDRESDOTTIR V, BURR SE, FREY J, GUDMUNDSDOTTIR BK. The AsaP1 peptidase of *Aeromonas salmonicida* subsp. achromogenes is a highly conserved deuterolysin metalloprotease (family M35) and a major virulence factor. *J Bacteriol.* 2009 Jan;191(1):403-10.

BARBEY C, BUDIN-VERNEUIL A, CAUCHARD S, HARTKE A, LAUGIER C, PICHEREAU V, PETRY S. Proteomic analysis and immunogenicity of secreted proteins from *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *Vet Microbiol.* 2009 Mar 30;135(3-4):334-45.

BARINOV A, LOUX V, HAMMANI A, NICOLAS P, LANGELLA P, EHRLICH D, MAGUIN E, VAN DE GUCHTE M. Prediction of surface exposed proteins in *Streptococcus pyogenes*, with a potential application to other Gram-positive bacteria. *Proteomics.* 2009 Jan;9(1):61-73.

BENDTSEN JD, KIEMER L, FAUSBØLL A, BRUNAK S. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol.* 2005 Oct 7;5:58.

BETTS HJ, CHAUDHURI RR, PALLEN MJ. An analysis of type-III secretion gene clusters in *Chromobacterium violaceum*. *Trends Microbiol.* 2004 Nov;12(11):476-82.

BLEVES S, VIARRE V, SALACHA R, MICHEL GP, FILLOUX A, VOULHOX R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol.* 2010 Dec;300(8):534-43.

BOANCA G, SAND A, BARYCKI JJ. Uncoupling the enzymatic and autoprocesing activities of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase. *J Biol Chem.* 2006 Jul 14;281(28):19029-37.

BOBADILLA FAZZINI RA, LEVICAN G, PARADA P. *Acidithiobacillus thiooxidans* secretome containing a newly described lipoprotein Licanantase enhances chalcopyrite bioleaching rate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011 Feb;89(3):771-80.

BORASTON AB, BOLAM DN, GILBERT HJ, DAVIES GJ. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J.* 2004 Sep 15;382(Pt 3):769-81.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 Sep 30;100(20):11660-5.

BRITO CF, CARVALHO CB, SANTOS F, GAZZINELLI RT, OLIVEIRA SC, AZEVEDO V, TEIXEIRA SM. *Chromobacterium violaceum* genome: molecular mechanisms associated with pathogenicity. *Genet Mol Res.* 2004 Mar 31;3(1):148-61.

BUMANN D, AKSU S, WENDLAND M, JANEK K, ZIMNY-ARNDT U, SABARTH N, MEYER TF, JUNGBLUT PR. Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 2002 Jul;70(7):3396-403.

CASTELLANO I, MERLINO A, ROSSI M, LA CARA F. Biochemical and structural properties of gamma-glutamyl transpeptidase from *Geobacillus thermodenitrificans*: an enzyme specialized in hydrolase activity. *Biochimie.* 2010 May;92(5):464-74.

CHAVES DF, DE SOUZA EM, MONTEIRO RA, DE OLIVEIRA PEDROSA F. A two-dimensional electrophoretic profile of the proteins secreted by *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *J Proteomics.* 2009 Nov 2;73(1):50-6.

CHERNIN LS, WINSON MK, THOMPSON JM, HARAN S, BYCROFT BW, CHET I, WILLIAMS P, STEWART GS. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. *J Bacteriol.* 1998 Sep;180(17):4435-41.

CROSSLEY RA, GASKIN DJ, HOLMES K, MULHOLLAND F, WELLS JM, KELLY DJ, VAN VLIET AH, WALTON NJ. Riboflavin biosynthesis is associated with assimilatory ferric reduction and iron acquisition by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Dec;73(24):7819-25.

DALLO SF, KANNAN TR, BLAYLOCK MW, BASEMAN JB. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 2002 Nov;46(4):1041-51.

DE ALMEIDA R, TREVILATO PB, BARTOLETI LA, PROENÇA-MÓDENA JL, HANNA ES, GREGORACCI GB, BROCCHI M. Bacteriophages and insertion sequences of *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. *Genet Mol Res.* 2004 Mar 31;3(1):76-84.

DEBROY S, DAO J, SÖDERBERG M, ROSSIER O, CIANCIOTTO NP. *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 12;103(50):19146-51.

DENG W, DE HOOG CL, YU HB, LI Y, CROXEN MA, THOMAS NA, PUENTE JL, FOSTER LJ, FINLAY BB. A comprehensive proteomic analysis of the type III secretome of *Citrobacter rodentium*. J Biol Chem. 2010 Feb 26;285(9):6790-800.

DESVAUX M, DUMAS E, CHAFSEY I, CHAMBON C, HÉBRAUD M. Comprehensive appraisal of the extracellular proteins from a monoderm bacterium: theoretical and empirical exoproteomes of *Listeria monocytogenes* EGD-e by secretomics. J Proteome Res. 2010 Oct 1;9(10):5076-92.

DESVAUX M, HÉBRAUD M, TALON R, HENDERSON IR. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. Trends Microbiol. 2009 Apr;17(4):139-45.

DÍAZ-MEJÍA JJ, BABU M, EMILI A. Computational and experimental approaches to chart the *Escherichia coli* cell-envelope-associated proteome and interactome. FEMS Microbiol Rev. 2009 Jan;33(1):66-97.

FANTINATTI-GARBOGGINI F, ALMEIDA R, PORTILLO VDO A, BARBOSA TA, TREVILATO PB, NETO CE, COÊLHO RD, SILVA DW, BARTOLETI LA, HANNA ES, BROCCHI M, MANFIO GP. Drug resistance in *Chromobacterium violaceum*. Genet Mol Res. 2004 Mar 31;3(1):134-47.

FISCHER M, BACHER A. Biosynthesis of vitamin B2: Structure and mechanism of riboflavin synthase. Arch Biochem Biophys. 2008 Jun 15;474(2):252-65.

FLIEGER A, RYDZEWSKI K, BANERJI S, BROICH M, HEUNER K. Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of *Legionella pneumophila*, *plaB*, exhibiting hemolytic activity. Infect Immun. 2004 May;72(5):2648-58.

FRIDOVICH I. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu Rev Biochem. 1995;64:97-112.

GALKA F, WAI SN, KUSCH H, ENGELMANN S, HECKER M, SCHMECK B, HIPPENSTIEL S, UHLIN BE, STEINERT M. Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. Infect Immun. 2008 May;76(5):1825-36.

GRANGEIRO TB, JORGE DM, BEZERRA WM, VASCONCELOS AT, SIMPSON AJ. Transport genes of *Chromobacterium violaceum*: an overview. Genet Mol Res. 2004 Mar 31;3(1):117-33.

GREENBAUM D, LUSCOMBE NM, JANSEN R, QIAN J, GERSTEIN M. Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: 'oming in on function. *Genome Res.* 2001 Sep;11(9):1463-8.

GUTTMAN DS, VINATZER BA, SARKAR SF, RANALL MV, KETTLER G, GREENBERG JT. A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science.* 2002 Mar 1;295(5560):1722-6.

HAN HJ, TAKI T, KONDO H, HIRONO I, AOKI T. Pathogenic potential of a collagenase gene from *Aeromonas veronii*. *Can J Microbiol.* 2008 Jan;54(1):1-10.

HAVLIS J, THOMAS H, SEBELA M, SHEVCHENKO A. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem.* 2003 Mar 15;75(6):1300-6.

HIGGINS CF. ABC transporters: physiology, structure and mechanism - an overview. *Res Microbiol.* 2001 Apr-May;152(3-4):205-10.

HOLDEN MJ, MAYHEW MP, GALLAGHER DT, VILKER VL. Chorismate lyase: kinetics and engineering for stability. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Jan 31;1594(1):160-7.

HUBERTS DH, VAN DER KLEI IJ. Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Apr;1803(4):520-5.

IMLAY JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:755-76.

JEFFERY CJ. Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet.* 2003 Aug;19(8):415-7.

JOHNSEN MG, HANSEN OC, STOUGAARD P. Isolation, characterization and heterologous expression of a novel chitosanase from *Janthinobacterium sp.* strain 4239. *Microb Cell Fact.* 2010 Jan 22;9:5.

JONAK J. Bacterial elongation factors EF-Tu, their mutants, chimeric forms, and domains: isolation and purification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Apr 15;849(1-2):141-53.

KAAKOUSH NO, MAN SM, LAMB S, RAFTERY MJ, WILKINS MR, KOVACH Z, MITCHELL H. The secretome of *Campylobacter concisus*. *FEBS J.* 2010 Apr;277(7):1606-17.

LEPKA D, WILHARM G. Flagellin genes of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A: playground of evolution towards novel flagellin functions. *Microb Res.* 2010; 2(1):31-6.

MARIAPPAN V, VELLASAMY KM, THIMMA JS, HASHIM OH, VADIVELU J. Identification of immunogenic proteins from *Burkholderia cepacia* secretome using proteomic analysis. *Vaccine*. 2010 Feb 3;28(5):1318-24.

MCCARTER LL. Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol*. 1995 Mar;177(6):1595-609.

MONNET V. Bacterial oligopeptide-binding proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Oct;60(10):2100-14.

NEUHOFF V, AROLD N, TAUBE D, EHRHARDT W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. 1988 Jun;9(6):255-62.

PAULE BJ, MEYER R, MOURA-COSTA LF, BAHIA RC, CARMINATI R, REGIS LF, VALE VL, FREIRE SM, NASCIMENTO I, SCHAEER R, AZEVEDO V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expr Purif*. 2004 Apr;34(2):311-6.

PEREIRA M, PARENTE JA, BATAUS LA, CARDOSO DD, SOARES RB, SOARES CM. Chemotaxis and flagellar genes of *Chromobacterium violaceum*. *Genet Mol Res*. 2004 Mar 31;3(1):92-101.

RHEE SG, CHAE HZ, KIM K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med*. 2005 Jun 15;38(12):1543-52.

SHIMOSAKA M, FUKUMORI Y, ZHANG XY, HE NJ, KODAIRA R, OKAZAKI M. Molecular cloning and characterization of a chitosanase from the chitosanolytic bacterium *Burkholderia gladioli* strain CHB101. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2000 Sep;54(3):354-60.

SHINODA S, MATSUOKA H, TSUCHIE T, MIYOSHI S, YAMAMOTO S, TANIGUCHI H, MIZUGUCHI Y. Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. *J Gen Microbiol*. 1991 Dec;137(12):2705-11.

SILHAVY TJ, KAHNE D, WALKER S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 May 1;2(5):a000414.

TATUSOV RL, NATALE DA, GARKAVTSEV IV, TATUSOVA TA, SHANKAVARAM UT, RAO BS, KIRYUTIN B, GALPERIN MY, FEDOROVA ND, KOONIN EV. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jan 1;29(1):22-8.

TERASHIMA H, KOJIMA S, HOMMA M. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2008;270:39-85.

TJALSMA H, ANTELMANN H, JONGBLOED JD, BRAUN PG, DARMON E, DORENBOS R, DUBOIS JY, WESTERS H, ZANEN G, QUAX WJ, KUIPERS OP, BRON S, HECKER M, VAN DIJL JM. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004 Jun;68(2):207-33.

TJALSMA H, BOLHUIS A, JONGBLOED JD, BRON S, VAN DIJL JM. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000 Sep;64(3):515-47.

TSENG TT, TYLER BM, SETUBAL JC. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol*. 2009 Feb 19;9 Suppl 1:S2

VAN ULSEN P, TOMMASSEN J. Protein secretion and secreted proteins in pathogenic Neisseriaceae. *FEMS Microbiol Rev*. 2006 Mar;30(2):292-319.

VINCENT F, MOLIN DD, WEINER RM, BOURNE Y, HENRISSAT B. Structure of a polyisoprenoid binding domain from *Saccharophagus degradans* implicated in plant cell wall breakdown. *FEBS Lett*. 2010 Apr 16;584(8):1577-84.

VIRATYOSIN W, INGSRISWANG S, PACHARAWONGSAKDA E, PALITTAPONGARNPIM P. Genome-wide subcellular localization of putative outer membrane and extracellular proteins in *Leptospira interrogans* serovar Lai genome using bioinformatics approaches. *BMC Genomics*. 2008 Apr 21;9:181.

WATANABE K. Collagenolytic proteases from bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004 Feb;63(5):520-6.

WU Z, ZHANG W, LU C. Comparative proteome analysis of secreted proteins of *Streptococcus suis* serotype 9 isolates from diseased and healthy pigs. *Microb Pathog*. 2008 Sep;45(3):159-66.

YEN YT, BHATTACHARYA M, STATHOPOULOS C. Genome-wide in silico mapping of the secretome in pathogenic *Yersinia pestis* KIM. *FEMS Microbiol Lett*. 2008 Feb;279(1):56-63.

YOUNG CC, BERNLOHR RW. Elongation factor Tu is methylated in response to nutrient deprivation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1991 May;173(10):3096-100.

4 CONCLUSÃO GERAL

A *C. violaceum* é uma bactéria amplamente distribuída na região amazônica. Neste trabalho, foram abordados dois aspectos desse versátil micro-organismo: sua capacidade de sobreviver em meio contendo o metaloide tóxico arsênio e sua grande adaptabilidade a diferentes ambientes, inclusive de forma patológica. A técnica escolhida foi a análise proteômica, que permitiu estudar centenas de proteínas intra e extracelulares da *C. violaceum* ao mesmo tempo e de forma comparativa, possibilitando a visualização de vários processos fisiológicos em resposta a diferentes estímulos.

A resposta global da *C. violaceum* ao arsênio foi caracterizada primariamente como o combate ao estresse oxidativo, com adaptação de vias do metabolismo energético ao trabalho de reparo e manutenção das atividades celulares.

O exoproteoma *C. violaceum* revelou uma série de ferramentas moleculares fundamentais para a adaptação às condições externas variáveis às quais está exposta e um arsenal de proteínas que atuam no processo de invasão e lesão de um organismo hospedeiro.

Este é o primeiro trabalho de análise proteômica das proteínas extracelulares de *C. violaceum* e da resposta da bactéria ao arsênio e mostra a complexidade da adaptação da bactéria a condições de estresse.

APÊNDICE A - Proteínas Extracelulares de *C. violaceum* Preditas pelo SurfG+.

RefSeq	Locus_tag	Description	COG ^a
NP_899676	CV_0006	Site-specific DNA-methyltransferase, cytosine-specific	V
NP_899700	CV_0030	Hypothetical protein CV_0030	S
NP_899713	CV_0043	Hypothetical protein CV_0043	R
NP_899726	CV_0056	Aminopeptidase	R
NP_899727	CV_0057	Class 4 metalloprotease	E
NP_899730	CV_0060	Endonuclease	L
NP_899733	CV_0063	Hypothetical protein CV_0063	S
NP_899734	CV_0064	Hypothetical protein CV_0064	S
NP_899736	CV_0066	Hypothetical protein CV_0066	S
NP_899747	CV_0077	Tonb-dependent receptor	P
NP_899751	CV_0081	Cytochrome c4	C
NP_899760	CV_0090	Hypothetical protein CV_0090	S
NP_899766	CV_0096	Hypothetical protein CV_0096	S
NP_899772	CV_0102	ABC transporter periplasmic substrate-binding protein	ET
NP_899779	CV_0109	Translocation protein tolB	U
NP_899786	CV_0116	ABC transporter periplasmic substrate-binding protein	ET
NP_899790	CV_0120	Amino acid ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	ET
NP_899828	CV_0158	Sulfite dehydrogenase - subunit a	R
NP_899829	CV_0159	Sulfite dehydrogenase - subunit b	R
NP_899842	CV_0172	Poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase	Q
NP_899845	CV_0175	Cytochrome C transmembrane protein	C
NP_899871	CV_0201	Hypothetical protein CV_0201	S
NP_899874	CV_0204	Hypothetical protein CV_0204	ET
NP_899884	CV_0214	Hypothetical protein CV_0214	S
NP_899885	CV_0215	Hypothetical protein CV_0215	S
NP_899894	CV_0224	Carboxycyclohexadienyl dehydratase	ET
NP_899918	CV_0248	Hypothetical protein CV_0248	ET
NP_899932	CV_0262	Sugar ABC transporter periplasmic protein	G
NP_899933	CV_0263	Hypothetical protein CV_0263	S
NP_899941	CV_0271	Methyl parathion hydrolase	R
NP_899942	CV_0272	Hypothetical protein CV_0272	S
NP_899959	CV_0289	Glutathione S-transferase family protein	O
NP_899962	CV_0292	Bifunctional 2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase/3'-nucleotidase periplasmic precursor protein	F
NP_899972	CV_0302	Hypothetical protein CV_0302	S
NP_899980	CV_0310	Hypothetical protein CV_0310	T
NP_900044	CV_0374	Hypothetical protein CV_0374	ET
NP_900047	CV_0377	Ribose ABC transporter substrate-binding protein	G
NP_900052	CV_0382	Hypothetical protein CV_0382	S
NP_900054	CV_0384	Hypothetical protein CV_0384	ET
NP_900067	CV_0397	Hypothetical protein CV_0397	E
NP_900112	CV_0442	Hypothetical protein CV_0442	S
NP_900116	CV_0446	ABC transporter	Q
NP_900117	CV_0447	ABC transporter substrate-binding protein	Q
NP_900136	CV_0466	Hypothetical protein CV_0466	V
NP_900146	CV_0476	Hypothetical protein CV_0476	S
NP_900149	CV_0479	Type-4 fimbrial biogenesis protein	S
NP_900151	CV_0481	Hypothetical protein CV_0481	NU
NP_900164	CV_0494	Outer membrane receptor protein	H
NP_900166	CV_0496	Substrate-binding periplasmic (PBP) ABC transporter protein	P
NP_900174	CV_0504	Hypothetical protein CV_0504	S
NP_900194	CV_0524	Zinc metalloprotease	R
NP_900205	CV_0535	Hypothetical protein CV_0535	S
NP_900223	CV_0553	Carbohydrate-binding protein	S
NP_900224	CV_0554	Carbohydrate-binding protein	S
NP_900245	CV_0575	Hypothetical protein CV_0575	M

RefSeq	Locus tag	Description	COG ^a
NP_900253	CV_0583	Hypothetical protein CV_0583	S
NP_900262	CV_0592	Hypothetical protein CV_0592	S
NP_900271	CV_0601	Cytochrome C oxidase assembly protein	O
NP_900275	CV_0605	Hypothetical protein CV_0605	S
NP_900282	CV_0612	Hypothetical protein CV_0612	R
NP_900289	CV_0619	Hypothetical protein CV_0619	S
NP_900299	CV_0629	Hypothetical protein CV_0629	S
NP_900323	CV_0653	Hypothetical protein CV_0653	R
NP_900353	CV_0683	Hypothetical protein CV_0683	S
NP_900354	CV_0684	Hypothetical protein CV_0684	S
NP_900355	CV_0685	Hypothetical protein CV_0685	S
NP_900356	CV_0686	Hypothetical protein CV_0686	R
NP_900357	CV_0687	Hypothetical protein CV_0687	S
NP_900359	CV_0689	Hypothetical protein CV_0689	S
NP_900368	CV_0698	Hypothetical protein CV_0698	ET
NP_900377	CV_0707	Hypothetical protein CV_0707	S
NP_900399	CV_0729	Poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase	R
NP_900423	CV_0753	Hypothetical protein CV_0753	S
NP_900428	CV_0758	Hypothetical protein CV_0758	M
NP_900443	CV_0773	Capsule polysaccharide export system periplasmic protein	M
NP_900444	CV_0774	Hypothetical protein CV_0774	S
NP_900447	CV_0777	Hypothetical protein CV_0777	S
NP_900452	CV_0782	Hypothetical protein CV_0782	NU
NP_900462	CV_0792	ABC transporter periplasmic-binding protein	ET
NP_900465	CV_0795	Hypothetical protein CV_0795	S
NP_900466	CV_0796	Periplasmic protein	P
NP_900470	CV_0800	Oligopeptide ABC transporter system, substrate-binding protein	E
NP_900499	CV_0829	Type 4 fimbrial biogenesis protein pilq	U
NP_900507	CV_0837	Hypothetical protein CV_0837	MU
NP_900512	CV_0842	Hypothetical protein CV_0842	S
NP_900522	CV_0852	Lysine/arginine/ornithine ABC transporter	ET
NP_900527	CV_0857	Hypothetical protein CV_0857	S
NP_900537	CV_0867	Superoxide dismutase	P
NP_900555	CV_0885	Alginate regulatory protein	R
NP_900565	CV_0895	Outer membrane protein oprc complement	P
NP_900579	CV_0909	Non-hemolytic phospholipase C precursor	M
NP_900589	CV_0919	C4-dicarboxylate-binding periplasmic protein	G
NP_900595	CV_0925	Polyamine ABC transporter system, substrate-binding protein	E
NP_900600	CV_0930	Hypothetical protein CV_0930	S
NP_900602	CV_0932	Hypothetical protein CV_0932	S
NP_900608	CV_0938	ABC transporter phosphate-binding protein	P
NP_900626	CV_0956	Rnase	J
NP_900630	CV_0960	Rnase I precursor	J
NP_900668	CV_0998	Lipase/esterase	N
NP_900669	CV_0999	Flagella basal body P-ring formation protein flga	NO
NP_900689	CV_1019	Tonb-dependent receptor	P
NP_900705	CV_1035	Hypothetical protein CV_1035	S
NP_900710	CV_1040	FAD-dependent oxidoreductase	C
NP_900717	CV_1047	Hypothetical protein CV_1047	S
NP_900752	CV_1082	Hypothetical protein CV_1082	S
NP_900767	CV_1083	Binding protein component of ABC dipeptide transporter	S
NP_900784	CV_1084	Hypothetical protein CV_1114	S
NP_900789	CV_1119	Hypothetical protein CV_1119	ET
NP_900795	CV_1125	Serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	M
NP_900798	CV_1128	Hypothetical protein CV_1128	S
NP_900806	CV_1136	Hypothetical protein CV_1136	P
NP_900811	CV_1141	Hypothetical protein CV_1141	S
NP_900812	CV_1142	Hypothetical protein CV_1142	S
NP_900865	CV_1195	ABC transporter periplasmic-binding protein	M

RefSeq	Locus tag	Description	COG ^a
NP_900870	CV_1200	Hypothetical protein CV_1200	S
NP_900872	CV_1202	Ribonuclease precursor	J
NP_900876	CV_1206	Methionyl-trna synthetase	J
NP_900881	CV_1211	Hypothetical protein CV_1211	S
NP_900908	CV_1238	Rhs-related protein	M
NP_900909	CV_1239	Rhs-related transmembrane protein related	M
NP_900939	CV_1269	Hypothetical protein CV_1269	E
NP_900940	CV_1270	Dipeptidyl aminopeptidase	E
NP_900945	CV_1275	ABC transporter periplasmic-binding protein	ET
NP_900964	CV_1294	Fimbrial subunit protein	NU
NP_900965	CV_1295	Chaperone protein ecpd precursor	NU
NP_900966	CV_1296	Outer membrane usher protein precursor	NU
NP_900967	CV_1297	Hypothetical protein CV_1297	NU
NP_900968	CV_1298	Hypothetical protein CV_1298	S
NP_900974	CV_1304	Hypothetical protein CV_1304	S
NP_900980	CV_1310	Beta-lactamase	V
NP_900991	CV_1311	Hypothetical protein CV_1321	S
NP_900995	CV_1325	Thiol-disulfide isomerase and thioredoxin	O
NP_901009	CV_1339	Hypothetical protein CV_1339	S
NP_901039	CV_1369	Hypothetical protein CV_1369	S
NP_901040	CV_1370	Hypothetical protein CV_1370	G
NP_901041	CV_1371	Hypothetical protein CV_1371	S
NP_901052	CV_1382	Hypothetical protein CV_1382	S
NP_901053	CV_1383	Hypothetical protein CV_1383	S
NP_901085	CV_1415	G-glutamyltransferase precursor	E
NP_901092	CV_1422	Hypothetical protein CV_1422	S
NP_901110	CV_1440	Hydrolase transmembrane protein	R
NP_901113	CV_1443	Hypothetical protein CV_1443	S
NP_901115	CV_1445	Hypothetical protein CV_1445	S
NP_901159	CV_1489	Periplasmic substrate-binding transport protein	P
NP_901161	CV_1491	Outer membrane receptor	P
NP_901163	CV_1493	B-N-acetylhexosaminidase	G
NP_901164	CV_1494	Epoxide hydrolase protein	R
NP_901177	CV_1507	Amino acid ABC transporter periplasmic protein	ET
NP_901182	CV_1512	Hypothetical protein CV_1512	S
NP_901183	CV_1513	Alkaline phosphatase precursor	P
NP_901203	CV_1533	Hypothetical protein CV_1533	S
NP_901229	CV_1559	Iron transport system substrate-binding protein	P
NP_901272	CV_1602	Hypothetical protein CV_1602	ET
NP_901279	CV_1609	Peptidoglycan N-acetylmuramoylhydrolase	M
NP_901284	CV_1614	Outer membrane lipoproteins carrier protein	M
NP_901288	CV_1618	Oxidoreductase	R
NP_901289	CV_1619	Hypothetical protein CV_1619	S
NP_901297	CV_1627	Acriflavin resistance protein E	M
NP_901316	CV_1646	Outer membrane porin	M
NP_901322	CV_1652	Methyl-accepting chemotaxis protein	NT
NP_901325	CV_1655	Hypothetical protein CV_1655	S
NP_901333	CV_1663	Hypothetical protein CV_1663	S
NP_901339	CV_1669	Hypothetical protein CV_1669	S
NP_901341	CV_1671	Hypothetical protein CV_1671	ET
NP_901342	CV_1672	Hypothetical protein CV_1672	S
NP_901351	CV_1681	ABC transporter periplasmic-binding protein	P
NP_901356	CV_1686	Hypothetical protein CV_1686	S
NP_901370	CV_1700	Flagella basal body P-ring formation protein flga	NO
NP_901378	CV_1708	Flagellar basal body P-ring protein	N
NP_901382	CV_1712	Phospholipase D/ transphosphatidylase	I
NP_901389	CV_1719	Hypothetical protein CV_1719	S
NP_901406	CV_1736	Secretion protein	V
NP_901471	CV_1801	Hypothetical protein CV_1801	S

RefSeq	Locus tag	Description	COG ^a
NP_901502	CV_1832	Sulfate transport system sulfate-binding protein	P
NP_901524	CV_1854	Periplasmic binding protein-related protein	P
NP_901525	CV_1855	Iron uptake ABC transporter periplasmic solute-binding protein	P
NP_901548	CV_1878	ABC transporter ATP-binding protein	MU
NP_901558	CV_1888	Hypothetical protein CV_1888	S
NP_901567	CV_1897	Endochitinase	R
NP_901577	CV_1907	Hypothetical protein CV_1907	S
NP_901578	CV_1908	ABC transporter, iron binding protein	P
NP_901587	CV_1917	Hemolysin activator protein	U
NP_901588	CV_1918	Hemolysin	R
NP_901603	CV_1933	Hypothetical protein CV_1933	S
NP_901613	CV_1943	Hypothetical protein CV_1943	S
NP_901627	CV_1957	Polyamine ABC transporter system, substrate-binding protein	E
NP_901630	CV_1960	Hypothetical protein CV_1960	S
NP_901635	CV_1965	Protease	O
NP_901638	CV_1968	Protease	O
NP_901640	CV_1970	Tonb-dependent receptor protein	P
NP_901641	CV_1971	Hypothetical protein CV_1971	S
NP_901648	CV_1978	Heme-binding protein A precursor	E
NP_901652	CV_1982	Tonb dependent receptor	P
NP_901657	CV_1987	Metallopeptidase	O
NP_901659	CV_1989	Porin protein	M
NP_901678	CV_2008	Hypothetical protein CV_2008	S
NP_901679	CV_2009	Hypothetical protein CV_2009	R
NP_901687	CV_2017	Hypothetical protein CV_2017	ET
NP_901704	CV_2034	Peptidoglycan N-acetylmuramoylhydrolase	M
NP_901719	CV_2049	Hypothetical protein CV_2049	S
NP_901730	CV_2060	Negative regulator for alginate biosynthesis mucb	T
NP_901731	CV_2061	Serine protease mucd precursor	O
NP_901747	CV_2077	Hypothetical protein CV_2077	S
NP_901750	CV_2080	Hypothetical protein CV_2080	E
NP_901766	CV_2096	Transmembrane protein	S
NP_901770	CV_2100	Hypothetical protein CV_2100	S
NP_901773	CV_2103	Hypothetical protein CV_2103	S
NP_901796	CV_2126	Hypothetical protein CV_2126	S
NP_901818	CV_2148	Hypothetical protein CV_2148	S
NP_901874	CV_2204	Outer membrane protein	M
NP_901875	CV_2205	Outer membrane protein	M
NP_901884	CV_2214	Hypothetical protein CV_2214	S
NP_901900	CV_2230	Enterobactin-iron outermembrane receptor protein	P
NP_901908	CV_2238	Hypothetical protein CV_2238	S
NP_901967	CV_2297	Outer membrane lipoprotein	P
NP_901973	CV_2303	Hypothetical protein CV_2303	E
NP_902017	CV_2347	Membrane lipoprotein	R
NP_902032	CV_2362	Fkbp-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase fkpa precursor	O
NP_902064	CV_2394	Cell division ftsk transmembrane protein	D
NP_902070	CV_2400	Sensor protein evgs precursor	T
NP_902073	CV_2403	Hypothetical protein CV_2403	S
NP_902078	CV_2408	Hypothetical protein CV_2408	S
NP_902081	CV_2411	Hypothetical protein CV_2411	S
NP_902098	CV_2428	Hypothetical protein CV_2428	ET
NP_902130	CV_2460	Hypothetical protein CV_2460	V
NP_902132	CV_2462	Hypothetical protein CV_2462	ET
NP_902137	CV_2467	Membrane lipoprotein	R
NP_902160	CV_2490	Hypothetical protein CV_2490	S
NP_902183	CV_2513	Methyl-accepting chemotaxis protein	NT
NP_902194	CV_2524	Transmembrane protein	S
NP_902195	CV_2525	Transmembrane protein	S
NP_902232	CV_2562	Penicillin-binding protein 2	M

RefSeq	Locus tag	Description	COG ^a
NP_902233	CV_2563	Hypothetical protein CV_2563	S
NP_902234	CV_2564	Hypothetical protein CV_2564	R
NP_902241	CV_2571	Lasa protease precursor	M
NP_902262	CV_2592	Carbohydrate-binding protein	S
NP_902267	CV_2597	Type III secretion system escc protein	NU
NP_902284	CV_2614	Hypothetical protein CV_2614	S
NP_902302	CV_2632	Invasion protein - outer membrane	NU
NP_902307	CV_2637	Disulfide isomerase/thiol-disulfide oxidase	O
NP_902309	CV_2639	Hypothetical protein CV_2639	S
NP_902311	CV_2641	Cell invasion protein	M
NP_902321	CV_2651	Hypothetical protein CV_2651	S
NP_902336	CV_2666	Hypothetical protein CV_2666	S
NP_902344	CV_2674	Hypothetical protein CV_2674	S
NP_902346	CV_2676	Endo-1,4-D-glucanase	G
NP_902358	CV_2688	Binding protein component of ABC transporter	E
NP_902375	CV_2705	Hypothetical protein CV_2705	M
NP_902383	CV_2713	Lipase chaperone	O
NP_902384	CV_2714	Triacylglycerol lipase	R
NP_902388	CV_2718	Hypothetical protein CV_2718	S
NP_902390	CV_2720	3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	I
NP_902391	CV_2721	Outer membrane protein	I
NP_902402	CV_2732	Hypothetical protein CV_2732	M
NP_902413	CV_2743	Hypothetical protein CV_2743	S
NP_902414	CV_2744	Hypothetical protein CV_2744	S
NP_902416	CV_2746	Hypothetical protein CV_2746	S
NP_902423	CV_2753	Disulphide-isomerase	O
NP_902471	CV_2801	Hypothetical protein CV_2801	S
NP_902478	CV_2808	Beta-lactamase/D-alanine carboxypeptidase	V
NP_902479	CV_2809	Hypothetical protein CV_2809	G
NP_902480	CV_2810	Oxidoreductase	QR
NP_902481	CV_2811	Hypothetical protein CV_2811	R
NP_902492	CV_2822	Amino acid ABC transporter	E
NP_902517	CV_2847	Fusaric acid resistance protein fuse II	V
NP_902521	CV_2851	Hypothetical protein CV_2851	R
NP_902528	CV_2858	Taurine transport system substrate-binding protein	P
NP_902529	CV_2859	Methyl-accepting chemotaxis protein	NT
NP_902533	CV_2863	Hypothetical protein CV_2863	C
NP_902543	CV_2873	Hemolysin activator protein	U
NP_902551	CV_2881	Flagellar basal body P-ring protein	N
NP_902557	CV_2887	Flagellar basal-body rod protein flgc	N
NP_902563	CV_2893	Hypothetical protein CV_2893	S
NP_902567	CV_2897	Sugar ABC transporter periplasmic sugar-binding protein	G
NP_902576	CV_2906	Hypothetical protein CV_2906	S
NP_902602	CV_2932	Signal peptide protein	O
NP_902603	CV_2933	Signal peptide protein	O
NP_902605	CV_2935	Chitinase A	G
NP_902608	CV_2938	Hypothetical protein CV_2938	R
NP_902613	CV_2943	Hemin-binding outer membrane transmembrane protein	R
NP_902618	CV_2948	Hypothetical protein CV_2948	S
NP_902636	CV_2966	Hypothetical protein CV_2966	M
NP_902638	CV_2968	Hypothetical protein CV_2968	S
NP_902639	CV_2969	Amino acid ABC transporter, periplasmic-binding protein	ET
NP_902645	CV_2975	Hypothetical protein CV_2975	S
NP_902653	CV_2983	Amino acid ABC transporter periplasmic protein	ET
NP_902661	CV_2991	Hypothetical protein CV_2991	S
NP_902680	CV_3010	Hypothetical protein CV_3010	S
NP_902693	CV_3023	Amino acid ABC transporter periplasmic protein	ET
NP_902726	CV_3056	Cytochrome c precursor	C
NP_902734	CV_3064	High-affinity zinc transport system substrate-binding protein	P

RefSeq	Locus tag	Description	COG ^a
NP_902739	CV_3069	Hypothetical protein CV_3069	C
NP_902746	CV_3076	Hypothetical protein CV_3076	S
NP_902755	CV_3085	Arginine/ornithine ABC transporter substrate-binding protein	ET
NP_902758	CV_3088	Transcriptional regulator	K
NP_902764	CV_3094	D-ala-D-ala-carboxypeptidase	M
NP_902774	CV_3104	Porin signal peptide protein	M
NP_902781	CV_3111	Type-4 fimbrial pilin related signal peptide protein	NU
NP_902782	CV_3112	Type-4 fimbrial biogenesis pilv transmembrane protein	NU
NP_902783	CV_3113	Type 4 fimbrial biogenesis transmembrane protein	NU
NP_902785	CV_3115	Type-4 fimbrial biogenesis pily1-related protein	NU
NP_902820	CV_3150	Beta-lactamase precursor	R
NP_902823	CV_3153	D-alanyl-D-alanine-endopeptidase	M
NP_902827	CV_3157	Putative kinase inhibitor	R
NP_902834	CV_3164	Thiamin-binding periplasmic protein	H
NP_902836	CV_3166	Hypothetical protein CV_3166	S
NP_902837	CV_3167	Amino acid ABC transporter periplasmic protein	ET
NP_902853	CV_3183	Long-chain fatty acid transport protein precursor	I
NP_902854	CV_3184	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	O
NP_902858	CV_3188	Tonb-dependent receptor	P
NP_902864	CV_3194	Hypothetical protein CV_3194	R
NP_902874	CV_3204	Carboxymethylenebutenolidase	Q
NP_902884	CV_3214	Hypothetical protein CV_3214	S
NP_902904	CV_3234	Hypothetical protein CV_3234	S
NP_902912	CV_3242	Hypothetical protein CV_3242	S
NP_902925	CV_3255	Secreted protease	R
NP_902945	CV_3275	Sphingomyelinase/beta-hemolysin	R
NP_902946	CV_3276	Hypothetical protein CV_3276	S
NP_902947	CV_3277	Hypothetical protein CV_3277	S
NP_902953	CV_3282	Hypothetical protein CV_3283	I
NP_902967	CV_3297	Hypothetical protein CV_3297	S
NP_902968	CV_3298	Maltoporin precursor	G
NP_902975	CV_3305	Hypothetical protein CV_3305	S
NP_902986	CV_3316	Chitinase	G
NP_902993	CV_3323	Carbohydrate-binding protein	S
NP_903000	CV_3330	Hypothetical protein CV_3330	S
NP_903023	CV_3353	Hypothetical protein CV_3353	D
NP_903024	CV_3354	Carboxy-terminal processing protease	M
NP_903060	CV_3390	Hypothetical protein CV_3390	S
NP_903061	CV_3391	Hypothetical protein CV_3391	S
NP_903068	CV_3398	Hypothetical protein CV_3398	S
NP_903094	CV_3424	Porin signal peptide protein	M
NP_903096	CV_3426	Binding protein component of ABC dipeptide transporter	E
NP_903140	CV_3470	Hypothetical protein CV_3470	S
NP_903142	CV_3472	Hypothetical protein CV_3472	S
NP_903145	CV_3475	Hypothetical protein CV_3475	S
NP_903160	CV_3490	Glucan 1,4- a-glucosidase	G
NP_903161	CV_3491	Hypothetical protein CV_3491	S
NP_903162	CV_3492	Hypothetical protein CV_3492	S
NP_903167	CV_3497	Hypothetical protein CV_3497	C
NP_903172	CV_3502	Prolyl oligopeptidase family protein	E
NP_903176	CV_3506	Protease precursor	R
NP_903181	CV_3511	Signal peptide protein	S
NP_903182	CV_3512	Signal peptide protein	S
NP_903189	CV_3519	Periplasmic aspartyl protease	O
NP_903196	CV_3526	Hypothetical protein CV_3526	P
NP_903241	CV_3571	Outer membrane protein A precursor	M
NP_903256	CV_3586	Monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylase	M
NP_903260	CV_3590	Hypothetical protein CV_3590	S
NP_903263	CV_3593	Hypothetical protein CV_3593	S

RefSeq	Locus tag	Description	COG ^a
NP_903279	CV_3609	Hypothetical protein CV_3609	S
NP_903287	CV_3617	Hypothetical protein CV_3617	S
NP_903295	CV_3625	Hypothetical protein CV_3625	S
NP_903297	CV_3627	Hypothetical protein CV_3627	S
NP_903311	CV_3641	Hypothetical protein CV_3641	S
NP_903313	CV_3643	Hypothetical protein CV_3643	Q
NP_903321	CV_3651	Glutamine transport system substrate-binding protein	ET
NP_903326	CV_3656	Glycerol-3-phosphate transporter periplasmic binding protein	G
NP_903357	CV_3687	Signal peptidase I	U
NP_903387	CV_3717	Hypothetical protein CV_3717	S
NP_903389	CV_3719	Hypothetical protein CV_3719	S
NP_903394	CV_3724	Hypothetical protein CV_3724	R
NP_903396	CV_3726	Molybdate-binding periplasmic protein precursor	P
NP_903398	CV_3728	Hypothetical protein CV_3728	S
NP_903405	CV_3735	Acyl-coa thioesterase	E
NP_903428	CV_3758	Hypothetical protein CV_3758	R
NP_903431	CV_3761	Hypothetical protein CV_3761	S
NP_903443	CV_3773	Hypothetical protein CV_3773	S
NP_903475	CV_3805	General secretory pathway protein N	U
NP_903477	CV_3807	General secretory pathway protein K	U
NP_903479	CV_3809	General secretion pathway protein I	U
NP_903484	CV_3814	Type II secretion system protein	NU
NP_903485	CV_3815	Hypothetical protein CV_3815	S
NP_903492	CV_3822	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	M
NP_903499	CV_3829	Outer membrane porin precursor	M
NP_903501	CV_3831	DNA transport competence protein	L
NP_903508	CV_3838	Outer membrane drug efflux lipoprotein	MU
NP_903509	CV_3839	Formate dehydrogenase	C
NP_903516	CV_3846	Hypothetical protein CV_3846	E
NP_903534	CV_3864	Hypothetical protein CV_3864	S
NP_903537	CV_3867	Hypothetical protein CV_3867	S
NP_903538	CV_3868	Hypothetical protein CV_3868	S
NP_903566	CV_3896	Tonb-dependent receptor	P
NP_903576	CV_3906	Hypothetical protein CV_3906	M
NP_903595	CV_3925	Periplasmic type I secretion system	MU
NP_903601	CV_3931	Chitosanase A	G
NP_903602	CV_3932	Copg protein	R
NP_903611	CV_3941	Hypothetical protein CV_3941	S
NP_903614	CV_3944	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	I
NP_903642	CV_3972	Hypothetical protein CV_3972	S
NP_903661	CV_3991	Hypothetical protein CV_3991	S
NP_903668	CV_3998	Thiol:disulfide interchange protein dsba precursor	O
NP_903689	CV_4019	UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid dehydrogenase	M
NP_903723	CV_4053	Amino acid ABC transporter periplasmic protein	ET
NP_903734	CV_4064	Hypothetical protein CV_4064	E
NP_903735	CV_4065	Hypothetical protein CV_4065	S
NP_903752	CV_4082	Hypothetical protein CV_4082	S
NP_903769	CV_4099	Polyamine ABC transporter protein	E
NP_903773	CV_4103	Outer membrane protein W precursor	M
NP_903776	CV_4106	Hypothetical protein CV_4106	S
NP_903798	CV_4128	Hypothetical protein CV_4128	S
NP_903818	CV_4148	Hypothetical protein CV_4148	S
NP_903883	CV_4213	Polyamine ABC transporter system, substrate-binding protein	E
NP_903891	CV_4221	Hypothetical protein CV_4221	S
NP_903892	CV_4222	Hypothetical protein CV_4222	ET
NP_903897	CV_4227	Hypothetical protein CV_4227	S
NP_903899	CV_4229	Organic solvent tolerance protein	M
NP_903900	CV_4230	Survival protein sura precursor	O
NP_903910	CV_4240	Chitinase	G

RefSeq	Locus tag	Description	COG ^a
NP_903911	CV_4241	Acid shock protein	R
NP_903919	CV_4249	Hypothetical protein CV_4249	S
NP_903920	CV_4250	Hypothetical protein CV_4250	S
NP_903927	CV_4257	Thioredoxin	O
NP_903931	CV_4261	Hypothetical protein CV_4261	S
NP_903947	CV_4277	Hypothetical protein CV_4277	S
NP_903957	CV_4287	Hypothetical protein CV_4287	S
NP_903965	CV_4295	Hypothetical protein CV_4295	S
NP_903969	CV_4299	Hypothetical protein CV_4299	S
NP_903974	CV_4304	Hypothetical protein CV_4304	S
NP_903977	CV_4307	Hypothetical protein CV_4307	S
NP_903978	CV_4308	Hypothetical protein CV_4308	ET
NP_903985	CV_4315	CDP-diacylglycerol pyrophosphatase	I
NP_903999	CV_4329	Oligopeptide ABC transporter system, substrate-binding protein	E
NP_904003	CV_4333	Hypothetical protein CV_4333	S
NP_904010	CV_4340	Cell division transmembrane protein	M
NP_904020	CV_4350	Hypothetical protein CV_4350	D
NP_904032	CV_4362	Zinc protease	R
NP_904034	CV_4364	Hypothetical protein CV_4364	S
NP_904041	CV_4371	Hypothetical protein CV_4371	S
NP_904056	CV_4386	Cytochrome-c oxidase	C
NP_904061	CV_4391	Hypothetical protein CV_4391	S
NP_904062	CV_4392	ABC transporter	M
NP_904068	CV_4398	ABC export system, membrane fusion protein	V

a. Classes COG: (C) Produção e conversão de energia; (D) Controle do ciclo celular, divisão celular e partição de cromossomo; (E) Metabolismo e transporte de aminoácidos; (F) Metabolismo e transporte de nucleotídeos; (G) Metabolismo e transporte de carboidratos; (H) Metabolismo e transporte de coenzimas; (I) Metabolismo e transporte de lipídeos; (J) Tradução, biogênese e estrutura ribossomal; (K) Transcrição; (L) Replicação, recombinação e reparo; (M) Biogênese de envelope, membrana e parede celular; (N) Motilidade celular; (O) Modificação pós-traducional, renovação de proteínas, chaperonas; (P) Metabolismo e transporte de íons inorgânicos; (Q) Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários; (R) Função geral predita; (S) Função desconhecida; (T) Mecanismos de transdução de sinal; (U) Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular; (V) Mecanismos de defesa.

APÊNDICE B - Mapa Proteico das Proteínas Extracelulares de *C. violaceum*.

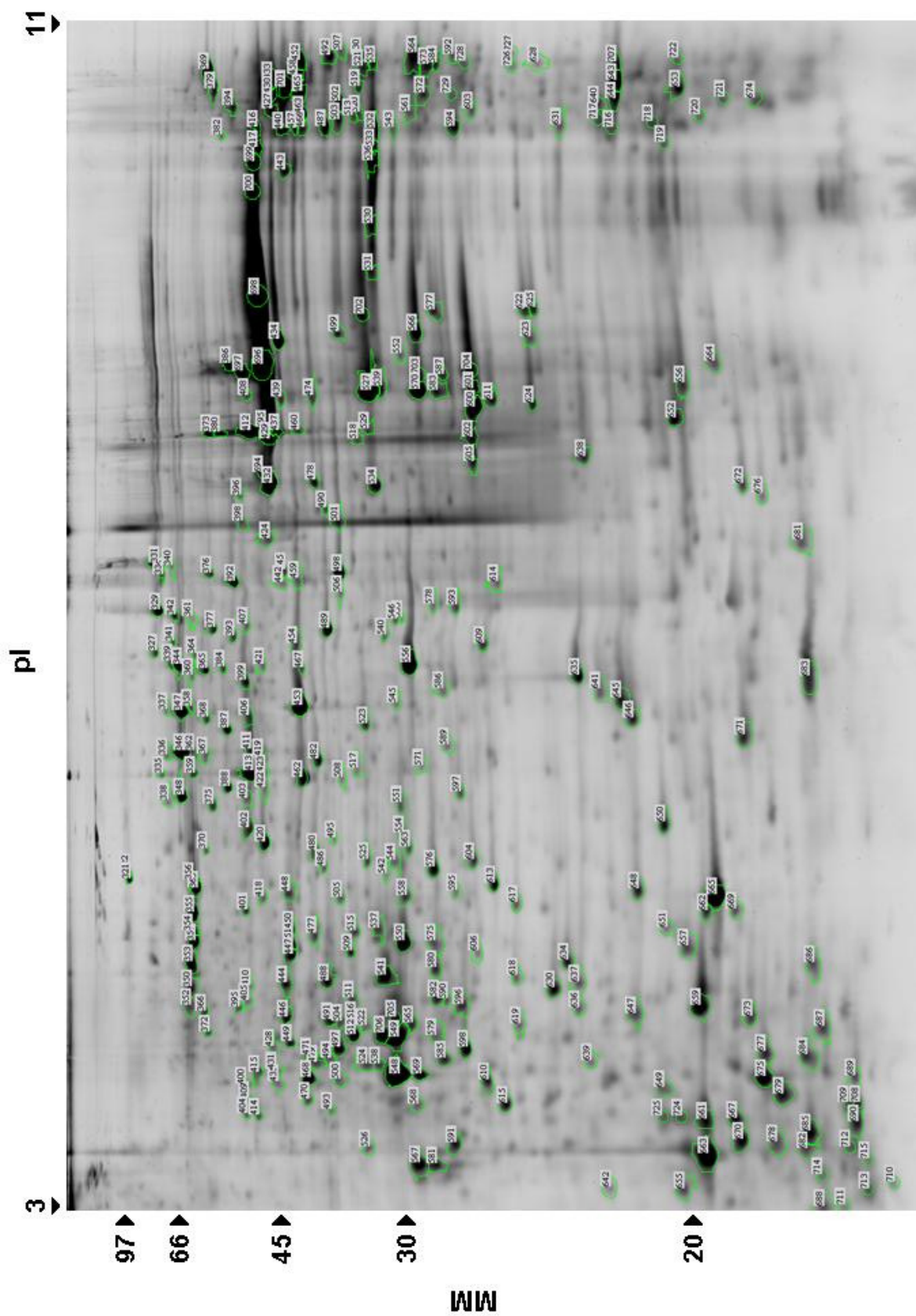


Figura B1: Mapa proteico das proteínas extracelulares de *C. violaceum*. A 2DE foi feita em tiras de gel para IEF de pH 3 a 11NL e gel da SDS-PAGE 15%. As proteínas foram coradas com azul de Coomassie coloidal. A numeração dos spots foi feita pelo programa ImageMaster Platinum 7.0.