

**IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS POR
Burkholderia sp. SMF 07 NA PRESENÇA DE FENOL EM RELAÇÃO À CONDIÇÃO
CONTROLE**

¹Maria Amélia Araújo Soares ; ²Nayanne Hardy Lima Pontes; ³Bruno Bezerra Carneiro; ⁴José Jackson do Nascimento Costa; ⁵João Garcia Alves Filho; ⁶Rodrigo Maranguape Silva da Cunha

Resumo

Bactérias do gênero *Burkholderia* apresentam como uma das suas aplicações biotecnológicas a capacidade de biodegradar compostos xenobióticos recalcitrantes, entre estes o fenol. A proteômica é um novo campo de estudo que se propõe analisar de forma global o conjunto de proteínas expressas, além de obter informações importantes sobre o ciclo de vida, regulação e modificações pós-traducionais de proteínas induzidas em condições específicas. Com base no exposto, o objetivo desse trabalho foi utilizar a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) para identificar proteínas diferencialmente expressas por *Burkholderia* sp. SMF 07 na presença fenol em relação à condição controle. A fim de fazer a extração das proteínas totais foi realizado o crescimento bacteriano em dois meios de cultivo TY (*Tryptone-Yeast Medium*), sendo um controle e o outro suplementado com 1000 mg/mL de fenol, ambos foram incubados a 28 °C. A amostra de proteínas intracelulares obtida foi quantificada pelo método de Bradford e a pureza das proteínas foi verificada pelo padrão de bandas em SDS-PAGE. A partir das proteínas totais extraídas foi determinado o mapa bidimensional de referência para cada condição. O ajuste das imagens dos géis bidimensionais, a detecção de *spots* protéicos e a avaliação dos dados para determinação de variações quantitativas e qualitativas, massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI) dos *spots* foi feito pelo programa *ImageMaster*[®]. As proteínas diferencialmente expressas no grupo fenol em relação ao grupo controle foram identificadas utilizando os valores de pI e MM do *spot* contra um banco de dados de proteínas *Uniprot* disponível no servidor *Expasy*. A análise estatística foi realizada aplicando o teste *Mann-Whitney* considerando $p < 0,05$. Foi possível verificar nos géis 2DE proteínas que apresentaram expressão quantitativa reduzida no grupo fenol em relação ao grupo controle. Entre estas se destacam aquelas envolvidas na biossíntese de nucleotídeos e de ácidos graxos, moléculas importantes para o desenvolvimento e manutenção da estrutura microbiana. Através da análise proteômica concluiu-se que o poluente interferiu na expressão de proteínas importantes para o metabolismo e manutenção da estrutura celular.

Palavras-chave: *Burkholderia*, Proteômica, Fenol.

Introdução

Define-se por poluição a degradação da qualidade ambiental resultante de atividades que direta ou indiretamente prejudiquem a saúde, a segurança e o bem-estar da população; criem condições adversas às atividades sociais e econômicas; afetem desfavoravelmente a biota; afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente ou lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos (BRASIL, 1981).

A poluição dos recursos hídricos ocorre devido ao lançamento, nos corpos de água, de contaminantes, que podem ser de origem natural, sintetizadas pelo metabolismo biológico, como por exemplo, hidrocarbonetos presentes em combustíveis fósseis e metais pesados presentes em minerais, ou de origem sintética, produzidos por tecnologias industriais modernas apresentando estruturas químicas complexas e estranhas ao meio ambiente (xenobióticos) (DIAZ, 2004; GAYRLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

Dentre os diversos contaminantes ambientais produzidos sinteticamente, estão os fenóis ou compostos fenólicos, que são a unidade estrutural básica para diversos compostos orgânicos sintéticos, como por exemplo, químicos agrícolas e pesticidas, além de estarem envolvidos nas etapas de processamento de produtos de várias indústrias, tais como, a da borracha, tecido, papel e celulose, madeira, cola e adesivos, aço e ferro, e ainda na fabricação de fibras sintéticas (náilon) e na produção de intermediários químicos utilizados em inúmeras outras aplicações, que vão desde a fabricação de plástico a produtos farmacêuticos e agrícolas. Os detritos resultantes da produção destas indústrias, na maioria das vezes são tóxicos e recalcitrantes e não são adequadamente tratados sendo lançados diretamente no meio ambiente, podendo atingir rapidamente as fontes de água, causando danos às espécies aquáticas e ao homem. Este fato faz dessas industriais as principais responsáveis pela presença desses compostos xenobióticos tóxicos no meio ambiente (BASHA; RAJENDRAN; THANGAVELU, 2010; CETESB, 2012; NANDISH, 2005).

Diversas tecnologias vêm sendo utilizadas no processo de tratamento de ambientes contaminados com fenol e seus derivados. Entre estas se destaca a biorremediação, uma técnica que utiliza o metabolismo dos micro-organismos para converter substâncias complexas e tóxicas, lançadas no meio ambiente, em compostos mais simples e menos poluente ou até mesmo em substâncias inertes (THAPA; KC; GHIMIRE, 2012).

Várias bactérias incluindo aquelas pertencentes ao gênero *Burkholderia* têm sido identificadas como tendo ampla capacidade de degradar compostos aromáticos (BASHA; RAJENDRAN; THANGAVELU, 2010). Com o objetivo de se obter informações sobre os mecanismos envolvidos nas vias metabólicas de biodegradação desses compostos, foram desenvolvidas diversas tecnologias inovadoras, incluindo a proteômica. A análise proteômica permite, além de outros benefícios, obter informações importantes sobre o ciclo de vida, regulação e modificações pós-traducionais de proteínas induzidas em condições específicas (KIM; CHOI; KAHNG, 2007).

O objetivo do trabalho foi utilizar a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) para identificar proteínas diferencialmente expressas por *Burkholderia* sp. SMF 07 na presença fenol em relação à condição controle.

Materiais e Métodos

A extração das proteínas intracelulares foi realizada de acordo com Riedel *et al.* (2006) com algumas modificações. Para este fim, a cepa de *Burkholderia* sp. SMF 07 foi crescida *overnight* em 10 mL de meio TY à 28°C sob agitação orbital de 250 rpm. Em seguida, o pré-inóculo foi adicionado a 1,3 L de TY. A indução da expressão de proteínas foi realizada através da adição de 1000 mg/L de fenol. Usando sempre um controle para cada meio com o poluente (grupo fenol) que constava apenas de meio TY e o isolado característico, para que pudesse ser comparada a expressão proteica de cada condição envolvida no estudo. O crescimento bacteriano foi monitorado através da O.D_{600 nm} utilizando o espectrofotômetro (*GenQuant, GE HealthcareTM*). Quando as suspensões bacterianas estavam na fase *log* de crescimento bacteriano uma alíquota foi retirada e utilizada para realização do teste de coloração de Gram (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005) e o restante foi centrifugado a 5000 rpm a 4°C por 30 minutos, para obtenção do sobrenadante e do decantado (*pellet*), sendo o primeiro descartado, e o último utilizado para a extração das proteínas intracelulares. Dessa forma o precipitado (*pellet*) foi lavado duas vezes com 10 mL de Tris/HCl 50 mM, pH 7,5. Após as lavagens foi adicionado 10 mL de Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 acrescido de 40 µL do Inibidor de Protease (*Protease Inibidor Mix (GE HealthcareTM)*). As células foram lisadas por sonicação (10 pulsos de 20 segundos com intervalo de 1 minuto entre cada pulso – com 50% de potência). Após sonicadas, as células foram centrifugadas a 12000 rpm por 1 hora e 30 minutos a 4°C para remoção dos *debris*. O sobrenadante foi colhido e a ele foi adicionado 1 mL de fenol e a mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos. As amostras foram resfriadas em gelo por 5 minutos e as fases foram separadas por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi

descartado e o decantado (*pellet*) lavado duas vezes com acetona gelada 100%. Após as lavagens o decantado (*pellet*) final foi seco a temperatura ambiente e ressuspensão em uréia 7 M/ tiouréia 2 M.

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) e a avaliação da pureza das amostras proteicas foi realizada por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). A separação na segunda dimensão foi realizada no sistema de eletroforese vertical *Hoefler Ruby SE 600 (GE Healthcare™)*. As tiras equilibradas foram colocadas em gel de poliacrilamida a 12,5% na presença de SDS e seladas com uma solução de agarose (0,5% de agarose e 0,002% de azul de bromofenol). Um marcador de baixo peso molecular (LMW) foi aplicado no lado ácido da tira. A separação da segunda dimensão teve duração de aproximadamente 5 horas.

Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi submerso na solução corante com *Coomassie blue G-250 (Blue Silver)* (CANDIANO *et al.*, 2004) por 24 horas, sob agitação. Para obter a imagem do gel em formato TIFF que é o utilizado pelo programa de identificação dos *spots*, o mesmo foi digitalizado utilizando o scanner *ImageScanner III* através do software *LabScan (GE Healthcare™)*, e estocado em solução de ácido acético a 5%. O ajuste da imagem, a detecção dos *spots* e a avaliação dos dados para determinar variações quantitativas e qualitativas, massa e ponto isoelétrico dos *spots* foi feito pelo programa *ImageMaster™ (GE Healthcare™)*. Algumas proteínas foram identificadas utilizando os valores de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular do *spot* contra o banco de dados *UniProtKB / Swiss-Prot*, através do *Expasy*, um Portal de Pesquisa de Bioinformática (<http://www.expasy.ch/tools/#proteome>), empregando a ferramenta *TagIdent*. A análise estatística foi realizada aplicando o teste *Mann-Whitney* considerando $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

Foi possível observar treze *spots* com expressão quantitativa reduzida no grupo fenol em relação ao grupo controle. Desses, onze *spots* foram identificados no banco de dados *UniProt/ Swiss-Prot* disponível no servidor *ExPASy*, utilizando os valores de ponto de isoelétrico (pI) e massa molecular (MM).

As proteínas que apresentaram expressão reduzida na presença do fenol e foram identificadas no banco de dados *UniProt/ Swiss-Prot* foram classificadas de acordo com a sua função biológica dentro das seguintes categorias: (1) liase; (2) hidrolase; (3) quinase/ transferase; (4) metiltransferase/ transferase; (5) oxidoreductase; (6) outros; (7) função desconhecida.

As proteínas que apresentaram expressão reduzida na presença do fenol se encontram principalmente envolvidas na biossíntese de nucleotídeos (nucleosídeo difosfato quinase; adenilato quinase; timidilato quinase; 2-nonaprenil-3-metil-6-metoxi-1,4-benzoquinol hidroxilase) ou no

processamento do RNAr (RNA ribossomal metiltransferase 2) o que, segundo Santos, Teixeira e Sá-Correia, (2004) poderá contribuir para a canalização da energia disponível para os mecanismos de adaptação e reparação celular sob estresse por fenol.

Além disso, também foi verificada a redução na expressão de proteínas envolvidas na biossíntese dos ácidos graxos (3-oxoacil sintase 3) e do lipídeo A (UDP-3-O-[3-hidroximiristoil] N-acetilglucosamina deacetilase), os quais são processos importantes desenvolvidos pelas células no objetivo de induzir mecanismos de reparo, substituição ou alteração da composição dos ácidos graxos presentes na membrana plasmática ou na parede celular (SANTOS, TEIXEIRA, SÁ-CORREIA, 2004). Logo se sugere que o fenol na concentração testada pode ser tóxico para a célula, danificando estruturas celulares importantes como a membrana plasmática e a parede celular.

Conclusão

A técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) permitiu identificar proteínas diferencialmente expressas no grupo fenol em relação ao grupo controle. Entre estas se destacam aquelas que tiveram sua expressão reduzida na presença do fenol, estando estas envolvidas principalmente nos mecanismos de manutenção da estrutura da membrana plasmática ou da parede celular.

Referências Bibliográficas

BASHA, K. M.; RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Recent advances in the Biodegradation of Phenol: A review. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 1, p. 219-234, 2010.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL, Lei N° **6.938, de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências.** Diário Oficial da União. Brasília, 2 set. 1981. Disponível em: <<http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/leis/1981/lei%206.938%20-%201981.xml>>. Acesso em: 05 dez. 2012.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**. v. 25, n. 9, p. 1327-33, 2004.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Águas superficiais: Variáveis de qualidade das águas**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/34-variaveis-de-qualidade-das-aguas---old#fenois>>. Acesso em: 18 set. 2012.

DIAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. **International Microbiology**, v. 7, p.173–180, 2004.

GAYRLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L. MANFIO, G. P. Biorremediação. **Biociência & Desenvolvimento**, n. 34, p. 36-43, 2005.

KIM, S. I.; CHOI, J. S.; KAHNG, H. Y. A Proteomics Strategy for the Analysis of Bacterial Biodegradation Pathways. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 11, n. 3, p. 280-294, 2007.

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

NANDISH M. S. **Microbial degradation of phenol and pentachlorophenol**. 2005. Dissertação (Master's Degree). Department of Agricultural Microbiology - College of Agriculture – University of Agricultural Sciences, Dharwad, Karnataka.

RIEDEL, K.; CARRANZA, P.; GEHRIG, P.; POTTHAST, F.; EBERL, L. Towards the proteome of *Burkholderia cenocepacia* H111: Setting up a 2-DE reference map. **Proteomics**, v. 6, p. 207-218, 2006.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C, SÁ-CORREIA, I. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a estresse químico em microrganismos. **Boletim de Biociência**, v.77, p.7–17. 2004.

THAPA, B.; KC, A. K.; GHIMIRE, A. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. **Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology**, v. 8, n. 1, p. 164-170, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R. CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.894p.

¹ Discente do Curso de Doutorado em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO – Universidade Federal do Ceará – UFC. amellyaaraujo@hotmail.com

² Discente do Curso de Especialização em Biologia Celular e Molecular – Universidade Estadual Vale do Acaraú –UVA. nayannelima@hotmail.com

³ Discente do Curso de Graduação em Biologia – Universidade Estadual Vale do Acaraú –UVA. brunobezerrabio@gmail.com

⁴ Discente do Curso de Doutorado em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO – Universidade Federal do Ceará - UFC; jackson.costa@hotmail.com

⁵ Doutor em Bioquímica – Universidade Federal do Ceará – UFC. garciabio@gmail.com

VIII Encontro de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA

Tema: Interdisciplinaridade e Inovação na Pesquisa e na Pós-Graduação

⁶ Orientador Prof. Dr. Do Curso de Biologia – Universidade Estadual Vale do Acaraú -UVA.
rmaranguape@gmail.com