

Análise global do metabolismo de cofatores [Fe-S] em *Azotobacter vinelandii*

Mattos, E. P.^a; Setubal, J. C.^b; Dean, D. R.^c; Frazzon, J.^{a,c}

^aInstituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, ^bVirginia Bioinformatics Institute e ^cFralin Life Science Institute, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA; *edu_p_m@hotmail.com

1. Introdução

Cofatores ferro-enxofre [Fe-S] são espécies químicas altamente versáteis presentes em inúmeros processos biológicos, como respiração, fotossíntese e fixação de nitrogênio (N₂). Diversas classes de proteínas tem sua função, pelo menos em parte, regulada pelo metabolismo de cofatores [Fe-S]. Este trabalho investiga o genoma da bactéria fixadora de N₂ *Azotobacter vinelandii*, buscando novos membros dedicados à biologia geral de cofatores [Fe-S]. Além disso, o estudo avalia o papel do RNA não-codificante *arrF* na expressão de genes associados ao metabolismo [Fe-S].

2. Materiais e Métodos

2.1. Análises de Bioinformática

Informações genômicas de *A. vinelandii* foram obtidas do projeto de sequenciamento do organismo¹. STRING² foi utilizado para avaliar interações físicas e funcionais entre proteínas. Domínios proteicos foram determinados por Pfam³. Operons foram estimados pelo servidor MicrobesOnline⁴. O pacote de ferramentas MEME⁵ foi utilizado na geração de uma matriz de substituição específica para o elemento regulatório [Fe-S] IscR.

2.2. Caracterização do RNA não-codificante *arrF*

A fim de se identificar possíveis elementos regulados por *arrF*, o perfil proteico de células sem o gene do elemento responsivo ao ferro, *fur*, (linhagem DJ1943 ou *fur*:Kan^R) e com a expressão de *arrF* induzida por promotor de arabinose (linhagem *arrF*) foi determinado por eletroforese bidimensional e comparado à linhagem selvagem (Trans). As células foram cultivadas em meio de Burk sem (B) ou com acetato de amônio (BN). O software Melanie foi utilizado na análise dos géis.

3. Resultados e Discussão

3.1. Diversidade de proteínas [Fe-S] de *A. vinelandii*

As análises de bioinformática permitiram a identificação de diversas proteínas [Fe-S], conhecidas e hipotéticas, codificadas pelo organismo diazotrófico *A. vinelandii*. A figura 1 ilustra a grande variedade de processos biológicos nos quais a bactéria emprega centros [Fe-S]. Nesse caso, destacam-se as vias de metabolismo energético (principalmente transporte de elétrons), metabolismo intermediário (assimilação de nitrogênio e enxofre) e biossíntese de grupos prostéticos.

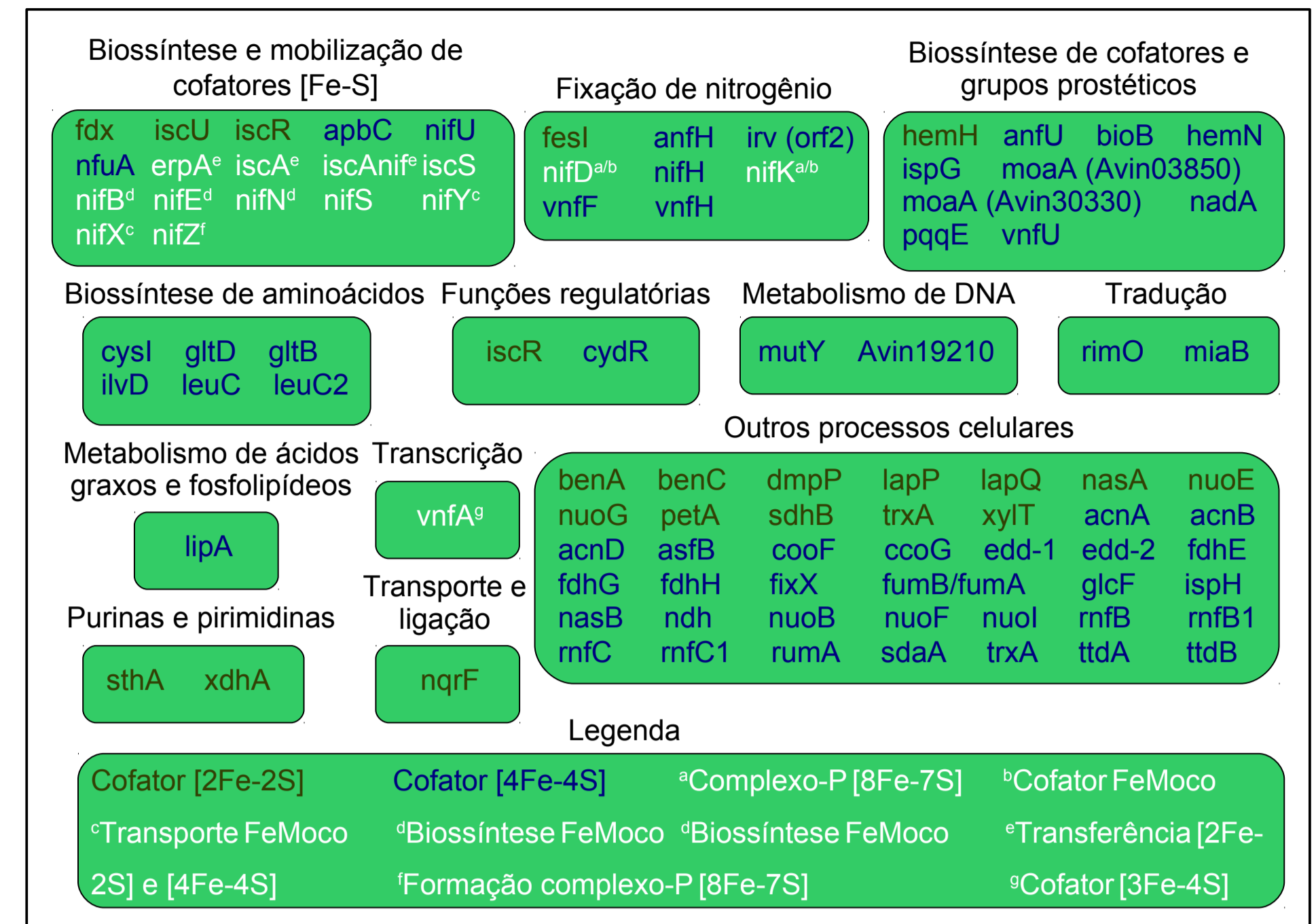


Figura 2: Painel sobre proteínas [Fe-S] caracterizadas de *Azotobacter vinelandii*. Os elementos estão codificados por cores, dependendo do tipo de cofator que interage com a proteína em seu estado funcional. A organização dos membros foi realizada de acordo com os grupos funcionais definidos pelo grupo de sequenciamento do genoma do organismo. FeMoco: cofator ferro-molibdênio.

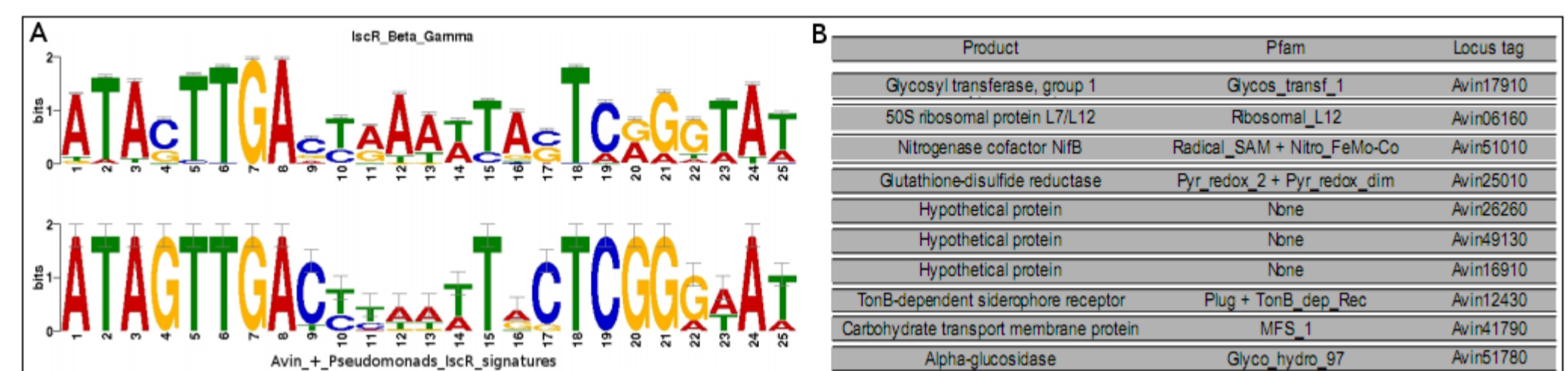


Figura 3A: Geração de uma matriz de substituição específica para o elemento regulatório [Fe-S] IscR. A matriz gerada (Avin+_Pseudomonads_IscR_signatures, linha inferior) foi baseada na região de ligação a IscR a montante dos genes *iscR* de *Azotobacter vinelandii* e de espécies sequenciadas de *Pseudomonas*. Essa construção foi comparada à matriz de IscR para *Beta* e *Gammaproteobacteria* do banco de dados curado RegTransBase e utilizada na busca de motivos de ligação. B: Lista das 10 proteínas de *A. vinelandii* cujos genes apresentaram os melhores motivos de ligação a IscR nas análises com a matriz de substituição gerada. Pfam: descrição de motivos proteicos segundo o banco de dados Pfam³.

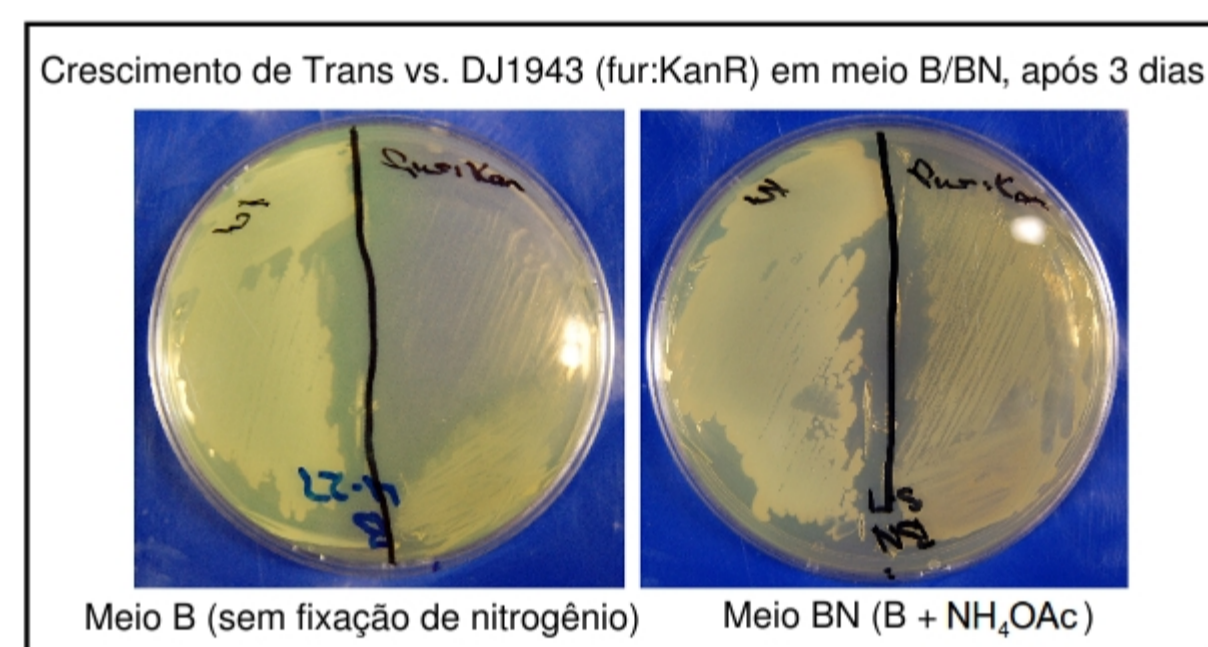


Figura 4: Comparação do crescimento de uma linhagem selvagem (Trans) de *Azotobacter vinelandii* com uma linhagem sem o gene do elemento responsivo ao ferro, *fur* (DJ1943 ou *fur*:Kan^R). As duas linhagens foram crescidas em meio B, que não promove a fixação de nitrogênio, e meio BN, que permite a fixação desse elemento. Em ambos os casos, a linhagem DJ1943 apresenta crescimento mais lento do que o controle.

Extratos proteicos das três linhagens foram submetidos a eletroforese bidimensional, a fim de se identificar diferenças de expressão. A análise do géis foi realizada com o auxílio de ferramentas que medem a densidade dos pontos na imagem, como ilustrado na figura 5. Até momento, 7 proteínas foram sequenciadas, provenientes de uma das três condições de cultivo. O maior número de diferenças é observado entre as linhagens selvagem e *fur*:Kan^R, como era esperado, uma vez que *fur* é um regulador de expressão de ação bastante ampla. A diferença mais significativa da linhagem *arrF* é a indicação de expressão mais elevada da proteína PhbA (Avin23640).

PhbA participa da via de síntese de poli-beta-hidroxitirato, uma fonte de energia para a forma de resistência em cisto de *A. vinelandii*. Futuras análises contribuirão para o desenvolvimento dessa questão.

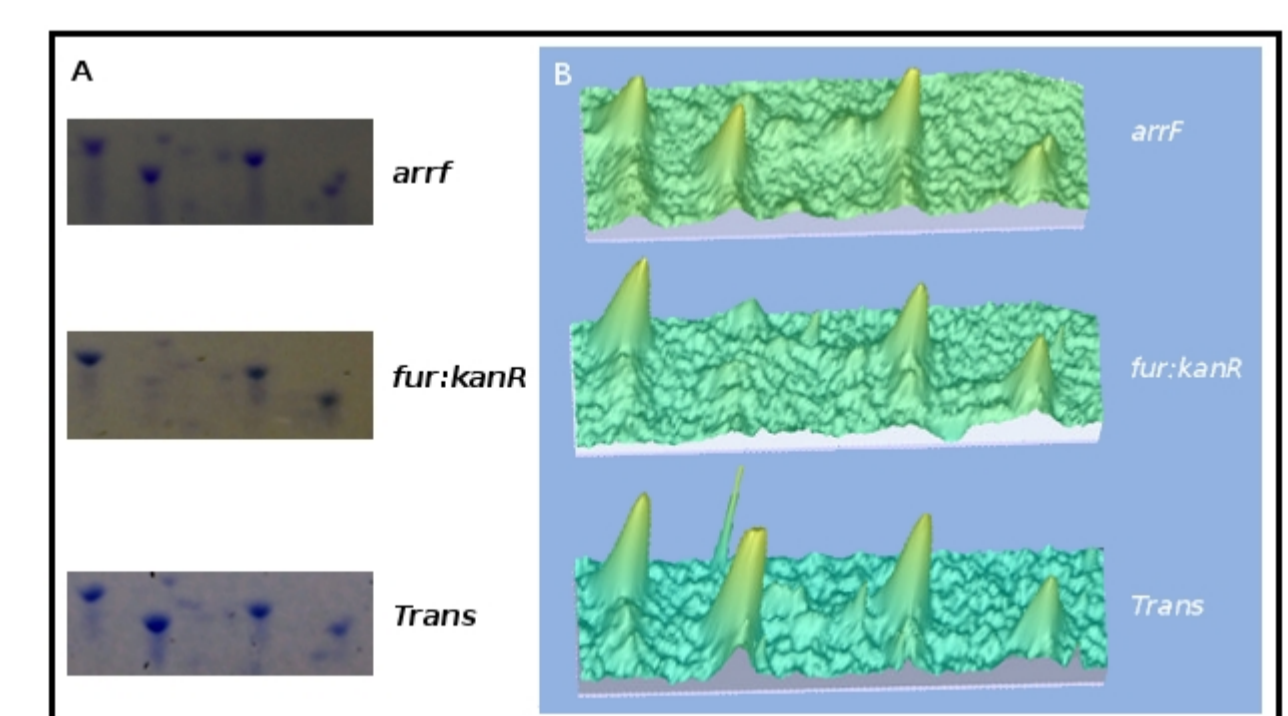


Figura 5: Exemplo de análise de perfil proteico das linhagens Trans, *fur*:Kan^R e *arrF* por eletroforese bidimensional. A: Os três detalhes correspondem à mesma posição nos géis, em que é possível observar a ausência de um dos pontos na linhagem *fur*:Kan^R. O sequenciamento desse ponto na linhagem Trans revelou tratar-se da proteína Fe-superóxido dismutase (Avin37820), expressa somente quando *fur* está presente. B: Esquematização dos resultados mostrados em A, realizada a partir das densidades de cada ponto. Essa ferramenta é muito útil para se estimar níveis de expressão.

4. Perspectivas

- Iniciar a análise do transcriptoma de *A. vinelandii*, focando na grande diversidade de proteínas [Fe-S] presentes.
- Continuar a investigação do RNA não-codificante *arrF*, buscando por relações entre elementos não expressos e cofatores [Fe-S].

5. Referências

1. *Azotobacter vinelandii* Genome Project - <http://www.azotobacter.org/>
2. STRING: functional protein association networks - <http://string.embl.de/>
3. Pfam - <http://pfam.sanger.ac.uk/>
4. MicrobesOnline Operon Predictions - <http://www.microbesonline.org/operons/>
5. The MEME Suite Motif-based sequence analysis tools - http://meme.sdsc.edu/meme4_3_0/intro.html