

ÂNGELA TONIETTO



**Investigação proteômica comparativa entre a cepa tóxica
Microcystis aeruginosa PCC 7820 e a cepa não tóxica
Microcystis aeruginosa NIVA CYA 43 (Cyanobacteria)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Beatriz Magalhães

Brasília

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

TERMO DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida e aprovada – como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia – no dia 8 de setembro de 2009 pela banca examinadora constituída por:

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco
(Orientador – UCB)

Prof.^a Dr.^a Beatriz Magalhães
(Co-Orientadora – UCB)

Prof. Dr. Ricardo Krüger
(Examinador Interno – UCB)

Prof.^a Dr.^a Sandra M. F. O. Azevedo
(Examinadora Externa – UFRJ)

Brasília
UCB

Dedico esta dissertação ao meu noivo, Rafael, por apoiar minha carreira científica e acreditar nela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pelas capacidades que me conferiu e por permitir o desenvolvimento e a conclusão desta dissertação.

Também devo muito aos meus pais, pela compreensão e apoio incondicionais, por sempre acreditarem que a realização dos meus sonhos é possível.

Agradeço ao meu irmão Gabriel, que sempre viabilizou a estrutura do Corpo de Bombeiros do Distrito Federal para a realização das coletas no Lago Paranoá, e ao meu irmão Leonardo, que acompanhou toda a minha trajetória na condição de bióloga.

Agradeço à minha grande amiga, Raquel Furquim, pelas sessões de acupuntura e massagem, que muito contribuíram para o meu bem-estar físico e emocional durante esta longa jornada de muita cobrança e desgaste.

Agradeço em especial ao meu orientador, Octávio Luiz Franco, que acreditou na realização desta pesquisa, que aceitou minha proposta de trabalhar com cianobactérias e cianotoxinas, mesmo não havendo ainda nenhuma estrutura para tal, sequer a estrutura para cultivarmos as cepas. Obrigada por ter me apoiado e por ter permitido com que eu continuasse trabalhando com cianobactérias! Superamos essa dificuldade e, hoje, a pós-graduação da Universidade Católica de Brasília possui infraestrutura para o cultivo e o estudo de cianobactérias.

Agradeço à minha co-orientadora, Beatriz Magalhães, por ter aceitado o desafio de me co-orientar, pela paciência em me ensinar a usar o MALDI-TOF/TOF, pelos fins de semana dedicados a esta dissertação e por me passar um pouco da sua grande experiência em Bioquímica. Muito obrigada!

Agradeço à pesquisadora Ângela Mehta (Embrapa Cenargen) pelo sequenciamento realizado no Paraná, por sempre ter se mostrado solícita e por sempre ter respondido às minhas dúvidas.

À professora Simoni (UCB), por ter gentilmente me cedido seu *laptop* para o sequenciamento das proteínas.

Ao pesquisador Luciano Paulino (Embrapa Cenargen), pela imensa ajuda com o sequenciamento manual de algumas proteínas.

Aos amigos Aline, Bernardo, Camila, Carol, Michelle, Pollyana, Simone, Suzana, Thaís, Wérika, William, pessoas que diretamente me ajudaram com manutenção e repicagem das culturas, técnicas proteômicas, sequenciamento das proteínas, uso de bancos de dados e busca de artigos científicos, e a todos os demais integrantes do Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, que indiretamente contribuem com os resultados uns dos outros pelo excelente ambiente de trabalho proporcionado, que faz toda a diferença no dia a dia.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro durante esses 24 meses de muito trabalho e dedicação.

*“Meu amigo: Só falo um idioma,
sequer eu tenho diplomas,
jamais fui colegial.
Não invejo cientistas com estudo
profundo,
querendo inventar novo mundo,
um mundo artificial.*

(...)

*E você, falando cinco idiomas
Tem nas paredes diplomas,
és bacharel, és doutor!
Não condeno, mas vou dizer
com franqueza,
Que vale tanta nobreza.
E um coração sem amor?”*

Amor e Ciência
João Pacífico

ÍNDICE

RESUMO.....	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE ABREVIACÕES	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
1 Introdução	1
1.1 Cianobactérias.....	1
1.2 Cianobactérias, água e problemas de saúde.....	3
1.3 Cianotoxinas	6
1.4 Microcistina.....	9
1.5 Análises proteômicas em cianobactérias.....	16
2 Justificativa	22
3 Objetivos	23
3.1 Objetivos específicos	23
4 Material e Métodos	24
4.1 Organismos e condições de cultivo	24
4.2 Medição das células	24
4.3 Análise da presença da toxina	25

4.4 Identificação das toxinas via MS	25
4.5 Extração proteica	26
4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida	27
4.7 Eletroforese bidimensional (2-DE)	27
4.8 Análise dos mapas proteicos	28
4.9 Identificação proteica por espectrometria de massa	29
4.10 Análise dos dados.....	30
5. Resultados e discussão.....	31
5.1 Cepas e seu crescimento	31
5.2 Análise da presença da toxina	34
5.3 SDS-PAGE	36
5.4 Análises eletroforéticas bidimensionais	38
5.4.1 Proteínas do metabolismo energético.....	52
5.4.2 Proteínas de membrana	57
5.4.3 Proteínas periplásmicas.....	58
5.4.4 Proteínas citoplasmáticas	60
5.5 Considerações Finais	62
6 Conclusões.....	65
7 Perspectivas	66
8. Referências Bibliográficas	67

RESUMO

Cianobactérias são microrganismos procarióticos fotossintetizantes que ocorrem em ecossistemas aquáticos e terrestres. Alguns gêneros de cianobactérias produzem metabólitos secundários que são tóxicos para a biota aquática e para os mamíferos terrestres. De especial interesse entre esses compostos, são as cianotoxinas: pequenas moléculas com ação hepatotóxica, neurotóxica, citotóxica ou dermatotóxica que representam um sério problema de saúde pública quando presentes em reservatórios destinados ao abastecimento público. *Microcystis aeruginosa* é uma espécie de cianobactéria presente em vários países e frequentemente relacionada a episódios de intoxicação animal devido ao fato de ser potencialmente produtora da cianotoxina microcistina. Apesar de haver extensa literatura sobre a estrutura e os efeitos da microcistina, pouco se sabe a respeito do processo de sua produção pela cianobactéria. Assim, este trabalho teve como objetivo comparar, por meio da proteômica, duas cepas da espécie *M. aeruginosa* contrastantes para toxicidade. Foram escolhidos 47 diferentes *spots* de ambos os géis. Foram obtidas identificações para 30 deles, sendo 9 exclusivos da cepa tóxica, 6 exclusivos da cepa não tóxica, 11 super expressos na tóxica e 4 super expressos na não tóxica. As 30 identificações correspondem a 20 proteínas diferentes. Cerca de 53% das proteínas sequenciadas estão relacionadas ao metabolismo energético. Elas foram expressas em maior quantidade pela cepa tóxica, o que indica que maior capacidade energética está diretamente relacionada com a capacidade de produzir microcistina em relação à cepa não produtora. Sugere-se que a produção da microcistina também esteja relacionada com proteínas envolvidas indiretamente em sua produção. Propõe-se que a produção da microcistina, além de relacionar-se com condições nutricionais e ambientais específicas, também dependa da expressão em níveis mais elevados de proteínas relacionadas ao metabolismo energético, considerando-se o gasto necessário para sua produção e armazenamento intracelular.

Palavras-chave: floração, *Microcystis aeruginosa*, microcistina, proteômica comparativa, metabolismo energético.

ABSTRACT

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotic microorganisms that occur in aquatic and terrestrial ecosystems. Some cyanobacteria genera produce secondary metabolites that are usually toxic to aquatic biota and terrestrial mammals. Among these compounds, cyanotoxins are of special interest. Cyanotoxins are small molecules that act as hepatotoxins, neurotoxins, cytotoxins or dermatotoxins, what represents a serious public health problem when it is present in reservoirs designated to public supply. *Microcystis aeruginosa* is a cyanobacteria species present in several countries and frequently related to animal intoxication episodes due to its capacity to produce the cyanotoxin microcystin. Despite the vast literature concerning microcystin structure and their effects, little is known about its synthesis in cyanobacteria. Therefore, the goal of the present work was to compare two *M. aeruginosa* strains contrasting for toxicity by proteomic tools. Forty seven spots were chosen from both gels. Identification was obtained for 30 of them, being 9 exclusive of toxic strain, 6 exclusive of non toxic strain, 11 up-regulated in toxic strain and 4 up-regulated in non toxic strain. The 30 identifications correspond to 20 different proteins. Around 53% of the sequenced proteins were related to energetic metabolism, being these proteins up-regulated in the toxic strain. These data indicate that a most efficient energetic production could be directly related to microcystin assembly in comparison to the non-toxic strain. Moreover, it is suggested that the production of microcystin could also be related to other proteins than those directly involved in its production. Besides the dependency of nutritional and environmental specific conditions for microcystin production, it is proposed that its synthesis is dependent on expression in higher levels of proteins related to energetic metabolism, considering the amount of energy consumed in its production and intracellular storage.

Key words: bloom, *Microcystis aeruginosa*, microcystin, proteomics tools, energetic metabolism.

LISTA DE ABREVIações

ABC – *ATP-Binding Cassette*

Adda – Ácido (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,3,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico

ATP – Adenosina trifosfato

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BNMA – β -N-metilamino-L-alanina

CA – Anidrase carbônica

CHAPS – [(3-cholamidopropil)dimetilamônio]-1-propanesulfonato hidrato

DBS – *Double strand break* (quebra dupla no DNA)

DHAP – Dihidroxiacetona fosfato

DNA-PK – Proteína quinase dependente de DNA

DO – Densidade óptica

DTT - Ditionitrito

CSIRO - *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization*

ELSIA – *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (imunoensaio enzimático)

FBA – Frutose-1,6-bifosfato aldolase

FBPase – Frutose-1,6-bifosfatase

FBPase classe 2/SBPase – D-frutose-1,6-bifosfatase classe II / sedoheptulose 1,7-bisfosfatase

FNR – Ferredoxina-NADP⁺ oxidorreductase

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GA3P – Gliceraldeído-3-fosfato

HCO₃⁻ – Ácido carbônico

HPLC – *High Performande Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de alta performance)

kDa – QuiloDalton

LC/MS – *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*

MALDI-TOF – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight*

Mdha – N-metildehidroalanina

m/z – razão massa sobre carga

NAD⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADP⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NRPS – Peptídeo sintetase não ribossomal

ORF – *Open Reading Frame* (região aberta de leitura)

PHA – Polihidroxilalcanoato

pI – Ponto Isoelétrico

PKS – Poliquetídeo sintase

PMF – *Peptide mass fingerprinting*

PRK – Fosforribuloquinase

PSI – Fotossistema I

PSII – Fotossistema II

PSP – *Paralytic Shellfish Poisoning* (paralisia de mexilhão por envenenamento)

2-DE – eletroforese bidimensional

SDS-PAGE – *Sodium Dodecil Sulphate-Poliacrilamide Gel Electrophoresis*

SOD – Superóxido dismutase

RuBisCO – Ribulose bifosfato carboxilase

TCA – Ácido tricloroacético

Vh – Volt/hora

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Toxinas de cianobactérias e características gerais.....	9
Tabela 2. Identificação, por MALDI-TOF/TOF, das microcistinas presentes na fração coletada em HPLC de fase reversa	36
Tabela 3. Proteínas identificadas a partir de extratos celulares de culturas axênicas de <i>Microcystis aeruginosa</i> após digestão trípica e análise por MALDI-TOF/TOF.	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da célula vegetativa de cianobactéria.....	2
Figura 2. Estrutura geral da microcistina	11
Figura 3. Organização do cluster gênico microcistina sintetase	13
Figura 4. Modelo proposto para a biossíntese da microcistina-LR	14
Figura 5. Células de <i>Microcystis aeruginosa</i> observadas em microscópio de luz transmitida – modalidade campo claro – aumento de 100x.	31
Figura 6. Curva de crescimento apresentada pela cepa <i>M. aeruginosa</i> PCC 7820.....	32
Figura 7. Curva de crescimento apresentada pela cepa <i>M. aeruginosa</i> NIVA CYA 43.....	33
Figura 8. Análise do extrato das amostras de <i>M. aeruginosa</i> PCC 7820 (linha vermelha) e <i>M. aeruginosa</i> NIVA CYA 43 (linha azul) em HPLC	34
Figura 9. Espectro de massa obtido por MALDI-TOF/TOF da fração eluída em cromatografia por HPLC do extrato de <i>M. aeruginosa</i> PCC 7820	35
Figura 10. SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250.....	37
Figura 11. Mapa proteômico de <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7820	39
Figura 12. Mapa proteômico de <i>Microcystis aeruginosa</i> NIVA CYA 43	40
Figura 13. Mapas proteômicos em visão tridimensional fornecidos pelo programa BioNumerics versão 4.6 após análise dos géis bidimensionais	42
Figura 14. Análise de dispersão obtida da comparação dos géis entre si	42

Figura 15. Análise de dispersão da correlação dos valores de volume gerados pelo programa BioNumerics para os géis da cepa <i>M. aeruginosa</i> PCC 7820 e <i>M. aeruginosa</i> NIVA CYA 43. $r^2=0,37$	43
Figura 16. Porcentagem de proteínas relacionadas ao metabolismo energético e porcentagem de proteínas de acordo com a localização celular calculadas a partir das identificações protéicas....	44
Figura 17. Expressão relativa das proteínas identificadas em <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7820 e <i>Microcystis aeruginosa</i> NIVA CYA 43.....	50

1 Introdução

1.1 Cianobactérias

Cianobactérias são organismos procariontes, aflagelados, com estrutura de parede baseada em camada de peptidoglicano (semelhante à das bactérias gram-negativas). São microrganismos capazes de realizar fotossíntese oxigênica (Stainer & Cohen-Bazire, 1977) – ou seja, com liberação de oxigênio molecular para a atmosfera – devido à presença dos pigmentos para captação da energia luminosa (clorofila-a e ficobiliproteínas). Seu aparato fotossintético está localizado nos tilacóides.

Nas células vegetativas cianobacterianas, existem quatro classes de inclusões: grânulos fosfato, grânulos de glicogênio, grânulos de cianoficina e os carboxissomos (Stainer & Cohen-Bazire, 1977) (Figura 1). Além destas, algumas cianobactérias apresentam ainda inclusões conhecidas como vesículas de gás. Estas são altamente permeáveis a todos os tipos de gases (N_2 , O_2 , CO_2 , CO , H_2 , Ar , CH_4) e impermeáveis a moléculas de água, contribuindo, assim, para regular a profundidade da célula na coluna d'água (Walsby, 1972). Alguns gêneros apresentam uma célula modificada chamada heterocito. Nesse compartimento separado, ocorre a fixação de nitrogênio atmosférico sob condições anaeróbicas. Uma vez fixado, o heterocito transfere o nitrogênio para as células vegetativas. Algumas espécies produzem estruturas denominadas acinetos. Estes também são células modificadas, diferenciadas pela formação de um envelope fino com multicamadas. Os acinetos constituem uma estrutura de resistência (Stainer & Cohen-Bazire, 1977).

Morfologicamente, as cianobactérias podem ser unicelulares, como no gênero *Synechocystis*, coloniais, no qual as células se mantêm unidas devido à presença de mucilagem, como *Microcystis*, ou filamentosas, consistindo em células alinhadas em série, separadas por uma membrana em comum, como nos gêneros *Cylindrospermopsis* e *Anabaena*. O único modo de reprodução conhecido entre elas é a reprodução assexuada – por fissão binária ou hormogônia (Stainer & Cohen-Bazire, 1977).

A ocorrência das cianobactérias é ampla e diversificada. Em ecossistemas de água doce, marinhos, e até mesmo nos solos e em outros *habitats* terrestres, podemos encontrar esses microscópicos organismos. As cianobactérias são particularmente importantes na comunidade fitoplanctônica de ambientes dulcícolas, diferenciando-se de outros grupos fitoplanctônicos por sua organização celular procarionte.

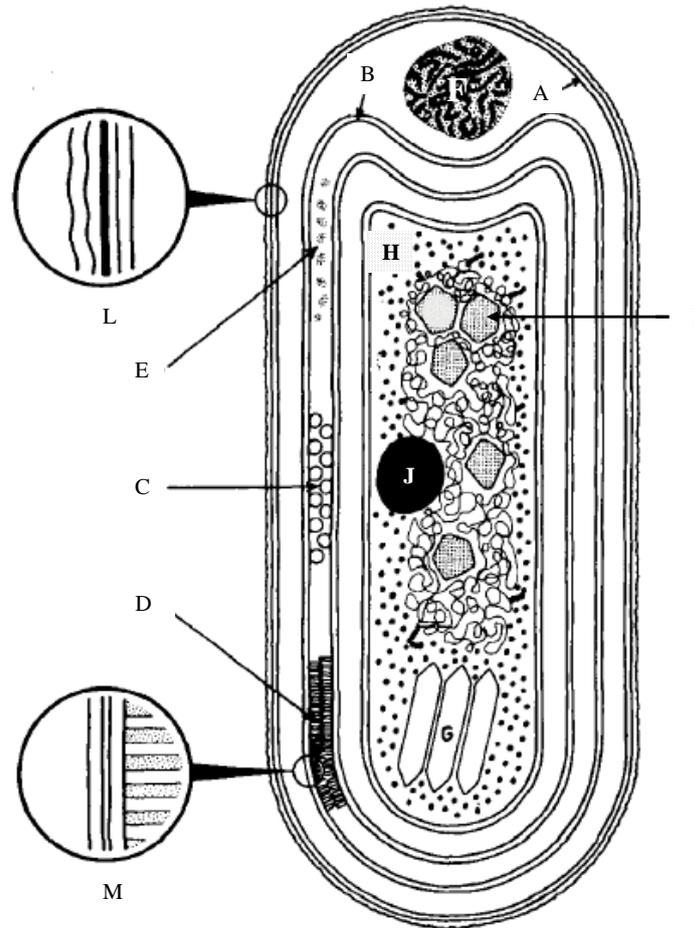


Figura 1. Representação esquemática da célula vegetativa de cianobactéria. (A) Membrana celular; (B) Membrana tilacoidal; (C) Visão frontal dos ficobilissomos presos ao tilacóide adjacente; (D) Visão lateral dos ficobilissomos; (E) Grânulos de glicogênio (glicogênio é o principal material de reserva orgânico não-nitrogenado); (F) Grânulos de cianoficina (cianoficina é a reserva de material orgânico nitrogenado); (G) Vesículas de gás; (H) Ribossomos 70S; (I) Carboxissomos; (J) Grânulos de polifosfato; (L) Ampliação do envelope celular (membrana externa, camadas de peptideoglicano e membrana celular); (M) Parte do tilacóide ampliado (unidades de membrana pareadas com os ficobilissomos presos). Stainer & Cohen-Bazire, 1977.

Algumas espécies de cianobactérias possuem importância econômica – valor nutritivo em geral alto. Elas têm sido usadas na dieta humana desde civilizações antigas como suplemento

alimentar ou fonte de proteínas (Campanella *et al.*, 1998), pois são ricas em vitaminas. O gênero *Spirulina*, por exemplo, é consumido em cerca de 70 países do mundo (Gantar & Svircev, 2008). Outras, quando capazes de fixar nitrogênio atmosférico, contribuem para a fertilidade do solo e da água (Chorus & Bartram, 1999). No entanto, outras espécies de cianobactérias, especialmente as aquáticas – tanto as marinhas quanto as dulcícolas –, apresentam características que podem ser prejudiciais aos demais organismos, como a produção e liberação de toxinas. Mesmo quando as toxinas não são produzidas, o simples fato de esses organismos reproduzirem-se demasiadamente, formando floração, já é prejudicial ao ambiente.

Entre as espécies capazes de produzir toxinas, *Microcystis aeruginosa* é uma das mais estudadas, pois tem ocorrência cosmopolita e representa impacto negativo em vários ecossistemas aquáticos do mundo por ser potencialmente produtora da cianotoxina microcistina (Visser *et al.*, 2005). *Microcystis* é um gênero de cianobactéria formador de colônia, ou seja, várias células que ocorrem agrupadas, envolvidas por uma bainha de mucilagem. O tamanho da colônia varia de poucas a centenas de células. Suas células são esféricas, possuem membrana tilacoidal, membrana citoplasmática, parede celular com uma nítida camada de peptideoglicano, membrana externa e uma camada de glicocálice. Seu citoplasma contém corpos de polifosfato, grânulos de cianoficina e inúmeras vesículas de gás (Caiola & Pellegrini, 1984). Esse gênero foi descrito por Kützing no início do século XX. Em ambientes eutrofizados, o gênero *Microcystis* é capaz de formar florações com potencial para produção de microcistinas – peptídeos extremamente tóxicos, descritos a seguir –, configurando um gênero de enorme impacto econômico e social devido aos problemas de saúde humana gerados.

1.2 Cianobactérias, água e problemas de saúde

A água é um elemento essencial para que a vida exista na Terra, pois nenhum processo metabólico ocorre sem sua ação direta ou indireta. A qualidade da água, portanto, é de extrema importância para o consumo humano, para o consumo animal ou para a manutenção da biota aquática. Tanto para uso pelos animais quanto pelos seres humanos, a água deve ser de boa

qualidade da água, preenchendo condições mínimas para que possa ser ingerida (di Bernardo, 1995).

Existem determinados fatores que são responsáveis pela diminuição da qualidade da água, entre eles, a eutrofização. Eutrofização é o aumento da produção primária em sistemas aquáticos como consequência da elevação dos níveis de nutrientes, principalmente compostos nitrogenados e fosfatados. A entrada desses nutrientes pode ser reconhecida como um problema de poluição. Vários ecossistemas dulcícolas apresentam-se em estado eutrófico (ex. Hee-Jin *et al.*, 2005; Baldia *et al.*, 2003; Bonnet *et al.*, 2002; Borics *et al.*, 2000) devido, entre outras causas, ao rápido e desordenado crescimento e à ocupação populacional em suas proximidades. Uma das consequências da eutrofização é o crescimento exacerbado de cianobactérias nos corpos d'água, fenômeno conhecido como floração (Tonietto *et al.*, 2008).

As florações de cianobactérias representam um dos impactos negativos sobre a qualidade da água, podendo causar gosto e odor desagradáveis, liberação de toxinas e alteração do equilíbrio ecológico do sistema aquático (Yunes *et al.*, 2005; Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2001). Como as florações de cianobactérias comumente resultam de processos de eutrofização e a pressão antrópica é cada vez maior, florações tóxicas tendem a aumentar em tamanho e duração, o que também aumenta o risco de exposição a níveis que podem causar toxicidade aguda (Carmichael, 1992). Assim, a ocorrência de florações tóxicas representa um grave risco à saúde pública, principalmente quando se dá em reservatórios destinados ao abastecimento de água potável para a população.

Uma vez perdidas para o meio aquático, as cianotoxinas permanecem ali por até três meses, devido à sua alta estabilidade química (Funari & Testai, 2008). Além disso, essas toxinas, quando dissolvidas, não são removidas pelo sistema de tratamento convencional da água (Lambert *et al.*, 1996). Outro problema é o seu bioacúmulo na teia trófica aquática, fator de magnificação dos seus efeitos tóxicos (Sivonen & Jones, 1999). Em casos de ingestão de água ou de animais aquáticos contaminados – como peixes –, ou nos casos de hemodiálise realizada com água contaminada, as toxinas – presentes na água ou bioacumuladas em animais – atingem o homem, causando principalmente problemas renais, hepáticos, neurológicos e gastrintestinais

(Carmichael, 1992; Azevedo *et al.*, 2002). Por esse motivo, as cianobactérias foram incluídas entre os microrganismos patogênicos emergentes, mesmo não havendo colonização ou invasão em um hospedeiro (OECD, 2005).

Em humanos, a exposição crônica a baixos níveis de microcistina pode levar à carcinogênese e à promoção do crescimento do tumor. Já nos casos de exposição recreacional, podem ocorrer irritações cutâneas e problemas gastrintestinais (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999). Mas foi em 1996 que ocorreu o caso de intoxicação humana por cianotoxinas mais grave já documentado. Dos 131 pacientes de hemodiálise tratados em Caruaru-PE, 116 apresentaram distúrbios visuais, náuseas e vômito após o tratamento. Posteriormente, 100 deles apresentaram falência hepática aguda e 76 morreram. Das 76 mortes, 52 foram atribuídas à “Síndrome de Caruaru”. Análises da água usada no tratamento, do tecido hepático e do soro dos pacientes atribuíram as mortes à presença da hepatotoxina microcistina (Carmichael *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2002).

O trágico incidente em Caruaru no ano de 1996, além de estimular um número cada vez maior de pesquisas sobre a relação entre as cianobactérias e a qualidade da água, teve reflexos também na legislação brasileira relacionada aos recursos hídricos. A Portaria n.º 518/2004, do Ministério da Saúde, estabelece os procedimentos e as responsabilidades relativos ao controle, à vigilância e ao padrão de qualidade da água para o consumo humano. A partir de então, a fim de evitar outros acidentes semelhantes, instituições responsáveis pelo sistema de abastecimento de água são obrigadas a monitorar as cianobactérias e as cianotoxinas. Devem ser monitoradas, na água tratada, as cianotoxinas cilindrospermopsina, saxitoxina e microcistina, sendo os valores máximos permitidos iguais a $15 \mu\text{g.L}^{-1}$, $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Também fica proibida, por lei, a aplicação de algicidas nas situações em que a densidade de cianobactérias ultrapassar $20.000 \text{ células.mL}^{-1}$, considerando-se os elevados riscos que a aplicação desse produto representa à saúde pública.

O controle de cianotoxinas nos reservatórios destinados ao abastecimento de água para a população é realizado mensalmente, exceto em situações de alta densidade de cianobactérias, quando o monitoramento passa a ser semanal. Geralmente, o monitoramento para microcistinas é

realizado por detecção imunológica, por ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), ou por métodos analíticos, como HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) e LC-MS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*), enquanto saxitoxinas são monitoradas por HPLC (Harada *et al.*, 1999).

As cianobactérias, portanto, interferem em nossas vidas por meio da alteração da qualidade da água com potencial risco de intoxicação por cianotoxinas. Nesse aspecto, é alarmante o número de reservatórios em estado eutrófico no Brasil – por exemplo, o Reservatório de Gargalheiras-RN (Chellapa & Costa, 2003), a Lagoa da Pampulha-MG (Figueiredo & Giani, 2001), o Lago das Garças-SP (Crossetti & Bicudo, 2005), o Reservatório de Guarapiranga-SP (Beyruth, 2000) e o Reservatório Billings-SP (Carvalho *et al.*, 1997) – fato que pede a atenção da comunidade científica e da população brasileira como um todo, pois a eutrofização traz o risco de floração que, conseqüentemente, traz o risco de liberação de toxinas para os ambientes dulcícolas do país.

1.3 Cianotoxinas

A capacidade de produzir metabólitos secundários tóxicos a outros organismos é comum entre as cianobactérias. Cerca de 40 gêneros são potencialmente tóxicos, mas os principais são *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc*, e *Oscillatoria* (*Planktothrix*) (Carmichael, 2001). No Brasil, Sant'Anna *et al.* (2008), ao compilarem dados de vários autores, verificaram que as cianobactérias tóxicas são representadas por 32 espécies distribuídas em 3 famílias: 12 Chroococcales, 10 Oscillatoriales e 10 Nostocales. *Microcystis* (7 espécies) e *Anabaena* (6 espécies) são os gêneros com o maior número de espécies tóxicas. *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* são as espécies de cianobactérias tóxicas mais amplamente distribuídas, ocorrendo em diferentes partes das regiões brasileiras tropicais e subtropicais.

Toxinas são compostos secundários com efeito nocivo em tecidos, células ou organismos. Geralmente, metabólitos secundários são assim chamados por incluírem apenas aqueles compostos não usados pelo organismo em seu metabolismo primário, como divisão celular

(Carmichael, 1992). As cianotoxinas são metabólitos secundários formados em todos os estágios de desenvolvimento da cianobactéria, permanecendo no interior das células até que a idade ou o estresse (aplicação de algicida, por exemplo) cause sua liberação para a água devido à lise celular (Sivonen & Jones, 1999). Uma vez liberadas para o meio, as cianotoxinas permanecem na água por meses. As microcistinas e nodularinas, por exemplo, podem permanecer na água por até mais de 6 meses (Jones *et al.*, 1995).

As cianotoxinas são classificadas em três grandes grupos – peptídeos cíclicos, toxinas alcalóides e lipopolissacarídeos (Sivonen & Jones, 1999). Codd e colaboradores (2005), entretanto, apresentam a classificação das cianotoxinas em função dos efeitos biológicos nos sistemas e órgãos que elas preferencialmente afetam – hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, toxinas irritantes e gastrintestinais. Existem, ainda, as cianotoxinas com perfil toxicológico ou ecotoxicológico parcialmente conhecidos (por exemplo, microviridina J e β -N-metilamino-L-alanina, ou BMAA). Neste trabalho, a classificação adotada é a de Sivonen & Jones (1999), por ser a que considera a estrutura química da toxina, pois algumas cianotoxinas podem afetar mais de um órgão ou sistema.

Os peptídeos cíclicos são as cianotoxinas mais frequentemente encontradas em florações de água doce (Sivonen & Jones, 1999). Os dois aminoácidos terminais do peptídeo linear – um em cada extremidade – juntam-se para formar o composto cíclico. Esse grupo de toxinas atua bloqueando a ação das proteínas serina/treonina fosfatase PP1 e PP2A das células hepáticas, o que causa morte por hemorragia hepática em poucas horas após dose aguda (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999). Essas toxinas apresentam massa molecular entre 800 e 1.100 Da e não são capazes de penetrar diretamente a membrana lipídica das células animais, vegetais ou bacterianas (Sivonen & Jones, 1999). Sua incorporação é realizada por transportadores de membrana que também capturam nutrientes essenciais. Uma vez dentro da célula-alvo, essa classe de cianotoxinas desempenha seus efeitos tóxicos.

Microcistinas e nodularinas são famílias de toxinas pertencentes ao grupo dos peptídeos cíclicos. Microcistina é a toxina mais frequentemente encontrada em florações tóxicas, sendo produzida por espécies dos gêneros *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Nostoc* e

Anabaenopsis. *Nodularina* foi descrita apenas na espécie *Nodularia spumigena* (Sivonen & Jones, 1999).

As toxinas alcalóides são, em sua maioria, compostos orgânicos heterocíclicos nitrogenados. Em geral, apresentam massa molecular inferior a 1000 Da. Elas são subdivididas em alcalóides neurotóxicos (toxinas alcalóides não-sulfatadas) e alcalóides citotóxicos (toxinas alcalóides sulfatadas). Fazem parte do primeiro subgrupo anatoxinas e saxitoxinas. Anatoxina-a pode inibir a transmissão de impulso nervoso na junção neuromuscular pelo mimetismo molecular do neurotransmissor acetilcolina. É produzida por *Anabaena*, *Oscillatoria (Plaktothrix)* e *Aphanizomenon*. Homoanatoxina-a é produzida por *Oscillatoria (Planktothrix)* e também mimetiza o efeito da acetilcolina. Anatoxina-a(S) é uma anticolinesterase, ou seja, é capaz de inibir a atividade da acetilcolinesterase. É produzida por *Anabaena* (Sivonen & Jones, 1999). As saxitoxinas bloqueiam os canais de sódio neuronais, o que resulta em inibição dos impulsos nervosos (Carmichael, 1994). As saxitoxinas também são conhecidas como *paralytic shellfish poison* (PSP) – veneno de mexilhão que causa paralisia – por ser o principal componente tóxico presente em dinoflagelados associado à paralisia quando mexilhões contaminados são consumidos (Codd *et al.*, 1999).

Os alcalóides citotóxicos têm ação semelhante à ação dos peptídeos cíclicos, ação hepatotóxica, bloqueando a síntese de proteínas das células do fígado (Sivonen & Jones, 1999). Fazem parte desse grupo as cilindrospermopsinas. As cilindrospermopsinas são alcalóides citotóxicos que inibem a síntese de proteínas. Em mamíferos, tem-se como resultado um quadro de necrose generalizada (Shen *et al.*, 2002). Também podem ter ação genotóxica. Nesse caso, existe a perda cromossomal e a quebra da fita de DNA (Humpage *et al.*, 2000). É produzida pelos gêneros *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* e *Anabaena* (Sivonen & Jones, 1999; Spoof *et al.*, 2006).

As toxinas lipopolissacarídicas, ou dermatotoxinas, localizam-se na membrana externa da parede celular das cianobactérias, formando complexos com proteínas e fosfolípídeos (Sivonen & Jones, 1999). São agentes inflamatórios que podem causar irritabilidade nos tecidos animais por meio do contato direto com a pele ou respostas alérgicas devido à ingestão de água contaminada

ou inalação de aerossóis da água contaminada. O ácido graxo é a molécula que desencadeia a resposta alérgica. A maioria das cianobactérias produz toxinas do grupo dos lipopolissacarídeos (Funari & Testai, 2008).

A Tabela 1 mostra, de maneira esquemática, os diferentes grupos de cianotoxinas, seu efeito tóxico e qual gênero é capaz de produzir as respectivas toxinas.

Tabela 1. Toxinas de cianobactérias e características gerais (adaptada de Katircioglu *et al.* 2004 e Svreck & Smith, 2004).

Grupo da Toxina	Estrutura	Gênero produtor	Efeito tóxico
Microcistina	Peptídeo cíclico	<i>Anabaena, Anabaenopsis, Aphanocapsa, Microcystis, Nostoc, Oscillatoria</i>	Hepatotóxico
Nodularina	Peptídeo cíclico	<i>Nodularia</i>	Hepatotóxico
Anatoxina-a	Alcalóide	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Oscillatoria</i>	Neurotóxico
Anatoxina-a(S)	Alcalóide	<i>Anabaena, Oscillatoria</i>	Neurotóxico
Saxitoxina	Alcalóide	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Lyngbya</i>	Neurotóxico
Cilindrospermopsina	Alcalóide	<i>Cylindrospermopsis</i>	Citotóxico
Lipopolissacarídeos	Ácido graxo	A maioria os gêneros	Resposta alérgica

1.4 Microcistina

Microcistina é a toxina mais frequentemente encontrada nos ambientes de água doce. Sua ação hepatotóxica consiste em romper os componentes do citoesqueleto dos hepatócitos, causando hemorragia no fígado (Dittmann *et al.*, 1997; Katircioglu *et al.*, 2004). Para as cianobactérias que a produzem, sua função intracelular ainda não é conhecida. Imagina-se que esse metabólito secundário esteja envolvido em processos celulares primários, pois as células que produzem microcistina apresentam maior diâmetro (Dittman *et al.*, 1997).

A quantidade intracelular de microcistina, geralmente, é muito maior do que a dissolvida no meio externo (van Apeldoorn *et al.*, 2007; Ibelings & Chorus, 2007). Apesar de a liberação da microcistina estar associada à lise celular, essa toxina também é parcialmente perdida para o meio externo devido, provavelmente, ao transporte ativo, porém, em menor proporção (Rapala *et al.*, 1997).

No interior da célula de *Microcystis*, microcistina pode ser acumulada em altas concentrações. Entretanto, sua baixa solubilidade em água não permite a solubilização de altas quantidades dessa toxina no citoplasma. Assim, microcistina está localizada na membrana tilacoidal de *Microcystis*, mais precisamente ligada às ficobilinas (Jüttner & Lüthi, 2007).

A estrutura química geral da microcistina é ciclo(-D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷), sendo D-MeAsp ácido D-*eritro*-β-metilaspártico, Adda ácido (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,3,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico e Mdha N-metildehidroalanina (Figura 2). Pode haver variação dos aminoácidos que a compõem, principalmente nas posições X e Z, chamadas de L-aminoácidos variáveis. Metilações e demetilações também são comuns (Sivonen & Jones, 1999). Tais variações são responsáveis por cerca de 70 variantes conhecidas dessa cianotoxina (Katircioglu *et al.*, 2004; Svrcek & Smith, 2004). A microcistina-LR contém os aminoácidos leucina (L) e arginina (R) nas posições X e Z, respectivamente. É a variante da família das microcistinas frequentemente mencionada como a mais comum em ambientes dulcícolas (Oudra *et al.*, 2002; Baldia *et al.*, 2003; Svreck & Smith, 2004; Lehman *et al.*, 2005), embora tais observações possam estar baseadas no fato de o padrão químico para as análises de microcistina-LR ter sido o primeiro a estar comercialmente disponível (Sivonen & Jones, 1999).

As microcistinas atingem as células hepáticas, ligando-se covalentemente às proteínas fosfatase tipo-1 e tipo-2A, proteínas que atuam na regulação de processos intracelulares por meio da desfosforilação de várias proteínas e enzimas na célula (MacKintosh *et al.*, 1995). A região Adda, resíduo de aminoácido mais incomum da microcistina, é crucial para a interação com a proteína fosfatase, sendo a região crucial para a toxicidade desse tipo de cianotoxina. Também é necessária a ligação entre o resíduo Mdha e a proteína fosfatase (Sivonen & Jones, 1999).

O bloqueio das fosfatases gera uma situação de hiperfosforilação nos hepatócitos e tem como resultado a ruptura dos microfilamentos do citoesqueleto, danificando a arquitetura hepática. A perda da estrutura do fígado provoca sua retração e o conseqüente aumento dos espaços intercelulares, permitindo que o sangue extravase e penetre por entre o parênquima hepático (Carmichael, 1994). Dependendo de suas proporções, essa hemorragia hepática pode ser letal.

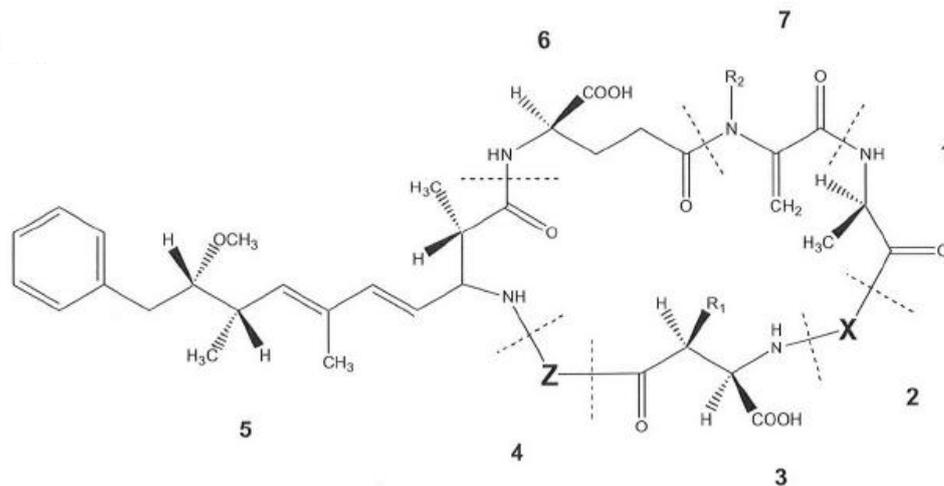


Figura 2. Estrutura geral da microcistina. 1- D-alanina, 2- X (variável), 3- ácido D-eritro- β -metilaspartico (D-MeAsp), 4- Z (variável), 5- ácido (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,3,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico (Adda), 6- D-glutamato, 7- N-metildehidroalanina (Mdha).

Fonte: Svrcek & Smith, 2004.

A microcistina também favorece a liberação de espécies reativas de oxigênio devido à ruptura das membranas mitocondriais (Chen *et al.*, 2005). Nesse caso, ocorre apoptose. Em 2003, Mikhailov e colaboradores identificaram 3 proteínas alvo da microcistina: duas delas relacionadas às proteínas fosfatase PP1 e PP2A, mas a terceira correspondente a um novo alvo: a subunidade β da ATP-sintase, que pode estar relacionada ao potencial indutivo de apoptose demonstrado pela microcistina.

Em situações de exposição crônica a baixas doses de microcistina, ocorre supressão da apoptose e promoção da divisão celular, resultando em tumor no fígado (Pegram *et al.*, 2008). Isso se dá porque a inibição da PP2A resulta em desequilíbrio das proteínas quinase ativadas por mitogenases (MAPK – *mitogen-activated protein kinases*), proteínas que regulam a transcrição de genes necessários à proliferação celular (Gehringer, 2004).

A microcistina também é capaz de induzir danos no DNA (Lankoff *et al.*, 2004). Nesse caso, embora nenhum estudo a respeito do efeito da microcistina-LR no reparo de DNA esteja disponível, supõe-se que a ligação da microcistina às proteínas fosfatase PP1 e PP2A seja a chave para se conhecer esse efeito, uma vez que essas proteínas regulam a atividade de várias famílias de quinases envolvidas no reparo do DNA, incluindo a DNA-PK (proteína quinase dependente de DNA), enzima necessária para o reparo de DSBs (*double strand break* ou quebras duplas no DNA). É importante ressaltar que o grau de toxicidade tem relação direta com a rota de contaminação (oral, intraperitoneal – ou intravenosa – e por inalação). A maior toxicidade ocorre quando a microcistina é incorporada via intraperitoneal (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

Os *operons* relacionados à biossíntese de cianotoxinas até então caracterizados são o relacionado à produção de microcistina nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Planktothrix* (Pegram *et al.*, 2008) e o responsável pela produção de cilindrospermopsina em *Cylindrospermopsis raciborskii* (Mihali *et al.*, 2008). A literatura que aborda os aspectos genéticos relacionados à biossíntese de cianotoxinas, portanto, é muito rica.

A quantidade de estudos sobre a caracterização dos genes envolvidos na produção da microcistina é relativamente grande (ex.: Stachellaus & Marahiel, 1995; Meißner *et al.*, 1996; Kaebernick *et al.*, 2002; Mikalsen *et al.*, 2003). O pequeno tamanho, a estrutura cíclica e a quantidade de aminoácidos incomuns indicam que a microcistina é sintetizada de maneira não ribossomal (Meißner *et al.*, 1996). Nas espécies do gênero *Microcystis*, o *operon* microcistina sintetase, envolvido na produção da toxina, apresenta 10 módulos assim constituídos: *mcyABCDEFGHIJ* (Figura 3). Esse *operon* é o responsável por codificar peptídeo sintetases não ribossomais (NRPS), poliquetídeo sintases (PKS) e complexos multienzimáticos de natureza mista NRPS/PKS. O mecanismo de produção da microcistina é chamado *thiotemplate*, mecanismo por meio do qual a produção de peptídeos lineares e cíclicos é realizada por peptídeo sintetases com multidomínios, no qual os resíduos periféricos de cisteína funcionam como aceptores aminoacil (Sivonen & Jones, 1999; Kleinkauf & von Döhren, 1996).

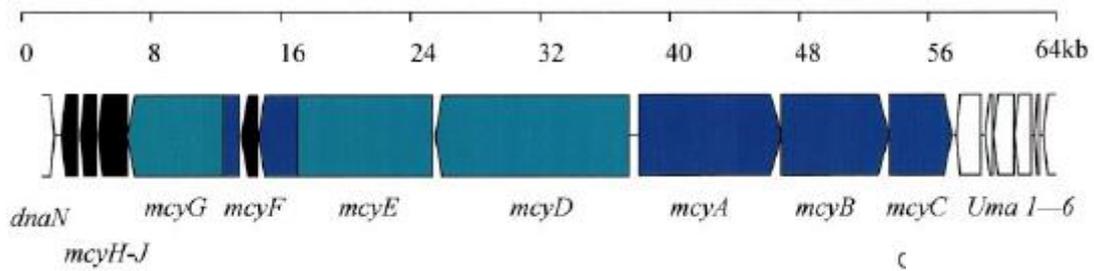


Figura 3. Organização do cluster gênico microcistina sintetase. Esse *operon* apresenta transcrição bidirecional – *mcyA-C* para a direita e *mcyD-J* para a esquerda. Em preto, ORFs contendo regiões homólogas a peptídeo sintetases não ribossomais. Em azul, ORFs contendo regiões homólogas a poliquetídeo sintases (Tillet *et al.*, 2000).

Os genes peptídeo sintetases não ribossomais consistem em módulos que são construídos por domínios, onde cada módulo codifica sistemas multienzimáticos. As multienzimas catalisam a condensação sequencial de aminoácidos, incluindo sua ativação e modificação. A ativação de cada aminoácido ocorre em seu grupo carboxil pela formação de aminoacil adenilato e a subsequente formação de éster. Cada aminoácido ativado vai sendo incorporado à crescente cadeia polipeptídica. A ordem de incorporação é determinada pelo arranjo espacial dos domínios catalíticos, pela ordem em que os módulos estão organizados. A maioria dos módulos contém domínios de adenilação, tilação e condensação (Figura 4). O domínio de adenilação é responsável pelo reconhecimento do aminoácido específico. A formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos ativados é mediada pelo domínio de condensação (Marahiel *et al.*, 1997; Kleinkauf & von Döhren, 1996).

O fato de módulos particulares das microcistina sintetases exibirem especificidade relaxada em relação ao substrato (Dittmann *et al.*, 1997), juntamente com a variação na metilação das isoformas da microcistina (Mikalsen *et al.*, 2003), também influencia a existência de cerca de 70 variantes de microcistina.

As cepas não tóxicas de *Microcystis aeruginosa*, entretanto, também podem apresentar os genes que codificam para microcistina sintetase. A não produção da toxina deve-se à ausência de parte do *operon mcy* (Meißner *et al.*, 1996). Segundo Mikalsen *et al.* (2003), as cepas de *Microcystis*, por eles avaliadas, que não possuem os genes *mcyA* e *mcyB* não produzem microcistina. O fragmento *mcyA* é responsável pela produção dos aminoácidos N-metil-D-hidro-

Alanina e D-Alanina, e o fragmento *mcyB* é responsável pela produção dos aminoácidos X (variável) e ácido D-eritro- β -metil-iso-aspartico (Mikalsen *et al.*, 2003). O fato de algumas cepas não tóxicas de *M. aeruginosa* apresentarem os genes que codificam para microcistina sintetase indica que a produção da toxina parece ser uma característica ancestral (Otsuka *et al.*, 1999). Assim, é provável que as cepas não tóxicas tenham sofrido eventos de deleção nesse *operon*.

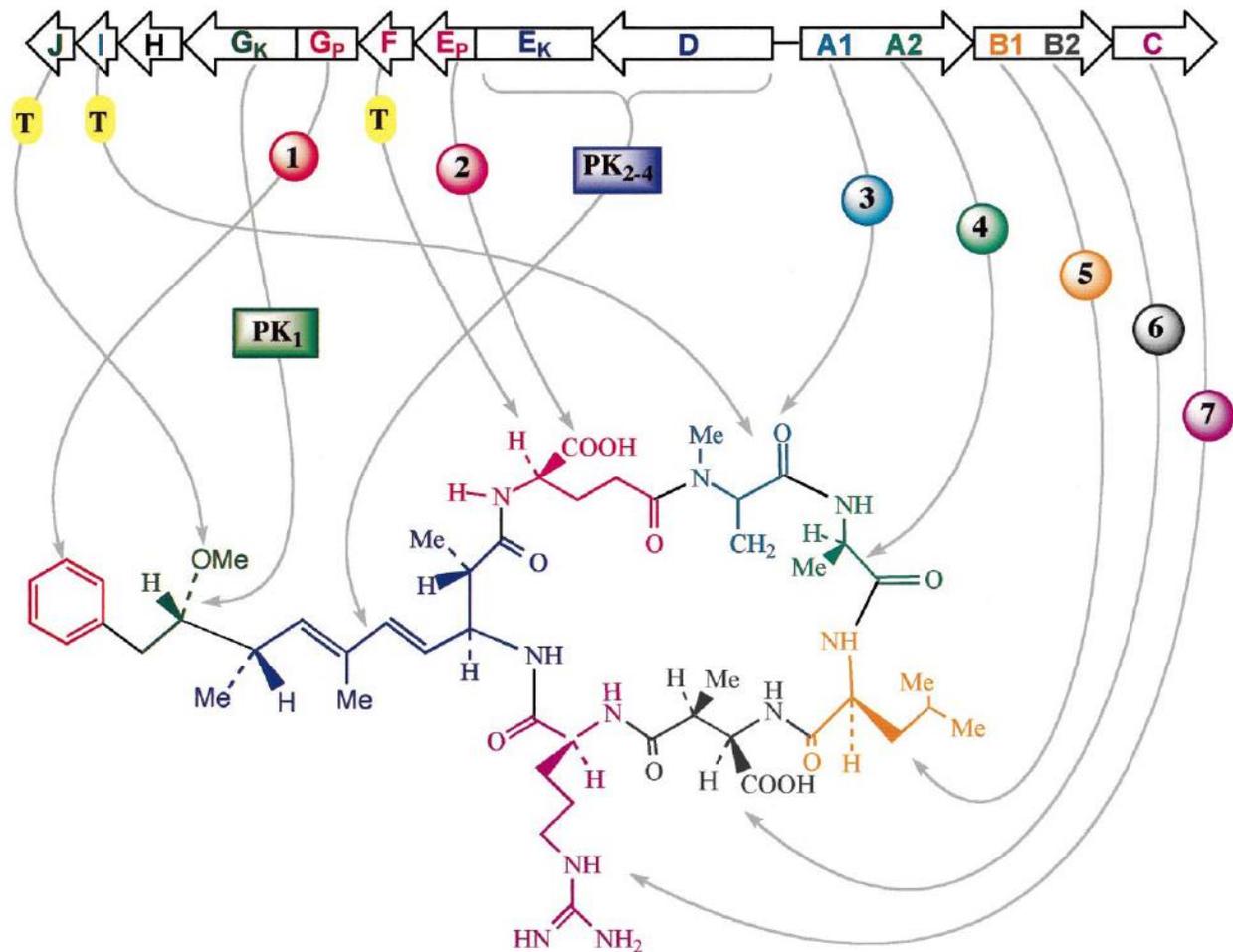


Figura 4. Modelo proposto para a biossíntese da microcistina-LR. Observe a organização do cluster gênico *mcyA-J* e a microcistina-LR. A biossíntese ocorre via um complexo multienzimático que consiste de módulos peptídeo sintetase e polipeptídeo sintetase. Os círculos numerados indicam a ordem dos aminoácidos incorporados à crescente cadeia peptídica pelos genes NRP (*mcyA*, B, C, Ep e GP). Os *mcyA* e B contêm dois módulos, A1/A2 e B1/B2, respectivamente. A1 também codifica o domínio N-metiltransferase. Os retângulos numerados mostram a ordem da síntese polipeptídica e a formação do Adda (*mcyGk*, *Ek*, D). ORFs adicionais da função “putative microcystin tailoring” estão indicados por T. O *mcyH* mostra alta identidade com genes de transportadores ABC. O tamanho relativo do *operon* é de cerca de 55kb (Kaebernick & Neilan, 2001).

Moffitt & Neilan (2004) propuseram que as hepatotoxinas em cianobactérias provavelmente se originaram a partir da microcistina-LR, isoforma mais comum da microcistina. Em seu trabalho, eles propõem que a estrutura da nodularina, assim como as demais variantes da microcistina, evoluiu da microcistina sintetase via deleção do segundo e do terceiro módulos NRPS das proteínas McyA e McyB, respectivamente.

Também é importante ressaltar que a constituição genômica do cluster gênico para microcistina sintetase é diferente entre os gêneros de cianobactérias. Por exemplo, em *M. aeruginosa*, a organização do cluster gênico *mcy*, que vai do *mcyA* ao *mcyJ* – apresentando leitura bidirecional (*operon mcyABC* e *operon mcyD-J*) (Tillet *et al.*, 2000) –, é totalmente diferente da estrutura do cluster gênico *mcy* de *Planktothrix agardhii*. Nesta última, o cluster gênico *mcy* não apresenta os genes *mcyF* e *mcyI*, presentes em *M. aeruginosa*, mas apresenta o gene *mcyT*, não presente em *M. aeruginosa* (Christiansen *et al.*, 2003).

A questão da produção da microcistina é intrigante. Microcistinas são produzidas por cianobactérias completamente diferentes, incluindo gêneros unicelulares, coloniais e filamentosos e gêneros heterocitados e não-heterocitados. Muitas cepas produzem diversas microcistinas simultaneamente, embora apenas uma ou duas delas sejam dominantes naquela cepa. Além disso, fatores ambientais podem induzir mudanças na toxicidade ou na concentração da toxina. Fatores como idade da cultura, temperatura, luz, nutrientes, salinidade, pH e concentração de micronutrientes afetam a quantidade de microcistina em *M. aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae*, e *Planktothrix agardhii* (*Oscillatoria*) (Chorus & Bartram, 1999). Entretanto, o fato de se usar diferentes condições de cultura e diferentes métodos de análise dificulta a comparação dos resultados, de maneira que não existem dados conclusivos a respeito dos fatores ambientais que regulam a produção da toxina. Assim, a biossíntese da microcistina passa pela identificação do gene microcistina sintetase nos diferentes gêneros de cianobactérias capazes de produzir a toxina, uma vez que as cepas produtoras só o fazem por possuírem o gene responsável pela sua produção.

1.5 Análises proteômicas em cianobactérias

Existem muitos estudos sobre a fisiologia de cianobactérias (Burns *et al.*, 2006; Dowing *et al.*, 2005; Coles & Jones, 2000; Brookes *et al.*, 1999; Badger & Price, 1992; Price *et al.*, 1992), mas só recentemente voltou-se a atenção para o estudo de cianobactérias por meio de técnicas proteômicas, principalmente das técnicas de eletroforese em gel bidimensional (2-DE) associadas à identificação por espectrometria de massa (Herranen *et al.*, 2004; Ekman *et al.*, 2006; Klint *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2006; Barrios-Llerena *et al.*, 2007).

A maioria dos trabalhos com proteômica de cianobactérias tem sido realizada utilizando-se a espécie *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Pisareva *et al.*, 2007; Kurian *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2006; Herranen *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2002; Kashino *et al.*, 2002; Fulda *et al.*, 2000). Essa é a cianobactéria modelo para estudos bioquímicos e fisiológicos – particularmente para análise da fotossíntese oxigênica –, porque essa cepa naturalmente transformável é capaz de crescer fotoheterotroficamente (Grigorieva & Shestakov, 1982). Gêneros filamentosos, como *Nostoc* (Anderson *et al.*, 2006; Klin *et al.*, 2006) e *Anabaena* (Barrios-Llerena *et al.*, 2007; Sazuka, 2003), estão, aos poucos, sendo analisados por ferramentas proteômicas.

Os trabalhos que usam proteômica para o estudo de cianobactérias, de um modo geral, avaliam as proteínas dos diferentes compartimentos desses organismos, tais como proteínas periplásmicas (Fulda *et al.*, 1999), proteínas citoplasmáticas (Ran *et al.*, 2007; Kurian *et al.*, 2006), proteínas da membrana plasmática (Pisavera *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2002), proteínas da membrana tilacoidal (Srivastava *et al.*, 2005) e proteínas da membrana externa (Huang *et al.*, 2004) e são, essencialmente, voltados para a proteômica constitutiva.

Com relação às proteínas periplásmicas, cianobactérias dos gêneros *Synechocystis* (Fulda *et al.*, 2000), *Anabaena* (Sazuka *et al.*, 2003) e *Nostoc* (Ran *et al.*, 2007), por exemplo, foram avaliadas para o entendimento das proteínas produzidas em resposta à salinidade, para o entendimento dos sinais de processamento pós-traducional e sequências nucleotídicas na iniciação da tradução e para o entendimento do padrão protéico do estágio de vida que antecede a associação simbiótica cianobactéria-planta, respectivamente. Fulda *et al.* (1999) usaram a cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803 como modelo de estudo para avaliar a função do periplasma

na adaptação da cianobactéria em condições de salinidade, uma vez que esse compartimento é particularmente responsável por mudanças na salinidade e responde às condições ambientais mais rapidamente que o citoplasma. Em maior concentração salina, as células de *Synechocystis* sp. PCC 6803 acumularam, em altas quantidades, duas proteínas periplásmicas codificadas pelos genes *slr0924* e *slr1485*. Entretanto, essas proteínas não apresentaram similaridade com nenhuma proteína de função conhecida, o que inviabilizou conclusões sobre suas funções durante a adaptação às condições de salinidade.

Com relação às proteínas de membrana, Herranen *et al.* (2004) avaliaram a dinâmica dos complexos proteicos de membrana das células de *Synechocystis* sp. PCC 6803 crescidas em elevadas concentrações de dióxido de carbono, depleção de ferro, estresse salino ou quando seu modo de crescimento muda de fotoautotrófico para mixotrófico ou fotoheterotrófico. Em condições de crescimento fotoautotróficas, foram identificadas proteínas dos centros de reação do fotossistema I (PSI) e do fotossistema II (PSII) e quatro subunidades do complexo NDH-1.

Os trabalhos com proteômica comparativa avaliam as proteínas diferencialmente expressas em condições de estresse por salinidade (Fulda *et al.*, 2000), estresse por acidez (Kurian *et al.*, 2006), estresse em função da concentração de dióxido de carbono (CO₂) e ferro (Herranen *et al.*, 2004), bem como proteínas diferencialmente expressas em associação simbiótica em relação à mesma espécie quando de vida livre (Ekman *et al.*, 2006). Mais uma vez, a maioria dos estudos foi realizada com a espécie *Synechocystis* sp. PCC 6803. Condições como maior ou menor salinidade, maior ou menor acidez, variações na concentração de CO₂ e ferro estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento das cianobactérias no ambiente. Portanto, é importante entender como as cianobactérias respondem a essas mudanças ambientais para melhor entender os processos de formação de floração. Além disso, as condições ambientais são particularmente importantes para cianobactérias produtoras de toxinas, pois variáveis abióticas têm influência direta sobre a produção da toxina e a variante produzida (Amé & Wunderling, 2005; Tonk *et al.*, 2005; Katircioglu *et al.*, 2004; Song *et al.*, 1998).

A maioria dos estudos de proteômica de cianobactérias é realizada com uso da ferramenta 2-DE. Entretanto, uma abordagem para a análise proteômica de cianobactérias que vem

ganhando espaço é a técnica *shotgun* (Anderson *et al.*, 2006; Barrios-Llerena *et al.*, 2006). Essa técnica consiste na análise direta de uma amostra proteômica complexa – já fragmentada por digestão triptica – por meio de cromatografia líquida uni- ou multidimensional seguida por espectrometria de massa em *tandem* (Cargile *et al.*, 2005). Com essa abordagem, existe uma representação significativamente maior das proteínas básicas (aquelas situadas no intervalo de pH de 7-10), das proteínas pequenas e das proteínas hidrofóbicas em relação à abordagem 2-DE, pois a técnica *shotgun* permite o acesso a proteínas difíceis de serem resolvidas por eletroforese.

Barrios-Llerena *et al.* (2007) analisaram as proteínas totais de *Anabaena variabilis* ATCC 29413 pela abordagem 2-DE. A grande diferença entre esse estudo e outros de proteômica de cianobactérias é o uso de *strips* com intervalo de pI maior (3-10 em relação ao intervalo mais comumente usado, 4-7), o que permite maior cobertura das proteínas básicas, e o uso de tampão de extração baseado em detergentes *zwitteriônicos* para aumentar a solubilização de proteínas hidrofóbicas, o que favorece maior representação dessa classe de proteínas no gel. Segundo os autores, pelo menos 1/3 do proteoma típico da cianobactéria é perdido quando se usa *strip* de extensão reduzida (pI 4-7). Entretanto, o proteoma de *Anabaena variabilis* ATCC 29413 já havia sido analisado pela abordagem *shotgun* (Barrios-Llerena *et al.*, 2006). O método *shotgun* foi mais efetivo para a detecção de proteínas de baixo peso molecular (<10kDa). Cerca de 13% das proteínas identificadas para *A. variabilis* foram encontradas apenas pela abordagem *shotgun* contra apenas 3% encontradas via 2-DE. Entretanto, nenhuma diferença foi observada para proteínas identificadas com massas moleculares maiores que 100 kDa. As proporções de proteínas ácidas (77-79%) e básicas também foram similares na avaliação por ambos os métodos.

A comparação entre proteínas identificadas por 2-DE e proteínas identificadas por métodos que não usam gel indica a natureza complementar desses métodos. Em Barrios-Llerena *et al.* (2007), por exemplo, 30% das proteínas identificadas por 2-DE não foram encontradas na abordagem *shotgun* (Barrios-Llerena *et al.*, 2006). Essa significativa porcentagem de proteínas identificadas por 2-DE reforça a importância dessa ferramenta para avaliações proteômicas, ainda que essa abordagem possa sub-representar certos grupos de proteínas (especialmente as hidrofóbicas, básicas, grandes (>100kDa), pequenas (<10kDa) ou de baixa abundância).

Anderson *et al.* (2006) também optaram por fazer proteômica de cianobactéria sem o uso da ferramenta 2-DE. Eles analisaram o genoma funcional de *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 pela definição do proteoma em culturas especificamente cultivadas na fase estacionária e na fase de transição, em condições de luz contínua e amônia como fonte de nitrogênio. Primeiramente, foi realizada filtração em gel para separação das proteínas solúveis e, posteriormente, sequenciamento peptídico por *shotgun* 2D LC/MS/MS obtido de cada fração para a identificação proteica. O uso da técnica 3D LC/MS/MS resultou na identificação de 1.574 proteínas, as quais foram agrupadas em 5 diferentes categorias: proteínas do metabolismo central (46% do proteoma solúvel), proteínas de transporte (4% do proteoma), proteínas de adaptação metabólica (11% do proteoma), proteínas próprias (1% do proteoma) e proteínas sem assinatura (39% do proteoma). A quantidade de proteínas identificadas por essa técnica indica seu potencial para análises em larga escala devido à alta sensibilidade do equipamento (fentomols) (Anderson *et al.*, 2006). A condição de luz contínua resultou na redundância de proteínas relacionadas ao metabolismo de espécies reativas de oxigênio (3 superóxido dismutase, 5 peroxirredoxinas, peroxidase, 5 glutathione-S-transferase) e fotorreparo do dano causado ao DNA (2 fotoliasas) – proteínas pertencentes à categoria “metabolismo central”. A redundância dessas proteínas revela um mecanismo de prevenção ao desencadeamento de tais estados de estresse, uma vez que *N. punctiforme* é um organismo fototrófico. Isso significa que *N. punctiforme* apresenta uma capacidade genômica extraordinária de responder rapidamente aos sinais ambientais (Anderson *et al.*, 2006).

No que diz respeito aos gêneros coloniais, como *Microcystis*, pouco se conhece a respeito da proteômica desses organismos. Especificamente no caso do gênero *Microcystis*, são escassos os trabalhos sobre seu padrão de expressão de proteínas, embora esse gênero seja amplamente estudado devido à sua capacidade de produção de toxinas (Dowing *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2002; Magalhães *et al.*, 2001; Chorus & Bartram, 1999; Dittman *et al.*, 1997). Os trabalhos geralmente detêm-se à determinação de oligopeptídeos (cianopeptolinas, micropeptinas, aeruginopeptinas, anabaenopeptinas e microcistinas) por meio da técnica MALDI-TOF. Erhard *et*

al. (1997), por exemplo, demonstraram o potencial da espectrometria de massa para a detecção direta de metabólitos secundários em células intactas de *M. aeruginosa*.

Em 2001, Dittmann e colaboradores identificaram uma proteína relacionada à produção da microcistina (MrpA). Em seu trabalho, eles avaliaram extratos proteicos da cepa *M. aeruginosa* PCC 7806 selvagem e seu mutante (*knockout* do *mcyB*) por 2-DE, usando tiras com intervalo de pI de 4,5-7, e verificaram a expressão da proteína MrpA apenas pela cepa mutante. Segundo esse trabalho, essa proteína, com cerca de 30 kDa, é muito semelhante à proteína RhiA, de *Rhizobium leguminosarum*, proteína com expressão dependente da densidade celular e que envolve mediadores *quorum-sensing*. As análises genômicas mostraram a presença das ORFs *mrpA* e *mrpB* em *M. aeruginosa*, embora a proteína MrpB não tenha sido detectada no 2-DE. Assim, para analisar a influência da microcistina na produção da MrpAB, eles avaliaram a resposta dos transcritos *mrpAB* à diferentes quantidades e qualidades de luz (luz branca, vermelha e azul e intensidades de 16, 68 e 400 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Houve grande aumento do nível de transcritos sob luz azul, e a quantidade de transcritos observada em 16 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi praticamente zero nas outras duas intensidades luminosas na cepa selvagem. A cepa mutante não apresentou diferença significativa na quantidade de transcritos. Assim, é possível que os genes *mrpA* e *mrpB* sejam regulados pela luz, e sua expressão seja drasticamente reduzida no mutante. Em *Rhizobium*, a expressão do RhiA, B e C é regulada pela proteína RhiR (regulador do tipo LuxR). Esses reguladores de *quorum-sensing* regulam a expressão de vários genes, inclusive genes de peptídeo sintetases. Assim, é possível que o contato célula-célula no ambiente natural desempenhe uma função importante para *Microcystis* e um tipo de *quorum-sensing* seja necessário para a formação da floração. Embora não existam evidências da microcistina como sinalizador extracelular, a existência de um transportador ABC putativo ligado à microcistina reforça a proposta de um mecanismo de efluxo ativo para a microcistina.

Considerando-se a imensa importância que a espécie *Microcystis aeruginosa* apresenta no que se refere à qualidade da água dos ecossistemas de água doce – por ser uma espécie potencialmente tóxica –, principalmente aqueles destinados ao abastecimento público, é surpreendente a carência de trabalhos na área proteômica com ênfase para proteômica

comparativa relacionada à biossíntese da microcistina, embora existam trabalhos que caracterizam os genes relacionados à sua biossíntese (Tillet *et al.*, 2000). Nesse aspecto, este trabalho visa preencher parte dessa carência. O entendimento de proteínas envolvidas na produção da toxina, independentemente de quais sejam os fatores ambientais que funcionem como estímulo, é fundamental para o desenvolvimento de pesquisas futuras. Tais estudos visam medidas de remediação em reservatórios de abastecimento público nos quais os episódios de floração sejam frequentes, como é o caso dos reservatórios de água doce do Norte e Nordeste brasileiros. Essas medidas devem garantir a qualidade da água para a população, uma vez que o tratamento convencional da água não elimina completamente a microcistina (Lambert *et al.*, 1996).

2 Justificativa

Conhecer a biologia e a ecologia das espécies e variedades de cianobactérias potencialmente tóxicas é de extrema importância, uma vez que diversos países do mundo, inclusive o Brasil, têm experimentado muitos episódios de floração, principalmente de espécies do gênero *Microcystis*. Como apresentado anteriormente, *M. aeruginosa* é uma espécie capaz de produzir a toxina microcistina. O aumento dos processos de eutrofização e o aquecimento global favorecem o aumento da ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas, o que enfatiza a necessidade de se entender os mecanismos de produção da toxina pela cianobactéria.

Percebe-se, pelo que já se explanou, que muito se sabe sobre os genes envolvidos na biossíntese da microcistina. Porém, a quantidade de estudos relacionados à sua produção que utiliza ferramentas proteômicas ainda é escassa. Análises proteômicas fornecem informações valiosas que podem levar a maior entendimento das vias metabólicas, das respostas fisiológicas e da sua regulação. Relativamente poucas espécies de cianobactérias foram objeto de investigações proteômicas, sendo a maioria dos estudos proteômicos por 2-DE restrita à cianobactéria unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dessa maneira, tornam-se particularmente interessantes os estudos proteômicos de outras espécies de cianobactéria, em especial daquelas potencialmente produtoras de microcistina, visando ao entendimento das vias de sua biossíntese por meio da proteômica comparativa. Além disso, o uso da proteômica comparativa entre cepas tóxicas e cepas não tóxicas naturais pode esclarecer porque as cianobactérias produzem metabólitos secundários e como estes são transportados, estocados na célula ou liberados para o meio extracelular.

Assim, a identificação de proteínas envolvidas na produção da microcistina pode levar, futuramente, ao desenvolvimento de compostos que ajudem a evitar a sua liberação em ecossistemas dulcícolas, principalmente em se tratando de reservatórios destinados ao abastecimento de água para a população. O desenvolvimento de tais compostos funcionaria como tentativa de amenizar esse sério e amplamente distribuído problema de saúde pública.

3 Objetivos

Este trabalho objetiva comparar, por meio da abordagem proteômica, as proteínas diferencialmente expressas por duas cepas de *Microcystis aeruginosa*, sendo uma tóxica – *M. aeruginosa* PCC 7806 – e a outra não tóxica – *M. aeruginosa* NIVA CYA 43.

3.1 Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver método de extração proteica para *M. aeruginosa* que seja particularmente eficiente para a extração das proteínas citoplasmáticas;
- ✓ Visualizar o padrão proteico de uma espécie de cianobactéria tóxica mundialmente importante entre faixa de pI de 3 a 11;
- ✓ Buscar proteínas expressas exclusivamente em condição de toxicidade;
- ✓ Elucidar a provável participação dessas proteínas na diferenciação entre cepas tóxicas e não tóxicas e em outros processos metabólicos que possam estar envolvidos, direta ou indiretamente, na produção de toxinas.

4 Material e Métodos

4.1 Organismos e condições de cultivo

Os microrganismos *M. aeruginosa* PCC 7820 (padrão para toxicidade) e NIVA CYA 43 (padrão para não toxicidade com toxicidade abaixo dos níveis de detecção) foram adquiridos do CSIRO (*Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization*) *Marine Laboratories culture collection*, na Tasmânia, Austrália. Cada cepa foi cultivada em três frascos distintos (triplicata) contendo 200 mL meio MLA modificado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mM, NaNO_3 1M, K_2HPO_4 40 mM, H_3BO_3 40 mM, NaHCO_3 200 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 200 mM, vitaminas e micronutrientes, pH = 7,5) (Bolch & Blackburn, 1996), temperatura $22\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$, luminosidade correspondente a 322 lux e fotoperíodo 12h:12h. Para as repicagens das culturas, foi mantido o padrão 1 mL :10 mL (cultivo/meio), como recomendado pelo CSIRO. A cada 48h, durante 38 dias, 3 alíquotas de 1 mL de cada frasco foram coletadas e tiveram sua absorbância medida a 680nm – espectro de absorção da clorofila. Assim, foram delineadas as curvas de crescimento e definidas as absorbâncias correspondentes à fase logarítmica (*log*) de crescimento de ambas as cepas.

4.2 Medição das células

Para viabilizar correlações entre os resultados proteômicos e características fenotípicas das cepas, foram realizadas medições de diâmetro das células. Para isso, ambas as cepas foram observadas em microscópio de luz transmitida na modalidade campo claro em aumento 100x (Axiophot, Zeiss, Alemanha). Foram montadas duas lâminas: uma para cada cepa. De cada lâmina, foram obtidas 17 fotografias. A captura das imagens foi realizada pelo programa Axiovision versão 4.7 (Zeiss, Alemanha), e as células foram medidas pelo programa Axiovision Release versão 4.8 (Zeiss, Alemanha).

Para a medição, foram consideradas células sozinhas, que visualmente não aparentavam estar em processo de divisão celular. Mais de 100 células de cada cepa foram medidas, sendo

pelo menos 4 de cada imagem obtida. Depois, foi feita a média aritmética entre as células medidas, valor considerado como tamanho celular médio. Também foram considerados os valores de desvio padrão.

4.3 Análise da presença da toxina

Alíquotas de 1 mL de meio de cada cepa foram coletadas durante a fase *log* de crescimento (*M. aeruginosa* PCC 7820 $DO_{680nm} = 0,164$ e *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 $DO_{680nm} = 0,252$) para avaliação. As alíquotas foram congeladas e descongeladas 3 vezes em *freezer* - 20 °C e água morna e centrifugadas a $12.100 \times g$ por 5 minutos. A quantidade de proteínas foi determinada por Qubit™, como será descrito no tópico 4.4. Cada alíquota foi separadamente analisada em cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Foram injetados 100 µL de cada amostra (*M. aeruginosa* PCC 7820 = $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 = $297 \mu\text{g.mL}^{-1}$), separadamente, em uma coluna analítica C18 de fase reversa (Vydac 218PT), poro de 5µm e fluxo de 1 mL.min^{-1} . A corrida teve duração de 35 minutos e seguiu variação não linear de gradiente de 35% a 95% de acetonitrila/TFA 0,1%. A absorbância foi monitorada em densidade óptica de 238 nm, comprimento de onda absorvido pela microcistina. Antes da aplicação de cada amostra, foi realizado um branco com o mesmo tempo de duração e as mesmas condições de corrida. As frações coletadas foram concentradas em *speed vacuum* (Labconco) para, posteriormente, serem analisadas por espectrometria de massa.

4.4 Identificação das toxinas via MS

As análises por espectrometria de massa foram realizadas com um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (*Matrix-assisted laser desorption time of flight*) Ultraflex III (Bruker Daltonics). As frações cromatográficas foram ressuspensas em 20 µL de TFA 0.1% e misturadas em uma razão de 1:3 v/v com solução saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico. Dessa mistura, 1 µL foi depositado sobre uma placa de MALDI. Os espectros foram adquiridos em modo refletido positivo. Íons com intensidade suficiente foram selecionados para clivagem por

MS/MS. O padrão de fragmentação das microcistinas foi gerado no modo LIFT de aquisição com calibração externa.

4.5 Extração proteica

Ao atingir a fase *log* de crescimento, as culturas foram centrifugadas a 3.000 x g, 4°C, por 30 minutos. As células foram ressuspensas em tampão de extração (Tris-HCl 5 mM, CaCl₂.2H₂O 5 mM, triton-X-100 0,01% e inibidor de proteinase 1 mM – *Proteinase Inhibitor Cocktail for General Use*, GE – contendo inibidores competitivos e não competitivos para as proteases serínicas, cisteínicas e calpaína – pH 7,3) em uma proporção 1:5 (g:v), congeladas e descongeladas 5 vezes em nitrogênio líquido. As amostras foram novamente centrifugadas a 3.000 x g, 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi recolhido para as análises proteicas e o precipitado foi descartado. Após a extração, a concentração proteica das amostras foi determinada por fluorimetria Qubit™ (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), seguindo-se os passos indicados pelo fabricante. Para a quantificação, 199 µL de tampão Qubit™ são, primeiramente, misturados com 1 µL de fluoróforo Qubit™. A partir desses 200 µL de solução, 199 µL foram aliqüotados em microtubo apropriado e 1 µL da amostra a ser quantificada foi, então, acrescentada. A reação durou 15 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, a amostra foi lida no leitor Qubit™. Esse leitor mede a fluorescência e fornece diretamente a concentração em µg.mL⁻¹, sem a necessidade de se realizar uma curva padrão. Após a quantificação proteica, aliqüotas das amostras contendo 50 µg.mL⁻¹ e 600 µg.mL⁻¹ foram precipitadas com 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 75% para SDS-PAGE e gel bidimensional, respectivamente. A reação com TCA ocorreu no gelo por 30 min. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 12.100 x g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e os precipitados foram lavados 3 vezes com 1 mL de acetona gelada 100%. Para a realização do gel bidimensional, após as lavagens com acetona, os precipitados foram submetidos ao *kit* de limpeza 2-DE *Cleaning-up Kit* (Amersham Biosciences) conforme as instruções do fabricante. Aos precipitados, foram adicionados 300 µL de solução precipitante. A mistura foi agitada vigorosamente e deixada em gelo por 15 minutos. Então, foram adicionados 300 µL de solução coprecipitante. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 12.100 x g por 5 minutos e os

sobrenadantes foram descartados. Mais 40 μL de solução coprecipitante foram adicionados com reação de 5 minutos no gelo. As amostras foram novamente centrifugadas e os sobrenadantes descartados. Foram adicionados 25 μL de água ultrapura seguidos de agitação vigorosa. Por fim, foram adicionados 1 mL de *Chilled Wash Buffer* e 5 μL de *Wash Additive*. As amostras foram agitadas vigorosamente mais uma vez, a cada 10 minutos, por 3 vezes, totalizando-se 30 minutos. Os precipitados foram armazenados em *freezer* – 20 °C.

4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970), à temperatura ambiente, para análises preliminares da composição proteica das cepas analisadas. Foram aplicados 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteína de cada cepa, em triplicata, em SDS-PAGE, com gel de empilhamento (acrilamida 5%, tampão Tris-HCl 1,5 M pH=6,8, persulfato de amônio 0,1% e temed 0,012%) e gel de corrida a 15% (acrilamida 15%, tampão Tris-HCl 1,5 M pH=8,8, persulfato de amônio 0,1% e temed 0,006%). Para comparação das massas moleculares, foram aplicados 5 μL de marcador de massa molecular (*Unstained Protein*, Fermentas) contendo β -galactosidase (*E. coli*), albumina sérica bovina (plasma bovino), ovoalbumina (clara de ovo de galinha), lactato desidrogenase (músculo de porco), enzima de restrição Bsp981 (*E. coli*), β -lactoglobulina (leite bovino) e lisozima (clara de ovo de galinha). Para visualização durante a corrida, as amostras foram misturadas com azul de bromofenol. Após a corrida (200 V, 200 mA, 10 W, 1h30m), o gel foi corado com Coomassie G-250.

4.7 Eletroforese bidimensional (2-DE)

Para a realização do gel bidimensional, 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteína de cada cepa, em triplicata (3 amostras biológicas de *M. aeruginosa* PCC 7820 e 3 amostras biológicas de *M. aeruginosa* NIVA CYA 43), foram ressuspendidos em tampão de re-hidratação (uréia 8 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2%, tampão IPG 3-10 1%, dithiothreitol (DTT) 65 mM e traços de azul de bromofenol) e aplicados em tiras não lineares de 13 cm (Amersham Biosciences) com pI variando de 3 a 11.

As tiras foram re-hidratadas por 16 horas, a 20 °C. A focalização isoeétrica foi realizada no IPGphor (General Electrics) seguindo os seguintes passos: (i) 500 V, por 1h; (ii) 1.000 V, por 2h; (iii) 3.500 V, por 5h30m e (iv) 3.500 V, por 10h, até a focalização acumular 40.000 Vh. Após a focalização, as tiras foram armazenadas em *freezer* – 80 °C até a realização da segunda dimensão. Antes da realização da segunda dimensão, as tiras foram equilibradas com tampão de equilíbrio (Tris-HCl 1,5 M, uréia 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, e traços de azul de bromofenol) contendo DTT 1% por 15 minutos e, em seguida, com mesmo tampão de equilíbrio, porém, contendo iodoacetamida 1% em vez de DTT, por mais 15 minutos. Depois de equilibradas, as tiras foram inseridas sobre o SDS-PAGE 12% para a realização da segunda dimensão (400 V, 400 mA, 100 W). Para comparação das massas moleculares, foram aplicados 10 µL de marcador de massa molecular (*Benchmark protein leader*, Invitrogen). Após 8 h de corrida, os géis foram colocados em solução descorante e, após 24 horas, foram corados com solução contendo Coomassie G-250.

4.8 Análise dos mapas proteicos

Os géis foram analisados pelo programa *BioNumerics* versão 4.6. Primeiramente, os *spots* de cada gel foram detectados manualmente. Em seguida, foi feita a calibragem de cada gel para que o programa detectasse a intensidade dos *spots*. A massa molecular e o ponto isoeétrico também foram ajustados. Para a comparação, foi escolhido um gel de referência para o grupo dos géis de *M. aeruginosa* PCC 7820 (padrão para toxicidade) e outro gel de referência para aquele de *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 (padrão de não toxicidade). Os géis foram, então, comparados entre si, primeiramente dentro de cada padrão (géis da cepa tóxica comparadas entre si e géis da cepa não tóxica comparadas entre si) e, posteriormente, entre os padrões (géis da cepa tóxica comparados com géis da cepa não tóxica). No primeiro caso, os *spots* que representam a mesma proteína foram correlacionados. Com isso, as análises estatísticas foram realizadas com base na intensidade dos *spots* (valor de volume fornecido pelo programa para cada *spot*). Foram usadas duas variáveis: volume e volume relativo dos *spots*. A primeira consiste em uma busca por significância, selecionando-se aqueles *spots* com base na regressão entre pares de géis. A última

busca baseia-se na informação de cada *spot* em relação a todos os outros no gel. Os valores de volume foram usados para cálculos de correlação entre os géis, dado que informa a reprodutibilidade entre eles. Os valores de volume relativo foram usados para seleção dos *spots* diferencialmente expressos. Finalmente, os géis de referência de cada grupo foram comparados entre si e sobrepostos. Baseado no valor do volume relativo e na presença ou ausência de determinado *spot*, foram escolhidos os *spots* de interesse para posterior identificação por espectrometria de massa.

4.9 Identificação proteica por espectrometria de massa

A digestão dos *spots* foi feita de acordo com Shevchenko *et al.* (1996). Os *spots* foram cortados com o auxílio de uma lâmina de bisturi e colocados em microtubos. Foram adicionados 300 μ L de solução descorante. Os tubos foram colocados em agitador por 16 horas, até a retirada completa do corante Coomassie. Após esse tempo, a solução descorante foi descartada e foram realizadas 3 lavagens com etanol 50%, com duração de 15 minutos cada uma. Foram adicionados 300 μ L de acetonitrila 100% por 10 minutos. Após a desidratação dos pedaços de gel, a acetonitrila foi descartada, 50 μ L de DTT 10 mM em NH_4HCO_3 100 mM foram adicionados e as amostras foram incubadas em banho-maria a 56 °C durante 30 minutos. A solução de DTT foi substituída por 50 μ L de iodoacetamida 55 mM em NH_4HCO_3 100 mM, seguido de incubação por 1h30min, no escuro, em temperatura ambiente. Os *spots* foram novamente lavados com 100 μ L de NH_4HCO_3 100 mM por 10 minutos. Foram adicionados 100 μ L de acetonitrila até a desidratação dos pedaços de gel. A acetonitrila foi descartada e a re-hidratação foi feita com 50 μ L de NH_4HCO_3 50 mM, CaCl_2 5 mM e 600 ng de tripsina (*Trypsin Golg-Mass Spectrometry Grade*, Promega) em gelo durante 45 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados em estufa 37°C, a 135 rpm, por 24 horas. Após a tripsinização, 1 μ L de cada tubo foi coletado para análises preliminares. O restante foi transferido para tubos novos e os tubos contendo os pedaços de gel foram descartados. As amostras foram colocadas em *speed vaccum* até que ficassem completamente secas, então, foram estocadas em – 20 °C até a realização das análises.

Os *spots* de interesse foram identificados por *peptide mass fingerprinting* (PMF) e por sequenciamento *de novo*. No caso do PMF, as massas encontradas foram comparadas com dados depositados em bancos de dados não redundantes do NCBI utilizando-se o *software* MASCOT (MASCOT versão 2.1.0, Matrix Science, Londres). O sequenciamento *de novo* foi executado manualmente, subtraindo-se as massas dos íons encontrados nos espectros a partir das séries *y* e *b*. O valor da diferença foi comparado às massas dos aminoácidos e a sequência foi anotada. Em seguida, uma procura no banco de dados Swiss-Prot (www.expasy.org) foi feita utilizando-se a ferramenta *MPSearch* do *European Intitute of Bioinformatics* – EBI – comparando-se o fragmento encontrado com as proteínas armazenadas no banco. Foram anotadas proteínas cujo momento hidrofóbico e ponto isoelétrico eram semelhantes às observadas nas técnicas previamente utilizadas e cujo ponto de corte do fragmento encontrado era equiparável a um fragmento tríptico.

4.10 Análise dos dados

As massas encontradas por *peptide mass fingerprinting* (PMF) foram comparadas com dados depositados em bancos de dados não redundantes do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando-se o *software* MASCOT (Perkins *et al.*, 1999). Foram assumidos como parâmetros de busca: modificação fixa devido à carbamidometilação de cisteínas, modificação variável devido à oxidação de metioninas, uma *mis-cleavage* da tripsina e 80 p.p.m. (partes por milhão) de acurácia de massa. Acertos com probabilidade baseada em MOWSE scores maiores que 50 foram obtidos, o que indica que os acertos foram significantes ($p < 0,05$). Ainda assim, as sequências de aminoácidos obtidas com score maior que 50 foram analisadas também pelo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para maior confiabilidade do resultado (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequências obtidas pelo Mascot, porém, que não apresentaram proteína associada, foram analisadas pelo BLAST. Para a maioria desses casos, os resultados do BLAST resolveram a proteína. Aquelas que ficaram sem resultado por Mascot, que foram analisadas pelo BLAST e, que, ainda assim, permaneceram não resolvidas, foram sequenciadas manualmente pelo programa PepSeq (Waters).

5 Resultados e discussão

5.1 Cepas e seu crescimento

As cepas *M. aeruginosa* PCC 7820 (padrão tóxico) e *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 (padrão não tóxico) foram adquiridas do centro CSIRO, na Austrália (Figura 5). Ao chegarem, passaram por um período de adaptação às condições de cultivo do Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília, equivalente a 45 dias. Inicialmente, análises morfológicas por microscopia mostraram que a cepa *M. aeruginosa* PCC 7820 apresenta coloração mais clara que a cepa *M. aeruginosa* NIVA CYA 43, característica refletida nos valores de absorvância correspondentes à fase *log* de crescimento, que diferem para ambas as cepas. Esses valores são mostrados nas Figuras 6 e 7. Medições das células a partir das imagens obtidas por microscopia mostram que as células da cepa PCC 7820 apresentam menor diâmetro – 3,66 μm (desvio padrão = 0,18) – (Figura 5A) em relação às células da cepa NIVA CYA 43 – 4,44 μm (desvio padrão = 0,21) – (Figura 5B).

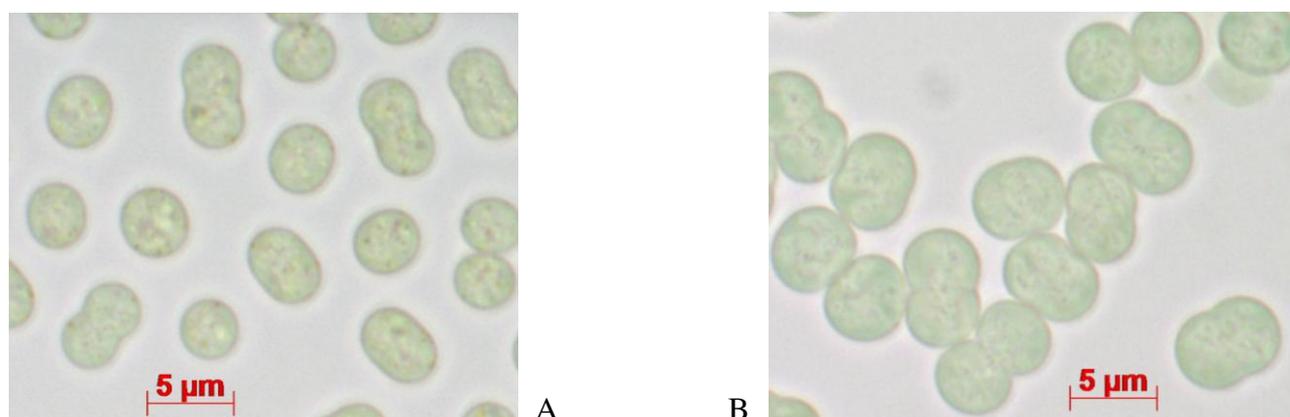


Figura 5. Células de *Microcystis aeruginosa* observadas em microscópio de luz transmitida – modalidade campo claro – aumento de 100x. (A) *M. aeruginosa* PCC 7820. (B) *M. aeruginosa* NIVA CYA 43.

Dittmann e colaboradores (1997) propõem, em seu trabalho, que a cepa tóxica de *M. aeruginosa* PCC 7806 apresenta maior diâmetro em relação a seu mutante – transformado por *knock-out* do gene *mapep1* (envolvido na produção de microcistina) –, sugerindo possível

participação da microcistina em processos celulares primários. Neste trabalho, observou-se que a cepa naturalmente tóxica – PCC 7820 – apresenta menor diâmetro celular em relação à cepa naturalmente não tóxica – NIVA CYA 43. Provavelmente, o gasto energético envolvido na produção das proteínas que sintetizam a microcistina e na síntese da toxina em si estaria relacionado com menor disponibilidade energética para o investimento em tamanho celular.

Após o período de adaptação, a curva de crescimento de ambas as cepas foi postulada como descrito na sessão 4.1 deste trabalho. Com o gráfico das curvas de crescimento, foi possível determinar a absorbância na qual as proteínas deveriam ser extraídas. Para extração, foi escolhido o meio da fase *log* de crescimento, uma vez que, nesse período, as células estão em constante divisão celular, o que garante células jovens e, conseqüentemente, maior vigor celular e maior probabilidade de não serem encontradas proteínas envolvidas em apoptose e morte celular. Embora a quantidade de toxina intracelular seja tipicamente maior no final da fase *log* de crescimento (Carmichael, 2001), nesse ponto da fase *log* e na fase estacionária, as células apresentam diminuição da taxa de divisão celular e é nesse período que ocorre degradação proteica. Por tais razões, as células de ambas as cepas foram extraídas no meio da fase *log* de crescimento, sendo em $DO_{680nm}=0,3$ para *M. aeruginosa* PCC 7820 (Figura 6) e em $DO_{680nm}=0,7$ para *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 (Figura 7).

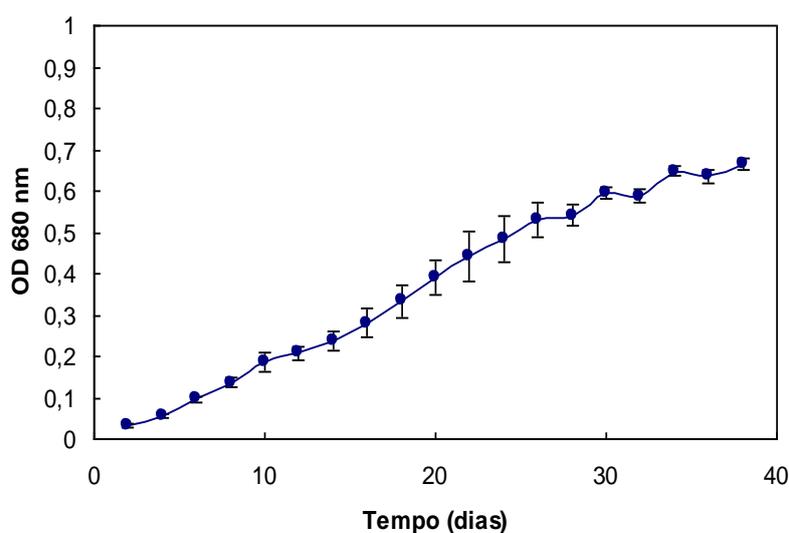


Figura 6. Curva de crescimento apresentada pela cepa *M. aeruginosa* PCC 7820 durante 38 dias de monitoramento em espectrofotometria usando comprimento de onda igual a 680nm. As barras verticais indicam o desvio padrão entre as triplicatas de cada ponto de medição. OD = densidade óptica.

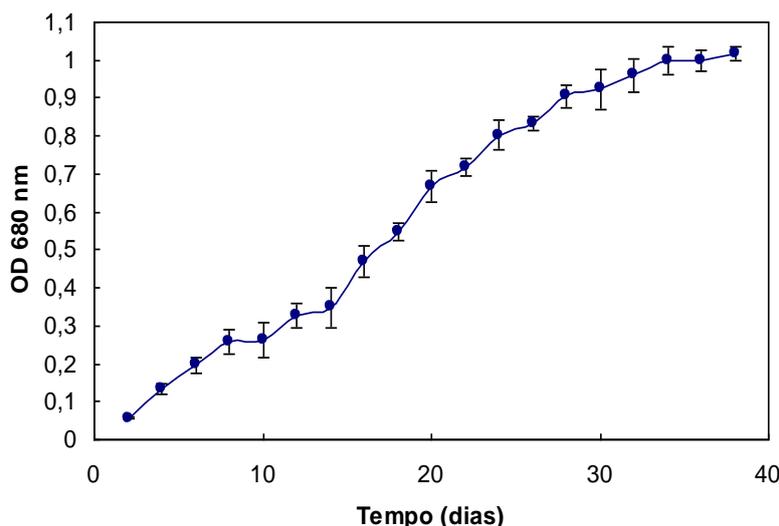


Figura 7. Curva de crescimento apresentada pela cepa *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 após 38 dias de medição da absorbância em comprimento de onda igual a 680nm. As barras na vertical indicam o desvio padrão entre as triplicatas de cada ponto de medição. OD = densidade óptica.

A cepa tóxica *M. aeruginosa* PCC 7820 apresentou valores de absorbância menores em relação à cepa não tóxica *M. aeruginosa* NIVA CYA 43, como mostrado nas respectivas curvas de crescimento. O comprimento de onda usado foi de 680 nm, valor próximo ao pico de absorbância da ficocianina. É provável que a cepa não tóxica possua esse pigmento em quantidade muito superior à cepa tóxica. Cepas tóxicas e não tóxicas de *Microcystis* apresentam diferenças na composição dos pigmentos acessórios. Cepas tóxicas possuem pigmentos acessórios que desempenham função de proteção contra UV (luz ultravioleta) (absorção entre 350 e 400 nm), ficoeritrina (absorção a 570 nm) e uma concentração relativamente baixa de ficocianina. Cepas não tóxicas não possuem ficoeritrina, mas apresentam uma quantidade de ficocianina muito maior (pico de absorbância a 627 nm) (Kardinaal *et al.*, 2007). Essa observação também é válida para explicar a diferença na coloração das cepas. A cepa não tóxica tem coloração verde azulada, bem típica de cianobactérias, o que também indica maior quantidade de ficocianina. A cepa tóxica possui coloração menos azulada, o que indica concentração relativamente baixa de ficocianina.

5.2 Análise da presença da toxina

As culturas foram analisadas por HPLC de fase reversa para confirmação dos dados fornecidos pelo CSIRO a respeito da produção da microcistina. A metodologia usada foi semelhante à previamente descrita por Harada *et al.* (1999). Para essa análise, 1 mL de cada cepa foi congelado e descongelado 3 vezes, centrifugado, e 100 μL do sobrenadante de cada cepa foram injetados, separadamente, em coluna C18 de cromatografia de fase reversa (concentração protéica correspondente a 256 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a cepa PCC 7820 e 297 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a cepa NIVA CYA 43). O cromatograma obtido para ambas as cepas pode ser visualizado na Figura 8.

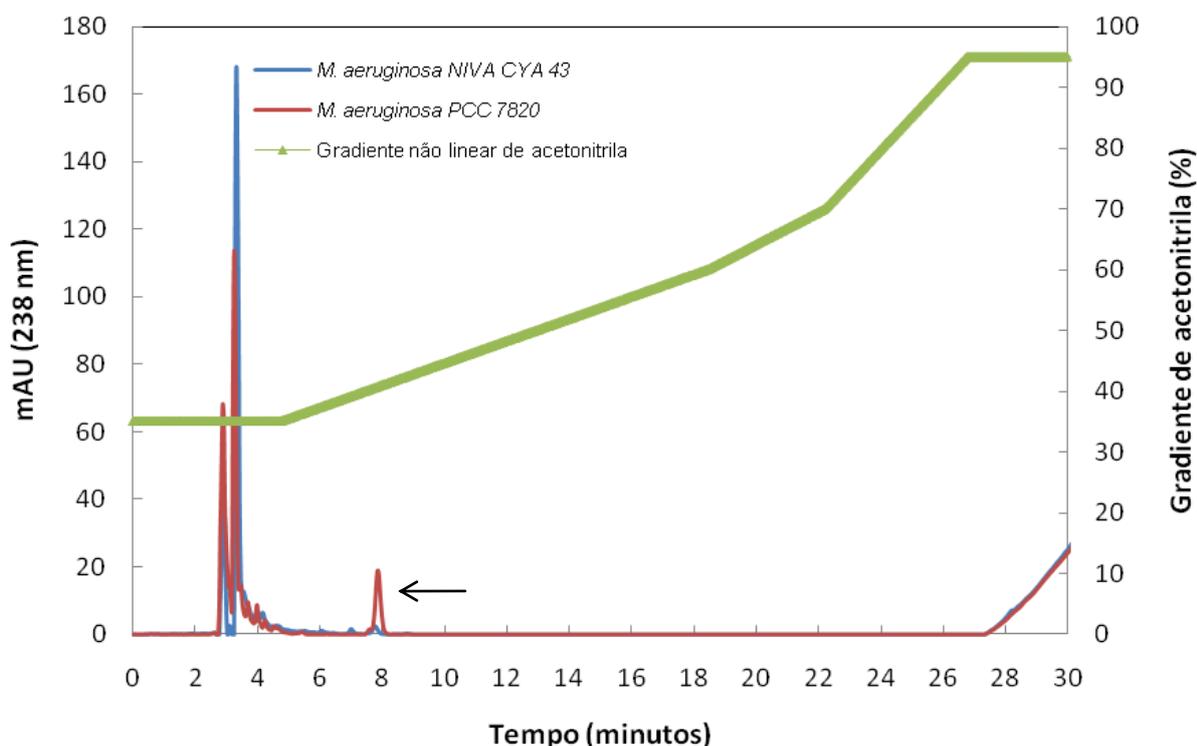


Figura 8. Análise do extrato das amostras de *M. aeruginosa* PCC 7820 (linha vermelha) e *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 (linha azul) em HPLC – coluna C18 de fase reversa – e detecção a 238 nm. A fração indicada pela seta foi seqüenciada por MALDI-TOF/TOF. A corrida teve duração de 35 minutos e seguiu variação não linear de gradiente de 35% a 95% de acetonitrila/TFA 0,1%.

Como observado na Figura 8, não foi eluída nenhuma fração cromatográfica do extrato de *M. aeruginosa* NIVA CYA 43. A fração coletada foi eluída apenas do extrato de *M. aeruginosa*

PCC 7820 após 7 minutos e 48 segundos de corrida. Para identificação, as frações coletadas foram concentradas em *speed vaccum*, ressuspendidas em matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e analisadas por MALDI-TOF/TOF. Os espectros de massa (Figura 9) mostraram que a fração indicada com uma seta na Figura 8 contém mais de uma variante de microcistina, confirmando que a cepa *M. aeruginosa* PCC 7820 é tóxica.

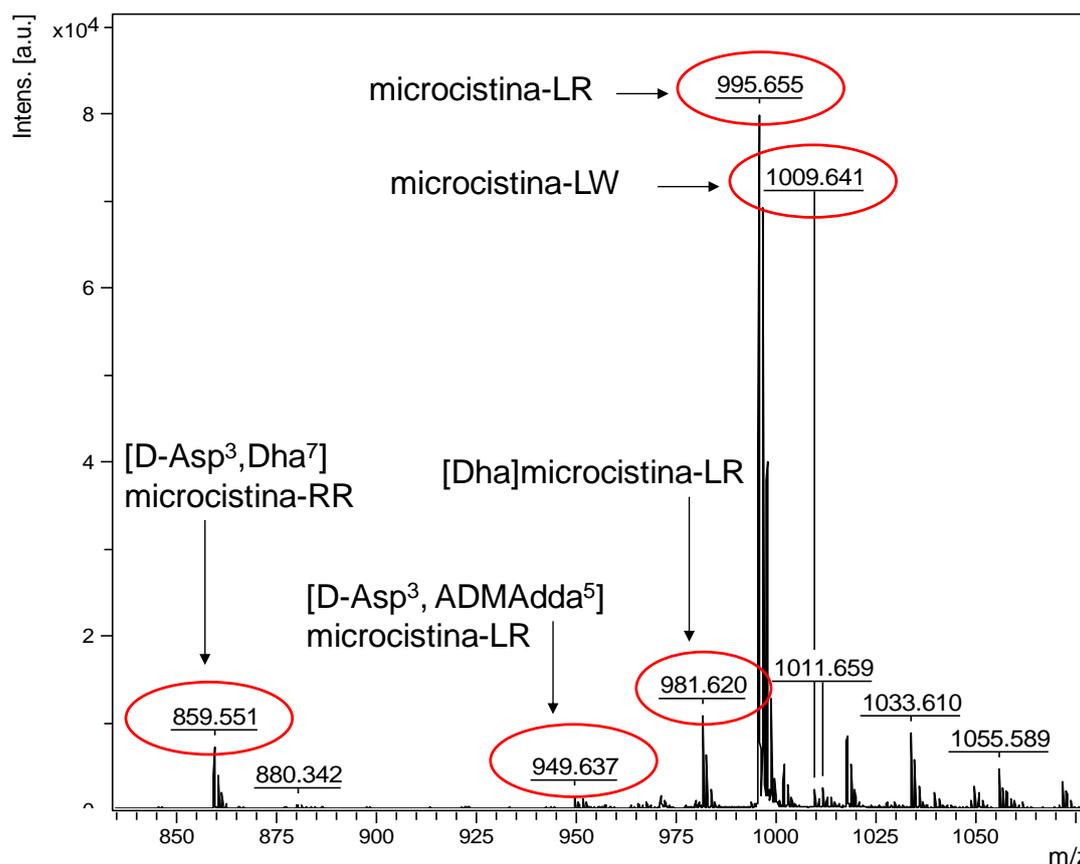


Figura 9. Espectro de massa obtido por MALDI-TOF/TOF da fração eluída em cromatografia por HPLC do extrato de *M. aeruginosa* PCC 7820 (fração indicada na figura 8) e as respectivas identificações das variantes de microcistina.

A partir do espectro MS obtido, foram escolhidos os íons de massa monoisotópica $[M+H]^+$ 859, 949, 981 e 995 m/z para obtenção dos espectros de fragmentação por MS/MS. Por não ser o foco deste trabalho, a identificação das microcistinas foi realizada apenas pela comparação das massas desses 4 íons e do íon 1009 m/z (não fragmentado) com dados da literatura (Tabela 2).

O fato de haver cinco variantes de microcistina sendo produzidas simultaneamente não é surpresa, pois, assim como cada cianotoxina pode ser produzida por mais de uma espécie de cianobactéria, a mesma espécie de cianobactéria é capaz de produzir mais de uma variante da

toxina. Além disso, em 50 a 75% das florações de cianobactérias, a toxicidade está associada com a produção simultânea de diversas cianotoxinas (An & Carmichael, 1994).

Tabela 2. Identificação, por MALDI-TOF/TOF, das microcistinas presentes na fração coletada após 7 minutos e 48 segundos de corrida em HPLC de fase reversa. As massas obtidas foram comparadas com dados da literatura para determinação da variante de microcistina.

Tempo de eluição	Massa monoisotópica identificada [M+H] ⁺	Variante de microcistina	Referência
7min48seg	859	[D-Asp ³ ,Dha ⁷] microcistina-RR	Yuan <i>et al.</i> , 1999
	949	[D-Asp ³ , ADMAdda ⁵] microcistina-LR	Oksanen <i>et al.</i> , 2004
	981	[Dha]microcistina-LR	Bateman <i>et al.</i> , 1995
	995	microcistina-LR	Bateman <i>et al.</i> , 1995
	1009	microcistina-LW	Bateman <i>et al.</i> , 1995

5.3 SDS-PAGE

Ao atingirem a metade da fase *log* de crescimento (*M. aeruginosa* PCC 7820 DO_{680nm}=0,3 *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 DO_{680nm}=0,7), as culturas foram devidamente processadas para a extração proteica. Minigéis (SDS-PAGE) foram realizados para avaliar a compatibilidade do tampão de extração para amostras de *Microcystis* e a reprodutibilidade da separação das proteínas solúveis (Figura 10).

Como observado na Figura 10, o protocolo de extração protéica apresentado demonstrou baixa degradação proteica bem como alta reprodutibilidade entre as réplicas técnicas. O gel mostrado na Figura 10A mostra 15 bandas bem resolvidas com massa molecular entre 10 e 116 kDa. Entretanto, a maioria das bandas apresentou massa molecular abaixo de 50 kDa. O gel mostrado na Figura 10B mostra 18 bandas bem resolvidas com massa molecular entre 5 e 116 kDa. A cepa *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 apresenta claramente maior quantidade de proteínas com massa molecular maior que 50 kDa e menor que 14 kDa em relação à cepa *M. aeruginosa* PCC 7820. Essas diferenças no padrão protéico entre as cepas podem refletir não apenas

diferenças constitutivas, sugerindo que a expressão proteica diferencial pode estar relacionada ao estado produtor da microcistina e ao estado não produtor dela, mas também apontar proteínas envolvidas em diversas características fenotípicas previamente observadas – como a cor diferente entre as culturas e as diferentes taxas de crescimento entre as cepas. Fulda e colaboradores (1999) verificaram, por SDS-PAGE, a expressão diferencial de proteínas de extratos celulares de *Synechocystis* sp. PCC 6803 em culturas-controle e em culturas adaptadas à salinidade. Os géis mostraram o acúmulo de 2 proteínas periplásmicas em células crescidas na presença de 342 mM de NaCl (cloreto de cálcio) que são expressas em menores quantidades nas culturas-controle (crescidas em 2 mM de NaCl).

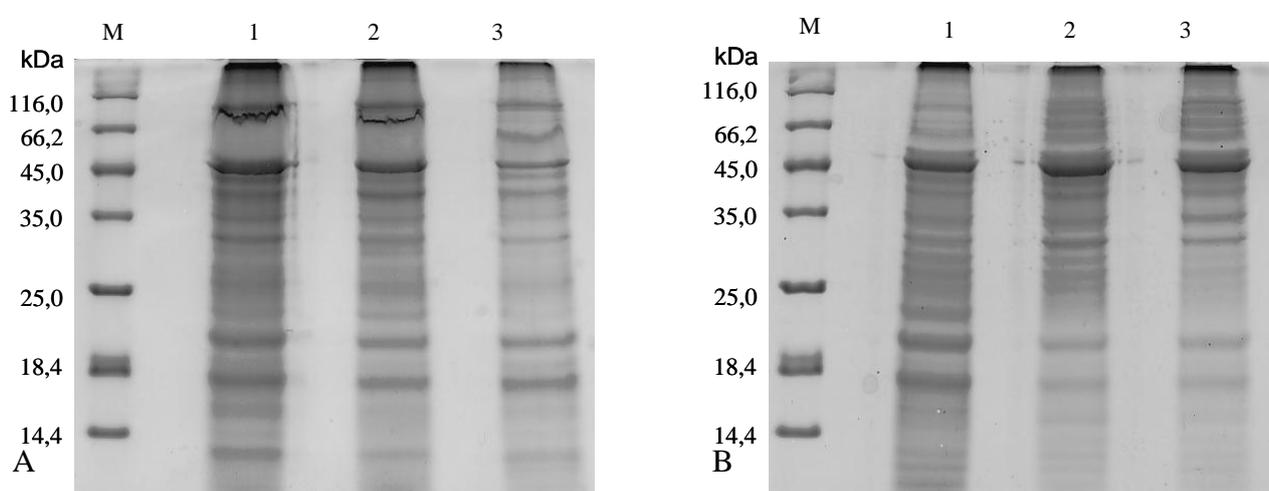


Figura 10. SDS-PAGE 15% corado com Coomassie G-250. Aplicação de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteína e $5 \mu\text{L}$ de marcador molecular Fermentas. (A) Réplicas técnicas das proteínas extraídas de *M. aeruginosa* PCC 7820. (B) Réplicas técnicas das proteínas extraídas de *M. aeruginosa* NIVA CYA 43. Os números 1, 2 e 3 correspondem aos pontos de aplicação da amostra, constituindo as réplicas. M indica marcador molecular.

Após verificar a eficiência do método de extração e quantificação proteica e para melhor averiguar a expressão proteica diferencial visualizada por SDS-PAGE, foram realizados os géis bidimensionais, que seguiram o mesmo protocolo de extração e tratamento das amostras feito para o SDS-PAGE.

5.4 Análises eletroforéticas bidimensionais

Cada cepa foi cultivada em triplicata, constituindo-se as réplicas biológicas. De cada cultivo, foram extraídas as proteínas para a realização dos géis bidimensionais. Os géis de ambas as cepas apresentaram *spots* expressos em níveis detectáveis e suscetíveis à tripsinização após desnaturação, redução e alquilação (Figuras 11 e 12).

A cepa *M. aeruginosa* PCC 7820 apresentou 220 *spots* bem resolvidos (Figura 11). A maioria dos *spots* situou-se no gel na faixa de pI entre 4 e 7. As espécies de cianobactérias já analisadas por proteômica, como *Anabaena variabilis* e *Synechococcus* sp. PCC 7942, apresentam esse padrão de distribuição de proteínas no gel (Koksharova *et al.*, 2006; Barrios-Llerena *et al.*, 2007). Entretanto, deve-se considerar que a maioria dos estudos com proteômica de cianobactérias usou tiras com extensão reduzida de pI, apenas de 4 a 7 (Ekman *et al.*, 2006; Klint *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2002; Fulda *et al.*, 2000). Esses estudos, por usarem tiras de reduzida extensão, deixam de considerar proteínas que podem ser proteínas-chave no metabolismo ou estrutura da célula cianobacteriana. Em nosso estudo, a extensão de pI foi maior, incluindo as proteínas básicas. A expansão da extensão do pI fornece um padrão mais global e permite um melhor entendimento do proteoma do organismo.

A cepa *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 apresentou 202 *spots* bem resolvidos (Figura 12). Assim como a cepa *M. aeruginosa* PCC 7820, a maioria dos *spots* situou-se no gel na faixa de pI entre 4 e 7. Entretanto, a cepa NIVA CYA 43 apresentou várias proteínas na faixa de 3 a 4 não observadas no mapa proteômico de *M. aeruginosa* PCC 7820. Essas proteínas diferencialmente expressas não foram identificadas por espectrometria de massa, como explicado mais adiante, e, por tal razão, não estão marcadas na Figura 12.

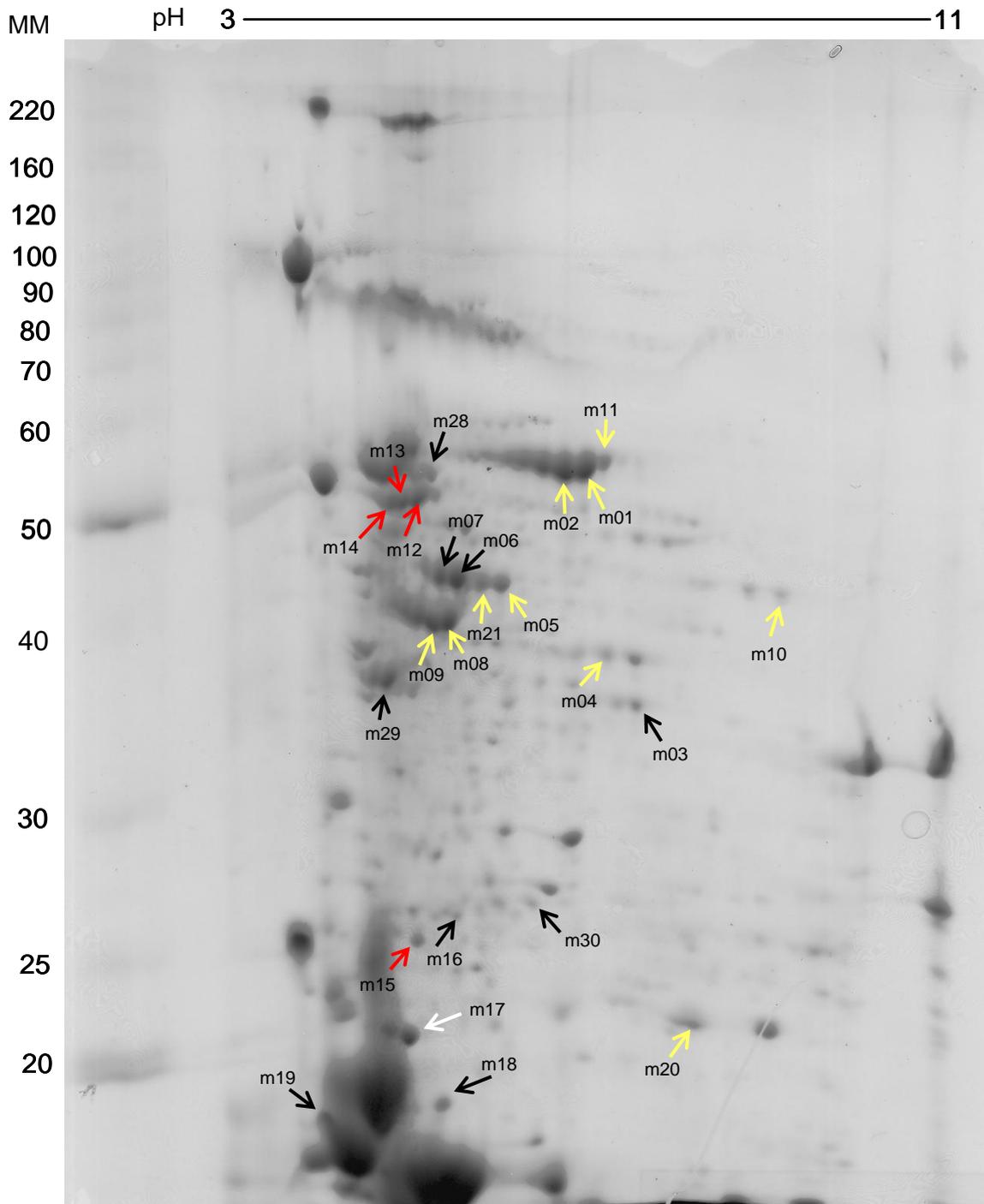


Figura 11. Mapa proteômico de *Microcystis aeruginosa* PCC 7820. Strips não lineares de 13 cm, pI 3-11. Gel a 12% e corado com Coomassie G-250. As setas pretas indicam os spots diferenciais, as setas vermelhas indicam os spots com menor intensidade em relação à *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 (sub expressas) e as setas amarelas indicam os spots com maior intensidade em relação à *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 (super expressas). A seta branca indica spot que não apresentou expressão diferencial.

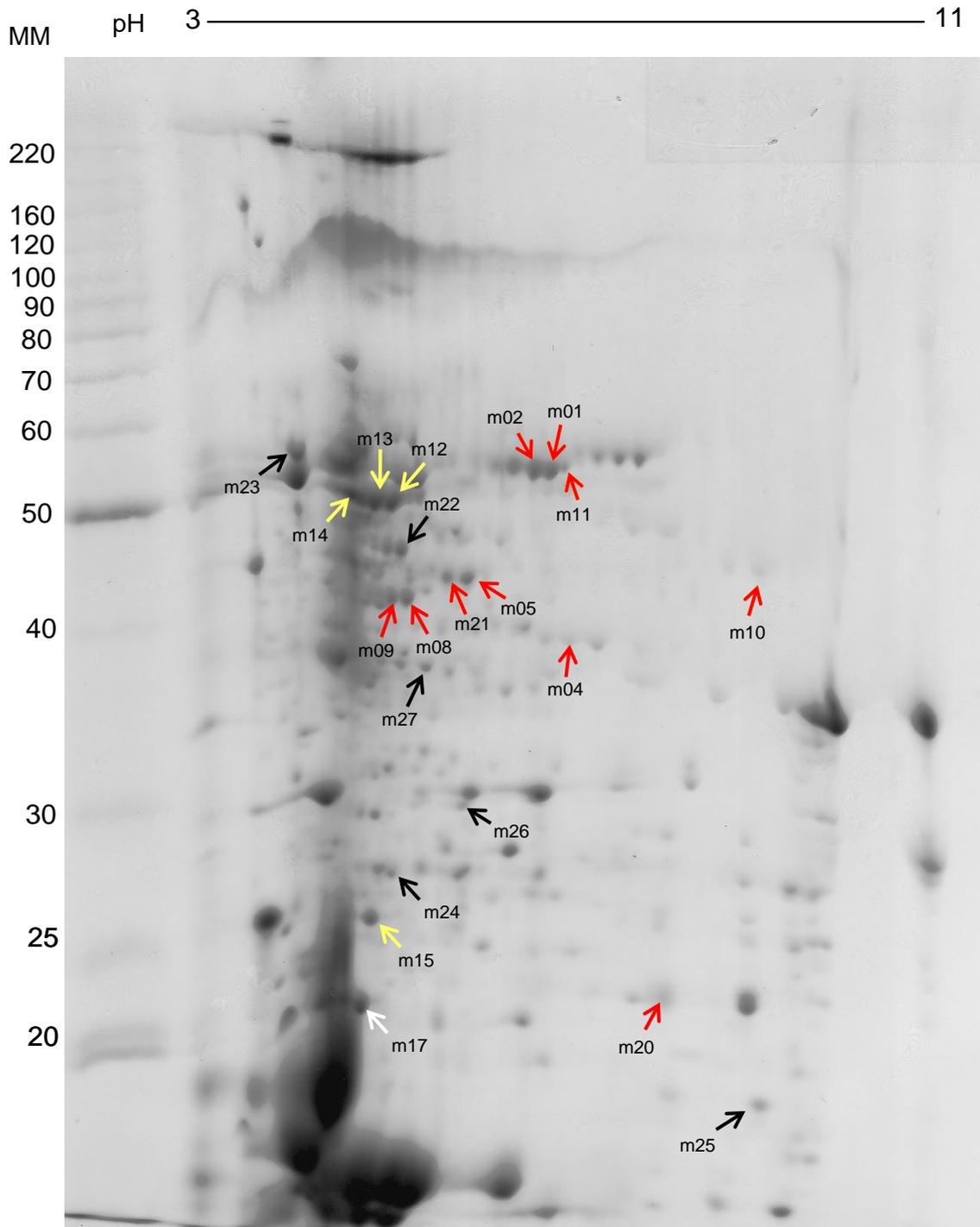


Figura 12. Mapa proteômico de *Microcystis aeruginosa* NIVA CYA 43. Strips não lineares de 13cm, pI 3-11. Gel a 12% e corado com Coomassie G-250. As setas pretas indicam os spots diferenciais, as setas vermelhas indicam os spots com menor intensidade em relação à *M. aeruginosa* PCC 7820 (sub expressas) e as setas amarelas indicam os spots com maior intensidade em relação à *M. aeruginosa* PCC 7820 (super expressas). A seta branca indica spot que não apresentou expressão diferencial.

Os trabalhos com proteômica de cianobactérias que usam tiras com intervalo de pI 4-7 relatam cerca de 200 *spots* (Huang *et al.*, 2002). Os géis reportados aqui apresentaram quantidade semelhante de *spots*, embora o intervalo de pI tenha sido maior (3-11). O trabalho de Barrios-Llerena *et al.* (2007), utilizando tiras com intervalo de pI semelhante ao usado neste trabalho (pI 3-10), obteve cerca de 500 *spots* de extrações proteicas de *A. variabilis*. Provavelmente, a quantidade de *spots* visualizados nos géis de *M. aeruginosa* em relação ao intervalo de pI escolhido deve-se à metodologia de processamento das amostras e ao fato de serem espécies diferentes, pertencentes a gêneros completamente distintos. A mesma metodologia pode apresentar resultados diferentes quando aplicada em diferentes espécies de cianobactérias. A metodologia de fracionamento celular desenvolvida para *Synechocystis*, quando aplicada para *Anabaena*, fornece resultado não satisfatório (Moslavac *et al.*, 2005). Da mesma maneira, a metodologia de extração proteica descrita em Barrios-Llerena *et al.* (2007) não funcionou para as cepas de *M. aeruginosa* deste estudo. O tampão de extração usado para *A. variabilis* (Barrios-Llerena *et al.*, 2007) foi incompatível com a etapa de focalização isoelétrica das tiras e, como resultado, causou seu rompimento. Provavelmente, o tampão de extração usado resultou em grande acúmulo de sal no precipitado. Em função da grande resistência, a voltagem na etapa de focalização isoelétrica não alcançou o valor programado e, como consequência, o gel da tira rompeu-se (dados não mostrados). Esses dados mostram que o método de extração proteica usado neste trabalho foi eficiente para amostras de *M. aeruginosa*, ao passo que o método usado por Barrios-Llerena *et al.* (2007) para amostras de *A. variabilis* não funcionou para as amostras de *M. aeruginosa*.

Para detecção e seleção dos *spots* de interesse, as imagens dos géis foram analisadas pelo programa BioNumerics versão 4.6. Após a detecção dos *spots*, o programa gera um gráfico tridimensional para a imagem analisada. A Figura 13 mostra os gráficos tridimensionais fornecidos pelo programa.

Os três géis obtidos para cada cepa (réplicas biológicas) foram comparados entre si pelo programa BioNumerics. Ao final da análise, o programa forneceu os valores do volume de cada *spot*. Com os valores do volume, foram realizadas as análises de regressão linear, usando-se

recursos do Excel 2003, para obtenção dos valores de r^2 . As triplicatas dos géis de *M. aeruginosa* PCC 7820 apresentaram $r^2 = 0,75$, e as triplicatas de *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 apresentaram $r^2 = 0,70$ (Figura 14). Análises de regressão linear realizadas entre réplicas técnicas de géis mostram, comumente, correlações superiores a 0,80 (Degrelle *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 2009). Neste trabalho, os géis comparados entre si representam réplicas biológicas, e não técnicas. Portanto, os valores de r^2 tendem a ser menores. Assim, os valores de r^2 obtidos mostram que houve reprodutibilidade entre os géis.

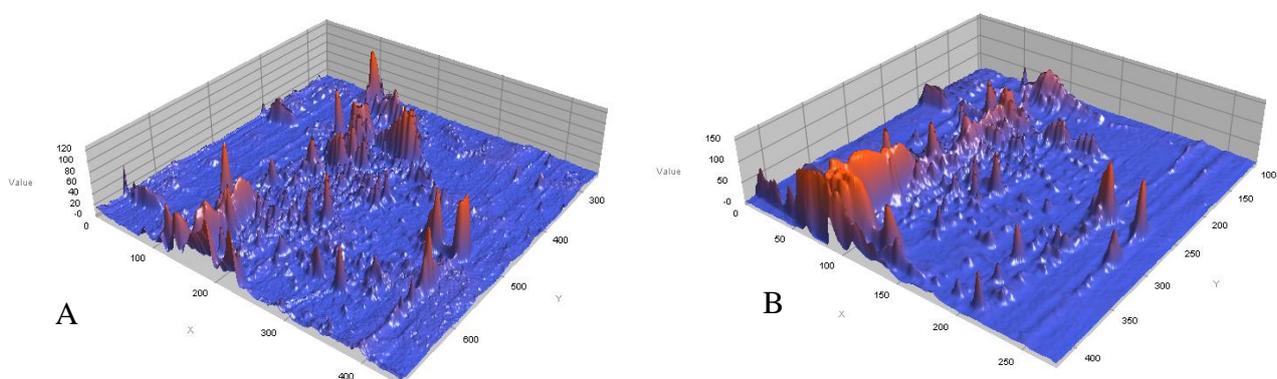


Figura 13. Mapas proteômicos em visão tridimensional fornecidos pelo programa BioNumerics versão 4.6 após análise dos géis bidimensionais. (A) Mapa proteômico da cepa *M. aeruginosa* PCC 7820 em visão tridimensional. (B) Mapa proteômico da cepa *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 em visão tridimensional. Eixo X corresponde aos valores de pI e eixo Y aos valores de massa molecular.

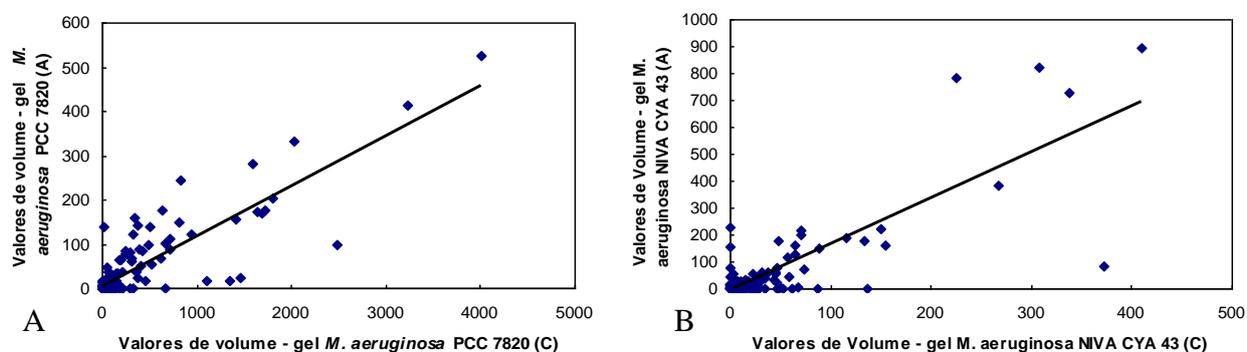


Figura 14. Análise de dispersão obtida da comparação dos géis entre si. (A) Comparação entre os géis da cepa *M. aeruginosa* PCC 7820. A correlação apresentou $r^2 = 0,75$. (B) Comparação entre os géis da cepa *M. aeruginosa* NIVA CYA 43. A correlação apresentou $r^2 = 0,70$. $p < 0,05$.

Os géis da cepa *M. aeruginosa* PCC 7820 foram comparados com os géis da cepa *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 para detecção dos *spots* diferencialmente expressos e, posteriormente, sobrepostos, para visualização da semelhança entre eles. Assim como as comparações feitas dentro de cada cepa, os valores de volume fornecidos pelo BioNumerics para ambas as cepas foram correlacionados, gerando um gráfico de dispersão com r^2 igual a 0,37 (Figura 15). Valores baixos de r^2 (entre cerca de 0,3 e 04) representam diferenças significativas no padrão de expressão proteica em gel. Essas diferenças estão relacionadas tanto à presença de um *spot* em um gel e sua ausência no outro, quanto a diferenças na intensidade de expressão dos *spots* que aparecem em ambos os géis.

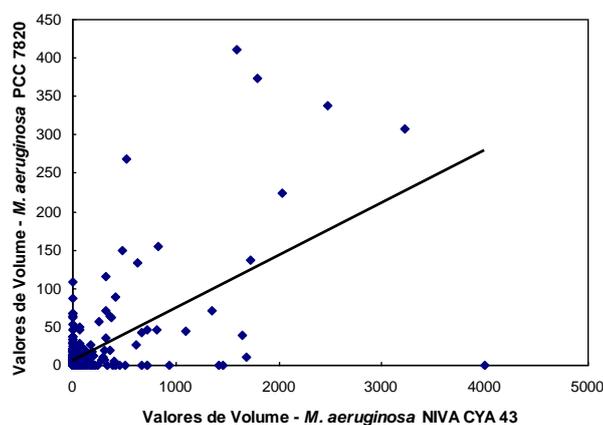


Figura 15. Análise de dispersão da correlação dos valores de volume gerados pelo programa BioNumerics para os géis da cepa *M. aeruginosa* PCC 7820 e *M. aeruginosa* NIVA CYA 43. $r^2=0,37$.

Após a escolha das proteínas de interesse, elas foram tripsinizadas e misturadas em uma razão de 1:3 v/v com solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico para identificação por MALDI-TOF/TOF. Foram 33 *spots* de interesse do gel de *M. aeruginosa* PCC 7820 e 31 *spots* do gel de *M. aeruginosa* NIVA CYA 43, que, no fim, corresponderam a 47 diferentes *spots*. Desses 47, 30 foram identificados (Tabela 3), sendo 9 exclusivos da cepa tóxica, 6 exclusivos da cepa não tóxica, 11 super expressos na tóxica e 4 super expressos na não tóxica (Figura 17).

Foram adquiridos 100 espectros de MS/MS. Para a maioria dos *spots*, foram adquiridos pelo menos 2 espectros. Os *spots* que apareceram em ambos os géis foram identificados como sendo a mesma proteína, o que aumenta a confiabilidade dos dados. Não foi possível identificar

26% dos *spots* devido à baixa intensidade de sinal de alguns dos espectros e, para estes, não foram gerados dados pelo Mascot. A baixa intensidade do sinal também inviabilizou o seqüenciamento manual, que, para ser correto, requer espectros com intensidade de sinal de 10^4 ou mais, como observado durante a realização dos trabalhos.

As 30 identificações proteicas correspondem a 20 proteínas diferentes. Quatro dessas 20 proteínas foram encontradas em mais de um *spot* no gel. Entre elas estão incluídas as enzimas ribulose bifosfato carboxilase (*spots* m01, m02, m11), frutose-1,6-bifosfato aldolase classe II (*spots* m05, m21), fosforribuloquinase (*spots* m08, m09, m29) e porina (*spots* m12, m13, m14, m23). Essa redundância de proteínas relacionadas à fotossíntese e ao transporte transmembrana é um indicativo de que esses produtos gênicos estão presentes como isoformas com modificações pós-traducionais. A proteína ribulose bifosfato carboxilase aparece como isoforma em 3 *spots* diferentes, com variação apenas do pI. A proteína frutose-1,6-bifosfato aldolase classe II também aparece em 3 *spots* diferentes que apresentam variação de pI na cepa tóxica. Entretanto, essa proteína aparece em apenas 2 *spots* na cepa não tóxica. A proteína fosforribuloquinase aparece em 2 *spots* diferentes que também apresentam variação apenas no pI. No entanto, a cepa tóxica possui essa mesma proteína com valor de massa inferior às outras duas. A proteína porina aparece em 4 diferentes *spots* no gel da cepa não tóxica, sendo 3 isoformas e o outro *spot* com valor de pI e massa molecular diferentes dos outros 3.

As identificações proteicas mostraram que 53,33% das proteínas estão relacionadas ao metabolismo energético, 20% delas correspondem a proteínas de membrana, 6,66% são proteínas periplásmicas, 10% são proteínas citoplasmáticas e 6,66% delas foram identificadas como proteínas hipotéticas (Figura 16).

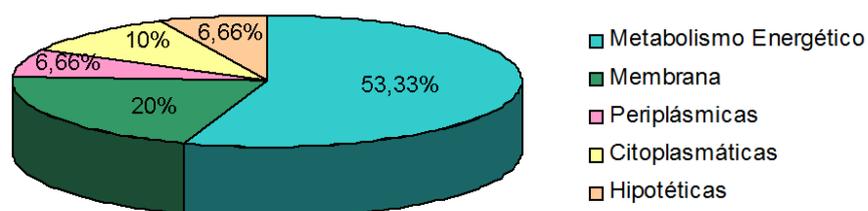


Figura 16. Porcentagem de proteínas relacionadas ao metabolismo energético e porcentagem de proteínas de acordo com a localização celular calculadas a partir das identificações proteicas.

Tabela 3. Proteínas diferencialmente expressas identificadas a partir de extratos celulares de culturas axênicas de *Microcystis aeruginosa* após digestão trípica e análise por MALDI-TOF/TOF.

Spot n.	Seqüência	Accession no	Espécie	Proteína ID	Cobertura da seqüência (%)	Mowse score	Função	Teórico pI/M _r (kDa)	Experimental pI/M _r (kDa)
m01	KTFQGPPHGITVERD GIIHHR	166367530	<i>M. aeruginosa</i>	ribulose bisofosfato carboxilase, subunidade maior	5	82	Fixação CO ₂ (Ciclo de Calvin) e fotorrespiração	6,76 / 53,195	6,4 / 53,86
m02	KTFQGPPHGITVERD AVTMGFVDLMR KTFEGPPHGIQAERD	166367530	<i>M. aeruginosa</i>	ribulose bisofosfato carboxilase, subunidade maior	9	92	Fixação CO ₂ (Ciclo de Calvin) e fotorrespiração	6,76 / 53,195	6,2 / 53,84
m03	KIAAEFPDNFRL IAAEFPDNFR	166363998	<i>M. aeruginosa</i>	ferredoxina-NADP oxidorreductase	5,5	44	Oxidação e redução (ficobilissomo, membrana tilacoidal)	6,07 / 44,807	6,94 / 35,61
m04	KGILEYNDLPLVSSDYRG	166365244	<i>M. aeruginosa</i>	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD(P)	5,3	101	Processo metabólico da glicose (fosforilação)	36,643	6,61 / 38,49
m05	RKPTGEILAISRI YAGENFLR RKPTGEILAISRI KYAGENFLRH	166365988	<i>M. aeruginosa</i>	frutose-1,6-bifosfato aldolase classe II (FBA)	49	74	Glicólise	6,00 / 39,156	5,58 / 43,01
m06	KNIADHVAVEAMRE SIEELVVVVMDRPR FFHGGAR	159029605	<i>M. aeruginosa</i>	Frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase)	10,15	78	Processo metabólico do glicerol	4,68 / 37,663	5,13 / 42,99
m07	LQEMGITNPDR FVDTVHLFDQPK	166365743	<i>M. aeruginosa</i>	D-frutose-1,6-bisfosfatase classe II / sedoheptulose 1,7-bisfosfatase (FBPase classe 2/SBPase)	6,6		Biossíntese de carboidrato (Ciclo de Calvin)	4,37 / 37,116	4,95 / 43,12
m08	RKPDFSAYIDPQRQ KVIVIEGLHPLYDERV	159027237	<i>M. aeruginosa</i>	Fosforribuloquinase (PRK)	18	107	Processo metabólico do carboidrato	5,45 / 38,036	5,00 / 40,88

	RKPDFSAYIDPQRQ KVIVIEGLHPLYDERV								
m09	RKPDFSAYIDPQRQ KVIVIEGLHPLYDERV RGHTYDDVMAAINSRK RKPDFSAYIDPQRQ KVIVIEGLHPLYDERV VLSVLLGMTIGQIHR	159027237	<i>M. aeruginosa</i>	Fosforribuloquinase (PRK)	27,3	112	Processo metabólico do carboidrato	5,45 / 38,036	4,86 / 40,77
m10	TLPDLIHSAPR	196257787	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822	Piridina nucleotídeo dissulfeto oxidorredutase dependente de FAD	2,6		oxidorredutase	6,41 / 46,870	8,41 / 42,98
m11	KTFQGPPHGITVERD RGITMGFVDLMRE KNHGIHFRV TFQGPPHGITVER	166367530	<i>M. aeruginosa</i>	Ribulose bisofosfato carboxilase, subunidade maior	10,6	91	Fixação CO ₂ (Ciclo de Calvin) e fotorrespiração	6,76 / 53,195	6,57 / 54,67
m12	RDNDVTIDDLFYRA KFADINFVYVRS RLQAGNFNNTFNQSGPTRT KFADINFVYVRS LQAGNFNNTFNQSGPTR QSQTPAHQSRANQR	166365540	<i>M. aeruginosa</i>	Porina principal da membrana externa	15,7	106	Transporte (proteína integral de membrana)	4,14 / 60,143	4,78 / 50,125
m13	RDNDVTIDDLFYRA LQAGNFNNTFNQSGPTR RDVSPTAWAYEALRS KFADINFVYVRS	166365540	<i>M. aeruginosa</i>	Porina principal da membrana externa	10,4	96	Transporte (proteína integral de membrana)	4,14 / 60,143	4,64 / 50,1
m14	LQAGNFNNTFNQSGPTR KFADINFVYVRS RLQAGNFNNTFNQSGPTRT	166365540	<i>M. aeruginosa</i>	Porina principal da membrana externa	8,6	61	Transporte (proteína integral de membrana)	4,14 / 60,143	4,48 / 50,425

m15	ITESGKYIIR RNFRSILRR	166365764	<i>M. aeruginosa</i>	Peptidase	12,4		Proteólise	16,553	4,68 / 25,39
m16	QYFGETDETVNLR	166363870	<i>M. aeruginosa</i>	Triosefosfato isomerase	6,5	62	Atividade triose fosfato isomerase (gluconeogênese e glicólise)	4,14 / 25,208	4,85 / 27,01
m17	RPDYISDFLTK YLDYQNR	166368140	<i>M. aeruginosa</i>	Superóxido dismutase (SOD)	9			5,83 / 21,715	4,6 / 21,5
m18	IVQASTGLEVLSDSILVQKL R FLIATPLLLALMR	220908731	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	Proteína relacionada ao transportador ABC	5,75			6,07 / 64,520	4,99 / 18,61
m19	DMDYYLR YLSPGELDR	166363768	<i>M. aeruginosa</i>	Aloficocianina, subunidade alfa	10		Fotossíntese (ficobilissomo)	4,21 / 17,188	3,79 / 18,09
m20	RVPAEIVFDQGLGDLFVCR V	166364254	<i>M. aeruginosa</i>	Anidrase carbônica periplásmica do tipo beta (CA)	8,3	130	Utilização de carbono	8,45 / 26,102	7,5 / 21,93
m21	KYAGENFLRH RKPTGEILAISRI	166365988	<i>M. aeruginosa</i>	Frutose-1,6-bisfosfato aldolase classe II (FBA)	6,4	59	Glicólise	6,00 / 39,156	5,39 / 43,1
m22	RSIEELVVVVMDRPRH FFHGGAR FVDTVHLFDQPK	166365743	<i>M. aeruginosa</i>	D-frutose 1,6-bisfosfatase classe 2/sedoheptulose 1,7-bisfosfatase (FBPase classe 2/SBPase)	10,15	51	Processo metabólico do glicerol (ciclo de Calvin)	4,37 / 37,679	4,95 / 45,86
m23	DVSPTAWAYEALR DVERALTAPHLTR	166365540	<i>M. aeruginosa</i>	Porina principal da membrana externa	4,6		Transporte (proteína integral de membrana)	4,14 / 60,143	3,94 / 57,46
m24	RQYFGETDETVNLRV	166363870	<i>M. aeruginosa</i>	Triosefosfato isomerase	6,5	62	Atividade triose fosfato isomerase (gluconeogênese e glicólise)	4,14 / 25,208	4,85 / 27,01
m25	RTFTEVAPQPAPEPSVPIRG RGEPQLNPGDYVLGRV	166367494	<i>M. aeruginosa</i>	Proteína hipotética MAE_47530	30,8	69		5,32 / 13,009	8,39 / 17,08

m26	FQQCLVQTR RETPVMSQAEIHSR	166368149	<i>M. aeruginosa</i>	Proteína hipotética MAE_54080	2,13				5,51 / 29,88
m27	LVSLGLLK	159028959	<i>M. aeruginosa</i>	Transportador ABC de cobalto, subunidade CbiQ, membrane interna	3,11	72	Transporte transmembrana do íon cobalto (processo biossintético da cobalamina)		5,18 / 37,08
m28	KKILLLLVLIVAVLNFGKT	15642898	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	Transportador ABC de zinco, proteína periplásmica que se liga ao zinco	7,11	61	Transporte de metal	6,25 / 30,12	4,85 / 52,85
m29	KPDFSAYIDPQR	166366586	<i>M. aeruginosa</i>	Fosforribuloquinase (PRK)	3,6		Quinase e transferase ATP binding	5,12 / 37,85	4,42 / 36,73
m30	QAGSIVCISSISGDR	166367746	<i>M. aeruginosa</i>	Acetoacetyl-CoA redutase específica do PHA	6,3		Oxidoreductase	5,66 / 25,18	5,89 / 27,19

A Figura 17 apresenta as proteínas identificadas agrupadas por função ou localização celular e suas respectivas intensidades relativas para ambas as cepas. É interessante observar que o protocolo usado para extração proteica era destinado à extração das proteínas citosólicas. Entretanto, grande parte das proteínas diferencialmente expressas identificadas (16 *spots* correspondendo a 9 proteínas) está relacionada ao metabolismo energético (Figura 17A). Também foram identificadas proteínas de membrana externa e interna (6 *spots* correspondendo a 3 proteínas) com expressão diferencial entre as cepas – 1 *spot* exclusivo da cepa tóxica (m18), 2 exclusivos da cepa não tóxica (m23 e m27) e 3 mais expressos pela cepa não tóxica (m12, m13 e m14) (Figura 17B), 2 proteínas periplásmicas (m20 e m28) (Figura 17C) e 4 proteínas citoplasmáticas (m10, m15, m17 e m30) (Figura 17D). Também foram identificadas duas proteínas hipotéticas (m25 e m26) expressas apenas pela cepa não tóxica (Figura 17E).

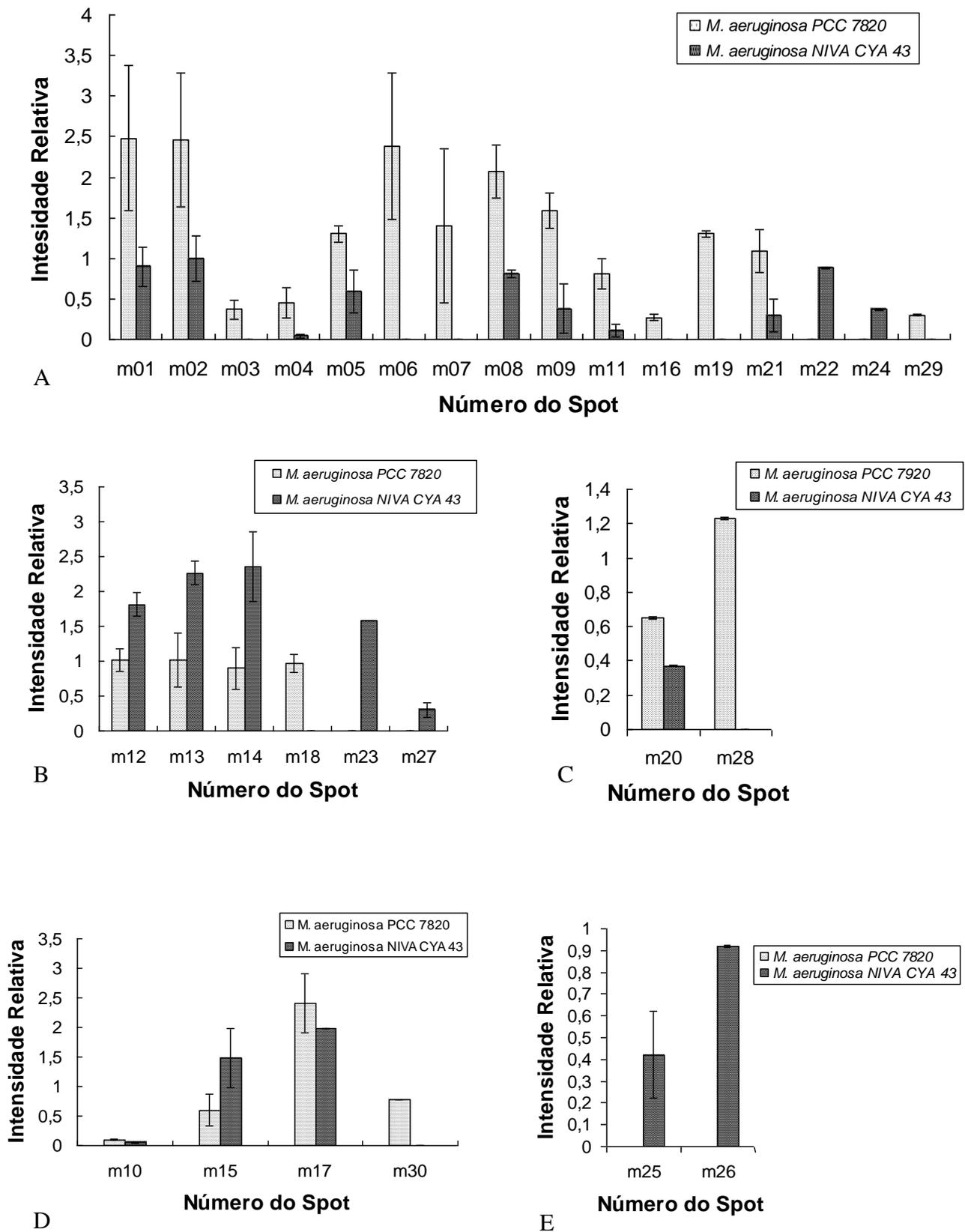


Figura 17. Expressão relativa das proteínas identificadas em *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 e *Microcystis aeruginosa* NIVA CYA 43. Os valores foram fornecidos pelo programa *BioNumerics* versão 4.6 e plotados como intensidades relativas dos *spots* indicados nas figuras 11 e 12. (A) Proteínas relacionadas ao metabolismo energético –

ciclo de Calvin, fotorrespiração, ficobilissomo, glicólise e gliconeogênese. (B) Proteínas de membrana (externa e interna). (C) Proteínas periplásmicas. (D) Proteínas citoplasmáticas. (E) Proteínas hipotéticas.

5.4.1 Proteínas do metabolismo energético

As reações bioquímicas envolvidas na fotossíntese são basicamente divididas em dois estágios: fluxo de elétrons e de hidrogênio dirigido pela luz e conversão redutora do CO₂ com consumo de energia. O primeiro estágio ocorre por meio dos complexos multiproteicos ligados à membrana, levando à redução do sistema ferredoxina/tiorredoxina e à produção de ATP e NADPH. Esses produtos, ATP e NADPH, são usados no segundo estágio, ou seja, na conversão de CO₂ em carboidrato, usado para a síntese de amido na presença de luz (Wedel & Soll, 1998).

Algumas das proteínas diferencialmente expressas pelas cepas estudadas neste trabalho são enzimas que atuam no ciclo de Calvin, ou seja, na fixação de CO₂ para a produção de carboidratos. Entretanto, como mencionado anteriormente, esse ciclo precisa de ATP e NADPH para funcionar. A proteína ribulose bifosfato carboxilase (spots m01, m02 e m11), mais conhecida como RuBisCO, catalisa o passo inicial de fixação do CO₂ no ciclo. O mecanismo envolve uma reação de carbamilação entre o CO₂ e o grupo ε-amino de um resíduo de lisina no sítio ativo da subunidade maior da RuBisCO (Martin *et al.*, 2004). Essa enzima se apresenta sob dois tipos estruturalmente diferentes: classe I e classe II, resultado de duplicações gênicas ancestrais (Martin *et al.*, 2004). RuBisCO classe I é composta por 8 subunidades maiores de 55 kDa cada uma e 8 subunidades menores de 15 kDa cada uma, resultando em uma holoenzima de cerca de 560 kDa (Martin & Schnarrenberger, 1997). Cianobactérias – e demais organismos fotossintetizantes – possuem RuBisCO classe I. RuBisCO classe II é encontrada apenas em proteobactérias (Martin & Schnarrenberger, 1997). As proteínas identificadas como RuBisCO (Figura 17A) apresentaram intensidade relativa de expressão 2 a 3 vezes maior na cepa tóxica do que na não tóxica, sugerindo que a cepa PCC 7820 possui maior capacidade de fixar CO₂ que a cepa NIVA CYA 43.

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (m04) também atua no ciclo de Calvin. Essa enzima converte o gliceraldeído-1,3-bifosfato em gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) em um passo de redução reversível (Martin *et al.*, 2004). GAPDH é dependente de NADP⁺,

preferencialmente, e também de NAD^+ , esse último podendo desempenhar função importante durante a síntese de ATP no escuro (Martin *et al.*, 2004). A enzima aqui identificada é a dependente de NADP^+ . A GAPDH também é encontrada nas formas classe I e classe II. Ambas são tetrâmeros com subunidades de aproximadamente 37 kDa e massa total de cerca de 150 kDa (Martin & Schnarrenberger, 1997). Cianobactérias possuem GAPDH classe I (Martin *et al.*, 2004). Essa enzima apresentou intensidade relativa de expressão 10 vezes maior na cepa tóxica em relação à não tóxica (Figura 17A), o que possivelmente confere maior eficiência na fixação do CO_2 .

Triosefosfato isomerase catalisa a isomerização da hidroxiacetona fosfato (DHAP) em gliceraldeído-3-fosfato (GA3P). A enzima nativa é um homodímero com subunidades de aproximadamente 27 kDa (Martin *et al.*, 2004). Para essa enzima, não existem descrições de classe I e classe II. Essa enzima apareceu em ambas as cepas – *spot* m16 no gel da cepa tóxica e m24 no da não tóxica – com pequena diferença de *pI* e expressão estatisticamente igual (Figura 17A).

Frutose-1,6-bifosfato aldolase (FBA) (m05 e m21) catalisa a condensação aldol reversível de dihidroxiacetona fosfato e de GA3P no ciclo de Calvin, glicólise e gliconeogênese para produzir frutose-1,6-bifosfato (Gefflaut *et al.*, 1995; Haake *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2004). Em *Synechocystis* sp. PCC 6803, ela participa do ciclo de Calvin (Nakahara *et al.*, 2003). Para essa enzima, também foram descritas as classes I e II, entretanto, são enzimas muito distintas entre si, diferindo até em sua atividade catalítica (Martin *et al.*, 2004). FBA classe I é um homotetrâmero, ao passo que FBA classe II é um homodímero. As subunidades de ambas as classes possuem cerca de 40 kDa de massa, embora seus monômeros não compartilhem similaridade de sequência detectável (Martin & Schnarrenberger, 1997). As aldolases classe I formam uma base de Schiff com o substrato durante a catálise e, assim, não precisam de íons para sua atividade. As FBAs classe II requerem cátions bivalentes – Zn^{2+} , Fe^{2+} e Ca^{2+} – como co-fatores para desempenharem sua atividade (Martin *et al.*, 2004). Entre os íons bivalentes testados na literatura, FBA classe II apresentou a maior atividade quando tratada com Co^{2+} (Nakahara *et al.*, 2003). Neste trabalho, foi identificada a FBA classe II. Essa enzima foi 2,2 vezes mais expressa pela

cepa tóxica no *spot* m05 e 3,6 vezes mais expressa pela cepa tóxica no *spot* m21 (Figura 17A). Novamente, é provável que a cepa PCC 7820 seja mais eficiente na fixação de carbono por apresentar mais proteínas envolvidas no ciclo de Calvin e em maior quantidade de expressão, como também observado para RuBisCO e GAPDH.

A enzima frutose-1,6-bifosfatase (FBPase) (m06) de cianobactérias é um tetrâmero com subunidades de cerca de 40 kDa. Essa enzima catalisa uma reação exergônica irreversível, um dos alvos-chave para a regulação do ciclo de Calvin, e é especificamente ativada pela tiorredoxina *f* (Martin *et al.*, 2004). FBPase foi identificada apenas na cepa tóxica e com alta intensidade relativa de expressão (Figura 17A). A identificação dessa proteína como diferencial, expressa apenas pela cepa tóxica, é mais um indicativo de maior capacidade de fixação de carbono apresentada pela cepa PCC 7820.

D-frutose 1,6-bisfosfatase classe II/sedoheptulose 1,7-bisfosfatase (FBPase classe 2/SBPase) (m07 e m22) também está vinculada ao ciclo de Calvin. Em cianobactérias, essa única enzima desempenha ambas as funções por possuir especificidade dupla pelos dois açúcares fosfato (Martin & Schnarrenberger, 1997). O *spot* m07 foi exclusivo da cepa tóxica e o m22 foi exclusivo da cepa não tóxica (Figura 17A). Entretanto, o *spot* m07 apresentou intensidade relativa 2 vezes maior em relação ao *spot* m22. Mais uma vez, observa-se que a cepa tóxica PCC 7820 aparentemente possui maior capacidade de produção de energia em relação à cepa não tóxica NIVA CYA 43.

Fosforribuloquinase (PRK) (m08, m09 e m29) regenera o acceptor primário de CO₂ para a RuBisCO, completando o ciclo de Calvin (Martin & Schnarrenberger, 1997). Ela catalisa uma reação altamente exergônica e é fortemente regulada pelo sistema tiorredoxina (Martin *et al.*, 2004). Também são descritas as formas classe I e classe II. A PRK de cianobactérias é um tetrâmero com subunidades de aproximadamente 44 kDa e pertencente à classe II (Martin *et al.*, 2004). Os *spots* m08 e m09 apareceram em ambas as cepas, porém, o *spot* m08 apresentou intensidade relativa 2,5 vezes maior, e o *spot* m09, intensidade relativa 4 vezes maior na cepa tóxica em relação à não tóxica (Figura 17A). O *spot* m29 foi exclusivo da cepa tóxica. Novamente,

perceberam-se mais proteínas – e em maior quantidade – relacionadas à fixação de carbono na cepa tóxica PCC 7820.

Ferredoxina-NADP⁺ oxidorredutase (FNR) (m03) é uma enzima envolvida do processo de respiração, portanto, localizada na membrana tilacoidal. É uma proteína periférica da membrana (Schmetterer, 1994). Essa enzima é um polipeptídeo de 43 a 55 kDa que catalisa a transferência de elétrons da ferredoxina reduzida (ou da flavodoxina reduzida) para o NADP⁺, mas precisa do FAD como cofator (Morand *et al.*, 1994). Devido à dificuldade de isolamento e à resistência ao ataque proteolítico, acredita-se que a FNR é protegida da proteólise, desde que os ficobilissomos estejam intactos, fato que indica a localização dessas proteínas dentro dos ficobilissomos (Morand *et al.*, 1994). A identificação de Ferredoxina-NADP⁺ oxidorredutase como diferencial, expressa apenas pela cepa tóxica (Figura 17A), sugere que a cepa tóxica PCC 7820 possui eficiência na respiração provavelmente maior em relação à não tóxica.

Ficobilissomo é um complexo proteico que funciona como a principal antena captadora de luz em cianobactérias e localiza-se preso na membrana tilacoidal. Ele é composto pelas ficobiliproteínas: ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina. Nesta pesquisa, foi identificada a subunidade α da aloficocianina (m19) (Figura 17A). Essa proteína também foi expressa apenas pela cepa tóxica, sugerindo capacidade extra de absorção luminosa. Embora Kardinaal *et al.* (2007) tenham observado que a cepa não tóxica *M. aeruginosa* V145 apresenta quantidade de ficocianina bastante superior em comparação com a cepa tóxica *M. aeruginosa* V163, é possível que a presença de um spot diferencial expresso exclusivamente pela cepa tóxica *M. aeruginosa* PCC 7820 esteja relacionada com a transferência direta da energia de excitação dos elétrons diretamente para o PSI. Normalmente, as ficobiliproteínas transferem a energia da excitação dos elétrons para o PSII, mas, quando essa transferência é direta – o que é possível – ela é dependente da aloficocianina (Gantt, 2004).

Assim como a variedade da microcistina produzida é diferente em diferentes intensidades luminosas (Tonk *et al.*, 2005), parece que a capacidade fotossintética é aumentada na presença da toxina. Além disso, a luz tem efeito direto sobre a expressão da microcistina sintetase. A

qualidade da luz está diretamente relacionada com maior ou menor expressão do *operon* (Kaebernick *et al.*, 2000).

Por um lado, as proteínas diferencialmente expressas entre as cepas apontam maior eficiência metabólica da cepa tóxica PCC 7820 em relação à cepa não tóxica NIVA CYA 43. Proteínas envolvidas no ciclo de Calvin, fotorrespiração, glicólise e gliconeogênese foram expressas em quantidades superiores ou exclusivamente pela cepa tóxica (m01, m02, m04, m05, m06, m07, m08, m09, m11, m16, m21 e m29). A maior disponibilidade energética apresentada pela cepa tóxica PCC 7820 provavelmente é uma necessidade para a produção da microcistina, uma vez que a produção da toxina parece depender da expressão em níveis mais elevados de proteínas relacionadas ao metabolismo energético.

Por outro lado, a maior eficiência metabólica observada nos resultados da avaliação proteômica comparativa entre as cepas sugerem maior gasto energético pela cepa tóxica. Provavelmente, produzir microcistina seja sinônimo de maior gasto energético – gasto com a expressão das proteínas necessárias à sua biossíntese, com a biossíntese em si e com o armazenamento da microcistina –, sugerindo que maior eficiência metabólica seja condição necessária para a sua produção.

Os resultados proteômicos mostrados neste trabalho explicam, em parte, porque a maioria das florações de cianobactérias é composta por cepas tóxicas. Isso acontece porque florações de cianobactérias tóxicas normalmente ocorrem em ambientes eutróficos, ambientes com grande disponibilidade de nutrientes. Não havendo limitação nutricional, a célula cianobacteriana produz e estoca mais energia. A grande disponibilidade energética permite que a célula invista na expressão em níveis mais elevados de proteínas relacionadas à produção de energia e, assim, mantenha o estoque energético intracelular. A sobra energética pode, então, ser usada para a produção de microcistina, metabólito secundário sem função intracelular descrita que, no entanto, parece inibir a predação (Lampert, 1982; Jungmann & Benndorf, 1994).

5.4.2 Proteínas de membrana

Em cianobactérias, a membrana externa, a membrana plasmática e a membrana tilacoidal representam as três membranas estrutural e funcionalmente distintas (Gantt, 1994). A membrana externa exerce importante função fisiológica, pois permite o transporte de nutrientes e metabólitos para dentro e para fora da célula (Hoiczky *et al.*, 2000; Benz, 1988).

Basicamente, são reconhecidos três tipos de canais: (i) canais de difusão passiva, como porinas que permitem a passagem de íons e pequenas moléculas de nutrientes, (ii) canais com sítios de ligação específicos que facilitam a difusão de compostos que penetram mais lentamente, e (iii) canais concentradores, que funcionam no sequestro de vitaminas e quelantes e de outras pequenas moléculas (Gantt, 2004). Em cianobactérias, a barreira mecânica em função das membranas e da parede celular afeta a permeabilidade de várias moléculas grandes (Hoiczky *et al.*, 2000). As porinas permitem a passagem de íons hidrofílicos por difusão, entretanto, apresentam poro pequeno em relação às porinas de bactérias, o que reflete o estilo de vida fotoautotrófico. O tamanho do poro permite a entrada apenas de íons, provavelmente porque os compostos orgânicos são sintetizados pela própria cianobactéria (Hoiczky *et al.*, 2000), mas a expressão das porinas é influenciada pela osmolaridade do meio de cultivo (Benz, 1988).

Duas porinas isoladas de *Synechococcus* PCC 6301 mostraram organização homotrimérica, tendo as subunidades cerca de 52 kDa e massa molecular total de 140 kDa (Hansel & Tadros, 1998). Neste trabalho, quatro *spots* foram identificados como porinas da membrana externa, evidenciando a redundância dessa proteína em *Microcystis aeruginosa*. Surpreendentemente, os *spots* m12, m13 e m14 foram cerca de 2 vezes mais expressos em *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 em relação à cepa tóxica PCC 7820 e o *spot* m23 foi exclusivo da cepa *M. aeruginosa* NIVA CYA 43 (Figura 17B). Considerando o suposto maior requerimento energético pela cepa tóxica, era de se esperar que ela apresentasse mais mecanismos de captura de íons, importantes para o funcionamento de muitas enzimas. Provavelmente, a expressão dessas proteínas em maior quantidade pela cepa não tóxica pode representar maior capacidade de capturar íons e pode estar relacionada com o maior tamanho celular apresentado por ela. Entretanto, nenhuma relação dessa proteína com toxicidade pôde ser traçada até o momento.

O *spot* m18 apareceu apenas na cepa tóxica (Figura 17B) e apresentou alta similaridade de sequência com transportador do tipo ABC (*ATP-Binding Cassette*) de *Cyanothece* sp. PCC 7425. Transportadores ABC constituem uma família de proteínas de membrana que realizam transporte de moléculas, preferencialmente íons, e estão envolvidos em vários processos fisiológicos (Hanikenne *et al.*, 2005). Transportadores ABC típicos possuem duas dobras conservadas de ligação a nucleotídeos, responsáveis pela hidrólise do ATP, e dois domínios altamente hidrofóbicos, que especificam os substratos a serem transportados. Funcionam como homo- ou heterodímeros (Holland *et al.*, 2003).

Neste trabalho, foi identificada a subunidade CbiQ do transportador ABC de cobalto (m27) apenas no gel da cepa não tóxica (Figura 17B). O modelo topológico para a proteína CbiQ prevê a existência de quatro hélices transmembrana. Apesar da preferência pelos íons cobalto, essa proteína também é capaz de transportar íons níquel (Rodionov *et al.*, 2006). Ambos os íons são fundamentais como cofatores para enzimas envolvidas em vários processos metabólicos (Mulrooney & Hausinger, 2003; Kobayashi & Shimizu, 1999). A atividade da enzima superóxido dismutase, por exemplo, é dependente de níquel (Eitinger *et al.*, 2005). O íon cobalto também é importante para a síntese da cobalamina – relacionada à vitamina B₁₂ (Taranto *et al.*, 2003).

5.4.3 Proteínas periplásmicas

Entre a membrana externa e a membrana plasmática, existe o espaço periplásmico. Esse espaço contém proteínas envolvidas em atividade de transporte, bem como canais ou complexos transportadores que facilitam a passagem de solutos e de pequenas moléculas entre a membrana externa e a membrana plasmática (Gantt, 2004).

Em ambientes aquáticos, a taxa de difusão do CO₂ é cerca de 10⁴ vezes menor em relação ao ar. Além disso, valores de pH acima de 7 fazem que o carbono inorgânico esteja disponível preferencialmente na forma de ácido carbônico (HCO₃⁻) (Coleman, 2004). Assim, microrganismos aquáticos fotossintetizantes desenvolveram mecanismos de concentração de carbono (CCM) para a formação de um *pool* de carbono inorgânico intracelular.

Anidrase carbônica (CA) é uma enzima que participa do mecanismo de concentração de carbono (CCM). O CCM em cianobactérias parece ser o mais eficiente entre os organismos fotossintéticos, podendo concentrar o CO₂ em até mais de 1.000 vezes ao redor do sítio ativo da RuBisCO (Badger & Price, 2003). O acúmulo intracelular de carbono inorgânico (C_i) pelo CCM é induzido, principalmente, pela depleção do *pool* de C_i intracelular (Woodger *et al.*, 2005).

Existem, basicamente, dois tipos de CAs: CA tipo α e CA tipo β . CAs tipo β estão associadas aos carboxissomos, o principal sítio da fixação do CO₂ em cianobactérias. CAs tipo α parecem funcionar mais como sensores ambientais do que como elementos catalíticos, ou seja, funcionariam como componente inicial de uma via de transdução de sinal que permite à cianobactéria responder rapidamente às mudanças extracelulares de carbono inorgânico (Coleman, 2004).

A proteína presente no *spot* m20 foi identificada como anidrase carbônica tipo β . Essa proteína foi 1,8 vezes mais expressa pela cepa tóxica em relação à não tóxica (Figura 17C). Assim, provavelmente, para manterem a produção da microcistina, as cepas tóxicas precisam de um *pool* de carbono inorgânico interno maior em relação às células não produtoras de microcistina. Segundo Jähnichen *et al.* (2007), a variação das condições de carbono inorgânico intracelular tem influência na produção da microcistina. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos por esses autores, condições de deficiência de carbono inorgânico intracelular levam ao aumento da produção da microcistina.

Entre as proteínas diferencialmente expressas, a identificação do *spot* m28 apareceu apenas no gel da cepa tóxica (Figura 17C) e apresentou alta similaridade com o transportador ABC de zinco de *Thermotoga maritima* MSB8. O zinco é um metal requerido pelo sítio ativo da anidrase carbônica, portanto, tem função central na fixação do carbono para a fotossíntese (Cavet *et al.*, 2003). Águas enriquecidas com zinco e que apresentam pH alto favorecem a abundância de cianobactérias de forma geral e, eventualmente, que elas se tornem os organismos dominantes (Cavet *et al.*, 2003). A existência de transportadores específicos para zinco em águas enriquecidas com esse metal está relacionada a esse fenômeno. A expressão de uma proteína com alta similaridade de sequência a um transportador de zinco apenas pela cepa tóxica sugere

sua vantagem em relação à não tóxica. Como mencionado, o zinco é cofator fundamental para a atividade da CA. A expressão em níveis mais elevados de CA pela cepa tóxica e a existência de um *spot* diferencial identificado como transportador ABC de zinco apenas na cepa tóxica podem estar relacionadas ao fato de florações de cianobactérias serem compostas predominantemente por cepas tóxicas em ambientes enriquecidos com zinco.

5.4.4 Proteínas citoplasmáticas

A proteína identificada no *spot* m10 apresentou alta similaridade com uma enzima da família flavoproteína piridina nucleotídeo-dissulfeto oxidorreductase dependente de FAD (*FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase*), presente em *Cyanothece* sp. As proteínas dessa família são homodiméricas. Cada monômero possui um grupo prostético FAD, um sítio de ligação ao NADPH e um sítio ativo contendo um dissulfeto redox ativo (Muistacich & Powis, 2000).

Essa proteína foi expressa por ambas as cepas em níveis estatisticamente iguais (Figura 17D). A enzima oxidorreductase dependente de FAD (m10) atua nos processos de homeostase redox celular e oxidação e redução, portanto, sua função molecular é desempenhar as atividades oxidorreductase e carreadora de elétrons. Para desempenhar sua função, ela depende dos cofatores ferro (Fe) e enxofre (S) (Welsh *et al.*, 2008). Essa classe de proteínas parece desempenhar um importante papel em situações de floração, pois é frequentemente encontrada em cianobactérias coletadas de densas florações naturais, onde comumente ocorre deficiência de ferro e cobre. Esse fato pode ser explicado pela capacidade que as flavoproteínas apresentam de substituir as ferredoxinas em algumas cianobactérias quando estas sofrem deficiência de Fe, pois essas duas classes de proteínas são semelhantes no que diz respeito ao conjunto de cargas e propriedades redox (Morand *et al.*, 1994).

Superóxido dismutases são enzimas redox que protegem as células dos danos causados pelos radicais superóxidos. A enzima superóxido dismutase (SOD), em cianobactérias, pode estar associada ao manganês (Mn) ou ao ferro (Fe). O metal associado está diretamente relacionado à

localização da enzima na célula, de modo que MnSOD está associada à membrana, e FeSOD é solúvel, presente no citoplasma (Regelsberger *et al.*, 2004).

A enzima MnSOD protege tanto o PSI quanto o PSII devido à sua localização membranosa. Cepas de *Anabaena* PSS 7120 que não a expressam apresentam crescimento mais lento, maior peroxidação de lipídeos e maior susceptibilidade à fotoinibição (Zhao *et al.*, 2007). A enzima FeSOD parece ter função essencial na manutenção dos baixos níveis de superóxidos, pois a maioria dos radicais superóxidos é produzida no sítio citosólico do PSI (Regelsberger *et al.*, 2004). Cepas de *Synechococcus* sp. PCC 7942 mutantes que não possuem FeSOD, apesar de não apresentarem mudanças nas taxas de crescimento, quantidade de clorofila e de carotenos, apresentam maior sensibilidade ao estresse por resfriamento (Thomas *et al.*, 1999).

A enzima superóxido dismutase (SOD) (m17) de *M. aeruginosa* identificada neste trabalho não apresentou expressão diferencial estatisticamente relevante entre as cepas (Figura 17D), indicando que, provavelmente, sua expressão não possui relação com a produção ou não da microcistina. Entretanto, não foi possível identificar a qual metal a enzima se liga, nem, portanto, prever sua exata localização celular. Essa enzima foi enquadrada dentro das proteínas citoplasmáticas porque o tampão de extração de proteínas descrito na metodologia se destinava, principalmente, à extração de proteínas solúveis.

Peptidases são enzimas que causam degradação específica de proteínas e de agregados proteicos formados sob o efeito de condições de estresse (Panichkin *et al.*, 2001). Em células mutantes de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (gene *clpP2* inativado), foi observada a incapacidade de essas células crescerem em condições fotoautotróficas. O gene inativado é responsável por codificar a subunidade proteolítica da peptidase dependente de ATP. Assim, esses autores relacionaram essa proteína à proteção das células contra a fotoinibição, pois, provavelmente, ela controla a fotossensibilidade (Panichkin *et al.*, 2001).

O spot m15 foi cerca de 2,5 vezes mais expresso pela cepa não tóxica (Figura 17D). É sabido que cepas tóxicas de *Microcystis* apresentam desvantagem na competição por luz (Kardinaal *et al.*, 2007). Assim, em alguns ambientes, é observada uma sucessão onde a dominância por cepas tóxicas cede lugar à dominância por cepas não tóxicas de *Microcystis*. A

presença de proteínas diferenciais em cepas não tóxicas com função de proteção contra a fotoinibição (*spot* m15) pode estar relacionada a essa característica de sucessão em ambientes naturais. Portanto, considerando a expressão, em maior quantidade, de proteínas do metabolismo energético pela cepa tóxica observada no presente trabalho, supõe-se que, inicialmente, essas cepas apresentem vantagem em relação às não tóxicas na composição dominante da floração. Porém, possivelmente em função da fotoinibição, as cepas tóxicas de *Microcystis* tendem a colapsar mais rápido, uma vez que cepas não tóxicas apresentam expressão, em maior quantidade, de proteínas relacionadas à proteção contra a fotoinibição.

A enzima acetoacetyl-CoA redutase específica do PHA (polihidroxialcanoato) foi identificada no *spot* m30, exclusivo da cepa tóxica (Figura 17D). Em *Synechocystis* sp. PCC 6803, essa proteína tem função de acumular PHA na célula e, juntamente com a enzima quetotiolase- β específica do PHA, forma a primeira via completa de biossíntese do PHA conhecida em cianobactéria (Taroncher-Oldenburg *et al.*, 2000). Polihidroxialcanoatos são poliésteres biodegradáveis, compostos de estoque de carbono e energia, sintetizados e depositados no citoplasma como inclusões insolúveis (Taroncher-Oldenburg *et al.*, 2000).

O fato de essa proteína ter aparecido apenas na cepa tóxica indica que, para manter o estado produtor de microcistina, *M. aeruginosa* PCC 7820 (tóxica) precisa ter acesso às reservas de energia. Pode-se considerar que, tendo a cepa tóxica níveis de expressão mais elevados das proteínas relacionadas ao metabolismo energético em relação à cepa não tóxica, existe a necessidade de se produzir proteínas responsáveis pelo acúmulo intracelular da energia produzida. A expressão do *spot* m30 apenas pela cepa tóxica sugere que produzir microcistina significa maior gasto energético – razão da necessidade do acúmulo de carbono e energia mostrado pela cepa tóxica *M. aeruginosa* PCC 7820.

5.5 Considerações Finais

Entre as sequências identificadas, não foram observadas sequências correspondentes a polipeptídeos com função de peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS) e poliquetídeo sintase (PKS), como proposto putativamente por Tillet *et al.* (2000). Seriam proteínas do tipo L-quetoacil

sintase, aciltransferase, L-quetoacil redutase, desidratase, proteína acil carreadora, aminotransferase, aspartato racemase, acetil-CoA sintetase, O-metiltransferase, domínios de adenilação, condensação, tiolação e epimerização e domínio tioesterase. Supõe-se que ambas as cepas possuam o *operon* microcistina sintetase, sendo a produção desses polipeptídeos com função NRPS, PKS e NRPS/PKS comum a ambas as cepas. Entretanto, é possível que a expressão dessas proteínas seja tão baixa que a visualização delas em gel de poliacrilamida não seja possível.

A existência de genes que codificam peptídeo sintetases já foi documentada tanto em cepas tóxicas quanto em cepas não tóxicas (Meißner *et al.*, 1996). Assim, peptídeo sintetases em cepas tóxicas estão relacionadas à produção da hepatotoxina, ao passo que peptídeo sintetases em cepas não tóxicas teriam outros propósitos, como a síntese de peptídeos não tóxicos. Aeruginosina, microginina e anabaenopeptina, por exemplo, são peptídeos não tóxicos produzidos por domínios NRPS ou PKS em *Microcystis* (Welker & von Döhren, 2006).

Dittmann *et al.* (1997) verificaram que, entre cepas tóxicas e não tóxicas, existe diferença na quantidade de genes que codificam a peptídeo sintetase específica que produz microcistina. Entretanto, nenhum experimento para a detecção desse *operon* no genoma da cepa não tóxica NIVA CYA 43 foi realizado, o que inviabiliza conclusões mais precisas com relação a esse aspecto. Para se ter certeza, seria necessário procurar, entre as proteínas que não apresentaram expressão diferencial, proteínas relacionadas aos domínios NRPS e PKS possivelmente expressas pela cepa não tóxica. Já que elas estão no banco de dados e sua massa e pI podem ser determinados, esses dados forneceria um indicativo de onde elas estariam no gel.

É certo que as cepas podem apresentar diferenças em seu genoma, que, por sua vez, podem se refletir em seu proteoma. Assim, não foi descartada a possibilidade de algumas das proteínas diferencialmente expressas serem resultado das diferenças genéticas, não havendo portanto, relação com a presença ou ausência da microcistina. Entretanto, mesmo sem a sequência genômica, a proteômica pode fornecer informações valiosas que, posteriormente, podem ser associadas às informações genômicas.

Além disso, dos 47 *spots* diferencialmente expressos, selecionados de ambos os géis para o sequenciamento, não foram obtidas identificações para todos eles devido à supressão de sinal dos espectros obtidos por MALDI-TOF/TOF. Dos 47 diferentes *spots*, 30 foram identificados. Para delinear mais proposições, seria necessário identificar as proteínas nos outros 17 *spots* diferenciais.

Entre as proteínas identificadas, os *spots* m25 e m26, expressos apenas pela cepa não tóxica, foram identificados como proteínas hipotéticas, também chamadas de proteínas putativas não caracterizadas, portanto, não apresentaram similaridade de sequência com nenhuma proteína de função conhecida. O *spot* m25 foi identificado como proteína hipotética MAE_47530, e o *spot* m26 como proteína hipotética MAE_54080. Para essas proteínas, não é possível propor nenhuma relação com toxicidade.

A expressão em altos níveis de proteínas como RuBisCO, FBA, FBPase, PRK, acetil-CoA redutase específica do PHA pela cepa tóxica *M. aeruginosa* PCC 7820 indica que a produção da microcistina demanda fixação de CO₂ em maior quantidade e maior estoque de carbono como garantia energética. Parece que, para ser capaz de produzir microcistina e se manter produtora, além de possuir o gene microcistina sintetase, é necessário estocar carbono em maior quantidade, para que haja energia para a expressão, em maior quantidade, das proteínas relacionadas ao metabolismo energético e, novamente, maior eficiência no estoque de carbono, completando o ciclo. É possível que a incapacidade de expressar algumas dessas proteínas em maior quantidade esteja relacionada com o estado não produtor da microcistina.

Os resultados apresentados abrem perspectivas para o entendimento das razões pelas quais *Microcystis aeruginosa* produz microcistina em determinadas condições ambientais e porque ela pára de produzi-la – ou perde essa capacidade – em outro contexto ambiental. É possível que a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo energético seja otimizada em condições ambientais e, principalmente, nutricionais específicas, o que pode favorecer a produção da microcistina.

6 Conclusões

A biossíntese da microcistina ainda é um assunto não compreendido. Apesar da caracterização do cluster gênico envolvido na sua produção, estudos que levem a uma melhor compreensão das vias de produção desse metabólito secundário ainda são necessários. O fato de uma cepa não produzir a toxina, por exemplo, não significa necessariamente que ela seja não tóxica, pois é possível possuir o *operon* microcistina sintetase e, devido a diversas variáveis, não produzir a toxina.

Os resultados apresentados sugerem que o estado de produção da microcistina também depende de proteínas outras que não aquelas diretamente envolvidas em sua produção. Entre as proteínas diferencialmente expressas por ambas as cepas, não foram observadas expressões diferenciais de proteínas diretamente envolvidas na biossíntese da microcistina. Portanto, não fica descartada a possibilidade de a cepa não tóxica apresentar essas proteínas em seu proteoma. Assim, a presença de outras proteínas, alheias aos polipeptídeos com função peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS) e poliquetídeo sintase (PKS), pode estar relacionada à determinação do produto final – microcistina –, uma vez que NRPS e PKS também atuam na produção de peptídeos não tóxicos, como aeruginosinas, microgininas e cianopeptolinas.

Como visto, parece que a produção da microcistina, além de estar associada a condições nutricionais e ambientais específicas, depende da expressão, em níveis mais elevados, de proteínas relacionadas principalmente ao metabolismo energético, considerando-se o gasto necessário para sua produção.

7 Perspectivas

A partir dos dados obtidos neste trabalho, ficou clara a importância de se conhecer as proteínas produzidas por *Microcystis aeruginosa*. Casos de florações com espécie de *Microcystis* acontecem no mundo inteiro. Análises proteômicas podem ser uma ferramenta poderosa para melhor se compreender como a microcistina é produzida, devido ao potencial de produção da toxina demonstrado por *M. aeruginosa*.

Para entender mais profundamente essa questão, é necessário identificar os *spots* diferenciais que não puderam ser sequenciados devido à baixa intensidade de sinal dos espectros gerados para eles. Além da identificação por MALDI-TOF, também será feita a purificação dos peptídeos tripticos por cromatografia. Dessa forma, os peptídeos purificados poderão ser analisados individualmente por MALDI-TOF de forma a evitar problemas com supressão de sinal, o que impediu a identificação de parte das amostras preparadas.

Em um trabalho futuro, será interessante a identificação de todas as proteínas do gel, inclusive daquelas que não apresentam expressão diferencial. Conhecer todas as proteínas que compõem o proteoma de *Microcystis aeruginosa*, ainda que em condições laboratoriais determinadas, abrirá caminho para o delineamento de novas estratégias de pesquisa e poderá contribuir para o entendimento de como as microcistinas são produzidas. É possível que sejam identificadas proteínas poliquetídeo sintase não ribossomal e peptídeo sintetase em ambas as cepas, o que confirmaria que mesmo cepas em estado de não produção da microcistina expressam o *operon*. Também é interessante seqüenciar o genoma de ambas as cepas e associar as características genéticas ao padrão de expressão de proteínas.

Em suma, entender o funcionamento proteômico de *M. aeruginosa* poderá fornecer informações valiosas para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos que bloqueiem a produção da toxina. Assim, mesmo em situações de floração, a qualidade da água para consumo não será, como atualmente, tão drasticamente afetada.

8. Referências Bibliográficas

- Amé, M. V. & Wunderlin, D. A. Effects of iron, ammonium and temperature on microcystin content by a natural concentrated *Microcystis aeruginosa* population. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 168, p. 235-248, 2005.
- An, J. & Carmichael, W. W. Use of colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. **Toxicon**, v. 32, p. 1495-1507, 1994.
- Anderson, D. C.; Campbell, E. L. & Meeks, J. C. A Soluble 3D LC/MS/MS Proteome of the Filamentous Cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 3096-3104, 2006.
- Azevedo, S. M. F. O.; Carmichael, W. W.; Jochimsen, E. M.; Rinehart, K. L.; Lau S.; Shaw, G. R. & Eaglesham, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru, Brazil. **Toxicology**, v. 181/182, p. 441-446, 2002.
- Badger, M. R. & Price, G. D. The CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. **Physiologia Plantarum**, v. 84, p. 606-615, 1992.
- Badger, M. R. & Price, G. D. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 609-622, 2003.
- Baldia, S. F.; Conaco, Ma C. G.; Nishijima, T.; Imanishi, s. & Harada, K-I. Microcystin Production During Algal Bloom Occurrence In Laguna De Bay, The Philippines. **Fisheries Science**, v. 69, p. 110-116, 2003.
- Barrios-Llerena, M. E.; Chong, P. K.; Gan, C. S.; Snijders, A. P. L.; Reardon, K. F. & Wright, P. C. Shotgun proteomics of cyanobacteria – applications of experimental and data-mining techniques. **Briefings an Functional Genomics and Proteomics**, v. 5, p. 121-132, 2006.
- Barrios-Llerena, M. E.; Reardon, K. F. & Wright, P. C.. 2-DE proteomic analysis of the model cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Electrophoresis**, v. 28, p. 1-9, 2007.

- Bateman, K. P.; Thibault, P.; Douglas, D. J. & White, R. L. Mass spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using on-line chromatographic and electrophoretic separations. **Journal of Chromatography A**, v. 712, p. 253-268, 1995.
- Benz, R. Structure and function of pili from gram-negative bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 42, p. 359-93, 1988.
- Beyruth, Z. Periodic disturbances, trophic gradient and phytoplankton characteristics related to cyanobacterial growth in Guarapiranga Reservoir, São Paulo State, Brazil. **Hydrobiologia**, v. 424, p. 51-65, 2000.
- Bittencourt-Oliveira, M. C.; Oliveira, M. C. & Yunes, J. S. Cianobactérias tóxicas. **Biocientífica, Ciência e Desenvolvimento**, v. 23, p. 44-47, 2001
- Bolch, C. J. S. & Blackburn S. I. Isolation and purification of Australian isolates of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kütz. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, p. 5-13, 1996.
- Bonnet, M. P. & Poulin, M. Numerical modelling of the planktonic succession in a nutrient-rich reservoir: environmental and physiological factors leading to *Microcystis aeruginosa* dominance. **Ecological Modelling**, v. 156, p. 93-112, 2002.
- Borics, G.; Grigorszky, I.; Szabó, S. & Padisák, J. Phytoplankton associations in a small hypertrophic fishpond in East Hungary during a change from bottom-up to top-down control. **Hydrobiologia**, v. 424, p. 79-90, 2000.
- Brockamp, H. P. & Kula, M. R. Purification and characterization of class I fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Staphylococcus carnosus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 34, p. 287-291, 1990.
- Brookes, J. D.; Ganf, G. G. & Oliver, R. L. Influence of light and nutrients on buoyance, filament aggregation and flotation of *Anabaena circinalis*. **Journal of Plankton Research**, v. 21, p. 327-341, 1999.
- Burns, R. A.; MacKenzie, T. D. B. & Campbell, D. A. Inorganic carbon repletion constrains steady-state light acclimation in the cyanobacterium *Synechococcus elongates*. **Journal of Phycology**, v. 42, p. 610-621, 2006.

- Caiola, M. G. & Pellegrini, S. Lysis of *Microcystis aeruginosa* (Kütz.) by Bdellovibrio-like bacteria. **Journal of Phycology**, v. 20, p. 471-475, 1984.
- Campanella, L.; Crescentini, G.; Avino, P. & Moauro, A. Determination of macrominerals and trace elements in the alga *Spirulina platensis*. **Aalusis**, v. 26, p. 210-214, 1998.
- Cargile, B. J.; Sevinsky, J. R.; Essader, A. S.; Stephenson, J. L. & Bundy, J. L. Immobilized pH gradient isoelectric focusing as a first-dimension separation in shotgun proteomics. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 16, p. 181-189, 2005.
- Carmichael, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, p. 445-459, 1992.
- Carmichael, W. W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific America**, v. 270, p. 78-86, 1994.
- Carmichael, W. W. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: "The CyanoHABs". **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 7, p. 1393-1407, 2001.
- Carmichael, W. W.; Azevedo, S. M. F. O.; An, J. S.; Molica, R. J. R.; Jochimsen, E. M.; Lau, S.; Rinehart, K. L.; Shaw, G. R. & Eaglesham, G. K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 663-668, 2001.
- Carvalho, M. C.; Coelho-Botelho, M. J.; Lamparelli, M. C.; Roquetti-Humaitá, M. H.; Salvador, M. E. P.; Souza, C. R. & Truzzi, A. Spacial and temporal variations of chlorofill-a, plankton and some physico-chemical factors at Billings Complex, São Paulo, Brazil. **Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie**, v. 26, p.452-457, 1997.
- Cavet, J. S.; Borrelly, G. P. M. & Robinson, N. J. Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 165-181, 2003.
- Chen, T.; Wang, Q.; Cui, J.; Yang, W.; Shi, Q.; Hua, Z.; Ji, J. & Shen, P. Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, p. 958-974, 2005.
- Chorus, I. & Bartram, J. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. **WHO**, 1999.

- Christiansen, G.; Fastner, J.; Erhard, M.; Börner, T. & Dittmann, E. Microcystin Biosynthesis in *Planktothrix*: Genes, Evolution, and Manipulation. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 564–572, 2003.
- Codd, G. A.; Bell, S. G.; Kaya, K.; Ward, C. J.; Beattie, K. A. & Metcalf, J. S. Cyanobacterial toxins, exposures routes and human health. **European Journal of Phycology**, v. 34, p. 405-415, 1999.
- Codd, G. A.; Morrison, L. F. & Metcalf, J. S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, p. 264-272, 2005.
- Coleman, J. R. Carbonic anhydrase and its role in photosynthesis. *In.*: **Photosynthesis: Physiology and Metabolism**. Ed.: Leegood, R. C.; Sharkey, T. D. & von Caemmerer, S. Kluwer Academic Publishers, 2004, 625p.
- Coles, J. F. & Jones, R. C. Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river. **Journal of Phycology**, v. 36, p. 7-16, 2000.
- Crossetti, L. O. & Bicudo, C. E. De M. Structural and functional phytoplankton responses to nutrient impoverishment in mesocosms placed in a shallow eutrophic reservoir (Garças Pond), São Paulo, Brazil. **Hydrobiologia**, v. 541, p. 71-85, 2005.
- Degrelle, S. A.; Blomberg, L. A.; Garret, W. M.; Li, R. W. & Talbot, N. C. Comparative proteomica and regulatory network analyses of the elongating pig conceptus. **Proteomics**, v. 9, p. 2678-2694, 2009.
- di Bernardo, L. **Algas e suas influências na qualidade das águas e nas tecnologias de tratamento**. Editora Abes, Rio de Janeiro, 1995. 140p.
- Dittmann, E.; Neilan, B. A.; Erhard, M.; von Döhren, H. & Börner, T. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Molecular Microbiology**, v. 26, p. 779-787, 1997.

- Dittmann, E.; Erhard, M.; Kaebernick, M.; Scheler, C.; Neilan, B. A.; von Döhren, H. & Börner, T. Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Microbiology**, v.147, p. 3113-3119, 2001.
- Downing, T. G.; Sember, C. S.; Gehringer, M. M. & Leukes, W. Medium N:P ratios and specific growth rate comodule microcystin and protein content in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 and *M. aeruginosa* UV027. **Microbial Ecology**, v. 49, p. 468-473, 2005.
- Eitinger, T.; Suhr, J.; Moore, L. & Smith, J. A. C. Secondary transporters for nickel and cobalt ions: Theme and variations. **BioMetals**, v. 18, p. 399-405, 2005.
- Ekman, M.; Tollbäck, P.; Klint, J. & Bergman, B. Protein expression profiles in an endosymbiotic cyanobacterium revealed by a proteomic approach. **The American Phytopathological Society**, v. 19, p. 1251-1261, 2006.
- Erhard, M.; von Döhren, H. & Jungblut, P. Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 906-909, 1997.
- Figueiredo, C. & Giani, A. Seasonal variation in the diversity and species richness of phytoplankton in a tropical eutrophic reservoir. **Hydrobiologia**, v. 445, p. 165-174, 2001.
- Fulda, S.; Mikkat, S.; Schröder, W. & Hagemann, M. Isolation of salt-induced periplasmic proteins from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. **Archives of Microbiology**, v. 171, p. 214-217, 1999.
- Fulda, S.; Huang, F.; Nilsson, F.; Hagemann, M. & Norling, B. Proteomics of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: Identification of periplasmic proteins in cells grown at low and high salt concentrations. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5900-5907, 2000.
- Funari, E. & Testai, E. Human Health Risk Assessment Related to Cyanotoxins Exposure. **Critical Reviews in Toxicology**. v, 38, p. 97-125, 2008.
- Gantar, M. & Svircev, Z. Microalgae and cyanobacteria: food for thought. **Journal of Phycology**. v. 44, p. 260–268, 2008.
- Gantt, E. Supramolecular Membrane Organization. *In.*: **The Molecular Biology of Cyanobacteria**. Ed.: Bryant, D. A. Kluwer Academic Publishers. 2004, 881p.

- Gefflaut, T.; Blonski, C.; Perie, J. & Wilson, M. Class I aldolases: Substrate specificity, mechanism, inhibitors and structural aspects. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.63, p. 301-340. 1995.
- Gehring, M. M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. **FEBS Letters**, v. 557, p. 1-8, 2004.
- Grigorieva, G. & Shestakov, S. V. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. **FEMS Microbiology Letters**, v. 13, p. 367-370, 1982.
- Haake, V.; Zrenner, R.; Sonnewald, U & Stitt, M. A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. **The Plant Journal**, v. 14, p. 147-157. 1998.
- Hansel, A. & Tadros, M. Characterization of two pore-forming proteins isolated from the outer membrane of *Synechococcus* PCC 6301. **Current Microbiology**, v. 36, p. 321-326, 1998.
- Harada, K-i.; Kondo, F. & Lawton, L. Laboratory analysis of cyanotoxins. *In.*: **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. *Ed.*: Chorus, I. & Bartram, J. WHO, 1999. 400p.
- Hee-Jin, C.; Baik-Ho, K.; Jeong-Dong, K. & Myung-Soo, H. *Streptomyces neyagawaensis* as a control for the hazardous biomass of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in eutrophic freshwaters. **Biological Control**, v. 33, p.335-343. 2005.
- Herranen, M.; Battchikova, N.; Zhang, P.; Graf, A.; Sirpiö, S.; Paakkarinen, V. & Aro, E-M. Towards Functional Proteomics of Membrane Protein Complexes in *Synechocystis* sp. PCC 68031. **Plant Physiology**, v. 134, p. 470-481, 2004.
- Hoiczky, E. & Hansel, A. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 1191-1199, 2000.
- Holland, I. B.; Benabdelhak, H.; Young, J.; Pimenta, A. L.; Schmitt, L. & Blight, M. A. Bacterial ABC transporters involved in translocation. *In.*: **ABC proteins: from bacteria to man**. Holland, I. B.; Cole, S. P. C.; Kuchler, K. & Higgins, C. F. Academic Press, London. 2003.

- Huang, F.; Parmryd, I.; Nilsson, F.; Persson, A. L.; Pakrasi, H. B.; Andersson B. & Norling, B. Proteomics of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, p. 956-966, 2002.
- Huang, F.; Hedman, E.; Funk, C.; Kieselbach, T.; Schröder, W. P. & Norling, B. Isolation of Outer membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its proteomic characterization. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, p. 586-595, 2004.
- Humpage, A. R.; Fenech, M.; Thomas, P. & Falconer, I. R. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 472, p 155-164, 2000.
- Ibelings, B. W. & Chorus, I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater 'seafood' and its consequences for public health: A review. **Environmental Pollution**, v. 150, p. 117-192, 2007.
- Jähnichen, S.; Ihle, T.; Petzoldt, T. & Benndorf, J. Impact of inorganic carbon availability on microcystin production by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6994-7002, 2007.
- Jones, G. J.; Falconer, I. F. & Wilkins. Persistence of cyclic peptide toxins in dried cyanobacterial crusts from Lake Mokoan, Australia. **Environmental Toxicology Water Quality**, v, 10, p. 19-24, 1995.
- Jungmann, D. & Benndorf, J. Toxicity to *Daphnia* of a compound extracted from laboratory and natural *Microcystis* spp., and the role of microcystins. **Freshwater Biology**, v. 32, p. 13-20, 1994.
- Jüttner, F. & Lüthi, H. Topology and enhanced toxicity of bound microcystins in *Microcystis* PCC 7806. **Toxicon**, v. , p. , 2007.
- Kaebernick, M.; Neilan, B. A.; Börner, T. & Dittmann, E. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3387-3392, 2000.

- Kaebernick, M. & Neilan, B. A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, p. 1-9, 2001.
- Kaebernick, M.; Dittmann, E.; Börner, T. & Neilan, B. A. Multiple Alternate Transcripts Direct the Biosynthesis of Microcystin, a Cyanobacterial Nonribosomal Peptide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 449–455, 2002.
- Kaneko, T.; Sato, S.; Kotani, H.; Tanaka, A.; Asamizu, E.; Nakamura, Y.; Miyajima, N.; Hirose, M.; Sugiura, M.; Sasamoto, S.; Kimura, T.; Hosouchi, T.; Matsuno, A.; Muraki, A.; Nakazaki, N.; Naruo, K.; Okumura, S.; Shimpo, S.; Takeuchi, C.; Wada, T.; Watanabe, A.; Yamada, M.; Yasuda, M. & Tabata, S. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. **DNA Research**, v. 3, p. 109-136, 1996.
- Kardinaal, W. E. A.; Tonk, L.; Janse, I.; Hol, S.; Slot, P.; Huisman, J. & Visser, P. M. Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2939-2946, 2007.
- Kashino, Y.; Lauber, W. M.; Carroll, J. A.; Wang, Q.; Whitmarsh, J.; Satoh, K. & Pakrasi, H. B. Proteomic analysis of a highly active photosystem ii preparation from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals the presence of novel polypeptides. **Biochemistry**, v.41, p. 8004-8012, 2002.
- Katircioglu, H.; Akin, B. S. & Atici, T. Microalgal toxin(s): characteristics and importance. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 667-674, 2004.
- Kleinkauf, H. & von Döhren, H. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. Review. **European Journal of Biochemistry**, v. 236, p. 335-351, 1996.
- Klint, J.; Ran, L.; Rasmussen, U. & Bergman, B. Identification of developmentally regulated proteins in cyanobacterial hormogonia using a proteomic approach. **Symbiosis**, v. 41, p. 87-95, 2006.
- Kobayashi, M. & S. Shimizu. Cobalt proteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 261, p. 1-9, 1999.

- Koksharova, O. A.; Klint, J. & Rasmussen, U. The first protein map of *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. **Microbiology**, v. 75, p. 664-672, 2006.
- Kuiper-Goodman, T.; Falconer, I. & Fitzgerald, J. Human Health Aspects. *In.*: **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. Ed.: Chorus, I. & Bartram, J. WHO, 1999. 400p.
- Kurian, D.; Phadwal, K. & Mäenpää, P. Proteomic characterization of acid stress response in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Proteomics**, v. 6, p. 3614-3624, 2006.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- Lambert, T. W.; Holmes, C. F. B. & Hrudey, S. E. Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. **Water Research**, v. 30, p.1411-1422, 1996.
- Lampert, W. Further studies on the inhibitory effect of toxic blue-green *Microcystis aeruginosa* on the filtering rate of zooplankton. **Archiv der Hydrobiologie**. v. 95, p. 207-220, 1982.
- Lankoff, A.; Krzowski, L.; Glab, J.; Banasik, A.; Lisowska, H.; Kuszewski, T.; Gózdź, S. & Wójcik, A. DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. **Mutation Research**, v. 559, p. 131-142, 2004.
- Lehman, P. W.; Boyer, G.; Hall, C.; Waller, S. & Gehrts, K. Distribution and toxicity of new colonial *Microcystis aeruginosa* bloom in the San Francisco Bay Estuary, California. **Hydrobiologia**, v. 541, p. 87-89, 2005.
- Mackintosh, R. W.; Dalby, K. N.; Campbell, D. G.; Cohen, P. T. W.; Cohen, P. & MacKintosh, C. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. **FEBS Letters**, v. 371, p. 236-240, 1995.
- Magalhães, V. F.; Soares, R. M. & Azevedo S. M. F. O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. **Toxicon**, v. 39, p. 1077-1085, 2001.
- Marahiel, M. A.; Stachelhaus, T. & Mootz, H. D. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 2651-2673, 1997.

- Martin, W. & Schnarrenberger, C. The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. **Current Genetics**, v. 32, p. 1-18, 1997.
- Martin, W.; Scheibe, R. & Schnarrenberger, C. The Calvin Cycle and Its regulation. In.: **Photosynthesis: Physiology and Metabolism**, vol. 9. Ed.: Leegood, R. C.; Sharkey, T. D. & von Caemmerer, S. Kluwer Academic Publishers, 2004, 625pp.
- Meißner, K.; Dittmann, E. & Börner, T. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 135, p. 295–303, 1996.
- Mihali, T. K.; Kellmann, R.; Muenchhoff, J.; Barrow, K. D. & Neilan, B. A. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 716-722, 2008.
- Mikalsen, B.; Boison, G.; Skulberg, O. M.; Fastner, J.; Davies, W.; Gabrielsen, T. M.; Rudi, K. & Jakobsen, K. S. Natural Variation in the Microcystin Synthetase Operon *mcyABC* and Impact on Microcystin Production in *Microcystis* Strains. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 2774–2785, 2003.
- Mikhailov, A.; Härmälä-Braskén, A-N.; Hellman, J.; Meriluoto, J. & Eriksson, J. E. Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR. **Chemico-Biological Interactions**, v. 142, p, 223-237, 2003.
- Moffitt, M. C. & Neilan, B. A. Characterization of the Nodularin Synthetase Gene Cluster and Proposed Theory of the Evolution of Cyanobacterial Hepatotoxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 6353–6362, 2004.
- Morand, L. Z.; Cheng, R. H.; Krogmann, D. W. & Ki Ho, K. Soluble Electron Transfer Catalysts of Cyanobacteria. In.: **The Molecular Biology of Cyanobacteria**. Ed.: Bryant, D. A. 1994, 881p.
- Moslavac, S.; Bredemeier, R.; Mirus, O.; Granvogl, B.; Eichacker, L. A. & Schleiff, E. Proteomic analysis of the outer membrane of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **Journal of Proteome Research**, v. 4, p. 1330-1338, 2005.

- Mulrooney, S. B. & R. P. Hausinger. Nickel uptake and utilization by microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 239-261, 2003.
- Mustacich, D. & Powis, G. Thioredoxin reductase. **Biochemical Journal**, v. 346, p. 1-8, 2000.
- Nakahara, K.; Yamamoto, H.; Miyake, C. & Yokota, A. Purifications and characterization of class-I and class-II fructose-1,6-biphosphate aldolases from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Plant Cell Physiology**, v. 44, p. 326-333, 2003.
- OECD. Emerging Risks to Water Supplies: Best Practice for Improved Management and Preparedness to protect Public Health. 2005. Disponível em: www.oecd.org/sti/biotechnology.
- Oksanen, I.; Jokela, J.; Fewer, D. P.; Wahlsten, M.; Rikkinen, J. & Sivonen, K. Discovery of rare and highly toxic microcystins from lichen-associated cyanobacterium *Nostoc* sp. strain IO-102-I. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5756-5763, 2004.
- Otsuka, S.; Suda, S.; Li, R.; Watanabe, M.; Oyaizu, H.; Matsumoto, S. & Watanabe, M. M. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 172, p. 15-21, 1999.
- Oudra, B.; Loudiki, M.; Sbiyyaa, B.; Sabour, B.; Martins, R.; Amorim, A. & Vasconcelos, V. Detection and variation of microcystin contents of *Microcystis* blooms in eutrophic Lalla Takerkoust Lake, Morocco. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**, v. 7, p. 35-44, 2002.
- Panichkin, V. B.; Glaser, V. M.; Zinchenko, V. V.; Sokolenko, A.; Herrmann, R. G. & Shestakov, S. V. Gene *clpP2* encoding peptidase in the *Synechocystis* sp. PCC 6803 cyanobacterium controls cell sensitivity to photoinhibition. **Biology Bulletin**, v. 28, p. 256-261, 2001.
- Pegram, R. A.; Humpage, A. R.; Neilan, B. A.; Runnegar, M. T.; Nichols, T.; Thacker, R. W.; Pflugmacher, S.; Etheridge, S. M. & Love, A. H. Cyanotoxins Workgroup Report. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 619, p. 317-381, 2008.

- Perkins, D. N.; Pappin, D. J. C.; Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v, 20, p. 3551-3567, 1999.
- Pisareva, T.; Shumskaya, M.; Maddalo, G.; Ilag, L. & Norling, B. Proteomics of *Synechocystis* sp. PCC 6803: Identification of novel integral plasma membrane proteins. **FEBS Journal**, v. 274, p. 791-804, 2007.
- Price, G. D.; Coleman, J. R. & Badger, M. R. Association of Carbonic Anhydrase Activity with Carboxysomes Isolated from the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. **Plant Physiology**, v. 100, p. 784-793, 1992.
- Ran, L.; Huang, F.; Ekman, M.; Klint, J. & Bergman, B. Proteomic analyses of the photoauto- and diazotrophically grown cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 73102. **Microbiology**, v. 153, p. 608-618, 2007.
- Rapala, J.; Sivonen, K.; Lyra, C. & Niemelä, S. I. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2206-2212, 1997.
- Regelsberger, G.; Laaha, U.; Dietmann, D.; Rüker, F.; Canini, A.; Grilli-Caiola, M.; Furtmüller, P. G.; Jakopitsch, C.; Peschek, G. A. & Obinger, C. The iron superoxide dismutase from the filamentous cyanobacterium *Nostoc* pcc 7120: localization, overexpression and biochemical characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 44384-44393, 2004.
- Richardson, M. R.; Lai, X.; Dixon, J. L. ; Sturek, M. & Witzmann, F. A. Diabetic dyslipidemia and exercise alter the plasma low-density lipoproteome in Yucatan pigs. **Proteomics**, v. 9, p. 2468-2483, 2009.
- Rodionov, D. A.; Hebbeln, P.; Gelfand, M. S. & Eitinger, T. Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters. **Journal of Bacteriology**, v.188, p. 317-327, 2006.
- Sant'Anna, C. L.; Azevedo, M. T. P.; Werner, V. R.; Dogo, C. R.; Rios, F. R.; de Carvalho, L. R. 2008. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies*, v. 126, p. 251-265.

- Sazuka, T. Proteomic analysis of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120 with two-dimensional gel electrophoresis and amino-terminal sequencing. **Photosynthesis Research**, v. 78, p. 279-291, 2003.
- Schmetterer, G. Cyanobacterial Respiration. *In.*: **The Molecular Biology of Cyanobacteria**. Ed.: Bryant, D. A. 1994, 881p.
- Serres, M. H.; Fladmark, K. E.; Døskeland, S. O. An ultrasensitive competitive binding assay for the detection of toxins affecting protein Phosphatases. **Toxicon**, v. 38, p. 347-360, 2000.
- Shen, X.; Lam, P. K. S.; Shaw, G. R.; & Wickramasinghe, W. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Toxicon**, v. 40, p. 14. *In.*: **The Molecular Biology of Cyanobacteria**. Ed.: Bryant, D. A. 1994, 881p.99-1501, 2002.
- Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O. & Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Annals of Chemistry**, v. 68, p. 850-858. 1996.
- Sivonen, K & Jones, G. Cyanobacterial Toxins. *In.*: **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. Ed.: Chorus, I. & Bartram, J. WHO, 1999. 400p.
- Song, L.; Sano, T.; Li, R.; Watanabe, M. M.; Liu, Y. & Kaya, K. Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. **Phycological Research**, v. 46, p. 19-23, 1998.
- Spoof, L.; Berg, K. A.; Rapala, J.; Lahti, K.; Lepistö, L.; Metcalf, J. S.; Codd, G. A. & Meriluoto, J. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). **Environmental Toxicology and Water Quality**, v 21, p. 552-560, 2006.
- Srivastava, R.; Pisareva, T. & Norling, B. Proteomic studies of the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Proteomics**, v. 5, p. 4905-4916, 2005.
- Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A. Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 125, p. 3–14, 1995.

- Stanier & Cohen-Bazire. Phototrophic Prokaryotes: The Cyanobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, p. 225-74, 1977.
- Suzuki, I.; Simon, W. J. & Slabas, A. R. The heat shock response of *Synechocystis* sp. PCC 6803 analysed by transcriptomics and proteomics. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 1573-1578, 2006.
- Svrcek, C. & Smith, D. W. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 3, p. 155-185, 2004.
- Taranto, M. P.; Vera, J. L.; Hugenholtz, J.; De Valdez, G. F. & Sesma, F. *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 5643-5647, 2003.
- Thomas, D. J.; Thomas, J. B.; Prier, S. D.; Nasso, N. E. & Herbert, S. K. Iron superoxide dismutase protects against chilling damage in the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC79421. **Plant Physiology**, v. 120, p. 275-282, 1999.
- Tillett, D.; Dittmann, E.; Erhard, M.; von Döhren, H.; Börner, T. & Neilan, B. A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide/polyketide synthetase system. **Chemistry & Biology**, v. 7, 753-764, 2000.
- Tonietto, A.; Fonseca, B. M. & Guimarães, M. **O gênero Microcystis (Cyanobacteria): uma abordagem eco-fisiológica**. Ed. Universa, Brasília, DF, 2008, 110p.
- Tonk, L.; Visser, P. M.; Christiansen, G.; Dittmann, E.; Snelder, E. O. F. M.; Wiedner, C.; Mur, L. R. & Huisman, J. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5177-5181, 2005.
- Toroncher-Oldenburg, G.; Nishina, K. & Stephanopoulos, G. Identification and analysis of the Polyhydroxyalkanoate-specific β -ketothiolase and acetoacetyl coenzyme A reductase genes in the cyanobacterial *Synechocystis* PCC 6803. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4440-4448, 2000.
- van Apeldoorn, M. E.; van Egmond, H. P.; Speijers, G. J. A., and Bakker, G. J. I. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p. 7-60, 2007.

- Visser, P. M.; Ibelings, B. W.; Mur, L. R. & Walsby, A. A. The ecophysiology of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. In: **Harmful cyanobacteria**. Ed. Huisman, J.; Matthijs, H. C. P. & Visser, P. M. Springer, 2005. 149p.
- Walsby, A. E. Structure and Function of Gas Vacuoles. *Bacteriological Reviews*. v. 36, p. 1-32, 1972.
- Wedel, N & Soll, J. Evolutionary conserved light regulation of Calvin cycle activity by NADPH-mediated reversible phosphoribulokinase / CP12 / glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complex dissociation. **The Proceedings of the National Academy of Science**, v. 95, p. 9699-9704, 1998.
- Welker, M. & von Döhren, H. Cyanobacterial peptides – Nature’s own combinatorial biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 530-563, 2006.
- Welsh, E. A.; Liberton, M.; Stöckel, J.; Loh, T.; Elvitigala, T.; Wang, C.; Wollam, A.; Fulton, R. S.; Clifton, S. W.; Jacobs, J. M.; Aurora, R.; Ghosh, B. K.; Sherman, L. A.; Smith, R. D.; Wilson, R. K. & Pakrasi, H. B. The genome of *Cyanothece* 51142, a unicellular diazotrophic cyanobacterium important in the marine nitrogen cycle. **PNAS**, v. 105, p. 15094-15099, 2008.
- Woodger, F. J.; Badger, M. R. & Price, G. D. Sensing of inorganic carbon limitation in *Synechococcus* PCC7942 is correlated with the size of the internal inorganic carbon pool and involves oxygen. **Plant Physiology**, v. 139, p. 1959-1969, 2005.
- Yuan, M.; Namikoshi, M.; Otsuki, A.; Rinehart, K. L.; Sivonen, K. & Watanabe, M. F. Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 34, p. 33-43, 1999.
- Yunes, J.; Matthiensen, A.; Carneiro, C.; Oroski, F.; Becker, V. & Carvalho, M. C. Florações de cianobactérias tóxicas: mãos à obra ao problema. In: ROLAND, F.; CESAR, D. & MARINHO, M. (eds). **Lições de Limnologia**. 1ª edição. Editora Rima, SP, 2005. p: 299-323.

Zhao, W.; Guo, Q. & Zhao, J. A membrane-associated Mn-superoxide dismutase protects the photosynthetic apparatus and nitrogenase from oxidative damage in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. **Plant Cell Physiology**, v. 48, p. 563-572, 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)