

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STEFANIA PETRUZZIELLO

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO*, CLONAGEM, SUPEREXPRESSÃO E  
PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TREALOSE-6-FOSFATO FOSFATASE DE  
*Herbaspirillum seropedicae*

CURITIBA

2009

STEFANIA PETRUZZIELLO

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO*, CLONAGEM, SUPEREXPRESSÃO E  
PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TREALOSE-6-FOSFATO FOSFATASE DE  
*Herbaspirillum seropedicae*

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Bioquímica como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Co-Orientador: Dr. Marcelo Müller- Santos

CURITIBA

2009

A mia madre,  
fonte de ispirazione e affetto, appoggio e incentivo.  
La miglior compagna e  
amica che avrei mai sognato avere accanto.  
Per tutto.

À minha mãe,  
fonte de inspiração e carinho, apoio e incentivo.  
A melhor companheira e  
amiga que eu jamais sonhei ter ao meu lado.  
Por tudo.

## AGRADECIMENTOS

À vida, pois ela é meu eterno objeto de estudo.

Ao meu professor e orientador Emanuel Maltempi de Souza, pelo constante incentivo, apoio e inspiração que me proporcionou durante todos estes anos e por, nos momentos mais difíceis, não me deixar desistir.

Ao doutor Marcelo Müller- Santos, por ter sido meu mentor e amigo desde os primórdios da minha jornada na pesquisa científica e pelas constantes contribuições teóricas e práticas que possibilitaram a execução deste trabalho.

Ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa, por ter me acolhido em seu laboratório e ter me dado a oportunidade de crescer e aprender com os melhores.

À professora Rose Adele Monteiro, pelo constante auxílio científico e pessoal.

Aos colegas do Anexo, por tornarem a experiência em laboratório ainda mais agradável.

Ao Valter, pela ajuda indispensável na execução deste trabalho, pela pronta disponibilidade a solucionar qualquer dificuldade técnica e pelos inúmeros momentos de descontração.

Aos demais professores, colegas e técnicos do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, por contribuírem para o desenvolvimento e divulgação científica deste excelente grupo de pesquisa.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original.

Albert Einstein

## RESUMO

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria diazotrófica, gram-negativa e capaz de colonizar gramíneas. Como muitas outras espécies, ela também possui a capacidade de sintetizar o dissacarídeo trealose a partir de UDP-glucose e glucose-6-fosfato. A trealose é um açúcar essencial para a célula em condições ambientais extremas, como seca e salinidade elevada, pois interage com as proteínas e lipídeos, estabilizando a sua conformação. O acúmulo de trealose em plantas de interesse econômico é essencial para aumentar a capacidade de sobrevivência frente a condições ambientais adversas. Isto pode ser alcançado introduzindo e superexpressando os genes da síntese da trealose de outras espécies em células vegetais. Em *H. seropedicae*, a via de biossíntese da trealose é formada por dois genes: o *otsA*, codifica a trealose-6-fosfato sintase (TPS) e o *otsB*, codifica a trealose-6-fosfato fosfatase (TPP). O objetivo deste trabalho é a caracterização da proteína TPP. A proteína TPP é membro da superfamília HAD (dehalogenase haloácida), caracterizada por dobras  $\alpha/\beta$ -hidrolase na estrutura das enzimas e pela utilização de um resíduo de aspartato como nucleófilo na reação catalisada. Através da análise comparativa com a TPP de *Thermoplasma acidophilum*, gerou-se um modelo tridimensional teórico para a TPP de *H. seropedicae*. O modelo mostrou que a proteína possui um domínio central com dobras  $\alpha/\beta$ -hidrolase e um possível *cap* do tipo C2. Além disso, observou-se evidente semelhança na composição e distribuição espacial dos aminoácidos que compõem o sítio ativo das TPPs dos dois organismos, sugerindo afinidade pelo mesmo tipo de substrato. O gene *otsB* foi amplificado a partir do DNA cromossomal da bactéria e clonado no vetor de expressão pET-28a. A proteína TPP foi então superexpressa e purificada por cromatografia de afinidade. Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando *p*-nitrofenol fosfato (pNPP) como substrato e indicaram que a enzima possui atividade ótima a 50°C, em tampão PIPES pH 6,1. A atividade da TPP mostrou-se dependente de Mg<sup>2+</sup>, indicando ser este o provável cofator da enzima, e suscetível à inibição competitiva por Ca<sup>2+</sup>. Este trabalho inicia a caracterização dos genes da via de biossíntese de trealose em *Herbaspirillum seropedicae*. Uma vez concluído, o estudo permitirá uma melhor compreensão da potencialidade e eficiência das enzimas deste organismo envolvidas na produção final do dissacarídeo.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1. CENÁRIO ECONÔMICO ATUAL.....	16
1.2. DISTRIBUIÇÃO DO PLANTIO DE CANA-DE AÇÚCAR NO BRASIL.....	17
1.3. ZAE-CANA: UM INSTRUMENTO DE ORDENAMENTO DA EXPANSÃO CANAVIEIRA.....	18
1.4. CARACTERÍSTICAS DA CANA DE AÇÚCAR.....	20
1.5. AÇÚCARES NÃO REDUTORES: MOLÉCULAS BIOPROTETORAS.....	21
1.6. PRODUÇÃO DE TREALOSE EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	23
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	26
3.2. REAGENTES .....	27
3.3. MEIOS DE CULTURA.....	27
3.3.1. Meios empregados para o cultivo de <i>H. seropedicae</i> .....	27
3.3.2. Meios empregados para o cultivo de <i>E. coli</i> .....	28
3.4. ANTIBIÓTICOS.....	29
3.5. CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	29
3.6. ARMAZENAMENTO DAS BACTÉRIAS.....	29
3.7. PURIFICAÇÃO DE DNA TOTAL DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	30
3.8. PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DE <i>E. coli</i> .....	30
3.9. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO.....	30
3.9.1. Preparo de células competentes para eletroporação.....	30
3.9.2. Transformação bacteriana.....	31
3.10. DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA O GENE <i>otsB</i> DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	31
3.11. AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>otsB</i> DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	32
3.12. ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE.....	33
3.13. LIGAÇÃO DO FRAGMENTO DE PCR NO VETOR pCR 2.1.....	33

3.14. SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	34
3.15. CLIVAGEM DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	34
3.16. ISOLAMENTO DO INSERTO CONTENDO O GENE <i>otsB</i> .....	35
3.17. LIGAÇÃO DO INSERTO AO VETOR pET 28a.....	35
3.18. ELETROFORESE SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE).....	35
3.19. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TREALOSE-6-FOSFATO FOSFATASE (TPP) DE <i>H. seropedicae</i> EM <i>E. coli</i> .....	36
3.20. PURIFICAÇÃO DA TPP-HIS DE <i>H. seropedicae</i> .....	37
3.21. DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD.....	38
3.22. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA TPP DE <i>Herbaspirillum</i> <i>seropedicae</i> .....	38
3.22.1. Ensaio de determinação da atividade enzimática.....	38
3.22.2. Efeito do pH na atividade enzimática.....	39
3.22.3. Ensaio de determinação do K <sub>M</sub> da enzima.....	40
3.22.4. Ensaio de termoestabilidade da enzima.....	40
3.22.5. Efeito de cátions divalentes na atividade da enzima.....	40
3.23. ANÁLISE <i>in silico</i> DA PROTEÍNA TPP DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	40
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
4.1. ANÁLISE <i>in silico</i> DA PROTEÍNA TREALOSE-6-FOSFATO FOSFATASE (TPP) DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	42
4.1.1. ANÁLISE COMPARATIVA DA ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>otsA</i> E <i>otsB</i> NO GENOMA DE DIFERENTES ORGANISMOS.....	43
4.1.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA TPP DE <i>Herbaspirillum</i> <i>seropedicae</i> PREDITAS <i>in silico</i> .....	45
4.1.3. ESTUDO COMPARATIVO DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DA TPP DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	46
4.1.3.1. MODELO ESTRUTURAL COMPARATIVO DA TPP DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	50
4.2. CLONAGEM, SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TPP DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	58
4.2.1. AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>otsB</i> DE <i>H. seropedicae</i> .....	58
4.2.2. CLONAGEM DO GENE <i>otsB</i> NO VETOR pCR 2.1.....	59



4.2.3. SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>otsB</i> CONTIDO NO PLASMÍDEO pCR-OTSB.....	60
4.2.4. CLONAGEM DO GENE <i>OTSB</i> NO VETOR pET-28a.....	60
4.2.5. SUPEREXPRESSION DA PROTEÍNA TREALOSE-6-FOSFATO FOSFATASE.....	62
4.2.6. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TREALOSE-6-FOSFATO FOSFATASE.....	64
4.3. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA TPP DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	67
4.3.1. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE REAÇÃO DA TPP DE <i>H. seropedicae</i> .....	67
4.3.2. DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DE REAÇÃO DA TPP DE <i>H. seropedicae</i> .....	68
4.3.3. DETERMINAÇÃO DO $K_M$ DA TPP DE <i>H. seropedicae</i> .....	69
4.3.4. TERMOESTABILIDADE DA TPP DE <i>H. seropedicae</i> .....	70
4.3.5. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE $Mg^{2+}$ NA ATIVIDADE DA TPP DE <i>H. seropedicae</i> .....	71
5. CONCLUSÕES.....	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
APÊNDICE I.....	78

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MAPA DO BRASIL COM AS ÁREAS APTAS PARA O PLANTIO DA CANA-DE-AÇÚCAR, SEGUNDO O ZONEAMENTO AGROECOLÓGICO ELABORADO PELA EMBRAPA.....	19
FIGURA 2 - BIOSÍNTESE DA TREALOSE A PARTIR DE UDP-GLUCOSE E GLUCOSE-6-FOSFATO.....	22
FIGURA 3 - ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>otsA</i> E <i>otsB</i> NO GENOMA DE <i>H. seropedicae</i> .....	23
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA DE HIDRÓLISE DO <i>p</i> -NITROFENIL FOSFATO.....	38
FIGURA 5 - LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>otsB</i> NO GENOMA DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	42
FIGURA 6 - ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>otsA</i> E <i>otsB</i> NO GENOMA DE OUTROS ORGANISMOS.....	44
FIGURA 7 - COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA TPP DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	45
FIGURA 8 - MECANISMO DE REAÇÃO NO SÍTIO CATALÍTICO DAS FOSFATASES PERTENCENTES À SUPERFAMÍLIA HAD.....	46
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE UM TÍPICO DOMÍNIO HAD.....	47
FIGURA 10 - ESQUEMA GRÁFICO DO SÍTIO ATIVO DE FOSFOTRANSFERASES.....	49
FIGURA 11 - PREDIÇÃO E ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA TPP DE <i>H. seropedicae</i> .....	51
FIGURA 12 - TOPOLOGIA DA ESTRUTURA DA TREALOSE-6-FOSFATO FOSFATASE DE <i>Thermoplasma acidophilum</i> .....	52
FIGURA 13 - SIMULAÇÃO DA ACOMODAÇÃO DA MOLÉCULA DE TREALOSE-6-FOSFATO NA TPP DE <i>Thermoplasma acidophilum</i> .....	53
FIGURA 14 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS PRIMÁRIAS DA PROTEÍNA TPP DE <i>T. acidophilum</i> E <i>H. seropedicae</i> .....	54
FIGURA 15 - MODELO TRIDIMENSIONAL TEÓRICO DA PROTEÍNA TPP DE <i>H. seropedicae</i> .....	55

FIGURA 16 -ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA PROTEÍNA TPP DE <i>T. acidophilum</i> .....	56
FIGURA 17 -DETALHE DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS DO SÍTIO CATALÍTICO DA TPP DE <i>H. seropedicae</i> E DA TPP DE <i>T. acidophilum</i> .....	56
FIGURA 18 -SOBREPOSIÇÃO DOS MODELOS ESTRUTURAS DA TPP DE <i>H. seropedicae</i> E <i>T. acidophilum</i> .....	57
FIGURA 19 -ELETROFORESE DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>otsB</i> de <i>H. seropedicae</i> .....	58
FIGURA 20 -CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DO INSERTO NO VETOR pCR2.1.....	59
FIGURA 21 -PLASMÍDEO pCR-OTSB.....	59
FIGURA 22 -CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DO INSERTO NO VETOR pET28a.....	61
FIGURA 23 -PLASMÍDEO pET-OTSB.....	61
FIGURA 24 -PERFIL ELETROFORÉTICO EM SDS-PAGE 12% DE PROTEÍNAS DO EXTRATO DE CÉLULAS <i>E. coli</i> BL21 CONTENDO O PLASMÍDEO pET-OTSB, INCUBADAS A 30°C E 37°C. ....	62
FIGURA 25 -PERFIL ELETROFORÉTICO EM SDS-PAGE 12% DE PROTEÍNAS DO EXTRATO DE CÉLULAS <i>E. coli</i> BL21 CONTENDO O PLASMÍDEO pET-OTSB, INCUBADAS A 20°C.....	63
FIGURA 26 -PERFIL DE ELUIÇÃO DA PROTEÍNA HIS-TPP.....	64
FIGURA 27 -PERFIL ELETROFORÉTICO DE AMOSTRAS DA PROTEÍNA HIS-TPP APÓS PURIFICAÇÃO NA COLUNA DE <i>CHELATING SEPHAROSE</i> CARREGADA COM $Ni^{+2}$ .....	65
FIGURA 28 -PERFIL ELETROFORÉTICO DE AMOSTRAS DIALISADAS DA PROTEÍNA HIS-TPP.....	66
FIGURA 29 -EFEITO DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE REAÇÃO NA TPP DE <i>H. seropedicae</i> .....	68
FIGURA 30 -EFEITO DE DIFERENTES TAMPÕES E pHs NA ATIVIDADE DA TPP DE <i>H. seropedicae</i> . ....	68
FIGURA 31 -EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DA TPP DE <i>H. seropedicae</i> .....	69

FIGURA 32 - GRÁFICO DO DUPLO-RECÍPROCO.....	69
FIGURA 33 - PERDA DA ATIVIDADE DA TPP DE <i>H. seropedicae</i> DURANTE A REAÇÃO.....	70
FIGURA 34 - TERMOESTABILIDADE DA TPP DE <i>H. seropedicae</i> .....	71
FIGURA 35 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE Mg <sup>2+</sup> NA TPP DE <i>H. seropedicae</i> .....	71
FIGURA 36 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE Ca <sup>2+</sup> NA TPP DE <i>H. seropedicae</i> .....	72

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES DE BACTÉRIAS UTILIZADAS.....	26
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DOS PLASMÍDEOS UTILIZADOS.....	26
TABELA 3 - CONCENTRAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS.....	29
TABELA 4 - SEQUÊNCIA E CARACTERÍSTICAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS.....	32
TABELA 5 - SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES.....	36
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS PARA OS ENSAIOS DE EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	39
TABELA 7 - PROGRAMAS UTILIZADOS NA ANÁLISE <i>in silico</i> .....	41

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
Da	dalton
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleosídeos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
kb	quilopares de bases
kDa	quilodalton
Km	Canamicina
kV	quilovolts
LMP	baixo ponto de fusão ( <i>low melting point</i> )
ORF	região codificadora de proteína
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PIPES	<i>1,4-bis(ácido 2-etanosulfônico)piperazina</i>
pNP	<i>p</i> -nitrofenol
pNPP	<i>p</i> -nitrofenol fosfato
pI	ponto isoelétrico
RNA	ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
Sm	estreptomicina
Sm <sup>R</sup>	estreptomicina resistente
Tris	Tris hidróxi-metil-aminometano

## LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE I - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DO PLASMÍDEO pCR-OTSB CONTENDO O GENE *otsB* DE *H. seropedicae*.

## 1 INTRODUÇÃO

A importância da sustentabilidade está cada vez mais clara no cenário econômico atual. O mercado global está particularmente mais atento às questões relacionadas à produção de energias alternativas a partir da biomassa vegetal.

Neste aspecto, o cultivo de cana-de-açúcar tornou-se o principal foco para produção de biocombustível em larga escala, tendo o Brasil como líder mundial. Essa liderança e competitividade devem-se ao longo trabalho feito por pesquisadores em instituições de ensino e pesquisa e em empresas privadas, que resultou em uma valiosa bagagem de conhecimento e de tecnologia sobre a cana, seus derivados e sobre o processo de produção do etanol. Como resultado, a eficiência energética do etanol da cana-de-açúcar é muito superior ao do milho e da beterraba (MACEDO *et al.*, 2008).

As lavouras de cana-de-açúcar para produção de açúcar e etanol são bastante exigentes em clima. Segundo o Zoneamento Agrícola do Estado de São Paulo (IAC, 1974), a planta necessita encontrar condições térmicas e hídricas adequadas no período vegetativo, para permitir desenvolvimento satisfatório, mas também requer uma estação com acentuada restrição hídrica ou térmica, para enriquecimento em sacarose na época do corte.

Por este motivo, não são todas as regiões brasileiras que suportam o cultivo de cana, levando em conta os diferentes climas e ecossistemas, o que acaba prejudicando a potencial produção de etanol do país. O governo brasileiro está desenvolvendo um projeto, o ZAE-Cana, que visa avaliar a aptidão das regiões brasileiras para o plantio da cana-de-açúcar.

Neste contexto, verifica-se também o interesse em desenvolver variedades de cana-de-açúcar resistentes a estresse osmótico, por exemplo, através de técnicas de biologia molecular, para que futuramente regiões brasileiras menos favoráveis, de clima semi-árido, possam também alojar culturas desta planta de considerável interesse econômico.

Entre as estratégias utilizadas por diferentes grupos de pesquisa, encontra-se a aplicação de determinadas propriedades bioprotetoras dos açúcares, como por exemplo a trealose (GARG *et al.*, 2002; KARIM *et al.*, 2007; GE *et al.*, 2008). Tais



estudos mostraram que o acúmulo deste dissacarídeo nas células vegetais, através da superexpressão dos genes da via biossintética da trealose de outros organismos, resultou em uma maior resistência a estresse osmótico.

Este trabalho inicia a caracterização dos genes da via de biossíntese de trealose em *Herbaspirillum seropedicae*, uma bactéria endofítica. Os genes *otsA* e *otsB* codificam respectivamente a trealose-6-fosfato sintase (TPS) e trealose-6-fosfato fosfatase (TPP) ambos envolvidos na biossíntese de trealose a partir de glucose-6-fosfato e UDP-glucose. Uma vez concluído, o estudo permitirá uma melhor compreensão da potencialidade e eficiência das enzimas deste organismo envolvidas na produção final do dissacarídeo. Para tanto, torna-se necessário isolar e expressar os genes *otsA* e *otsB*, para posterior purificação das enzimas e execução dos respectivos ensaios de atividade. Uma vez confirmada a função das proteínas TPP e TPS de *H. seropedicae*, os genes poderão ser introduzidos em células vegetais, aumentando a concentração de trealose intracelular, esperando que este aumento promova sua ação protetora ao estresse hídrico.

O foco deste trabalho será inicialmente dirigido para a enzima trealose-6-fosfato fosfatase (TPP).

## 1.1 CENÁRIO ECONÔMICO ATUAL

Em resposta à rápida elevação dos preços do petróleo, em meados dos anos 1970, o Brasil lançou uma iniciativa global que visava à diminuição da dependência da energia importada, tornando-se hoje praticamente autossuficiente no setor energético. Parte essencial da estratégia brasileira na área foi a utilização de etanol a partir da cana-de-açúcar no setor de transportes em substituição às importações de petróleo.

Desta forma, o Brasil se tornou exemplo internacional no uso de energia renovável, pois enquanto a média mundial atual é de apenas 12,6% do consumo total, no Brasil esse índice chega a quase 46%. Vale destacar ainda que a utilização do etanol como fonte de energia renovável nos últimos 30 anos evitou a emissão de 850 milhões de toneladas de CO<sub>2</sub> na atmosfera (BRASIL. SECRETARIA DE IMPRENSA E DE COMUNICAÇÃO SOCIAL. Brasília, 2009).

A tecnologia própria permitiu que todos os equipamentos empregados nas usinas e destilarias, assim como as máquinas usadas na colheita fossem produzidos e desenvolvidos no País. Além disso, o Brasil possui a maior frota de automóveis *flex-fuel* e o maior e mais bem sucedido programa de substituição de combustíveis fósseis por combustíveis renováveis. Tudo isso fez da pesquisa de biocombustíveis no Brasil uma referência mundial. Ainda assim, o País tem um enorme potencial para a expansão da oferta de energia renovável.

## 1.2 DISTRIBUIÇÃO DO PLANTIO DE CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o segundo maior produtor de etanol, uma vez que os Estados Unidos suplantaram a produção brasileira de etanol combustível em 2006. Em 2008, a área plantada com cana no Brasil superou 7 milhões de hectares, com uma produtividade de mais de 81.000 kg por hectare (CONAB, 2008). A produção de cana de açúcar concentra-se na região Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, com aproximadamente 90% da produção anual. Já a tradicional região produtora do Nordeste do país responde hoje por pouco mais de 10% da produção nacional. O estado de São Paulo destaca-se como maior produtor do país, com aproximadamente 60% da produção nacional de cana de açúcar e de etanol. O plantio de cana em São Paulo chegou a ocupar mais de 3,8 milhões de hectares na safra 2008, segundo dados da CONAB.

Nos últimos anos, o chamado setor sucroalcooleiro obteve rápido crescimento, atingindo na última safra um montante de matéria-prima 13,9% maior que na safra passada. Relativo à produção de açúcar o aumento foi de 2,6%, enquanto que referente ao álcool houve um significativo aumento de 15,7%.

Estes números confirmam a tendência de crescimento na produção de álcool, muito acima do que é observado para o açúcar. Este fato corresponde à demanda crescente de etanol combustível como fonte energética, tanto no mercado interno, influenciado pelo sucesso dos veículos *flex-fuel* lançados em 2003, quanto pela exportação, sobretudo para os Estados Unidos, União Européia e Japão, devido a políticas de estímulo do uso do etanol em substituição parcial da gasolina.

Em consequência destas mudanças observadas nos mercado nacional e internacional, este ano o Ministério brasileiro do Meio Ambiente estimou que até 2017, a área cultivada com a cana no país crescerá em 5 milhões de hectares, chegando aos 12 milhões, possibilitando assim atingir a meta do aumento de 11% ao ano de produção de etanol, conforme estabelecido no Plano Nacional de Mudanças Climáticas criado pelo governo brasileiro. A expectativa do governo é que o Brasil dobre a área atual de cultivo da cana até 2020.

No entanto, vale ressaltar que nem todas as regiões brasileiras são passíveis de receber plantio da cana-de-açúcar, pois o cultivo exige condições térmicas e hídricas específicas, especialmente visando o etanol como produto final. Então, para direcionar esse elevado crescimento de área de plantio de cana, o governo planeja utilizar como instrumento o ZAE-Cana.

### 1.3 ZAE-CANA: UM INSTRUMENTO DE ORDENAMENTO DA EXPANSÃO CANAVIEIRA

O ZAE-Cana trata-se de um projeto coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e executado sob a liderança da Embrapa, com a participação ativa do Ministério do Meio Ambiente. O governo federal realiza o Zoneamento Agroecológico da Cana-de-Açúcar com o propósito de estabelecer as condições necessárias para a sustentabilidade da produção de etanol no País.

O objetivo deste projeto é avaliar a aptidão das regiões brasileiras para o plantio da cana-de-açúcar através de um criterioso estudo do clima e do solo, levando em consideração os aspectos ambientais, econômicos e sociais. A partir deste estudo a orientação do governo é de que o País não utilize mais que 7,5% do seu território para o plantio da cana, como mostra o mapa da FIGURA 1.

Para orientar a expansão sustentável da produção de cana, alguns critérios foram estabelecidos. Primeiramente, a produção só será permitida nas áreas onde a colheita possa ser mecanizada, o que eliminará a possibilidade de novas queimadas. Foram indicadas áreas com potencial agrícola onde a irrigação seja a menor possível, o que proporcionará economia de água e energia. Foi proibida a supressão de vegetação nativa, portanto a implantação de novos projetos ocorrerá

em áreas antropizadas, em especial as de pecuária. E por fim, um dos fatores primordiais é que a Amazônia, Pantanal e a bacia do Alto Paraguai não poderão ser utilizadas para a expansão do cultivo de cana.

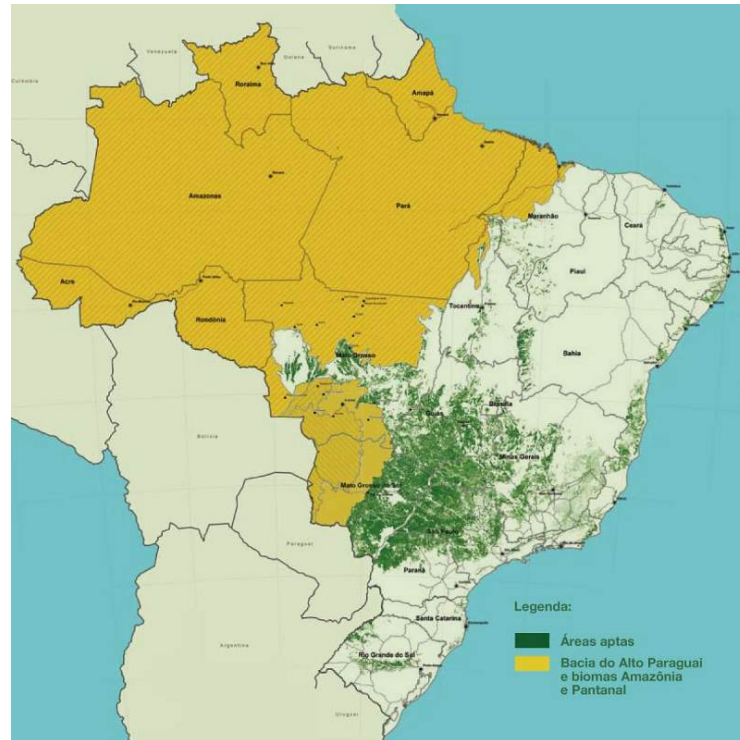


FIGURA 1. MAPA DO BRASIL COM AS ÁREAS APTAS PARA O PLANTIO DA CANA-DE-AÇÚCAR, SEGUNDO O ZONEAMENTO AGROECOLÓGICO ELABORADO PELA EMBRAPA. Fonte: Embrapa

Atualmente, a cana-de-açúcar é cultivada em menos de 1% do território nacional (aproximadamente 7 milhões de hectares), enquanto que a pecuária abrange mais de 170 milhões de hectares. De acordo com o Ministério da Agricultura, até 64,7 milhões de hectares poderão ser usados para o plantio da cana sem que isso represente prejuízo ambiental. Portanto, apesar de 92,5% do território nacional não estar incluído na expansão canavieira, existem 40 milhões de hectares a serem utilizados em áreas de pastagens degradadas, e outros 4 milhões de hectares hoje dedicados a pecuária e lavouras.

O objetivo final do ZAE-Cana é garantir que o Brasil continue crescendo sem perder suas riquezas, aproveitando ao máximo o fato de possuir uma avançada tecnologia agrícola tropical.

#### 1.4 CARACTERÍSTICAS DA CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é classificada como uma planta de clima semi-tropical, cuja cultura se estende por todo o período do ano. Nesse aspecto, difere das culturas anuais de ciclo curto, como as de arroz, algodão, trigo, batata, entre outras, que são influenciadas pelas características climáticas dos diferentes períodos do ano. Entretanto, as exigências climáticas da lavoura canavieira podem diferir bastante segundo a finalidade: açúcar de usina, aguardente ou forragem.

As lavouras para produção de açúcar são mais exigentes em clima, pois há necessidade de alta produção de sacarose e, para obtê-la, a planta necessita de condições térmicas e hídricas adequadas no período vegetativo, para permitir desenvolvimento satisfatório da planta. É também fundamental que exista uma estação de repouso com acentuada restrição hídrica ou térmica, para forçar repouso da planta e enriquecimento em sacarose para a época do corte (IAC, 1974).

Dessa forma, para evitar os efeitos de um período hibernal rigoroso, que reduza demasiadamente a estação vegetativa, a cultura açucareira costuma estar restrita à zona intertropical, com poucas penetrações em áreas de latitudes mais elevadas da zona subtropical. Seria suficiente que em alguns meses do ano, a temperatura caísse abaixo de 15°C, para que se tivesse de recorrer a variedades precoces e resistentes ao frio (IAC, 1974).

Especificamente no estado de São Paulo, encontram-se as mais variadas condições e restrições climáticas para a lavoura canavieira. Certas áreas possuem clima que pode ser considerado ideal, sem restrição alguma. Outras apresentam restrições, térmicas ou hídricas, mas em geral moderadas, que permitem a atividade em condições econômicas, sem exigir recursos e técnicas agronômicas especiais.

Fatores diversos podem influenciar a maturação da cana, o rendimento de sacarose e a presença de glucose no caldo, mas são dois os principais fatores climáticos: baixa temperatura e umidade.

A queda da temperatura média diária abaixo de determinados limites reduz substancialmente o crescimento da cana e a ausência de estação seca também prejudica o acúmulo de sacarose, pois com o consumo de produtos assimilados no

processo de crescimento, sobram menos desses produtos para serem armazenados na haste da cana.

Apesar disso, quando a deficiência hídrica excede determinados limites, pode afetar seriamente o desenvolvimento e a produtividade do canavial. Vários fatores influenciam o estabelecimento deste limite, mas uma vez ultrapassado, as deficiências passam a ser prejudiciais à lavoura canavieira e a exigir correção pela irrigação suplementar, de elevado custo.

Desta forma, verifica-se um interesse em buscar soluções para aumentar a resistência das lavouras de maior interesse econômico frente a condições ambientais adversas. Alguns grupos de pesquisa da área de biotecnologia agrícola desenvolveram estudos em busca de moléculas que proporcionassem um efeito bioprotetor às plantas. Entre as estratégias utilizadas encontra-se a aplicação de determinadas propriedades bioprotetoras dos açúcares (GARG *et al*, 2002; KARIM *et al*, 2007; GE *et al*, 2008).

## 1.5 AÇÚCARES NÃO REDUTORES: MOLÉCULAS BIOPROTETORAS

Os açúcares possuem um papel fundamental na manutenção da vida. Sua natureza versátil lhes possibilita atuar em diferentes funções centrais na célula, como no fornecimento e estoque energético, na arquitetura celular, na comunicação intra e intercelular e na integração do metabolismo.

Uma classe de açúcares são os não redutores. Estes açúcares, como a sacarose e a trealose, são fonte de energia solúvel na forma de moléculas estáveis e são também conhecidos por possuírem propriedades bioprotetoras.

A trealose é um dissacarídeo não redutor formado a partir de UDP-glucose e glucose-6-fosfato, numa ligação  $\alpha(1\rightarrow1)$ , pela ação das enzimas trealose-6-fosfato sintase (TPS) e trealose-6-fosfato fosfatase (TPP) (FIGURA 2).

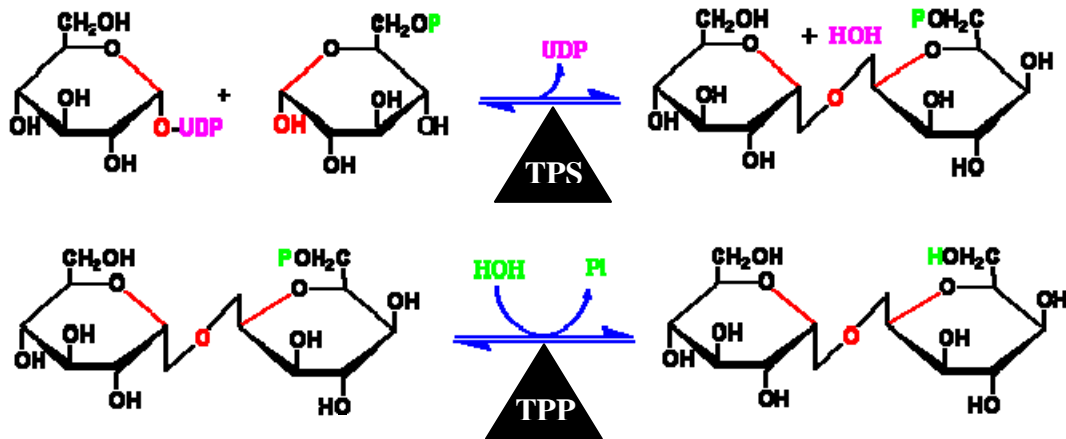


FIGURA 2. BIOSÍNTESE DA TREALOSE A PARTIR DE UDP-GLUCOSE E GLUCOSE-6-FOSFATO. A enzima TPS catalisa a reação de condensação de UDP-glucose e glucose-6-fosfato através da formação de uma ligação O-glicosídica, gerando a trealose-6-fosfato. A enzima TPP promove a hidrólise do fosfato da trealose-6-fosfato, gerando a molécula de trealose.

Apesar de ser estruturalmente similar à sacarose, a trealose possui maior estabilidade em altas temperaturas e pH ácido, além de possuir elevada solubilidade em água, hidrólise lenta, baixa higroscopicidade e alta temperatura de transição vítrea (PAUL *et al.*, 2008) Devido a estas características, é muito utilizada na indústria cosmética e alimentícia, mas possui também aplicações na agronomia. A sua importância para o fenótipo celular reside no fato de proporcionar resistência a possíveis situações de estresse osmótico, pois interage com proteínas, lipídeos e outras macromoléculas, estabilizando a sua conformação (PAUL *et al.*, 2008).

A capacidade de sintetizar trealose é amplamente distribuída entre os seres vivos, estando presente em todos os reinos, desde procaríotos até plantas e animais, exceto em vertebrados. A quantidade de trealose produzida e utilizada, entretanto, varia de espécie para espécie. Artrópodes a utilizam como ponto inicial na construção do exoesqueleto quitinoso, sendo o principal açúcar encontrado na sua circulação sanguínea (MERZENDORFER; ZIMMICH, 2003). Já nas plantas, apesar de terem a capacidade única de sintetizar trealose e sacarose, encontram-se poucos traços de trealose, em concentrações de micromolares ou menor, exceto naquelas originárias de desertos que podem conter concentrações de milimolares do açúcar para protegê-las do estresse osmótico (PAUL *et al.*, 2008).

A principal razão para as plantas utilizarem preferencialmente a sacarose é a elevada solubilidade deste dissacarídeo, compatível com as altas concentrações

encontradas no floema, e a habilidade de liberar UDP-Glucose diretamente da sacarose sob ação da sacarose sintase, podendo então ser utilizada na formação da parede celular (PAUL *et al.*, 2008).

As plantas podem acumular outros compostos bioprotetores além da trealose, como a sacarose, frutana e oligossacarídeos da família da rafinose (LEYMAN *et al.*, 2001). A sacarose torna-se vantajosa por não estar tão prontamente disponível como fonte energética para patógenos, pois alguns deles não possuem a invertase, garantindo assim maior proteção (WINGLER, 2002).

Apesar dos aparentes prejuízos que altas concentrações de trealose podem trazer às plantas, estudos mostraram que superexpressando genes da via biossintética da trealose de outros organismos em vegetais, há um acúmulo do dissacarídeo nas células levando a uma maior resistência a estresse osmótico (GARG *et al.*, 2002; KARIM *et al.*, 2007; GE *et al.*, 2008).

## 1.6 PRODUÇÃO DE TREALOSE EM *Herbaspirillum seropedicae*

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foi o organismo modelo escolhido para a realização deste trabalho. É um microrganismo diazotrófico, gram-negativo, pertencente à subdivisão  $\beta$  das proteobactérias e capaz de colonizar gramíneas. Como muitos outros microrganismos, esta bactéria também possui os genes necessários para a biossíntese da trealose em seu genoma (PROGRAMA GENOPAR): o *otsA*, codificando a trealose-6-fosfato sintase (TPS) e o *otsB*, codificando a trealose-6-fosfato fosfatase (TPP) (FIGURA 3).



FIGURA 3. ORGANIZAÇÃO DOS GENES *otsA* E *otsB* NO GENOMA DE *H. seropedicae*. *putP*: gene de proteína de simporte de Na<sup>+</sup>/prolina; *hp*: proteína hipotética.



A organização destes genes no genoma de *H. seropedicae*, representada pela Figura 3, é bastante similar à de outros organismos, principalmente entre as proteobactérias, e será discutida em maiores detalhes na seção de resultados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto foi caracterizar a enzima trealose-6-fosfato fosfatase de *Herbaspirillum seropedicae*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

• Buscar e identificar o gene *otsB* de *H. seropedicae* com base no banco de dados do Programa GENOPAR e através de análises de homologia;

• Clonar o gene *otsB* em vetor de superexpressão e superexpressá-lo em *E. coli*;

• Purificar por meio de métodos cromatográficos a proteína TPP (trealose-6-fosfato fosfatase) para posterior caracterização enzimática;

• Caracterizar a trealose-6-fosfato fosfatase com ferramentas *in silico* para melhor entendimento de sua função.

• Realizar ensaios preliminares de caracterização da atividade enzimática, determinando as condições ótimas de reação.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As estirpes de bactérias e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados nas TABELAS 1 e 2.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES DE BACTÉRIAS UTILIZADAS.

<i>Escherichia coli</i>	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA/FONTE
TOP10	Estirpe de manutenção de plasmídeos recombinantes. Mutante em genes de recombinação e endonuclease [ <i>recA</i> - <i>endA</i> -] Sm <sup>R</sup>	INVITROGEN
BL21 (λDE3)	Estirpe de expressão gênica a partir do promotor T7. Possui o gene da T7 RNA polimerase regulado por um promotor <i>lac</i> [ <i>dcm</i> λ(DE3)]	NOVAGEN
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA/FONTE
SmR1	Estirpe tipo Z78 Sm <sup>R</sup> , Nif+	MACHADO <i>et al.</i> , 1996

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DOS PLASMÍDEOS UTILIZADOS.

PLASMÍDEOS	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA/FONTE
pCR2.1	Vetor de clonagem/ promotor <i>lac</i> . Km <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup> .	Invitrogen
pET28a	Vetor de expressão/ promotor T7. Gera proteína de fusão com His-Tag N- terminal. Km <sup>R</sup>	Novagen
pCR-OTSB	pCR2.1 contendo o gene <i>otsB</i> de <i>H. seropedicae</i> . Km <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup> .	Este trabalho
pET-OTSB	pET28a contendo o gene <i>otsB</i> de <i>H. seropedicae</i> no sítio de policlonagem. Km <sup>R</sup>	Este trabalho

### 3.2. REAGENTES

Lisozima, Tris base, glicerol, SDS, acrilamida, bis-acrilamida, persulfato de amônio, TEMED, e os antibióticos foram adquiridos da Sigma Chemical Company. Fenol, ágar e agarose foram adquiridos da Invitrogen (Life-Technologies). EDTA, NaCl, NaOH, etanol, metanol, ácido acético, isopropanol, clorofórmio e álcool isoamílico foram adquiridos da Merck ou Reagen. As enzimas modificadoras de DNA e RNase foram adquiridas da GE Healthcare, Gibco-BRL (Life-Technologies) ou New England Biolabs. Extrato de levedura, triptona e ágar bacteriológico foram adquiridos da Merck e Biobrás. Os demais reagentes utilizados foram provenientes de diversas fontes, todos sendo reagentes analíticos.

### 3.3. MEIOS DE CULTURA

#### 3.3.1. Meios empregados para o cultivo de *H. seropedicae*

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFb malato líquido (Machado *et al.*, 1996), cuja composição segue abaixo:

	CONCENTRAÇÃO FINAL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 x 10 <sup>-1</sup> g/L
NaCl	1 x 10 <sup>-1</sup> g/L
CaCl <sub>2</sub>	2 x 10 <sup>-2</sup> g/L
Ácido nitrilo-triacético (NTA)	5,6 x 10 <sup>-2</sup> g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 x 10 <sup>-2</sup> g/L
Biotina	1 x 10 <sup>-4</sup> g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1 g/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,175 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,4 g/L
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	4 x 10 <sup>-2</sup> g/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,2 x 10 <sup>-1</sup> g/L
Malato	5 g/L

No momento do inóculo foram adicionados 50 mmol/L de solução de fosfatos ( $K_2HPO_4$  17,8 g/L;  $KH_2PO_4$  159,5 g/L), e 20 mmol/L de cloreto de amônio. A mistura de fosfato e a solução de cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio frio no momento do uso. Quando completo, o meio de cultura apresenta pH 6,8 e é denominado NFbHPN malato.

### 3.3.2 Meios empregados para o cultivo de *E. coli*

Os meios de cultura utilizados no cultivo das estirpes de *E. coli* foram: Luria-Bertani Broth (LB), SOB e SOC.

O meio LB (SAMBROOK et al., 1989) apresenta a seguinte composição:

	CONCENTRAÇÃO FINAL
Triptona	10 g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L

O meio sólido LA é obtido a partir da adição de ágar na concentração de 15 g/L ao meio líquido LB.

Para preparo de células eletrocompetentes as estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio SOB (SAMBROOK et al., 1989). Este meio apresenta a seguinte composição:

	CONCENTRAÇÃO FINAL
Extrato de levedura	5 g/L
Triptona	20 g/L
NaCl	0,6 g/L
KCl	0,186 g/L

O pH é ajustado para 7 com NaOH 2 mol/L. O meio SOC é obtido com a adição de glucose 3,6 g/L,  $MgCl_2$  0,94 g/L e  $MgSO_4$  1,2 g/L ao meio SOB.

### 3.4. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados, as concentrações das soluções estoque e suas concentrações de uso estão na TABELA 3.

TABELA 3 – CONCENTRAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS.

ANTIBIÓTICOS	SOLUÇÃO ESTOQUE (mg/mL)	CONCENTRAÇÃO FINAL (µg/mL)
Ampicilina (Amp)	250	250
Canamicina (Km)	100	100
Streptomicina (Sm)	80	80

As soluções estoques de antibióticos foram preparadas em água destilada autoclavada e esterilizadas por filtração (Millipore HAWP 0,45µm). Todas as soluções de antibióticos foram mantidas a -20°C.

### 3.5. CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido LB, SOB, ou SOC, a temperatura de 37°C e agitação (120 rpm). Para cultivo de *E. coli* em meio sólido foi utilizado o meio de cultivo LA a 37°C. O cultivo de *H. seropedicae* foi realizado em meio líquido NFbHPN malato, mantido a 30°C e sob agitação (120 rpm). Para cultivo de bactérias em meio líquido foi sempre mantida a relação de 1/5 de volume de meio para o volume total do frasco. Esta relação é utilizada para manutenção da aeração durante o crescimento.

### 3.6. ARMAZENAMENTO DAS BACTÉRIAS

Estoques das estirpes de *E. coli* foram preparados centrifugando-se 1 mL de cultura saturada por 1 minuto a 13000 rpm. O sedimento de células obtido foi ressuspenso em 1 mL de glicerol 50% e conservado a -20°C. As células também foram mantidas em meio sólido a 4 °C.

### 3.7. PURIFICAÇÃO DE DNA TOTAL DE *Herbaspirillum seropedicae*

A técnica de purificação do DNA total de *H. seropedicae* foi modificada daquela descrita por SOUZA (1991). Dez mililitros de cultura de *H. seropedicae* (D.O.<sub>600</sub>  $\cong$  2,0) crescida em meio NFbHPN, contendo 80  $\mu$ g/mL de streptomicina foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos, a 4°C. As células foram lavadas com 500  $\mu$ L do tampão TES (Tris-HCl 50 mmol/L pH8,0; EDTA 20 mmol/L pH 8,0; NaCl 200 mmol/L) e ressuspendidas em 500  $\mu$ L do mesmo. A lise celular foi obtida com adição da enzima lisozima (100  $\mu$ g/mL) e incubação a 30°C, durante 15 minutos. Para completar a lise das células, foi adicionado o detergente SDS na concentração final de 1% (m/v), e a mistura incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. A degradação das proteínas foi feita adicionando-se Pronase E (500  $\mu$ g/mL) seguida de incubação a 37°C por 16 horas. A mistura foi extraída uma vez com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e duas vezes com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após a extração, o DNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 80%, seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 200 $\mu$ L de água ultra-pura autoclavada.

### 3.8. PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DE *E. coli*

A extração dos plasmídeos das células de *E. coli* Top10 foi realizada segundo o método de lise alcalina modificado de SAMBROOK *et al.* (1989). Depois da purificação, o plasmídeo foi analisado por eletroforese (agarose 0,8% em TBE1X).

### 3.9. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

#### 3.9.1. Preparo de células competentes para eletroporação

Para o preparo de células eletrocompetentes, duzentos e cinquenta mililitros de meio líquido LB foram inoculados com 3 mL de uma cultura de *E. coli* cultivada

durante 12 horas. A cultura foi incubada a 37°C sob agitação até atingir uma D.O.<sub>600</sub> entre 0,5 e 1,0. A cultura foi mantida em gelo durante 30 minutos e em seguida transferida para tubos estéreis e centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos. As células foram então lavadas sequencialmente com 30 mL de água estéril gelada e posteriormente, com 10 mL de glicerol 15% (v/v) estéril. Após centrifugação o sedimento de células foi ressuspensão em 0,5 a 1 mL de glicerol 10% e a suspensão aliquoteada em tubos e armazenada a -70°C.

### 3.9.2. Transformação bacteriana

Para transformação bacteriana 50 ng do plasmídeo purificado ou da mistura da ligação vetor/DNA inserto foi adicionado a 40 µL da suspensão de células eletrocompetentes e a mistura foi incubada em gelo por 1 minuto. Essas células foram transferidas para uma câmara de eletroporação e submetidas a um único pulso elétrico de aproximadamente 2,5 kΩ por 6 mili-segundos. Após o pulso elétrico, a mistura foi transferida para um frasco estéril contendo 1 mL de meio SOC e incubada a 37°C por cerca de 30 minutos para recuperação. Alíquotas da suspensão foram plaqueadas em meio LA contendo o antibiótico adequado.

## 3.10 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA O GENE *otsB* DE *Herbaspirillum seropedicae*

A sequência do gene *otsB* de *H. seropedicae* foi obtida do PROGRAMA GENOPAR ([www.genopar.org](http://www.genopar.org)). Oligonucleotídeos iniciadores com sítios de restrição para NdeI e HindIII introduzidos para posterior clonagem, foram desenhados para amplificar a região desejada. Os oligonucleotídeos foram analisados com o auxílio do programa OligoAnalyzer® 3.1., o qual forneceu as características descritas na TABELA 4.



TABELA 4 – SEQUÊNCIA E CARACTERÍSTICAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS.

Nome do oligonucleotídeo	OtsB FORWARD	OtsB REVERSE
Sequência	5'- CAAAACATATGACTGAGCAAAC -3'	5'- GCCAAGCTTACGGTTATCC -3'
Comprimento	21 nucleotídeos	19 nucleotídeos
Conteúdo GC	42,9%	52,6%
Temperatura de fusão (MT)	51,3 °C	53,5 °C
Dímero mais estável	5' CAAAACATATGACTGAGCAAAC :       : 3' CAAACGAGTCAGTATACAAAAC	5' GCCAAGCTTACGGTTATCC :           : 3' CCTATGGCATTTCGAACCG
$\Delta G^\circ$ do dímero mais estável	-7,82 kcal/mol	-10,23 kcal/mol
Sítio de restrição inserido	NdeI: CATATG	HindIII: AAGCTT
Heterodímero mais estável	5' GCCAAGCTTACGGTTATCC     : :: 3' CAAACGAGTCAGTATACAAAAC	
$\Delta G^\circ$ do heterodímero mais estável	-4,74 kcal/mol	

### 3.11 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *otsB* DE *Herbaspirillum seropedicae*

A amplificação do DNA foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) como descrito por KOCHER e WILSON (1991) utilizando os oligonucleotídeos sintetizados quimicamente. Para a reação de amplificação foram utilizados: tampão de PCR (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,4 e 50 mmol/L KCl), 0,2 mmol/L dNTPs, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0,75 µL de DMSO, aproximadamente 10 ng de DNA molde e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase em um volume final de reação de 20 µL. Diferentes condições foram testadas no decorrer das amplificações, entre elas: (I) variação de MgCl<sub>2</sub> de 0,5-3 mmol/L; (II) variação da quantidade de oligonucleotídeos, de 5-50 pmol; (III) presença ou ausência de

DMSO; (IV) diferentes DNA polimerases termo estáveis (*Taq* DNA polimerase - purificada em nosso laboratório, *Taq* DNA Polymerase – Fermentas). Também foram testados vários parâmetros para os ciclos de amplificação, incluindo diferentes temperaturas de anelamento e tempo de extensão, e diversos gradientes de temperatura.

### 3.12 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

As amostras de DNA foram diluídas em 0,5 V de F<sub>suds</sub> (Tris-HCl 65 mmol/L pH 8,0, EDTA 1,75mmol/L, Ficoll ® 10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,025) e aplicadas em gel de agarose (1 %), em tampão TBE 1X (Tris base 10,8 g/L, ácido bórico 5,5 g/L e EDTA 0,5 mol/L pH 8,0, 4 ml/L,). A corrida eletroforética foi realizada sob voltagem constante de 60 V, utilizando-se o sistema horizontal HE33 da Höeffer (Amersham Biosciences).

Após a eletroforese, os géis foram corados com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados em sistema UVP (BioImaging Systems).

### 3.13 LIGAÇÃO DO FRAGMENTO DE PCR NO VETOR pCR 2.1

Na reação de ligação, foram utilizados 10 ng do vetor pCR 2.1 (Invitrogen), comercializado na forma linear, e 5 µL do produto de amplificação. A reação de ligação foi realizada em presença de 1U de T4 DNA ligase e tampão T4 DNA ligase 1x (66mmol/L Tris-HCl pH 7,6, 6,6 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10mmol/L DTT, 66 µmol/L ATP) e incubada a 16°C durante a noite. O produto da reação foi eletrotransformado em *E. coli* Top 10.

As bactérias transformadas foram selecionadas pela resistência aos antibióticos canamicina (100 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL) e também através do cultivo em meio sólido com x-gal (40 µg/mL). Os plasmídeos foram extraídos pela técnica de purificação plasmidial por lise alcalina e analisados por clivagem com as enzimas de restrição EcoRI e posteriormente NdeI e HindIII. O plasmídeo recombinante contendo o gene *otsB* de *H. seropedicae* foi denominado pCR-OTSB.

### 3.14 SEQUENCIAMENTO DE DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia utilizando didesoxirribonucleotídeos (SANGER *et al.*, 1977) e um sequenciador automático de DNA (Applied Biosystems modelo 377). Neste sistema quatro didesoxinucleotídeos fluorescentes são utilizados como terminadores de cadeia, seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção a Laser. As reações de sequenciamento são realizadas utilizando o sistema ET terminator (GE Healthcare), e os parâmetros de amplificação são definidos de acordo com os iniciadores utilizados. Como DNA molde para as reações de sequenciamento foram utilizados plasmídeos purificados. Os plasmídeos molde para sequenciamento foram purificados como descrito no item 3.8, mas com a adição de RNase 10µg/mL, incubando por 2 horas a 37°C. Cerca de 200 a 500 ng de DNA plasmidial foram utilizados nas reações de sequenciamento. Após a reação, a mistura foi precipitada com etanol absoluto e acetato de amônio. O precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 70% e após secagem a vácuo, permaneceu armazenado a -20° até o momento do sequenciamento.

### 3.15 CLIVAGEM DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

A digestão do DNA foi feita segundo protocolo descrito por SAMBROOK *et al.* (1989) ou especificado pelo fabricante. Uma a cinco unidades das diferentes enzimas de restrição foram utilizadas para digestão de 0,2 – 1 µg de DNA, em um volume de 20 a 100 µL durante a noite em tampão e temperatura adequados para cada enzima. Após incubação, o DNA foi incubado a 80°C para inativação das enzimas e então precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 80% e seco a vácuo. O precipitado foi dissolvido em 5 a 10 µL de água ultra purificada estéril. A clivagem foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TBE 1X).

### 3.16 ISOLAMENTO DO INSERTO CONTENDO O GENE *otsB*

O plasmídeo pCR-OTSB foi digerido com as enzimas NdeI e HindIII, para liberação do inserto contendo o gene *otsB*. O DNA digerido foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose a baixo ponto de fusão (LMP 0,8% em TAE 1X). A banda de gel LMP contendo o fragmento do tamanho esperado foi cortada e submetida a purificação utilizando o kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (Amersham Pharmacia Biotech).

### 3.17 LIGAÇÃO DO INSERTO AO VETOR pET 28a

O vetor pET-28a foi digerido com as mesmas enzimas que o plasmídeo pCR-OTSB (NdeI e HindIII). O vetor linearizado foi incubado com o fragmento purificado do gene *otsB* a 16°C durante 4 a 8 horas, na presença de 1U de T4 DNA ligase e tampão T4 DNA ligase 1x (66 mmol/L Tris-HCl pH 7,6, 6,6 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L DTT, 66 μmol/L ATP). Após a reação, 2 μl da mistura foram utilizados para a eletroporação da estirpe TOP10 de *E.coli*. As bactérias transformadas foram selecionadas pela resistência ao antibiótico canamicina (100 μg/mL). Os plasmídeos foram extraídos pela técnica de purificação plasmidial por lise alcalina e analisados por clivagem com enzimas de restrição. O plasmídeo recombinante contendo o gene *otsB* foi denominado pET-OTSB.

### 3.18 ELETROFORESE SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes foi realizada em gel de poliacrilamida como descrito por LAEMMLI (1970). A concentração do gel de separação foi de 12% (m/v) e o sistema utilizado foi tris-glicina. As soluções estoque utilizadas estão descritas na TABELA 5, abaixo:

TABELA 5 – SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES.

<b>ACRILAMIDA</b>	30% Acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 37,5:1)	Armazenada a 4°C
<b>SOLUÇÃO 2</b>	1,5 M Tris-HCl pH8,8; 0,3% SDS	Armazenada a 4°C
<b>SOLUÇÃO 3</b>	0,5 M Tris-HCl pH6,8; 0,4% SDS	Armazenada a 4°C
<b>10% PA</b>	Persulfato de amônio 10% v/v em água	Armazenada a 4°C
<b>TAMPÃO DE AMOSTRA</b>	2% SDS 10%glicerol; 0,01% azul de bromofenol; 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8; 5% β-mercaptoetanol	Armazenada a 4°C
<b>TAMPÃO DE CORRIDA (10X)</b>	30 g Tris-base, 140 g Glicina 10 g SDS por litro	Armazenado a temperatura ambiente

As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical Mini Protean 3 Cell seguindo recomendação do fabricante (BioRad). As corridas foram realizadas a 180V em tampão de corrida 1X durante um intervalo de 1 a 2 horas, dependendo do tamanho da amostra. Após a corrida o gel foi corado com azul brilhante de Coomassie R-250 0,05% (m/v) e descorado com uma mistura de metanol:ácido acético:água (5/1/4, v/v/v) para a visualização das bandas de proteínas.

### 3.19 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TREALOSE-6-FOSFATO FOSFATASE (TPP) DE *H. seropedicae* EM *E. coli*

Dez mililitros de meio LB foram inoculados na proporção de 1/100 com uma cultura de *E. coli* estirpe BL21 ( $\lambda$ DE3) cultivada durante a noite e transformada com o plasmídeo pET-OTSB. As células foram incubadas a 37°C sob agitação constante (120 rpm) até atingirem uma D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 0,4. Neste ponto, foi adicionado IPTG na concentração final de 0,5 mmol/L ou lactose 0,5% (m/v). A seguir, as culturas continuaram incubadas sob agitação constante a 37°C ou a temperaturas menores por um período de 4 a 16 horas, dependendo da temperatura de incubação. Como controle negativo, incubou-se uma cultura das células sem a presença de qualquer agente indutor por três horas. Após indução as células foram coletadas por centrifugação (13000 rpm por 1 minuto a 4°C). Para análise das proteínas, o sedimento de células foi ressuspensão em 400  $\mu$ L de tampão S (50 mmol/L Tris.HCl pH 8,0, 200 mmol/L NaCl) acrescido com 0,5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, e as

células foram lisadas por sonicação por 2 minutos em ciclos de 20 segundos seguidos de 1 minuto de intervalo, no gelo, utilizando um sonicador (Heat System) equipado com uma micropona. Após a lise, a mistura foi centrifugada a 13000rpm por 5 minutos a 4°C. As frações solúveis e insolúveis foram analisadas através de separação eletroforética em géis de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) segundo LAEMMLI (1970), assim como a proteína total.

### 3.20 PURIFICAÇÃO DA TPP-HIS DE *H. seropedicae*

O plasmídeo pET-OTSB, contendo o gene *otsB* de *H. seropedicae* clonado no vetor pET28a, foi utilizado para superexpressar a proteína de fusão TPP-His com uma sequência de aminoácidos contendo 6 resíduos de histidinas na porção N-terminal (sequência HisTag). Para purificação dessas proteínas, 1000 mL de uma cultura de *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) transformada com o plasmídeo pET-OTSB foi induzida como descrito no item anterior nas condições que resultaram em uma maior solubilidade da proteína (IPTG 0,5 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mmol/L, incubação a 20°C por 16 horas). Após indução, a suspensão de células foi sonicada com 6 pulsos de 20 segundos, seguidos de incubação em gelo por 30 segundos. O sobrenadante livre de células foi aplicado em uma coluna preenchida com a matriz *chelating sepharose* carregada com Ni<sup>+2</sup>, com volume final de 5,6 ml. Em seguida, foram feitas lavagens sucessivas com 30 volumes de tampão de lavagem A (50 mmol/L TrisCl pH 8,0, 200 mmol/L NaCl) contendo 20 mmol/L de imidazol. A eluição da proteína de fusão foi feita com um gradiente linear do tampão B pH 8,0 (50 mmol/L TrisCl pH 8,0, 200 mmol/L NaCl, 1000 mmol/L de imidazol). A purificação foi analisada por eletroforese em SDS-PAGE segundo LAEMMLI (1970) e as frações contendo a proteína TPP-His foram dialisadas contra o tampão D (50 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 200 mmol/L NaCl) acrescido com 0,5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub> e em seguida armazenadas em alíquotas de 1000  $\mu$ L em glicerol 50%, concentração final. Todas as etapas da purificação foram realizadas a 4°C.

### 3.21 DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

Esse método é baseado na formação de um complexo de cor azul, através da interação do corante Coomassie G250 com a proteína (BRADFORD, 1976). O sistema de reação contém 1 mL de solução de Bradford (100 mg/L Coomassie Brilliant Blue G250, 95% etanol, 85% ácido fosfórico) e 100  $\mu$ L de amostra. Essa mistura é homogeneizada e a absorbância determinada a 595 nm. A curva padrão é feita utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A sensibilidade deste método é de 1 a 10  $\mu$ g de proteína.

### 3.22 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA TPP DE *Herbaspirillum seropedicae*

#### 3.22.1 Ensaio de determinação da atividade enzimática

O método utilizado para determinação da atividade enzimática foi o espectrofotométrico, usando como substrato o *p*-nitrofenil fosfato (pNPP). A hidrólise deste composto libera um composto cromogênico, o *p*-nitrofenol (pNP) que, em pH alcalino, tem forte cor amarela e, portanto, absorve a luz visível na região de 410 nm (FIGURA 4).

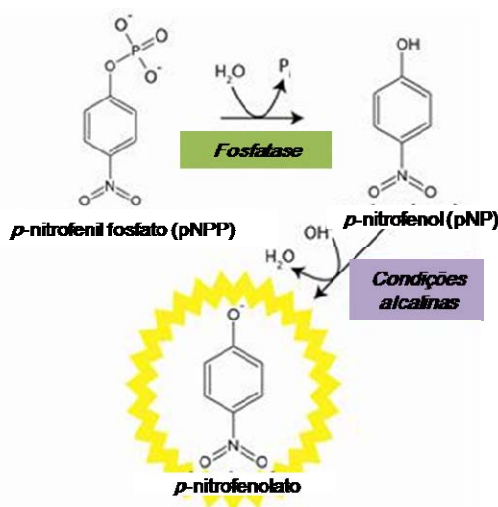


FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA DE HIDRÓLISE DO *p*-NITROFENIL FOSFATO. O produto, *p*-nitrofenol, em condições alcalinas se transforma em *p*-nitrofenolato e pode ser quantificado por espectrofotometria utilizando um filtro de 410 nm.

As reações foram realizadas em microplacas de 96 poços, com um volume reacional de 200 µL. O tampão de reação com substrato era composto da seguinte forma: tampão PIPES 50 mmol/L pH 6,1, MgCl<sub>2</sub> 20 mmol/L, DTT 5 mmol/L, pNPP 75 mmol/L. Cada poço da placa continha 100 µL do tampão de reação mais substrato e 100 µL da solução de enzima, numa concentração final de PIPES 25 mmol/L pH 6,1, MgCl<sub>2</sub> 10 mmol/L, DTT 2,5 mmol/L, pNPP 37,5 mmol/L. As reações foram incubadas por 30 minutos em banho-maria a 50°C e depois alcalinizadas com 50 µL de Tris-base. Para cada reação foi feito um poço controle contendo exatamente a mesma composição de tampão de reação adicionado de 100 µL de tampão da enzima sem enzima (50 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 200 mmol/L NaCl, 0,5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub> em glicerol 50% - v/v). O resultado das reações foi determinado por espectrofotometria a 410 nm em leitor de microplacas BIO-TEK, Modelo ELX800 (Highland Park, Vermont, EUA). O valor do controle foi subtraído dos valores obtidos para as reações catalisadas. Assumiu-se como unidade de atividade enzimática a quantidade de enzima que gera 1 µmol de produto por minuto.

### 3.22.2 Efeito do pH na atividade enzimática

O efeito de pH na atividade enzimática foi estudado na faixa de pH 5,6 a 10,6, usando diferentes composições de tampões para que as faixas de pHs se sobrepusessem. A descrição dos tampões e respectivos pHs está detalhada na TABELA 6.

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS PARA OS ENSAIOS DE EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

TAMPÃO	FAIXA DE pH UTILIZADA	CONCENTRAÇÃO FINAL
Citrato	5,6 – 6,2	50 mmol/L
PIPES	6,1 – 6,5	50 mmol/L
Fosfatos	6,0 – 8,0	50 mmol/L
Tris - HCl	7,2 – 9,0	50 mmol/L
Glicina - NaOH	8,8 – 10,6	50 mmol/L

As reações foram realizadas como descrito no item anterior, variando somente o tipo de tampão.



### 3.22.3 Ensaio de determinação do $K_M$ da enzima

Para determinar a especificidade da enzima ao substrato utilizado, verificou-se a atividade enzimática em diferentes concentrações de pNPP, variando de 0,5 a 100 mmol/L (concentração final). A atividade foi determinada nas condições descritas no item 3.22.1.

### 3.22.4 Ensaio de termoestabilidade da enzima

Para estes ensaios, alíquotas de enzima foram incubadas em banho-maria, em tubos Eppendorf de 1,5 mL, em temperaturas elevadas.

O primeiro ensaio foi realizado incubando a enzima a 50°C em intervalos de tempo que variaram de 5 a 30 minutos. A estabilidade da enzima foi determinada em relação às reações executadas com alíquotas de TPP conservadas em gelo (0°C).

O segundo ensaio visou determinar a atividade residual da TPP quando submetida a elevadas temperaturas. As alíquotas da enzima foram incubadas a 50, 60, 70 e 80°C por 30 minutos e a atividade residual em cada temperatura foi determinada em relação às alíquotas conservadas em gelo.

### 3.22.5 Efeito de cátions divalentes na atividade da enzima

Para averiguar o efeito do  $Mg^{2+}$  e do  $Ca^{2+}$  na atividade enzimática da TPP, foram realizados ensaios de atividade com tampões de reação contendo concentrações gradativas dos cátions divalentes, até a concentração máxima de 10 mmol/L (concentração final) para o  $Mg^{2+}$  e 50 mmol/L (concentração final) para o  $Ca^{2+}$ . A atividade foi determinada nas condições descritas no item 3.22.1.

## 3.23 ANÁLISE *in silico* DA PROTEÍNA TPP DE *Herbaspirillum seropedicae*.

As análises *in silico* foram realizadas com o auxílio dos programas bioinformáticos de livre acesso listados na TABELA 7.

TABELA 7 – PROGRAMAS UTILIZADOS NA ANÁLISE *in silico*

PROGRAMA	APLICAÇÃO	PÁGINA ELETRÔNICA
ProtParam	Cálculo de parâmetros físico-químicos da proteína a partir da sequência de aminoácidos	> <a href="http://www.expasy.ch/tools/protparam.html">http://www.expasy.ch/tools/protparam.html</a> <
Pfam 22.0	Identificação de domínios da proteína por homologia com a sequência de aminoácidos	> <a href="http://pfam.sanger.ac.uk/">http://pfam.sanger.ac.uk/</a> <
DAS - Transmembrane Prediction server®	Identificação de regiões transmembrana da proteína	> <a href="http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/">http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/</a> <
Psort	Predição da localização celular da proteína	> <a href="http://www.psort.org/psortb/index.html">http://www.psort.org/psortb/index.html</a> <
PSIPred	Determinação da estrutura secundária da proteína	> <a href="http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html">http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html</a> <
Swiss-Model	Determinação de um modelo da possível estrutura terciária da proteína	> <a href="http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html">http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html</a> <
PyMOL	Manipulação da estrutura terciária da proteína	> <a href="http://www.pymol.org/">http://www.pymol.org/</a> <
CLUSTALW®	Alinhamento de sequências primárias	> <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/</a> <
STRING 8.2	Banco de dados de interações proteicas conhecidas	> <a href="http://string.embl.de/">http://string.embl.de/</a> <

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE *in silico* DA PROTEÍNA TREALOSE-6-FOSFATO FOSFATASE (TPP) DE *Herbaspirillum seropedicae*.

A primeira etapa da pesquisa concentrou-se na busca e identificação do gene que codificaria a trealose-6-fosfato fosfatase no genoma de *H. seropedicae*. Durante a análise do mapa físico do genoma desse organismo (Programa GENOPAR) foi identificado o gene *otsB*, localizado no *contig* 282 e anotado como uma provável TPP (FIGURA 5). A montante localizou-se o gene *putP*, que codifica uma proteína de simporte de Na<sup>+</sup>/prolina, e a jusante o gene de uma glucoamilase (FIGURA 3).

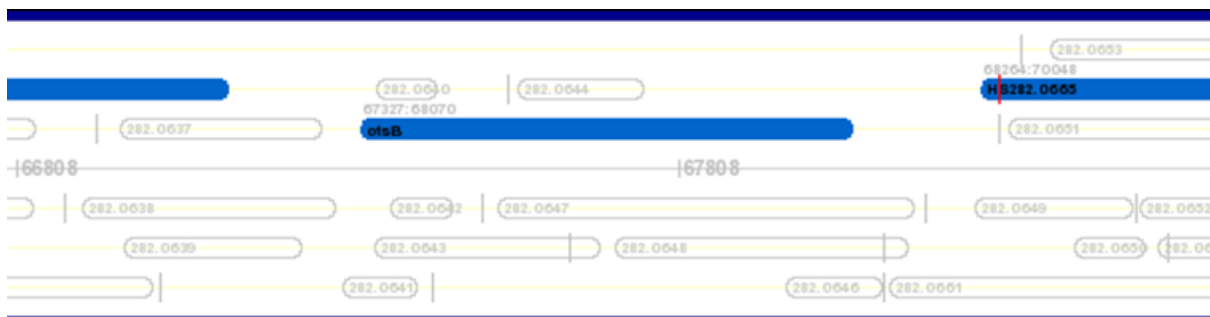


FIGURA 5. LOCALIZAÇÃO DO GENE *otsB* NO GENOMA DE *Herbaspirillum seropedicae*. O gene foi identificado no *contig* 282, ORF HS282.0645, anotado como uma provável trealose-6-fosfato fosfatase. Fonte: Programa GENOPAR.

A sequência de nucleotídeos da ORF HS282.0645 foi convertida para aminoácidos e então submetida em diversos programas bioinformáticos para obtenção das possíveis características físico-químicas e estruturais desta proteína. Tais informações possibilitaram uma melhor compreensão da provável função enzimática da TPP de *H. seropedicae*.











#### 4.1.1 ANÁLISE COMPARATIVA DA ORGANIZAÇÃO DOS GENES *otsA* E *otsB* NO GENOMA DE DIFERENTES ORGANISMOS.

Como apontado anteriormente, os genes da cadeia de biossíntese da trealose (*otsA* e *otsB*), estão presentes em diversos organismos, pertencentes a todos os reinos de seres vivos, com a única exceção dos vertebrados.

A organização destes genes no genoma é bastante similar entre as bactérias, principalmente no filo das proteobactérias, onde se observa que os genes estão sempre próximos um ao outro, o *otsB* geralmente antecede o *otsA* e, em determinadas famílias, estão separados pelo gene de uma glucoamilase ou outro semelhante (FIGURA 6).

Em *Herbaspirillum seropedicae* (FIGURA 3) e outras  $\beta$ -proteobactérias, verifica-se a presença da glucoamilase separando o *otsB* do *otsA*, enquanto em *Escherichia coli* e outras  $\gamma$ -proteobactérias não há nenhum gene separando os dois. Já nos outros filós e subdivisões de bactérias e também nas arqueas, especificamente no gênero *Thermoplasma*, o gene *otsA* antecede o *otsB* no genoma e geralmente não há nenhum outro gene entre eles (FIGURA 6).

Legenda da Figura 6:

	<i>otsB</i> (trealose-6-fosfato fosfatase)
	<i>otsA</i> (trealose-6-fosfato sintase)
	glucoamilase
	<i>treA</i> (trealase)
	trealose sintase
	gK (glucoquinase)
	transportador MFS
	pterina-4a-carbinolamina desidratase
	galU (UTP-glucose-1-fosfato uridililtransferase)
	ttg2C (transportador tipo ABC)

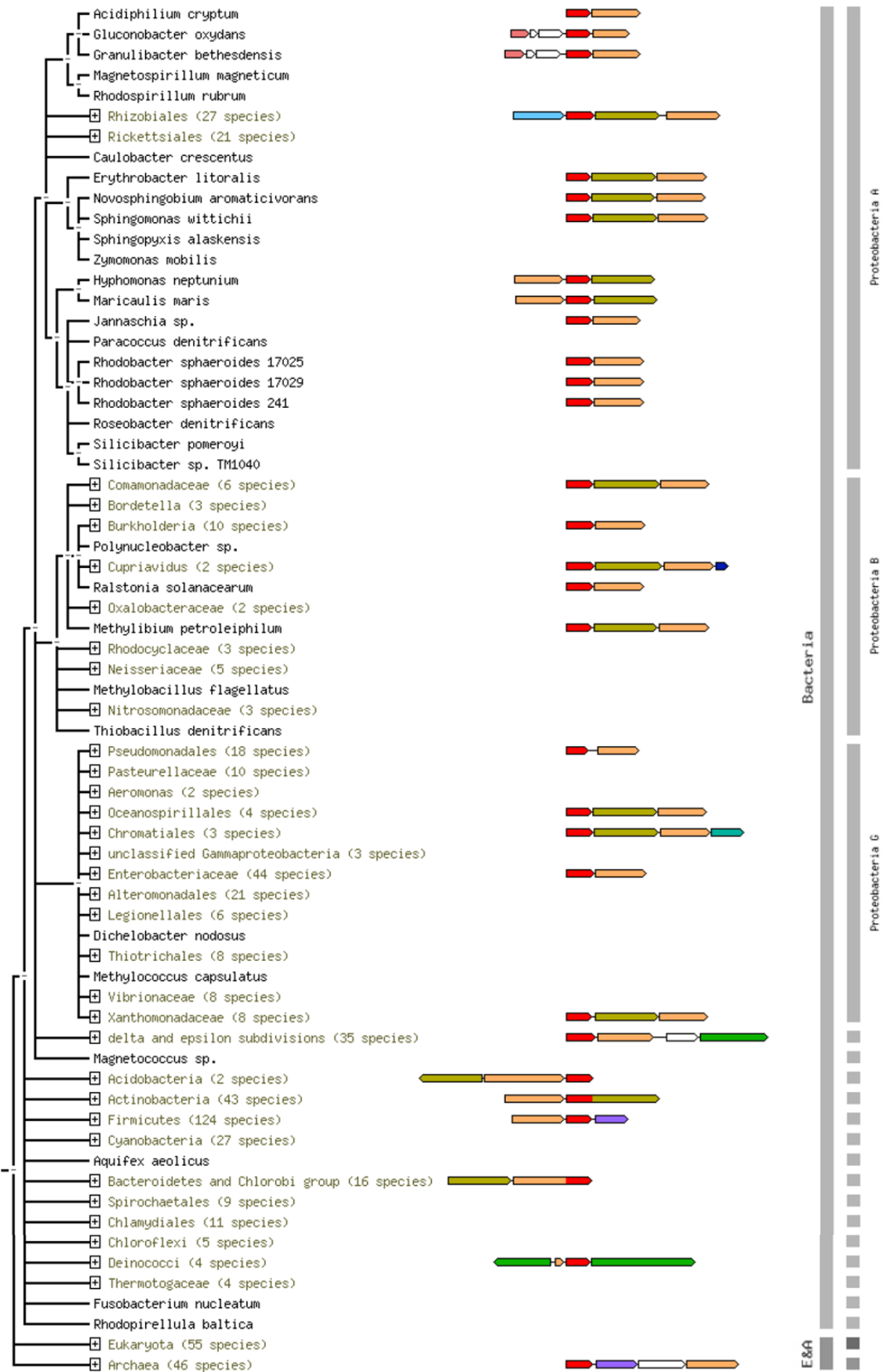


FIGURA 6. ORGANIZAÇÃO DOS GENES *otsA* E *otsB* NO GENOMA DE OUTROS ORGANISMOS.

Fonte: STRING® - Proteins and their Interactions (<http://string.embl.de/>)

#### 4.1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA TPP DE *Herbaspirillum seropedicae* PREDITAS *in silico*

A trealose-6-fosfato fosfatase é uma proteína de peso molecular de 26803,7 Da, composta por um total de 248 aminoácidos e seu pI teórico foi estimado a 5,53.

A sequência de aminoácidos da proteína TPP está detalhada na FIGURA 7.

10	20	30	40	50	60
MTEQTRPYDV	AADALFLDFD	GTLVDLAPQP	DGIVVPEPELI	TLLQQIQLES	DGALAIIVSGR
70	80	90	100	110	120
PLDQLDFFLA	PLRLPAAGVH	GAERRTADGR	ILQQPVPDVQ	HLRERLLPLV	DSHSGLQLEL
130	140	150	160	170	180
KRGALALHYR	HAAHLEQRCV	DTMMEALRHE	PGFTLLHGKM	VVEAKPHINK	GDAVA AFLHE
190	200	210	220	230	240
APFRGRRPVF	IGDDVTDEAG	FAIAQGEVFG	GLGIKIGAGP	TQALQRLADP	AAVLGLLRQS
VEVRSTSG					

FIGURA 7. COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA TPP DE *Herbaspirillum seropedicae*. Os números indicam a posição dos aminoácidos. Fonte: ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)

A estabilidade de uma proteína *in vitro* é um dado importante a ser considerado durante as etapas de purificação e ensaios de atividade, pois determina se a proteína está sujeita à degradação e desnaturação, influenciando assim na escolha das condições de manipulação durante tais ensaios.

O índice de instabilidade é calculado a partir da sequência primária da proteína, através de um algoritmo que identifica a predominância de determinados dipeptídeos presentes na estrutura (GURUPRASAD *et al.*, 1990). Quando o índice é menor que 40,00, a proteína é provavelmente estável; quando é maior que 40,00, a proteína pode ser considerada instável. O índice de instabilidade calculado através do programa ProtParam para a proteína TPP de *H. seropedicae* foi 46,54, sendo considerada, portanto, uma proteína instável.

#### 4.1.3 ESTUDO COMPARATIVO DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DA TPP DE *Herbaspirillum seropedicae*.

A TPP é membro da família das trealose fosfatases (EC.1.3.12). Estas enzimas catalisam a defosforilação da trealose-6-fosfato em trealose e ortofosfato. Adicionalmente, esta família é membro da superfamília HAD (denominada assim devido ao seu ancestral comum, a enzima dehalogenase haloácida) (KOONIN; TATUSOV, 1994).

Esta superfamília inclui diversas enzimas que catalisam a transferência de grupos fosforil ou carbonil de uma grande variedade de substratos, utilizando para tanto a carboxila de um resíduo de aspartato no sítio ativo como nucleófilo na reação (BURROUGHS *et al.* 2006) (FIGURA 8). No caso das fosfotransferases, como a TPP, é também requerido um íon  $Mg^{2+}$  como cofator para a catálise (KOONIN; TATUSOV, 1994; ARAVIND *et al.*, 1998) (FIGURA 10).

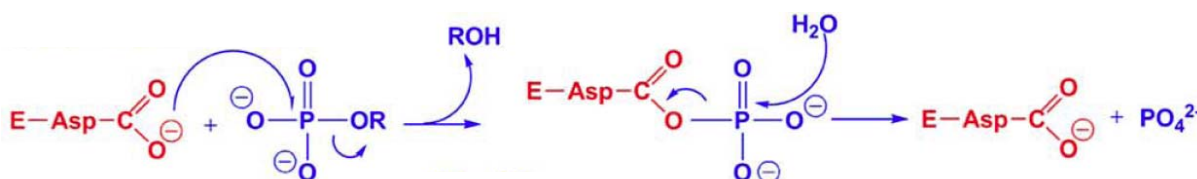


FIGURA 8. MECANISMO DE REAÇÃO NO SÍTIO CATALÍTICO DAS FOSFATASES PERTENCENTES À SUPERFAMÍLIA HAD. A carboxila de um resíduo de aspartato no sítio catalítico da enzima (em vermelho) atua como nucleófilo na reação de defosforilação do substrato (em azul). Fonte: BURROUGHS *et al.* (2006).

Para melhor compreensão das características estruturais encontradas na TPP de *H. seropedicae* e conseqüente relação com sua provável função de fosfatase, procuramos relacionar os motivos conservados já descritos em outros membros da superfamília HAD.

O principal domínio estrutural dos membros da superfamília HAD é o domínio HAD, composto por dobras  $\alpha/\beta$ -hidrolase que adotam a topologia típica  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  das chamadas dobras Rossmann (RAO; ROSSMANN, 1973) (FIGURA 9). Entretanto, as dobras HAD são diferenciadas de todas as outras dobras Rossmann pela presença de dois motivos estruturais chave. Primeiro, imediatamente após a primeira região em conformação  $\beta$  (fita- $\beta$  F1), encontra-se um motivo estrutural

composto por cerca de seis resíduos de aminoácidos que assume a forma de uma semi-hélice com uma única volta quase completa, denominado “squiggle”. Segundo, logo após o “squiggle”, encontra-se a estrutura chamada “flap”, um grampo formado a partir de duas fitas- $\beta$  e que se projeta do núcleo do domínio HAD (BURROUGHS *et al.* 2006) (FIGURA 9).

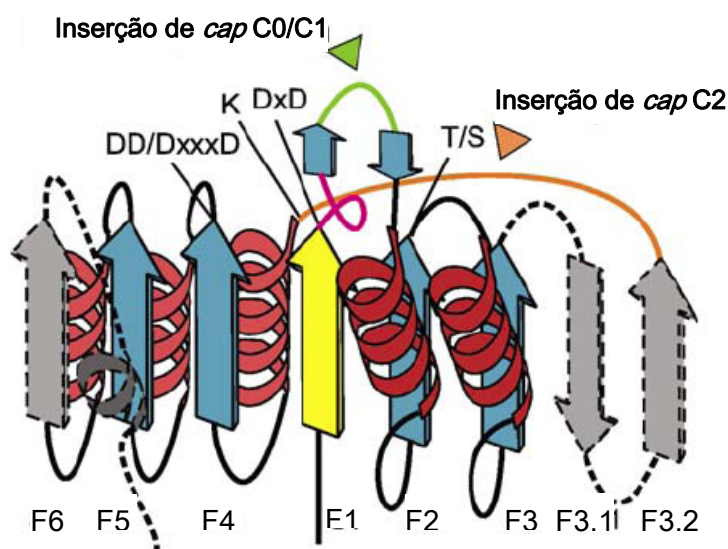


FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE UM TÍPICO DOMÍNIO HAD. As regiões em conformação  $\beta$  (fitas- $\beta$ ) estão representadas por setas e as  $\alpha$ -hélices por hélices. A primeira fita- $\beta$  com o resíduo catalítico D está em amarelo; outras fitas que se mantiveram conservadas em todos os membros da superfamília estão em azul; elementos não conservados que estavam ausentes na molécula ancestral estão representados em cinza. Em rosa está representado o motivo estrutural conservado “squiggle” e em verde o “flap”, onde pode ocorrer a inserção de um *cap* do tipo C0/C1. Em laranja encontra-se o ponto de uma possível inserção de um *cap* do tipo C2. F1 a F6 indicam as fitas- $\beta$  que compõem o domínio HAD. Os quatro motivos sequenciais conservados estão representados da seguinte forma: “D” indica um resíduo de aspartato; “K” indica um resíduo de lisina; “T/S” indica um resíduo de treonina ou serina; “x” indica qualquer aminoácido. Fonte: modificado de BURROUGHS *et al.* (2006).

Além destes motivos estruturais, encontramos quatro motivos sequenciais altamente conservados em praticamente todos os membros da superfamília HAD (BURROUGHS *et al.* 2006). O motivo sequencial I corresponde à presença da assinatura DxD, no final da fita F1, onde D indica um resíduo de aspartato e “x” indica qualquer aminoácido. O primeiro aspartato do motivo I forma um intermediário com o substrato – um fosfoaspartato – durante a reação de defosforilação (FIGURA



8). O motivo II corresponde à composição da fita F2, caracterizado por uma treonina (T) ou serina (S) altamente conservada na extremidade desta fita- $\beta$ , a qual forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio do grupo fosforil do substrato. O motivo III está centrado em uma lisina (K) conservada que aparece próxima à posição N-terminal da  $\alpha$ -hélice localizada anteriormente à fita F4. Estes dois últimos motivos contribuem para a estabilidade dos intermediários da reação de hidrólise que ocorre no sítio ativo. Por fim, o motivo IV é caracterizado pelos resíduos ácidos localizados na extremidade C-terminal da fita F4, os quais exibem uma das seguintes assinaturas: DD, GDxxxD ou GDxxxxD, onde G indica um resíduo de glicina. Estes resíduos ácidos, juntamente àqueles do motivo I, são fundamentais na coordenação do  $Mg^{2+}$  no sítio ativo (MORAIS *et al.*, 2000). A FIGURA 10 representa um esquema do sítio ativo, onde é possível visualizar a disposição espacial dos resíduos que compõem cada um dos quatro motivos descritos, além de suas interações com o substrato e o  $Mg^{2+}$ .

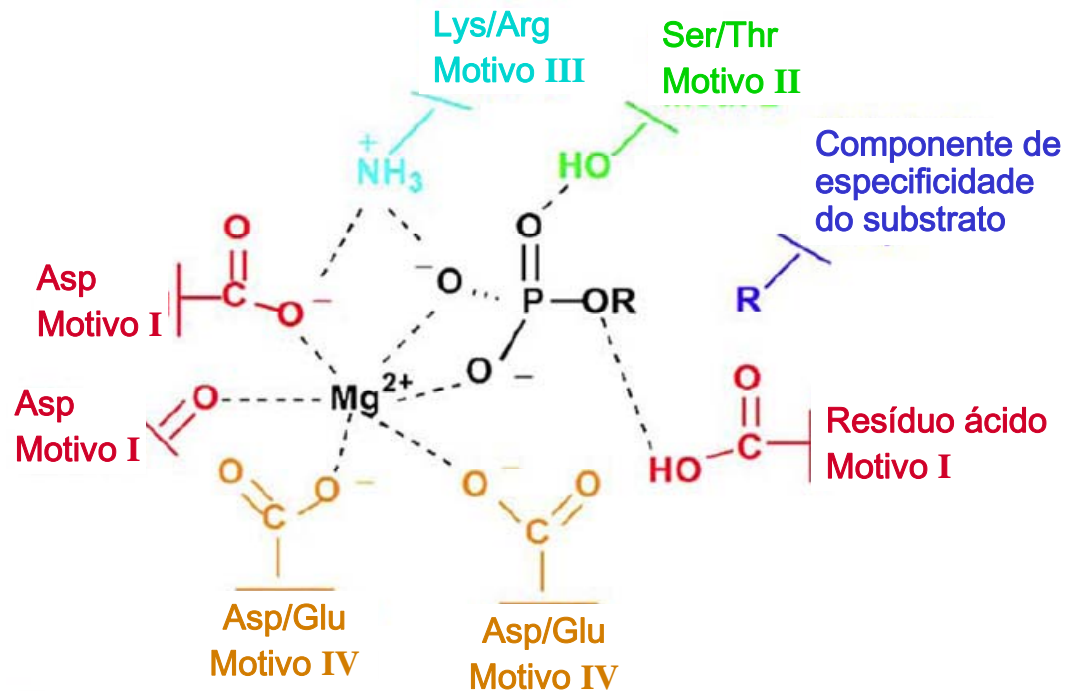


FIGURA 10. ESQUEMA GRÁFICO DO SÍTIO ATIVO DE FOSFOTRANSFERASES. Este esquema mostra o íon  $Mg^{2+}$  interagindo com o grupo fosforil do substrato (em preto) e com os resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo. Os resíduos ácidos que constituem o motivo I (aspartato e outros) estão mostrados em vermelho. O resíduo do motivo II (serina ou treonina) está em verde. O resíduo de lisina ou arginina do motivo III está representado em azul claro e os aspartatos ou glutamatos do motivo IV estão em laranja. O componente de especificidade do substrato, o qual determina a afinidade por um determinado substrato e geralmente fornecido pelo domínio *cap*, está mostrado em azul escuro. Fonte: modificado de BURROUGHS *et al.* (2006).

Os quatro motivos sequenciais estão espacialmente arranjados ao redor da cavidade formada pelas fitas- $\beta$  do domínio central, constituindo o sítio ativo. Esta cavidade é geralmente coberta pelo “flap” que ocorre depois da fita F1, mas insertos adicionais, localizados entre as fitas do “flap” ou logo após a fita F3, proporcionam uma proteção mais ampla ao sítio catalítico. Estes insertos, chamados *caps*, variam na complexidade de sua estrutura dependendo da quantidade de conformações secundárias que comportam, além de possuírem um papel fundamental nas funções catalíticas por contribuírem com resíduos necessários para a especificidade da enzima. Há três categorias básicas de *caps*: (1) os *caps* C0 são os estruturalmente mais simples e geralmente constituem pequenas inserções no “flap”; (2) os *caps* C1 são definidos como inserções que ocorrem no meio do grampo- $\beta$  do “flap” e que se projetam do domínio central, formando uma unidade estrutural distinta; (3) os *caps*

C2 são insertos que ocorrem logo após a fita F3 e também se projetam externamente ao domínio central. A maioria dos representantes da superfamília HAD possui *caps* do tipo C1 ou C2, mas há proteínas em que os dois *caps* estão simultaneamente presentes na estrutura (BURROUGHS *et al.* 2006).

#### 4.1.3.1 MODELO ESTRUTURAL COMPARATIVO DA TPP DE *Herbaspirillum seropedicae*.

Para comparar a estrutura da TPP de *H. seropedicae* com a de outros membros HAD, submeteu-se a sequência primária da proteína em diversos programas bioinformáticos, obtendo assim uma predição da possível estrutura e conformação que a enzima apresentaria.

A análise estrutural iniciou-se com a predição de sua conformação secundária. A estrutura secundária da proteína foi gerada através do programa PSIPred, o qual prevê a conformação resultante,  $\alpha$ -hélices ou fitas- $\beta$ , utilizando a sequência primária submetida (FIGURA 11).

Os dados obtidos desta predição possibilitaram visualizar a presença das cinco fitas- $\beta$  que compõem o domínio central e que se mantiveram conservadas em outros integrantes da superfamília HAD (F1, F2, F3, F4 e F5 - FIGURA 11). Verifica-se também a presença de três fitas- $\beta$  adicionais (F3.1, F3.2 e F6 - FIGURA 11) que surgiram de modificações evolutivas da molécula ancestral.

Outra observação significativa refere-se à presença de um possível *cap* do tipo C2 entre a fita F3.1 e a fita F4. Este *cap* é composto por duas unidades consecutivas de uma  $\alpha$ -hélice seguida por duas fitas- $\beta$  (Fc1 a Fc4).

Através da análise comparativa da conformação secundária predita e da sequência primária com as estruturas descritas na literatura e detalhadas anteriormente, encontramos evidências de que a proteína TPP de *H. seropedicae* seja de fato um membro da superfamília HAD. Estas evidências se baseiam na presença dos quatro motivos sequenciais conservados localizados exatamente onde descrito em outros membros da superfamília HAD, ou seja, a assinatura de aspartatos (DxD) no final da fita F1 (motivo I), a serina (S) na extremidade da fita F2 (motivo II), a lisina (K) próxima à posição N-terminal da  $\alpha$ -hélice à montante da fita

F4 (motivo III) e a assinatura GDxxxD na extremidade C-terminal da fita F4 (motivo IV) (FIGURA 11).

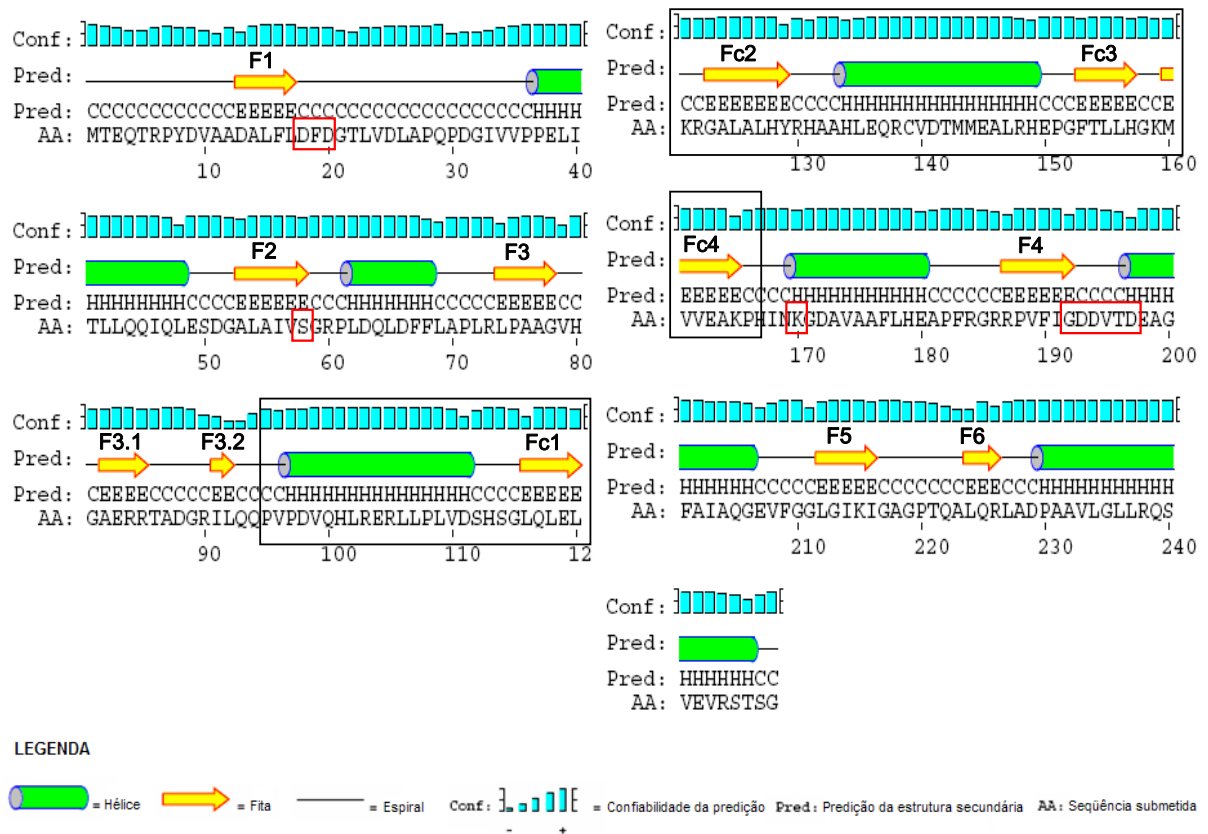


FIGURA 11. PREDIÇÃO E ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA TPP DE *H. seropedicae*. O esquema gerado pelo programa PSIPred mostra a presença de 12 fitas- $\beta$  (setas amarelas) e 7  $\alpha$ -hélices (cilindros verdes). Os retângulos pretos delimitam o domínio *cap*, do tipo C2, composto por 2  $\alpha$ -hélices e 4 fitas- $\beta$ . Os retângulos vermelhos destacam os motivos conservados I a IV, descritos anteriormente. F1, F2, F3, F4 e F5 indicam as fitas que compõem o domínio central e que se mantiveram conservadas em outros integrantes da superfamília HAD. F3.1, F3.2 e F6 indicam as fitas que compõem o domínio central que não estão presentes em outros membros da superfamília. Fc1 a Fc4 mostram as fitas que compõem o domínio *cap*. Fonte: modificado do programa PSIPred.

Apesar das evidências encontradas sobre a provável função de fosfatase da TPP de *H. seropedicae*, era necessário obter melhores explicações em nível molecular sobre a conformação espacial da proteína. Para tanto, gerou-se um modelo tridimensional teórico para a enzima com o auxílio do programa Swiss-Model. Este programa utiliza estruturas homólogas de outros organismos

depositadas no banco de dados do PDB (Protein Data Bank) como moldes para processar uma possível estrutura terciária, baseando-se para isso nas similaridades entre a sequência de aminoácidos submetida e a sequência da proteína depositada.

Após o processamento, o programa retorna uma lista dos melhores moldes encontrados. Neste caso, a única estrutura encontrada para comparação foi a TPP da arquea *Thermoplasma acidophilum* (RAO *et al.*, 2006), o único organismo até o momento a ter esta enzima caracterizada tridimensionalmente (código no protein data bank PDB:1U02).

A sequência de aminoácidos da TPP de *H. seropedicae* possui 25% de identidade com a TPP de *T. acidophilum*. Para efeitos comparativos, foram consideradas todas as características estruturais da TPP de *Thermoplasma acidophilum* citadas por Rao e colaboradores em seu trabalho. A estrutura terciária da proteína TPP de *Thermoplasma acidophilum* foi determinada por difração de raios-X, pelo método DAD (difração anômala de duplo comprimento de onda). Esta enzima possui uma região central com dobras  $\alpha/\beta$ -hidrolase, características da superfamília HAD, e um *cap* do tipo C2, constituído de uma folha- $\beta$  de 4 fitas e 2  $\alpha$ -hélices, estas últimas dobradas tridimensionalmente de um lado da folha- $\beta$  (FIGURA 12).

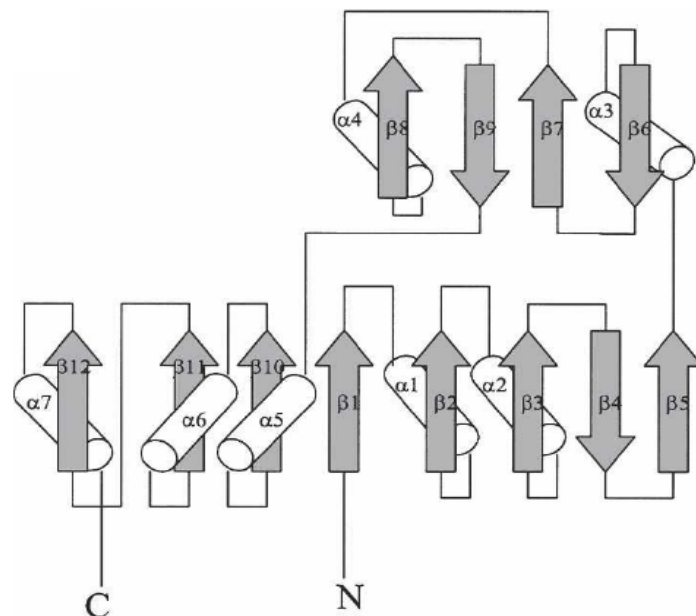


FIGURA 12. TOPOLOGIA DA ESTRUTURA DA TREALOSE-6-FOSFATO FOSFATASE DE *Thermoplasma acidophilum*. As fitas- $\beta$  estão representadas por setas e  $\alpha$ -hélices por cilindros. A letra N indica a extremidade N-terminal da proteína e C a C-terminal. Fonte: RAO *et al.* (2006).

Um íon magnésio e uma molécula de glicerol encontrados na interface dos dois domínios proporcionaram aos autores informações sobre o modo de ligação do substrato à TPP. A presença do glicerol e de várias moléculas de água na cavidade formada pelos dois domínios sugeriu que substratos relativamente volumosos poderiam se alojar nesta região, inclusive moléculas fosforiladas de açúcar, como a trealose-6-fosfato. Além disso, os tipos de interação da molécula de glicerol com a estrutura indicam a possível posição do substrato no sítio ativo. Conclusivamente, Rao e colaboradores simularam a modelagem da molécula de trealose-6-fosfato no sítio ativo e descobriram que o substrato era perfeitamente acomodado na cavidade formada pelos dois domínios. O grupo açúcar foi posicionado na entrada da cavidade, enquanto o grupo fosfato foi posicionado mais internamente no sítio ativo, interagindo com os resíduos básicos, favorecendo assim a catálise (RAO *et al.*, 2006) (FIGURA 13).

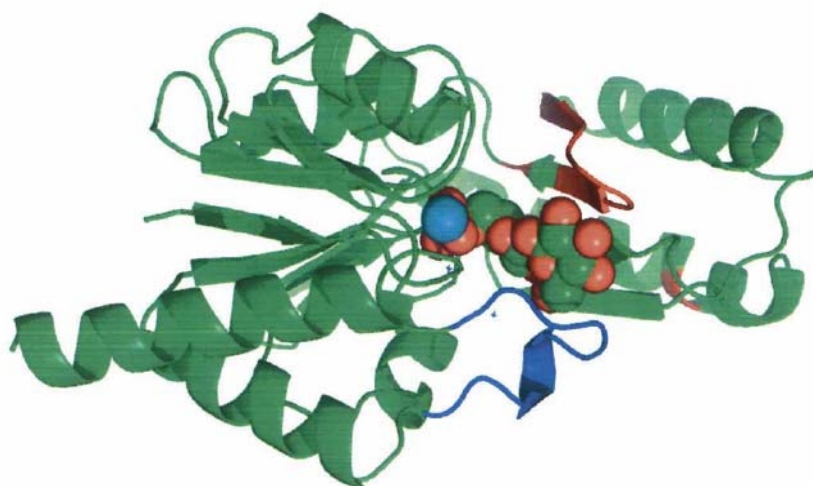


FIGURA 13. SIMULAÇÃO DA ACOMODAÇÃO DA MOLÉCULA DE TREALOSE-6-FOSFATO NA TPP DE *Thermoplasma acidophilum*. A molécula de trealose-6-fosfato, representada por esferas (átomos), encontra-se alojada na cavidade formada entre os domínios central (à esquerda da molécula) e *cap* (à direita) da TPP de *T. acidophilum*. As regiões em vermelho e azul indicam a localização dos componentes de especificidade da enzima. Fonte: RAO *et al.* (2006).

Alinhando as sequências primárias das proteínas de ambos os organismos (FIGURA 14) e comparando o modelo tridimensional teórico com a estrutura cristalográfica da TPP de *T. acidophilum* (FIGURAS 15 e 16), pudemos observar uma série de semelhanças que apontam claramente para a função de fosfatase da proteína TPP de *H. seropedicae*.

O alinhamento mostrou que apesar de haver uma baixa identidade entre os aminoácidos das duas proteínas, as regiões descritas na literatura como conservadas apresentaram de fato uma composição de aminoácidos muito similar nos dois organismos. Os resíduos que fazem parte do sítio catalítico descrito na TPP de *T. acidophilum* (RAO *et al.*, 2006) são também encontrados na TPP de *H. seropedicae*, com uma única disparidade, o resíduo na posição 45 na TPP de *T. acidophilum* é uma treonina, enquanto que o da posição 58 em *H. seropedicae* trata-se de uma serina. Como discutido anteriormente, ambos os aminoácidos podem fazer parte do motivo II, pois tanto a treonina quanto a serina possuem a hidroxila necessária para formar a ligação de hidrogênio com a trealose-6-fosfato.

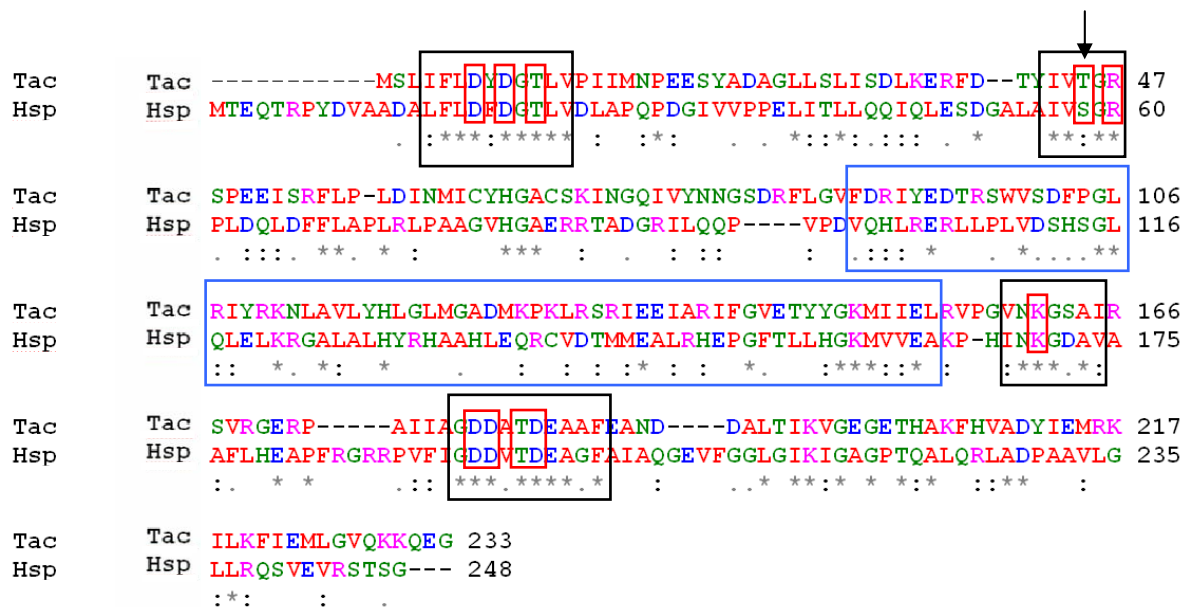


FIGURA 14. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS PRIMÁRIAS DA PROTEÍNA TPP DE *T. acidophilum* E *H. seropedicae*. As sequências de aminoácidos de ambas as proteínas foram alinhadas utilizando o programa ClustalW® e posteriormente analisadas para identificação das regiões mais conservadas, destacadas em retângulos pretos. Estas regiões conservadas englobam os aminoácidos que compõem o sítio catalítico (retângulos vermelhos), sendo que parte deles foram descritos anteriormente como motivos conservados. A única disparidade encontrada na composição do sítio ativo refere-se ao resíduo 45 de *T. acidophilum*, uma treonina, e ao 58 de *H. seropedicae*, uma serina (indicados pela seta). A região *cap* está destacada pelo retângulo azul e compreende aproximadamente os resíduos da posição 89 à 154 da sequência de *T. acidophilum*. *Legenda*: Tac: sequência de aminoácidos da TPP de *Thermoplasma acidophilum*; Hsp: sequência de aminoácidos da TPP de *Herbaspirillum seropedicae*; “\*”: aminoácido idêntico; “:”: substituição conservada; “.”: substituição semi-conservada; “-”: *gaps* no alinhamento; os números no final das linhas indicam a posição dos aminoácidos.



Ao analisar mais detalhadamente o modelo estrutural gerado para a TPP de *H. seropedicae* com o auxílio do programa PyMOL, encontramos fortes indicações de que o inserto após a fita F3.2 seja de fato uma região *cap* do tipo C2, cuja função seria proteger fisicamente o sítio ativo e contribuir para a especificidade da enzima (BURROUGHS *et al.* 2006). Tais indicações consistem no fato de que esta região encontra-se claramente projetada do domínio central, constituindo uma unidade estrutural à parte e, semelhantemente à TPP de *T. acidophilum*, ser constituída de uma folha- $\beta$  de 4 fitas e 2  $\alpha$ -hélices (FIGURAS 15 e 16). Enquanto na enzima de *T. acidophilum* o *cap* compreende os resíduos da posição 89 a 154, em *H. seropedicae* esta região deveria compreender os resíduos 99 a 164 (FIGURA 14).

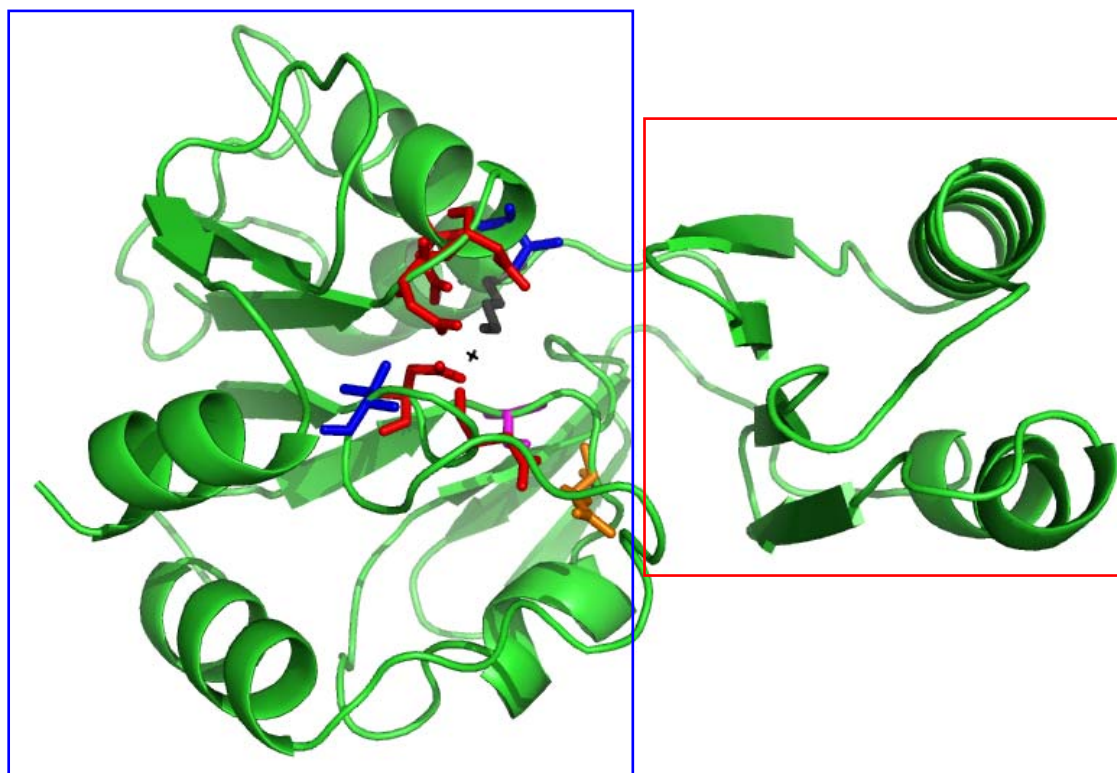


FIGURA 15. MODELO TRIDIMENSIONAL TEÓRICO DA PROTEÍNA TPP DE *H. seropedicae*. A estrutura foi gerada pelo programa Swiss-Model e manipulada pelo programa PyMOL. O retângulo vermelho aponta a região *cap* da enzima com a folha- $\beta$  de 4 fitas e 2  $\alpha$ -hélices e o azul destaca o domínio central com dobras  $\alpha/\beta$ -hidrolase, características da superfamília HAD. Os aminoácidos do sítio ativo estão representados por bastões coloridos e a cruz no centro deles representa o íon  $Mg^{2+}$ .



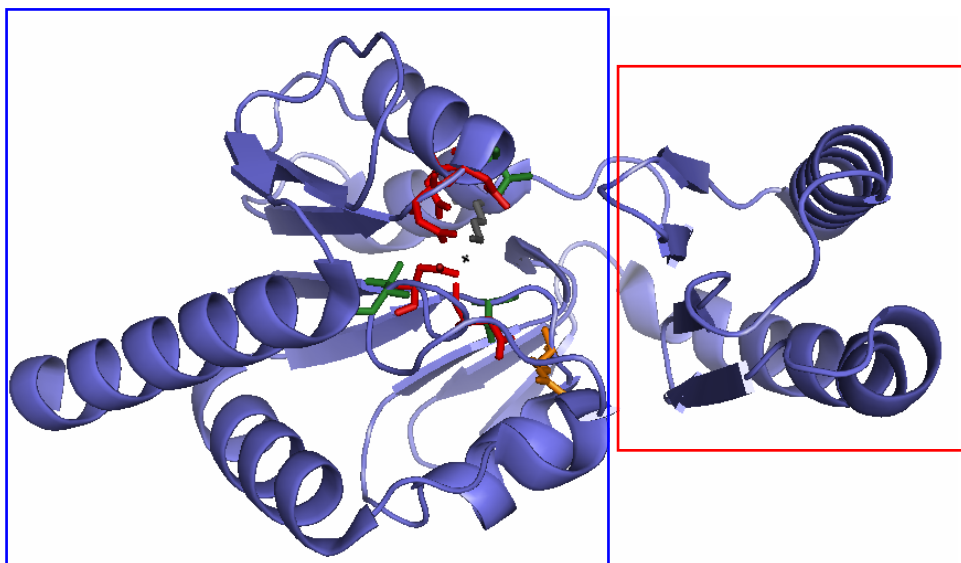


FIGURA 16. ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA PROTEÍNA TPP DE *T. acidophilum*. A estrutura foi retirada do banco de dados PDB (1U02) e manipulada pelo programa PyMOL para efeitos comparativos. O retângulo vermelho aponta a região *cap* da enzima e o retângulo azul o domínio central. Os aminoácidos do sítio ativo estão representados por bastões coloridos e a cruz no centro deles representa o íon  $Mg^{2+}$ .

A FIGURA 17 detalha o sítio catalítico da TPP de *H. seropedicae* (em verde) e *T. acidophilum* (em azul) mostrando a conservação evolutiva dos aminoácidos que o compõem, com exceção da substituição de uma serina em *H. seropedicae* por uma treonina em *T. acidophilum*. Além disso, é evidente a semelhança na organização espacial dos resíduos do sítio ativo, o que sugere uma afinidade pelo mesmo tipo de substrato na reação catalítica.

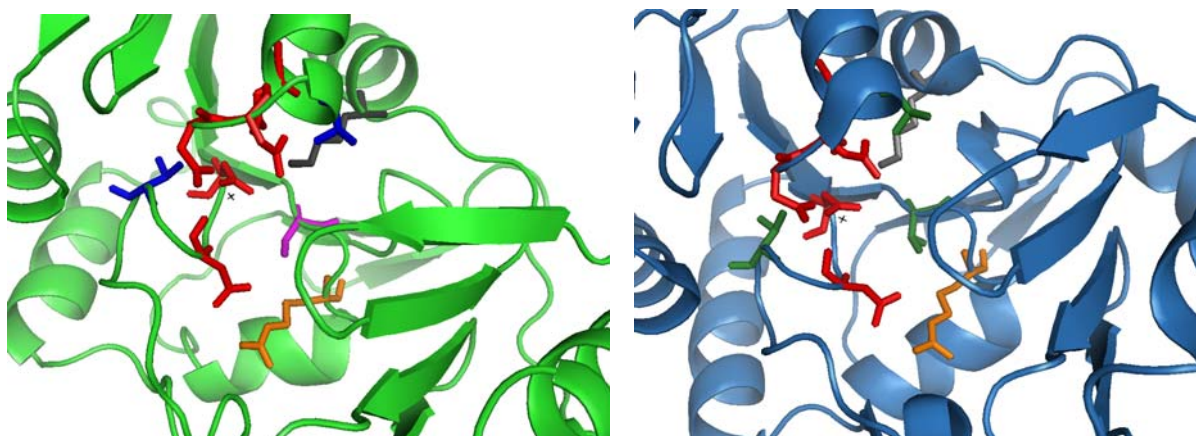


FIGURA 17. DETALHE DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS DO SÍTIO CATALÍTICO DA TPP DE *H. seropedicae* (ESQUERDA) E DA TPP DE *T. acidophilum* (DIREITA). A região do sítio catalítico nas

estruturas foi ampliado pelo programa PyMOL, mostrando a composição dos resíduos de aminoácidos. As cores dos resíduos foram usadas da mesma maneira nos dois modelos: vermelho>aspartato; azul/verde> treonina; cinza>lisina; laranja>arginina; rosa>serina. A composição e organização espacial destes resíduos é a mesma nos dois organismos, exceto pela substituição de uma serina em *H. seropedicae* por uma treonina em *T. acidophilum*.

Finalmente, na tentativa de melhor visualizar a semelhança entre as enzimas dos dois organismos, as estruturas totais foram sobrepostas utilizando o programa PyMOL (FIGURA 18). O resultado foi uma ótima concordância entre os dois modelos, o que aponta para um nível de realidade bastante confiável na estrutura proposta para a TPP de *H. seropedicae*.

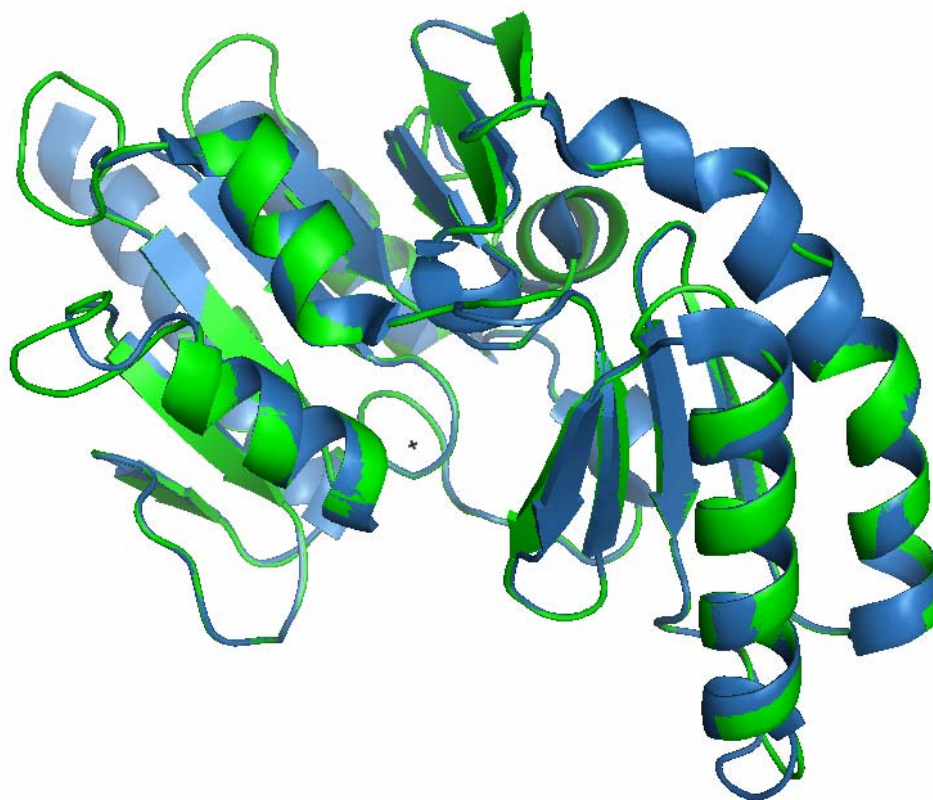


FIGURA 18. SOBREPOSIÇÃO DOS MODELOS ESTRUTURAS DA TPP DE *H. seropedicae* (VERDE) E *T. acidophilum* (AZUL). As estruturas foram sobrepostas pelo programa PyMOL e apresentaram uma ótima concordância entre os dois modelos.

## 4.2 CLONAGEM, SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TPP DE *Herbaspirillum seropedicae*

Uma vez avaliada a estrutura teórica proposta para a TPP de *H. seropedicae*, buscou-se confirmar experimentalmente a função enzimática da proteína, tendo como primeiro objetivo a clonagem e superexpressão do gene *otsB*, que codifica a proteína TPP, e posteriormente o estudo da atividade enzimática.

### 4.2.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *otsB* DE *H. seropedicae*

A amplificação do gene *otsB* foi realizada segundo a metodologia previamente descrita no item 3.11. O tamanho do gene é de 755 nucleotídeos, portanto a banda esperada se encontraria próxima à banda de 750 pb do marcador molecular. A FIGURA 19 mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose 1% do produto da reação de PCR, onde à direita se visualiza a banda contendo o gene *otsB*, localizada como previsto um pouco acima da banda de 750 pb do marcador molecular.

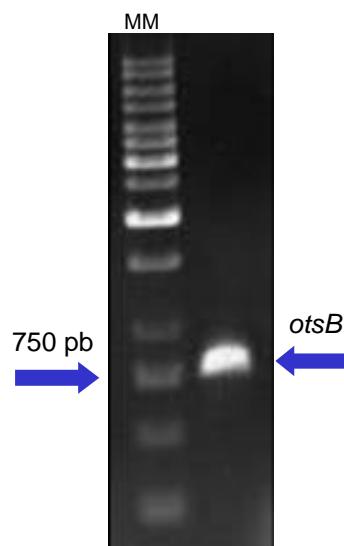


FIGURA 19. ELETROFORESE DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE *otsB* de *H. seropedicae*. A amplificação do gene *otsB* foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores OtsB FORWARD e OtsB REVERSE segundo metodologia descrita anteriormente e o produto foi aplicado em gel de agarose 1%. MM: marcador molecular.

#### 4.2.2 CLONAGEM DO GENE *otsB* NO VETOR pCR 2.1

O amplificado foi ligado ao vetor linearizado pCR 2.1 como descrito no item 3.13. Após a ligação, a mistura foi eletrotransformada na estirpe TOP10 de *E.coli* e os clones foram selecionados em placas de meio LA contendo ampicilina, canamicina e x-gal nas concentrações também previamente descritas. O DNA plasmidial dos transformantes foi isolado e a inserção do gene *otsB* no vetor foi confirmada pela visualização em gel de agarose 1% da restrição com as enzimas NdeI e HindIII (tamanho do vetor: 3,9 kb; tamanho do inserto: 755 pb) (FIGURA 20). O plasmídeo contendo o gene *otsB* foi denominado pCR-OTSB (FIGURA 21).

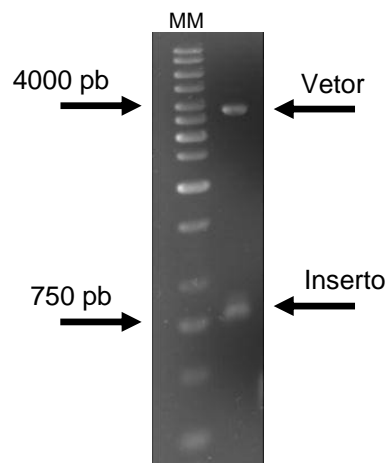


FIGURA 20. CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DO INSERTO NO VETOR pCR2.1. O gene *otsB* foi ligado ao vetor linearizado pCR2.1 e a reação foi confirmada por restrição com as enzimas NdeI e HindIII (tamanho do vetor: 3,9 kb; tamanho do inserto: 755 pb). MM: marcador molecular.

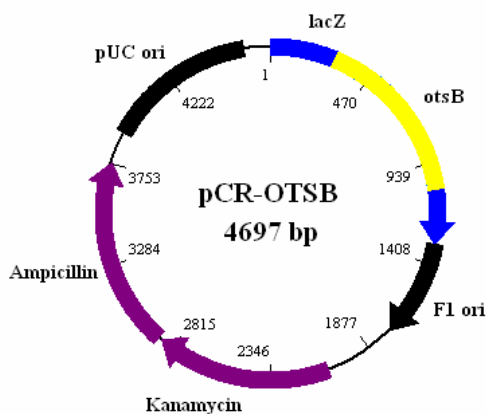


FIGURA 21. PLASMÍDEO pCR-OTSB. O vetor pCR2.1 contendo o gene *otsB* foi denominado pCR-OTSB e possui um tamanho aproximado de 4,7 kb.

*Legenda:* pUC ori: origem de replicação do plasmídeo pUC; lacZ: gene *lacZ* que codifica a  $\beta$ -galactosidase; *otsB*: gene *otsB* que codifica a trealose-6-fosfato fosfatase; F1 ori: origem de replicação do fago F1; Kanamycin: gene que confere resistência ao antibiótico canamicina; Ampicillin: gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina.

#### 4.2.3 SEQUENCIAMENTO DO GENE *otsB* CONTIDO NO PLASMÍDEO pCR-OTSB

O inserto do plasmídeo pCR-OTSB, contendo o gene *otsB*, foi completamente sequenciado para verificação de possíveis erros de inserção de base durante a amplificação do gene.

Para tanto, foram utilizados os iniciadores do vetor pCR2.1 e os iniciadores previamente desenhados para o gene *otsB*. A reação foi realizada como descrito no item 3.14. A comparação dos resultados do sequenciamento com a sequência anotada no genoma não revelou alterações de bases (APÊNDICE I), permitindo assim proceder para as etapas subsequentes.

#### 4.2.4 CLONAGEM DO GENE *OTSB* NO VETOR pET-28a

O gene *otsB* foi removido do plasmídeo pCR-OTSB por restrição com as enzimas NdeI e HindIII e purificado, segundo protocolo citado no item 3.16. A reação de ligação ao vetor pET-28a procedeu-se como descrito no item 3.17. Após a ligação, a mistura foi eletrotransformada na estirpe TOP10 de *E.coli* e os clones foram selecionados em placas de meio LA contendo canamicina nas concentrações previamente descritas. O DNA plasmidial dos transformantes foi isolado e a inserção do gene *otsB* no vetor foi confirmada por restrição com as enzimas NdeI e HindIII (tamanho do vetor: 5,3 kb; tamanho do inserto: 755 pb) no gel de agarose 1% (FIGURA 22), resultando no plasmídeo recombinante pET-OTSB (FIGURA 23).

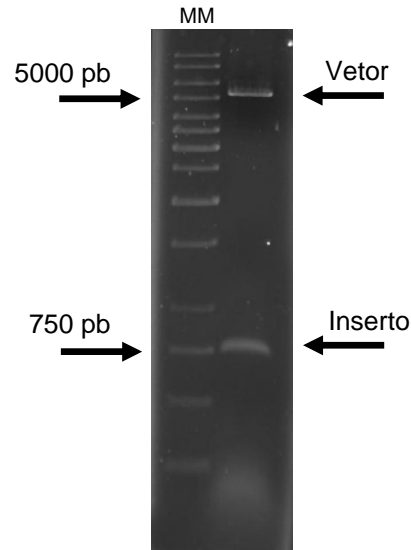


FIGURA 22. CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DO INSERTO NO VETOR pET-28a. O gene *otsB* foi removido do plasmídeo pCR-OTSB e ligado ao vetor linearizado pET-28a. O sucesso da reação foi confirmado por restrição com as enzimas NdeI e HindIII (tamanho do vetor: 5,3 kb; tamanho do inserto: 755 pb). MM: marcador molecular.

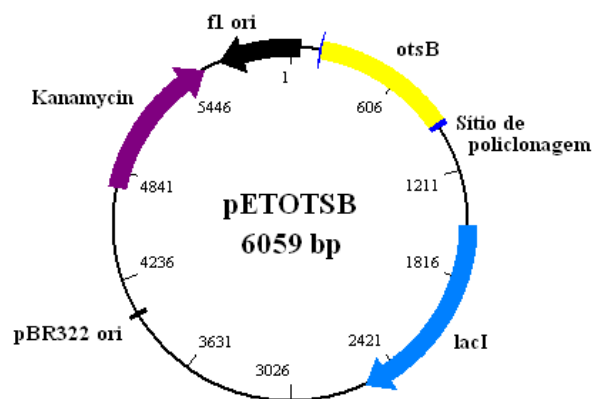


FIGURA 23. PLASMÍDEO pET-OTSB. O vetor pET-28a contendo o gene *otsB* foi denominado pET-OTSB e possui um tamanho aproximado de 6 kb.

*Legenda:* fl ori: origem de replicação do fago1; pBR322 ori: origem de replicação do plasmídeo pBR322; lacI: gene *lacI* que codifica a proteína LacI inibidora da transcrição da RNA polimerase T7; *otsB*: gene *otsB* que codifica a trealose-6-fosfato fosfatase; Kanamycin: gene que confere resistência ao antibiótico canamicina;

#### 4.2.5 SUPEREXPRESSÃO DA PROTEÍNA TREALOSE-6-FOSFATO FOSFATASE

Para uma análise inicial de expressão da proteína TPP, células de *E. coli* BL21(λDE3) pLysS foram eletrotransformadas com o plasmídeo pET-OTSB e a expressão do gene clonado no vetor foi induzida por IPTG (0,5 mmol/L) ou lactose (concentração final 0,5%) durante 4 horas (item 3.19). Como controle utilizou-se uma cultura de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pET-OTSB, sem a adição de indutores. As frações bruta, solúvel e insolúvel do extrato celular foram analisadas em géis SDS-PAGE 12%. Os perfis de expressão das frações são mostrados na FIGURA 24.

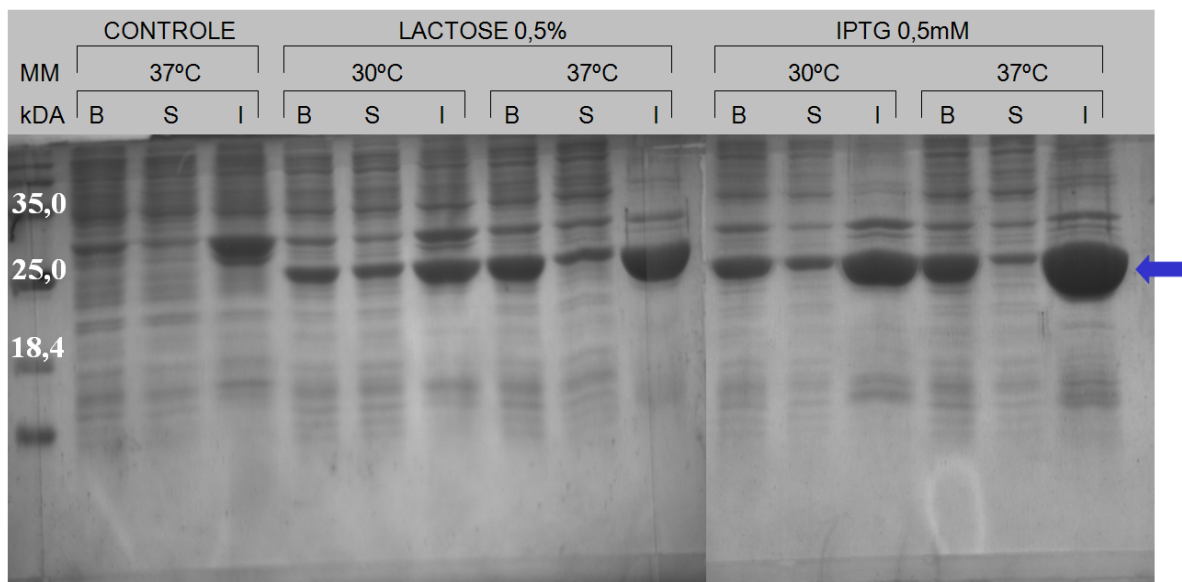


FIGURA 24. PERFIL ELETROFORÉTICO EM SDS-PAGE 12% DE PROTEÍNAS DO EXTRATO DE CÉLULAS *E. coli* BL21 CONTENDO O PLASMÍDEO pET-OTSB, INCUBADAS A 30°C E 37°C.

B = Extrato bruto; S = Fração solúvel; I = Fração insolúvel. A seta indica a proteína His-TPP, com aproximadamente 28kDa. Como controle utilizou-se uma cultura de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pET-OTSB, sem a adição de indutores.

Neste primeiro ensaio, observou-se que a banda mais concentrada do gel coincidia com o tamanho esperado da proteína His-TPP (aproximadamente 28kDa).

Notou-se também que a superexpressão foi satisfatória, entretanto a maior parte da proteína superexpressa concentrou-se na fração insolúvel independente do tipo de indutor, condição inadequada para os posteriores ensaios de purificação e caracterização enzimática.



Para tentar superexpressar na forma solúvel a proteína His-TPP, variou-se a temperatura de incubação durante a superexpressão (20°C) e prolongou-se o tempo de incubação da cultura (16 horas), em uma tentativa de proporcionar as condições ideais para o correto dobramento da proteína, tornando-a assim mais solúvel. Este novo ensaio mostrou resultados satisfatórios, pois resultou em aproximadamente 50% da proteína na fração solúvel (FIGURA 25), possibilitando assim a execução das etapas sucessivas.

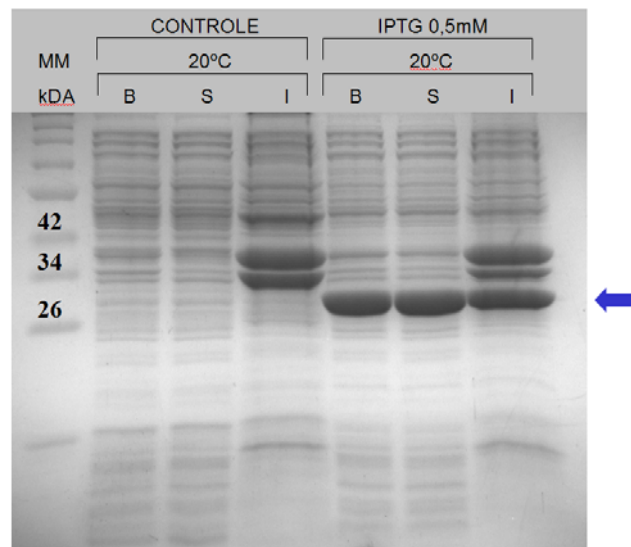


FIGURA 25. PERFIL ELETROFORÉTICO EM SDS-PAGE 12% DE PROTEÍNAS DO EXTRATO DE CÉLULAS *E. coli* BL21 CONTENDO O PLASMÍDEO pET-OTSB, INCUBADAS A 20°C. B = Extrato bruto; S = Fração solúvel; I = Fração insolúvel. A seta indica a proteína His-TPP. No controle não foi adicionado nenhum indutor.

Nesta nova tentativa de solubilização, utilizou-se também  $MgCl_2$  (concentração final 0,5 mmol/L) no tampão de sonicação, visto que outras enzimas da superfamília HAD utilizam o íon  $Mg^{2+}$  como cofator e os cofatores tendem a aumentar a estabilidade e solubilidade das proteínas *in vitro*.



#### 4.2.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TREALOSE-6-FOSFATO FOSFATASE

Esta etapa consistiu inicialmente na indução da superexpressão de 1 litro de cultura de *E.coli* contendo o plasmídeo pET-OTSB, nas condições estipuladas nos ensaios anteriores. A fração solúvel foi centrifugada e o sobrenadante livre de células foi aplicado na coluna de *chelating sepharose* carregada com Ni<sup>2+</sup> conforme detalhado no item 3.20. Após a purificação, as amostras compreendidas no pico cromatográfico observado no cromatograma da FIGURA 26 foram analisadas por gel de poliacrilamida (FIGURA 25), o qual mostrou bandas muito concentradas de proteína His-TPP purificada. A proteína His-TPP (pico apontado pela seta) foi eluída com aproximadamente 240 mmol/L de imidazol.

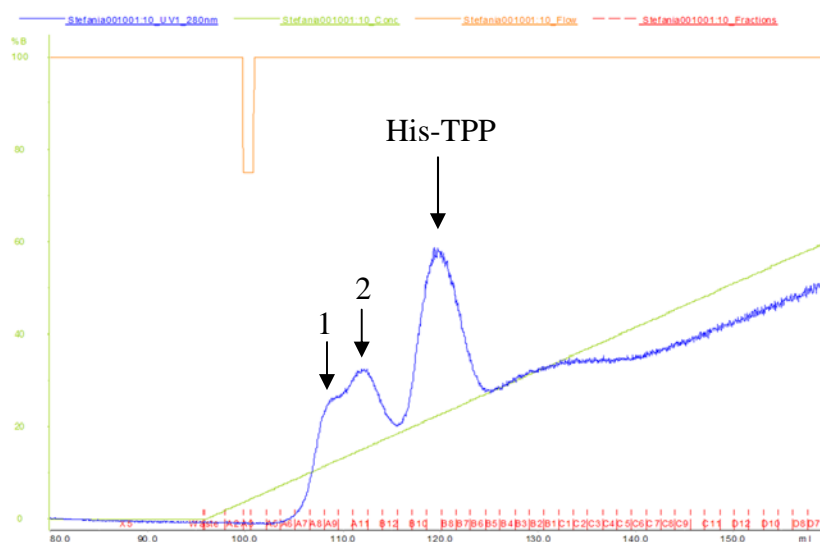


FIGURA 26. PERFIL DE ELUIÇÃO DA PROTEÍNA HIS-TPP. A seta indica o pico da proteína ao ser eluída com aproximadamente 240 mmol/L de imidazol. Os números 1 e 2 indicam picos formados por proteínas contaminantes (ver FIGURA 27). No eixo y, porcentagem de tampão B (200 mmol/L de NaCl; 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8.0; 1000 mmol/L de imidazol). No eixo x, volume de eluição em mL. Em azul, leitura da absorção a 280 nm. Em verde, gradiente de imidazol. As delimitações em vermelho indicam as amostras coletadas.

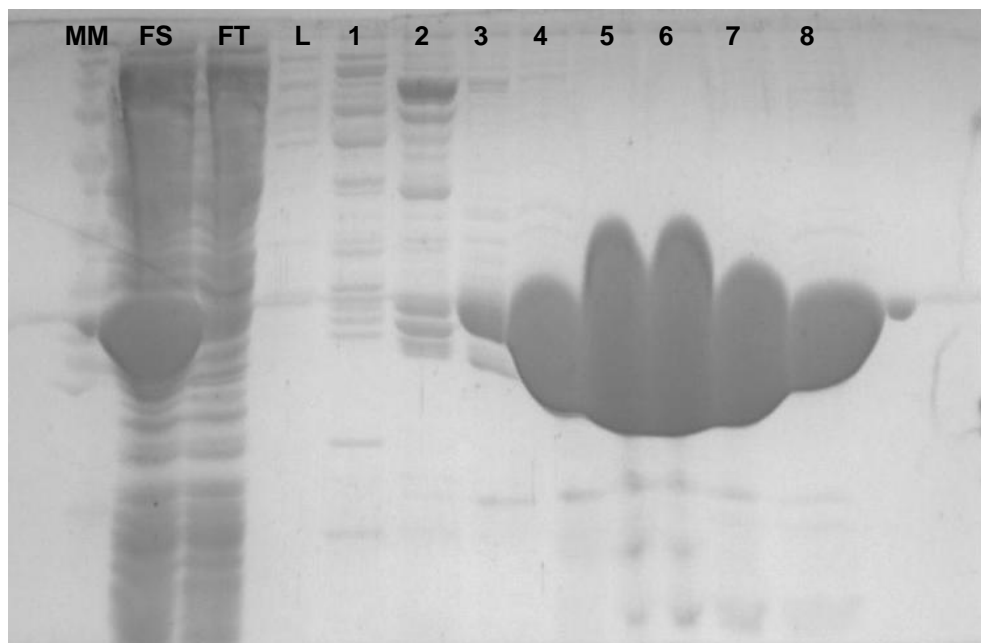


FIGURA 27. PERFIL ELETROFORÉTICO DE AMOSTRAS DA PROTEÍNA HIS-TPP APÓS PURIFICAÇÃO NA COLUNA DE *CHELATING SEPHAROSE* CARREGADA COM  $\text{Ni}^{+2}$ .

Em cada linha foram aplicados 10  $\mu\text{l}$  das frações. MM: padrão de massa molecular (kDa).

FS: fração de proteínas solúveis do extrato celular.

FT: fração de proteínas não adsorvidas na coluna Hi-trap Chelating  $\text{Ni}^{+2}$ ;

L: fração de proteínas eluídas com a lavagem da coluna após injeção da amostra.

Linha 1: fração contendo as proteínas eluídas com a concentração de imidazol do pico 1 da FIG. 19.

Linha 2: fração contendo as proteínas eluídas com a concentração de imidazol do pico 2 da FIG. 19.

Linhas 3 a 8: frações contendo a proteína His-TPP eluída com gradiente de imidazol.

Após a análise do gel acima, as amostras de 4 a 8 foram reunidas, e dialisadas a 4 °C por 12 horas em tampão D (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 0,5 mmol/L de  $\text{MgCl}_2$ ) para serem estocadas e utilizadas futuramente para a caracterização enzimática.

A concentração proteica da amostra foi estimada pelo método de Bradford (item 3.21) após a diálise, resultando em aproximadamente 1,5 mg/mL de proteína purificada. Vale ressaltar que a TPP não se manteve solúvel após a purificação, havendo precipitação de grande quantidade da proteína durante a diálise, o que levou a uma considerável diminuição da concentração final de proteína em relação as frações eluídas (FIGURA 27). Tal efeito pode ter sido causado pela elevada concentração de proteína purificada, o que teria favorecido interações proteína-

proteína e conseqüentemente induzido sua precipitação, principalmente quando estocada em baixas temperaturas.

O grau de pureza, estimado em aproximadamente 93 %, resultou da análise densitométrica de bandas da proteína purificada em diferentes concentrações, utilizando o programa VisionWorksLS Software do sistema de visualização UVP (BioImaging Systems) (FIGURA 28).

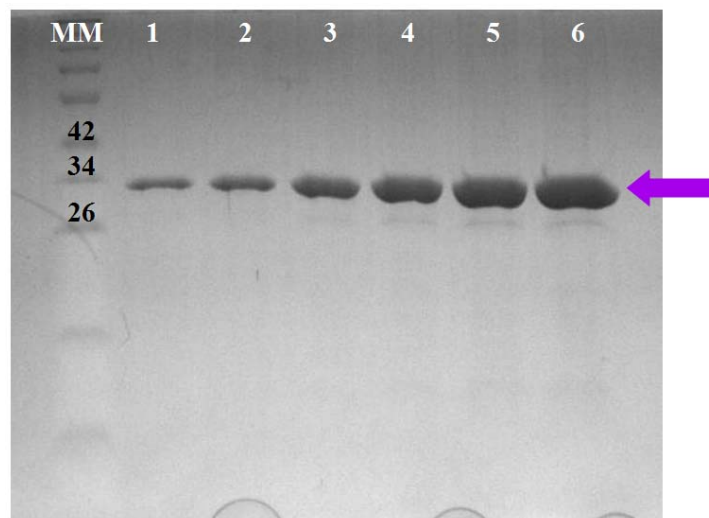


FIGURA 28. PERFIL ELETROFORÉTICO DE AMOSTRAS DIALISADAS DA PROTEÍNA HIS-TPP. MM: padrão de massa molecular (kDa). Linhas 1 a 6: frações contendo a proteína His-TPP eluída com gradiente de imidazol, após diálise, e em gradiente crescente de concentração (respectivamente 1, 2, 5, 10 e 20  $\mu\text{g}$  por poço). A seta indica a banda da proteína TPP fusionada à cauda de histidinas.

Apesar de ter purificado uma quantidade satisfatória de enzima para os subsequentes ensaios de atividade, é necessário destacar que a precipitação ocorrida após a diálise pode ter interferido na capacidade catalítica da TPP.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA TPP DE *Herbaspirillum seropedicae*

Tendo alcançado a produção da proteína TPP recombinante em *E. coli* e a sua purificação por cromatografia de afinidade, passou-se à caracterização da atividade enzimática. Os ensaios realizados objetivaram primeiramente a determinação dos parâmetros cinéticos da enzima, utilizando como substrato o *p*-nitrofenil fosfato (pNPP) conforme detalhado no item 3.22.1.

#### 4.3.1 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE REAÇÃO DA TPP DE *H. seropedicae*

O primeiro dado a ser obtido foi a temperatura ótima de reação para a enzima. Os ensaios de atividade foram realizados em três temperaturas: a 30°C, a temperatura de crescimento ideal de *H. seropedicae*; a 37°C, a temperatura padrão usada em ensaios enzimáticos; e a 50°C, a temperatura de reação ideal para a TPP de *T. acidophilum* (RAO *et al.*, 2006).

Os resultados mostraram que apesar de ser uma enzima de um organismo não termofílico, a TPP de *H. seropedicae* também possui maior atividade em altas temperaturas (FIGURA 29). Uma razão para tal observação seria que sob as condições de ação da enzima (estresse osmótico e de temperatura) é necessária uma atividade eficiente em temperaturas elevadas. Além disso, poderíamos supor que nas condições ótimas de crescimento de *H. seropedicae*, a TPP se encontraria em um estado quase latente, proporcionando assim um melhor controle da atividade para a célula.

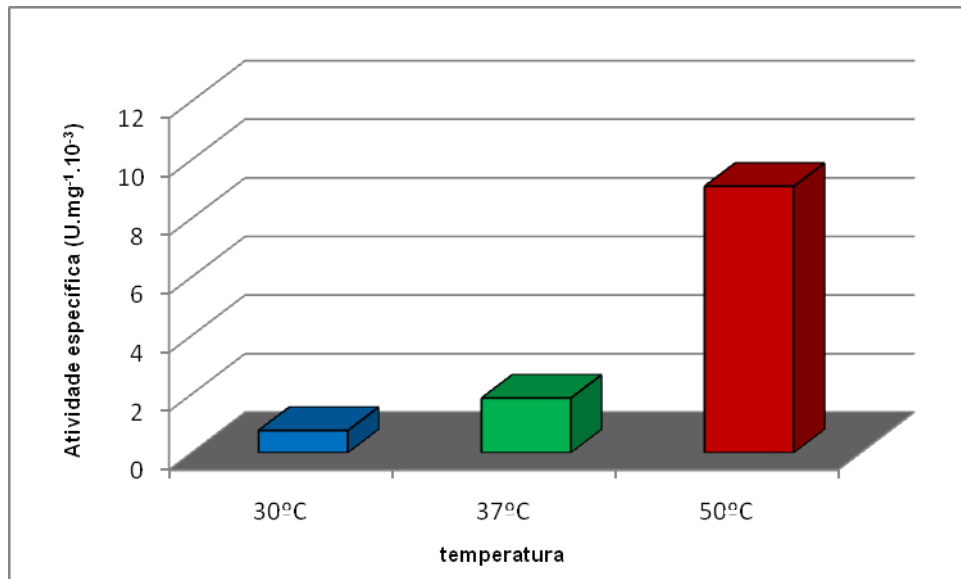


FIGURA 29. EFEITO DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE REAÇÃO EM TAMPÃO PIPES pH 6,1 NA TPP DE *H. seropedicae*.

#### 4.3.2 DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DE REAÇÃO DA TPP DE *H. seropedicae*

Outro dado importante para caracterizar a atividade da enzima foi determinar o pH ótimo de reação. Para os ensaios de atividade, foram utilizados tampões de diferentes composições e valores de pH (item 3.22.2). A maior atividade foi obtida com o tampão PIPES em pH 6,1 a 50°C (FIGURA 30).

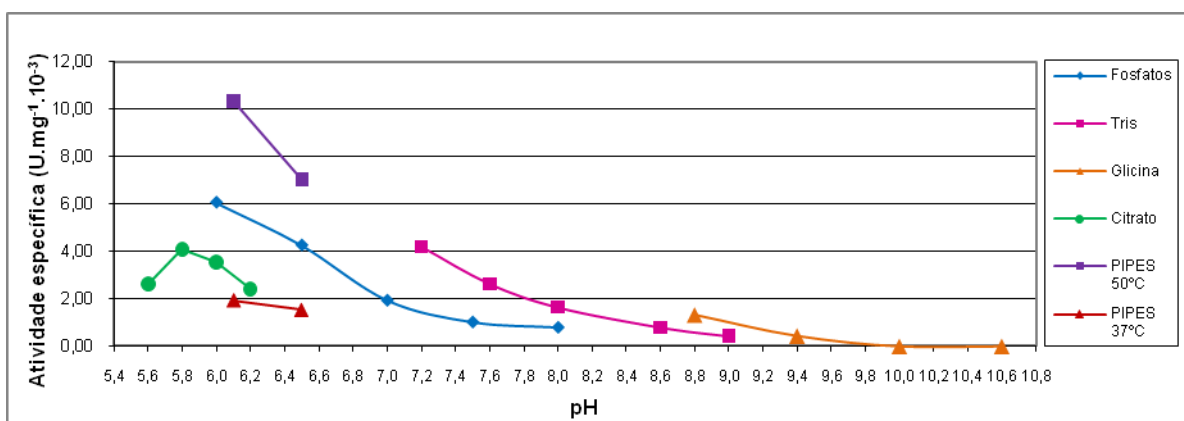


FIGURA 30. EFEITO DE DIFERENTES TAMPÕES E pHs NA ATIVIDADE DA TPP DE *H. seropedicae*.

#### 4.3.3 DETERMINAÇÃO DO $K_M$ DA TPP DE *H. seropedicae*

Uma vez determinados os parâmetros ideais de reação para a TPP, prosseguiu-se para a análise da afinidade da enzima pelo substrato utilizado (pNPP). O  $K_M$  da enzima foi determinado segundo protocolo descrito no item 3.22.3, e o gráfico da concentração de produto *versus* concentração de substrato está mostrado na FIGURA 31. Para o cálculo do  $K_M$ , foi necessário construir o gráfico duplo-recíproco dos dados obtidos com o ensaio da concentração de substrato. A partir da curva gerada, foi possível determinar que o valor de  $K_M$  da TPP de *H. seropedicae* é 2,5 mM de pNP (FIGURA 32).

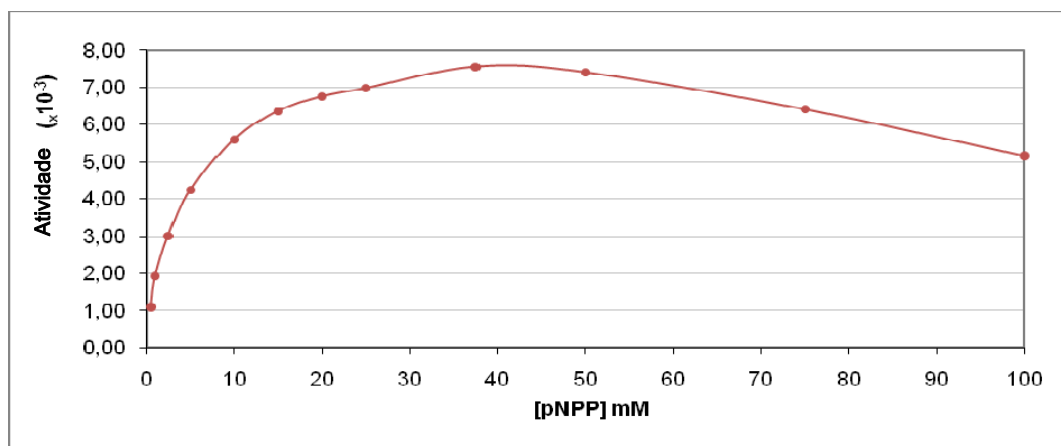


FIGURA 31. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DA TPP DE *H. seropedicae*, EM TAMPÃO PIPES pH 6,1 A 50°C.

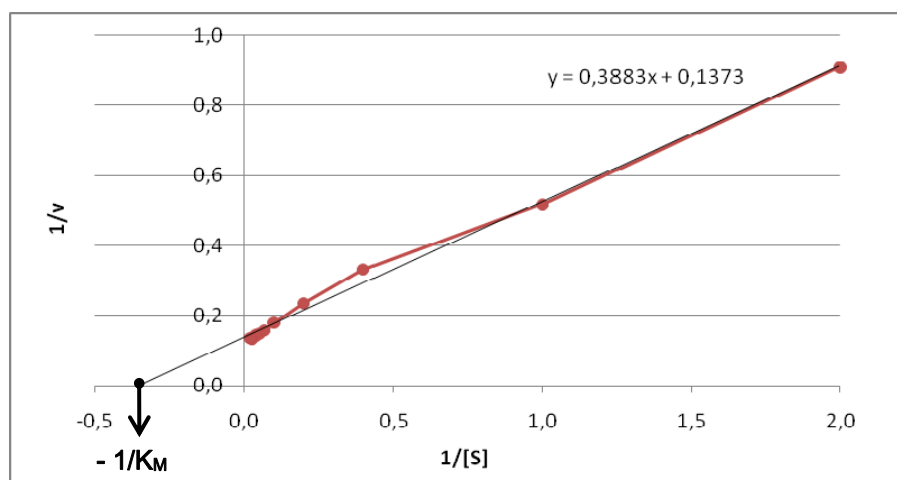


FIGURA 32. GRÁFICO DO DUPLO-RECÍPROCO. O  $K_M$  da enzima foi calculado a partir da equação da reta obtida por regressão linear.

#### 4.3.4 TERMOESTABILIDADE DA TPP DE *H. seropedicae*

Apesar de não se tratar de uma enzima de um organismo termofílico, assume-se que a atividade da TPP de *H. seropedicae* deva persistir frente a condições adversas do meio, como elevada temperatura, já que sua ação se faz necessária em ocasiões de estresse celular. Portanto, decidiu-se determinar a termoestabilidade da TPP para entender o comportamento da enzima em tais condições. Em um primeiro ensaio, a enzima foi incubada a 50°C por diferentes períodos de tempo, até um máximo de 30 minutos, e depois utilizada para os ensaios de atividade conforme protocolo descrito no item 3.22.4, para verificar se havia perda da atividade durante a reação. O resultado mostrou que houve pouca perda de atividade, pois mesmo após 30 min de incubação a enzima ainda manteve 86% de atividade residual (FIGURA 33).

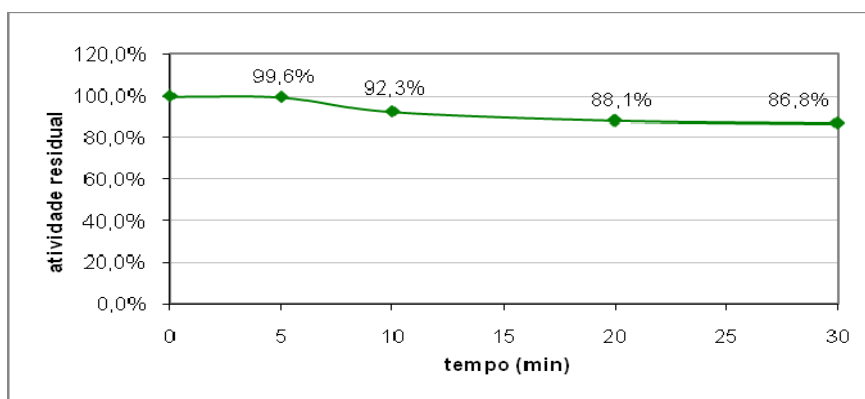


FIGURA 33. PERDA DA ATIVIDADE DA TPP DE *H. seropedicae* DURANTE A REAÇÃO. A enzima foi incubada a 50°C, em tampão PIPES pH 6,1, por diferentes períodos de tempo e depois foi utilizada para ensaios de atividade, verificando sua atividade residual.

A partir disso, tornou-se necessário averiguar se podia tratar-se de uma enzima termoestável. Neste segundo ensaio, a enzima foi incubada a diferentes temperaturas por 30 minutos. Como controle, utilizou-se uma amostra de enzima conservada em gelo (0°C). Os resultados deste ensaio indicaram que a TPP não pode ser rigorosamente classificada como termoestável. Entretanto, vale destacar a boa resistência em elevadas temperaturas, pois a enzima manteve parte de sua atividade a 60°C, condição muito além da capacidade de sobrevivência do organismo que a possui (FIGURA 34).

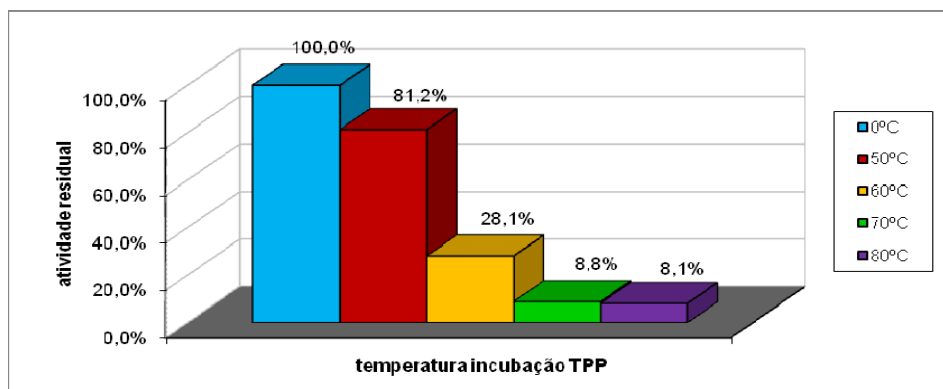


FIGURA 34. TERMOESTABILIDADE DA TPP DE *H. seropedicae*. A enzima foi incubada a diferentes temperaturas por 30 minutos, em tampão PIPES pH 6,1, e depois foi utilizada para ensaios de atividade, verificando sua atividade residual.

#### 4.3.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE $Mg^{2+}$ NA ATIVIDADE DA TPP DE *H. seropedicae*

Visto que o  $Mg^{2+}$  é o íon mais utilizado como cofator pelas enzimas pertencentes à superfamília HAD (BURROUGHS *et al.* 2006), decidiu-se verificar a atividade da TPP na presença de diferentes concentrações deste íon e na presença de um íon divalente, o  $Ca^{2+}$ .

O ensaio de atividade da TPP na presença de  $Mg^{2+}$  foi conduzido conforme detalhado no item 3.22.5, e apresentou resultados esperados, ou seja, quanto maior a concentração do  $Mg^{2+}$  no meio, maior a atividade da enzima (FIGURA 35).

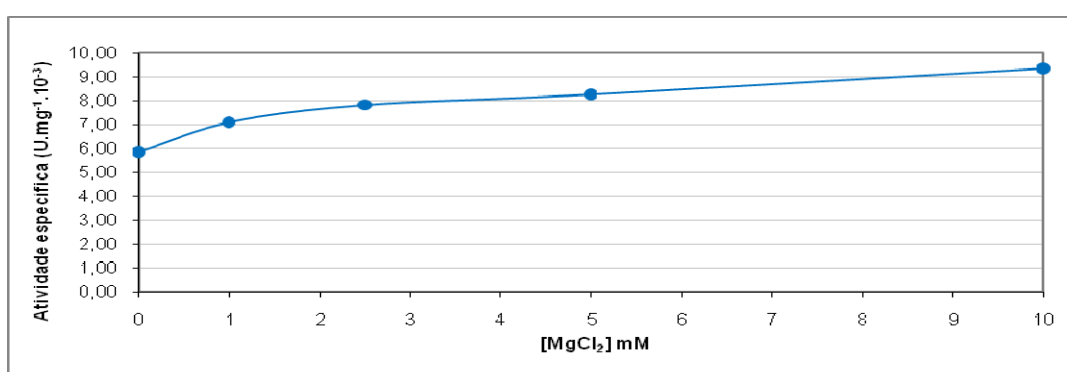


FIGURA 35. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE  $Mg^{2+}$  NA TPP DE *H. seropedicae*. A atividade da enzima foi determinada a 50° em tampão PIPES pH 6,1, em meios de reação contendo diferentes concentrações de  $Mg^{2+}$  até o máximo utilizado normalmente durante os ensaios (10 mM).



Ao se adicionar  $\text{Ca}^{2+}$  ao meio (item 3.22.5), a atividade da enzima foi diminuindo à medida que a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio aumentou (FIGURA 36). Outras enzimas como a fosfoglicolato fosfatases também apresentaram este efeito de inibição pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , sugerindo que o íon age como um inibidor competitivo em relação ao  $\text{Mg}^{2+}$  para a ligação do substrato ao sítio ativo (KIM *et al.*, 2004; MAMEDOV *et al.*, 2001). Na TPP, o  $\text{Ca}^{2+}$  estaria gradativamente substituindo o  $\text{Mg}^{2+}$  no sítio ativo, inibindo assim a atividade da TPP ao diminuir sua afinidade pelo substrato. Esta inibição poderia ser revertida ao acrescentar  $\text{Mg}^{2+}$  ao meio.

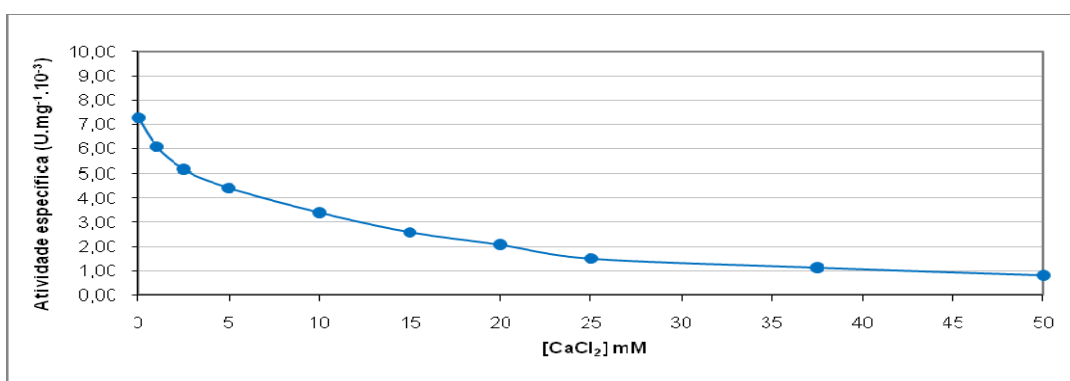


FIGURA 36. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE  $\text{Ca}^{2+}$  NA TPP DE *H. seropedicae*. A atividade da enzima foi determinada em meios de reação contendo diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 5. CONCLUSÕES

Os genes para a biossíntese de trealose são extremamente importantes para a sobrevivência de um organismo em condições de estresse osmótico, dada a função protetora do metabólito final, o dissacarídeo trealose. Por esta razão, os genes que codificam as enzimas trealose-6-fosfato sintase e trealose-6-fosfato fosfatase estão amplamente distribuídos nos diversos reinos de seres vivos. Entretanto, em alguns organismos, como as plantas, a quantidade de trealose sintetizada não é suficiente para protegê-las de situações de estresse osmótico extremo. A sensibilidade a estresse osmótico acarreta em um enorme prejuízo na produção de vegetais de interesse econômico, como cana-de-açúcar, arroz, sorgo, entre outros. A superexpressão dos genes da via de síntese da trealose nas células vegetais proporcionaria um acúmulo do açúcar no meio intracelular, aumentando a eficiência de proteção às macromoléculas e conseqüentemente aumentando a resistência do vegetal, garantindo assim uma alta produtividade para os agricultores.

A bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* possui estes genes, mas antes de utilizar técnicas biotecnológicas para introduzi-los e superexpressá-los em plantas, é necessário caracterizar as proteínas codificadas para confirmar a sua função. Por este motivo, este trabalho teve como foco a clonagem, superexpressão e caracterização do gene *otsB* da via de biossíntese da trealose, que codifica a trealose-6-fosfato fosfatase.

As principais conclusões deste trabalho, baseadas em seus objetivos, são:

- 1) A ORF HS282.0645 de *Herbaspirillum seropedicae*, denominada *otsB*, é um gene que codifica a enzima trealose-6-fosfato fosfatase (TPP).
- 2) O modelo estrutural tridimensional gerado *in silico* para a TPP mostrou que esta enzima possui diversas semelhanças com outros membros da superfamília HAD, além de possuir uma região *cap* do tipo C2, constituída de uma folha- $\beta$  de 4 fitas e 2  $\alpha$ -hélices, e um domínio central com dobras  $\alpha/\beta$ -hidrolase (tipo Rossmann), como também observado em *T. acidophilum*.

- 3) A comparação do sítio catalítico das proteínas TPP de *H. seropedicae* e *T. acidophilum* mostrou a mesma composição e distribuição espacial de aminoácidos, com exceção da substituição de uma treonina em *T. acidophilum* por uma serina em *H. seropedicae*.
- 4) A proteína TPP mostrou-se insolúvel quando superexpressa a 30° e a 37° por 4 horas, e mais solúvel, mas não completamente, quando superexpressa a 20°C *overnight* (16 horas).
- 5) A proteína TPP foi purificada através de cromatografia de afinidade por interação com Ni<sup>2+</sup> em elevado grau de pureza (93%).
- 6) A atividade máxima para a TPP foi obtida na temperatura de 50°C, em tampão PIPES pH 6,1, com aproximadamente 40 mmol/L de substrato (pNPP).
- 7) O K<sub>M</sub> determinado para a enzima TPP, utilizando pNPP como substrato, foi de aproximadamente 2,5 (mmol/L).
- 8) A atividade da TPP mostrou-se dependente de Mg<sup>2+</sup>, indicando ser este o provável cofator da enzima.
- 9) A presença de Ca<sup>2+</sup> no tampão de reação da enzima causou diminuição de sua atividade, sugerindo inibição competitiva.
- 10) Os ensaios de termoestabilidade mostraram que a TPP não pode ser considerada uma enzima termoestável, entretanto manteve quase 30% de atividade residual quando incubada a 60°C.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAVIND, L., GALPERIN, M. Y. & KOONIN, E. V. The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. **Trends Biochem. Sci.** 23, 127–129, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254 1976.

BRASIL. SECRETARIA DE IMPRENSA E DE COMUNICAÇÃO SOCIAL. Blog do Planalto. **Mais informações sobre o evento do ZAE Cana.** Brasília, 17 set. 2009. Disponível em: <http://blog.planalto.gov.br/drops-do-zae-cana/>. Acesso em: 17/10/2009.

BURROUGHS AM, ALLEN KN, DUNAWAY-MARIANO D, ARAVIND L. Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes. **J Mol Biol.** 361(5):1003-34, 2006.

GARG AK, KIM JK, OWENS TG, RANWALA AP, CHOI YD, KOCHIAN LV, WU RJ. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Proc Natl Acad Sci USA** 99:15898–15903, 2002

GE LF, CHAO DY, SHI M, *et al.* Overexpression of the trehalose-6-phosphate gene OsTPP1 confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. **Planta**, v. 228(1), p. 191-201, 2008

IAC. SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA. Zoneamento agrícola do Estado de São Paulo. **São Paulo**; 1974. v. 1.

KARIM *et al.* Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. **Plant Molecular Biology** 64(4): 371-386, 2007

KIM Y, YAKUNIN AF, KUZNETSOVA E, XU X, PENNYCOOKE M, GU J, CHEUNG F, PROUDFOOT M, ARROWSMITH CH, JOACHIMIAK A, EDWARDS A, CHRISTENDAT D. Structure- and function-based characterization of a new phosphoglycolate phosphatase from *Thermoplasma acidophilum*. **J Biol Chem.** 279(1): 517–526, 2004.

KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In BROWN, T. A., **Essential Molecular Biology: A Practical Approach**, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, p.185-208, 1991.

KOONIN, E. V., TATUSOV, R. L. Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search. **J. Mol. Biol.** 244, 125–132, 1994.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.

LEYMAN B, VAN DIJCK P, THEVELEIN JM. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. **Trends Plant Sci** 6:510–513, 2001

MACEDO JC, SEABRA JEA, SILVA JEAR. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, 32, 582-595, 2008.

MACHADO, I. M. P.; YATES, M.G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29: 1599-1602, 1996.

- MAMEDOV, T. G., SUZUKI, K., MIURA, K., KUCHO, K.-I., FUKUZAWA, H. Characteristics and Sequence of Phosphoglycolate Phosphatase from a Eukaryotic Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **J. Biol. Chem.** 276, 45573–45579, 2001.
- MERZENDORFER H, ZIMOCH L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **J. Exp. Biol.** 206:4393–412, 2003.
- MORAIS, M. C., ZHANG, W., BAKER, A. S., ZHANG, G., DUNAWAY-MARIANO, D. & ALLEN, K. N. The crystal structure of *Bacillus cereus* phosphonoacetaldehyde hydrolase: insight into catalysis of phosphorus bond cleavage and catalytic diversification within the HAD enzyme superfamily. **Biochemistry**, 39, 10385–10396, 2000.
- PAUL, M.J., PRIMAVESI, L.F., JHURREEA, D. AND ZHANG, Y. Trehalose Metabolism and Signaling. **Annu. Rev. Plant Biol.** 59:417–41, 2008.
- RAO S, ROSSMANN M. Comparison of super-secondary structures in proteins. **J Mol Biol.** 76 (2): 241–56, 1973.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SOUZA , E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Canadian Journal of Microbiology**. 37(6):425-429, 1991.
- WINGLER A *et al.* The function of trehalose biosynthesis in plants. **Phytochemistry** 60:437–440, 2002

APÊNDICE I – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DO PLASMÍDEO pCR-OTSB CONTENDO O GENE *otsB* DE *H. seropedicae* (PROGRAMA CLUSTAL W). **18417\_1REV\_**=iniciador reverse *otsB*; **18415\_1R\_**=iniciador reverso pCR2.1; **OTSB**=sequência original da TPP de *H. seropedicae* do banco de dados GENOPAR; **18414\_1U\_**=iniciador universal pCR2.1; **18416\_1FOR\_**=iniciador forward *otsB*.

**CLONE 1** CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

18417_1REV_      TNNNCCNCGGAANNNGNNAATNCNNNGNTACNCCNAGGNTTGGANCNGGNTNGGAACCAA 60
18415_1R_       -----NCNNNTANAANANATNNTNNAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCAC 44
OTSB            -----
18414_1U_       -----
18416_1FOR_     -----

18417_1REV_      TN-TANCCNCCGCCA-TTTNNTNGGATTTGGNTCAAAAAANA--GNNGGANNANACTCC 116
18415_1R_       TAGTAACTGGGCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCAAAACATATGACTTGAGCAAACTCG 104
OTSB            -----ATGACTGAGCAAACTCG 17
18414_1U_       -----
18416_1FOR_     -----GCNNNTNNNNNANNCTT 17

18417_1REV_      CCCCANGAATTTTNCNGCCGANNTTNAATTNTTG-ATTTGGACGGNACTTTTGTNGACCG 175
18415_1R_       CCCCACGATGTTGCTGCCGATGCGTTATTTCTGGATTTGAAAGGCACGCTGGTTCGAAC 164
OTSB            CCCCACGATGTTGCTGCCGATGCGTTATTTCTGGATTTGAAAGGCACGCTGGTTCGAAC 77
18414_1U_       -----ACNATTTTGTCTCCCGA-ANGNTNTTTTNTGGATTTTNGCGGCNACGTNTTGNAC 54
18416_1FOR_     NNNNNNNNNNTGNNNNGCGATGCGTNAATTTCTGGATTTGAAAGGCACGCTGGTTCGAAC 77
                    ***          ** * * * * * * * * * * * * * * * *

18417_1REV_      GGCGCCACAACCNGAAGGGATGTGNTCCCGCA-AGAACTGATCANCNTTTTTTGNACAAA 234
18415_1R_       GGCGCCACAGCCCGAAGGGATGTTGGTGCCGCC-AGAACTTATCAGCTGTTT-GCAGCAG 222
OTSB            GGCGCCACAGCCCGACGGGATGTTGGTGCCGCC-AGAACTGATCAGCTGTTT-GCAGCAG 135
18414_1U_       GGCNC-ACNACCCCAAGGGATGTGTTGCCCGCCAGAACTGATCACCCTTTC-ANCA-AA 111
18416_1FOR_     GGCGCCACAGCCCGACGGGATGTTGGTGCCGCC-AGAACTGATCAGCTGTTT-GCAGCAG 135
                    *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

18417_1REV_      AAACAATTGGAATCGGACGNCGNNTG-CNATTTGTAAGCGGCGGCCCTTGAACCAGT 293
18415_1R_       ATACAACCTGGAATCGGACGGNGCGCTGGCCATTGGTCAGCGGGCGGCC- TGGAACAAC 281
OTSB            ATACAACCTGGAATCGGACGGCGCGCTGGCCATT-GTCAGCGGCGGCCCTTGGACCAGCT 194
18414_1U_       ANACAACCTTGAATCGG-CGGCGCGNTGGCCATT-TTAAACCGCCGGGCCCTTGGACCAGT 169
18416_1FOR_     ATACAACCTGGAATCGGACGGCGCGCTGGCCATT-GTCAGCGGCGGCCCTTGGACCAGCT 194
                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

18417_1REV_      TGATTTNTTACCCCTNTGCGCCTGCCGCGGTTGGCGTGCATGGCGCCGAGCNC 353
18415_1R_       CGACTTCTTCTACCCCG-CTGCCCTGCCGCGGCTGGCGTGCATTTGCCCGA-CGCC 339
OTSB            CGACTTCTTCTAGCCCGCTGCGCCTGCCGCGGCTGGCGTGCATGGCGCCGCGCG 254
18414_1U_       GGATTTNTTCTAACCCCGCTGCGCCTGCCGCGGNTGGCGTGCATGGCNCAGCNC 229
18416_1FOR_     CGACTTCTTCTAGCCCGCTGCGCCTGCCGCGGCTGGCGTGCATGGCGCCGAGC 254
                    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

18417_1REV_      CACCNCCGATGGCNCATTTCNTGCGCAAGCCGGTGCCGAACGTGCAAGCACT-TGCGNG 412
18415_1R_       CANCGCCCATTTGCCGCAT-CCTGCANCAN-CCGGTGCCGGACGTGCA-GCACC-TGCGCG 395
OTSB            CACCNCCGATGGCCGCAT-CCTGCAGCAG-CCGGTGCCGGACGTGCA-GCACC-TGCGCG 310
18414_1U_       CACCNCCGATGGCCGANTCTTGCGCCACCCCGTGCAGAACGTGCA-GCACCCTGCNCG 288
18416_1FOR_     CACCNCCGATGGCCGCATCCT-GCAGC-AGCCGGTGCCGGACGTGCA-GCACC-TGCGCG 310
                    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

18417_1REV_      AGCGCTGCTGCCNTGGTCGACTCCCATTCGGCTTGNAACTG-AACTAAA-GCGCGG- 469
18415_1R_       ANCGCTGCTGCCCT-GGTCAANT--CCATTCCGGCTTCAAATGGAAC TCAA-GCGCGG- 450
OTSB            AGCGCTGCTGCCCTGGTCGACTCCCATTCGGCTTGCAACTGGAAC TCAA-GCGCGG- 368
18414_1U_       AGCGCTGCTGCCCTGGTCGACTCCCATTCGGCTTGCAACTGGAAC TCAAAGCGCGG- 348
18416_1FOR_     AGCGCTGCTGCCCTGGTCGACTCCCATTCGGCTTGCAACTGGAAC TCAA-GCGCGG- 368
                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

18417_1REV_      CGCGCTGGCCCTGCATTACCGCCA-CGCCGCCATCTCGAGCAGCGCTGCGTGGACACCA 528
18415_1R_       NGCGCTGGCCCTGCATTACCGCCA-NGCCGGCCATCTCGAGCAG-GCTGCGTGGACANCA 508
OTSB            CGCGCTGGCCCTGCATTACCGCCA-CGCCGCCATCTCGAGCAGCGCTGCGTGGACACCA 427
18414_1U_       CGCGCTGNCCCTGCATTACCGCCAACGCCGCCATCTCGAGCAGCGCTGCGTGAACACCA 408

```

```

18416_1FOR_ CGCGCTGGCCCTGCATTAC-GCCA-CGCCGCCCATCTCGAGCAGCGCTGCGTGGACACCA 426
*****
18417_1REV_ ATGATGGAGGCGCTGCGCCACGAACCCGNTTTCACCCCTGCTGCACGGCAAGATGGTGGT- 587
18415_1R_ -TGATGGAGGCGCTGCGCCACGAANCGGTTTCACC-TGCTGCAANGNAAAAANTGTGGT- 565
OTSB -TGATGGAGGCGCTGCGCCACGAACCCGGTTTCACCCCTGCTGCACGGCAAGATGGTGGT- 485
18414_1U_ -TGATG-AGGCGCTGCGCCACGAACCCGNTTTCACCCCTGCTGCACGGCAAGATGGTGGT- 465
18416_1FOR_ -TGATGGAGGCGCTGCGCCACGAACCCGGTTTCACCCCTGCTGCACGGCAAGATGGTGGT 485
*****

18417_1REV_ GGAAGCCAAGCCGCACATCAACAAGGGCGACGCCGTCGCCGCCCTTCCTGCACGAAGCCCC 647
18415_1R_ GGAAGCCAANCCGCACATNAACAANGNGAAGNCGTGCGCCGCTTTCTGCACGAANNCC- 624
OTSB GGAAGCCAAGCCGCACATCAACAAGGGCGACGCCGTCGCCGCCCTTCCTGCACGAAGCCCC 545
18414_1U_ GGAAGCCAAGCCGCACATCAACAAGGGCGACGCCGTCNCCGCCCTTCCTGCACGAAGCCCC 525
18416_1FOR_ GGAAGCCAAGCCGCACATCAACAAGGGCGACGCCGTCGCCGCCCTTC-TGCACGAAGCCCC 544
*****

18417_1REV_ GTTCCGCGGCGCTCGCCCGGTCTTTCATCGGTGACGACGTGACCGAT-GAGGCCGGATTTG 706
18415_1R_ GTTCCGNGGGCGTCGCCCGGTCTTINATCGGTNACAAATTAANCAAT-AAGCC--GATTTG 681
OTSB GTTCCGCGGCGCTCGCCCGGTCTTTCATCGGTGACGACGTGACCGAT-GAGGCCGGATTTG 604
18414_1U_ GTTCCGCGGCGCTCGCCCGTCTTTCATCGGTGACGACGTGACCGAT-GAGGCCGGATTTG 584
18416_1FOR_ GTTCCGCGGCGCTCGNCCGGTCTTTCATCGGTGAC-ACGTGAACGATTGAGGCCGGATTTG 603
*****

18417_1REV_ CCATCGCCAGGGCGAAGTCTTCGGCGGCTTGGGCATCAAGATCGGGCGCCGGTCCCACGC 766
18415_1R_ C-ATCGCCANGGG--AANTCTTCGGGGGNT-GGGNATNAANATCGGGGCCGG-CCCAC-C 735
OTSB CCATCGCCAGGGCGAAGTCTTCGGCGGCTTGGGCATCAAGATCGGGCGCCGGTCCCACGC 664
18414_1U_ CCATCGCCAGGGCGAAGTCTTCGGCGGCTTGGGCATCAAGATCGGGCGCCGGTCCCACGC 644
18416_1FOR_ CCATCGCCAGGGCGAAGTTTTTCGGGGCTTGGGCATCAAGATCGGGCGCCGGTCCCAC-C 662
*****

18417_1REV_ AGGCCTTGACGCGCCTGGCC-GATCCGGCCCGGGTG-CTGGGCCTGCTGCGCCAGAGGC 824
18415_1R_ AGGCTTGAAAGC---TTGCC-NATNCGGNCNGGGG-TTGG-CCTGNT-TGCCAAAANNT 788
OTSB AGGCCTTGACGCGCCTGGCC-GATCCGGCCCGGGTG-CTGGGCCTGCTGCGCCAGAGCGT 722
18414_1U_ AGGCCTTGACGCGCCTGGCC-GATCCGGCCCGGGTG-CTGGGCCTGCTGCGCCAGAGCGT 702
18416_1FOR_ ANGCCCTGN-GCGCCTGGNCCNATCGGGCCGGGGTGGCTGGGCCTGTTGCGCCAAA-CGT 720
*****

18417_1REV_ GTGGA-GTGCC---CTTTANNGANNNGN----- 848
18415_1R_ TGGAG-GTGGCACAACTCCGGATNACCGTANCT----- 820
OTSB GGAGGTGCGCAGCACCTCCGGATAA----- 747
18414_1U_ GGAGGTGCGCAGCACCTCCGGATAACCGTAAGCTTGGCAAGCCGAATCTGCAAGATATC 762
18416_1FOR_ GGAG-TGGGCANAC-TCCGGATAANCGTNAAGCTTGGGAAGCCAATTTTNG--ANATNTC 776
* * *

18417_1REV_ -----
18415_1R_ -----
OTSB -----
18414_1U_ CATCACACTGGCGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGT 822
18416_1FOR_ -ATTACACTGGNCGC-GNNCCAANATTGATTTTAAAGGGCCAATTCGCCCTNNNTGGAGT 834

18417_1REV_ -----
18415_1R_ -----
OTSB -----
18414_1U_ NANTNCCNNAACAAGNTTTCANNNGN 849
18416_1FOR_ TTTTTA----- 841

```