

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA PROTEÍNA HFQ DE
*Herbaspirillum seropedicae***

**CURITIBA
2008**

MARCO ANTONIO SEIKI KADOWAKI

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA PROTEÍNA HFQ DE
*Herbaspirillum seropedicae***

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências - Área Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadoras:

Prof^a. Dr^a. Maria Berenice R. Steffens

Prof^a. Dr^a. Rose Adele Monteiro

**CURITIBA
2008**

**Aos meus avós Shigehiro e Matsuno
Kadowaki.**

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui registrado meu especial agradecimento às minhas orientadoras e incentivadoras professora Maria Berenice Reynaud Steffens e professora Rose Adele Monteiro pela orientação, paciência e confiança que recebi desde meus primeiros passos na iniciação científica.

Ao Professor Fábio de Oliveira Pedrosa pelo apoio e incentivo depositados nas minhas viagens dedicadas à cristalização da proteína Hfq.

A professora Leda Satie Chubatsu e ao professor Emanuel Maltempi de Souza pelas opiniões, apoio e por terem me proporcionado amadurecer a minha pobre idéia do que é e do que significa Ciência.

A todos os professores do Núcleo de Fixação de Nitrogênio.

A Dona Marilza e a coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica.

Ao Programa GENOPAR pela sequência do gene *hfq* utilizada neste trabalho.

Aos queridos colegas da sala 279, pela amizade, discussões e excelente ambiente de trabalho: Alexandre, André, Giovana, Halisson, Juliana Osaki, Larissa Comarella, Larissa Tonelli e Marco Aurélio.

A Lilian Noindorf um especial agradecimento pela paciência, disponibilidade e por ter renovado meu olhar sobre biologia molecular.

Aos colegas do Núcleo de Fixação de Nitrogênio: Ana Claudia, Andressa, Anelis, Arnaldo, Camila, Daniela, Eduardo, Stefânia, Fabiane, Fernanda Pacheco, Geraldo, Giovani, Gustavo, Helisson, Juliana Inaba, Kerlly, Letícia, Luciano, Magda, Márcia, Marcelo Miller, Michelle Tadra, Michelle Torres, Patilene, Rafael Ioris, Rafael Eto, Renato, Tuca e Viviane.

Ao Valter pela dedicação aos problemas do laboratório e pelos momentos de descontração.

A Dona Ju e Roseli pelo imutável cuidado e carinho dedicado a todas as gerações de alunos que passaram pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio.

Ao Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa por ter aberto as portas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron a tão inexperiente estudante e ter me passado os seus conhecimentos sobre cristalização de proteínas.

A Andréia, Celisa, Camila e Jadson, pesquisadores do LNLS, pela amizade e apoio durante as minhas estadias em Campinas.

Ao Dr. Jorge Iulek, Dr^a Carolina Galvão, Rosana e Viviane pela amizade, hospitalidade e paciência nas minhas idas à UEPG.

Ao Dr. Lease da Johns Hopkins University pela gentileza em prontamente conceder alguns plasmídeos utilizados neste trabalho.

Aos meus pais Jacira e Taizoo Kadowaki.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
JUSTIFICATIVA.....	XV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO.....	1
1.2 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	2
1.3 sRNA.....	3
1.4 PROTEÍNA HFQ	7
1.5 FUNÇÃO DE CHAPERONA DA PROTEÍNA HFQ.....	12
1.6 EFEITO PLEIOTRÓPICO DE Hfq E ENVOLVIMENTO NA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.....	15
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE <i>hfq</i> DE <i>H. seropedicae</i>	19
3.2 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	20
3.3 MEIOS DE CULTURA, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ESTOQUE DOS MICRORGANISMOS.....	22
3.4 ANTIBIÓTICOS	24
3.5 MANIPULAÇÃO DE DNA.....	24
3.5.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>H. seropedicae</i> ...	24
3.5.2 REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR).....	25
3.5.3 CLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO	25
3.5.4 MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO POR LISE ALCALINA	26
3.5.5 SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	26
3.5.6 CLIVAGEM DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	27
3.5.7 LIGAÇÃO DNA INSERTO AO VETOR	27
3.6 PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES DE <i>E. coli</i>	27
3.7 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Hfq.....	28
3.8 ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	29

3.9 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA DA PROTEÍNA Hfq.....	29
3.10 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DA PROTEÍNA Hfq POR ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DE MASSA PELO MÉTODO MALDI-TOF/MS.....	30
3.10.1 DIGESTÃO DAS PROTEÍNAS E EXTRAÇÃO DE PEPTÍDEOS	30
3.10.2 ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS POR MALDI-TOF/MS.....	31
3.10.3 IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	31
3.11 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq DE <i>H. seropedicae</i>	31
3.11.1 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq NATIVA	32
3.11.1.1 CROMATOGRAFIA EM BUTIL-SEPHAROSE	32
3.11.1.2 CROMATOGRAFIA EM DEAE-SEPHAROSE	33
3.11.2 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq CONTENDO CAUDA DE HISTIDINAS	33
3.11.2.1 CROMATOGRAFIA EM HI-TRAP CHELATING Ni ⁺²	33
3.12 ESTOCAGEM DAS PROTEÍNAS	34
3.13 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA	34
3.14 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq A RNA	35
3.15 ENSAIO DE TRANSCRIÇÃO <i>in vitro</i> DE RNA.....	36
3.16 ENSAIO DE RETARDAMENTO DE BANDA EM GEL	37
3.17 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA Hfq DE <i>H. seropedicae</i>	37
3.17.1 ANÁLISE <i>in silico</i> DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA	37
3.17.2 ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA POR DICROISMO CIRCULAR.....	38
3.18 DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE OLIGOMERIZAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq	39
3.18.1 GEL FILTRAÇÃO	39
3.18.2 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS).....	40
3.19 CRISTALIZAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq NATIVA	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 ANÁLISE <i>in silico</i> DO GENE <i>hfq</i>	43
4.2 ANÁLISE <i>in silico</i> DA PROTEÍNA Hfq.....	50
4.3 ANÁLISE FUNCIONAL DA PROTEÍNA Hfq.....	55
4.3.1 CLONAGEM DO GENE <i>hfq</i> EM VETORES DE EXPRESSÃO	55
4.3.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Hfq	60
4.3.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA FUSIONADA A CAUDA DE HISTIDINAS... 67	
4.3.4 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq NATIVA	70
4.3.4.1 PURIFICAÇÃO POR INTERAÇÃO HIDROFÓBICA E TROCA IÔNICA .. 70	
4.3.5 ATIVIDADE DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq A PEQUENOS RNAS	77
4.4 DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE OLIGOMERIZAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq	82
4.5 ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA Hfq	85
4.6 ANÁLISE CRISTALOGRÁFICA DA PROTEÍNA Hfq.....	89
5. CONCLUSÕES	96
6. PERSPECTIVAS.....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS sRNAs	5
FIGURA 2 – MONÔMERO DA PROTEÍNA Hfq DE <i>S. aureus</i>	10
FIGURA 3 – ESTRUTURA DA PROTEÍNA Hfq DE <i>E. coli</i>	11
FIGURA 4 – FORMAS DE INTERAÇÃO ENTRE mRNA E sRNA PROMOVIDAS PELA PROTEÍNA Hfq.....	13
FIGURA 5 – ESQUEMA DAS REGIÕES DE INTERAÇÃO ENTRE O sRNA DsrA E O mRNA <i>RpoS</i> DE <i>E. coli</i>	14
FIGURA 6 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>hfq</i>	26
FIGURA 7 – PLACA PARA CRISTALIZAÇÃO EM GOTA SENTADA.....	41
FIGURA 8 – EQUIPAMENTO PARA CRISTALIZAÇÃO AUTOMATIZADA	42
FIGURA 9 – SEQUÊNCIA DE BASES DA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE <i>hfq</i> DE <i>H. seropedicae</i>	44
FIGURA 10 – SEQUÊNCIA DA REGIÃO CODIFICADORA DO PROVÁVEL OPERON <i>hfqhflXhflKhflC</i>	45
FIGURA 11 – PREDIÇÃO DO PROVÁVEL TERMINADOR DO OPERON <i>hfqhflXhflKhflC</i>	48
FIGURA 12 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES VIZINHOS A <i>hfq</i> NO GENOMA DE DIFERENTES MICRORGANISMOS	49
FIGURA 13 – ALINHAMENTO INDIVIDUAL DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS Hfq	51
FIGURA 14 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS Hfq	53
FIGURA 15 – ÁRVORE DE SIMILARIDADE ENTRE AS PROTEÍNAS Hfq.....	54
FIGURA 16 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>hfq</i> POR PCR COM GRADIENTE DE TEMPERATURA.....	56
FIGURA 17 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE CLONE pCR2.1 :: <i>hfq</i>	57
FIGURA 18 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE RESTRIÇÃO DO CLONE pKADO0	58
FIGURA 19 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pKADO1	59

FIGURA 20 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pKADO2	60
FIGURA 21 – ELETROFORESE DO EXTRATO BRUTO DA PROTEÍNA Hfq	61
FIGURA 22 – ESPECTRO DA RELAÇÃO m/z DA PROTEÍNA Hfq NATIVA.....	62
FIGURA 23 – RESULTADO DA SUBMISSÃO DAS RELAÇÕES m/z DA PROTEÍNA Hfq NATIVA.....	62
FIGURA 24 – ESPECTRO DA RELAÇÃO m/z DA PROTEÍNA Hfq FUSIONADA A CAUDA DE HISTIDINAS	63
FIGURA 25 – RESULTADO DA SUBMISSÃO DAS RELAÇÕES m/z DA PROTEÍNA Hfq FUSIONADA À CAUDA DE HISTIDINAS	64
FIGURA 26 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO TESTE DE EXPRESSÃO COM A PROTEÍNA Hfq NATIVA.....	65
FIGURA 27 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO TESTE DE EXPRESSÃO COM A PROTEÍNA Hfq FUSIONADA A CAUDA DE HISTIDINAS	66
FIGURA 28 – PERFIL DE ELUIÇÃO REFERENTE À PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq FUSIONADA A CAUDA DE HISTIDINAS	68
FIGURA 29 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE AMOSTRAS DA PROTEÍNA Hfq FUSIONADA A CAUDA DE HISTIDINAS	69
FIGURA 30 – PERFIL DE ELUIÇÃO DA PURIFICAÇÃO EM BUTIL-SEPHAROSE	72
FIGURA 31 – ELETROFORESE DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq NATIVA.....	73
FIGURA 32 – CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO EM DEAE-SEPHAROSE.....	74
FIGURA 33 – ELETROFORESE DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq NATIVA.....	75
FIGURA 34 – ELETROFORESE DA PROTEÍNA Hfq NATIVA APÓS CONCENTRAÇÃO	76
FIGURA 35 – TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i> DO SRNA DSRA E DO mRNA RpoS PELO MÉTODO <i>RUN-OFF</i>	79
FIGURA 36 – ENSAIO DE RETARDAMENTO DE BANDA PELA INTERAÇÃO Hfq-DsrA (sRNA).....	80
FIGURA 37 – MODELO DA INTERFERÊNCIA ESTRUTURAL CAUSADA PELA PRESENÇA DA CAUDA DE HISTIDINAS.....	81
FIGURA 38 – DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DE Hfq POR CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO	83

FIGURA 39 – ENSAIO DE DLS DA PROTEÍNA Hfq.....	84
FIGURA 40 – PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA Hfq	86
FIGURA 41 – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD) DA PROTEÍNA Hfq	87
FIGURA 42 – ENOVELAMENTO E VARIAÇÃO DA TEMPERATURA	87
FIGURA 43 – PORCENTAGEM DE ESTRUTURA ESCUNDÁRIA AO LONGO DA VARIAÇÃO DE TEMPERATURA	88
FIGURA 44 – <i>SCREENING</i> INICIAL DE CRISTALIZAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq.....	90
FIGURA 45 – PADRÕES DE DIFRAÇÃO DOS CRISTAIS DA PROTEÍNA Hfq	92
FIGURA 46 – DIFRAÇÃO DA PROTEÍNA HFQ A 2.7Å DE RESOLUÇÃO	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PEQUENOS RNAs DE <i>E. coli</i>	6
TABELA 2 – PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE Hfq EM DIFERENTES FILOS BACTERIANOS	9
TABELA 3 – LISTA DE ESTIRPES DE BACTÉRIAS UTILIZADAS	20
TABELA 4 – LISTA DE PLASMÍDEOS UTILIZADOS	21
TABELA 5 – PASSOS DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq NATIVA.....	71
TABELA 6 – LEVANTAMENTO DA PORCENTAGEM DE GOTAS LÍMPIDAS REGISTRADAS NO <i>SCREENING</i> INICIAL	89
TABELA 7 – COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES DE PRECIPITAÇÃO DOS CRISTAIS PROTÉICOS.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: 5' trifosfato de 2' desoxiadenosina

ATPase: Adenosina trifosfatase

BSA: Soro albumina bovina

CD : Dicroísmo Circular

DEAE : Dietilaminoetil

ΔG : Variação de energia livre

DEPC : Dietilpirocarbonato

DLS : *Dynamic Light Scattering*

dNTPs : 5' trifosfato de 2' desoxinucleotídeo

D.O. : Densidade óptica

EDTA : Ácido etilenodiamino-tetra-acético

GTPase : Guanosina trifosfatase

IPTG : β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo

K_{AV} : Constante de partição

Kb : Kilopares de base

kDa : Kilo Daltons

k Ω : Kilo Ohms

kV : Kilo Volts

L : Litro

L_{Sm} : Sm like

m/z : Razão massa por carga

MALDI-TOF/MS : *Matrix Assisted Light Desorption Ionization-Time of Flight/ Mass Spectroscopy*

MES : Ácido 2-[N-Morfolino]-etanosulfônico

μ F : Micro Faraday

MMT : MES / Ácido L-Malico / TRIS

mRNA : RNA mensageiro

MW : *Molecular weight*

PAGE : *Polyacrilamide Gel Electrophoresis*

PAPI : Poli(A) Polimerase I
pb : Pares de base
PCB : Propionato de sódio / Cacodilato trihidratado de sódio / Bis-Tris propano
PCR : *Polimerase Chain Reaction*
PEG : Polietilenoglicol
PNP : Polinucleotídeo fosforilase
PMSF : Fluoreto de fenilmetilsulfonil
ppm : Partes por milhão
PSIPRED: *Position Specific Iterated Prediction*
RBS : *Ribosome binding site*
RNA : Ácido ribonucleico
RNase : Ribonuclease
rpm : Rotações por minuto
SDS : Dodecilsulfato de sódio
SPG : Ácido succínico / Dihidrogeno fosfato monohidratado de sódio /Glicina
sRNA : *Small RNA*
TBE : Tris / Borato / EDTA
TFA : Ácido Trifluoro-acético
T_m : *Melting point*
Tris : Tris(hidroximetil)-aminometano
UV : Ultra violeta
w/v : Razão massa por volume
VC : Volumes de Coluna

RESUMO

A proteína Hfq, considerada pleiotrópica e com função de chaperona de RNA, tem sido amplamente estudada devido a sua importância na regulação pós-transcricional em várias bactérias. Neste trabalho foram caracterizados o gene e a proteína Hfq de *Herbaspirillum seropedicae*, uma bactéria diazotrófica que se associa a importantes culturas agrícolas. O gene *hfq* foi amplificado a partir do DNA genômico de *H. seropedicae* e clonado nos vetores de expressão pT7-7 e pET28(a), resultando nos plasmídeos pKADO1 e pKADO2 que permitiram expressar a proteína nas suas formas nativa e fusionada a cauda de histidinas respectivamente. A proteína Hfq foi purificada por cromatografia de afinidade (forma fusionada) usando a coluna *Hitrap-chelating* Ni²⁺ ou pelas cromatografias de interação hidrofóbica e troca aniônica (forma nativa) usando as colunas butil-Sepharose e DEAE-Sepharose respectivamente. A proteína Hfq-His foi purificada com 90 % de pureza final e a nativa alcançou 99 % de pureza. As duas formas da proteína Hfq apresentaram atividade de ligação ao sRNA DsrA de *Escherichia coli* quando analisadas em ensaios de retardamento de banda. A proteína nativa apresentou uma maior afinidade pelo sRNA do que a forma fusionada, sugerindo uma possível alteração da conformação do oligômero devido a presença da cauda de histidinas. Hfq foi também analisada através das técnicas de dicroísmo circular (CD) e espalhamento de luz dinâmico (DLS). O espectro de CD na região de UV distante indicou a predominância de fitas beta em relação aos demais tipos de estrutura secundária como já reportado na literatura para a Hfq de outros microrganismos. O experimento de DLS mostrou uma amostra monodispersa com 48 kDa, dado indicativo de uma conformação hexamérica final que foi confirmada por experimentos de gel-filtração. Ensaios de cristalização automatizada por difusão de vapor em gota sentada resultaram na formação de cristais em diversas condições, após três dias. A difração por raios-X, utilizando um gerador de raios-X Rigaku, confirmou a presença de vários cristais constituídos de proteínas. Uma das condições de cristalização, 100 mM de PCB pH 7,0 e 25 % (w/v) PEG1500, permitiu a formação de um cristal que difratou a uma resolução de 2.7 Å.

ABSTRACT

Hfq, an RNA chaperone and pleiotropic protein, is recognized as an important protein involved in the post-transcriptional regulation in several bacteria. In this work, we analyzed the *hfq* gene and its product from *Herbaspirillum seropedicae*, a diazotrophic bacterium found associated to important agricultural crops. The *H. seropedicae hfq* gene was amplified from genomic DNA and cloned into the expression vectors pT7-7 and pET28(a), yielding plasmids pKADO1 and pKADO2. These allowed the over-expression of the Hfq protein in its native and His-tagged forms, respectively. The Hfq protein was purified either by affinity chromatography (His-tag Hfq) using HiTrap-Chelating $-Ni^{2+}$ column or by hydrophobic interaction and anion exchange chromatography (native Hfq) using a Butyl-Sepharose and DEAE-Sepharose columns respectively. The His-tag protein was purified to 90 % purity and the native form reached 99 % purity. The purified proteins were shown to bind to DsrA sRNA from *E. coli* in band-shift assay. Interestingly, the native protein seems to have more affinity for sRNA than his-tagged protein. Hfq was analyzed by circular dichroism (CD) spectroscopy and dynamic light scattering (DLS). The far-UV CD spectrum profile of Hfq protein indicated the predominance of beta-sheet secondary structure as reported in the literature. The DLS experiment showed a monodisperse sample with 48 kDa of molecular mass indicating a hexameric final conformation in accordance with gel-filtration experiments. Automated crystallization trials by sitting drop vapor diffusion method resulted in crystals in different conditions after three days. X-ray diffraction, using an in-house X-ray generator from Rigaku, confirmed that most of the crystals were indeed protein crystals. One of this crystallization conditions, 100mM PCB pH 7.0 and 25% (w/v) PEG1500, yielded a crystal that diffracted to 2.7 Å of resolution.

JUSTIFICATIVA

O diazotrofo *Herbaspirillum seropedicae* é um importante alvo de estudo por ser um potencial biofertilizante a ser empregado na agricultura. Este potencial resume-se na capacidade deste microrganismo de converter o nitrogênio gasoso em amônia que poderia ser disponibilizada para as plantas como uma das fontes de nitrogênio. Esta oferta de uma fonte extra de nitrogênio, aliada à produção de fitohormônio por *H. seropedicae*, incrementaria o crescimento vegetal. Em função disto, esta bactéria vem sendo estudada pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio desde 1984, tendo o seu genoma seqüenciado e anotado pelo projeto GENOPAR (www.genopar.org). No momento, estão em andamento projetos de caracterização funcional e estrutural dos principais genes que participam do processo de fixação de nitrogênio e da interação microrganismo-planta.

A proteína Hfq, identificada durante a anotação do genoma de *H. seropedicae*, é um regulador pós-transcricional que interage com dois tipos de RNAs: um mensageiro e outro com função regulatória (MOLLER *et al.*, 2002). Em *E. coli* foi constatado que quando não há expressão desta proteína, o microrganismo passa a apresentar um fenótipo pleiotrópico (TSUI *et al.*, 1994). Este fato ressalta a importância desta proteína em vários processos celulares. Dentre estes processos está provavelmente o envolvimento desta proteína na fixação biológica de nitrogênio (KAMINSKI *et al.*, 1994; DREPPER *et al.*, 2002). Os microrganismos que fixam nitrogênio, comumente denominados diazotrofos, são dotados de uma via metabólica específica para a conversão do nitrogênio gasoso em amônia e outros produtos nitrogenados. Estudando o microrganismo diazotrofo *Azorhizobium caulinodans*, Kaminski e colaboradores (1994) observaram que quando não havia expressão de uma proteína homóloga a Hfq, também não ocorria a expressão do gene *nifA*. No microrganismo *Rhodobacter capsulatus* foi também constatada a influência da proteína Hfq sobre a expressão dos genes *nifA1*, *nifA2* e *anfA* (DREPPER *et al.*, 2002). Desta forma o processo de fixação de nitrogênio parece ser estreitamente regulado não só por proteínas regulatórias específicas, mas também pela proteína Hfq. Esta regulação pode estar ocorrendo pela estabilização dos RNAs dos genes envolvidos na fixação de nitrogênio ou pela

promoção do encontro de seus produtos com pequenos RNAs regulatórios específicos para este processo, sugerindo etapas de regulação a nível pós-transcricional no metabolismo do nitrogênio.

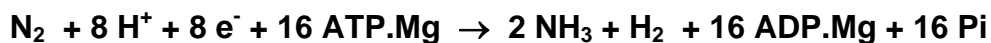
Além do potencial papel desta proteína no processo de fixação de nitrogênio, ela pode ser utilizada ainda como um importante instrumento para a identificação de novos sRNAs regulatórios. Como não há nenhuma espécie relacionada a *H. seropedicae* onde os sRNAs já tenham sido estudados com maior profundidade, este microrganismo pode ser uma importante fonte de novos RNAs regulatórios ainda não caracterizados.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

O nitrogênio é um importante componente do metabolismo dos seres vivos, principalmente no que diz respeito à síntese de proteínas e ácidos nucleicos. A metabolização deste elemento é relevante na área agrícola principalmente para o desenvolvimento de plantas como milho, arroz e trigo, os quais constituem a principal fonte de alimento da população mundial.

A fixação do nitrogênio pode ser feita através de diversos processos, por exemplo, os fatores abióticos (descargas elétricas naturais, combustão e ação vulcânica) ou por ação biótica (bactérias diazotróficas). A capacidade de fixar nitrogênio é encontrada em muitos grupos de bactérias, incluindo: Firmibactérias, Actinomicetos, Cyanobactérias, bactérias verdes sulfurosas e nas subdivisões de Proteobactérias (DIXON & KAHN, 2004). Entre as proteobactérias pode-se citar os microrganismos fixadores *Bradyrhizobium japonicum*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Rhodobacter capsulatus* e *Sinorhizobium meliloti*. A capacidade destes organismos de fixar o nitrogênio atmosférico depende dos níveis de oxigênio e energia (DIXON & KAHN, 2004). A redução de nitrogênio gasoso a amônia requer grande investimento energético por parte do microrganismo e, na natureza, somente um pequeno número de procariotos é capaz de realizar esta atividade. A redução do nitrogênio a amônia é catalizada pelo complexo enzimático da nitrogenase e sua estequiometria está descrita abaixo (SIMPSON & BURRIS, 1984):



Esta reação também pode ser realizada em escala industrial através de um processo químico, desenvolvido por Fritz Haber e Carl Bosch (1918), que requerer altas temperaturas e elevada pressão.

A utilização de microrganismos fixadores de nitrogênio para o cultivo de plantas em larga escala revela-se, do ponto de vista biológico e econômico, uma importante e viável alternativa para uma agricultura sustentável, pois se estima que os fertilizantes nitrogenados contribuam com uma grande porcentagem no custo total da produção agrícola, além de serem as maiores fontes de poluição ambiental (MACHADO & MAGNAVACA, 1991). Portanto, vários grupos de pesquisa têm buscado desenvolver tecnologias para a produção de inoculantes contendo diferentes microrganismos. Tem-se por objetivo aumentar a produtividade agrícola com fontes alternativas de nitrogênio e evitar, desta forma, a agressão ao meio ambiente, como os causados pelas fontes inorgânicas comumente empregadas, diminuindo a degradação ambiental em função da expansão agrícola. Além disso, pode-se também destacar a economia gerada pela restrição do uso de fertilizante industrial.

Estes fatores têm sido os principais motivadores ao desenvolvimento de pesquisas que ampliem a compreensão da genética e fisiologia dos microrganismos fixadores de nitrogênio.

1.2 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica, gram-negativa, geralmente vibróide, com dois flagelos em um ou em ambos os pólos, membro da subdivisão β das Protobactérias (BALDANI *et al.*, 1986). Segundo a etimologia das palavras: *Herbaspirillum* corresponde a uma pequena bactéria em formato espiral presente em sementes de plantas herbáceas e *seropedicae* refere-se à cidade de Seropédica/Rio de Janeiro/Brasil, onde o organismo foi primeiramente isolado (BALDANI *et al.*, 1986).

Estudos da interação entre *H. seropedicae* e gramíneas demonstraram o seu grande potencial como biofertilizante nitrogenado, além da capacidade de produzir fitohormônios que estimulam o crescimento vegetal (OLIVARES *et al.*, 1997). Bactérias do gênero *Herbaspirillum* spp. têm sido encontradas dentro de raízes e tecidos aéreos

de cana-de-açúcar sugerindo o caráter endofítico da infecção desse diazotrofo (BODDEY *et al.*, 1995).

Esta bactéria tem sido alvo de estudo do Núcleo de Fixação de Nitrogênio-UFPR e diversos genes envolvidos na fixação de nitrogênio já foram caracterizados a nível estrutural e/ou funcional: *nifA* (SOUZA *et al.*, 1991a; SOUZA *et al.*, 1991b), *nifHDK* (MACHADO *et al.*, 1996), *glnB* (BENELLI *et al.*, 1997), *glnAntrBC* (PEDROSA *et al.*, 2001), *nifENXorf1orf2*, *nifQmodABC*, *fixXC* (KLASSEN *et al.*, 1999), *nifB* (REGO *et al.*, 2006), *modE* (VOIGT *et al.*, 2000) e *orf1glnKamtB* (NOINDORF *et al.*, 2006).

Com o Programa Genoma do Paraná (GENOPAR – www.genopar.org), iniciado em 2001, foi possível realizar o seqüenciamento e a anotação do genoma deste microrganismo e desta forma identificar/mapear outros genes envolvidos na fixação biológica de nitrogênio, assim como inferir a provável função de seus produtos. O perfil de expressão protéica de mutantes resultantes do *knock-out* de genes envolvidos na fixação está sendo estudado no Programa Proteoma do Paraná (PROTEOPAR).

Atualmente, o foco das pesquisas está voltado para a necessidade de compreender os mecanismos pelos quais ocorre a interação entre *H. seropedicae* e a planta hospedeira assim como entender melhor os mecanismos de regulação desta função biológica. O propósito futuro consiste em estimular, controlar e potencializar a disponibilização de amônia a planta.

1.3 sRNA

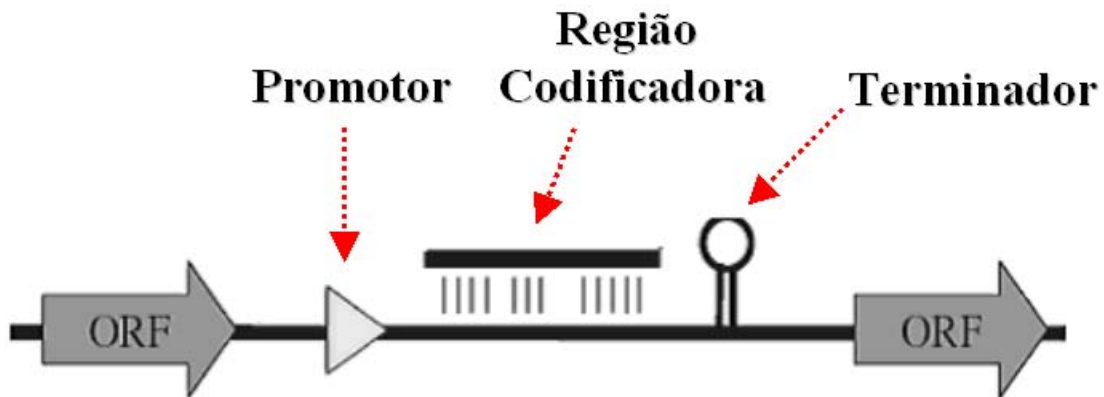
RNA (Ácido Ribonucléico) é a biomolécula que transporta a informação contida no DNA. Apresenta-se geralmente na forma de simples fita, composta de ribonucleotídeos (adenosina, guanossina, citosina e uracila), podendo assumir estruturas secundárias mais complexas que o próprio DNA e, desta forma, outras funções (LEWIN, 1999). Tradicionalmente os RNAs do tipo mensageiro, transportador e ribossômico são os mais citados, devido à participação direta que estas biomoléculas exercem durante o processo de tradução.

Nos últimos anos tem sido caracterizado um novo grupo de RNAs de 40-400 pares de base que não codificam proteínas via mRNA e não correspondem a tRNA ou rRNA (STORZ *et al.*, 2004). Devido ao seu pequeno tamanho são comumente chamados de RNAs pequenos (sRNA - *Small RNAs*) ou RNAs não-codificadores (ncRNA - *Noncoding RNAs*). Os sRNAs não puderam ser encontrados por ensaios de mutação e nem pelo processo de anotação dos genomas por não possuírem as características de uma ORF (*Open Reading Frame*). Os primeiros sRNAs foram descobertos em estudos que envolviam o fenótipo resultante de plasmídeos de múltiplas cópias e também pela detecção de seqüências referentes a estes RNAs quando estudava-se um operon específico (GOTTESMAN, 2004).

Várias técnicas têm sido desenvolvidas a fim de encontrar novos sRNAs, devido à sua importância como reguladores pós-transcricionais. Estratégias como análise de bioinformática, detecção por microarranjo, clonagem por *shot-gun* (RNomics), copurificação com a proteína Hfq e estudos de genética funcional e marcação de RNA (VOGEL & SHARMA, 2005) tem sido utilizadas. Apesar da lista de sRNAs ser cada vez maior, devido a novas descobertas, a função fisiológica detalhada da maioria ainda permanece desconhecida.

Os sRNAs são freqüentemente conservados entre espécies relacionadas e suas seqüências comumente encontram-se em regiões intergênicas dentro de *operons* (figura 1) (GOTTESMAN, 2004; MAJDALANI *et al.*, 2005). Sua seqüência codificadora possui um terminador independente da proteína *Rho* e, freqüentemente, contém estruturas internas na forma de grampos e *loops* (GOTTESMAN, 2004).

FIGURA 1 – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS sRNAs



Localização da região codificadora dos sRNAs com seus componentes estruturais. Figura modificada de LIVNY *et al.*, 2005.

Assim como as proteínas, a diversidade estrutural que os sRNAs podem assumir lhes confere a capacidade de desempenhar diferentes funções e eles podem ser enquadrados em duas principais classes: aqueles que atuam por pareamento de bases com mRNA e aqueles que atuam por interação direta com proteínas, sendo que a maioria dos integrantes da primeira classe necessita da proteína Hfq como chaperona (MAJDALANI *et al.*, 2005). Alguns sRNAs de *E. coli* cuja função e categoria já foram definidos estão listados na tabela 1.

Os RNAs curtos afetam a tradução e a estabilidade de mRNAs adicionando complexidade aos mecanismos moleculares da célula que respondem às mudanças ambientais (ALTUVIA, 2004). Esta característica permite classificar os sRNAs como reguladores da expressão gênica a nível pós-transcricional que atuam de acordo com três mecanismos gerais: funcionando como parte integral de complexos protéicos, como o RNA 4.5S que é um componente da RNaseP; mimetizando a estrutura de outros ácidos nucléicos; como o RNA 6S que se liga a σ^{70} -RNA polimerase holoenzima; ou realizando o pareamento de base com outros RNAs (STORZ *et al.*, 2004). Esta última função será abordada com mais detalhes por ser a classe funcional cujos integrantes interagem com a proteína Hfq.

TABELA 1 – PEQUENOS RNAs DE *E. coli*

CATEGORIA	sRNA	TAMANHO (pb)	FUNÇÃO	
Estrutural/enzimática	4.5S	114	Secreção	
	RNAseP	377	Ribozima, processamento	
Controle de Qualidade Proteínas Inibitórias	TmRNA	363	Controle de qualidade da tradução	
	6S	184	Inibe a RNA polimerase	
	CsrB	360	Inibe CsrA	
	CsrC	270	Inibe CsrA	
Antisense (ação em cis)	SokA	55	HokA antitoxina	
	RdID	66	LdrD antitoxina	
Interação com Hfq, antisense	DsrA	85	Estimula <i>rpoS</i> Inibe <i>hns</i>	
	RprA	105	Estimula <i>rpoS</i>	
	OxyS	109	Anti- <i>rpoS</i> , <i>fhIA</i>	
	RyhB/SraI	90	Anti- <i>sdh</i> , <i>sod</i>	
	Spot 42	109	Anti- <i>galK</i>	
	MicF	93	Anti- <i>ompF</i>	
	MicC	108	Anti- <i>ompC</i>	
	DicF	56	Anti- <i>ftsZ</i>	
	Antisense	RyhA/SraC	275	Anti- <i>ryeB</i>

Modificado de GOTTESMAN, 2004.

A maioria dos sRNAs que realizam pareamento de base desempenham sua função ao formar pequenas regiões híbridas e descontínuas com seu mRNA alvo. Devido a forma rápida pela qual estes híbridos podem ser formados, um sRNA pode interagir com mais de um mRNA através de diferentes regiões (ALTUVIA, 2004). Pode-se inferir que a interação rápida e o pequeno tamanho do sRNA possibilita uma resposta muito mais rápida do que aquela oferecida por proteínas reguladoras (GOTTESMAN, 2004).

Este pareamento pode resultar na ativação ou inibição da tradução ou ainda, na ativação ou inibição da degradação do mRNA (MAJDALANI *et al.*, 2005). A primeira situação ocorre quando o pareamento do sRNA com o mRNA libera o sítio de ligação do ribossomo, que estava ocluído por um grampo interno, ativando a tradução; ou o sRNA pode ocluir o sítio de ligação inibindo a tradução. As atividades referentes à

ativação ou inativação da tradução realizadas indiretamente por estas biomoléculas são mediadas pela proteína Hfq (MAJDALANI *et al.*, 2005). Na segunda situação o pareamento pode estabilizar o mRNA ou torná-lo mais vulnerável à ação de RNAses (MASSE *et al.*, 2003; GOTTESMAN, 2004).

1.4 PROTEÍNA HFQ

A proteína Hfq foi primeiramente identificada como um fator do hospedeiro necessário para a replicação da fita (+) do bacteriófago Q β RNA (FERNANDEZ *et al.*, 1968). As siglas Hfq provêm então de *Host Factor Q*. A maquinaria para a replicação deste retrovirus é composta de uma proteína codificada pelo material genético do próprio fago (subunidade β) e três proteínas codificadas pelo hospedeiro: a proteína ribossomal 30S (subunidade α), um fator de elongação EF-Ts (subunidade γ) (BLUMENTHAL & CARMICHAEL, 1979) e a proteína Hfq também referida como HF-I (KAJITANI *et al.*, 1994). A proteína Hfq está envolvida no reconhecimento do RNA viral facilitando o acesso da replicase à região 3' do molde (ORTÍN & PARRA, 2006). Hfq faz com que o complexo da replicase ligue-se mais fortemente ao RNA (BLUMENTHAL & CARMICHAEL, 1979).

Atualmente, é consenso que esta proteína atua como um regulador da expressão de muitos genes através da interação com RNAs (MUFFLER *et al.*, 1997) e, por este motivo, ela é considerada um regulador global do metabolismo bacteriano.

De acordo com dados disponíveis, a proteína Hfq está ausente em três clados bacterianos: Chlamidia-Spirochaetes, Actinomycetes-Deinococcus e Cytophagales (bactérias verdes sulfurosas) (SUN *et al.*, 2002). Contudo, está presente em todas as proteobactérias (α , β e γ) com exceção das bactérias que sofreram grande redução de seus genomas devido a um estilo de vida parasitário (SUN *et al.*, 2002). As informações acima descritas estão resumidas na tabela 2. Em *E. coli*, o gene *hfq* encontra-se no minuto 94,8 do cromossomo (KAJITANI & ISHIHAMA, 1991), em um operon que compreende os genes: *amiB* e *miaA* (envolvidos na modificação de RNA); e os genes *hflXKC* (reguladores da protease FtsH). Neste organismo mais de 30% dos sRNAs

conhecidos interagem com a proteína Hfq (ZHANG *et al.*, 2003) dado que reforça a importância desta proteína no processo de regulação da expressão gênica.

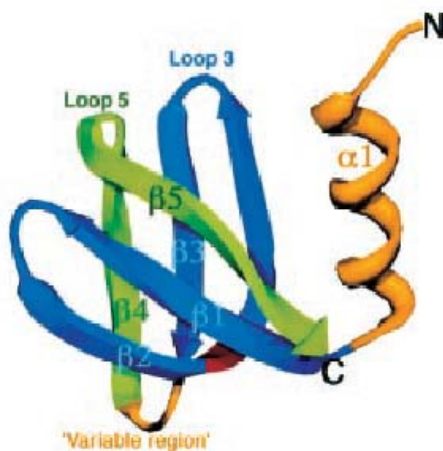
Esta proteína é altamente conservada e termoestável (VALISSILIEVA *et al.*, 2002). Hfq pertence à família de proteínas denominada *Sm-like proteins*, que se caracterizam por interagir com moléculas de RNA gerando complexos que participam dos *spliceossomos* (WILL *et al.*, 2001). Os seus membros possuem duas regiões conservadas (Sm1 e Sm2) separadas por uma região variada em tamanho e seqüência (HERMANN *et al.*, 1995). O motivo Sm é constituído de uma α -hélice N-terminal seguida de cinco fitas β (KAMBACH *et al.*, 1999). A conformação da proteína Hfq de *E. coli* está ilustrada na figura 2.

TABELA 2 – PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE HFQ EM DIFERENTES FILOS BACTERIANOS

Filo	Espécies com Hfq	Espécies sem Hfq
Thermotogales-Aquificales	<i>Aquifex aeolicus</i> <i>Thermotoga maritima</i>	
Chlamydia-Spirochetes		<i>Chlamydia muridarum</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Chlamydoiphia pneumoniae</i> <i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Treponema pallidum</i> <i>Cytophaga hutchinsonii</i>
Green sulfur-Cytophagales		<i>Deinococcus radiodurans</i>
Actinomycetes-Deinococcales		<i>Mycobacterium leprae</i> <i>Thermobifida fusca</i> <i>Streptomyces coelicolor</i> <i>Nostoc</i> sp. <i>Nostoc punctiforme</i> <i>Synechocystis</i> sp. <i>Prochlorococcus marinus</i> <i>Synechococcus</i> sp.
Cyanobacteria		<i>Mycoplasma genitalium</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pulmonis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Campylobacter jejuni</i>
Gram-positivo (baixo GC)	<i>Bacillus halodurans</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus anthracis</i> (2)	
ε-proteobacteria		
α-proteobacteria	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Caulobacter crescentus</i> <i>Mesorhizobium loti</i> <i>Sinorhizobium meliloti</i> <i>Magnetococcus</i> sp. <i>Rhodospseudomonas palustris</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> (2) <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> (2)	<i>Brucella melitensis</i> <i>Rickettsia conorii</i> <i>Rickettsia prowazekii</i>
β/γ-proteobacteria	<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Ralstonia solanocearum</i> <i>Burkholderia fungorum</i> (2) <i>Burkholderia mallei</i> (2) <i>Burkholderia pseudomallei</i> (2) <i>Haemophilus influenza</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Xylella fastidiosa</i> <i>Nitrosomonas europea</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia pestis</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Buchnera</i> sp.

Relação de espécies onde a proteína Hfq está presente ou ausente. Espécies que possuem duas cópias do gene *hfq* (2). (SUN *et al.*, 2002)

FIGURA 2 – MONÔMERO DA PROTEÍNA Hfq DE *S. aureus*

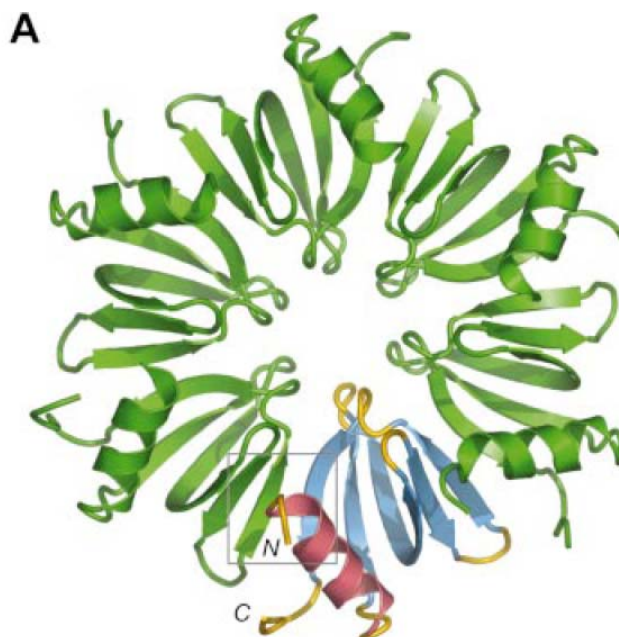


O monômero da proteína Hfq apresenta conformação composta de uma α -hélice N-terminal seguido de cinco fitas β C-terminal. Estrutura determinada por análise cristalográfica. SCHUMACHER *et al.*, 2002.

As proteínas Hfq de vários organismos apresentam um núcleo constituído de 7 a 66 aminoácidos bastante conservados e uma região C-terminal variável (SAUTER *et al.*, 2003; SUN & WARTELL, 2006). Sonnleitner e colaboradores (2004) demonstraram que os 65 primeiros aminoácidos da proteína Hfq de *E. coli* são suficientes para a formação do hexâmero e para a ligação ao sRNA DsrA. Quanto a região C-terminal, Vecerek e colaboradores (2007) relataram a importância da mesma na ligação a mRNA, uma vez que Hfq de *E. coli* destituída desta região perde esta propriedade de ligação.

A conservação na seqüência de aminoácidos justifica a conservação estrutural observada para esta proteína. As estruturas cristalográficas das proteínas Hfq de *Staphylococcus aureus* (SCHUMACHER *et al.*, 2002), *E. coli* (SAUTER *et al.*, 2003), *Pseudomonas aeruginosa* (NICULIN *et al.*, 2005) e *Methanococcus jannaschii* (NIELSEN *et al.*, 2007) já foram determinadas e foi possível observar que, em sua forma ativa, as proteínas Hfq apresentam estrutura quaternária em anel composto por seis a sete monômeros. Em *E. coli*, Hfq encontra-se na forma de um hexâmero onde cada monômero possui uma massa molecular de 11,7 KDa (KAJITANI & ISHIHAMA, 1991) (figura 3).

FIGURA 3 – ESTRUTURA DA PROTEÍNA HFQ DE *E. coli*



Estrutura cristalográfica da proteína Hfq de *E. coli*. Em vermelho e azul os componentes estruturais de um monômero da proteína no contexto do oligômero. SAUTER *et al.*, 2003.

Além da atividade de ligação a RNAs, tem-se evidenciado que a proteína Hfq possui atividade de ATPase (SUKHODOLETS & GARGES, 2003; ARLUISON *et al.*; 2007). Mas, até o momento, não se sabe qual reação bioquímica está acoplada à hidrólise de ATP realizada por Hfq. Sukhodolets e Garges (2003) demonstraram a atividade de hidrólise de ATP por Hfq, além de observarem que a região N-terminal da proteína em *E. coli* apresentava homologia a uma região de ClpB. Esta proteína de choque-térmico foi identificada como uma ATPase, sendo que esta região homóloga incluía o motivo Walker A, característico das proteínas com esta atividade. Posteriormente Arluison e colaboradores (2007) demonstraram que a ligação a ATP promove desestabilização do complexo proteína-RNA e a liberação do RNA. Contudo não está claro se esta atividade é latente ou se está acoplada a uma atividade relevante *in vivo*.

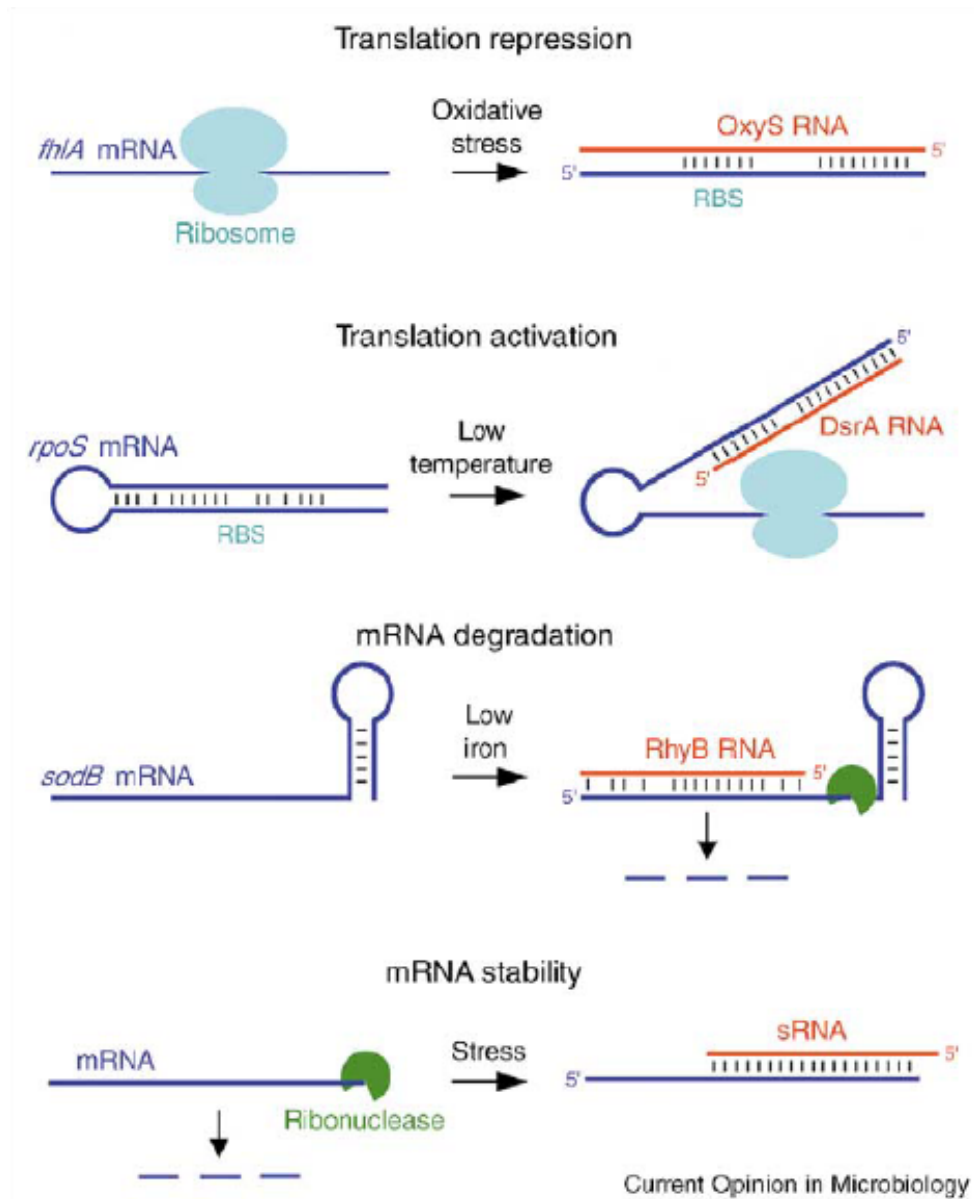
Sendo a proteína Hfq um riboregulador, espera-se sua interação com proteínas do ribossomo, degradossomo de RNA e outras proteínas envolvidas no metabolismo do RNA (BRENNAN & LINK, 2007). Tem sido reportada a interação da proteína Hfq com: proteína ribossomal S1 (SUKHODOLETS & GARGES, 2003), proteínas PNP e PAPI componentes do degradossomo (MOHANTY *et al.*, 2004), RNaseE (MORITA *et al.*, 2005, AIBA, 2007) e proteína CCA, que adiciona a seqüência CCA à região 3' de todos os tRNAs (SCHEIBE *et al.*, 2007).

A atividade de ligação ao sRNA SgrS e ao mRNA *ptsG* tem sido descrita na literatura como um mecanismo de silenciamento gênico (KAWAMOTO *et al.*, 2006; AIBA, 2007). Esta desestabilização do mRNA ocorre via RNaseE, resultando na degradação do mesmo. Este complexo pode futuramente ser explorado como um modelo de RNA de interferência em procariotos e ser utilizado nas pesquisas para o silenciamento gênico.

1.5 FUNÇÃO DE CHAPERONA DA PROTEÍNA HFQ

A proteína Hfq apresenta função de chaperona ao promover a interação entre o pequeno RNA regulatório (sRNA) e o RNA mensageiro (mRNA) alvo, facilitando a formação do duplex sRNA-mRNA (figura 4) (MOLLER *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2002, 2003; GEISSMANN & TOUATI, 2004; RASMUSSEN *et al.*, 2005). Esta função tem sido reportada, por exemplo, na estimulação do anelamento intermolecular entre o sRNA DsrA e o mRNA *rpoS* que codifica para o fator de transcrição do estado estacionário sigma S (σ^S) (figura 5) (REPOILA *et al.*, 2003). Este fator sigma está envolvido na transcrição de genes durante o estado de estresse osmótico, o crescimento em meios de cultura com pH baixo, falta de oxigênio, choque térmico e transição para a fase estacionária do crescimento celular (HENGGE- ARONIS, 1993).

FIGURA 4 – FORMAS DE INTERAÇÃO ENTRE mRNA e sRNA PROMOVIDAS PELA PROTEÍNA HFQ



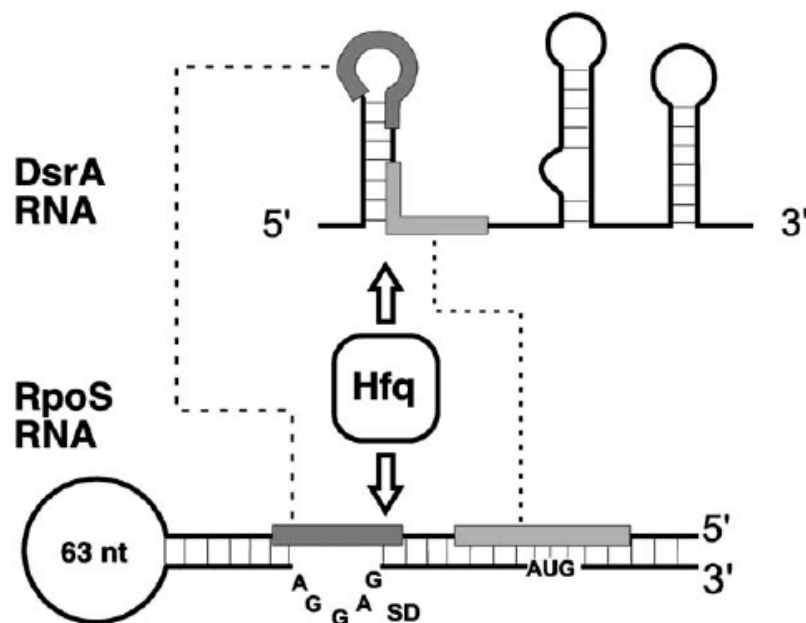
STORZ *et al.*, 2004.

Além do controle estabelecido por este fator, vários sRNA também são transcritos em resposta às condições ambientais (WASSARMAN, 2002).

Sugere-se que a interação da proteína Hfq com o RNA aumente a concentração local desta biomolécula, fornecendo assim um local para a interação entre os RNAs. Desta forma, sRNADsrA e Hfq estimulam a tradução da proteína RpoS através da abertura da estrutura secundária do seu mRNA, liberando o acesso do ribossomo ao seu sítio de ligação (LEASE *et al.*, 2004). Tem sido também demonstrado que em alguns casos a participação da proteína Hfq é dispensável após a formação da interação sRNA-mRNA (LEASE *et al.*, 2004).

Além de regular positivamente a transcrição do mRNA, a interação entre sRNA-mRNA pode também causar o bloqueio da seqüência de Shine-Dalgarno ou desencadear a degradação do duplex (figura 5) (MASSE & GOTTESMAN, 2002).

FIGURA 5 – ESQUEMA DAS REGIÕES DE INTERAÇÃO ENTRE O sRNA DsrA E O mRNA *rpoS* DE *E. coli*



SD: Seqüência Shine-Dalgarno. LEASE *et al.*, 2004.

Em *E. coli*, a regulação pós-transcricional ocorre também sob a própria expressão de Hfq (autoregulação), onde o excesso de proteína acarreta na instabilidade de seu mRNA de uma forma dependente de RNaseE (TSUI *et al.*, 1997). Outra forma de autoregulação descrita por Vecerek e colaboradores (2006), consiste na competição entre Hfq e a subunidade 30S do ribossomo pelo mRNA de *hfq*, o que levaria à inibição da formação do complexo de início de tradução. Esta repressão consiste num controle fino realizado por Hfq sob sua própria expressão.

A interação entre a proteína Hfq e os RNAs ocorre preferencialmente em seqüências ricas em adeninas e uracilas (HASETH & UHLENBECK, 1980). Como exemplo pode-se citar a ligação da proteína Hfq ao sítio 5' AAUUAUAAUAAA 3' do mRNA *sodB* que codifica para uma das proteínas da superóxido dismutase (GEISSMANN & TOUATI, 2004). O sítio de ligação é similar à seqüência de clivagem reconhecida pela RNaseE e desta forma sugere-se que a proteína Hfq bloqueia e evita a clivagem (MOLL *et al.*, 2003; STORZ *et al.*, 2004), exercendo desta forma um efeito estabilizador sobre o RNA.

Esta interação de Hfq com RNAs levaram a estudos da localização subcelular da proteína revelando que a maior parte encontra-se associada com o aparato traducional e uma menor parte associada ao nucleóide (KAJITANI *et al.*, 1994). A associação ao nucleóide pode ser explicada pela ligação não específica da proteína Hfq ao DNA (AZAM & ISHIHAMA, 1999).

1.6 EFEITO PLEIOTRÓPICO DE Hfq E ENVOLVIMENTO NA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

Estudos com o mutante *hfq*⁻ de *E.coli* mostraram uma diminuição na taxa de crescimento, aumento no tamanho celular, sensibilidade osmótica e aumento na sensibilidade à radiação ultravioleta (UV) (TSUI *et al.*, 1994). Muitos destes fenótipos coincidiram com o fenótipo *rpoS*⁻ (HENGGE-ARONIS, 2002). O aumento na sensibilidade ao UV pode ser justificado pela ação desestabilizadora da proteína Hfq sob o mRNA do gene *mutS* que participa do mecanismo de reparo do DNA (TSUI *et al.*,

1997). Todas essas características do mutante sugerem a importante atuação da proteína Hfq no controle da expressão de genes envolvidos em mais de uma via metabólica, apresentando então um efeito pleiotrópico.

Como abordado anteriormente, a proteína Hfq é conservada entre as diferentes espécies de bactérias, possuindo não só um papel no metabolismo geral, mas também sobre atividades específicas como a virulência de organismos patogênicos e o metabolismo do nitrogênio. A proteína Hfq tem sido também apresentada como um importante fator de interferência na virulência de organismos patogênicos como as bactérias Gram-negativas: *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Brucella abortus*, *Legionella pneumophila* e *Vibrio cholerae* (NAKAO *et al.*, 2005; ROBERTSON & ROOP, 1999; SONNLEITNER *et al.*, 2003; DING *et al.*, 2004; McNEALY *et al.*, 2005). Sonnleitner e colaboradores (2003) demonstraram que o patógeno *hfq*⁻ de *Pseudomonas aeruginosa* O1 quando administrado a camundongos apresentava uma virulência diminuída num fator de 1×10^4 em consequência da influência na taxa de crescimento e sobre a expressão do *pili* do sistema de secreção tipo IV. Estudos recentes apresentaram a influência da proteína Hfq sobre o efeito do ambiente de microgravidade na virulência do patógeno *Salmonella typhimurium* (WILSON *et al.*, 2007). O crescimento deste patógeno no espaço culminou com o aumento de sua virulência, formação de agregação celular e modificação da expressão de genes associados com a utilização de ferro e formação de biofilme (WILSON *et al.*, 2007). Os mesmos autores sugeriram que a proteína Hfq coordenou a resposta deste microrganismo a este ambiente uma vez que grande parte dos genes cuja expressão foi modificada pertencia ao *regulon* desta proteína.

Hfq, aparentemente, também apresenta papel específico no processo de fixação de nitrogênio. Em 1994, Kaminski e colaboradores, ao estudar o diazotrofo *Azorhizobium caulinodans*, reportaram a presença de uma proteína homóloga a Hfq, chamada de Nrf, necessária para a expressão da proteína NifA, um ativador transcricional dos genes *nif*. Os mesmos pesquisadores relataram a ausência de expressão do gene *nifA* no mutante *nrfA*⁻ (KAMINSKI *et al.*, 1994). Esta proteína atua, portanto como um regulador positivo e controla a resposta da célula a dois sinais exógenos ambientais, nitrogênio e oxigênio (KAMINSKI & ELMERICH, 1998). Este

controle ocorre quando a proteína Hfq estabiliza e estende a tradução do mRNA de *nifA*, permitindo o desencadeamento da cascata gênica que culmina com a formação do complexo da nitrogenase.

O microrganismo *Rhodobacter capsulatus* possui também uma proteína NrfA similar a de *A. caulinodans*, entretanto esta não parece influenciar o crescimento do diazotrofo, mas é necessária para o máximo crescimento quando na presença de N₂ como única fonte de nitrogênio via nitrogenase dependente de molibdênio ou nitrogenase alternativa (DREPPER *et al.*, 2002). Neste organismo, a proteína Hfq estaria regulando o processo de fixação ao nível de tradução dos ativadores transcricionais NifA1, NifA2 e AnfA.

O indício mais recente de uma provável atuação da proteína Hfq sobre a fixação biológica de nitrogênio surgiu com o trabalho de Wilson e colaboradores (2007) ao estudarem a expressão gênica diferencial do microrganismo não diazotrófico *Salmonella typhimurium* em resposta a esta proteína em ambiente de microgravidade. Os genes *nifU* e *fnr* foram listados como tendo expressão diminuída neste ambiente. A proteína NifU é responsável pela formação do *cluster* Fe-S destinado a maturação da nitrogenase em microrganismos diazotrofos (SANTOS *et al.*, 2004) e a proteína Fnr é um ativador transcricional envolvido na sensibilidade ao oxigênio da proteína NifA (MONTEIRO *et al.*, 2003). Estes dados sugerem a possível influência de Hfq sobre a expressão de outras proteínas que participam da fixação de nitrogênio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve por objetivos a caracterização funcional e estrutural da proteína Hfq de *Herbaspirillum seropedicae*, visando a posterior investigação do seu papel no processo de fixação de nitrogênio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar *in silico* a região regulatória e estrutural do gene *hfq* de *H. seropedicae* e de seu produto;
- Clonar o gene *hfq* de *H. seropedicae* em vetor de expressão e determinar as condições de superexpressão em *Escherichia coli*;
- Purificar a proteína Hfq nas formas nativa e fusionada a cauda de histidinas;
- Realizar ensaios de cristalização da proteína Hfq purificada;
- Determinar a sua atividade através da sua ligação a pequenos RNAs de *Escherichia coli*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE *hfq* DE *H. seropedicae*

A análise da seqüência do gene *hfq* e das regiões a montante e a jusante deste foi realizada por programas de Bioinformática disponíveis no *site* do Núcleo de Fixação de Nitrogênio - UFPR (NFN, 2005) ou de acesso público na Internet. As análises realizadas foram: identificação da provável região codificadora da proteína (ORF), identificação de prováveis promotores, identificação do sítio de ligação de ribossomo (RBS), identificação dos códons de início e término de transcrição e identificação de terminador de transcrição independente de proteína Rho.

Os mapas de restrição e a seqüência de aminoácidos traduzidas a partir da seqüência de pares de base foram obtidas com o programa BioEdit (HALL, 2001).

As seqüências completas de aminoácidos foram alinhadas e comparadas para a identificação de regiões conservadas através do programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). As seqüências foram obtidas do banco de dados GeneBank DataBases, disponível na internet, utilizando o programa Entrez Nucleotide Search, assim como o programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As buscas foram realizadas tomando como base as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos da proteína Hfq de *H. seropedicae*.

3.2 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As estirpes de bactérias e plasmídeos que foram utilizados neste trabalho estão relacionados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

TABELA 3 – LISTA DE ESTIRPES DE BACTÉRIAS UTILIZADAS

<u>Estirpe</u>	<u>Genótipo ou Características Relevantes</u>	<u>Referência/ Fonte</u>
<i>E. coli</i>		
TOP10	F- <i>mcrA</i> (<i>mrr-hsdRMS-crBC</i>) 80 <i>lacZ</i> M15 <i>lacX74 recA1 ara 139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> <i>Hsd gal (λ clts 857 ind 1 Sam7 nin5</i>	Invitrogen Inc.
BL21 (DE3)	<i>lacUV5-T7 gene 1)</i> (produtora da RNA polimerase do fago T7).	New England Biolabs.
<i>H. seropedicae</i>		
Smr1	Estirpe selvagem, Sm ^R , NIF ⁺	SOUZA, 2000.

TABELA 4 – LISTA DE PLASMÍDEOS UTILIZADOS

<u>Plasmídeos</u>	<u>Características Relevantes</u>	<u>Referência/ FONTE</u>
pHS17-LV-00-000-023-D11	Amp ^R , pUC19 contendo DNA inserto com o gene <i>hfq</i> de <i>H. seropedicae</i> .	Banco de genes de <i>H. seropedicae</i> (GENOPAR).
pCR2.1	<i>lacZ</i> , Amp ^R , Km ^R	Invitrogen Inc.
pET28(a)	Promotor T7, <i>lacI</i> , Km ^R , seqüência codificadora para a cauda de histidinas.	Novagen Inc.
pDK-7	Vetor de expressão com promotor <i>tac</i> . Cm ^R	KLEINER <i>et al.</i> , 1988.
pT7-7	Vetor de expressão/ promotor T7. Amp ^R	TABOR & RICHARDSON, 1985
pT7G₂A₂DsrA	Amp ^R , contém o promotor T7 a montante da seqüência codificadora do sRNA DsrA de <i>E. coli</i> .	LEASE & WOODSON, 2004.
pUC-T7RpoS2	Amp ^R , contém o promotor T7 a montante da seqüência codificadora do mRNA RpoS2 de <i>E. coli</i> .	LEASE & WOODSON, 2004.
pKADO0	Fragmento <i>XbaI/HindIII</i> contendo o gene <i>hfq</i> do plasmídeo pCR2.1:: <i>hfq</i> clonado no vetor pDK7-7.	Este trabalho
pKADO1	Fragmento <i>NdeI/HindIII</i> contendo o gene <i>hfq</i> do plasmídeo pKADO0 clonado no vetor pT7-7.	Este trabalho
pKADO2	Fragmento <i>NdeI/HindIII</i> contendo o gene <i>hfq</i> do plasmídeo pKADO1 clonado no vetor pET28-a.	Este trabalho

3.3 MEIOS DE CULTURA, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ESTOQUE DOS MICRORGANISMOS

As estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas em meio LB (SAMBROOK *et al.*, 1989) sob agitação (130 rpm) a 37 °C ou em estufa a 37 °C em meio LA.

O meio LB possui a seguinte composição:

Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L

O meio LA é composto de meio LB mais 15 g/L de ágar.

Para o cultivo celular de *E.coli* com a finalidade de preparar células eletrocompetentes foi utilizado o meio SOB (Gibco-BRL-Invitrogen) que possui a seguinte composição:

Bacto Triptona	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	0,584 g/L
KCl	0,186 g/L

Após o processo de transformação por eletroporação as células de *E. coli* foram recuperadas em meio SOC (Gibco-BRL-Invitrogen), que possui a seguinte composição:

Triptona	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	0,06 g/L
KCl	0,019 g/L
MgCl ₂	0,094 g/L
MgSO ₄	0,12 g/L
Glucose	0,36 g/L

A estirpe de *H. seropedicae* SmR1 foi cultivada a 30 °C, sob agitação a 130 rpm, durante 16 horas em meio NFbHPN (KLASSEN *et al.*, 1997), na presença de estreptomicina (80 µg/mL). O meio NFb-malato possui a seguinte composição:

MgSO ₄ .7H ₂ O	2 x 10 ⁻¹ g/L
NaCl	1 x 10 ⁻¹ g/L
CaCl ₂	2 x 10 ⁻² g/L
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 ⁻² g/L
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2 x 10 ⁻² g/L
Malato de sódio	5 g/L
Biotina	1 x 10 ⁻⁴ g/L
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	2 x 10 ⁻³ g/L
MnSO ₄ . H ₂ O	2,35 x 10 ⁻³ g/L
H ₃ BO ₃	2,8 x 10 ⁻³ g/L
CuSO ₄ .5 H ₂ O	8 x 10 ⁻⁵ g/L
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	2,4 x 10 ⁻⁴ g/L

No momento do uso, o meio NFbHPN foi obtido por adição de 50 mL/L de solução estéril de fosfatos (159,5 g/L de KH₂PO₄ e 17,8 g/L de K₂HPO₄) e de 20 mL/L de cloreto de amônio 1 mol/L ao meio NFb-Malato.

3.4 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos usados nos meios de cultura foram:

Antibiótico	Abreviatura	Concentração Final	Organismo
Ampicilina	Amp	250 µg/mL	<i>E. coli</i>
Canamicina	Km	100 µg/mL	<i>E. coli</i>
		1000 µg/mL	<i>H.seropedicae</i>
Cloranfenicol	Cm	30 µg/mL	<i>E. coli</i>
		100 µg/mL	<i>H.seropedicae</i>
Estreptomicina	Sm	80 µg/mL	<i>E. coli</i> e <i>H.seropedicae</i>
Tetraciclina	Tc	10 µg/mL	<i>E. coli</i> e <i>H.seropedicae</i>

As soluções estoque foram preparadas e estocadas segundo SAMBROOK *et al.*, 1989.

3.5 MANIPULAÇÃO DE DNA

3.5.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *H. seropedicae*

Células de *H. seropedicae* de cerca de 10 mL de cultura saturada, cultivadas em meio NFbHPN, foram coletadas, em 2 a 5 tempos de centrifugação a 12.000 g por 1 minuto, em um mesmo tubo de 2 mL. A massa de células foi ressuspensa, por agitação em “vortex”, em 500 µL de tampão GET (50 mmol/L glicose, 25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0; 10 mmol/L EDTA pH 8,0) e as células foram lisadas por tratamento com lisozima 100 µg/mL a 37°C por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado SDS 1 % ao material e incubado a temperatura ambiente por cinco minutos. Em seguida, o material

foi incubado com Proteinase K 200 µg/mL a 50 °C por 12 horas. A mistura foi centrifugada e o sobrenadante coletado foi extraído, sequencialmente, uma vez com fenol equilibrado, uma vez com fenol:clorofórmio (1:1) e duas vezes com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O DNA genômico foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol 96 %, lavado com etanol 80 %, seco e ressuspenso em 100 µL de água ultra pura estéril.

3.5.2 REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR)

O sistema de reação (20 µL) foi composto de: 1-5 ng/mL de DNA genômico de *H. seropedicae*, 0,5 pmol/mL de cada *primer* (figura 6), 0,2 mmol/L de dNTPs, tampão de reação (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,4 e 50 mmol/L de KCl), 1,5 mmol/L de cloreto de magnésio e 1 µL de Taq DNA Polimerase. A amplificação foi realizada com o seguinte programa de 35 ciclos: 30 segundos a 94 °C, 45 segundos para anelamento e 1 minuto e 30 segundos de extensão a 72 °C. A amplificação do gene *hfq* foi conduzida utilizando uma curva de temperatura de 45 a 55 °C para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores.

3.5.3 CLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO

Para a amplificação do gene *hfq* de *H. seropedicae* foi desenhado um par de oligonucleotídeos mutageneizados (figura 6), tendo como base a seqüência de nucleotídeos do gene encontrado no banco de dados do Programa Genopar. Foram utilizados o oligonucleotídeo iniciador 5' (*forward primer*) contendo um sítio para a enzima *NdeI* e o oligonucleotídeo iniciador 3' (*reverse primer*) contendo um sítio para a enzima *HindIII*. O produto de amplificação foi clonado no vetor pCR2.1, sendo em seguida subclonado no vetor pDK-7 e finalmente subclonado nos vetores de expressão pET28(a) e pT7-7 (tabela 4).

FIGURA 6 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE *hfq*



Em vermelho, a posição do sítio de restrição. A seta azul indica o local da clivagem pela enzima de restrição.

3.5.4 MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO POR LISE ALCALINA

A extração dos plasmídeos das células de *E. coli* foi realizada pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Os plasmídeos purificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.5.5 SEQUENCIAMENTO DE DNA

A reação de sequenciamento foi realizada segundo o método de Sanger (SANGER & COULSON, 1977), em que os dideoxynucleotídeos foram utilizados como terminadores de cadeia.

O sistema de reação constituiu de aproximadamente 0,5 µg de DNA de fita dupla, 2 pmol de oligonucleotídeo iniciador, 3 µL de ET terminador mix (Sequencing Reagent Premix - DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, GE HealthCare) que contém os cromóforos fluorescentes como terminadores de cadeia e água ultra pura suficiente para 7,5 µL. O sistema foi amplificado em termociclador. A seguir o produto das reações foi transferido para um novo tubo contendo 2 µL de

acetato de amônio (7,5 mmol/L) e 60 μ L de etanol absoluto para a sua purificação. Após precipitação, a amostra de DNA foi centrifugada a 12.000 *g* por 20 minutos, lavada duas vezes com etanol 80 % e secado. O DNA foi ressuspendido em 4 μ L de Formamide Loading Dye (Applied Biosystems), desnaturado por 2 minutos a 96 °C e aplicado no gel do seqüenciador automático de DNA ABI-PRISM 377 (Applied Biosystems).

3.5.6 CLIVAGEM DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

O sistema de restrição foi composto das enzimas apropriadas, tampão de reação e DNA purificado, sendo em seguida incubado em temperatura e tempo sugeridos pelo fabricante.

3.5.7 LIGAÇÃO DNA INSERTO AO VETOR

A reação de ligação foi composta de: 2 μ L de vetor (aproximadamente 50 ng/ μ L); 10 μ L de inserto (aproximadamente 100ng/ μ L); 2 μ L de tampão para a enzima T4 DNA Ligase (10X) e 0,5 U de T4 DNA Ligase, para um volume final de 20 μ L. A reação foi incubada a 4 °C durante um período de 12 horas.

O produto de ligação foi introduzido por eletroporação na estirpe *E. coli* TOP10 conforme item 3.6 e os transformantes foram selecionados pela resistência a antibiótico(s).

3.6 PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES DE *E. coli*

As células de *E. coli* foram tornadas eletrocompetentes conforme protocolo do fabricante do eletroporador Cell-Porator Voltage Booster (Gibco-BRL-Invitrogen), com modificações. Uma cultura saturada de *E. coli* foi adicionada a 100 mL de meio SOB na proporção de 1:100. A cultura foi mantida sob agitação (130 rpm) a 37 °C até atingir

D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,5. A cultura foi mantida então em gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 g por 5 minutos a 4 °C. As células foram então lavadas duas vezes com água ultrapura estéril e gelada e uma vez com glicerol 15 % estéril e gelado. Em seguida foram ressuspensas em 100 µL de glicerol 15 %, separadas em alíquotas de 35 µL e estocadas a -70 °C.

Para a eletroporação, 35 µL de células competentes e 1 µL de solução de plasmídeo (5 ng - 0,5 µg/µL) foram misturados e transferidos para uma cubeta de eletroporação. O aparelho foi ajustado para a aplicação do choque elétrico numa diferença de potencial de 16 a 21 Kv/cm e um campo elétrico de 4 kΩ/330 µF à câmara de eletroporação, com tempo de pulso de 6 a 10 ms. Após a aplicação deste processo, as células de *E. coli* foram inoculadas em 1 mL de meio SOC, para recuperação, por 60 minutos a 37 °C e 130 rpm. Em seguida, foram espalhadas em meio LA (contendo os antibióticos necessários para a seleção dos clones) e incubadas a 37 °C durante um período de 12 horas.

3.7 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Hfq

O plasmídeo recombinante (pKADO1 ou pKADO2) obtido foi transformado em *E. coli* BL21(DE3) (item 3.6).

Três colônias de *E. coli* BL21(DE3) transformadas foram inoculadas em 3 mL de meio LB com os respectivos antibióticos, e cultivadas a 37 °C por 12 horas a 130 rpm. Cem microlitros deste cultivo foram re-inoculados em 10 mL de meio LB (proporção 1:100) e incubados a 37 °C e a 130 rpm, a fim de se obter um cultivo celular com D.O._{600nm} entre 0,6 e 0,8. Nesta fase foram variadas as condições de expressão quanto a temperatura (30 e 37 °C) e tipo indutor (1 mmol/L de IPTG ou 14 mmol/L de Lactose). A lactose é um indutor alternativo que pode ser utilizado, no lugar do IPTG, para aumentar a expressão de proteínas na forma solúvel (MONTEIRO *et al.*, 2000). Em seguida a cultura continuou sendo incubada por mais 3 horas sob uma das condições descritas acima. O objetivo deste experimento foi determinar a melhor condição de expressão da proteína Hfq quanto à quantidade de proteína expressa e solubilidade.

Após a expressão, os cultivos foram centrifugados a 7.000 g durante 5 minutos a 4 °C, o sobrenatante foi descartado, e o pellet celular foi ressuscitado em 400 µL de tampão de ressuspensão (400 mmol/L de NaCl e 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0). Uma alíquota de 20 µL da fração bruta foi estocada para posterior análise em gel SDS-PAGE. O restante da fração bruta foi sonicado no aparelho Ultrasonic Processor XL Heat Systems a fim de romper as células. A sonicação foi realizada em 8 ciclos de 20 segundos, alternando-se iguais períodos de repouso em gelo. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 g durante 15 minutos para a separação das frações solúvel e insolúvel. A fração insolúvel foi ressuscitada em tampão de ressuspensão com igual volume ao da fração solúvel.

3.8 ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As amostras protéicas foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % contendo glicina (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) ou em gel de poliacrilamida 12% contendo Tricina e SDS (SCHAGGER & von JAGOW, 1987), que permite separar proteínas entre 1 e 100 kDa com maior resolução. As proteínas foram visualizadas após a coloração por Coomassie Blue (LAEMMLI, 1970), sendo em seguida foto-documentadas no aparelho UVP-Biolmaging Systems.

3.9 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA DA PROTEÍNA HFQ

Para avaliar o grau de pureza da proteína Hfq superexpressa e purificada (item 3.11), uma amostra foi submetida à eletroforese SDS-PAGE. O gel foi corado com Coomassie Blue e submetido à análise densitométrica no aparelho Personal Densitometer SI – Molecular Dynamics. A imagem do gel foi capturada e armazenada pelo programa Scan Control. A pureza foi determinada por densitometria pelo programa ImageQuant™.

3.10 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DA PROTEÍNA Hfq POR ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DE MASSA PELO MÉTODO MALDI-TOF/MS

A confirmação da identidade da proteína Hfq pelo método MALDI-TOF/MS foi realizada como descrita por Westermeier e Naven (2004) com adaptações.

3.10.1 DIGESTÃO DAS PROTEÍNAS E EXTRAÇÃO DE PEPTÍDEOS

A banda equivalente à proteína Hfq superexpressa foi recortada do gel de poliacrilamida com um bisturi e armazenada em tubo plástico e em gelo.

Remoção do corante Coomassie Blue: O gel contendo a proteína foi tratado com solução descolorante (75 mmol/L de bicarbonato de amônio e 40 % de etanol) até a total remoção do corante. Em seguida, foi lavado com 500 μ L de água ultrapura para a remoção do descolorante e tratado com acetonitrila 100 % até a completa desidratação e, finalmente, seco em bomba a vácuo.

Digestão das proteínas: O gel desidratado foi transferido para um tubo plástico contendo 10 μ L de Tripsina (10 μ g/mL) e incubado a 4 °C por 20 minutos. A solução C (40 mmol/L de bicarbonato de amônio e 10 % de acetonitrila) foi adicionada então em volume suficiente para cobrir o gel e o sistema foi incubado a 37 °C por 12 h.

Extração dos peptídeos originados da digestão: Após a digestão trípica os peptídeos já presentes na solução sobrenadante foram transferidos para um novo tubo plástico. Para a extração dos demais peptídeos, o gel foi lavado três vezes consecutivas com 30 μ L de solução de extração de peptídeos (50 % de Acetonitrila e 0,1 % de ácido trifluoracético [TFA]), sendo que entre cada lavagem foram recolhidas as soluções com os peptídeos.

Dessalinização da solução: A solução final, cerca de 200 μ L, contendo os peptídeos foi concentrada em bomba a vácuo até um volume final de 10 μ L. Para a dessalinização foram utilizadas ponteiras contendo mini-colunas Zip-Tip (Millipore Inc.).

3.10.2 ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS POR MALDI-TOF/MS

Após a dessalinização, a amostra foi ressuspensa, utilizando a própria ponteira Zip-Tip, em 2 μ L de solução contendo a matriz CHCA (Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) e aplicada sobre uma placa metálica. A análise dos peptídeos foi realizada pelo método MALDI-TOF/MS (Espectrometria de Massas de Ionização a Laser com Tempo de Voo) no espectrômetro de massa Bruker Daltonics Inc., no modo refletor positivo.

A calibração do aparelho foi realizada utilizando-se uma mistura de padrões de peptídeos (Bruker Daltonics Inc.). Após a análise de cada amostra foram gerados espectrogramas que foram visualizados utilizando o programa Flexanalysis (Bruker Daltonics Inc.).

3.10.3 IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

A identificação da proteína foi realizada através do programa Aldente (<http://www.expasy.org/tools/aldente/>), que utiliza os bancos de dados do Swiss-Prot e do TrEMBL, e do programa Protein Prospector v. 4.0 (<http://prospector.ucsf.edu/>) que utiliza o banco local contendo dados dos peptídeos provenientes da digestão trípica *in silico* das 50.000 ORFs do organismo *H. seropedicae* (Projeto Proteopar). Foram utilizados os valores dos picos monoisotópicos referentes a m/z para a submissão nos bancos de dados.

3.11 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq DE *H. seropedicae*

Na literatura foram encontradas algumas informações sobre a purificação da proteína Hfq na sua forma nativa (VASSILIEVA *et al.*, 2002; NIKULIN *et al.*, 2005). Os pesquisadores citados utilizaram o aquecimento da fração solúvel pós-lise celular por 15 minutos a 80 °C. O aquecimento teve por objetivo precipitar uma grande quantidade

de proteínas que, diferentemente de Hfq, não possuem estabilidade térmica. O principal passo cromatográfico utilizado foi o da interação hidrofóbica, mais especificamente, em uma coluna de Butil-Sepharose (GE HealthCare Inc.). O aquecimento a 80 °C foi utilizado também como passo de purificação para a proteína fusionada a cauda de histidinas.

3.11.1 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq NATIVA

3.11.1.1 CROMATOGRAFIA EM BUTIL-SEPHAROSE

A coluna Hi-trap Butil-Sepharose (1 mL) (GE HealthCare) é composta de uma matriz de agarose ligada a (-O-CH₂-CH₂O-CH₂-O-(CH₂)₃-CH₃). Esta coluna permite uma interação hidrofóbica moderada. A purificação foi realizada no cromatógrafo Äkta Basic (GE HealthCare).

A fração solúvel do extrato celular (1 mol/L de NaCl e 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0) foi aquecida a 80 °C durante 15 minutos sob constante agitação. A amostra foi então centrifugada a 14.000 g por 40 minutos. A fração solúvel foi coletada e a ela foi adicionado lentamente sulfato de amônio na forma de sal até uma concentração final de 1,7 mol/L. Esta solução foi mantida sob agitação até a solubilização total do sal.

Em seguida a solução protéica foi injetada na coluna Butil-Sepharose equilibrada previamente com 3 VC da solução A (1 mol/L de NaCl; 1,5 mol/L de sulfato de amônio; 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0). Toda a cromatografia foi realizada utilizando um fluxo de 1 mL/min. Após a injeção da amostra, a coluna foi lavada com 20 VC de solução A. A proteína foi eluída em um duplo gradiente decrescente de 1 mol/L a 0,1 mol/L de NaCl e de 1,5 mol/L a 0 mol/L de (NH₄)₂SO₄, correspondente a 20 VC. Amostras das frações contendo a proteína Hfq foram analisadas por eletroforese. As frações que apresentaram maior pureza foram reunidas e dializadas contra 1L de

solução contendo: 100 mmol/L de NaCl, 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0 e 0,1 mmol/L de PMSF. A diálise foi realizada a temperatura ambiente por 12 horas.

3.11.1.2 CROMATOGRAFIA EM DEAE-SEPHAROSE

A coluna DEAE-Sepharose (GE HealthCare) é composta de uma matriz de agarose ligada a $(-O-CH_2-CH_2-N^+(C_2H_5)_3H)$. Esta coluna age como um trocador fraco de ânions. A purificação foi realizada no cromatógrafo Äkta Basic (GE HealthCare). Para este ensaio, foi montada uma coluna de 40 mL de volume, 1,6 cm de diâmetro e 20 cm de altura.

A solução protéica dialisada após a primeira etapa de purificação foi injetada, num fluxo de 1 mL/min, em uma coluna DEAE-Sepharose (40 mL) previamente equilibrada com 3 VC de solução A (100 mmol/L de NaCl e 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0). Em seguida, a coluna foi lavada com 3 VC de Solução A. A proteína Hfq foi eluída, num fluxo de 3 mL/min, antes do gradiente crescente de NaCl (0,1 a 1,0 mol/L). A proteína foi coletada em três frações de 20 mL e concentrada por ultrafiltração usando o sistema Centricon 5K (Millipore) com limite de exclusão para proteínas com massa molecular superior a 5 kDa.

3.11.2 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq CONTENDO CAUDA DE HISTIDINAS

3.11.2.1 CROMATOGRAFIA EM HI-TRAP CHELATING Ni⁺²

A fração solúvel do extrato celular (300 mmol/L de NaCl e 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0) foi aquecida a 80 °C durante 15 minutos sob constante agitação. A amostra foi então centrifugada a 14.000 g por 40 minutos. A fração solúvel foi coletada e levada à cromatografia de afinidade.

A purificação foi realizada no cromatógrafo Äkta Basic (GE HealthCare). A coluna de purificação utilizada foi a Hi-Trap Chelating (GE Health Care), carregada manualmente com solução de Ni (100 mmol/L de acetato de amônio pH 4,0 e 100mmol/L de cloreto de níquel) e em seguida acoplada ao equipamento.

A solução de proteínas foi injetada, num fluxo de 1mL/min, na coluna Hi-Trap Chelating (1 mL) equilibrada com 3 VC de tampão A (300 mmol/L de NaCl; 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0; 10 mmol/L de imidazol). A proteína Hfq foi eluída utilizando um gradiente contínuo de 10 a 1000 mmol/L de imidazol equivalente a 20 VC. As amostras foram coletadas em alíquotas de 1mL. Amostras de 20 µL das frações obtidas e correspondentes ao pico no cromatograma foram coletadas para análise em gel SDS-PAGE. As frações que apresentaram maior pureza foram reunidas e dializadas contra 1 L de solução contendo: 150 mmol/L de NaCl e 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0. A diálise foi realizada a temperatura ambiente por 12 horas.

3.12 ESTOCAGEM DAS PROTEÍNAS

As proteínas destinadas aos testes de atividade foram dialisadas contra 1000 mL de solução contendo 100 mmol/L de NaCl, 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mmol/L de PMSF e 50 % de glicerol a temperatura ambiente por 12horas. Em seguida, a solução de proteínas foi dividida em frações de 100 µL que foram estocadas a -80 °C.

3.13 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA

A estimativa da concentração protéica foi realizada segundo Bradford (1976) ou utilizando o coeficiente de extinção molar (PACE *et al.*, 1995) no caso da proteína purificada.

Pelo método de Bradford, o sistema de reação foi composto de 1 mL de solução corante (100mg de Coomassie Blue G-250; 50 mL de etanol 95 % e 100mL ácido

fosfórico 85 %) e 100 μ L de amostra. Esta solução foi homogeneizada e sua absorbância a 595nm determinada em espectrofotômetro. A curva padrão foi determinada utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Pelo coeficiente de extinção molar, uma alíquota (1 μ L) da solução de proteína foi diluída inicialmente 100X e a sua absorbância a 280nm foi determinada pelo espectrofotômetro. O valor de absorbância foi aplicado na fórmula ($C=A/\epsilon$), onde “C” corresponde à concentração molar protéica, A corresponde a absorção a 280 nm e ϵ corresponde ao valor do coeficiente de extinção molar. O valor de ϵ igual a 4470 foi obtido pela submissão da seqüência de aminoácidos da proteína Hfq ao programa ProtParam, disponível no site do EXPASY (www.expasy.ch/tools/protparam.html)

Esta função foi utilizada tanto para a determinação da concentração molar quanto para a determinação da concentração em mg/mL.

3.14 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq A RNA

Para a realização dos ensaios de atividade de ligação a RNA, o primeiro passo foi a escolha da molécula molde a ser utilizada para os ensaios. O pequeno RNA DsrA e o mRNA RpoS de *E. coli* foram selecionados por terem sido extensivamente estudados na literatura (HENGGE-ARONIS, 2002; BRESCIA *et al.*, 2003; LEASE *et al.*, 2004; LEASE & WOODSON, 2004). O trabalho com este tipo de biomolécula exigiu várias precauções no que diz respeito à presença de ribonucleases, pois estas são de difícil controle e retenção uma vez que são termoestáveis e de difícil inativação. Desta forma todos os materiais utilizados, assim como a manipulação, necessitaram de cuidados especiais. Estes cuidados estão detalhados abaixo.

Todos os procedimentos foram realizados utilizando luvas e em espaço reservado, uma vez que a pele e poeira são grandes fontes de contaminação. A bancada de trabalho e as pipetas foram limpas com etanol absoluto e em seguida com o reagente RNase Away® (Invitrogen).

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água a 0,01 % de dietilpirocarbonato (DEPC), sendo em seguida autoclavadas. Este composto inibe

eficientemente nucleases através de modificações covalentes na proteína. Estas modificações consistem em converter aminas primárias e secundárias em ésteres de ácido carbâmico (LEONARD *et al.*, 1970). Entretanto a água tratada com DEPC deve ser inativada por autoclavação antes de ser utilizada no preparo de soluções contendo Tris, Hepes ou mercaptanas, pois estes compostos podem ser inutilizados pelas modificações citadas acima.

As cubas de eletroforese assim como seus acessórios foram lavadas com detergente neutro durante 12 horas, ácido clorídrico 0,1 mol/L por 10 minutos e enxaguado com água tratada com DEPC.

Além dos cuidados com ribonucleases, há a necessidade de trabalhar com o material constantemente em gelo. Este cuidado foi tomado no momento da preparação da reação de transcrição *in vitro* assim como com as soluções de interação proteína-RNA. Esta precaução é importante, pois o RNA é uma molécula termodinamicamente instável onde a hidroxila 2' do anel de ribose pode promover um ataque hidrofílico sobre a ligação fosfodiéster formando um fosfato cíclico 2'-3'.

3.15 ENSAIO DE TRANSCRIÇÃO *in vitro* DE RNA

Os plasmídeos utilizados para o ensaio continham o DNA codificador dos sRNA DsrA (89pb) ou RpoS (140pb) de *E. coli* clonados a jusante de um promotor T7. Estes plasmídeos permitiram a transcrição *in vitro* em larga escala dos sRNA desejados além de possibilitarem a marcação do fim de transcrição sem a presença de um grampo terminador. O término é marcado pelo final da seqüência de DNA formada pela ação de uma enzima de restrição.

O plasmídeo pT7G₂A₂DsrA ou pUC-T7RpoS2 foi linearizado por restrição com a enzima *EcoRI* (LEASE & WOODSON, 2004). A mistura de transcrição (50 µL) continha: 1 µg de plasmídeo linearizado, 1X de Tampão 10X (USB), 2 mmol/L de cada ribonucleotídeo (ATP, UTP, CTP e GTP), 50 U de inibidor de RNase (RNaseOUT-Invitrogen) e 30 U de T7 RNA polimerase (USB) como recomendado pelo fabricante.

Em seguida a reação foi incubada a 37 °C por duas horas e o produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2 %.

3.16 ENSAIO DE RETARDAMENTO DE BANDA EM GEL

Para este ensaio, a proteína Hfq de *H. seropedicae* foi previamente purificada como descrito no item 3.11.

As reações de ligação entre a proteína Hfq e os sRNA(s) foram preparadas em um volume final de 10 µL contendo: 50 nmol/L de sRNA, 2 µL de TE (10 mmol/L Tris-HCl pH 8,0 e 2,5 mmol/L de EDTA), 2 µL de tampão 5X (50 mmol/L Tris-HCl pH 8,0; 250 mmol/L NaCl, 250 mmol/L KCl e 250 mmol/L NH₄Cl) e concentrações variadas da proteína Hfq. A reação foi incubada por cinco minutos a 4 °C (LEASE & WOODSON, 2004). As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida em condição nativa 6 % (acrilamida/ bisacrilamida 29:1 (w/w)) em 0,5 X TBE). A coloração foi realizada com CYBR Gold (Invitrogen Inc.) durante 20 minutos no escuro. As imagens dos géis foram capturadas por excitação a 300 nm no aparelho UVP-Biolmaging Systems.

3.17 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA Hfq DE *H. seropedicae*

3.17.1 ANÁLISE *in silico* DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA

A análise *in silico* da estrutura secundária da proteína Hfq foi realizada usando o programa Psipred (JONES, 1999) disponível no site <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>.

3.17.2 ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA POR DICROISMO CIRCULAR

A espectroscopia por dicroísmo circular é uma técnica biofísica que permite determinar experimentalmente as frações de estrutura secundária de uma determinada proteína. Esta técnica permite ainda observar mudanças estruturais em função da variação de parâmetros como pH, temperatura e ação de ligantes.

As medidas de dicroísmo circular (CD) foram realizadas no espectropolarímetro Jasco model J-810, localizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas-SP), com o auxílio do Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa e de sua aluna de doutorado Camila Ramos dos Santos. O espectro UV (200-260 nm) foi coletado utilizando a proteína Hfq com uma concentração de 0,2 mg/mL em 20 mmol/L de tampão fosfato pH 8,0 e 100 mmol/L de NaCl, a 25 °C. As cubetas de quartzo tinham um caminho óptico de 0,1 cm. Os dados foram coletados com uma resolução de 0,5 nm e registrados com uma velocidade de 100 nm/min. Cada espectro resultou de uma média de vinte registros com uma resposta de 1s. Os dados correspondentes ao branco foram coletados usando somente o tampão da proteína. Cada espectro foi corrigido à linha de base e normalizado a $[\theta]_{\text{mrw}}$ (graus $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$) de acordo com ADLER *et al.*, 1973. Os experimentos de desnaturação foram realizados variando-se a temperatura de 15 a 95 °C acompanhando as mudanças a 222 nm. Estes dados foram utilizados para se obter a temperatura de *melting*, ou seja, temperatura na qual a proteína perde drasticamente a estrutura secundária.

A estimativa das estruturas secundárias foi realizada pela deconvolução do espectro de CD usando o programa DICROPROT (DELEAGE & GEOURJON, 1993).

3.18 DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE OLIGOMERIZAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq

Para a determinação do número de monômeros da proteína Hfq por oligômero, foram utilizados o método cromatográfico de gel filtração e o método biofísico de espalhamento de luz dinâmico.

3.18.1 GEL FILTRAÇÃO

A massa molecular do oligômero da proteína Hfq foi estimada por gel filtração na coluna Superose 12HR 10/30 (GE HealthCare). Esta coluna tem as seguintes dimensões: 1 cm de diâmetro, 30 cm de altura e 23,52 ml de volume total. A eluição foi realizada no cromatógrafo ÄKTA Basic System (GE HealthCare). A coluna foi equilibrada com 3 VC de 50 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,0) contendo 100 mmol/L de NaCl a um fluxo de 0,5 mL/min.

Após a eluição dos padrões *blue dextran* (2000 kDa), β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo C (12,4 kDa), foram determinados seus volumes de eluição e respectivas constantes de partição. Com estes dados, foi montado um gráfico constante de partição em função do log da massa molecular de cada proteína padrão. A determinação da equação de reta foi realizada por regressão linear usando o programa Excel. A proteína foi eluída com o mesmo tampão e seu volume de eluição foi registrado. A massa molecular Hfq foi determinada pela interpolação de sua constante de partição no gráfico preparado anteriormente.

3.18.2 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

As medidas de DLS da proteína Hfq foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas-SP) utilizando o equipamento DYNAPRO (Protein Solutions Inc.), à temperatura ambiente, com o auxílio do Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa e de sua aluna de doutorado Camila Ramos dos Santos. A amostra de proteínas (0,2 mg/mL) foi centrifugada a 14.000 g por 15 minutos antes das medidas de DLS. A partir da análise dos dados foi obtido o coeficiente de difusão translacional (D_T).

As análises de DLS foram realizadas através do programa DYNAMICS versão 3.0 (Protein Solutions Inc.).

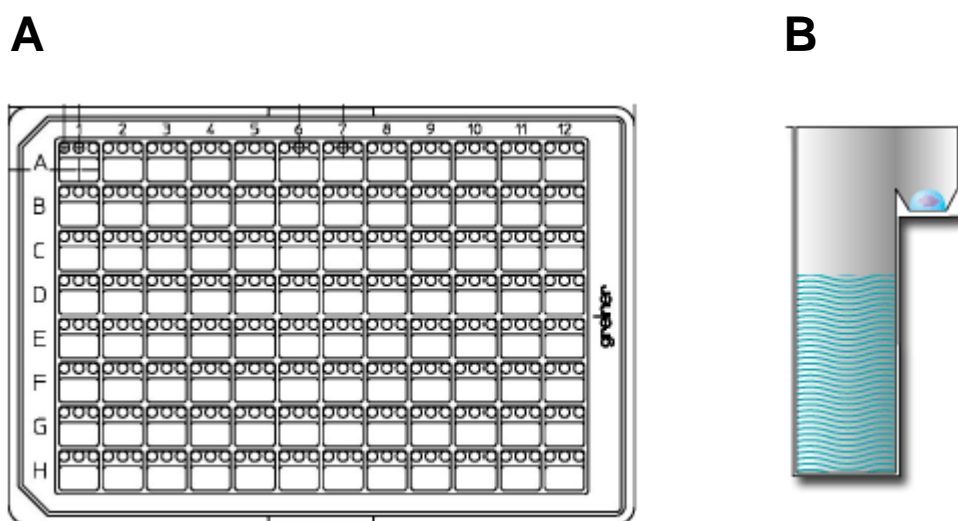
3.19 CRISTALIZAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq NATIVA

Os ensaios de cristalização são baseados em um método fatorial, ou seja, de tentativa e erro, utilizados para levar a solução protéica a um estado de supersaturação. A partir deste estado, a proteína pode formar um precipitado amorfo ou organizar-se, formando um cristal. Este estado pode ser atingido variando-se os componentes e a concentração da solução precipitante (tampão, sal e agente precipitante) que foram adicionadas à solução de proteínas. Outros dois importantes fatores para se obter um cristal são a pureza e a quantidade de proteína. O alto grau de pureza diminui a possibilidade das impurezas causarem a formação de cristais imperfeitos, devido à desorganização interna do cristal. A grande quantidade da proteína pode permitir a formação de cristais com tamanho suficiente para os experimentos de difração de raios-X.

Para o ensaio de *screening* inicial de cristalização, a proteína Hfq nativa em 100 mmol/L de NaCl e 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0, purificada como descrito no item 3.11, foi concentrada em tubos Centricon 5K (Millipore) até uma concentração final de 13 mg/mL.

Os ensaios foram realizados através do método de difusão de vapor em gota sentada onde 0,5 μL da solução de proteína a 13 mg/mL e 6,5 mg/mL foi misturada a 0,5 μL da solução do reservatório (80 μL). Foram utilizadas placas 96 Well CrystalQuick™Plate (Greiner Bio-One) de 96 reservatórios com três poços por reservatório (figura 7).

FIGURA 7 – PLACA PARA CRISTALIZAÇÃO EM GOTA SENTADA



(A) Figura esquemática da placa 96 Well CrystalQuick™Plate (Greiner Bio-One) utilizada para os ensaios de cristalização. (B) Figura mostrando em detalhes a estrutura do poço.

Os ensaios iniciais foram realizados através do método da matriz esparsa (JANCARIK & KIM, 1991; CUDNEY *et al.*, 1994) utilizando as soluções dos Kits: Crystal Screening (Hampton), Crystal Screening 2 (Hampton), Wizard I (Emerald Biosystems), Wizard II (Emerald Biosystems), PACT (Nextal/Qiagen), JCSG (Nextal/Qiagen), SaltRx (Hampton) e Precipitant Synergy (Emerald Biosystems). Estas soluções (544 condições) foram montadas nas placas de forma automatizada utilizando o robô Honeybee 963 (Genomic Solution®) no Laboratório Nacional de Luz Síncrontron (figura 8).

Após a montagem do experimento as caixas contendo as soluções foram acondicionadas em sala com temperatura controlada a 18 °C. O desenvolvimento de cada gota foi acompanhado durante o período de um mês.

FIGURA 8 – EQUIPAMENTO PARA CRISTALIZAÇÃO AUTOMATIZADA



Robô Honeybee 963 utilizado para o processo de montagem das placas de cristalização.

Os cristais obtidos foram avaliados como sendo de proteína através de difração de raios-x. Os dados foram coletados usando o Gerador Rigaku UltraX-18HF (ânodo rotatório de Cu) e o detector Mar345. A coleta de dados foi realizada a 100 K utilizando o sistema criogênico Oxford Cryosystem 700. Antes da coleta, foram adicionados 10 μ L de glicerol à gota contendo o cristal com o objetivo de crioproteção. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Apoio GAR do Laboratório Nacional de Luz Síncrontron.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína Hfq tem sido amplamente estudada, devido à sua função de regulador global da expressão gênica a nível pós-transcricional. No caso do metabolismo do nitrogênio, Kaminski e colaboradores (1994) e Drepper e colaboradores (2002) relataram um possível envolvimento desta proteína no processo a fixação de nitrogênio via proteína NifA.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de contribuir para a caracterização estrutural e funcional da proteína Hfq da bactéria diazotrófica *H. seropedicae*. Desta forma para os ensaios de atividade e cristalização o gene *hfq* foi clonado e a proteína foi purificada e caracterizada quanto a sua estrutura secundária e estado de oligomerização.

4.1 ANÁLISE *in silico* DO GENE *hfq*

O gene *hfq* de *H. seropedicae* é composto de 240 pares de bases e codifica uma proteína de 79 aminoácidos. Na região regulatória foi identificado um provável promotor tipo sigma 70 (figura 9).

No gene *hfq* *E. coli*, além do promotor sigma 70, foi identificado um promotor de *heat-shock* (CTGGCGAACAGTCAGTCTGACCCCTATTT) que está, aparentemente, envolvido na manutenção dos altos níveis de transcrição em condições de stress (TSUI *et al.*, 1996). O mesmo promotor (TTGAAA-N₁₄-CCCCATTT) (NONAKA *et al.*, 2006) não foi identificado na região promotora de *hfq* em *H. seropedicae*.

FIGURA 9 – SEQUÊNCIA DE BASES DA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE *hfq* DE *H. seropedicae*

```

ctc cac tgc gta tcg agt tcc gat ccg gca aga atc ctt tca tcc
ggc agg aaa agt aat cga aaa gtt cgc tat tga atc aat gtt ttt
ggc gtt gaa gct aaa atc gtt taa att gaa tag cat aaa att ggt
                                      $\sigma^{70}$ 
aaa gca ctt gat att cct tga agt gcc tcc aag tcc taa tca caa

caa cac cgt gga gct gcc ATG agc aac aaa ggg caa ttg tta caa
          RBS                M   S   N   K   G   Q   L   L   Q
gac cca ttt ctg aac gca ttg aga aaa gag cac gtt ccc gtc tct
D   P   F   L   N   A   L   R   K   E   H   V   P   V   S
atc tac ctg gtc aac ggc atc aag ctg caa ggc cat gtg gag tct
I   Y   L   V   N   G   I   K   L   Q   G   H   V   E   S
ttc gat caa tac gtg gtc ctg ctg cgt aac acc gtt acg caa atg
F   D   Q   Y   V   V   L   L   R   N   T   V   T   Q   M
gtt tac aaa cac gcc atc tct acc gtc gtg cct gca cgt gcg gtc
V   Y   K   H   A   I   S   T   V   V   P   A   R   A   V
aac ctc agt ctc gaa tcc tcg tcc gac gaa TAA tgg tct acc tgg
N   L   S   L   E   S   S   S   D   E   *

```

RBS: sítio de ligação do ribossomo. Em vermelho a sequência de bases do gene *hfq*. Em azul a sequência de aminoácidos determinada usando o programa BioEdit. Em rosa o provável promotor σ^{70} .

Através das análises do banco de dados da anotação do genoma de *H. seropedicae* (GENOPAR) foi possível determinar que o gene *hfq* encontra-se no contig 251, juntamente com três genes a jusante *hflX*, *hflK* e *hflC*. Estes aparentemente compreendem um operon (figura 10 e 12). Esta sugestão baseia-se na análise *in silico* das regiões intergênicas onde não foram encontrados promotores clássicos e também da região a jusante do códon de término de tradução do gene *hflC*, em que, pela análise utilizando o programa de bioinformática Mfold (ZUKER, 2003), foi encontrado um provável grampo com $\Delta G = -15$ kcal/mol seguido de seis uracilas logo após o término do gene (figura 10 e figura 11). Estas características são típicas de terminadores independentes da proteína Rho (LEWIN, 1999).

FIGURA 10 – SEQUÊNCIA DA REGIÃO CODIFICADORA DO PROVÁVEL OPERON *hfqhflXhflKhfIC*



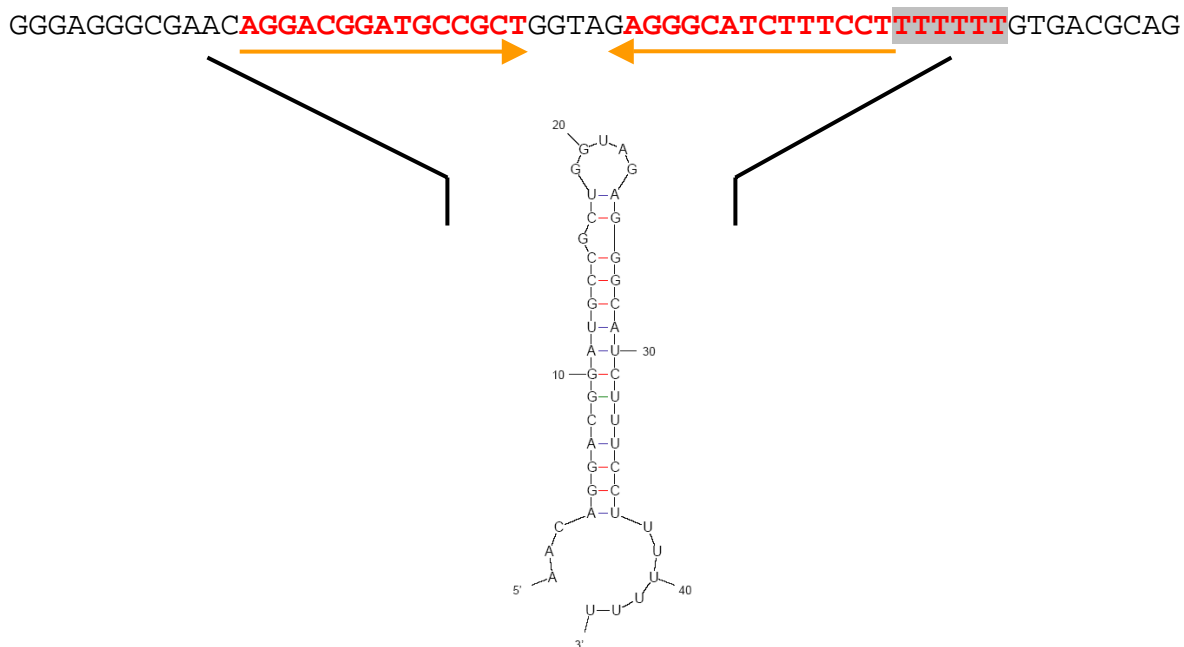
AAGTCCATCGATTCCGCCTACGCCGCGGCCATGGCCAAGCTGAGCACGCCGCGCCTGACCCGCGC
 GCTGGAAGAGGCGCTGGAGCACCAGCAGCCGCGCCGCAAGGGTTCGATCCGTCCCAAGCTGCGCT
 ATGCGCACCAGGGTGGCCAGAATCCGCCGGTGGTGGTCATCCACGGAAATGCCCTCGAAGCCATC
 GATGACAACACTACAAACGCTATCTGGAAAAGCACTTCCGGGAAACTTTCTCCCTGGTCGGCACTCC
 ACTGCGTATCGAGTTCGATCCGGCAAGAATCCTTTCATCCGGCAGGAAAAGTAATCGAAAAGTT
 CGCTATTGAATCAATGTTTTTGGCGTTGAAGCTAAAATCGTTTAAATTGAATAGCATAAAATTGG
 TAAAGCACTTGATATTCCTTGAAGTGCCTCCAAGTCTAATCACAACAACACC**GTGGAG**CTGCCA
TGAGCAACAAAGGGCAATTGTTACAAGACCCATTTCTGAACGCATTGAGAAAAGAGCACGTTCCC
GTCTCTATCTACCTGGTCAACGGCATCAAGCTGCAAGGCCATGTGGAGTCTTTCGATCAATACGT
GGTCTGCTGCGTAACACCGTTACGCAAATGGTTTACAAACACGCCATCTCTACCGTCGTGCCTG
CACGTGCGGTCAACCTCAGTCTCGAATCCTCGTCCGACGAATAATGGTCTACCTGGCCGGCTTGA
 CGCCGT**GGGCA**TTCTGACATGCGTGCCGCGTTAGTCGGCCTGGACTTCGGCAAGAACGATTTTGC
 CGTAGTCTGGATGAGCTGTATCTGTTGGCGAAATCCGCTGGCGCTGAACCCGTGATCACCATCA
 CCGGTCGCCGCGCCAGTCCGGATGCCGCTCTCTTCATCGGTACGGCAAGGCCAGGAAGTGGCC
 GACGCCGTCGCTGATCTCCAGCTTGAGCTGGTCATCTTCAATCACGCACTGTCCCCGGCCCAGCA
 ACGTAACTGGAGCGTCTGCTCAAGGTGCGCGTGTCTGACCGTACCAGCCTGATCCTGGATATCT
 TCGCGCAGCGCGCCAAGAGCCACGAGGGCAAGGTGCAGGTGCAACTGGCGCAGTTGCAGCACCTG
 TCTACCCGCTCATCCGCGGCTGGACTCACCTGGAACGGCAAAGGGCGGTATCGGCCTGCGCGG
 CCCGGGTGAAACGCAGCTCGAAACCGACCGCCGCTGCTGGGCGAGCGCGTCAAGGCCTTGCGTG

CGGTGCTGGCCAAGCTGCGCCGGCAACACGCCACCCAGCGTCGTGCGCGGGGGCGCAACGAGACG
TTCTCGGTGTGCTGGTGGGGTATACCAACGCCGGCAAATCAACCATCTTCAATGCGCTGGCCAA
GGCCGGCGTGTATGCTGCGAACAGCTCTTCGCTACGCTGGATACGACCTCCCGTCGCGTCTACC
TGGGTGAAGTAGGGCATGTGGTGATCTCCGACACCGTCGGTTTCATCCGCGAACTGCCCCACCAG
CTGGTGAAGCCTTCCGCGCCACGCTGGAAGAAACCATCCATGCCGACCTCCTGTTGCACGTGGT
CGATGCCGCCAGCCCGGTGCGCATGGAGCAGATCGAGGAGGTCAACCTGGTCCTCAAGGAAATCG
GCGCCGACCACGTGCCGAGATCCTGGTCTGGAACAAGATCGACGCTGCCGGCCTGGAGCCGACG
GTCGAGTATGACGAGTATGGTAAATCCAGCGGGTTTTTCGTGAGTCCCAAGTCTGGTGTGGCCT
GGATCTGCTGCGCGAAGCGATCGCCGCTTCGCTCAAGGCCGCCTTGGAGGCCAGGGGTGCGAGCC
GTTCCGAGCCAGTCGATTCGGTAGACATGCACGCCTGAGCCGTTTCGAGGGGACGGCATTTCGCCC
GTTCTGCGCGCATTCTCCTAGATTCTTAAATCCATCACTACAGCCGGATCGCAAAACGCATG
CTTGTGTCTTTATTAGGAAAATCGGTGTCAAGTTTTTCGTTGAACGACCCCAATGGGGACGTGG
TTCGCAAAACGACAACCGGGACAATCAGAATAACGGAAATAACGGCGACAAACGGGCAGAAAAAC
CGTCCGGGCACAATGACGGTCCGCCTGATCTCGACCAGCTCTGGCGCGACTTCAATCAGCGTCTG
TCCGCCCTGTTTCGCCCAGGCGGCGGTGGCGGTTTCGTCCGATGGCGGCAATGGCGGCGGCTTCAA
CCGTGGCGACGTCAAGGGCGCCGGTATCGGCGTGGGCGTCATTGCGGTCATCGTGCCCTTCCTCT
GGCTGGCCAGCGGCTTCTTCATCGTGCAGGAAGGCCAGACCGCGGTCGTGACCACCTTCGGCCGC
TACAGCCATAACCAGCTGCCAGGCTTCAACTGGCGCTGGCCATATCCATCCAGGGCCATGAGAT
CGTCAACATGTCCCAGGTGCGGACCGCCGAGATCGGCTATCGCGGCAACGTGCGCAACAAGCAGC
TCAAGGAATCGCTGATGCTCACCGATGATGAGAACATCATCGACATCCAGTTTGCCGTCCAGTAC
AAGCTCAAGAACGCCCGCAATGGCTGTTCAACAACCGCGACCCGGATGACTCCGTGCGCCAGGT
CGCCGAGACCGCCATCCGCGAGATCGTCGGCCGAGCAAGATGGACTTCGTCCTCTATGAAGGCC
GCGAAAAGGTGCGCCTCGACGTGAGCCAGCGCATGCAGCAGATCCTGGACCGCTACAAGTCGGGC
GTGCAGATCACCAACGTGACCATGCAGGGCGTGCAACCGCCTGAGCAGGTGCAGGCCGCTTCGA
TGACGCCGTCAAGGCCGGCCAGGACCGCGAACGCCTCAAGAACGAAGGCCAGGCCTACGCCAACG
ACGTGATTCCGCGCGCTTCCGGCGCCGCCTCGCGCCTGCTGGAAGAAGCCGAAGCCTACCGCTCG
CGCGTAGTGGCCAACGCCGAAGGTGACGCCTCGCGCTTCAACCAGGTGCAAGAAGCCTATGCCAA
GGCCCCGGCCGTACCCGCGACCGCATGTATATCGAAACCATGCAGCAGATCTTCGCCAACACCA
CCAAGGTCATGGTCGATGCCAAGTCCGGCAGCAACCTGCTGTACCTGCCGCTGGACAAGCTGATC
CAGCAGACCGGCCCGAAGCCGCTGCGGGGGCAAGCCGGCCGCTCGGCTGCGGCCCCGGCCGC
CAGCGCTGCGAATCCCGCGTGAATGCGGGCAATGACACTGTGTATTCTTCGAGCTGATGCGTG
ACATGAGAAACCGCGATCCGCGCAATCGCGCGAAAAGGAGGTGCGCTGATGGGCCGCGCTCGTTA

CTTCCGTCATCGTCGCCGTGGTGGCGATCTGGCTGGCCTCGTCCACGATCTTCGTGGTCGACCAG
 CGTTCCTCGGCCATCGTCTTCGCCCTGGGTGAAGTCAAGCAGGTCATCACCGAACCCGGCCTGCA
 TTTCAAGCTGCCGCCGCCGTTCCAGAACGTGATGTACCTGGACAAGCGCATCCAGACCCTGGATA
 CGCCGGACGCCGACCGCTTCATCACCGCCGAGAAGATGAACGTGCTGGTTCGATGCCTACGTCAAG
 TGGCGCATCGTCGATCCGCGCCTGTACTTCGTACGCTTCGGCGCCGACGAACGCCGCACCCAGGA
 CCGCCTCTCGCAGATCGTCAAGGCTGCGCTCAACGACGAGATCACCAAGCGCACCCGTGCGCGAAG
 TCATCTCCAGCCAGCGCAACAACGTGATGGACGCCATCCAGGCGCGCGTGGCCAACGAAGCCAAG
 CAGATCGGCGTGGAAGTCATCGACGTGCGTCTGCGTTCGCGTGGACTATGTTGACCAGATCAACAA
 TTCCGTCTTCGAACGCATGAAGTCCGAGCGCGTGGCGTGGCCAACGAGCTGCGTTCCACCGGTG
 CGGCAGAATCCGAGAAGATCCGCGCCGACGCCGACCGCCAGCGCGTGGTGATCCTGGCCGAAGCC
 TATCGCGAATCCGAAAAGATCCGTGGCGCTGGCGACTCCAAGGCGTCGCAGATCTACGCCCAGGC
 CTTCCGGCCAGAACCCTGAGTTCTTCAAGTTCTACCGCAGCCTGGAAGCCTACCGCGCCAGCTTCA
 AGAACCGCCACGATGTCATGGTGGTGGACCCGAGCTCGGAATCTTCAAGTATTTCAAGGGCATC
 GCGCAGGCAGCGCCAGCACTTCCAAGAAGTAA AATTCCGCTGAACAAGCGATAATGTGAATATG
 TCCGCCCCGCCAGCCTGGCTGGAGGGGAGGGCGAAC **AGGACGGATGCCGCT**GGTAG **AGGGCATCT**
TTCCTTTTTTTTGTGACGCAGAATGTTCCGGTGTGCAATTTTCCCGGAATGTGAGACGAGGGGCGG
 CAGGTTTTTCCCGACCGCCCCGGTTTTTTCGTCTGGCGGACCTGTTTGTGCAACCTGTACCTGGG
 CTTGTCCCTGGTGTGGCTGCTACGCCCTGGTTTCGCAATGCATGCAAGCCCCGCAATTCGTTACG
 CAAACCGTTTTTTTCTGCTTTCACTCTTGTTTATGCCTAACTGGCTTCTTCCCGAAAACATCGCCG

Seqüência de bases analisada pelo programa FramePlot (ISHIKAWA & HOTTA, 1999). Em vermelho a seqüência do gene *hfq*, em azul a seqüência do gene *hflX*, em verde a seqüência do gene *hflK*, em rosa a seqüência do gene *hflC*, em amarelo os sítios de ligação do ribossomo. Setas em laranja indicam as regiões formadoras do provável grampo de terminação. A seqüência de seis timinas está destacada em cinza.

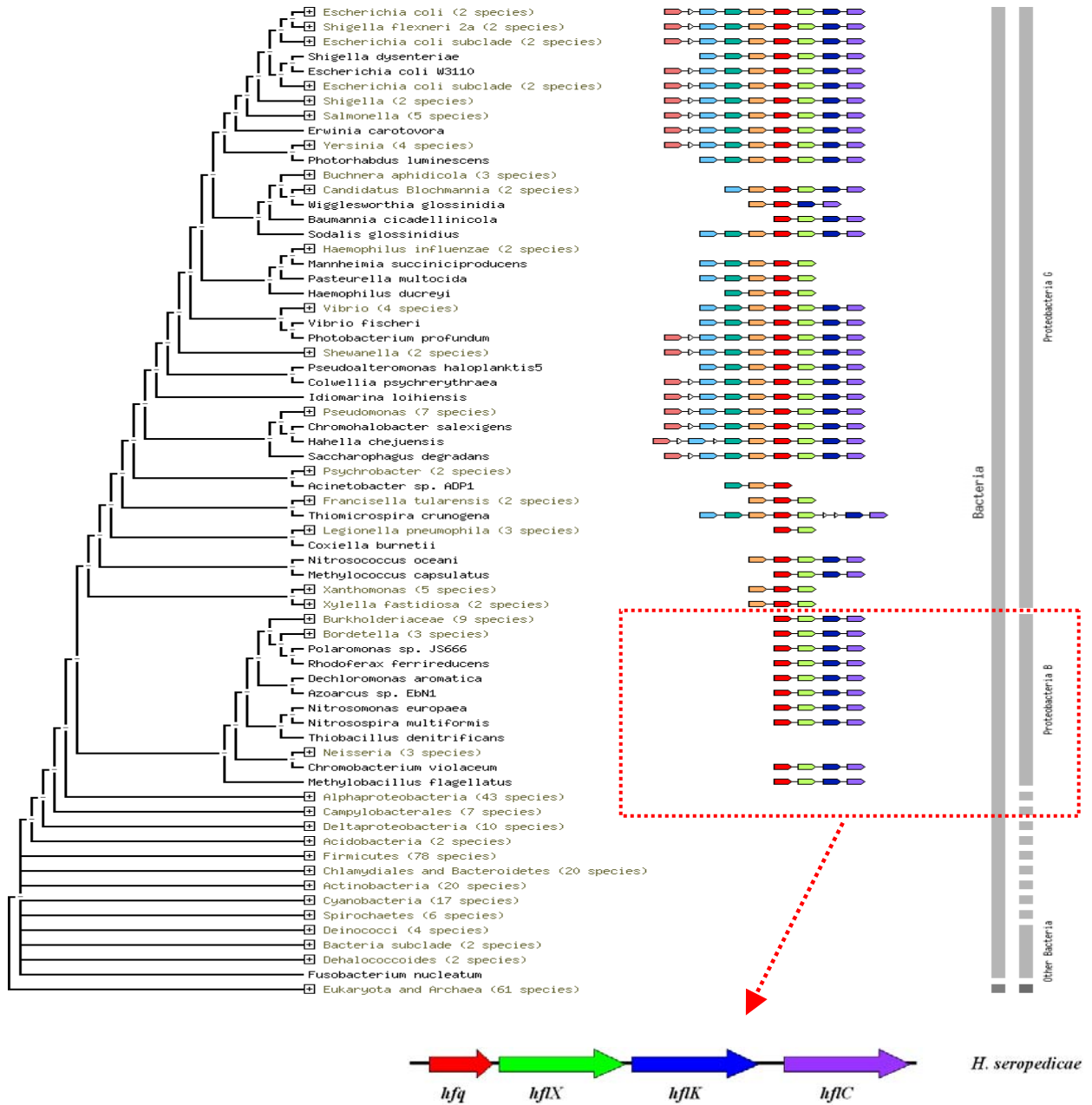
FIGURA 11 – PREDIÇÃO DO PROVÁVEL TERMINADOR DO OPERON *hfqhflXhflKhflC*



A predição do terminador do operon *hfqhflXKC* foi realizada pelo programa Mfold. Na porção superior da figura a localização da sequência formadora do terminador. Na porção inferior estrutura secundária do provável terminador.

Os genes *hflX*, *hflK* e *hflC* fazem parte da vizinhança gênica de *hfq* nas γ e β -Protobactérias (figura 12). O gene *hflX* codifica uma GTPase envolvida na proteólise do repressor CII do fago lambda, enquanto que os genes *hflK* e *hflC* codificam proteínas integrais de membrana (NOBLE *et al.*, 1993) e podem compor duas formas gerais de organização gênica dentre as bactérias: *hfqhflXKC* presente nas β -Proteobactérias e o *cluster amiBmiaAmutLhfqhflXKC* presente nas γ -Proteobactérias (figura 12). No caso deste último, é comum a presença de um gene codificador para uma proteína hipotética a montante do gene *amiB* (figura 12). Kajitani e Ishihara (1991) descreveram em *E. coli* o operon *amiBmiaAmutLhfqhflXKC* onde se encontra o gene *hfq*. Em *H seropedicae*, no *contig* 251 foi encontrado somente a seqüência de genes *hfqhflXhflKhflC*, concordando, portanto, com a organização gênica observada para as β -Protobactérias.

FIGURA 12 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES VIZINHOS A *hfq* NO GENOMA DE DIFERENTES MICRORGANISMOS



Comparação das vizinhanças gênicas do gene *hfq* em diferentes organismos realizada pelo programa String (<http://string.embl.de>). À esquerda a árvore filogenética dos grupos analisados e à direita o contexto genômico do gene *hfq* indicado por uma seta vermelha. O quadrado vermelho indica a organização gênica no grupo das β-Proteobactérias. Em destaque, a organização gênica presente em *H. seropedicae*.

4.2 ANÁLISE *IN SILICO* DA PROTEÍNA Hfq

A seqüência de aminoácidos da proteína Hfq de *H. seropedicae* apresentou alta identidade com as proteínas Hfq de *Burkholderia xenovorans* LB400 (90%), *Ralstonia eutropha* JMP134 (88%), *Nitrosomonas eutropha* C91 (76%), *Escherichia coli* (72%), *Pseudomonas aeruginosa* (68%), quando analisadas pelo programa BlastP. Contudo apresentou baixa identidade quando comparada com as proteínas Hfq de *Staphylococcus aureus* (30%), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (24%) e *Methanococcus jannaschii* (20%), estas com estrutura cristalográfica já resolvida. Estas relações de identidade podem ser observadas pelos alinhamentos individuais da seqüência de aminoácidos da proteína Hfq de *H. seropedicae* com as seqüências das proteínas dos organismos acima citados (figura 13).

Com o alinhamento dos aminoácidos das proteínas Hfq de treze organismos diferentes pertencentes ao grupo das γ e β -Protobactérias foi possível observar a presença de aminoácidos conservados na região N-terminal e central (figura 14). Estes dados concordam com o que já foi observado por Sauter e colaboradores (2003) que relataram ser o núcleo da proteína Hfq uma região comum a todas as proteínas Hfq. É possível também observar que as seqüências variam entre si principalmente quanto ao tamanho e composição de aminoácidos da região C-terminal (figura 14). As regiões N-terminal e central da proteína Hfq são responsáveis pela formação do hexâmero e ligação a sRNA (SONNLEITNER *et al.*, 2004), enquanto que a região C-terminal parece ser responsável pela ligação ao mRNA (VECEREK *et al.*, 2007).

Ainda quanto ao alinhamento de aminoácidos, é importante notar que o motivo YKHAL encontra-se totalmente conservado em todas as seqüências analisadas. Ao estudarem a estrutura cristalográfica do complexo Hfq-RNA de *Staphylococcus aureus* Schumacher e colaboradores (2002) relataram para este motivo que os aminoácidos lisina (K) e histidina (H) interagem com RNA, além da tirosina 43.

FIGURA 13 – ALINHAMENTO INDIVIDUAL DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS Hfq

(A)

Herbaspirillum MSNKGQLLQDPFLNALRKEHVPVSIYLVNGIKLQGHVESFDQYVLLRNTVTQMVKHAI 60
 Burkholderia MSNKGQLLQDPFLNALRKEHVPVSIYLVNGIKLQGNIESFDQYVLLRNTVTQMVKHAI 60
 *****:*****

Herbaspirillum STVVPARAVNLSLESSSDE 79
 Burkholderia STVVPARPVNFHPDSEQS- 78
 *****:**: *..

(B)

Herbaspirillum MSNKGQLLQDPFLNALRKEHVPVSIYLVNGIKLQGHVESFDQYVLLRNTVTQMVKHAI 60
 Ralstonia MSNKGQLLQDPFLNALRKEHVPVSIYLVNGIKLQGNIESFDQYVLLRNTVTQMVKHAI 60
 *****:*****

Herbaspirillum STVVPARAVNLSLESSSDE 79
 Ralstonia STVVPARAVNFRVDDSAEG 79
 *****: :.*:

(C)

Herbaspirillum MSNKGQLLQDPFLNALRKEHVPVSIYLVNGIKLQGHVESFDQYVLLRNTVTQMVKHAI 60
 Nitrosomonas MGVKGQLLQDPFLNLRKEHIPVSIYLVNGIKLQGHIDESFDQYVLLRNSVTQMVKHAI 60
 * . ***** . *****:*****:*****:*****:*****

Herbaspirillum STVVPARAVNLSLESSS-DE 79
 Nitrosomonas STIVPGKAVSIPVPAETLPE 80
 **:*:*:*:*:*: :.. *

(D)

Herbaspirillum MSNKGQLLQDPFLNALRKEHVPVSIYLVNGIKLQGHVESFDQYVLLRNTVTQMVKHAI 60
 Escherichia MA-KGQSLQDPFLNALRRERVPVSIYLVNGIKLQGGQIESFDQFVILLKNTVSQMVKHAI 59
 *: ** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Herbaspirillum STVVPAR-----AVNLSLESSSDE-- 79
 Escherichia STVVPSPVSHHSNAGGGTSSNYHHGSSAQNTSAQDSEETE 102
 *****: * * * :.*:*

(E)

Herbaspirillum MSNKGQLLQDPFLNALRKEHVPVSIYLVNGIKLQGHVESFDQYVLLRNTVTQMVKHAI 60
 PSEAE MS-KGHSLODPYLNTRLKERVPSIYLVNGIKLQGGQIESFDQFVILLKNTVSQMVKHAI 59
 ** *: *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Herbaspirillum STVVPARAVNLSLESSSDE--- 79
 PSEAE STVVPSPVRLPSGDQPAEPGNA 82
 *****:*. * . . . *

(F)

Herbaspirillum -MSNKGQLLQDPFLNALRKEHVPVSIYLVNGIKLQGHVESFDQYVLLRN-TVTQMVKHAI 58
 Staphylococcus MIANEN--IQDKALENFKANQTEVTVFLNGFQMKGVIEEYDKYVVSLSNSQGGQHLIYKH 58
 :*: . :** *: :. :. *:::*****: * . :*:*** * . :::**

Herbaspirillum AISTVVPARAVNLSLESSSDE 79
 Staphylococcus AISTYTVETEGQASTESEE-- 77
 **** . : * * . .

(G)

```
Herbaspirillum      -----MSNKGQLLQDPFLNALR-KEHVPVSIYLVNGIKLQGHVESFDQYVVLLRNTVTQM 54
M. therm            GSVIDVSSQRVNVQRP-LDALGNSLNSPVI IKLKGDFRFGVLKSFDLHMNLVLDAAEEL 59
                    :*.:      : * * * : * * * . : * * * * . . : : * : * * * : : * : * . : :
```

```
Herbaspirillum      VYKHAISTV--VPAVAVNLSLESSSDE 79
M. therm            EDGEVTRRLGTVLIRGDNIVYISP--- 83
                    ..      : * * . * : * .
```

(H)

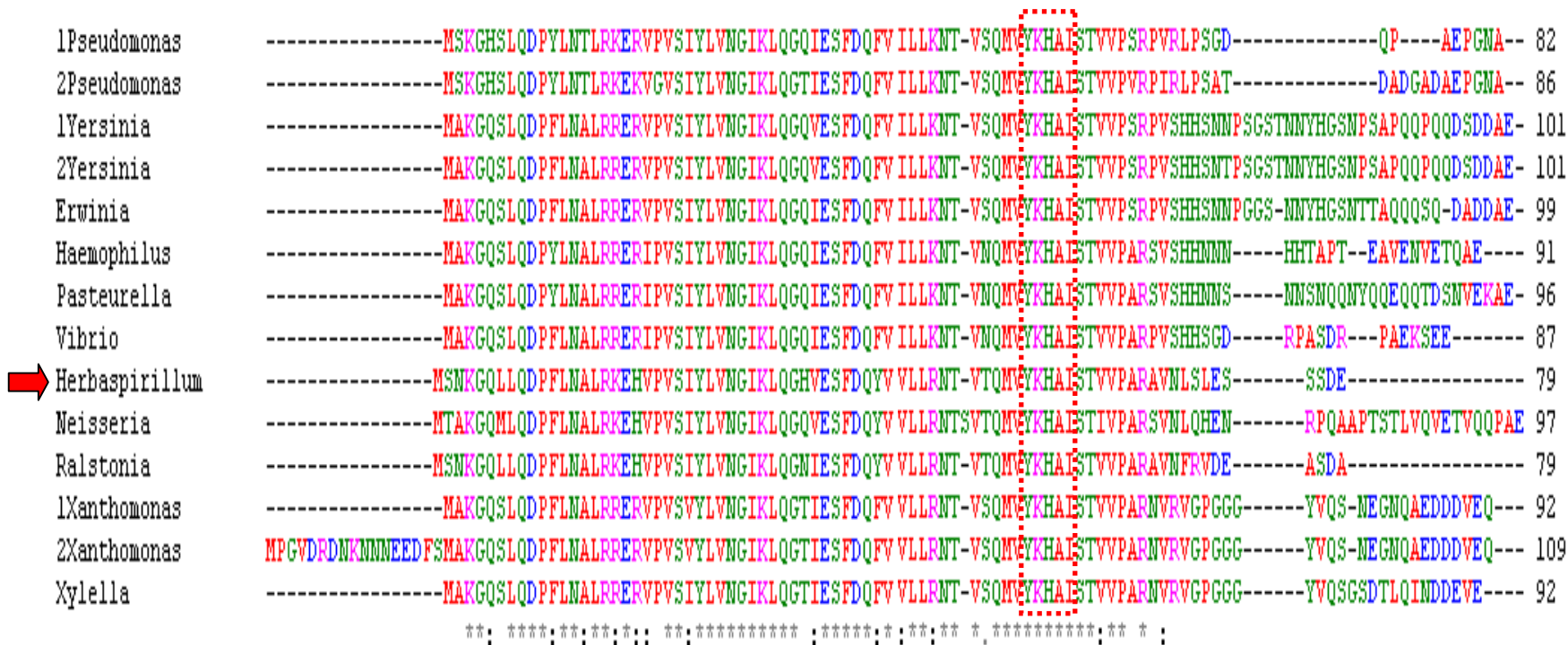
```
Herbaspirillum      -----MSNKGQLLQDPFLNALRKEHVPVSIYLVNGIKLQGHVESFDQYVVLLRN-TVTQM 54
Methanococcus       MNKPVKKQPKKVIIPNFEYARRLNGKKVKIFLRNGEVLDAEVTGVSNYEIMVKVGDRLNL 60
                    . : : : * * * : * . * * * * : . . * . . . : * : : : . : :
```

```
Herbaspirillum      VYKHAISTVVPARAVNLSLESSSDE 79
Methanococcus       VFKHAIDYIEY----- 71
                    *:****. :
```

Os dados do alinhamento foram obtidos com a utilização do programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). (*) Aminoácidos idênticos; (:) Aminoácidos de alta similaridade; (.) Aminoácidos de baixa similaridade. (A) *H. seropedicae* e *Burkholderia xenovorans* LB400; (B) *H. seropedicae* e *Ralstonia eutropha* JMP134; (C) *H. seropedicae* e *Nitrosomonas eutropha* C91; (D) *H. seropedicae* e *Escherichia coli*; (E) *H. seropedicae* e *Pseudomonas aeruginosa*; (F) *H. seropedicae* e *Staphylococcus aureus*; (G) *H. seropedicae* e *Methanobacterium thermoautotrophicum*; (H) *H. seropedicae* e *Methanococcus jannaschii*.

Até o momento foram determinadas as estruturas cristalográficas das proteínas Hfq de *E. coli*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanococcus jannaschii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (SAUTER *et al.*, 2003; COLLINS *et al.*, 2002; NIELSEN *et al.*, 2007; NICULIN *et al.*, 2005; SCHUMACHER *et al.*, 2002). Na árvore de similaridade de aminoácidos para a proteína Hfq de *H. seropedicae* e organismos com estrutura cristalográfica da proteína Hfq já resolvida (figura 15) fica evidente a presença de aminoácidos que diferencia a proteína Hfq de *H. seropedicae* das demais. Estas diferenças podem ser irrelevantes ou, podem contribuir para uma diferenciação estrutural e, portanto funcional.

FIGURA 14 – ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS Hfq



Os dados do alinhamento foram obtidos com a utilização do programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). (*) Aminoácidos idênticos; (:) Aminoácidos de alta similaridade; (.) Aminoácidos de baixa similaridade. 1 Pseudomonas (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1), 2 Pseudomonas (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* str. DC3000), 1Yersinia (*Yersinia enterocolitica*), 2 Yersinia (*Yersinia pestis* CO92), Erwinia (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCR11043), Haemophilus (*Haemophilus influenzae* Rd KW20), Pasteurella (*Pasteurella multocida*), Vibrio (*Vibrio cholerae*), Herbaspirillum (*Herbaspirillum seropedicae*), Neisseria (*Neisseria meningitidis* serogroup A), Ralstonia (*Ralstonia solanaceum*), Pasteurella (*Pasteurella multocida*), , 1 Xanthomonas (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* str. 85-10), 2 Xanthomonas (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KACC10331), Xylella (*Xylella fastidiosa*). O motivo YKHA está destacado por um quadrado vermelho.

FIGURA 15 – ÁRVORE DE SIMILARIDADE ENTRE AS PROTEÍNAS Hfq



Árvor e de similaridade de aminoácidos entre a proteína Hfq de *H. seropedicae* e de organismos com estrutura cristalográfica da proteína Hfq já resolvida. O programa utilizado foi o ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994).

Usando o programa ProtParam disponível no site EXPASY (www.expasy.ch/tools/protparam.html), foi possível também determinar algumas características bioquímicas teóricas da proteína Hfq nativa e fusionada à cauda de histidinas de *H. seropedicae*:

Proteína Nativa:

Número de Aminoácidos: 79

Massa Molecular: 8838,1 Da

pI Teórico: 6,82

Proteína Fusionada a Cauda de Histidinas:

Número de Aminoácidos: 99

Massa Molecular: 11001,4 Da

pI Teórico: 8,22

As análises *in silico* realizadas permitiram observar a significativa conservação da proteína Hfq de *H. seropedicae* assim como obter dados bioquímicos teóricos que foram levados em consideração nos passos de purificação e análise estrutural.

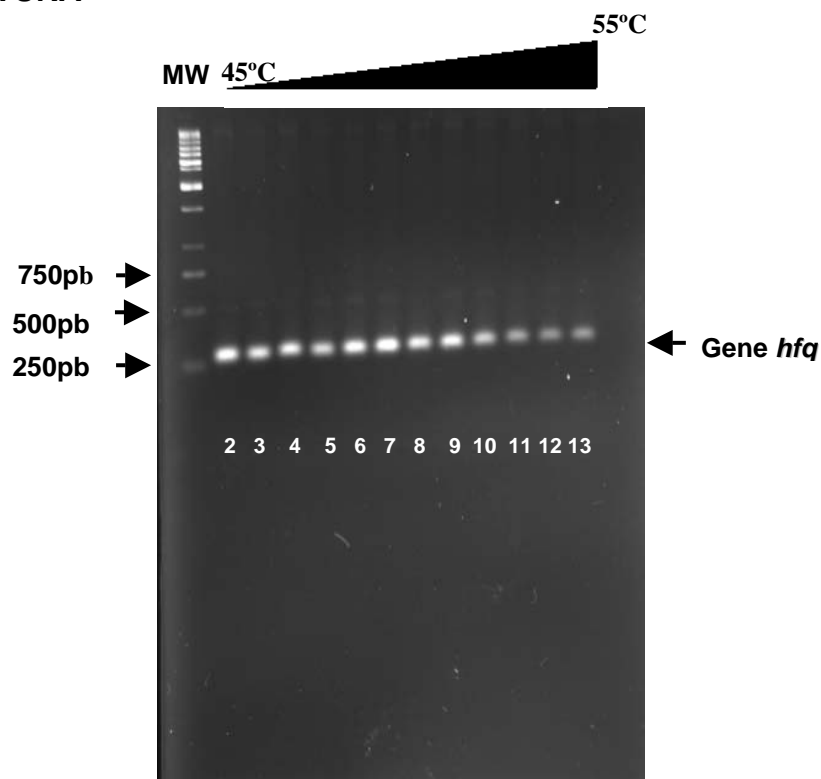
4.3 ANÁLISE FUNCIONAL DA PROTEÍNA Hfq

A fim de estudar a proteína Hfq de *H. seropedicae*, a seqüência codificadora foi amplificada e clonada em vetores de supexpressão que foram posteriormente transformados em *E. coli* BL21(DE3). Estes passos foram desenvolvidos visando a purificação da proteína para os ensaios de ligação ao sRNA DsrA e cristalização.

4.3.1 CLONAGEM DO GENE *hfq* EM VETORES DE EXPRESSÃO

Para a clonagem do gene *hfq* de *H. seropedicae* em vetor de expressão, primeiramente o mesmo foi amplificado utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores contendo os sítio de restrição para as enzima *NdeI* e *HindIII*. O DNA genômico de *H. seropedicae* extraído conforme o ítem 4.5.3 foi utilizado como molde e a reação de PCR foi realizada em gradiente de temperatura (45-55°C) de anelamento, devido à dificuldade inicial em se obter o amplificado utilizando a temperatura de anelamento calculado teoricamente. Como resultado, houve a formação de um amplificado de aproximadamente 250pb em todas as temperaturas selecionadas para o anelamento do oligonucleotídeo. Os amplificados produzidos estão mostrados na figura 16.

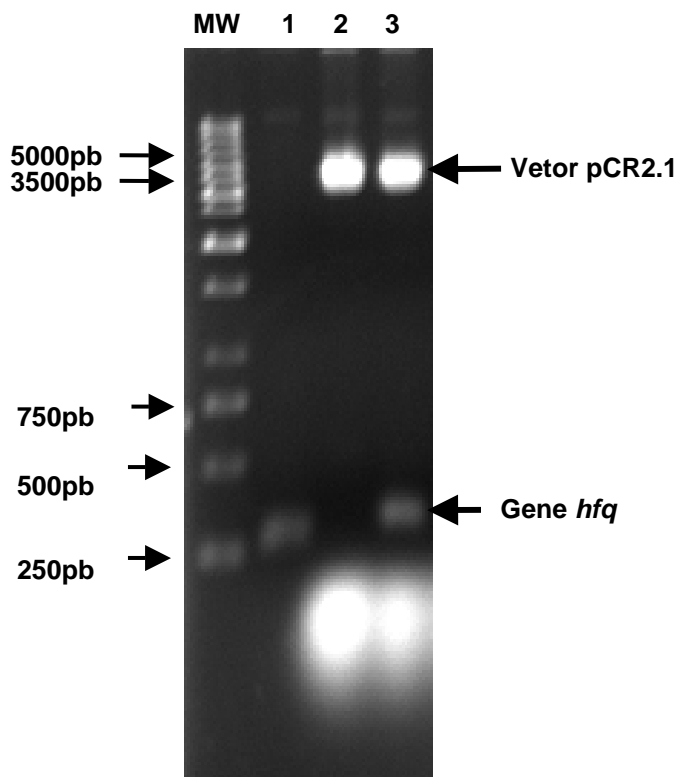
FIGURA 16 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *hfq* POR PCR COM GRADIENTE DE TEMPERATURA



Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5 %. MW: padrão de massa molecular 1 Kb Ladder. Linhas de 2 a 13: produtos de PCR obtidos com o gradiente térmico de 45 a 55°C.

Em seguida, o fragmento contendo o gene *hfq* amplificado foi subclonado no vetor pCR2.1 (3,9 Kb) que possui resistência aos antibióticos ampicilina e canamicina, dois sítios para a enzima de restrição *EcoRI* que permitem a liberação do inserto e confirmação da clonagem, gene *lacZ* e uma timina em cada ponta 3'. A presença de timina permite a clonagem do produto de PCR, uma vez que a *Taq* DNA polimerase caracteriza-se por adicionar uma adenina às pontas 3' do amplificado. Após a transformação das células de *E. coli* TOP10, doze transformantes que não apresentaram atividade de β -galactosidase, ou seja, doze colônias de cor branca, tiveram os seus plasmídeos extraídos e analisados por eletroforese após restrição com a enzima *EcoRI*. Após a confirmação da clonagem por restrição, um dos clones contendo o gene *hfq* (figura 17) teve a seqüência de pares de base do inserto confirmado por seqüenciamento (item 3.5.4).

FIGURA 17 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE CLONE pCR2.1 :: *hfq*

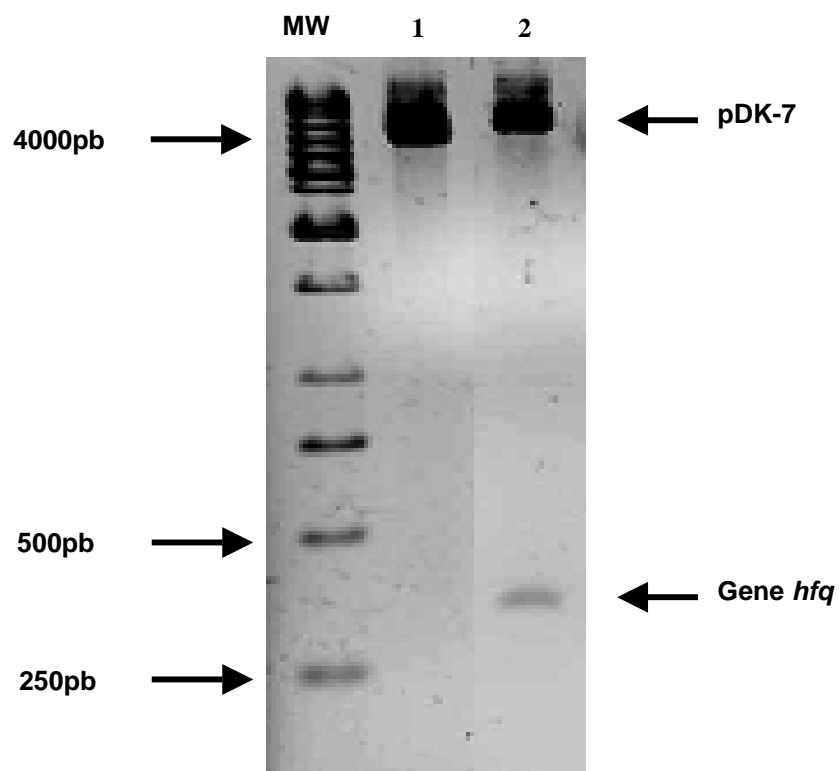


Eletroforese em gel de agarose 1,5 %. O clone obtido foi clivado com a enzima de restrição *EcoRI*. MW: padrão de massa molecular 1 Kb Ladder. 1: amplificado intacto do gene *hfq*. 2: vetor pCR2.1. 3: clone.

Como o plasmídeo pCR2.1 apresenta resistência aos antibióticos ampicilina e canamicina, foi necessário realizar um passo intermediário de clonagem no vetor pDK-7, que possui resistência ao antibiótico cloranfenicol, para então transferir o DNA inserto para os plasmídeos pET28(a) e pT7-7. Esta estratégia teve como objetivo facilitar a seleção dos subclones para a expressão de Hfq, uma vez que o vetor pET28(a) possui resistência a canamicina e o vetor pT7-7 possui resistência a ampicilina.

Os vetores pCR2.1::*hfq* e pDK7 foram clivados com as enzimas *XbaI* e *HindIII* e um fragmento de 360pb contendo o gene *hfq* foi subclonado no vetor pDK7 originando o plasmídeo pKADO0 (figura 18).

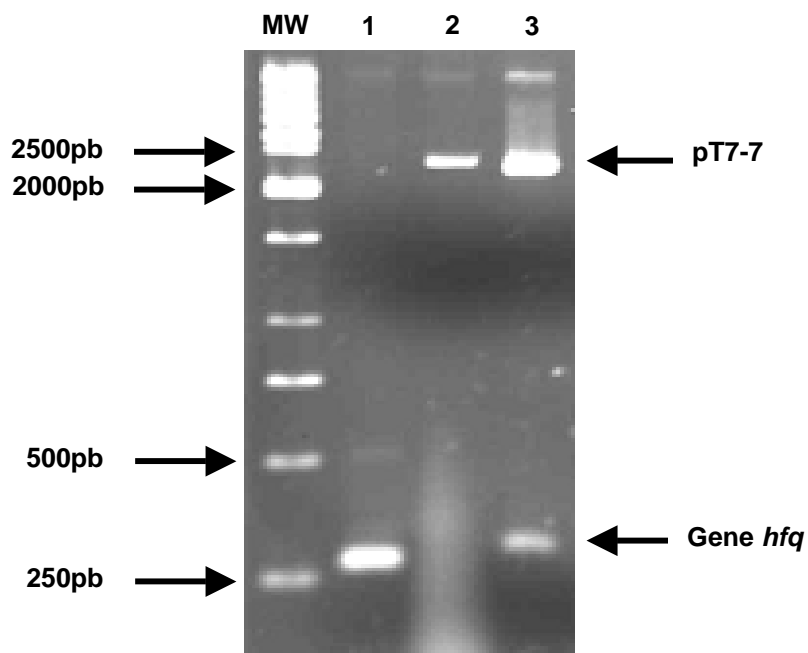
FIGURA 18 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE RESTRIÇÃO DO CLONE pKADO0



Eletroforese em gel de agarose 1,5 %. O clone obtido foi clivado com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III. MW: padrão de massa molecular 1 Kb Ladder. 1: vetor pDK-7. 2: pKADO0.

O vetor pT7-7 foi o primeiro a ser utilizado para a clonagem do gene *hfq* com o objetivo de superexpressão do produto. Este se caracteriza por fornecer resistência ao antibiótico ampicilina, possuir promotor T7, possuir sítio de ligação ao ribossomo próprio e possibilitar a superexpressão da proteína na forma nativa. Os plasmídeos pKADO0 e pT7-7 foram clivados com as enzimas *Nde*I e *Hind*III e o inserto de 250pb contendo o gene *hfq* foi clonado no vetor pT7-7 originando o plasmídeo pKADO1. A eficiência da ligação foi confirmada por restrição do clone com as enzimas *Xba*I e *Hind*III e obtenção de um fragmento de 300pb (figura 19).

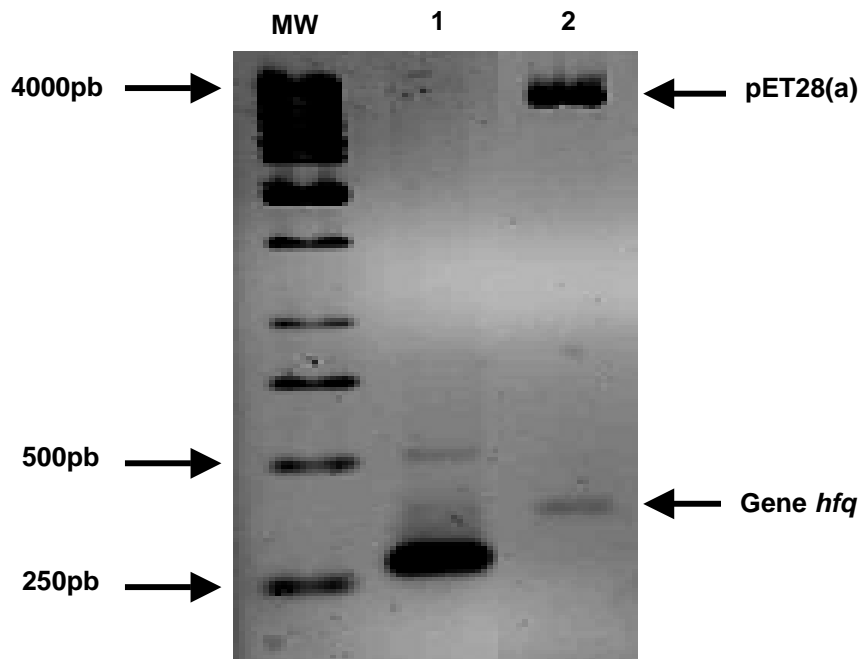
FIGURA 19 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pKADO1



Eletroforese em gel de agarose 1,5 %. O clone obtido foi clivado com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III. MW: padrão de massa molecular 1 Kb Ladder. 1: amplificado do gene *hfq*. 2: vetor pT7-7 clivado com as enzimas *Xba*I e *Hind*III. 3: plasmídeo pKADO1 clivado com as enzimas *Xba*I e *Hind*III.

O último passo de clonagem consistiu na transferência do gene *hfq* do clone pKADO1 para o vetor pET28(a). Este vetor se caracteriza por fornecer resistência ao antibiótico canamicina, possuir promotor T7, possuir sítio de ligação ao ribossomo próprio e possibilitar a superexpressão da proteína fusionada a uma cauda composta de seis resíduos de histidina na região N-terminal. Os plasmídeos pKADO1 e pET28(a) foram clivados com as enzimas *Nde*I e *Hind*III e em seguida o DNA inserto contendo o gene *hfq* foi clonado no vetor pET28(a) originando o plasmídeo pKADO2. O sucesso da ligação foi confirmado por restrição do clone com as enzimas *Xba*I e *Hind*III e obtenção de um fragmento de 300pb (figura 20).

FIGURA 20 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pKADO2

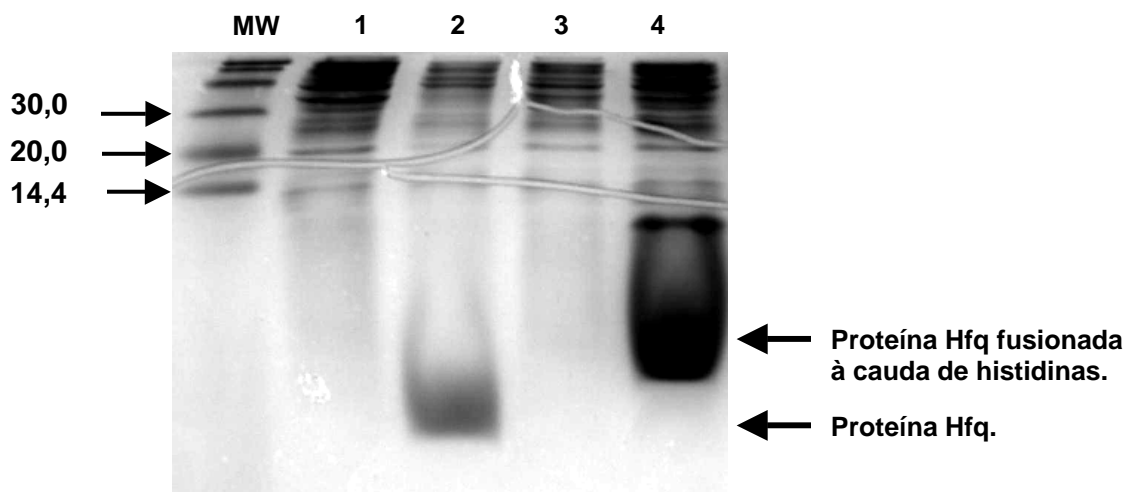


Eletroforese em gel de agarose 1,5 %. O clone obtido foi clivado com as enzima de restrição *Xba*I e *Hind*III. MW: padrão de massa molecular 1 Kb Ladder. 1: DNA amplificado intacto do gene *hfq*. 2: pKADO2.

4.3.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Hfq

Para uma análise inicial de expressão da proteína Hfq, os plasmídeos pKADO1 e pKADO2 foram introduzidos por eletroporação em *E. coli* estirpe BL21 (DE3), células transformantes foram inoculadas em meio LB e induzidas com IPTG (1mmol/L) durante 3 horas (3.7). Os perfis de expressão das frações brutas estão mostrados na figura 21. Nota-se que a superexpressão foi satisfatória e que ambas proteínas migraram da forma esperada.

FIGURA 21 – ELETROFORESE DO EXTRATO BRUTO DA PROTEÍNA Hfq

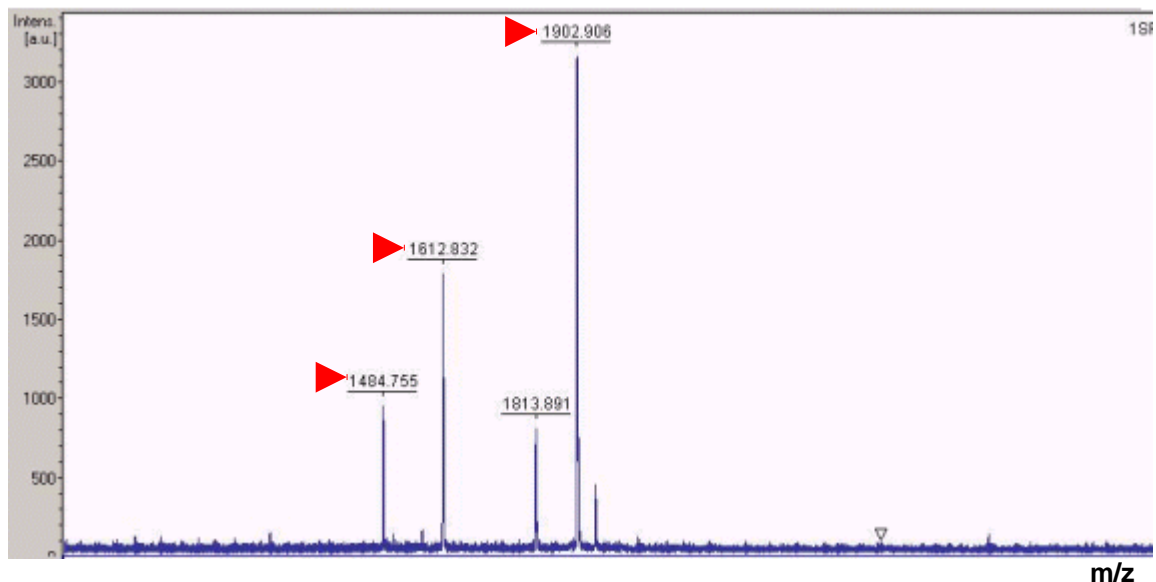


Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) 12 % do extrato bruto da proteína Hfq expressa na forma nativa ou fusionada a uma cauda de histidinas. MW: padrão de massa molecular (kDa). Linhas 1,2,3 e 4: extrato bruto das células de *E. coli* BL21(DE3) contendo: pT7-7 [1], pKADO1 [2], pET28(a) [3] e pKADO2 [4]. O gel foi corado com azul de Coomassie.

As bandas correspondentes às proteínas superexpressas foram retiradas do gel e analisadas por MALDI-TOF/MS conforme descrito no item 3.10.

A banda correspondente à proteína nativa foi identificada como sendo a proteína Hfq de *H. seropedicae* quando as relações m/z obtidas (1484,755; 1612,832; 1813,891 e 1902,906) foram submetidas ao programa Protein Prospector (3.10). O espectro contendo as m/z está ilustrado na figura 22. Das quatro relações m/z , duas (1484,755 e 1612,832) contribuíram para a identificação da proteína. A porcentagem de cobertura dos peptídeos analisados foi de 37 % (figura 23) assumindo-se um desvio de 209 ppm.

FIGURA 22 – ESPECTRO DA RELAÇÃO m/z DA PROTEÍNA Hfq NATIVA.



Os picos representam as massas dos peptídeos originados da digestão da proteína com tripsina. Análise feita pelo MALDI -TOF/MS. Picos cuja informação possibilitou a cobertura da sequência de aminoácidos da proteína identificada estão indicados por setas.

FIGURA 23 – RESULTADO DA SUBMISSÃO DAS RELAÇÕES m/z DA PROTEÍNA Hfq NATIVA

1. 3/5 matches (60%). 8838.2 Da, pI = 6.82. Acc. # 251.0533.p. UNREADABLE. >251.0533.p.

m/z submitted	MH ⁺ matched	Delta ppm	start	end	Peptide Sequence (Click for Fragment Ions)	Modifications
1484.7550	1484.8225	-45.4855	5	17	(K)GQLLQDPFLNALR(K)	
1612.8320	1612.9175	-53.0101	5	18	(K)GQLLQDPFLNALRK(E)	
1902.9060	1903.0078	-53.4798	33	48	(K)LQGHVESFDQYVLLR(N)	

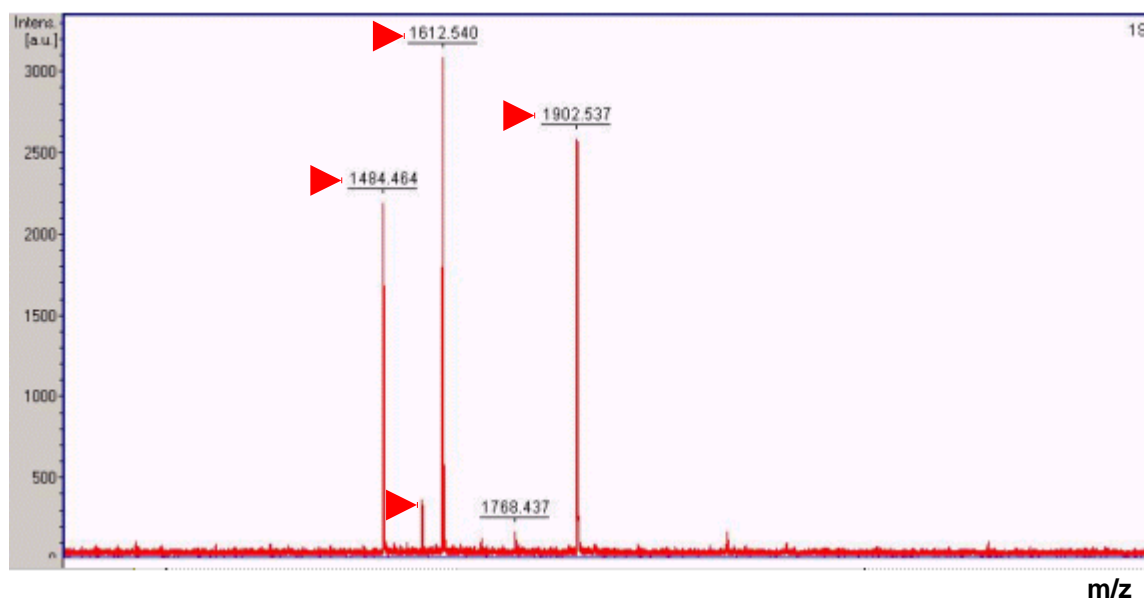
2 unmatched masses: 1813.8910 1941.9820

The matched peptides cover **37%** (30/80 AA's) of the protein.
Coverage Map for This Hit (MS-Digest index #): [24214](#)

Os resultados mostram: o número da ORF do genoma de *H. seropedicae* encontrada, as características teóricas (MW, pI) da proteína anotada, as m/z que coincidiram as razões m/z obtidas com a digestão *in silico* da sequência de aminoácidos da proteína anotada e porcentagem de cobertura.

A banda correspondente à proteína fusionada a cauda de histidinas também foi identificada como sendo a proteína Hfq de *H. seropedicae* quando as relações m/z obtidas (1484,464; 1567,480; 1612,540; 1768,437 e 1902,537) foram submetidas ao programa Protein Prospector (3.10). O espectro contendo as m/z está ilustrado na figura 24. Das cinco relações m/z , quatro (1484,464; 1567,480; 1612,540 e 1902,537) contribuiu para a identificação da proteína. A porcentagem de cobertura dos peptídeos analisados foi de 55 % (figura 25) assumindo-se um desvio de 209 ppm.

FIGURA 24 – ESPECTRO DA RELAÇÃO m/z DA PROTEÍNA Hfq FUSIONADA A CAUDA DE HISTIDINAS



Os picos representam as massas dos peptídeos originados da digestão trípica da proteína. Análise feita pelo MALDI -TOF/MS. Picos cuja informação possibilitou a cobertura da seqüência de aminoácidos da proteína identificada estão indicados por setas.

FIGURA 25 – RESULTADO DA SUBMISSÃO DAS RELAÇÕES *m/z* DA PROTEÍNA Hfq FUSIONADA À CAUDA DE HISTIDINAS

1. 4/5 matches (80%). 8838.2 Da, pI = 6.82. Acc. # 251.0533.p. UNREADABLE. >251.0533.p.

<i>m/z</i> submitted	MH ⁺ matched	Delta ppm	start	end	Peptide Sequence (Click for Fragment Ions)	Modifications
1484.4640	1484.8225	-241.4685	5	17	(K) GQLLQDPFLNALR (K)	
1567.4800	1567.8848	-258.1847	19	32	(K) EHVPVSIYLVNGIK (L)	
1612.5400	1612.9175	-234.0485	5	18	(K) GQLLQDPFLNALRK (E)	
1902.5370	1903.0078	-247.3834	33	48	(K) LQGHVESFDQYVLLR (N)	

1 unmatched mass: 1768.4370

The matched peptides cover 55% (44/80 AA's) of the protein.
Coverage Map for This Hit (MS-Digest index #): [24214](#)

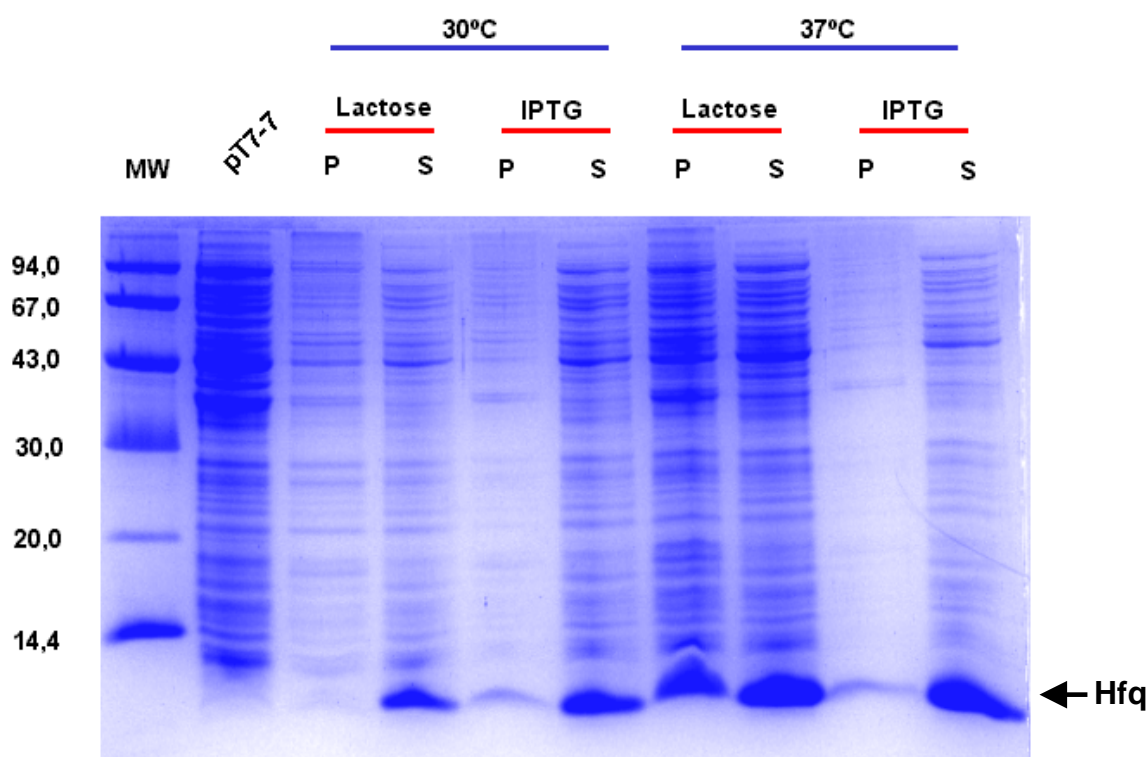
Os resultados mostram: o número da ORF do genoma de *H. seropedicae* encontrada, as características teóricas (MW, pI) da proteína anotada, as *m/z* que coincidiram as razões *m/z* obtidas com a digestão *in silico* da seqüência de aminoácidos da proteína anotada e porcentagem de cobertura.

Uma vez que o material obtido para a análise por MALD-TOF/MS foi extraído de extrato bruto e não de uma amostra contendo proteína purificada, os valores de porcentagens de cobertura para ambas as amostras podem ser considerados baixos. Contudo, eles estão acima dos 20 % normalmente aceitáveis e as razões *m/z* obtidas foram suficientes para obter *match* contra o banco de dados de *H. seropedicae* e confirmar a identidade da proteína Hfq.

Confirmada a identidade da proteína, foram realizados testes de expressão em que se procurou determinar a melhor condição para a obtenção de proteína solúvel e em quantidade suficiente para os ensaios de atividade e de cristalização (figuras 26 e 27). Inicialmente, a expressão foi induzida por IPTG e na temperatura de 37 °C, sendo em seguida analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Nesta condição, a proteína Hfq foi obtida, em sua maior parte, na fração solúvel (figuras 26 e 27 - linhas 8 e 9). Quando estes parâmetros foram modificados (IPTG foi substituído por lactose 0,5 % e a temperatura de indução foi reduzida para 30 °C) percebeu-se que a alteração do agente indutor não provocou aumento da expressão protéica. Os ensaios de

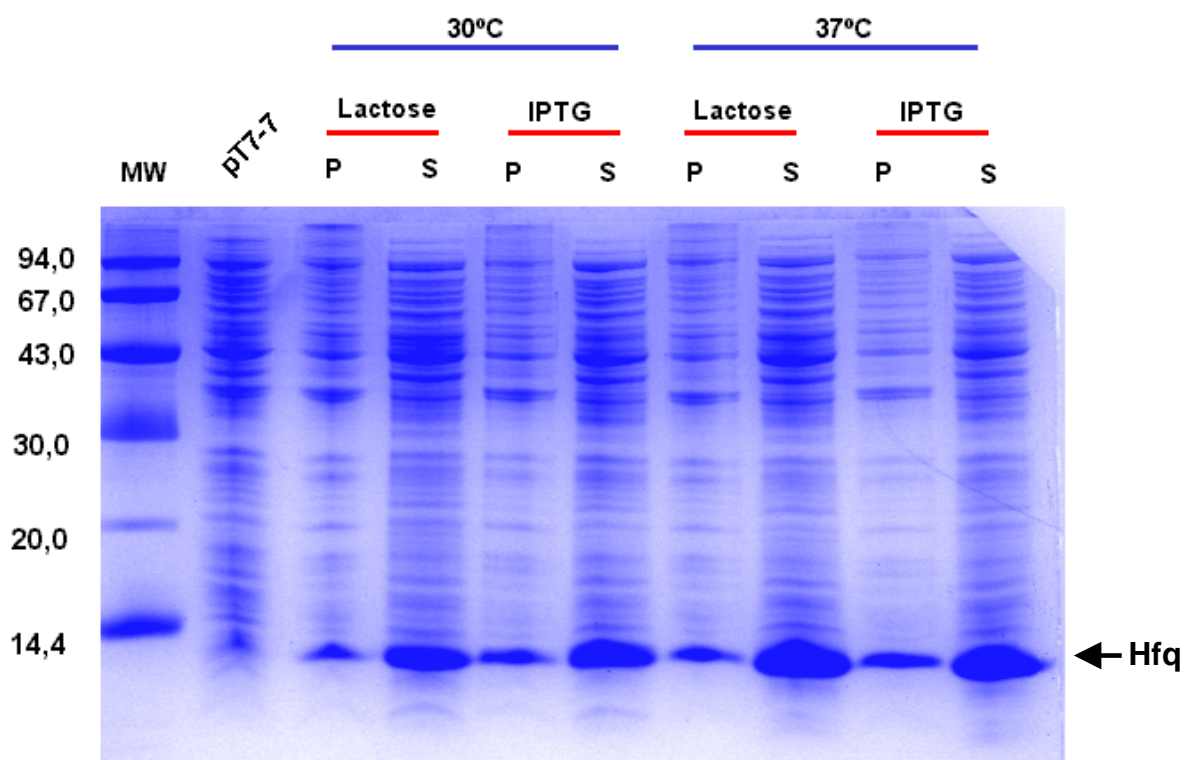
expressão foram realizados tanto com a proteína nativa quanto com a fusionada (3.7) e os resultados estão mostrados nas figuras 26 e 27. Conclui-se que a melhor temperatura de indução foi 37 °C e nesta temperatura os dois tipos de indutor aparentemente resultaram em um mesmo rendimento, quando se leva em consideração a quantidade de proteína expressa na fração solúvel.

FIGURA 26 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO TESTE DE EXPRESSÃO COM A PROTEÍNA Hfq NATIVA



Eletroforese em Gel de Poliacrilamida/Tricina 12 % do Teste de Expressão com a Proteína Hfq Nativa. As linhas não possuem a mesma quantidade de proteína. MW: padrão de massa molecular (kDa). linha 1: extrato bruto (pT7-7). linhas 3-10: amostras (pKADO1). linhas 3-6: indução a 30 °C. linhas 7-10: indução a 37 °C. P: fração de proteínas insolúveis após sonicação. S: fração de proteínas solúveis após sonicação. Lactose: indução com 0,5% de lactose. IPTG: indução com 1mmol/L de IPTG. As proteínas foram coradas com azul de Coomassie.

FIGURA 27 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO TESTE DE EXPRESSÃO COM A PROTEÍNA Hfq FUSIONADA A CAUDA DE HISTIDINAS



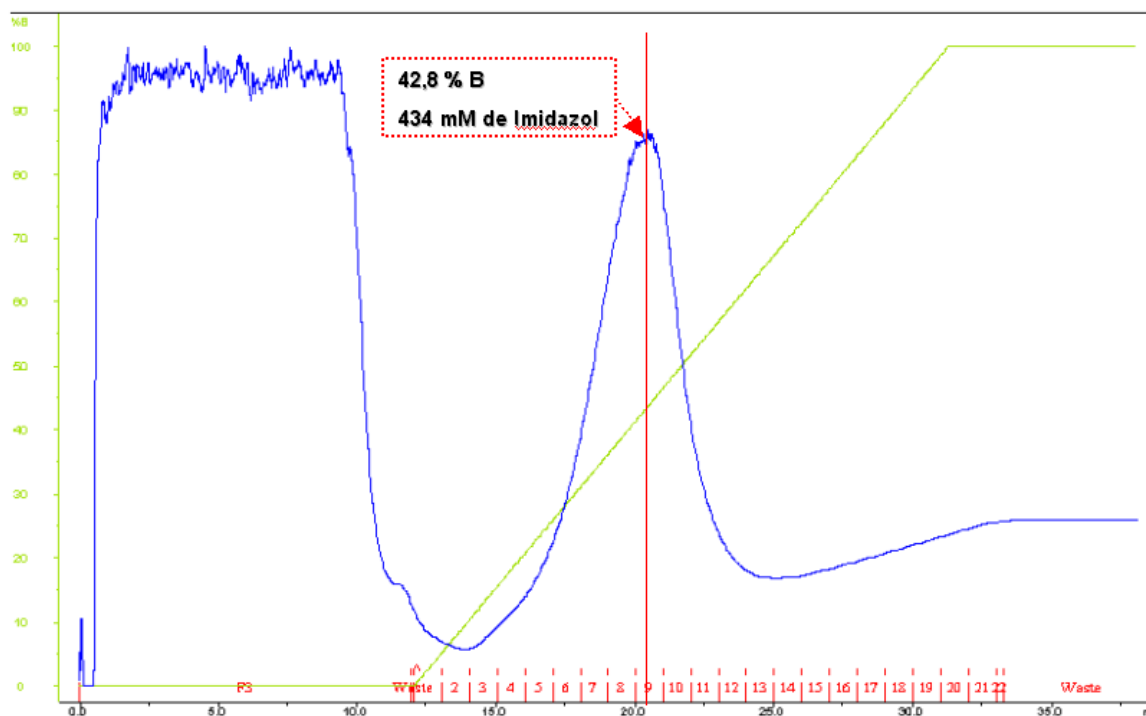
Eletroforese em Gel de Poliacrilamida/Tricina 12 % do Teste de Expressão com a Proteína Hfq Nativa. As linhas não possuem a mesma quantidade de proteína. MW: padrão de massa molecular (kDa). linha 1: extrato bruto (pT7-7). linhas 3-10: amostras (pKADO1). linhas 3-6: indução a 30 °C. linhas 7-10: indução a 37 °C. P: fração de proteínas insolúveis após sonicação. S: fração de proteínas solúveis após sonicação. Lactose: indução com 0,5% de lactose. IPTG: indução com 1mmol/L de IPTG. As proteínas foram coradas com azul de Coomassie

4.3.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA FUSIONADA A CAUDA DE HISTIDINAS

A proteína Hfq fusionada a uma cauda de histidinas foi purificada a um grau de pureza de aproximadamente 90 % utilizando uma coluna Hi-trap chelating carregada com níquel (3.11.2.1). Antes de aplicar a fração solúvel na coluna, esta foi aquecida a 80 °C por 15 minutos. Este aquecimento já possibilitou a eliminação de várias proteínas contaminantes que ficaram na fração insolúvel (figura 29A - linhas 4 e 5). Após a purificação, as amostras compreendidas no pico cromatográfico observado no cromatograma da figura 28 foram analisadas por gel de poliacrilamida/tricina (figura 29). A proteína Hfq fusionada a cauda de histidinas foi eluída com 434 mmol/L de imidazol.

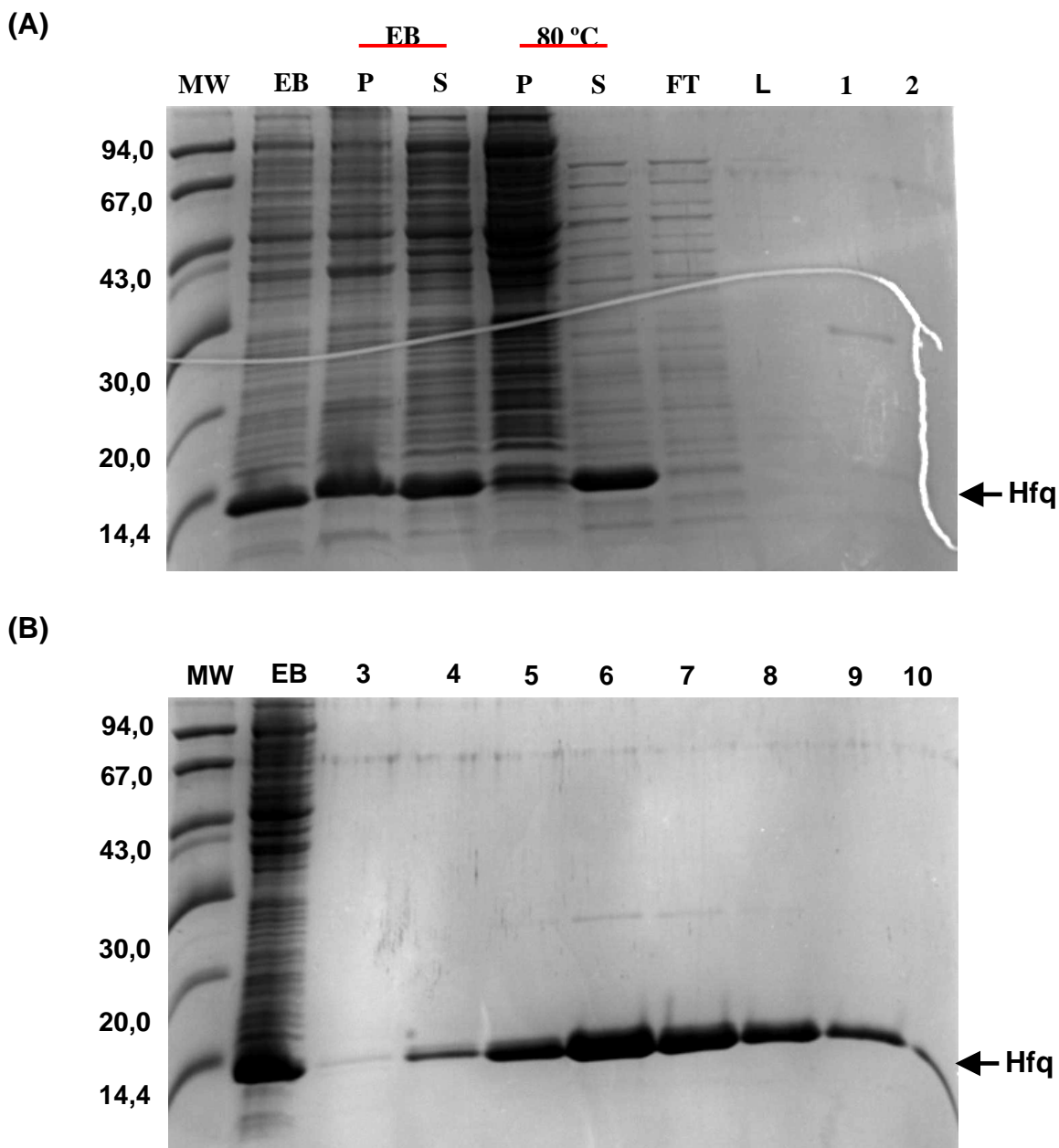
Após a análise do gel (figura 29A), as amostras de 4 a 9 foram reunidas, resultando em um volume final de aproximadamente 9 mL. Este volume foi dividido em duas amostras de 4,5 mL. Uma fração foi dialisada a 4 °C por 12 horas em tampão A (200 mmol/L de NaCl; 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0 e 50 % de glicerol) para ser estocada e utilizada para a análise funcional. Após a diálise a concentração protéica da amostra foi estimada pelo método de Bradford (item 3.13), resultando em 4,9 mg/mL de proteína com 90,0 % de pureza.

FIGURA 28 – PERFIL DE ELUIÇÃO REFERENTE À PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq FUSIONADA A CAUDA DE HISTIDINAS



A purificação foi realizada utilizando uma coluna Hi-trap chelating (1 mL). A solução de proteínas foi injetada, num fluxo de 1 mL/min. Após injeção a coluna foi lavada com 10 CV de tampão (300 mmol/L de NaCl; 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8.0; 10 mmol/L de imidazol). A proteína Hfq foi eluída utilizando um gradiente contínuo de 10 a 1000 mmol/L de imidazol equivalente a 20 VC. As amostras foram coletadas em alíquotas de 1mL. No eixo y, porcentagem de tampão B (300 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. *Waste*: frações descartadas. A concentração de imidazol onde a proteína Hfq foi eluída está destacada no quadrado vermelho.

FIGURA 29 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE AMOSTRAS DA PROTEÍNA Hfq FUSIONADA A CAUDA DE HISTIDINAS



Eletroforese em Gel de Poliacrilamida/Tricina 12%. MW: padrão de massa molecular (kDa). EB: extrato bruto de células induzidas e preparadas conforme item 13.11.2.1. P: fração de proteínas insolúveis do extrato bruto (EB) ou após aquecimento a 80 °C. S: fração de proteínas solúveis do extrato bruto (EB) ou após aquecimento a 80 °C. FT: fração de proteínas não adsorvidas na coluna Hi-trap Chelating Ni⁺². L: fração de proteínas eluídas com a lavagem da coluna após injeção da amostra. 1-10: frações eluídas com o gradiente de imidazol. A seta indica a proteína Hfq fusionada a cauda de histidinas. As proteínas foram coradas com azul de Coomassie.

4.3.4 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq NATIVA

4.3.4.1 PURIFICAÇÃO POR INTERAÇÃO HIDROFÓBICA E TROCA IÔNICA

Para os ensaios de cristalização e atividade *in vitro* foi necessário obter a proteína Hfq com alta pureza e concentração, uma vez que estes experimentos são sensíveis à presença de contaminantes. As etapas cromatográficas foram selecionadas com base em relatos de VASSILIEVA *et al.* (2002) e NIKULIN *et al.* (2005) que descreveram a utilização das resinas DEAE-Sepharose (troca iônica) e Butil-Sepharose (interação hidrofóbica) na purificação da proteína Hfq nativa. Esta informação levou à verificação do índice teórico de hidropaticidade da proteína Hfq de *H. seropedicae* que revelou um valor numérico alto, o que indica uma grande hidrofobicidade da proteína (4.2) justificando o uso desta resina. Desta forma a coluna Butil-Sepharose foi utilizada para a purificação da proteína Hfq de *H. seropedicae*. A matriz desta coluna é composta da cadeia lateral (-O-CH₂-CH(OH)-CH₂-O-(CH₂)₃-CH₃).

A primeira etapa para a purificação da proteína Hfq nativa também foi o aquecimento da fração solúvel a 80°C por 15 minutos (item 3.11). Em seguida, foi adicionado a fração solúvel, após centrifugação, (NH₄)₂SO₄ na forma de sal até uma concentração final de 1,7mol/L. Este aumento na força iônica da solução favorece as interações hidrofóbicas entre a proteína e a resina. A solução protéica foi eluída em um duplo gradiente contínuo decrescente de NaCl (1,0 - 0,1mol/L) e de (NH₄)₂SO₄ (1,5 - 0mol/L). A proteína foi eluída com aproximadamente 290mmol/L de NaCl e 435mmol/L de (NH₄)₂SO₄. Após a purificação as amostras que compreendiam o pico cromatográfico observado no cromatograma (figura 30) foram analisadas por gel de poli(acrilamida)/tricina (figura 31).

As frações com menos impurezas (figura 31 – linhas 5 a 9) foram reunidas e dialisadas por 12 horas a temperatura ambiente.

A concentração da proteína e a sua pureza foram analisadas após a diálise e revelaram um aumento expressivo de 78 % na pureza. Este passo cromatográfico possibilitou também a concentração da proteína Hfq (tabela 5).

Em seguida, a solução protéica foi injetada na coluna DEAE-Sepharose como descrito no item 3.11.1.3. A proteína não adsorveu na coluna e foi eluída e coletada em 6 frações com volumes de 10 e 20 mL (figura 32 – linhas 2 a 7) antes do gradiente crescente de NaCl (0,1 a 1,0 mol/L) (figura 32).

As frações com maior grau de pureza e mais concentradas, amostras 4 a 6 da figura 33, foram reunidas e concentradas por ultrafiltração a uma concentração final de 1,2mg/mL para ensaios de atividade e 13mg/mL para experimentos de cristalografia.

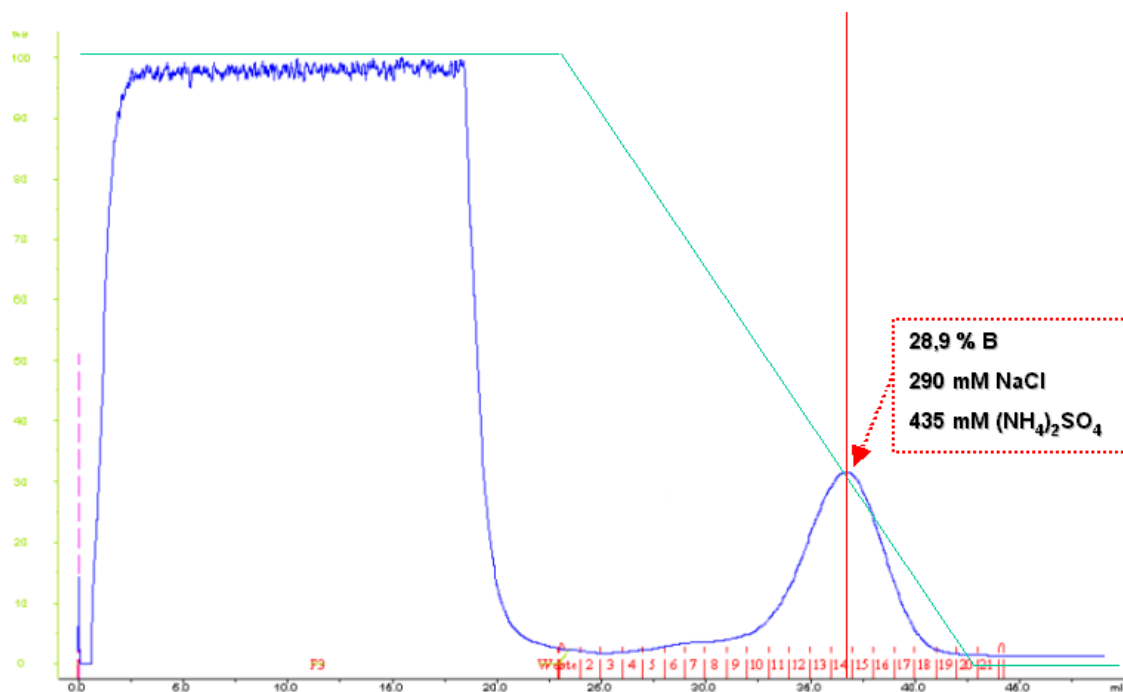
TABELA 5 – PASSOS DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq NATIVA

Fração	Proteína Total (mg)	Pureza (%)	Rendimento (%)
Massa Úmida	3630	-----	-----
Fração Solúvel	52,5	-----	100
Tratamento a 80°C	44,5	21	84,7
Butil-Sepharose	10	78	19
DEAE-Sepharose	8,8	99	16,8

Passos de purificação da proteína Hfq nativa. A pureza foi determinada por análise densitométrica de gel Poliacrilamida/Tricina.

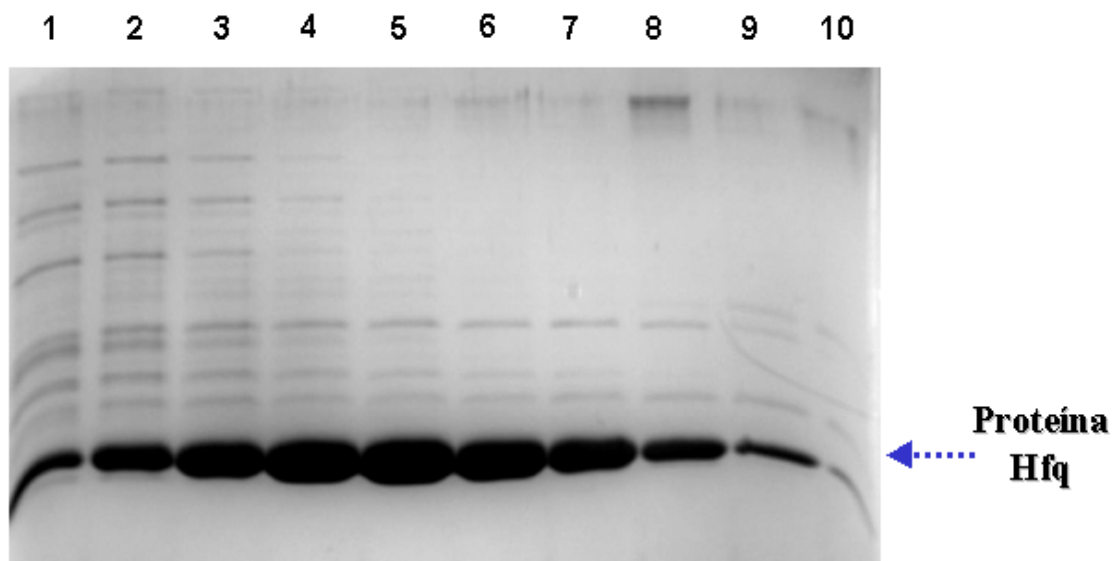
A pureza final alcançada foi de 99% como pode ser observado na figura 34. A proteína Hfq nativa foi obtida com pureza e concentração adequadas para a realização dos experimentos de atividade assim como para a cristalização.

FIGURA 30 – PERFIL DE ELUIÇÃO DA PURIFICAÇÃO EM BUTIL-SEPHAROSE



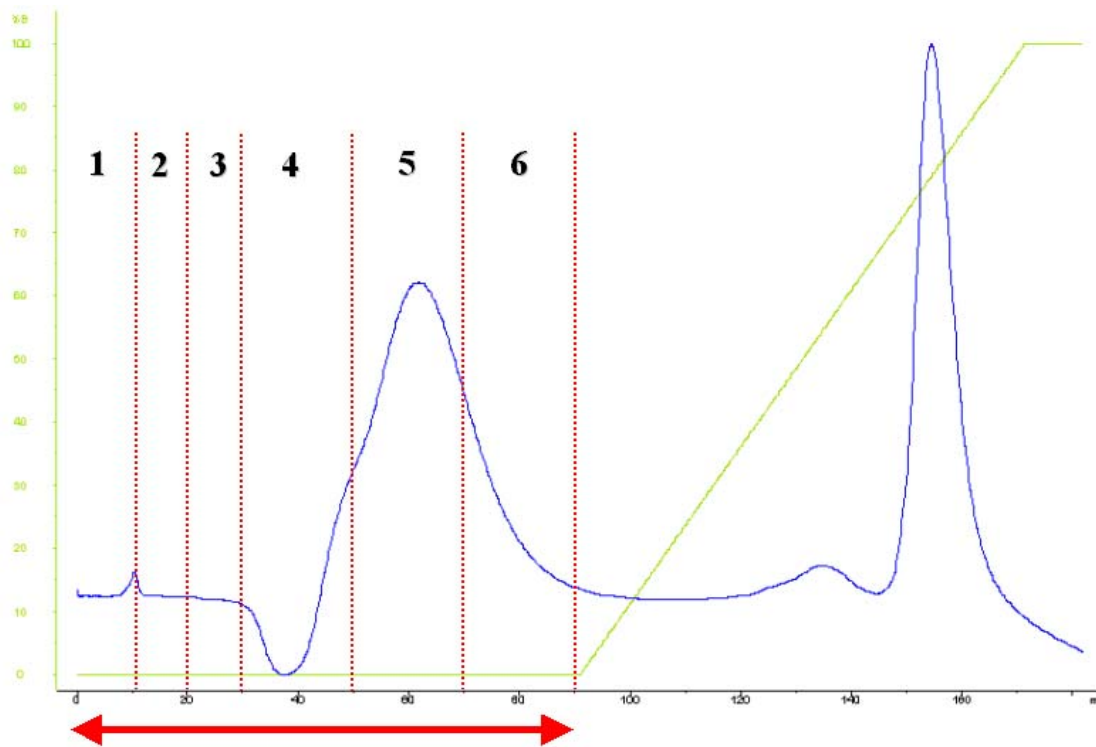
Cromatograma mostrando o perfil de eluição da proteína Hfq nativa. Toda a cromatografia foi realizada utilizando um fluxo de 1 mL/min. Após a injeção da amostra, a coluna foi lavada com 20 VC de solução contendo 1 mol/L de NaCl; 1,5 mol/L de sulfato de amônio e 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0. As amostras foram coletadas em alíquotas de 1mL. No eixo y, porcentagem de tampão B (1000 mmol/L de NaCl; 1,5 mol/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0). No eixo x, volume de eluição em mL. Em azul, leitura da absorção a 280 nm. Em verde, gradiente decrescente de NaCl (1,0 - 0,1 mol/L) e de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. (1,5 – 0 mol/L). As delimitações em vermelho indicam as amostras coletadas. *Waste*: frações descartadas. A concentração de NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, onde a proteína Hfq foi eluída está destacada no quadrado vermelho.

FIGURA 31 – ELETROFORESE DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq NATIVA



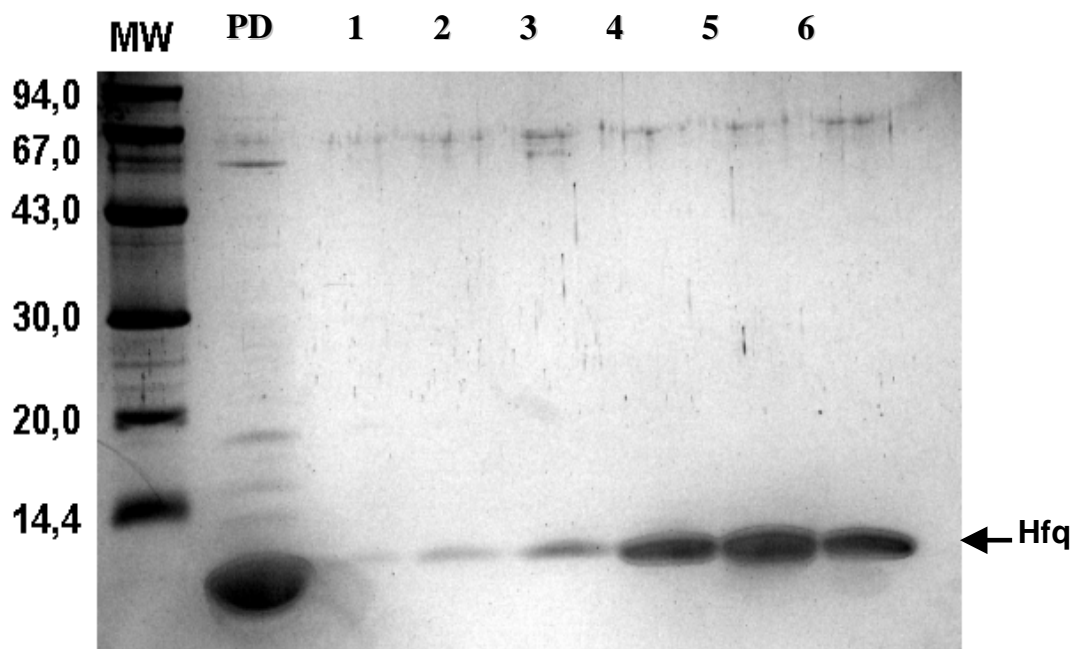
Eletroforese em Gel de Poliacrilamida/Tricina 12%. As linhas de 1 a 10 indicam as frações protéicas correspondentes às amostras de 10 a 19 indicadas no pico cromatográfico da figura acima. A seta azul indica a posição da proteína Hfq. As proteínas foram coradas com azul de Coomassie.

FIGURA 32 – CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO EM DEAE-SEPHAROSE



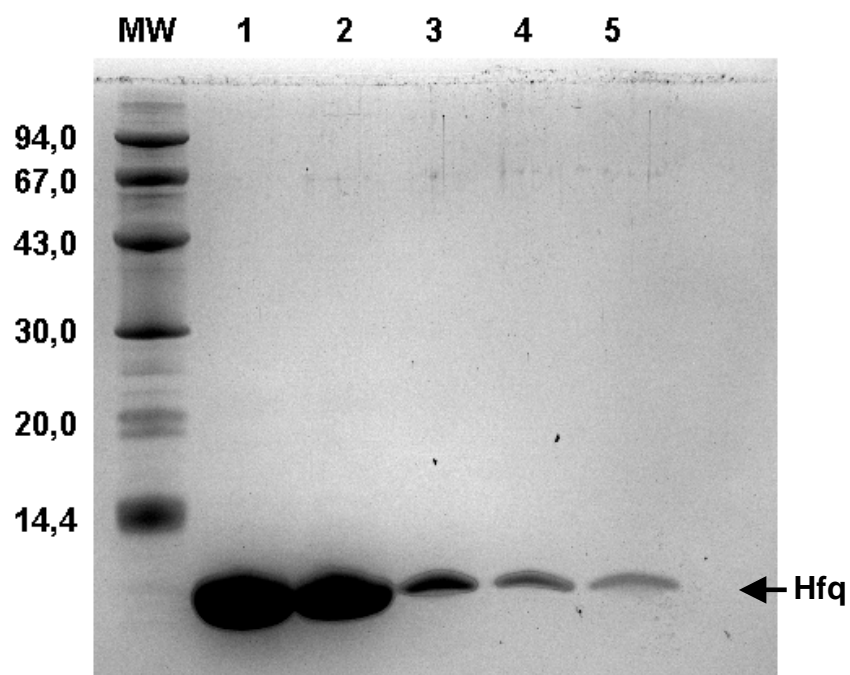
Cromatograma mostrando o perfil de eluição da proteína Hfq nativa na coluna DEAE-Sepharose. A cromatografia foi realizada utilizando um fluxo de 3 mL/min. As amostras foram coletadas em 3 volumes de 10mL e 3 volumes de 20 mL, e estão representadas pelos números de 1 a 6 no cromatograma. Em azul, leitura da absorção a 280nm. Em verde, gradiente crescente de NaCl (0,1 - 1,0mol/L). A seta em vermelho indica a região do cromatograma referente às frações coletadas.

FIGURA 33 – ELETROFORESE DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq NATIVA



Eletroforese em Gel de Poliacrilamida/Tricina 12%. MW: padrão de massa molecular (kDa). PD: Solução de proteínas após diálise. 1 a 3: frações de 10mL eluídas antes do gradiente de NaCl (0,1 - 1,0mol/L). 4 a 6: frações de 20mL eluídas antes do gradiente de NaCl (0,1 - 1,0mol/L). A seta indica a proteína Hfq. As proteínas foram coradas com azul de Coomassie.

FIGURA 34 - ELETROFORESE DA PROTEÍNA Hfq NATIVA APÓS CONCENTRAÇÃO



Eletroforese em Gel de Poliacrilamida/Tricina 12%. MW: padrão de massa molecular (kDa). 1: 13 μ g de proteína aplicada. 2: 6,5 μ g de proteína aplicado. 3: 0,6 μ g de proteína aplicado. 4: 0,3 μ g de proteína aplicado. 5: 0,1 μ g de proteína aplicado. A seta indica a proteína Hfq. As proteínas foram coradas com azul de Coomassie.

4.3.5 ATIVIDADE DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq A PEQUENOS RNAs

Para se investigar se a proteína Hfq de *H. seropedicae*, assim como a de *E. coli*, possui a atividade de ligação a pequenos RNAs, foram selecionados para o ensaio de ligação o sRNA DsrA e o mRNA RpoS de *E. coli* cujo mecanismo de ligação a Hfq foi amplamente estudado (LEASE & WOODSON, 2004; MIKULECKY *et al.*, 2004).

Os RNAs curtos foram sintetizados *in vitro* (3.15) a partir dos plasmídeos pT7G₂A₂DsrA ou pUC-T7RpoS2 linearizados (3.15) e a integridade do produto de transcrição foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 2% (figura 35). Observou-se que o produto de transcrição referente ao sRNA DsrA apresentou duas bandas (88 e ~160 bases) enquanto que o produto de transcrição do mRNA RpoS que apresentou uma única banda com 140 bases. Este fato pode estar relacionado à presença de MgCl₂ que pode provocar a dimerização do DsrA (176pb-dímero) (LEASE & WOODSON, 2004), à conformação secundária do sRNA ou ainda estar relacionado à presença de plasmídeo não digerido completamente. Esta última hipótese é a menos provável, pois o plasmídeo geraria um RNA com no mínimo 350 bases e uma banda com este tamanho não foi observada no gel. Foi observado uma banda de 88 bases equivalente a uma molécula de DsrA e uma banda com mais de 140 bases.

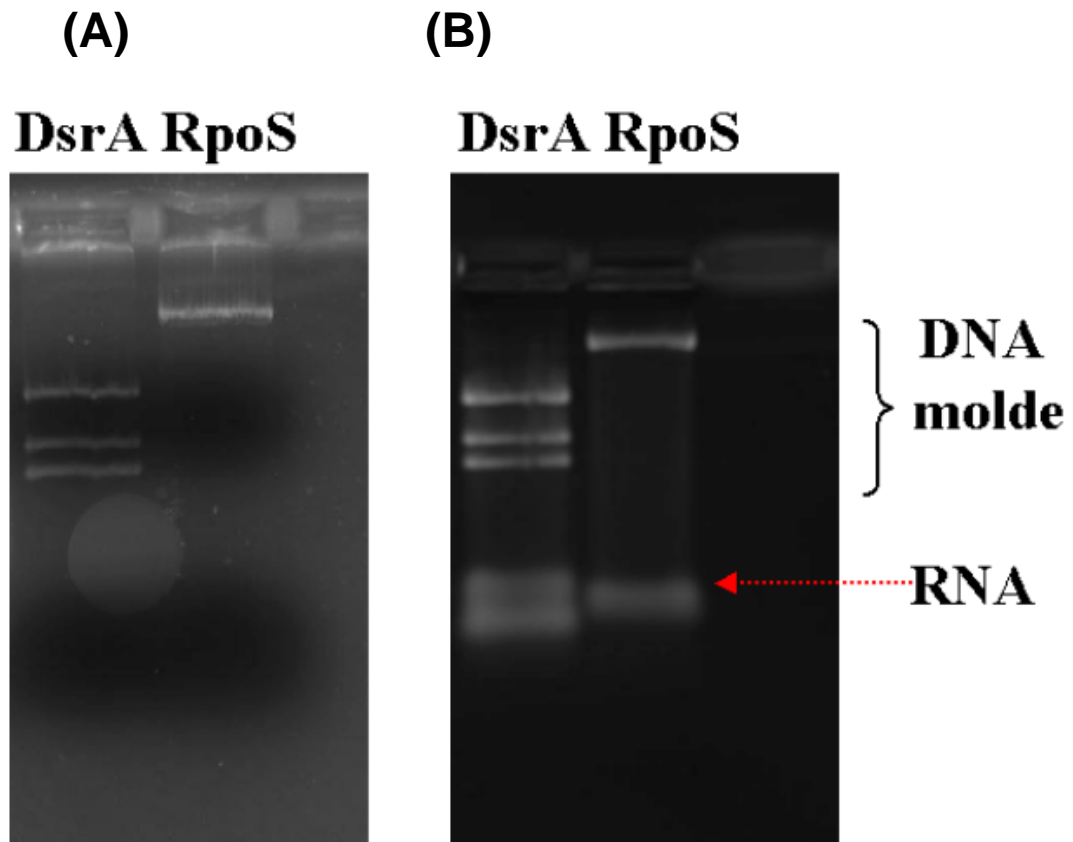
Somente o sRNA DsrA foi utilizado para os ensaios de ligação, uma vez que este foi obtido em maior rendimento: 23 µg/mL para DsrA e 14 µg/mL para RpoS. A presença de duas bandas referentes ao RNA transcrito, assim como a presença do DNA molde, não atrapalhou a análise e interpretação da interação proteína-RNA.

O resultado do ensaio de capacidade de ligação da proteína Hfq ao DsrA está mostrado na figura 36. O comportamento de ligação da proteína Hfq nativa é similar ao reportado por Lease e Woodson (2004) para *E. coli*. Para este organismo foi descrita uma estequiometria de hexâmero ligado a DsrA de 2:1. Na figura 36, nota-se dois padrões de atraso de banda sendo que o segundo inicia-se com 0,5 µM de Hfq. Este resultado sugere também uma estequiometria de 2:1 para a proteína Hfq de *H. seropedicae*.

A diferença de afinidade entre a proteína Hfq nativa e fusionada a cauda de histidinas é claramente visível. Tomando-se o valor 0,2 μM de proteína como ponto de comparação, pode-se inferir que a proteína na sua forma nativa possui maior afinidade pelo RNA em estudo uma vez que nesta concentração a mesma já provocou retardo de migração da banda. Entretanto, no ensaio com a proteína fusionada a cauda de histidinas, na concentração de 0,2 μM não se observou retardo de migração.

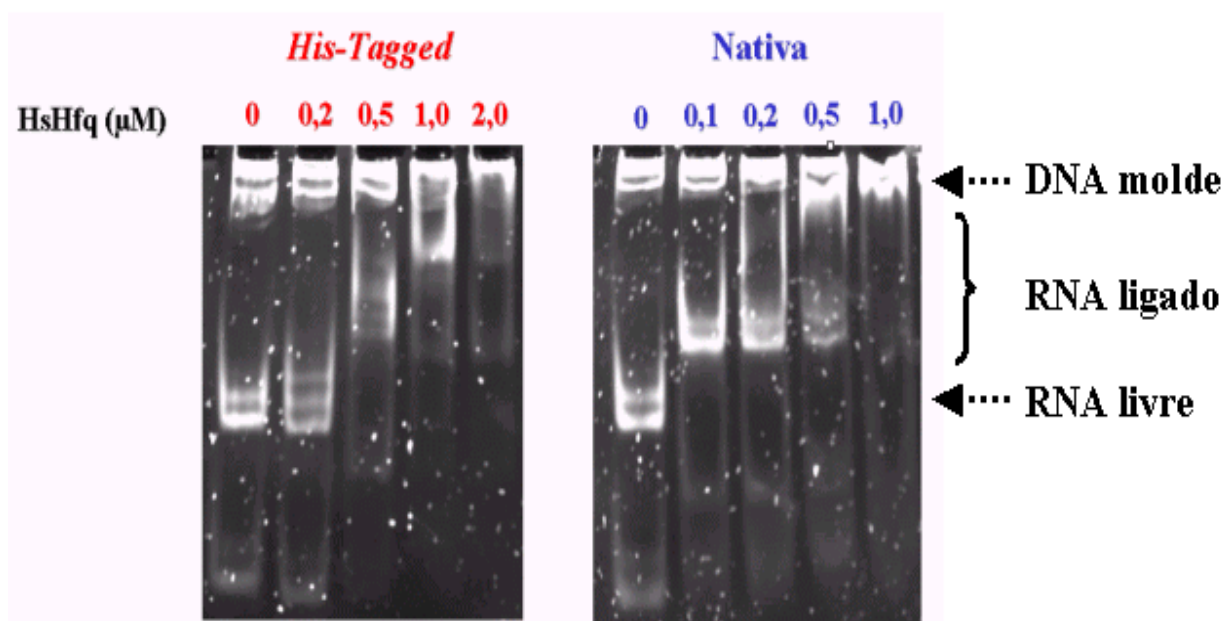
Analisando a estrutura da proteína Hfq de *E. coli* é possível notar que os aminoácidos da região N-terminal encontram-se na porção superior da proteína e próximos ao poro (figura 37). Desta forma a menor afinidade apresentada pela proteína Hfq-his tag de *H. seropedicae* poderia estar relacionada à presença da cauda de histidinas na região N-terminal da proteína, o que poderia dificultar o acesso do RNA a região central (poro).

FIGURA 35 – TRANSCRIÇÃO *IN VITRO* DO sRNA DsrA E DO mRNA RpoS PELO MÉTODO *RUN-OFF*



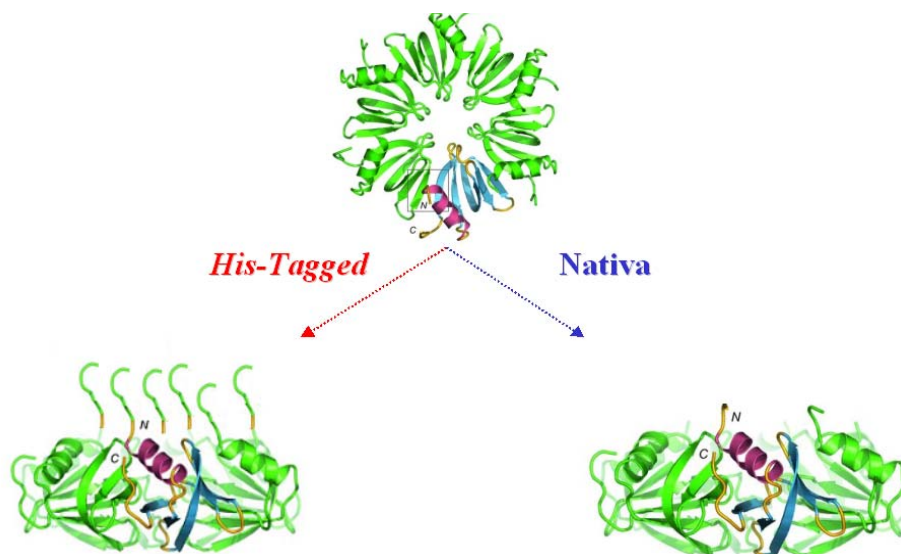
Eletoforese em gel de agarose 2,0% em tampão TBE (1X). A: gel de referência com os DNAs moldes linearizados com a enzima *EcoRI*. B: gel com os produtos de transcrição: DsrA e RpoS indicados por seta.

FIGURA 36 – ENSAIO DE RETARDAMENTO DE BANDA PELA INTERAÇÃO Hfq-DSRA (sRNA)



Eletroforese em gel de acrilamida 6,0% em tampão TBE (0,5X) corados com CYBR *Gold* (Invitrogen). A figura a esquerda mostra o experimento de retardamento de banda realizado com a proteína Hfq fusionada a cauda de histidinas enquanto que a figura a direita apresenta o resultado obtido com a proteína nativa. Foram utilizados 50nmol/L do sRNA DsrA para cada reação. As concentrações em termos de μM de hexâmero de proteína utilizadas estão indicadas na parte superior de cada figura.

FIGURA 37 – MODELO DA INTERFERÊNCIA ESTRUTURAL CAUSADA PELA PRESENÇA DA CAUDA DE HISTIDINAS



O modelo acima mostra a possível posição das caudas de histidinas na proteína Hfq de *H. seropedicae*. A estrutura da proteína Hfq de *E. coli* (SAUTER *et al.*, 2003) foi utilizada para a construção deste modelo. À esquerda encontra-se a proteína Hfq (visão lateral). Na parte superior da mesma figura está representada a cauda de histidinas. À direita, visão lateral da proteína Hfq nativa.

A análise dos géis da figura 36 permitiu observar, além da capacidade de ligação a RNA, uma discreta ligação da proteína Hfq ao DNA molde (figura 37). Esta associação não específica foi observada também por Azam e Ishihama (1999). Estes autores relataram a presença da proteína Hfq de *E. coli* associada a DNA plasmidial além de realizarem ensaios de retardo de banda devido a ligação de Hfq a dois tipos de DNA diferentes (DNA de fago λ e plasmídeo pCM959).

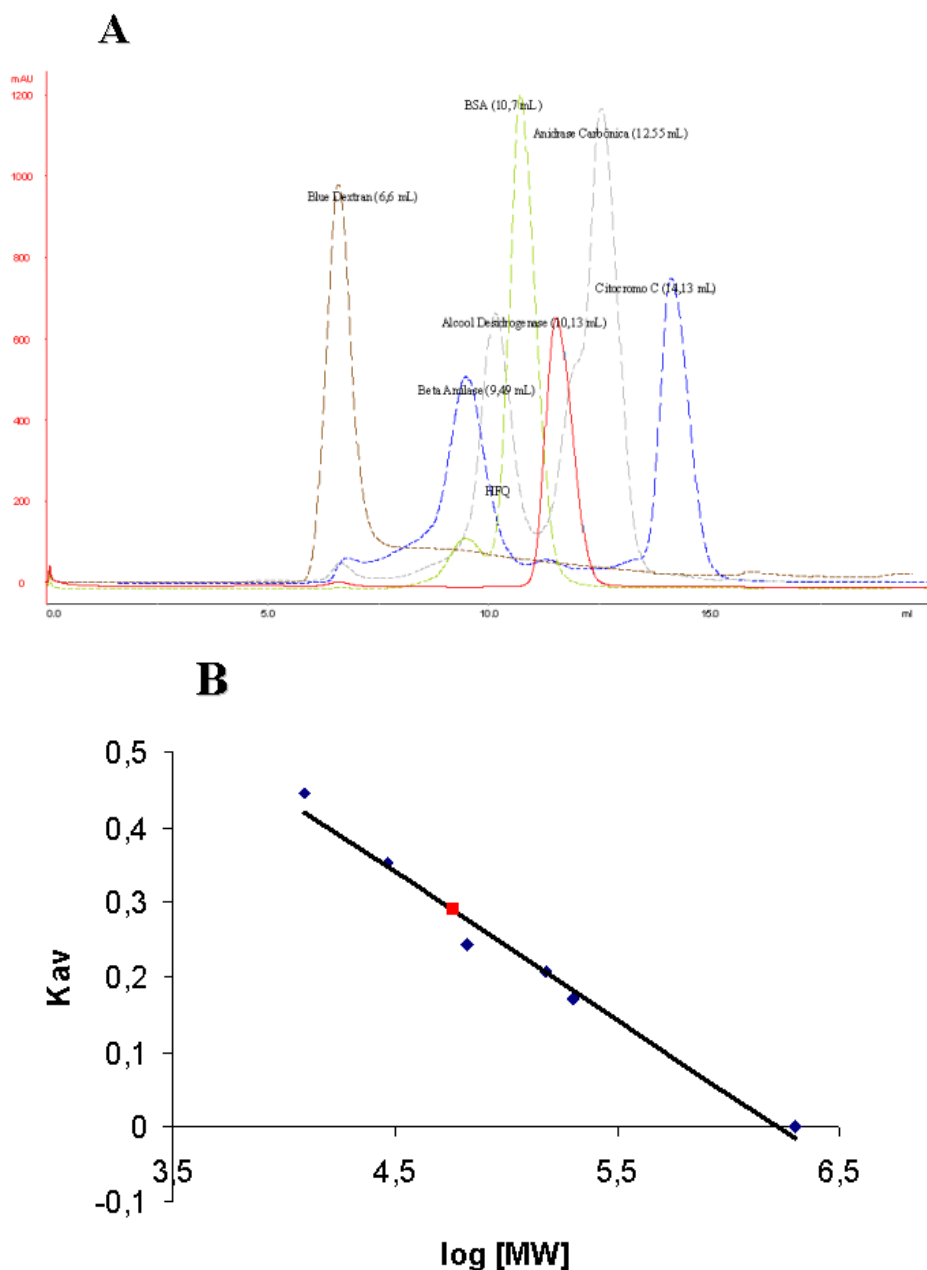
O ensaio de retardo de banda permitiu confirmar a atividade *in vitro* de ligação da proteína Hfq de *H. seropedicae* ao sRNA DsrA de *E. coli*. Foi também observado que a adição de aminoácidos na região N-terminal aparentemente dificultaria o acesso do sRNA ao poro do hexâmero.

4.4 DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE OLIGOMERIZAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq

Proteínas pertencentes à família *LSm* caracterizam-se por ter o formato de um *doughnut*. Em eucariotos, estas macromoléculas são heteroheptaméricas enquanto que em procariotos a maioria é homohexamérica (WILUSZ & WILUSZ, 2005). Uma das exceções é o microrganismo *Methanobacterium thermoautotrophicum* que possui uma proteína Hfq homoheptamérica cuja estrutura foi recentemente depositada no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*). No caso de *H. seropedicae*, o estado de oligomerização da proteína Hfq foi determinado por gel filtração e espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Na cromatografia de gel-filtração, foi possível observar a eluição de uma população homogênea de proteínas (figura 38A). A massa molecular da proteína Hfq foi calculada (3.18.1). Com base nos dados de eluição dos padrões, foram realizadas a regressão linear e a determinação da equação de reta ($K_{av} = - 0,1979 \times \log [MW] + 1,2313$) (figura 38B). A proteína Hfq foi eluída em um volume de 11,58mL e um K_{av} de 0,29. Através da equação indicada acima foi possível determinar uma massa de 54 kDa para a macromolécula. Calculando a razão entre massa molecular do oligômero e massa molecular teórica do monômero foi possível concluir que a macromolécula é formada por cerca de 6 monômeros, ou seja, a organização é homohexamérica.

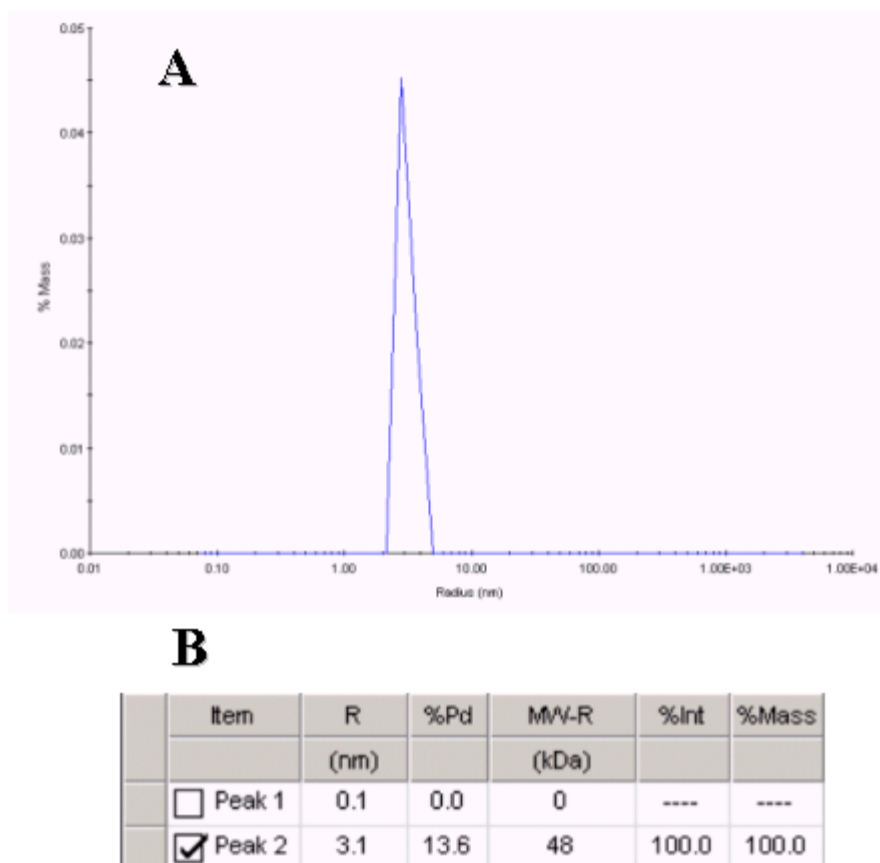
FIGURA 38 – DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DE Hfq POR CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO



(A) Cromatograma por gel filtração em coluna Superose 12 HR 10/30 referente a eluição da proteína Hfq (linha vermelha) e das proteínas padrão (linhas tracejadas). Na ordenada, absorvância a 280nm. Na abscissa, volume de eluição em mL. Acima de cada pico está indicado o nome da proteína padrão assim como o seu volume de eluição. (B) Curva padrão K_{av} por $\log [MW]$ mostrando a relação linear entre o \log da massa molecular e a constante de partição das proteínas padrão. O ponto vermelho indica o K_{av} e o $\log [MW]$ referente a proteína Hfq.

Com o experimento de DLS não foi possível chegar a um valor tão exato quanto na cromatografia de gel filtração, contudo os resultados foram compatíveis para uma macromolécula homohexamérica. Como pode ser observada na figura 39A, a amostra apresentou-se monodispersa, ou seja, não foi evidenciado o aparecimento de estruturas intermediárias como dí, tri, tetra ou pentâmeros, assim como agregados protéicos.

FIGURA 39 – ENSAIO DE DLS DA PROTEÍNA Hfq



O ensaio de DLS foi realizado conforme o item 3.18.2.(A) Monodispersividade da amostra protéica em função do raio hidrodinâmico. (B) O resultado final do experimento de DLS. *Peak 2* : dados referentes a proteína Hfq. R: raio hidrodinâmico, %Pd: polidispersividade, MW-R: massa molecular relativa, %Int: porcentagem da intensidade, %Mass: porcentagem da massa.

Esta população monodispersa possui um raio hidrodinâmico médio de 3,1nm que equivale a uma macromolécula de 48kDa (figura 39-b). Calculando a razão entre massa molecular determinada por DLS e a massa molecular teórica do monômero foi possível chegar a uma relação de 5,4 monômeros por macromolécula.

Os resultados destes dois experimentos permitem inferir que a proteína Hfq de *H. seropedicae* realmente é um homohexâmero.

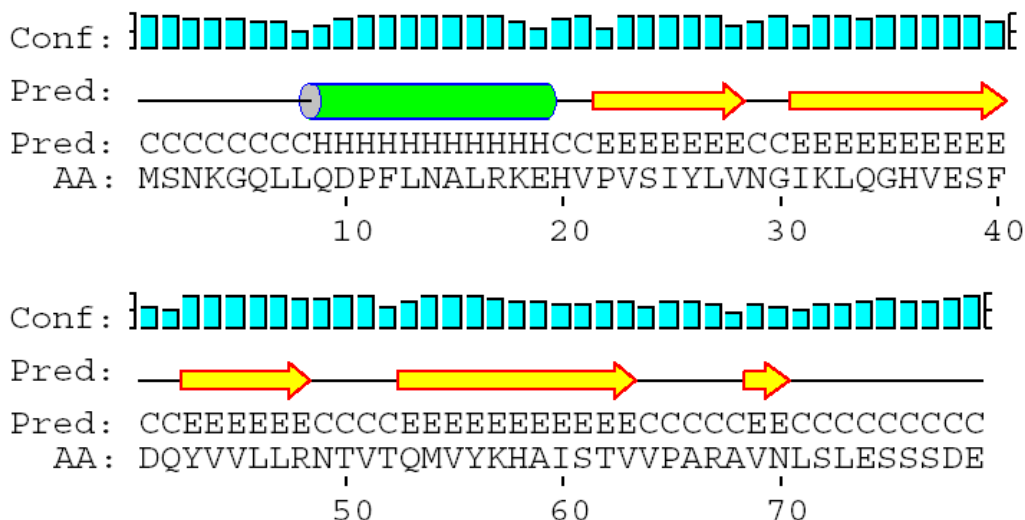
4.5 ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA Hfq

A estrutura secundária da proteína Hfq foi investigada usando o método de dicroísmo circular (3.17.2) assim como por estudos de predição de estrutura através do programa de bioinformática PSIPRED.

A figura 40 mostra a predição que se baseia no alinhamento estrutural entre a seqüência de aminoácidos da proteína Hfq com a seqüência de aminoácidos de proteínas cuja estrutura foi determinada experimentalmente. O resultado da predição foi uma proteína com 5 fitas β e 1 α -hélice N-terminal.

No espectro de dicroísmo circular (CD) a 15 °C aparece claramente uma banda negativa em 216 nm que é característica da presença, em maior porcentagem, de fitas β (figura 41). Os dados referentes a este espectro foram submetidos ao programa DICROPROT (Delèage & Geourjon, 1993) para a determinação das proporções de cada estrutura secundária obtida a partir de dados experimentais. O resultado obtido foi: 47 % de fitas β , 6 % de α hélices, 7 % de alças e 39 % de outras estruturas (conformações não ordenadas).

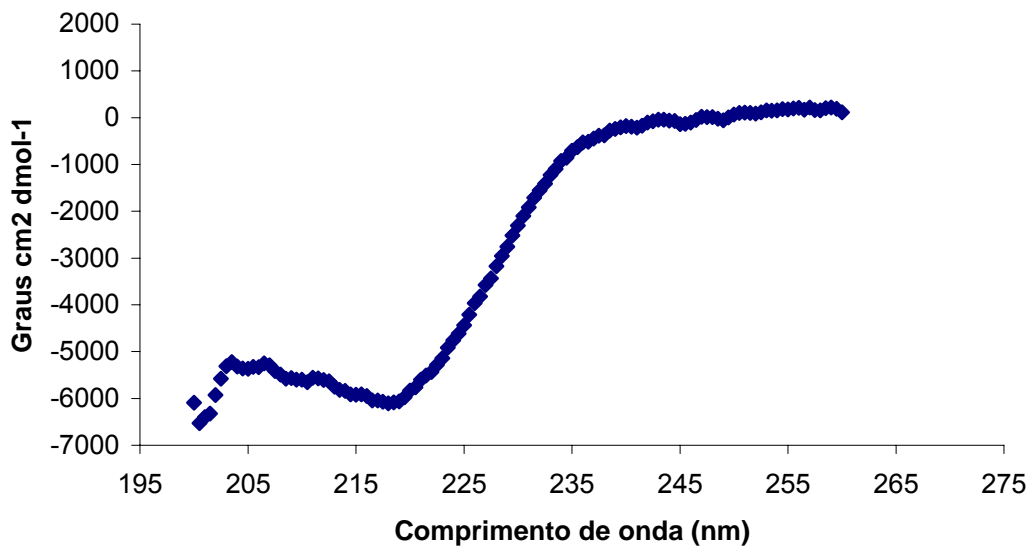
FIGURA 40 – PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA Hfq



Predição da estrutura secundária usando o programa PSIPRED. Pred: estrutura secundária predita. “C”: aminoácidos que contribuem para a formação de estrutura em alça. “E”: aminoácidos que contribuem para a formação de fita β . “H”: aminoácidos que contribuem para a formação de α -hélice. O cilindro verde corresponde a α -hélice. As setas amarelas correspondem a fitas β . Abaixo das figuras encontra-se a seqüência de aminoácidos da proteína (AA). Conf: grau de confiabilidade calculado pelo programa Psipred para a estrutura secundária predita.

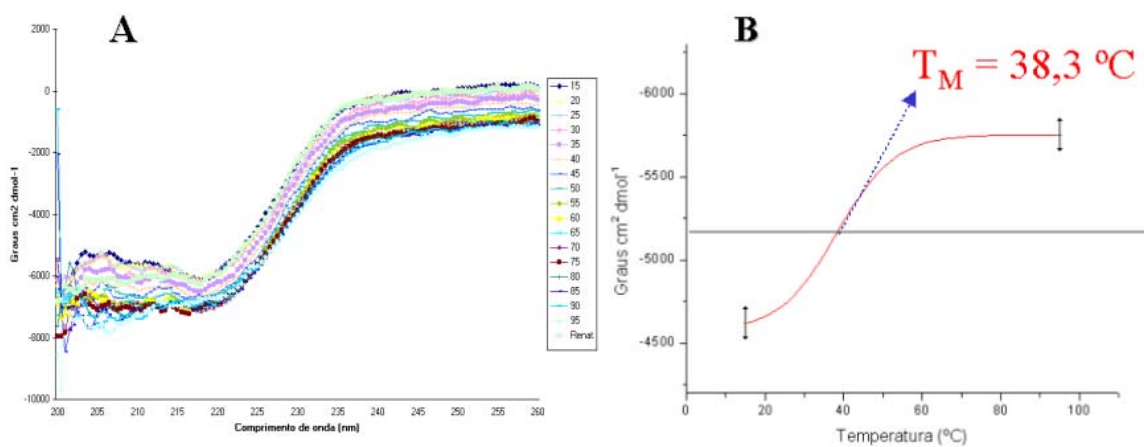
As mudanças estruturais sofridas ao longo da variação de temperatura (15 a 95°C) também foram investigadas. Para cada temperatura foi registrado um espectro de CD e estes foram sobrepostos em um mesmo gráfico (figura 42-a). O perfil global obtido indica uma grande variação estrutural com a variação de temperatura e esta mudança pode ser melhor percebida quando plota-se a porcentagem dos diversos tipos estruturais em função da temperatura (figura 43). Observa-se claramente a perda de estrutura em fitas β com o aumento de temperatura, uma vez que a porcentagem desta estrutura secundária diminuiu abruptamente a partir de 20°C. Aparentemente, quando comparado à variação sofrida por β , a α hélice não sofreu efeito significativo da variação de temperatura.

FIGURA 41 – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD) DA PROTEÍNA Hfq



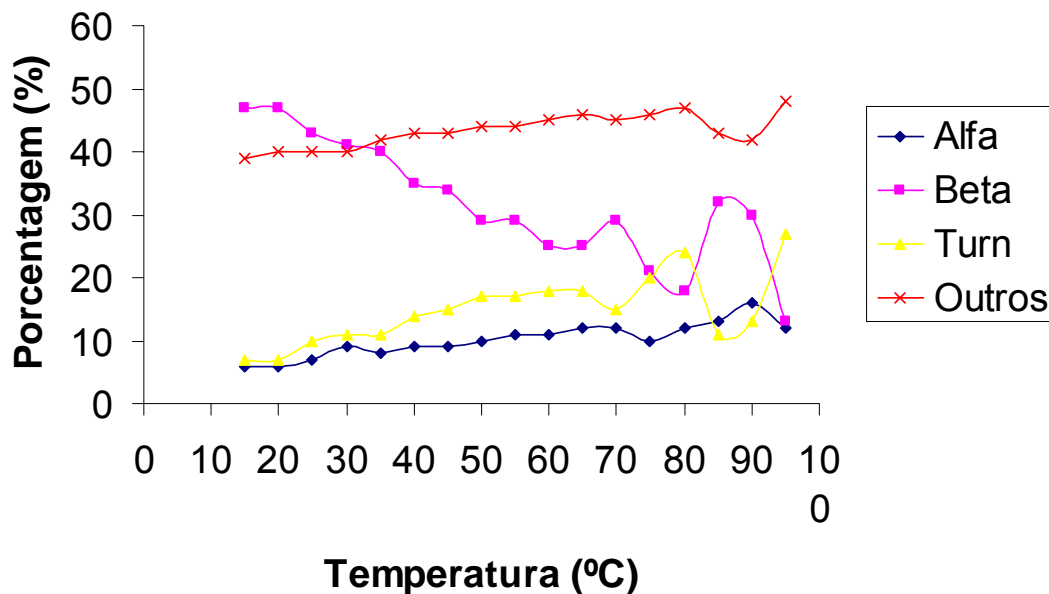
Espectro de CD de 200 a 260nm da proteína Hfq nativa (0,2mg/mL) a 15°C. Na ordenada, a elipticidade molar. Na abscissa o comprimento de onda em nm.

FIGURA 42 – ENOVELAMENTO E VARIAÇÃO DA TEMPERATURA



(A) Sobreposição dos espectros de CD de 200 a 260nm referente à variação de temperatura. O espectro referente a cada temperatura está representado em cores diferentes. (B) O gráfico mostra a relação entre elipticidade a 222nm e a variação de temperatura. Na figura está indicada a temperatura de *melting* ou desenovelamento.

FIGURA 43 – PORCENTAGEM DE ESTRUTURA ESCUNDÁRIA AO LONGO DA VARIAÇÃO DE TEMPERATURA



Variação de porcentagem de cada estrutura secundária (α -hélice, fitas β e alças) em função da variação de temperatura.

Uma vez que a temperatura foi um importante parâmetro que afetou a estrutura secundária da proteína Hfq, foi determinada a temperatura crítica a partir da qual há um grande desenovelamento protéico. Este estudo foi realizado variando-se a temperatura (15 a 95°C) e monitorando a mudança estrutural a 222nm. Este comprimento de onda permite observar mudanças sofridas pelas α hélices. A relação elipticidade (222nm) em função da temperatura pode ser observada no gráfico da figura 42B. O ponto médio da inflexão determinou a temperatura de 38,3°C como a temperatura a partir da qual a proteína perde drasticamente a estrutura secundária.

Estes resultados permitem inferir que a proteína Hfq não possui uma grande estabilidade térmica, mas sim um re-enovelamento eficiente. Esta hipótese poderia justificar a permanência da atividade de ligação ao RNA da proteína Hfq mesmo após seu aquecimento a 80°C no passo inicial de purificação.

4.6 ANÁLISE CRISTALOGRÁFICA DA PROTEÍNA Hfq

A proteína Hfq de *H. seropedicae* foi submetida à cristalização com a finalidade de determinar sua estrutura tridimensional e conseqüentemente utilizar seu modelo estrutural para realizar estudos de similaridade estrutural, funcional e evolutivo e assim como mapear o sítio de ligação para ATP.

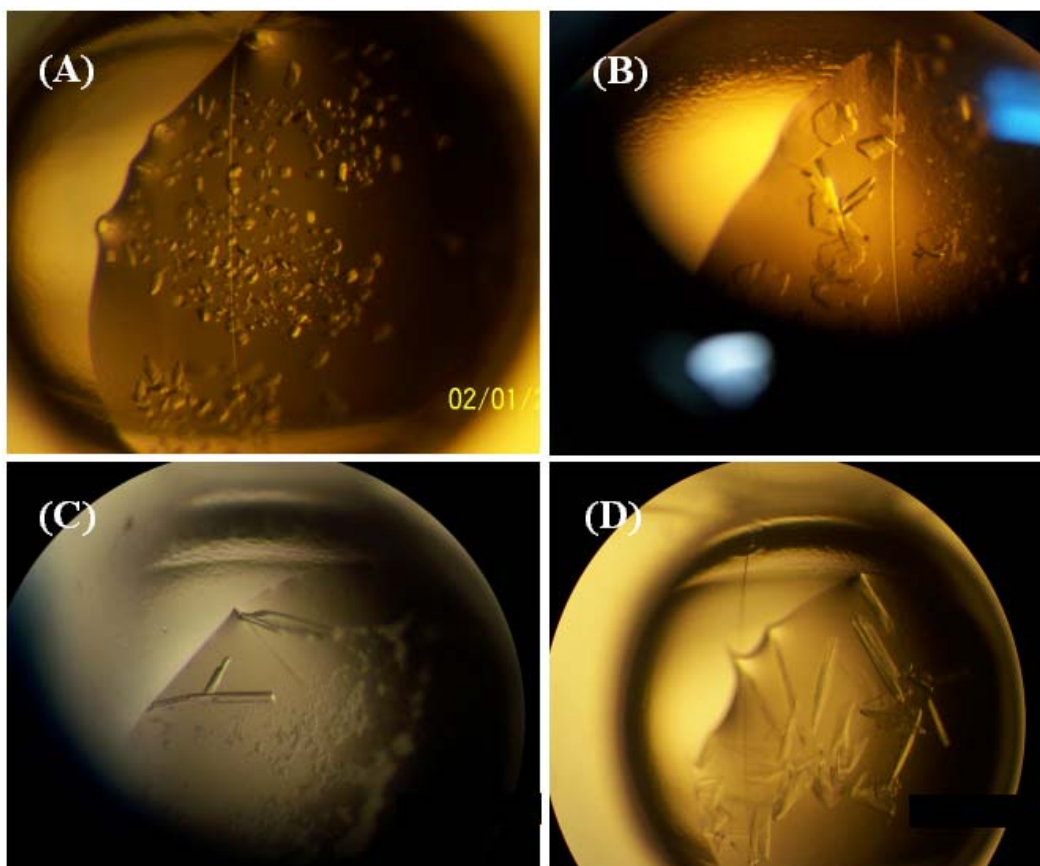
A cristalização foi realizada pelo método de difusão de vapor em gota sentada (3.19). Após a montagem automatizada das placas, todas as 544 condições foram acompanhadas periodicamente e as características das gotas anotadas. No primeiro dia de observação apareceram cristais em diversas condições e o seu desenvolvimento foi acompanhado por 14 dias. Estes cristais apresentaram-se de diversas formas: agulhas, microcristais ou placas (figura 44).

No quinto dia de observação foi contabilizada a quantidade de gotas límpidas (sem alteração de fase) por *kit* de cristalização testado. Este resultado está representado na tabela 6.

TABELA 6 – LEVANTAMENTO DA PORCENTAGEM DE GOTAS LÍMPIDAS REGISTRADAS NO SCREENING INICIAL

KIT	% de Gotas Límpidas
Crystal Screen e Crystal Screen II (Hampton Research)	56
Wizard I e Wizard II (Emerald BioSystems)	65
PACT (Nextal / Qiagen)	54
JSCG+ (Nextal / Qiagen)	51
SaltRx (Hampton Research)	85
Precipitant Synergy (Emerald BioSystems)	56

FIGURA 44 – SCREENING INICIAL DE CRISTALIZAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq



Ensaio de cristalização da proteína Hfq utilizando o método de difusão de vapor em gota sentada. O *screening* inicial da proteína Hfq apresentou cristais em diversas condições de cristalização assim como várias formas. (A) Forma microcristalina. (B) Forma de placas. (C) Forma de agulha na presença de precipitado protéico. (D) Forma de agulhas.

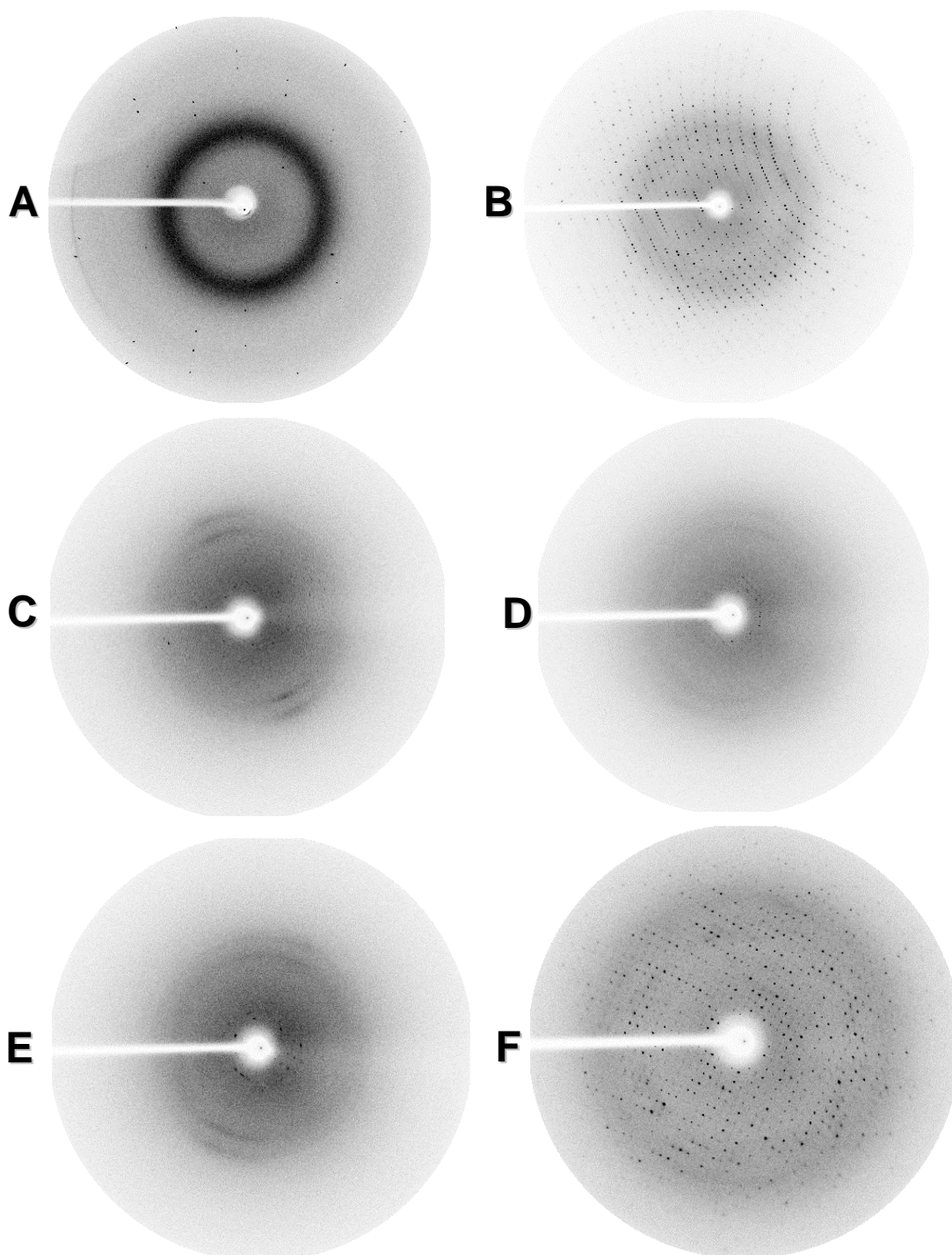
Observou-se que em todos os kits testados mais de 50% das condições não possuíram alteração de fase nos primeiros cinco dias, ou seja, não foi observado cristal ou proteína precipitada amorfa. Gouling e Perry (2003) relataram que quando aproximadamente 50% das condições apresentarem-se como proteína solúvel, considera-se a concentração protéica apropriada para mais ensaios. Esta afirmativa sugere que a concentração protéica era inadequada aos ensaios, pois mais de 50% das condições, em todos os Kits, apresentaram-se como gotas limpas. Contudo assume-se que este fato tenha sido um reflexo da solubilidade da proteína nas várias condições de cristalização e não um efeito da baixa concentração de proteína utilizada, uma vez que a concentração protéica medida anteriormente foi superior a 10mg/mL quando determinada pelos métodos de Bradford e coeficiente de extinção molar.

Os cristais com tamanho superior a 0,1mm foram submetidos à difração de raios-x com o objetivo de identificar as condições que propiciaram a formação de cristais constituídos de proteína e não de sal. Na figura 45 estão ilustrados alguns padrões de difração obtidos. Os padrões de difração podem ser comparados, pelo leitor, com os padrões de difração controles, como cristal de sal e cristal de lisozima, para uma melhor diferenciação (figura 45).

Um cristal salino (figura 45A) possui poucos pontos difratados, inclusive na região de alta resolução (região mais distante do centro do difratograma), enquanto que os constituídos de proteína possuem vários pontos inclusive na região de baixa resolução (figura 45B).

Para a proteína Hfq, dentre quinze cristais escolhidos aleatoriamente catorze foram caracterizados como cristais pouco organizados (figura 45 - C a E) e um como cristal bem formado (figura 45F). A composição das soluções de precipitação nas quais estes cristais formaram-se está listada na tabela 7. Destaca-se o efeito de PEG na cristalização da proteína Hfq, uma vez que este agente precipitante está presente na grande maioria das condições. O cristal bem formado foi obtido na condição número 10 (tabela 7) e este ao ser difratado apresentou uma resolução máxima de 2.7 Å (figura 46).

FIGURA 45 – PADRÕES DE DIFRAÇÃO DOS CRISTAIS DA PROTEÍNA Hfq



Os cristais obtidos no *screen* inicial foram submetidos a difração de raios-x conforme item 3.19. Os padrões de difração digitalizados obtidos com o detector Mar345 estão representados acima. (A) Sal. (B) Lisozima. (C-E) Cristais mal-formados da proteína Hfq. (F) Cristal bem-formado da proteína Hfq.

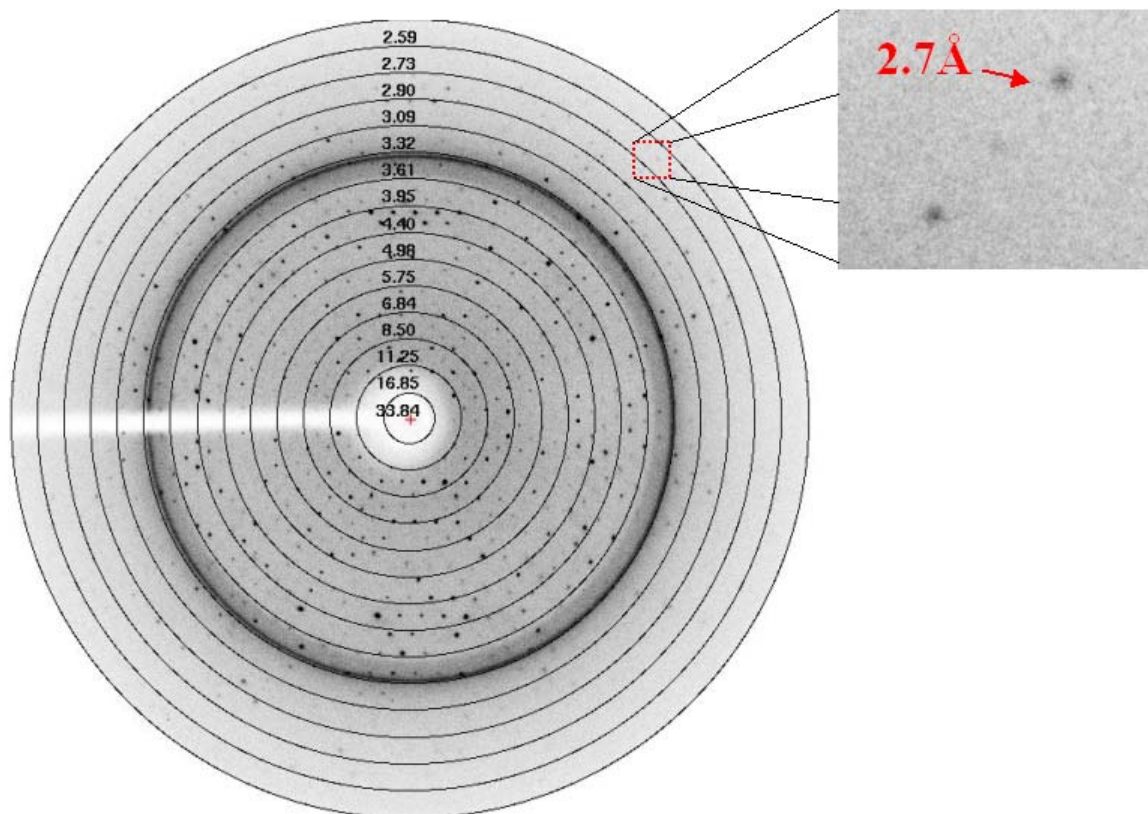
Futuramente a condição número 10 da tabela 7 será refinada para a obtenção de cristais maiores e melhor organizados, para a coleta completa dos dados necessários para a construção de um modelo estrutural em alta resolução. A melhor condição será utilizada também para ensaios de co-cristalização com RNA e ATP. O objetivo desta última abordagem será o mapeamento da posição da molécula de ATP na proteína, assim como o efeito da mesma na sua conformação final.

Assim, os resultados obtidos levaram à indicação de várias condições de cristalização para a proteína Hfq de *H. seropedicae*, sendo que uma das condições é considerada momentaneamente a mais promissora. Isto demonstra que o processo de purificação para proteína atendeu às exigências de pureza e quantidade necessárias para se obter o cristal.

TABELA 7 – COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES DE PRECIPITAÇÃO DOS CRISTAIS PROTÉICOS

Nº	TAMPÃO	PRECIPITANTE	SAL
1	-----	10% (w/v) PEG1000	-----
2	100mM HEPES de sódio/HCl pH 7,5	20% (w/v) PEG4000	-----
3	100mM Ácido Cacodílico/HCl pH 6,5	10% (v/v) Isopropanol 20% (w/v) PEG8000	200mM Acetado de magnésio
4	100mM Tris/HCl pH 7,0	30% (w/v) PEG3000	200mM Cloreto de Sódio
5	-----	20% (w/v) PEG3350	200mM Nitrato de Sódio
6	100mM SPG/SPG pH 6,0	25% (w/v) PEG1500	-----
7	-----	20% (w/v) PEG3350	200mM Acetato de Sódio
8	100mM MES/NaOH pH 6,0	20% (w/v) PEG6000	200mM Cloreto de Sódio
9	100mM PCB/PCB pH 6,0	25% (w/v) PEG1500	-----
10	100mM PCB/PCB pH 7,0	25% (w/v) PEG1500	-----
11	100mM MMT/MMT pH 8,0	25% (w/v) PEG1500	-----
12	100mM Cloreto de Amônio pH 6,3	20% (w/v) PEG3350	-----
13	-----	20% (w/v) PEG3350	200mM Nitrato de Amônio pH 6,3
14	100mM Imidazol/HCl pH 8,0	10% (w/v) PEG8000	-----
15	100mM Bis-Tris/HCl pH 5,5	25% (w/v) PEG3350	200mM Cloreto de Magnésio

FIGURA 46 – DIFRAÇÃO DA PROTEÍNA Hfq A 2.7Å DE RESOLUÇÃO



Padrão de difração da proteína Hfq utilizando o cristal obtido na condição de precipitação número 10 (tabela 7). Os círculos representam as faixas de resolução. Em destaque os pontos de difração na região de maior resolução.

5. CONCLUSÕES

- ◆ O gene *hfq* de *H. seropedicae* provavelmente forma uma unidade transcricional com os genes *hfIXKC*, concordando com a organização gênica observada para as β -proteobactérias;
- ◆ O gene *hfq* codifica uma proteína solúvel de 8,8 kDa com alta identidade com as proteínas Hfq de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- ◆ A proteína Hfq foi superexpressa em *E. coli* nas formas nativa e fusionada a cauda de histidinas. Ambas as proteínas foram purificadas e apresentaram uma pureza final de 99 e 90 %, respectivamente;
- ◆ A proteína Hfq possui atividade de ligação ao sRNA DsrA, sendo que a forma fusionada a cauda de histidinas possui menor afinidade quando comparada a nativa;
- ◆ Hfq possui estrutura secundária característica das proteínas pertencentes à família *Sm like proteins*;
- ◆ Hfq é um homohexâmero;
- ◆ A proteína Hfq foi cristalizada na condição 100 mM de PCB pH 7,0 e 25 % (w/v) PEG1500. Esta condição gerou um cristal com padrão de difração com uma resolução de 2,7 Å.

6. PERSPECTIVAS

No presente trabalho foi apresentada a clonagem, expressão e purificação da proteína Hfq de *H. seropedicae* nas formas nativa e fusionada a cauda de histidinas. Foi demonstrado também a capacidade de ligação da proteína Hfq a ao sRNA DsrA. Uma condição de cristalização promissora foi encontrada a partir de um *screen* inicial de 544 diferentes condições.

Os resultados aqui expostos abrem oportunidade para o desenvolvimento de mais pesquisas no campo estrutural e no estudo do controle da expressão gênica fornecendo ponto de partida para:

1. Identificação de novos sRNAs regulatório;
2. Determinação do modelo estrutural da proteína Hfq de *H. seropedicae*;
3. Estudo da interação de ligantes, interação proteína-proteína e dinâmica molecular;
4. Estudo do fenótipo *hfq* em *H. seropedicae* e investigação de um provável papel desta proteína no processo de fixação biológica de nitrogênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, A. J.; GREENFIELD, N. J.; FASMAN, G. D. **Met. Enzymol.**, London and New York: Academic Press, vol. XXVII D, pp. 675, 1973.

AIBA, H. Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 10, p. 134-139, 2007.

ALTUVIA, S. Regulatory Small RNAs: the Key to Coordinating Global Regulatory Circuits. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 6679-6680, 2004.

ARLUISON, V.; MUTYAM, S.K.; MURA, C.; MARCO, S.; SUKHODOLETS, M.V. Sm-like protein Hfq: Location of the ATP-binding site and the effect of ATP on Hfq-RNA complexes. **Prot. Science**, v. 16, p. 1-12, 2007.

AZAM, T.A.; ISHIHAMA, A. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 33105-33113, 1999.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a new root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Intl. J. Sys. Bact.**, n. 36, p. 86-93, 1986.

BENELLI, E.M. Análise funcional e estrutural da proteína PII, controladora da fixação de nitrogênio em *Herbaspirillum seropedicae*. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Brazil, 200p., 1997.

BLUMENTHAL, T.; CARMICHAEL, G. G. RNA replication: function and structure of Q β replicase. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 48, p. 525-548, 1979.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. ***Plant and Soil***, v. 174, p. 195-209, 1995.

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

BRENNAN, R.G.; LINK, T.M. Hfq structure, function and ligand binding. ***Curr. Opin. Microbiol.***, v. 10, p. 1-9, 2007.

BRESCIA, C.C.; MIKULECKY, P.J.; FEIG, A.L.; SLEDJESKI, D.D. Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. ***RNA***, v. 9, p. 33-43, 2003.

Cell-Porator Voltage Booster – Instruction Manual – Life Technologies, Inc. 1991.

COLLINS, B.M.; NAIDOO, N.; HARROP, S.J.; CURMI, P.M.G.; MABBUTT, B.C. Refined Structure of Sm-Like Protein Heptamer from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. (Fonte: PDB - a ser publicado).

CUDNEY, R.; PATEL,S.; WEISGRABER, K.; NEWHOUSE, Y.; McPHERSON, A. Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. ***Acta Cryst.***, D50, p. 414-423, 1994.

DELEAGE, G., GEOURJON, C. An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. ***Comput. Appl. Biosci.***, v.2, p.197-199, 1993.

DING, Y.; DAVIS, B. M.; WALDOR, M. K. Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates sigma expression. **Mol. Microbiol.**, v. 53, p. 345-354, 2004.

DIXON, RAY; KAHN, DANIEL. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nature Rev.**, v. 2, p. 621-631, 2004.

DREPPER, T.; RAABE, K.; GIAOURAKIS, D.; GENDRULLIS, M.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. The Hfq-like protein NrfA of the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* controls nitrogen fixation via regulation of *nifA* and *anfA* expression. **FEMS**, 215, P. 221-227, 2002.

EXPASY (EXPERT PROTEIN ANALISYS SYSTEM) **ALDENTE**. Disponível em: < www.expasy.ch/tools/aldente/ >. Acesso em: 13 mai. 2006.

EXPASY (EXPERT PROTEIN ANALISYS SYSTEM) **PROTPARAM**. Disponível em: < www.expasy.ch/tools/protparam.html >. Acesso em: 13 dez. 2006.

FERNANDEZ, M. T. F.; EOYANG, L.; AUGUST, J. T. Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Q β -RNA. **Nature**, v. 219, p. 588-590, 1968.

GEISSMANN, T. A.; TOUATI, D. Hfq, a new chaperoning role: Binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. **EMBO J.**, v. 23, p. 396-405, 2004.

GOTTESMAN, S. THE SMALL REGULATORS OF *ESCHERICHIA COLI*: Roles and Mechanisms. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.58, p. 303-328, 2004.

GOULDING, C.W.; PERRY, L.J. Protein production in *Escherichia coli* for structural studies by X-ray crystallography. **J. Struct. Biol.**, v. 142, p. 133-143, 2003.

HALL, T.A. **BioEdit 4.8**. Raleigh, 1997-2001. 1 arquivo (11,5 Mb); Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>> BioEdit: a userfriendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.

HASETH, P. L.; UHLENBECK, O. C. Interaction of *Escherichia coli* host factor protein with oligoriboadenyates. **Biochem.**, v.19, p. 6138-6146, 1980.

HENGGE-ARONIS, R. Survival of hunger and stress: The role of rpoS in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. **Cell**, v. 72, p. 165-168, 1993.

HENGGE-ARONIS, R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, p.373-395, 2002.

HERMANN, H.; FABRIZIO, P.; RAKER, V.A.; FOULAKI, K.; HORNIG, H.; BRAHMS, H.; LÜHRMAN, R. snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions. **EMBO J.**, v. 14, n. 9, p. 2076-2088, 1995.

ISHIKAWA, J.; HOTTA, K. FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G + C content. **FEMS**, v. 174, p. 251-253, 1999.

JANCARIK, J.; KIM, S. H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **J. Appl. Cryst.**, v. 24, p. 409-411, 1991.

JONES, D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **J. Mol. Biol.**, v.292, p.195-202, 1999.

KAJITANI, M.; ISHIHAMA, A. Identification and sequence determination of the host factor gene for bacteriophage Q β . **Nuc. Acids Res.**, v. 19, p. 1063-1066, 1991.

KAJITANI, M.; KATO, A.; WADA, A.; INOKUCHI, Y.; ISHIHAMA, A. Regulation of the *Escherichia coli hfq* Gene Encoding the Host Factor for Phage Q β . **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 531-534, 1994.

KAMINSKI, P.A., DESNOUES, N.; ELMERICH, C. The expression of *nifA* *Azorhizobium caulinodans* requires a gene product homologous to *Escherichia coli* HF-I, an RNA-binding protein involved in the replication of phage Q β RNA. **PNAS**, USA, 91, p. 4663-4667, 1994.

KAMINSKI, P.A., ELMERICH, C. The Control of *Azorhizobium caulinodans nifA* expression by oxygen, ammonia and by the HF-I-like protein, NrfA. **Mol. Microbiol.**, 28, p. 603-13, 1998.

KAMBACH, C.; WALKE, S.; YOUNG, R.; AVIS, J. M.; DE LA FORTELLE, E.; RAKER, V.A.; LÜHRMANN, R.L.; LI, J.; NAGAI, K. Crystal Structures of Two Sm Protein Complexes and Their Implications for the Assembly of the Spliceosomal snRNPs. **Cell**, v. 96, p. 375-387, 1999.

KAWAMOTO, H.; KOIDE, Y.; MORITA, T.; AIBA, H. Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 1013-1022, 2006.

KLASSEN, G; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* strain SMR1. **Can. J. Microbiol.** , n. 43, p. 841–846, 1997.

KLASSEN, G. ; PEDROSA, F. O. ; SOUZA, E. M. ; YATES, M. G. ; RIGO, L. U. . Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 181, n. 1, p. 165-170, 1999.

KLEINER, D.; PAUL, W.; MERRICK, M.J. Construction of multicopy expression vectors for regulated over-production of proteins in *Klebsiella pneumoniae* and other enteric bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 1779-1784, 1988.

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

LEASE, R. A.; SMITH, D.; McDONOUGH, K.; BELFORT, M. The Small Noncoding DsrA RNA Is an Acid Resistance Regulator in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriol.**, v. 186, n. 18, p. 6179-6185, 2004.

LEASE, R. A.; WOODSON, S. A. Cycling of the Sm-like Protein Hfq on the DsrA Small Regulatory RNA. **J. Mol. Biol.**, n.344, p. 1211-1223, 2004.

LEWIN, B. **GenesVII**. 7º ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

LEONARD, N. J.; MCDONALD, J. J.; REICHMANN, M. E. Reaction of Diethyl Pyrocarbonate with Nucleic Acid Components, I. Adenine*. **PNAS**, USA, v.67, p. 93-98, 1970.

LIVNY, J.; FOGEL, M. A.; DAVIS, B. M.; WALDOR, M. K. sRNAPredict: an integrative computational approach to identify sRNAs in bacterial genomes. **Nuc. Acids Res.**, v. 33, p. 4096-4105, 2005.

MACHADO, A.T.; MAGNAVACA, R. **Estresse Ambiental**: o milho em perspectiva. Rio de Janeiro: AS-PTA, 47p, 1991.

MACHADO, I.M.P.; YATES, M.G.; MACHADO, H.B.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 1599-1602, 1996.

MAJDALANI, N.; VANDERPOOL, C. K.; GOTTESMAN, S. Bacterial Small RNA Regulators. **CRBMB**, v. 40, p. 93-113, 2005.

MASSE, E; GOTTESMAN, S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. **PNAS, USA**, v. 99, p. 4620-4625, 2002.

MASSE, E; ESCORCIA, F.E.; GOTTESMAN, S. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. **Genes Dev.**, v. 17, p. 2374-2383, 2003.

McNEALY, T. L.; FORSBACH-BIRK, V.; SHI, C.; MARRE, R.; The Hfq homolog in *Legionella pneumophila* demonstrates regulation by LetA and RpoS and interacts with the global regulator CsrA. **J. Bacterol.**, v. 187, p. 1527-1532, 2005.

MIKULECKY, P.J.; KAW, M.K.; BRESCIA, C.C.; TAKACH, J.C.; SLEDJESKI, D.D.; FEIG, A.L. *Escherichia coli* Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs. **Nature Struct. Mol. Biol.**, v. 11, n. 12, p. 1206-1214, 2004.

MOHANTY, B.K.; MAPLES, V.F.; KUSHNER, S.R. The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 54, p. 905-920, 2004.

MOLL, I.; AFONYUSHKIN, T.; VYTVYTSKA, O.; KABERDIN, V. R.; BLASI, U. Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. **RNA**, v. 9, 2003.

MOLLER, T.; FRANCH, T.; HOJRUP, P.; KEENE, D. R.; BACHINGER, H. P.; BRENNAN, R.G.; VALENTIN-HANSEN, P. Hfq: A bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. **Mol. Cell.**, v. 9, p. 23-30, 2002.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L.S. Use of lactose to induce expression of soluble NifA protein domains of *Herbaspirillum seropedicae* in *Escherichia coli*. **Can. J. Microbiol.**, n. 46, p. 1-4, 2000.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L.S. Fnr Is Involved in Oxygen Control of *Herbaspirillum seropedicae* N-Truncated NifA Protein Activity in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 3, p. 1527-1531, 2003.

MORITA, T.; MAKI, K.; AIBA, H. Rnase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. **Genes Dev.**, v. 19, p. 2176-2186, 2005.

MUFFLER, A.; TRAUlsen, D. D.; FISCHER, D.; LANGE, R.; HENGGE-ARONIS, R. The RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 297-300, 1997.

NAKAO, H.; WATANABE, H.; NAKAYAMA, S.; TAKEDA T. yst gene expression in *Yersinia enterocolitica* is positively regulated by a chromosomal region that is highly homologous to *Escherichia coli* host factor 1 gene (hfq). **Mol Microbiol.**, V. 18, p. 859-865, 2005.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION) **BLAST**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: agosto de 2006.

NFN (NÚCLEO DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO-UFPR). Disponível em: <<http://nfn.genopar.org/>>. Acesso em: 08 ago. 2006.

NIELSEN, J.S.; BØGGILD, A.; ANDERSEN, C.B.; NIELSEN, G.; BOYSEN, A.; BROSERSEN, D.E.; VALENTIN-HANSEN, P. An Hfq-like protein in archaea: Crystal structure and functional characterization of the Sm protein from *Methanococcus jannaschii*. **RNA**, 2007.

NIKULIN, A.; STOLBOUSHKINA, E.; PEREDERINA, A.; VASSILIEVA, I.; BLAESI, U.; MOLL, I.; KACHALOVA, G.; YOKOYAMA, S.; VASSYLYEV, D.; GARBER, M.; NIKONOV, S. Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq protein. **Acta Cryst.**, v. 61, p. 141-146, 2005.

NOBLE, J.A.; INNIS, M.A.; KOONIN, E.V.; RUDD, K.E.; BANUETT, F.; HERSKOWITZ, I. The *Escherichia coli* *hflA* locus encodes a putative GTP-binding protein and two membrane proteins, one of which contains a protease-like domain. **PNAS**, v. 90, p. 10866-10870, 1993.

NOINDORF, L.; REGO, F. G. M.; BAURA, V. A.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L. M.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.**, v. 185, p. 55-62, 2006.

NONAKA, G.; BLANKSCHEN, M.; HERMAN, C.; GROSS, RHODIUS, V.A. Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, σ^{32} , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. **Genes Dev.**, n. 20, p. 1776-1789, 2006.

OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled strip disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytol.**, Cambridge, v. 135, p. 723-737, 1997.

ORTÍN, J.; PARRA, F. Structure and Function of RNA Replication. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 60, p. 305-326, 2006

PACE, C.N.; VAJDOS, F.; FEE, L.; GRIMSLEY, G.; GRAY, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Science**, v. 4, p. 2411-2423, 1995.

PEDROSA, F.O.; BENELLI, E.M.; YATES, M.G.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R.A.; KLASSEN, G.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; CHUBATSU, L.S.; RIGO, L.U. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Biotechnol.**, v. 91, p. 189-195, 2001.

ProteinProspector. Disponível em: <<http://prospector.ucsf.edu/>> Acesso em: agosto de 2006.

Psipred. Disponível em: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> Acesso em: março de 2007.

RASMUSSEN, A. A.; ERIKSEN, M.; GILANY, K.; UDESEN, C.; FRANCH, T.; PETERSEN, C.; VALENTIN-HANSEN, P. Regulation of OmpA mRNA stability: The role of small regulatory RNA in growth phase-dependent control. **Mol. Microbiol.**, v. 58, p. 1421-1429, 2005.

REGO, F. G. M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. ; WASSEM, R.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L.; SOUZA, E. M.. The expression of *nifB* gene from *Herbaspirillum seropedicae* is dependent upon the NifA and RpoN proteins. **Can. J. Microbiol.**, 2006.

REPOILA, F.; MAJDALANI, N.; GOTTESMAN, S. Small non-coding RNAs, coordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm. **Mol. Microbiol.**, 48, 855-861, 2003.

ROBERTSON, G.T.; ROOP, R.M. J. The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. **Mol Microbiol.**, v. 34, p. 690-700, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **PNAS, USA 74**, 5463-5467, 1977.

SANTOS, P.C.; SMITH, A.D.; FRAZZON, J.; CASH, V.L.; JOHNSON, M.K.; DEAN, D.R. Iron-Sulfur Cluster Assembly. NifU-DIRECTED ACTIVATION OF THE NITROGENASE Fe PROTEIN. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 19705-19711, 2004.

SAUTER, C.; BASQUIN, J.; SUCK, D. Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*. **Nucl. Acids Res.**, v. 31, p. 4091-4098, 2003.

SCHAGGER, H.; von JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal. Biochem.**, v. 166, p. 368-379, 1987.

SCHEIBE, M.; BONIN, S.; HAJNSDORF, E.; BETAT, H.; MÖRL, M. Hfq stimulates the activity of the CCA-adding enzyme. **BMC**, v. 8, p. 1-7, 2007.

SCHUMACHER, M. A.; PEARSON, R. F.; MOLLER, T.; VALENTIN-HANSEN, P.; BRENNAN, R. G. Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and na Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. **EMBO J.**, v. 21, p. 3546-3556, 2002.

SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, v. 224, p. 1095-1096, 1984.

SONNLEITNER, E.; HAGENS, S.; ROSENAU, F.; WILHELM, S.; HABEL, A.; JÄGER, K.; BLÄSI, U. Reduced virulence of a *hfq* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. ***Microb. Pathog.***, v. 35, p. 217-228, 2003.

SONNLEITNER, E.; NAPETSCHNIG, J.; AFONYUSHKIN, T.; ECKER, K.; VECEREK, B.; MOLL, I.; KABERDIN, V.R. BLÄSI, U. Functional effects of variants of the RNA chaperone Hfq. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.***, v. 323, p. 1017-1023, 2004.

SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO L. U.; PEDROSA, F. O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. ***Can. J. Microbiol.***, v.37, p. 425-429, 1991a.

SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB* gen from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z18. ***J. Gen. Microbiol.***, v.137, p. 1511-1522, 1991b.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; RIGO, L.U.; MACHADO, H.B.; YATES, M.G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. ***Microbiol.*** v. 146, p. 1407-1418, 2000.

STORZ, G.; OPDYKE, J.A.; ZHANG, A. Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. ***Curr Opin Microbiol***, 7, p. 140-144, 2004.

STRING. Disponível em: <<http://string.embl.de/>> Acesso em: dezembro de 2007.

SUKHODOLETS, M.V.; GARGES, S. Interaction of Escherichia coli RNA Polymerase with the Ribosomal Protein S1 and Sm-like ATPase Hfq. ***Biochem.***, v. 42, p. 8022-8034, 2003.

SUN, X.; ZHULIN, I.; WARTELL, R.M. Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq. ***Nucl. Acids Res.***, v. 30, n. 17, p. 3662-3671, 2002.

SUN, X.; WARTELL, R.M. *Escherichia coli* Hfq Binds A18 and DsrA Domain II with Similar 2:1 Hfq6/RNA Stoichiometry Using Different Surface Sites. **Biochemistry**, v. 45, p.4875-4887, 2006.

TABOR, S.; RICHARDSON, C.C. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. **PNAS**, USA, v. 82, p. 1074-1078, 1985.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Acids Res.**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TSUI, H. C.; LEUNG, H. C. E.; WINKLER, M. E. Characterization of broadly pleiotrophic phenotypes caused by an Hfq insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. **Mol. Microbiol.**, v. 13, p. 35-49, 1994.

TSUI, H. C.; FENG, G.; WINKLER, M. E. Transcription of the *mutL* repair, *miaA* tRNA modification, *hfq* pleiotrophic regulator, and *hflA* region protease genes of *Escherichia coli* K-12 from clustered σ_{32} -specific promoters during heat shock. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 5719-5931, 1996.

TSUI, H. C.; FENG, G.; WINKLER, M. E. Negative regulation of *mutS* and *mutH* repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 7476-7487, 1997.

WASSARMAN, K. M. Small RNAs in bacteria: diverse regulators of gene expression in response to environmental changes. **Cell**, v. 109, p. 141-144, 2002.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Part III: Course Manual, Step 9: In-gel digestion. In: WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. (Ed.). **Proteomics in Practice. A laboratory Manual of Proteome Analysis**. Wiley-VCH, p.261, 2004.

WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 13, p. 290-301, 2001.

WILSON, J.W.; OTT, C.M.; BENTRUP, K.H.; RAMAMURTHY, R.; QUICK, L.; PORWOLLIK, S.; CHENG, P.; MCCLELLAND, M.; TSAPRILIS, G.; RADABAUGH, T.; HUNT, A.; FERNANDEZ, D.; RICHTER, E.; SHAH, M.; KILCOYNE, M.; JOSHI, L.; NELMAN-GONZALES, M.; HING, S.; PARRA, M.; DUMARS, P.; NORWOOD, K.; BOBER, R.; DEVICH, J.; RUGGLES, A.; GOULART, C.; RUPERT, M.; STODIECK, L.; STAFFORD, P.; CATELLA, L.; SCHURR, M.J.; BUCHANAN, K.; MORICI, L.; MCCRACKEN, J.; ALLEN, P.; BAKER-COLEMAN, C.; HAMMOND, T.; VOGEL, J.; NELSON, R.; PIERSON, D.L.; STEFANYCHYN-PIPER, H.M.; NICKERSON, C.A. Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq. **PNAS**, v. 104, n. 41, 2007.

WILUSZ, C.J.; WILUSZ, J. Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 12, n. 12, p. 1031-1036, 2005.

VASSILIEVA, I. M.; ROUZANOV, M. V.; ZELINSKAYA, N. V.; MOLL, I.; BLÄSI, U.; GARBER, M. B. Cloning, Purification, and Crystallization of a Bacterial Gene Expression Regulator – Hfq Protein from *Escherichia coli*. **Biochem.**, v. 67, p. 1293-1297, 2002.

VECEREK, B.; MOLL, I.; BLASI, U. Translational autocontrol of the *Escherichia coli* hfq RNA chaperone gene. **RNA J.**, 11, p. 976-984, 2006.

VECEREK, B.; RAJKOWITSCH, L.; SONNLEITNER, E.; SCHROEDER, R.; BLÄSI, U. The C-terminal domain of *Escherichia coli* Hfq is required for regulation. **Nucl. Acids Res.**, p. 1-11, 2007.

VOGEL, J.; SHARMA, C. M. How to find non-coding RNAs in bacteria. **Biol. Chem.**, v. 386, p. 1219-1238, 2005.

VOIGT, E. L. (2000) Identificação e análise estrutural de genes a montante do gene *nifA* em *Herbaspirillum seropedicae*. **Tese de Mestrado**. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 74p.

ZHANG, A.; WASSARMAN, K. M.; ORTEGA, J.; STEVEN, A. C.; STORZ, G. The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. **Mol. Cell**, v. 9, p. 1-20, 2002.

ZHANG, A.; WASSARMAN, K. M.; ROSENOW, C.; TJADEN, B. C.; STORZ, G.; GOTTESMAN, S. Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. **Molec. Microbiol.**, v. 50, 2003.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucl. Acids Res.**, v. 31, n. 13, p. 3406-3415, 2003

