

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VIVIANE CRISTINA HEINZEN DA SILVA

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SISTEMA DE SECREÇÃO  
DO TIPO III DE *Herbaspirillum seropedicae***

CURITIBA

2008

VIVIANE CRISTINA HEINZEN DA SILVA

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SISTEMA DE SECREÇÃO  
DO TIPO III DE *Herbaspirillum seropedicae***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leda Satie Chubatsu

Co-orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempo de Souza

CURITIBA

2008

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Dra. Leda Satie Chubatsu pela sua orientação, apoio e ensinamentos, fundamentais para o bom transcorrer desta dissertação e para minha formação.

Ao professor Emanuel M. de Souza pela atenção, discussões, sugestões e co-orientação.

Agradeço ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalho e pela chance do desenvolvimento desta dissertação.

Aos professores do Núcleo de Fixação de Nitrogênio, em especial a professora Rose Adele Monteiro pelo interesse e atenção dispensados.

À professora Roseli Wassem pela concessão de algumas estirpes de bactérias.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica que permitiu a realização deste trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica pelas disciplinas de pós-graduação, fundamentais para minha formação.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, seus professores e funcionários pelo auxílio e amizade. Em especial à Dona Julieta, à Roseli Prado e ao Valter pela prestatividade e carinho demonstrados.

Agradeço aos técnicos do biotério Luiz e Candido, pelo auxílio com os coelhos utilizados neste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório, Ana C, André Luiz, Ju Inaba, Ju Osaki, Helisson, Gus, Patilene, e Lizi pela ajuda, amizade, carinho, e bons momentos compartilhados. Em especial aos companheiros da sala 271, Luíza, Lilian e Luciano pelo apoio, ensinamentos e amizade.

Aos amigos da turma de mestrado, Alexandre Orsato, Danilo, Fernanda Pacheco, Fhernandinha, Gláucio, João, Larissa Tonelli, Larissa Comarella, Lúcia, Marco Antônio, Michele, Rafael, Thaís, e aos colegas Dayane e Doumit, pelo companheirismo, carinho e momentos de descontração.

À Daniela S. pela atenção e auxílio nas análises de espectrometria de massa.

À Fabiane Rego pela amizade, confiança, prestatividade e carinho demonstrados.

Ao Projeto Genopar pela concessão de seqüências e plasmídeos.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Um agradecimento muito especial aos meus pais Luiz da Silva e Terezinha H. da Silva, meus irmãos Evandro e Fernando, e meu querido Ewerton que sempre me incentivaram, ajudaram e torceram por mim.

Finalmente, porém de maior importância, agradeço a Deus, fundamento de minha vida.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
1.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	10
1.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO .....	11
1.3 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA .....	11
1.4 SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III .....	12
1.4.1 Genes do sistema de secreção do tipo III .....	15
1.4.2 Estrutura supramolecular do sistema de secreção do tipo III .....	18
1.4.2.1 Componentes extracelulares .....	20
1.4.2.2 Complexo da membrana externa .....	20
1.4.2.3 Complexo da membrana interna .....	21
1.4.3 Proteínas secretadas .....	22
1.5 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DO T3SS .....	23
1.6 REGULAÇÃO DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III .....	24
1.6.1 Regulação em <i>Pseudomonas syringae</i> .....	25
1.6.2 Regulação em <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	27
1.7 SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	29
2 OBJETIVOS .....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
3.1 BACTÉRIAS .....	34
3.2 PLASMÍDEOS .....	35
3.3 REAGENTES .....	35
3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	36
3.4.1 Composição dos meios de cultura .....	36
3.4.1.1 Meio NFb-malato .....	36
3.4.1.2 Meio TB (Terrific broth) .....	37
3.4.1.3 Meio LB (Luria Bertani) .....	37
3.4.1.4 Meio SOB .....	37
3.4.1.5 Meio Plant-Medium .....	38
3.4.1.6 Exsudato de milho e extrato de cana de açúcar .....	38
3.4.2 Antibióticos .....	39
3.4.3 Manutenção de estirpes bacterianas .....	39
3.5 PURIFICAÇÃO DO DNA TOTAL DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	39
3.6 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL .....	40
3.7 AMPLIFICAÇÃO DE DNA .....	40
3.8 ELETROFORESE DE DNA .....	41
3.9 EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSÃO	42

<b>3.10 DIGESTÃO DE DNA POR ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>3.11 PREPARO DOS VETORES.....</b>	<b>43</b>
<b>3.12 LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA NOS VETORES.....</b>	<b>43</b>
<b>3.13 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO .....</b>	<b>43</b>
3.13.1 Preparo de células de <i>E. coli</i> eletrocompetentes.....	43
3.13.2 Transformação bacteriana .....	44
<b>3.14 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS POR CONJUGAÇÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>3.15 ANÁLISE DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES .....</b>	<b>45</b>
<b>3.16 SEQUENCIAMENTO DE DNA .....</b>	<b>45</b>
3.16.1 Purificação de DNA dupla fita para sequenciamento .....	45
3.16.2 Reação de sequenciamento .....	466
3.16.3 Tratamento da amostra após reação de sequenciamento .....	46
<b>3.17 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES pVPET-HrpG, pVBLUE-HrcV, pVPET-HrcV, pVBLUE-HrcC E pVPET-HrcC .....</b>	<b>46</b>
<b>3.18 SUPEREXPRESSIONO DAS PROTEÍNAS HrpG, HrcV E HrcC DE <i>H. seropedicae</i> EM <i>E. coli</i>...</b>	<b>48</b>
<b>3.19 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-HrpG DE <i>H. seropedicae</i> .....</b>	<b>49</b>
<b>3.20 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-HrcV DE <i>H. seropedicae</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>3.21ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE) 51</b>	
<b>3.22 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS HrpG E HrcV SUPEREXPRESSIONADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA .....</b>	<b>52</b>
3.22.1 Retirada de proteínas dos géis de poliacrilamida .....	52
3.22.2 Preparo das amostras para análise espectrométrica .....	52
3.22.3 Análise espectrométrica através de MALDI-Tof .....	54
3.22.4 Identificação das proteínas .....	54
<b>3.23 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA AS PROTEÍNAS HrpG E HrcV DE <i>H. seropedicae</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>3.24 “IMMUNOBLOTTING” .....</b>	<b>55</b>
3.24.1 Tampões de transferência .....	56
3.24.2 Transferência .....	56
3.24.3 Tratamento da membrana.....	56
<b>3.25 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO DE MEMBRANA CELULAR DE <i>H. SEROPEDICAE</i> .....</b>	<b>57</b>
<b>3.26 CONSTRUÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE HrpG DE <i>H. SEROPEDICAE</i>.....</b>	<b>58</b>
3.26.1 Construção do plasmídeo pSUPhrpGlacZ.....	58
3.26.2 Obtenção da estirpe mutante <i>hrpG::lacZ</i> de <i>H. seropedicae</i> .....	59
<b>3.27 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE <math>\beta</math>-GALACTOSIDASE .....</b>	<b>61</b>
<b>3.28 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....</b>	<b>61</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>

<b>4.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA SEQUÊNCIA DO GENE <i>hrpG</i> DE <i>H. seropedicae</i> .....</b>	<b>62</b>
<b>4.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA His-HrpG DE <i>H. seropedicae</i> EM <i>E.coli</i> .....</b>	<b>65</b>
<b>4.3 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DA PROTEÍNA His-HrpG.....</b>	<b>66</b>
<b>4.4 ENSAIOS DE SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA His-HrpG .....</b>	<b>67</b>
4.4.1 Efeito do pré-tratamento com choque térmico na solubilização da proteína His-HrpG.....	68
4.4.2 Efeito de diferentes tampões na solubilização da proteína His-HrpG .....	69
4.4.3 Utilização de diferentes estirpes de <i>E.coli</i> na expressão da proteína His-HrpG .....	69
4.4.4 Efeito da temperatura e tempo de indução na expressão da proteína His-HrpG solúvel ..	70
<b>4.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-HrpG DE <i>H. seropedicae</i> .....</b>	<b>73</b>
<b>4.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA PROTEÍNA His-HrpG DE <i>H. seropedicae</i>.....</b>	<b>76</b>
<b>4.7 OBTENÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE HrpG DE <i>H. seropedicae</i> .....</b>	<b>79</b>
<b>4.8 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DA FUSÃO <i>hrpG::lacZ</i> NA ESTIRPE VShrpG DE <i>H. seropedicae</i>.....</b>	<b>81</b>
<b>4.9 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA SEQUÊNCIA DOS GENES HrcV E HrcC DE <i>H. seropedicae</i>.....</b>	<b>88</b>
<b>4.10 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS His-HrcV E His-HrcC DE <i>H. seropedicae</i> .....</b>	<b>89</b>
<b>4.11 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-HrcV DE <i>H. seropedicae</i>.....</b>	<b>92</b>
<b>4.12 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DA PROTEÍNA His-HrcV.....</b>	<b>92</b>
<b>4.13 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA PROTEÍNA His-HrcV DE <i>H. seropedicae</i>.....</b>	<b>94</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>96</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>97</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>98</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ESTRUTURAS DE COMPONENTES DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III E SUAS LOCALIZAÇÕES. ....	19
FIGURA 2: MODELO DE REGULAÇÃO DOS GENES <i>hrp/hrc</i> DE <i>Pseudomonas syringae</i> E <i>Ralstonia solanacearum</i> . ....	28
FIGURA 3 - SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III EM <i>H. seropedicae</i> .....	31
FIGURA 4 - COMPARAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>hrp/hrc</i> DE <i>H. seropedicae</i> E OUTROS MICRORGANISMOS. ....	32
FIGURA 5 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pSUPhrpGlacZ.....	60
FIGURA 6 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA HrpG DE <i>H. seropedicae</i> COM PROTEÍNAS SIMILARES DE OUTROS MICRORGANISMOS.....	64
FIGURA 7 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA His-HrpG DE <i>H. seropedicae</i> EM <i>E. coli</i> A PARTIR DO PLASMÍDEO pVPET-hrpG.....	67
FIGURA 8 – ALINHAMENTO DOS PEPTÍDEOS DE HIS-HRPG IDENTIFICADOS POR ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE MASSA MALDI-TOF .....	67
FIGURA 9 - EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTO COM CHOQUE TÉRMICO NA SUPEREXPRESSÃO DA PROTEÍNA His-HrpG .....	71
FIGURA 10 - EFEITO DA VARIAÇÃO DE pH E SAL NA SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA His-HrpG72	
FIGURA 11 – EFEITO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA His-HrpG EM <i>E. coli</i> ESTIRPE TUNER ...	73
FIGURA 12 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA His-HrpG SOLÚVEL .....	73
FIGURA 13 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-HrpG.....	75
FIGURA 14 - DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA E CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA His-HrpG DE <i>H. seropedicae</i> APÓS DIÁLISE .....	76
FIGURA 15 - IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA His-HrpG EM DIFERENTES DILUIÇÕES DO ANTICORPO.....	78
FIGURA 16 - SENSIBILIDADE DO ANTICORPO CONTRA His-HrpG .....	78
FIGURA 17 – ESQUEMA DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA OCORRIDA PARA PRODUZIR A ESTIRPE VShrpG DE <i>H. seropedicae</i> .....	80



FIGURA 18 - EFEITO DE NH <sub>4</sub> CL, NARINGENINA, EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR E EXSUDATO DE MILHO NA ATIVIDADE DO PROMOTOR <i>hrpG</i> DA ESTIRPE VShrpG .....	82
FIGURA 19 – EXPRESSÃO DA PROTEÍNA His-HrcV EM <i>E. coli</i> BL21(λDE3) pLysS A PARTIR DO PLASMÍDEO pVPET-HrcV .....	91
FIGURA 20 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-HrcV .....	93
FIGURA 21 – ALINHAMENTO DOS PEPTÍDEOS DE HIS-HRCV IDENTIFICADOS POR ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE MASSA MALDI-TOF .....	93
FIGURA 22 - IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA His-Hrcv PURIFICADA EM DIFERENTES DILUIÇÕES DO ANTICORPO.....	95
FIGURA 23 – IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA His-HrcV DE <i>H.seropedicae</i> .....	95

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- NOMENCLATURA DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III DESCRITAS NESTE TRABALHO .....	17
TABELA 2 - ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> E <i>Escherichia coli</i> .....	34
TABELA 3 – PLASMÍDEOS .....	35
TABELA 4 – ANTIBIÓTICOS .....	39
TABELA 5 – SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE DESNATURANTE .....	51
TABELA 6 – SOLUÇÕES PARA O PREPARO DO GEL DE EMPILHAMENTO .....	51
TABELA 7 – VOLUMES DAS SOLUÇÕES PARA O PREPARO DO GEL DE SEPARAÇÃO.....	52
TABELA 8 – TAMPÕES DE TRANSFERÊNCIA .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
Amp	Ampicilina
ATP	5' trifosfato de adenosina
atm	Unidade de pressão atmosférica
Cm	Cloranfenicol
D.O.	Densidade óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	5' trifosfato de 2' desoxinucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EPS	Exopolissacarídeos
F	Faraday
g	Grama
HCCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxiamínico
IPTG	$\beta$ -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
k $\Omega$	Quilohms
kb	Quilopares de base
kDa	Quilodalton
Km	Canamicina
kV	Quilovolts
L	Litro
LPS	Lipopolissacarídeos
Nal	Ácido nalidíxico
NMWL	Limite de tamanho molecular nominal
ONPG	o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo
ORF	Seqüência potencial para codificação de proteína
pb	Pares de base nucleotídeos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PVDF	Poly-1,1-difluoroeteno

RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS- PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
Sm	Estreptomicina
T3SS	Sistema de secreção do tipo III
Tc	Tetraciclina
TEMED	(N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina)
TFA	Ácido trifluoracético
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
U	Unidade enzimática
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
x <i>g</i>	Aceleração da gravidade
$\sigma^{54}$	Fator sigma alternativo da RNA polimerase de procariotos
% p/v	Relação em porcentagem entre o peso do soluto e o volume da solução

## RESUMO

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, fixadora de nitrogênio, endofítica, encontrada em associação com plantas de interesse comercial, como milho, cana-de-açúcar e arroz, sem causar danos a planta hospedeira. Embora o mecanismo envolvido nesta associação ainda não esteja definido, a presença de um sistema de secreção do tipo III (T3SS) em *H. seropedicae* sugere o seu envolvimento neste processo. T3SS é um sistema supramolecular utilizado por bactérias gram-negativas para a exportação de proteínas efetoras para o interior da célula eucariótica hospedeira. Esses efetores modificam sinais celulares em benefício da bactéria (no caso de patógenos) ou de ambos os organismos (no caso de simbioses). A fim de contribuir para o esclarecimento do papel do T3SS no processo da interação de *H. seropedicae* com plantas, neste trabalho focalizamos os genes *hrpG*, *hrcV* e *hrcC*. O gene *hrpG* codifica para uma provável proteína reguladora de resposta de dois componentes, ativadora da transcrição de genes codificadores de T3SS. Os genes *hrcV* e *hrcC* codificam para proteínas formadores do poro deste sistema. Esses três genes foram clonados em vetores para superexpressão em *E. coli*. As proteínas HrpG e HrcV foram super-expressas como proteínas de fusão e purificadas através de cromatografia de afinidade. As proteínas purificadas foram utilizadas para a obtenção de anticorpos policlonais. Análises de imunodeteção indicaram que os anticorpos anti-HrcV reconheceram a proteína purificada, uma proteína presente na fração de membrana de *H. seropedicae* e uma proteína similar presente em *E. coli*. Os anticorpos anti-HrpG reconheceram a proteína purificada, mas não foi possível a detecção da proteína no extrato celular de *H. seropedicae*, indicando que HrpG é produzido em baixas concentrações. Um mutante cromossomal *hrpG::lacZ* foi obtido e análises indicaram que o gene *hrpG* é expresso constitutivamente em *H. seropedicae*. Estas análises, juntamente com a futura caracterização das proteínas purificadas poderão contribuir de forma significativa para o esclarecimento do funcionamento e regulação do sistema de secreção do tipo III em *H. seropedicae*.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*. Sistema de Secreção do Tipo III. Proteínas HrpG, HrcV e HrcC.

## ABSTRACT

*Herbaspirillum seropedicae* is a gram-negative diazotroph, endophytic bacterium, found in harmless association to important commercial crops such as maize, sugar cane and rice. Although, it is not clear which mechanism are involved in this association, a type III secretion system (T3SS) present in *H. seropedicae* may be involved in the process. T3SS is a supramolecular system used by gram-negative bacteria to export effectors into the eukaryotic cells in order to modify cellular response in benefit of the prokaryote (for pathogens) or both cell (for symbionts). In order to contribute to understand the role of T3SS on the interaction between *H. seropedicae* and plants, in this work we focus on the *hrpG*, *hrcV* and *hrcC* genes. The *hrpG* gene codes for a putative two-components regulatory protein, a probable transcription activator of T3SS coding genes. The *hrcV* and *hrcC* genes code for T3SS pore forming proteins. These three genes were cloned into vectors for over-expression in *E. coli*. The HrpG and HrcV proteins were over-expressed as His-tag fusion proteins and purified by affinity chromatography. The purified proteins were used to produce polyclonal antibodies. Immunoblotting assays showed that anti-HrcV antibodies recognized the purified protein and a protein present in the membrane fraction of *H. seropedicae*. The antibodies also recognized unspecifically a protein present in whole cell extracts of *E. coli*. The anti-HrpG antibodies recognized the purified proteins, however they were unable to detect the presence of HrpG in cellular protein extract from *H. seropedicae*, suggesting that HrpG is present at low concentration. A chromosomal fusion mutant *hrpG::lacZ* was also obtained and gene-reported assays indicated that *hrpG* is constitutively expressed in *H. seropedicae*. These analyses and the characterization of the purified proteins will contribute to elucidate the function and regulatory mechanism of the type three-secretion system in *H. seropedicae*.

Key words: *Herbaspirillum seropedicae* . Type III Secretion System. HrpG, HrcV and HrcC proteins.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Herbaspirillum seropedicae*

*Herbaspirillum seropedicae* é um diazotrofo endofítico encontrado no interior de gramíneas como trigo (*Triticum aestivum*), milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), algumas espécies de gramíneas forrageiras, bananeiras (*Musa* sp.), palmeiras oleaginosas e abacaxizeiros (*Ananas comosus*). É capaz de colonizar raízes, caules e folhas de seus hospedeiros apresentando baixa sobrevivência no solo (BALDANI *et al.*, 1986; PIMENTEL *et al.*, 1991; BALDANI *et al.* 1992a; BALDANI *et al.* 1992b; BODDEY *et al.*, 1995; OLIVARES *et al.* 1996; JAMES, OLIVARES, 1998; CRUZ *et al.*, 2001).

Esta bactéria é classificada, com base na análise de seqüências de rRNA, como membro da Classe  $\beta$  do Filo Proteobacteria (YOUNG, 1992). *H. seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, geralmente vibrióide, algumas vezes helicoidal e muito móvel, podendo possuir de um a três flagelos em um ou ambos os pólos (BALDANI *et al.*, 1986). É um microrganismo capaz de reduzir nitrogênio atmosférico a amônia sob condições microaeróbicas e em uma ampla faixa de pH (5,3 a 8,0) (BALDANI *et al.*, 1986).

A colonização da bactéria endofítica *H. seropedicae* foi estudada por JAMES *et al.* (2002) e RONCATO-MACCARI *et al.* (2003b). Estes autores demonstram que o processo de colonização começa por quimiotaxia de exsudatos de raiz, seguido da entrada da bactéria, provavelmente através de aberturas nas regiões laterais das raízes emergentes, e colonização dos espaços intercelulares, aerênquima e tecidos vasculares de raízes e partes aéreas.

A capacidade de *H. seropedicae* formar uma associação com gramíneas de interesse econômico, sem provocar doença, tem despertado interesse para seu estudo. Vários trabalhos demonstraram que essa interação pode trazer benefícios à planta. BALDANI *et al.* (2000) e RONCATO-MACCARI *et al.* (2003a) observaram que inoculações de arroz com esta bactéria promovem um aumento de conteúdo de nitrogênio em grãos e o aumento de crescimento de raízes. A contribuição de *H. seropedicae* na fixação biológica de nitrogênio foi demonstrada em arroz e cana-de-açúcar pela incorporação de  $^{15}\text{N}_2$  (BALDANI *et al.* 2000; ELBELTAGY *et al.* 2001;

JAMES *et al.* 2002; OLIVEIRA *et al.* 2002). Estes resultados indicam que o *H. seropedicae* tem grande potencial como biofertilizante (DÖBEREINER, 1992; PEDROSA *et al.*, 2001).

## 1.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é um elemento essencial para a sobrevivência de todos os organismos, sendo necessário para a síntese de proteínas, ácidos nucléicos e outras biomoléculas. O ar atmosférico contém aproximadamente 78% de dinitrogênio ou nitrogênio molecular ( $N_2$ ), que é metabolicamente indisponível para a maioria dos seres vivos.

O elemento nitrogênio é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento de plantas (DIXON, KAHN, 2004) sendo também o mais caro dos fertilizantes agrícolas (PEDROSA, 1987). Além disso, o uso de fertilizantes nitrogenados pode provocar sérios danos ecológicos, uma vez que 50% do total aplicado é usualmente perdido pela ação de chuvas, erosão e atividade bacteriana (PEDROSA, 1987). Entre os efeitos do uso de fertilizantes nitrogenados estão a emissão de óxidos nitrosos tóxicos, a eutrofização de lagos e rios e a acidificação do solo (DIXON e KAHN, 2004).

A fixação biológica de nitrogênio é o processo pelo qual o  $N_2$  é reduzido enzimaticamente em amônia ( $NH_3$ ), forma metabolicamente utilizável pela maior parte dos organismos. O catalisador biológico para este processo é o complexo enzimático nitrogenase (BURRIS, 1991). A capacidade para fixar nitrogênio ocorre apenas em procariotos denominados diazotrofos e está amplamente distribuída entre Bacteria e Archaea (YOUNG, 1992).

## 1.3 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

Muitas bactérias fazem associações com plantas hospedeiras, colonizando suas superfícies (colonização epifítica) ou espaços em tecidos internos (colonização endofítica) para obtenção de fontes de carbono e outros nutrientes essenciais para sua sobrevivência (BRENCIC, WINANS, 2005).



O processo de interação planta-bactéria pode ser dividido em três classes: simbiótica, fitopatogênica e associativa. Na interação simbiótica, representada por *Rhizobium* spp e leguminosas, há o favorecimento mútuo entre a bactéria e a planta, uma vez que a bactéria é capaz de fixar nitrogênio atmosférico transferindo parte da amônia obtida para a planta, e em troca obtém nutrientes da planta e proteção (BRENCIC , WINANS, 2005). Para a interação fitopatogênica, como *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e tomate, os microrganismos desenvolveram métodos de infecção e permanência no hospedeiro, podendo ocasionar lesão ou morte da planta (BONAS *et al.*, 1991). Já nas interações associativas há um aproveitamento maior por parte do microrganismo, mas a bactéria pode beneficiar a planta ao protegê-la por supressão de patógenos, ou através da produção de substâncias específicas (RESSONICO *et al.*, 2005).

O termo endofítico, utilizado para a bactéria estudada no presente trabalho *Herbaspirillum seropedicae*, inclui todos os organismos que são capazes de colonizar, durante algum estágio de seu ciclo de vida, o interior de tecidos de plantas sem causar aparentemente danos ao seu hospedeiro. Microrganismos endofíticos também podem ser encontrados não apenas nas partes aéreas dos vegetais, mas inclusive em raízes. A distinção, no caso, é feita apenas para não incluir as bactérias fixadoras de nitrogênio entre os endófitos que vivem em simbiose com as plantas formando nódulos (PETRINI, 1991).

O estabelecimento dos diferentes tipos de interação planta-bactéria parece ocorrer por eventos de reconhecimento de moléculas sinalizadoras específicas da planta por proteínas sensoras bacterianas (MA *et al.*, 2006). Extensivos estudos nos últimos vinte anos têm revelado que grande parte destas proteínas estão associadas a um sistema de secreção, em bactérias, classificado como tipo III (LINDGREN *et al.*, 1986; HUANG *et al.*, 1988; BONAS *et al.*, 1991; BOUCHER *et al.*, 1992; BAUER *et al.*, 1994; BAKER *et al.* 1997; GRANT *et al.*, 2006).

#### 1.4 SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III

O Sistema de Secreção do Tipo III (da sigla em inglês T3SS) é um sistema supramolecular utilizado por bactérias Gram-negativas na exportação de proteínas para o interior do citosol de células eucarióticas hospedeiras (GALAN, COLMMER,

1999; HE, NOMURA, WHITTAM, 2004). O sistema de exportação é formado por proteínas que associam-se numa estrutura que lembra uma seringa com uma agulha, sendo que o corpo da seringa está presente na membrana interna da bactéria e a agulha atravessa a membrana externa, fazendo o contato com a célula hospedeira (ANDERSON , SCHEEWIND, 1999; BÜTTNER , BONAS, 2002; CORNELIS, VAN GIJSEM, 2000). O sistema de secreção do tipo III difere dos demais presentes em bactérias Gram negativas (I, II, IV e V) pela ausência de clivagem de peptídeo sinal N-terminal, *sec*-dependente, nas proteínas secretadas (HUECK, 1998).

O sistema *sec*, presente nos mecanismos de transportes do tipo II, IV e V e representado por *E.coli*, envolve proteínas na membrana interna (SecD, SecE, SecF e SecY), uma ATPase citoplasmática associada à membrana (SecA), uma chaperona (SecB) que se liga à proteína que será secretada e uma peptidase periplasmática que cliva o peptídeo sinal (THANASSI, HULTGREN, 2000; HUECK, 1998). Apesar do processo de secreção no sistema do tipo I também ser independente de Sec, a montagem do aparato secretor não é, pois a proteína externa do aparato é transportada através da membrana interna pelo sistema Sec. As proteínas secretadas por este sistema não possuem seqüência na extremidade aminoterminal clivável, e sim uma seqüência sinal carboxiterminal de aproximadamente 60 aminoácidos, que não é submetida à clivagem proteolítica. Este sinal de secreção parece ser específico para as subfamílias do sistema de secreção do tipo I (THANASSI, HULTGREN, 2000; HUECK, 1998; PUGSLEY, 1993).

O T3SS está presente em bactérias patógenas de animais e plantas, e recentemente tem sido descrita em bactérias simbiotes, saprofíticas, associativas e endofíticas. Exemplos de bactérias que apresentam esse sistema são os patógenos animais *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e enterohemorrágica (EHEC), *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis* e *Burkholderia pseudomallei* (HUECK, 1998); os fitopatógenos *Erwinia* spp., *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas* spp. (GRANT et al., 2006); e as bactérias simbiotes *Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium japonicum* e *Sinorhizobium fredii* (BRENCIC , WINANS, 2005). Uma linhagem endofítica de *Pseudomonas*, *Pseudomonas fluorescens* SBW25 utilizada em biocontrole, por

associar-se a raízes protegendo plantas contra fungos e outras bactérias ao produzir componentes anti-fungos, também possuem genes do sistema de secreção do tipo III (PRESTON *et al.*, 2001; JACKSON *et al.* 2005).

Nesses microrganismos, o sistema de secreção do tipo III é utilizado para translocar proteínas pela membrana plasmática e injetar algumas delas, as chamadas efetoras, dentro do citoplasma da célula eucariótica, onde modificam sinais celulares em benefício da bactéria, no caso dos patógenos, ou de ambos os organismos, no caso de simbiotes e associativos (MOTA, SORG, CORNELIS, 2005; HACKER, CARNIEL, 2001; GRANT *et al.*, 2006).

Patógenos intracelulares de mamíferos como *Salmonella*, *Shigella* e *Chlamydia* utilizam o T3SS para invadir ou multiplicar-se dentro da célula hospedeira (KANINGA *et al.*, 1995; HIGH *et al.*, 1992; HACKSTADT *et al.*, 1997; HUECK, 1998; MOTA, SORGA, CORNELIS, 2005). Em *Yersinia* spp. proteínas que fazem parte do T3SS, chamadas de translocadoras, e aquelas que são transportadas pelo sistema, permitem a resistência a fagocitose celular nos últimos estágios da patogenicidade (GUAN, DIXON, 1990; ANDERSSON *et al.*, 1996; HUECK, 1998). O T3SS de *Pseudomonas aeruginosa* induz significantes mudanças morfológicas em células epiteliais do pulmão, por alteração do citoesqueleto de actina, e levam a apoptose de macrófagos infectados, inibindo a fagocitose (FRITZH-LINDSTEN *et al.*, 1997). Em contraste a estes bem documentados exemplos, a função de muitas proteínas efetoras em bactérias patógenas de plantas ainda não está bem caracterizada.

Fitopatógenos multiplicam-se predominantemente no espaço intercelular, e muitas evidências sugerem que cada linhagem de fitopatógeno introduza um conjunto de proteínas efetoras através do T3SS dentro da célula vegetal para impossibilitar a defesa do hospedeiro e facilitar a sobrevivência e disseminação do patógeno (HE *et al.* 2004; GRANT *et al.*, 2006).

Muitas proteínas efetoras de bactérias fitopatogênicas estão presentes também em bactérias simbióticas, onde são expressas nos primeiros estágios do processo associação (BRENCIC, WINANS, 2005).

A função do T3SS em bactérias associativas não fitopatogênicas e não simbióticas é igualmente pouco conhecida. A inativação do T3SS de *P. fluorescens* linhagem SBW25 parece não interferir na colonização de raízes. Já em *P. fluorescens* linhagem Pf-5, a inativação do T3SS interfere no processo de colonização (PRESTON *et al.*, 2001; PULSEN *et al.*, 2005). Um estudo realizado por

RESSONICO *et al.* (2005) em *P. fluorescens* linhagem KD mostrou que a mutação polar no cluster de genes do T3SS ocasiona a perda da capacidade bacteriana de proteger plantas contra o fungo *Pithium ultimum*. Com este resultado os autores propuseram que o T3SS está envolvido na atividade de biocontrole destas bactérias.

Em *H. seropedicae*, a presença de genes homólogos aos do sistema de secreção do tipo III (Programa GENOPAR; DEDECEK, 2006) sugere que seus produtos de codificação tenham uma função similar aos já descritos, podendo interferir no mecanismo de interação com a célula hospedeira.

#### 1.4.1 Genes do sistema de secreção do tipo III

Os genes que compõe o sistema de secreção do tipo III formam um “cluster” de aproximadamente 25kb na região cromossômica, ou em megaplasmídeos como ocorre em *Ralstonia solanacearum* (BOUCHER *et al.*, 1986; ARNOLD, PITMAN, JACKSON, 2003). O “cluster” de genes *hrp* em fitopatógenos é flanqueado pelos genes efetores do T3SS e outros genes de virulência; juntos esses genes formam a Ilha de Patogenicidade que é diferenciada do resto do genoma por RNA transportadores ou elementos móveis (ALFANO *et al.*, 2000; ARNOLD, PITMAN, JACKSON, 2003). Adicionalmente alguns genes efetores estão dispersos no restante do genoma bacteriano em outros “clusters” ou encontram-se isolados (ARNOLD, PITMAN, JACKSON, 2003). Dependendo do microrganismo que o possui e do ambiente em que o mesmo habita, o “cluster” *hrp* pode receber outras denominações: Ilha Ecológica, Ilha de “fitness”, ou Ilha de Simbiose (HACKER, CARNIEL, 2001). Os genes de reação de hipersensibilidade e de patogenicidade (*hrp*) foram primeiramente identificados na bactéria fitopatogênica *Pseudomonas syringae* por LINDGREN, PEET, PANOPOULOS, em 1986. Desde então, vários pesquisadores mostraram que os genes *hrp* de outras bactérias estão envolvidos na secreção de proteínas efetoras para dentro do citoplasma da célula hospedeira (GOPALAN *et al.*, 1996; TANG *et al.*, 1996; SCOFIELD *et al.*, 1996; LEISTER, AUSUBEL, KATAGIRI, 1996).

Os genes *hrp* foram caracterizados independentemente em diversos organismos, levando a uma nomenclatura extensa e variada. Para amenizar este problema, BOGDANOVE e colaboradores (1996) propuseram uma nomenclatura

unificada com base principalmente na similaridade entre algumas das proteínas do Sistema de Secreção do Tipo III, presente em patógenos animais e fitopatógenos. Nove genes altamente conservados do T3SS receberam a denominação *hrc* (para genes *hrp* conservados) e a última letra conforme a homologia com as proteínas Ysc de *Yersinia* spp. O restante dos genes do sistema são denominados *hrp* e a última letra é utilizada em ordem alfabética conforme a ordem de descobrimento. A escolha dos genes *ysc* de *Yersinia* como padrão para a nomenclatura dos genes *hrc* é devido à maior similaridade com os respectivos genes de fitopatógenos (BOGDANOVE *et al.*, 1996; HUECK, 1998). A tabela 1 contém a nomenclatura dos produtos de genes do T3SS descritos no presente trabalho e seus correspondentes homólogos nos organismos onde estão bem caracterizados, bem como sua homologia com o sistema flagelar. A semelhança da nomenclatura do organismo de estudo do presente trabalho, *H. seropedicae*, com as bactérias fitopatogênicas é devido a maior homologia de seus genes com este grupo de bactérias.

TABELA 1- NOMENCLATURA DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III DESCRITAS NESTE TRABALHO<sup>a</sup>

<i>Yersinia</i> spp.	Patógenos de plantas	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	<i>Salmonella</i> SPI-1	<i>Shigella flexneri</i>	EPEC <sup>b</sup>	Proteínas flagelares	Função / Localização <sup>c</sup>
<i>Componentes do aparato estrutural</i>							
LcrD	HrcV	HrcV	InvA	MxiA	EsaV	FliA	M. I.
YscN	HrcN	HrcN	InvC	Spa47	EscN	FliI	C / M. I.
YscQ	HrcQ	HrcQ	SpaO	Spa33	EscQ	FliN/FliY	Secretada / Secreção
YscR	HrcR	HrcR	SpaP	Spa24	EscR	FliP	M. I.
YscS	HrcS	HrcS	SpaQ	Spa9	EscS	FliQ	M. I.
YscT	HrcT	HrpX	SpaR	Spa29	EscT	FliR	M. I.
YscU	HrcU	HrcU	SpaS	Spa40	EscU	FliB	M. I.
YscJ	HrcJ	HrcJ	PrgK	MxiJ	EscJ	FliF	M. I. / Base da agulha
YscC	HrcC	HrcC	InvG	MxiD	EscC		M. E. / Base da agulha
YscD	HrpQ	HrpQ		MxiM			M E / Base da agulha
YscI		HrpB	PrgJ				Complexo da agulha
		PilO					Complexo da agulha
		PilN					Complexo da agulha
<i>Componentes de translocação</i>							
YopB	HrpK/HrpF/PopF2 <sup>d</sup>		SipB	IpaB	EspB, EspD, EspB		Membrana hospedeiro
YopD							Membrana hospedeiro
LcrV					EspA-CesA		Membrana hospedeiro
<i>Componentes regulatórios</i>							
	HrpL	HrpL					Fator sigma
	HrpR/S						Ativador Transcrição/C
	Ou						
	HrpA						Sinalização/ M.E. M. I.
	HrpR						Sinalização/ M. I.
	HrpI						Sinalização/ M.I.
	HrpJ						Sinalização/ C.
	HrpG	HrpG					Ativador Transcrição/ C
	HrpB <sup>e</sup>						Ativador Transcrição/ C
			InvF	MxiE			

<sup>a</sup> Proteínas da mesma linha compartilham similaridade de seqüências.

<sup>b</sup> EPEC (*Escherichia coli* enteropatogênica)

<sup>c</sup> Localização exclui as proteínas flagelares. Inferida a partir de estudos usando uma ou mais bactérias. M.I. (Membrana Interna), M.E. (Membrana Externa), C (citoplasma)

<sup>d</sup> HrpK, HrpF e PopF2 correspondem a proteínas de *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, e *Ralstonia solanacearum*, respectivamente.

<sup>e</sup> As proteínas HrpL, HrpR e HrpS são características da regulação de genes *hrp* do grupo I (presente em *P. syringae*). As proteínas HrpA, HrpR, HrpJ, HrpI, HrpG e HrpB são de *R. solanacearum*, representantes do grupo II de genes *hrp*.

FONTE: HE, MOUMRA, WHITTAM (2004); SANI *et al.* (2007); HUECK (1998); DEDECEK (2006).

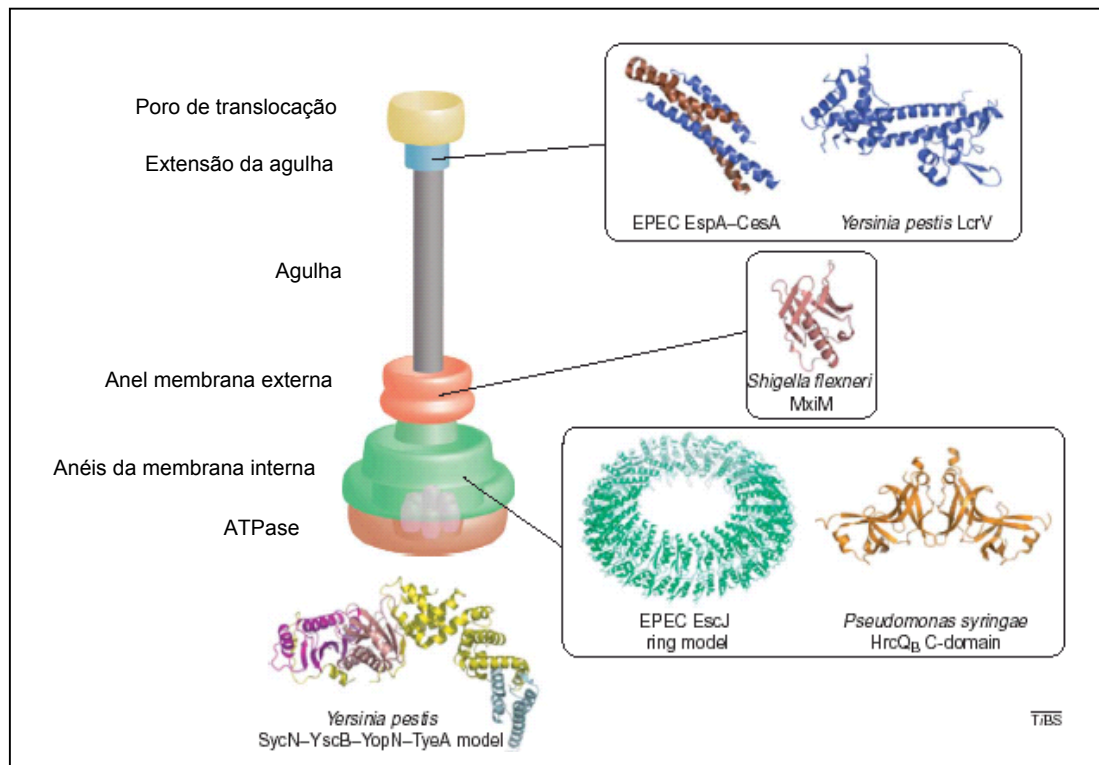
Baseado em suas funções, os produtos dos genes *hrp/hrc* podem ser classificados em três categorias: (1) estrutura supramolecular, (2) proteínas secretadas, e (3) sistema regulatório (DENG , HUNAG, 1999).

#### **1.4.2 Estrutura supramolecular do sistema de secreção do tipo III**

O aparato do T3SS é uma complexa estrutura com diversas subunidades ligadas à membrana. Consiste de mais de 20 proteínas (CORNELIS, VAN GIJSEGEM, 2000; CORNELIS, 2006), sendo que aproximadamente oito são altamente conservadas e homólogas a proteínas do aparato flagelar, indicando a existência de um ancestral comum (HUECK,1998). As proteínas formam uma rígida e estendida estrutura em formato de uma seringa com uma agulha, que é ancorada na base e atravessa a membrana interna, o espaço periplasmático e a membrana externa da bactéria. A estrutura supramolecular do T3SS foi primeiro isolada em *Salmonella typhimurium* e recebeu a denominação de “complexo da agulha” (KUBORY *et al.*,1998). Desde então o complexo tem sido purificado e visualizado por eletromicroscopia em outros patógenos de animais (*Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*) e também em fitopatógenos (*Pseudomonas syringae*), onde recebeu a denominação “pili Hrp” (HE, NOMURA, WHITTAM, 2004).

O “complexo da agulha” é formado por três partes principais: componentes extracelulares, complexo da membrana externa bacteriana, complexo da membrana interna bacteriana.

FIGURA 1- ESTRUTURAS DE COMPONENTES DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III E SUAS LOCALIZAÇÕES.



Os modelos foram construídos com base em estruturas de cristais de alta resolução e empacotamento molecular. A localização é baseada em estudos de imunocitoquímica.  
 FONTE: YIP, STRYNADKA (2006).



#### 1.4.2.1 Componentes extracelulares

A porção extracelular do T3SS pode ser subdividida em três partes principais: a agulha, que é um polímero helical composto por quase cem cópias de proteínas isoladas da família YscF; a extensão da agulha, que consiste de seqüências não similares de proteínas entre as diferentes espécies de bactérias; e o poro de translocação, que é composto por duas proteínas da família de YopB e YopD. Estas presumivelmente hetero-oligomerizam em um canal na membrana do hospedeiro e são requeridas para a entrada de proteínas secretadas na célula do hospedeiro. Todos esses componentes estruturais são exportados para o espaço extracelular pelo corpo basal do T3SS, que funciona como uma proteína com mecanismo de secreção durante a montagem do aparato estrutural (YIP, STRYNADKA, 2006). As proteínas da extensão da agulha são bastante divergentes entre as bactérias patogênicas animais e vegetais. KUBORI *et al* (2000) especulou que esta possa ser a maior diferença entre o T3SS destes dois tipos de interação, estando relacionado com a função da agulha em controlar especificamente a passagem de proteínas secretadas através das barreiras das superfícies de plantas e animais, que são muito diferentes – plantas tem parede celular enquanto que animais não a possuem.

#### 4.1.2.2 Complexo da membrana externa

O complexo da membrana externa é parte do corpo basal da agulha e é formado por subunidades concêntricas de proteínas da família “secretin”. As proteínas “secretin” compreendem uma grande família amplamente dispersas em muitas espécies de bactérias Gram-negativa. Estão presentes não somente no T3SS (onde também são conhecidas como família de proteínas YscC) como também participam de vários processos de transporte macromolecular incluindo os sistemas de secreção do tipo II e IV (THANASSI , HULTGREN, 2000). Estas proteínas não possuem homologia de seqüência nem de estrutura com os componentes da membrana externa de flagelos. Análises por espectrometria eletrônica indicam que monômeros individuais destas proteínas associam-se em oligômeros estáveis de 12 a 14 subunidades formando um canal central de 5-10 nm

de diâmetro (YIP, STRYNADKA, 2006). A biogênese dos anéis de secretin consiste da síntese no citoplasma bacteriano e exportação de seus monômeros individuais para o periplasma por mecanismo *sec* –dependente. Uma classe especial de proteínas conhecidas como “pilotins” é responsável pela oligomerização e inserção das subunidades na membrana externa. Em *Shigella flexneri* foram isoladas e caracterizadas duas proteínas formadoras do anel externo: MxiD “secretin” e MxiM “pilotin”. Sugere-se que a primeira tenha a função de envolver e sustentar a “agulha” de forma flexível, enquanto que a segunda promoveria a inserção de MxiD na membrana externa utilizando sua extensão lipídica para ancorar na região C-terminal subunidades hidrofóbicas (SANI *et al.*, 2007).

#### 1.4.1.3 Complexo da membrana interna

O complexo da membrana interna consiste de múltiplas cópias de pelo menos cinco proteínas. São estrutural e funcionalmente similares aos componentes do corpo basal flagelar. Seu complexo em forma de anel tem a função de servir como plataforma para a montagem das demais estruturas do complexo da agulha, e promover a catalização de translocação de proteínas. Estudos bioquímicos da estrutura da proteína PrgK de *Salmonella*, EscJ de *E. coli* enteropatogênica, e HrcJ de *Pseudomonas syringae* (representadas por YscJ em *Yersinia*) revelaram que o anel multimérico desta proteína tem a função de recrutar os demais componentes da membrana interna como IscR, YscS, YscT, YscU e YscV (YIP *et al.*, 2005; FU, GUO, ALFANO, 2006). Outra parte proeminente da membrana interna é formada por proteínas da família YscQ. A proteína representante desta família em *P. syringae*, HrcQ<sub>B</sub> teve sua estrutura determinada revelando formar um homotetrâmero que se liga pela porção N-terminal ao anel (YIP, STRYNADKA, 2006). Em adição a estas proteínas altamente conservadas e essencialmente da membrana interna, todo T3SS possui uma ATPase localizada no citoplasma e membrana interna. Em fitopatógenos ela é denominada HrcN, onde tem a função de bombear ativamente as proteínas que são secretadas.

### 1.4.3 Proteínas secretadas

As proteínas que são secretadas pelo sistema *hrp* incluem fatores essenciais para a patogenicidade, proteínas de avirulência e outros fatores não específicos. As proteínas que são translocadas para o interior da célula hospedeira são denominadas efetoras. Elas são capazes de modificar o metabolismo celular da célula eucariótica hospedeira para a infecção e sobrevivência da bactéria patogênica, ou simbiótica. Diferente das proteínas do aparato estrutural, as proteínas secretadas variam muito de tamanho, estrutura e função. Em muitos casos os genes que as codificam localizam-se fora do “cluster” que codifica o sistema de secreção, porém geralmente ambos parecem ser co-regulados (HUECK, 1998; GALÁN, COLLMER, 1999). Uma vez que estas proteínas não possuem peptídeo sinal na porção amino-terminal, supõe-se que a sinalização da secreção seja semelhante à que ocorre em eucariotos durante a tradução e translocação de proteínas para o interior do retículo endoplasmático: um sinal na extremidade 5' do RNA mensageiro da proteína forma uma estrutura dobrada impedindo o reconhecimento dos sinais de início de tradução. Este impedimento é interrompido após a interação do RNA mensageiro com a maquinaria de secreção, expondo assim o sítio de ligação para o ribossomo. Sendo assim, a tradução destas proteínas estaria acoplada a sua secreção (HUECK, 1998; GALLAN, COLLMER, 1999; ANDERSON, SCHNEEWIND, 1999; THANASSI, HULTGREN, 2000).

As proteínas que são secretadas necessitam de pequenas proteínas, normalmente ácidas, citoplasmáticas, com função de chaperonas. As chaperonas ligam-se individualmente às proteínas secretadas para sua proteção contra interações prematuras com outros componentes do sistema. Normalmente as chaperonas são codificadas por genes localizados próximos ao gene que codifica para a proteína com que elas interagem (HUECK, 1998; CORNELIS, VAN GIJSEM, 2000; PARSOT, HAMIAUX, PAGE, 2003).

Em bactérias fitopatogênicas as proteínas secretadas são de três classes: as chamadas “harpins”, que quando infiltradas em folhas de algumas plantas estimulam resposta de hipersensibilidade não específica; proteínas de avirulência (Avr) que são peças-chave na interação patógeno-planta, sendo responsáveis pela especificidade da interação; e proteínas que são necessárias para a virulência mas não tem

capacidade de desencadear resposta imune (WEI *et al.*, 1992; ALFANO , COLLMER, 1997; CORNELIS , VAN GIJSEGEM, 2000).

### 1.5 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DO T3SS

A expressão dos genes do T3SS tanto em patógenos de mamíferos quanto de plantas parece ser estimulada pelo contato entre a bactéria e seu hospedeiro em um sistema muito regulado (HE, NOMURA, WHITTAM, 2004).

Em cinco gêneros de bactérias fitopatogênicas (*Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Rastonia* e *Xanthomonas*) a indução é muito similar. Os genes *hrp* são reprimidos quando as bactérias são cultivadas em meio complexo e induzidos em altos níveis quando crescidas no apoplasto da planta ou em contato íntimo com células vegetais. Também foi detectada a expressão dos genes *hrp* quando estas bactérias foram crescidas em meio mínimo (HUYNH *et al.*, 1989; ARLAT *et al.* 1992; RAHME, MINDRINOS, PANOPOULOS, 1992; SCHULTE, BONAS, 1992a; XIAO *et al.*, 1992, BRENCIC, WINANS, 2005). Fatores que afetam a expressão dos genes *hrp* em meio mínimo são variados em diferentes espécies e hospedeiros. Em cada caso, alta osmolaridade e complexas fontes de nitrogênio, como peptona ou casaminoácidos, são fortes repressores da expressão dos genes *hrp* (HUYNH *et al.*, 1989; ALART *et al.*, 1992; RAHME, MINDRINOS, PANOPOULOS, 1992; SCHULTE, BONAS, 1992b; XIAO *et al.*, 1992; BRENCIC, WINANS, 2005). A natureza das fontes de carbono também tem uma importante função, porém varia de organismo para organismo. Em geral o crescimento com substratos como manitol, frutose, sacarose e piruvato parece ter um efeito positivo na expressão de *hrp*, enquanto que succinato, citrato e glutamato parecem ser inibitórios (MO *et al.*, 1995; MURPHY *et al.*, 1995). A expressão dos genes *hrp* também é afetada por pH, sendo em geral induzida em pH próximo de 5,5 com exceção de *X. campestris* pv. *vesicatora* cuja indução melhor é em pH 6,5 e 7,5 (MURPHY *et al.*, 1995). Outro fator é a temperatura, em *Erwinia amylovora* a expressão de *hrp* é até 10 vezes maior quando o crescimento é a 18°C no lugar de 30°C.

Embora a expressão de genes *hrp* de fitopatógenos possa ser detectada em meio mínimo, estudos recentes têm demonstrado que a indução de todos os genes *hrp* incluindo os genes reguladores da expressão do T3SS, requerer fatores específicos da planta hospedeira que são detectados pela bactéria. A composição

destes fatores sinalizadores ainda não está esclarecida. Em *Agrobacterium tumefaciens* e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, componentes fenólicos encontrados nos tecidos e exsudatos da planta hospedeira, parecem induzir a expressão de fatores de virulência que são secretados pelo T3SS (STACHEL *et al.*, 1985; MO *et al.*, 1995). Em *R. solanacearum* a co-cultura desta bactéria com suspensão de células da planta hospedeira *Arabidopsis* e de tomate mostrou que a indução do gene *hrpG*, que regula a expressão dos demais genes *hrp* desta bactéria, é detectada em altos níveis quando a bactéria está em contato direto com as células da planta (ALDON *et al.*, 2000; DENNY, 2000). A expressão de *hrp* em *R. solanacearum* também foi aumentada pelo contato direto com fragmentos de parede celular vegetal, embora com níveis menores de expressão em relação ao experimento em que a bactéria fica em contato com células da planta. Este resultado sugere que componentes da matriz de polissacarídeos da parede celular podem atuar como sinalizadores na indução dos genes *hrp*, uma vez que para o experimento os fragmentos de parede celular vegetal foram tratados para remoção de lipídeos e proteínas (ALDON *et al.*, 2000). Contudo a identidade química dos sinalizadores permanece desconhecida.

Em patógenos de mamíferos assim como descrito para fitopatógenos, a expressão dos genes *hrp/hrc* pode ser detectada em condições de cultivo que mimetizam as condições de infecção dentro da célula hospedeira. No entanto, um modelo alternativo de indução do T3SS foi proposto, baseado no mecanismo de regulação da biossíntese flagelar. Neste modelo, o T3SS está presente em níveis basais na bactéria, e quando esta se aproxima da célula hospedeira ou quando há alteração das condições de meio de cultura, proteínas do “complexo da agulha” sofrem modificação de seu estado helical, produzindo um sinal instantâneo para as proteínas do complexo da membrana interna e proteínas citoplasmáticas que mudam sua seletividade e ou induzem a expressão de genes (HUTCHESON, 2001; HE, NOMURA, WHITTAM, 2004; MOTA, SORG, CORNELIS, 2005).

## 1.6 REGULAÇÃO DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III

A transcrição dos genes do T3SS é controlada por múltiplos componentes regulatórios que integram os estímulos ambientais e do hospedeiro. A cascata

regulatória, entretanto, difere significativamente entre as diferentes espécies. De acordo com a estrutura do operon *hrp* e o sistema regulatório da expressão dos genes do T3SS, os genes *hrp* de bactérias fitopatogênicas são divididos em dois grupos principais (TANG, XIAO, ZHOU, 2006). No grupo I, exemplificado por *P. syringae*, *P. fluorescens*, *Erwinia* e *Pantoea* spp., os operons são ativados por HrpL, um membro da subfamília de fatores sigma de função extra-citoplasmática (ECF) (FREDERICK *et al.*, 2001; WEI *et al.*, 1992; XIAO, HUTCHESON, 1994; ALFANO, COLLMER, 1997;). No grupo II, os operons são ativados por um membro da família AraC, designado como HrpX em *X. campestris* e HrpB em *R. solanacearum*. Estes dois genes são ativados por sua vez por HrpG, membro da família OmpR de proteínas de sistema de dois componentes, funcionando como um regulador de resposta para permitir a adaptação em mudanças de condições ambientais. (GENIN *et al.*, 1992; WENGELNIK, BONAS, 1996; SCHELL, 2000).

### 1.6.1 Regulação em *Pseudomonas syringae*

Em *P. syringae*, o fator sigma de função extracitoplasmática HrpL é requerido para transcrição de genes *hrp*, bem como de genes que estão fora do cluster *hrp* cujo os produtos gênicos são secretados pelo T3SS (XIAO *et al.*, 1994). Em adição, HrpL regula a transcrição de outros fatores que provavelmente agem independente do T3SS, tais como fitotoxinas e fitormônios (BRENCIC, WINANS, 2005). A ativação transcricional de genes regulados por HrpL presumivelmente envolve a interação de HrpL com seqüências consenso de seus promotores, chamadas *hrp box*, cuja seqüência consenso em *P. syringae* é (5'-GGAACC-N15/16-CCACNNA-3') (FOUTS *et al.*, 2002, INNES *et al.*, 1993; SHEN, KEEN, 1993; THANG, XIAO, ZHOU, 2006). Seqüências similares foram encontradas em todos os promotores regulados por HrpL, embora a interação direta de HrpL com seqüências *hrp box* e a determinação dos nucleotídeos essenciais nestas seqüências não tenham sido pouco reportadas (BRENCIC, WINANS, 2005; THANG, XIAO, ZHOU, 2006).

HrpL é codificado em um operon monocistrônico localizado na extremidade esquerda do cluster *hrp* em *P. syringae* (fig. 4). O gene *hrpL* desta bactéria possui promotor dependente de fator  $\sigma^{54}$  (fator sigma alternativo da RNA polimerase de

procariotos envolvido na integração de metabolismo de nitrogênio e carbono) (KUSTU *et al.*, 1989; HENDRICKSON, GUEVERA, AUSUBEL, 2000). Sua transcrição também requer o operon *hrpRS*, que está localizado na extremidade direita do cluster *hrp* (GRIMM, AUFSATZ, PANOPOULOS, 1995) (fig. 4).

Os produtos do operon *hrpRS*, as proteínas HrpR e HrpS, possuem 60% de identidade com proteínas da família NtrC de reguladores de resposta de dois componentes. Os reguladores de resposta de dois componentes são caracterizados por apresentar um sensor que monitora um parâmetro ambiental, e um regulador de resposta citoplasmática que altera a expressão gênica ou movimento celular em resposta às modificações ambientais (STOCK, NINFA, STOCK, 1989; STOCK, ROBINSON, GOUDREAU, 2000). Membros da família NtrC têm a função de ativadoras de transcrição semelhante às “*enhancer-binding proteins*” de eucariotos (PARKINSON, KOFOID, 1992; DENG *et al.*, 1998). Similar às outras “*enhancer-binding proteins*”, HrpR e HrpS contém o domínio central (AAA) de hidrólise de nucleotídeo e interação com o fator  $\sigma^{54}$ , e o domínio C-terminal de ligação à seqüência ativadora específica à montante do promotor tipo  $\sigma^{54}$ ; porém não possuem o domínio N-terminal de regulação de resposta dependente de fosforilação comum nos membros de sua família, implicando que a atividade destas proteínas talvez não seja controlada por sinal (HUTCHESON *et al.*, 2001). No entanto, a expressão de *hrpRS* é baixa durante o crescimento em meio rico, e induzida em meio mínimo (RAHME, MINDRINOS, PANOPOULOS, 1992). O operon *hrpRS* também é induzido durante a infecção na planta; entretanto há controvérsias quanto ao nível de expressão na planta e em cultura, o que tem fomentado a hipótese de que diferentes mecanismos estejam envolvidos na regulação destes genes na planta e *in vitro* (RAHME, MINDRINOS, PANOPOULOS, 1992, XIAO *et al.*, 1992).

O mecanismo pelo qual HrpR/S regulam o promotor de *hrpL* não está bem estabelecido. Tem sido proposto que HrpR funciona como um ativador transcricional de *hrpS*. Foi demonstrado que HrpS sozinha é capaz de ativar o gene *hrpL* em *P. syringae* mas somente em baixo nível, sendo que a máxima indução de *hrpL* requer ambas HrpR e HrpS (BRETZ *et al.* 2002; GRIMM, AUFSATZ, PANOPOULOS, 1995; HUTCHESON *et al.* 2001). Resultados de HUTCHESON e colaboradores (2001), demonstram que HrpR/S interagem fisicamente formando um complexo

heteromérico, crucial para regular positivamente a expressão do promotor *hrpL* dependente de  $\sigma^{54}$  (fig.2).

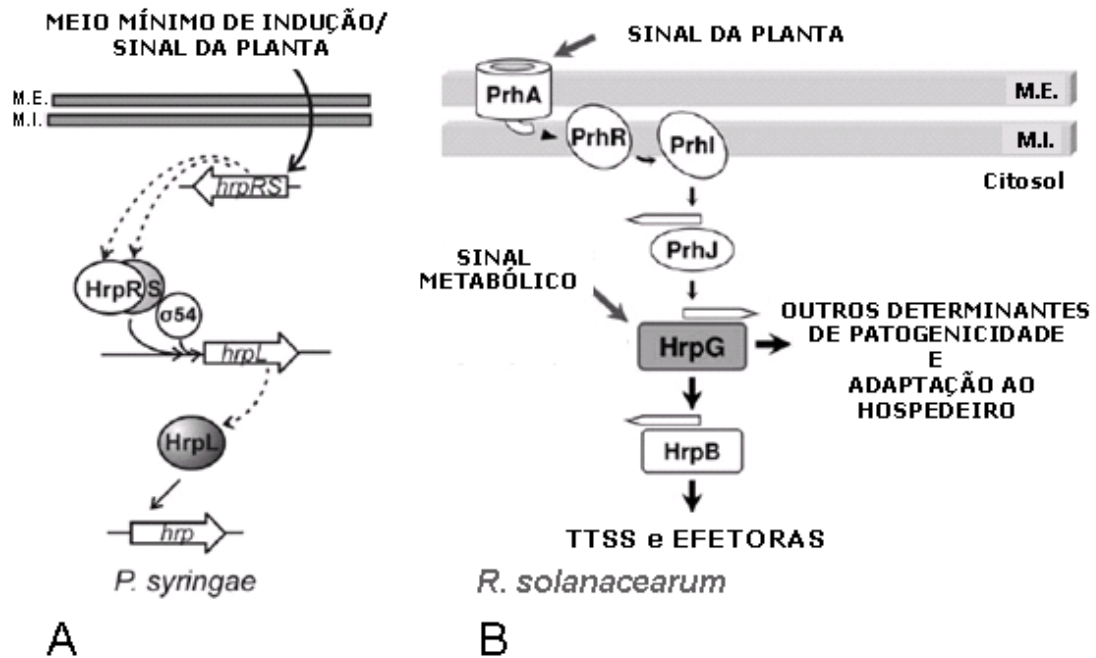
### 1.6.2 Regulação em *Ralstonia solanacearum*

Em *R. solanacearum* o componente chave da cascata regulatória é a proteína HrpG, um regulador de resposta de dois componentes da subfamília OmpR, cuja característica é a presença do domínio regulatório N-terminal que controla a atividade do domínio C-terminal de ligação ao DNA de maneira dependente de fosforilação (BOURRET, HESS, SIMONS, 1990; STOCK, STOCK, MOTTONEN, 1990). A transcrição do gene *hrpG* é aumentada em resposta ao contato direto da bactéria com células de planta (ALDON *et al.*, 2000). Contudo a atividade de HrpG é aumentada perceptivelmente em meio de cultura mínimo, por sinais metabólicos ainda desconhecidos (BRITO *et al.*, 1999). Em adição a estes sinais, a atividade de HrpG parece ser influenciada por uma regulação dependente da proteína de membrana PrhA. A proteína PrhA é a provável receptora de sinal da planta (MARENDA *et al.*, 1998) e transmite o sinal à PrhR, que em resposta ativa PrhI. PrhI induz a transcrição de *prhJ*, levando a expressão de *hrpG*. A proteína HrpG ativa a expressão do gene *hrpB*, um ativador transcricional da família AraC (proteína regulatória do operon de arabinose em *E. coli* – ENGLESBERG, WILCOX, 1974). HrpB ativa a transcrição de genes *hrp* e de outros genes localizados fora do cluster *hrp* cujos produtos de codificação são secretados via maquinaria do T3SS (GENIN *et al.*, 1992). Esta ativação ocorre pela ligação a sequências que são denominadas *hrpII* box (TTCG-N<sub>16</sub>-TTCG) (CUNNAC *et al.*, 2004).

Um segundo modelo de regulação em *R. solanacearum* foi proposto por VALLS, GENIN e BOUCHER (2006). Neste modelo, a regulação por HrpG é independente de HrpB, e envolve a transcrição de outros fatores, como genes para enzimas de degradação da parede celular vegetal, exopolissacarídeos, lectinas e fitormônios (fig.2). Este modelo estabelece uma co-regulação da expressão do T3SS e outros determinantes de virulência e colonização do hospedeiro.



FIGURA 2: MODELO DE REGULAÇÃO DOS GENES *hrp/hrc* DE *Pseudomonas syringae* E *Ralstonia solanacearum*.



(A) genes *hrp* do grupo I, representado por *Pseudomonas syringae*. Os genes *hrp* são ativados pelo membro da subfamília de fatores sigma de função extra-citoplasmática, HrpL. (B) Regulação dos genes *hrp* do grupo II, e de outros fatores de associação com o hospedeiro em *Ralstonia solanacearum*. As proteínas regulatórias HrpG e HrpB são as chaves principais da cascata regulatória.

FONTE: BRENCIC , WINANS (2005); VALLS, GENIN, BOUCHER (2006).

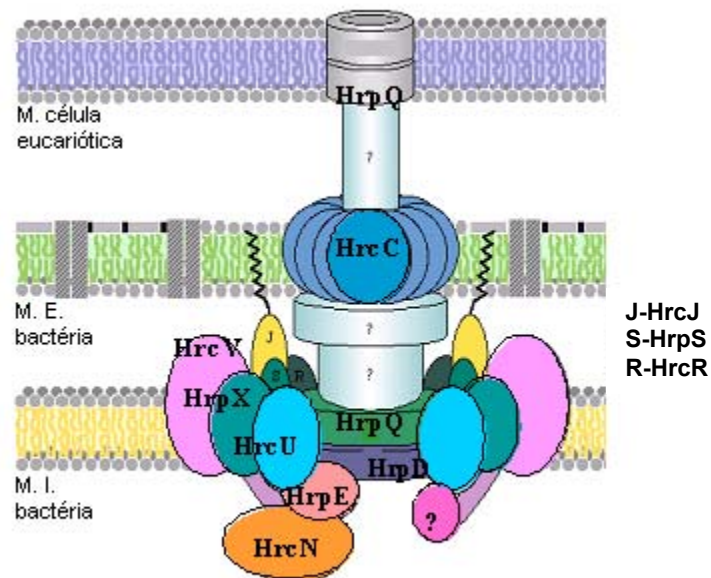
### 1.7 SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III EM *Herbaspirillum seropedicae*

A partir de dados do Programa de Sequenciamento Genômico de *Herbaspirillum seropedicae* (GENOPAR) foram identificados 14 genes *hrp/hrc* homólogos, perfazendo uma região de aproximadamente 28 kb do genoma da bactéria. Nesta ilha também foram identificados dois genes similares a *pil* (do aparato de secreção em bactérias patogênicas) e 15 ORFs hipotéticas consideradas conservadas. A figura 3 ilustra o arranjo hipotético das proteínas do aparato de secreção do tipo III de *Herbaspirillum seropedicae*, cuja configuração baseia-se na comparação dos genes encontrados em *Yersinia* spp. e em fitopatógenos. Dois genes, provavelmente envolvidos na regulação da transcrição desta ilha, foram identificados em *H. seropedicae*: *hrpL*, um provável fator sigma da RNA polimerase, presente nesta região genômica e *hrpG* que codifica para um provável regulador transcricional localizado fora desta ilha genômica. Isto sugere a possibilidade do sistema de regulação neste organismo ser um híbrido entre os Grupos I e II (ALFANO, COLLMER, 1997). Outro aspecto é a sugestão de que o “cluster” *hrp/hrc* tenha sido adquirido através de transferência horizontal múltipla (Programa GENOPAR; DEDECEK, 2006).

O “cluster” *hrp/hrc* de *H. seropedicae* apresenta uma organização de genes e operons parcialmente conservada comparada com os fitopatógenos representantes do grupo I (*Pseudomonas syringae*), grupo II (*Raltonia solanacearum*), simbioses (*Rhizobium* spp.) e patógenos de animais (*Yersinia* spp), conforme pode ser observado na figura 4. Esta semelhança pode apontar indícios de que em *H. seropedicae* estes genes formem também uma unidade de transcrição e que possam estar envolvidos no processo de interação entre *H. seropedicae* e a planta hospedeira.

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos genes *hrp* devido à sua importante função na secreção de proteínas essenciais na interação entre bactérias e suas células hospedeiras ou associativas. O estudo da regulação de expressão, estrutura, montagem e tráfego de moléculas do sistema de secreção do tipo III, em bactérias patogênicas e simbioses, tem sido um grande foco na pesquisa molecular e microbiológica nos últimos 10 anos. Contudo, em organismos que realizam interação associativa há poucos relatos na literatura sobre o funcionamento desse sistema. Na bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae*, a presença de genes

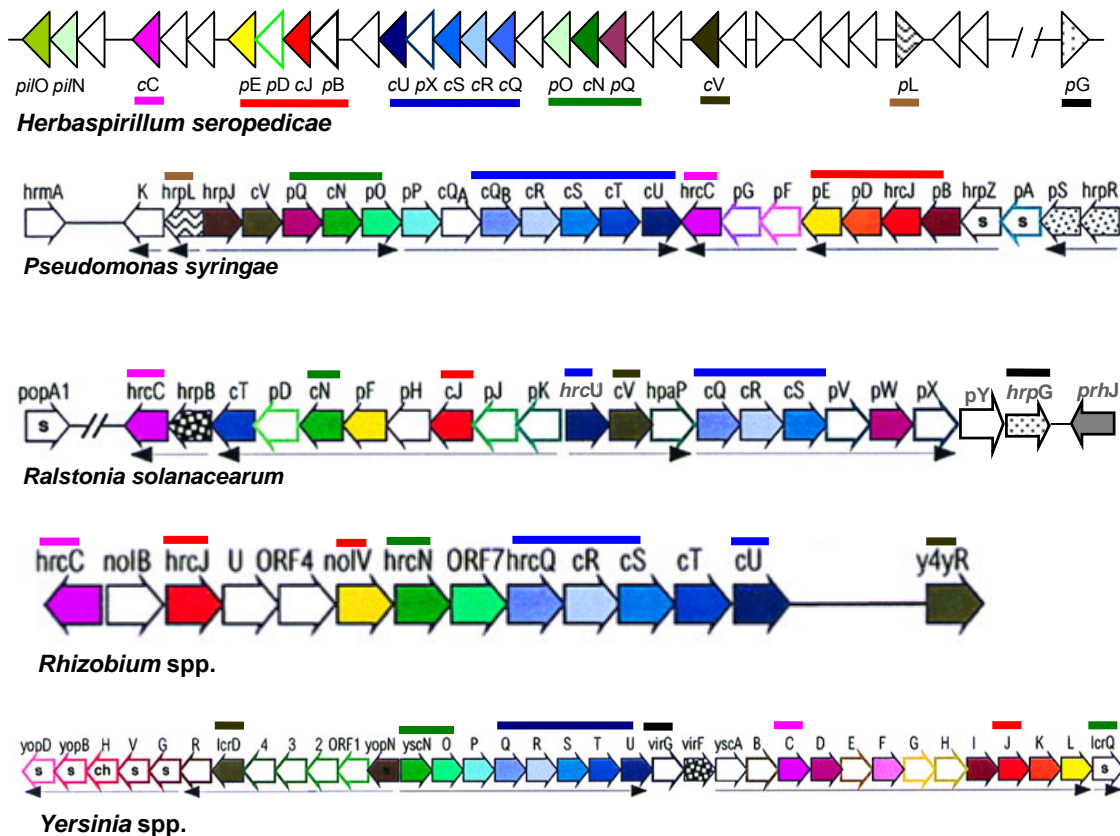
homólogos a *hrp/hrc* indica o provável envolvimento do T3SS na associação desta bactéria com seus hospedeiros. O estudo do funcionamento do T3SS de *H. seropedicae* poderá contribuir para o esclarecimento de aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos dessa interação.

FIGURA 3 - SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III EM *H. seropedicae*

Arranjo hipotético das proteínas do sistema Hrp/Hrc de *Herbaspirillum seropedicae* baseado em homologia com proteínas de *Yersinia* spp. e fitopatógenos. Adaptado de COG ("Cluster of Orthologous Groups of Proteins"), modelo modificado para *H. seropedicae*.

FONTE: MONTEIRO, R. A. (dados não publicados).

FIGURA 4 - COMPARAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DOS GENES *hrp/hrc* DE *H. seropedicae* E OUTROS MICRORGANISMOS.



Comparação da organização dos genes *hrp/hrc* de *Herbaspirillum seropedicae*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium spp.*, e *Yersinia spp.* As barras coloridas indicam a localização de alguns genes presentes nos quatro organismos.  
 FONTE: HUECK (1998); ALDON *et al.* (2000); DECECEK (2006)

## 2 OBJETIVOS

O sistema de secreção do tipo III possui importância já comprovada na interação entre bactérias e hospedeiros animais e vegetais, sendo responsável pela secreção de proteínas efetoras nas células eucarióticas (GALÁN, COLLMER, 1999; HUECK, 1998; CORNELIS, VAN GIJSEGEM, 2000). Em *H. seropedicae*, uma bactéria endofítica, o sistema de secreção do tipo III ainda não foi profundamente estudado, mas acredita-se possuir uma função similar aos já descritos, introduzindo moléculas efetoras nas células eucarióticas, permitindo a comunicação entre as duas células. Também, não se conhece o mecanismo de regulação da expressão do grupamento *hrp* de *H. seropedicae*. Assim, o principal objetivo deste trabalho é contribuir no esclarecimento deste sistema de secreção em *H. seropedicae*, analisando três proteínas envolvidas na estrutura do aparato de secreção ou na regulação da expressão dos genes: HrcV, HrcC e HrpG, através de:

- Clonagem dos genes *hrpG*, *hrcC* e *hrcV* de *Herbaspirillum seropedicae* em vetores de superexpressão;
- Superexpressão e purificação das proteínas HrpG e HrcV de *Herbaspirillum seropedicae*;
- Obtenção de anticorpos policlonais para as proteínas purificadas;
- Construção de fusão cromossomal do gene *hrpG* com o gene *lacZ*;
- Determinação da presença das proteínas indicadas em diversas condições de cultivo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 BACTÉRIAS

As bactérias que foram utilizadas estão descritas na tabela 2.

TABELA 2 - ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae* E *Escherichia coli*

Estirpe	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referências
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
SmR1	Z78 Sm <sup>r</sup> Nif <sup>+</sup>	SOUZA <i>et al.</i> , 1995
VShrpG	SmR1 contendo <i>hrpG::lacZ-Km<sup>R</sup></i>	Este trabalho
<i>Escherichia coli</i>		
BL21(λ DE3) pLysS	F <sup>-</sup> <i>hsdS gal (λclts 857 ind 1 Sam7 nin5 lacUV5 – T7 gene1</i>	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
BL21-AI	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm araB::T7RNAP-tetA</i>	INVITROGEN
C43(λ DE3) pLysS	Derivada da estirpe BL21(λ DE3), contém mutação que permite a expressão de proteínas tóxicas.	DUMON-SEIGNOVERT <i>et al.</i> , 2004
Origami (λ DE3) pLysS	Δ <i>ara-leu7697 araD139ΔlacX74 galE galK rpsL ΔphoAPvuII phoR</i> F <sup>+</sup> [ <i>lac<sup>+</sup>(lacI<sup>q</sup>)pro</i> ] <i>gor522::Tn10 (Tc<sup>r</sup>) trxB::kan (DE3) pLysS (Cm<sup>r</sup>)</i>	NOVAGEN
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> Φ80 <i>lacZ.M15.lacX74 recA1 araD139.(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	INVITROGEN
S17.1	Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Tra <sup>+</sup> <i>pro thi recA hsdR</i> , RP4-2 <i>kan::Tn7 tet::Mu</i> , integrado no cromossoma	SIMON, PRIEFFER e PUHLER, 1983
Tuner (λ DE3) pLacI	F <sup>+</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm lacY1 (DE3) pLacI (Cm<sup>r</sup>)</i>	NOVAGEN

### 3.2 PLASMÍDEOS

Os plasmídeos que foram utilizados neste trabalho estão descritos na tabela 3.

TABELA 3 – PLASMÍDEOS

Plasmídeos	Características	Fonte/Referência
pET28a	Vetor de expressão/ promotor T7. Gera proteína de fusão com His-Tag.Km <sup>r</sup> .	Novagen
pET28b	PET28a com subtração de um par de base na posição 198.	Novagen
pETBlue-2	Vetor de expressão/promotor T7.Gera proteína de fusão com His-Tag. Permite identificação de recombinantes por coloração. Amp <sup>r</sup>	Novagen
pVPET-hrpG	Km <sup>r</sup> (pET28a). Expressa proteína His-HrpG de <i>H. seropedicae</i> .	Este trabalho
pVPET-hrcV	Km <sup>r</sup> (pET28b). Expressa proteína His-HrcV de <i>H. seropedicae</i> .	Este trabalho
pVPET-hrcC	Km <sup>r</sup> (pET28b). Expressa proteína His-HrcC de <i>H. seropedicae</i> .	Este trabalho
pVBLUE-hrcV	Amp <sup>r</sup> (pETBlue-2). Expressa proteína His-HrcV de <i>H. seropedicae</i> .	Este trabalho
pVBLUE-hrcC	Amp <sup>r</sup> (pETBlue-2). Expressa proteína His-HrcC de <i>H. seropedicae</i> .	Este trabalho
pKOK6.1	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , contém o cassete <i>lacZ</i> -Km <sup>r</sup> sem promotor.	KOKOTEK e LOTZ, 1989
pUC19	<i>lacZ</i> , <i>lacI</i> , Amp <sup>r</sup>	INVITROGEN
pSUP202	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Mob	SIMON, PRIEFFER e PUHLER, 1983
pSUPhrpG	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , pSUP202 contendo um fragmento de 609 pb <i>Sall</i> / <i>SmaI</i> do gene <i>hrpG</i> obtido do clone do programa GENOPAR HS08-FP-00-000-012-F01.	Este trabalho
pSUPhrpG/ <i>lacZ</i> : :Km	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , pSUP202, pSUPhrpG contendo cassete Km <sup>r</sup> - <i>lacZ</i> do vetor pKOK6 clonado com a enzima <i>PstI</i> na posição 407 pb do gene <i>hrpG</i> .	Este trabalho

### 3.3 REAGENTES

Lisozima, o-nitrofenil β-D-galactopiranosídeo (ONPG), Tris base, glicerol, SDS, acrilamida, bis-acrilamida, persulfato de amônio, TEMED, e os antibióticos foram adquiridos da Sigma Chemical Company. Os géis de policrilamida foram preparados usando uma solução de acrilamida 30% (relação acrilamida:bisacrilamida 37,5:1) da Severn Biotech. Fenol, ágar e agarose foram adquiridos da Invitrogen (Life-Technologies). EDTA, NaCl, NaOH, etanol, metanol, ácido acético, isopropanol, clorofórmio e álcool isoamílico foram adquiridos da Merck



ou Reagen. As enzimas modificadoras de DNA e RNase foram adquiridas da GE Healthcare (GE– Healthcare), Gibco-BRL (Life-Technologies) ou New England Biolabs. Extrato de levedura, triptona e ágar bacteriológico foram adquiridos da Merck, Oxoid 48 ou Biobrás. Água ultrapura com resistividade  $\geq 18\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  foi obtida em sistema de purificação do tipo Mili-Q (Milliore). A esterelização da água foi realizada por autoclavação por 20 minutos a 1 atm. Os demais reagentes utilizados foram provenientes de diversas fontes, todos eram reagentes analíticos.

### 3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio líquido NFb-malato (KLASSEN et al., 1997) a 30 °C, sob agitação de 120 rpm. As culturas em meio sólido ou semi-sólido foram crescidas em NFb-malato sem agitação e incubadas em estufa a 30 °C.

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) (SAMBROOK et al., 1989) ou Terrific broth (TB) (SAMBROOK et al., 1989) sob agitação de 150 rpm ou em meio sólido LA, a 37 °C.

Para o preparo de células eletrocompetentes (item 3.13.1) *E. coli* estirpe DH10B foi cultivada em meio SOB a 37 °C sob agitação de 150 rpm. Após o choque elétrico, as células de *E. coli* foram mantidas em recuperação em meio SOC a 37 °C, sob agitação de 150 rpm.

#### 3.4.1 Composição dos meios de cultura

##### 3.4.1.1 Meio NFb-malato (KLASSEN et al., 1997)

O meio Meio NFb-malato (KLASSEN et al., 1997) tem a seguinte composição: 0,2 g/L  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g/L NaCl; 0,02 g/L  $\text{CaCl}_2$ ; 0,056 g/L Ácido nitrilo-triacético; 0,02 g/L  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5 g/L Ácido málico; 0,0002 g/L Biotina; 0,002 g/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,00235 g/L  $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,0028 g/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,00008 g/L  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,0002,4 g/L  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

Após o preparo, o meio foi autoclavado por 20 minutos a 120 °C a 1 atm. No momento do uso foram adicionados ao meio NFb-malato 50 mL/L de solução estéril de fosfatos (159,4 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 17,8 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ). Este meio foi denominado NFbHP-malato. Como fonte de nitrogênio foi utilizado  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2 mmol/L ou 20 mmol/L. O meio NFbHP-malato adicionado de 20 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  foi denominado NFbHPN-malato. As soluções de fosfatos e cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionadas frias ao meio no momento do uso.

Os meios sólido e semi-sólido foram obtidos pela adição de ágar ao meio líquido NFb-malato nas concentrações de 15 g/L e 1,5 g/L, respectivamente.

Para a verificação de expressão da proteína HrpG em *H. seropedicae*, foi acrescentado ao meio Nfb-malato, naringenina 50  $\mu\text{mol/L}$  ou extrato de cana-de-açúcar 5% (item 3.4.1.6). Foi utilizado também exsudato de milho como substituinte do meio NFb-malato (obtido conforme descrito no item item 3.4.1.6).

#### 3.4.1.2 Meio TB (*Terrific broth*) (SAMBROOK et al., 1989)

O meio TB tem a seguinte composição: 24,0 g/L extrato de levedura; 12,0 g/L triptona; 4,0 mL/L glicerol; 2,31 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 12,54 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

#### 3.4.1.3 Meio LB (*Luria Bertani*) (SAMBROOK et al., 1989)

O meio LB tem a seguinte composição: 5g/L extrato de levedura; 10g/L cloreto de sódio; 10g/L triptona.

O pH foi ajustado para 7,0 utilizando  $\text{NaOH}$  5mol/L. Para o preparo do meio sólido (LA) foi adicionado 1,5% (p/v) de ágar.

#### 3.4.1.4 Meio SOB (GIBCO – BRL - INVITROGEN)

O meio SOB tem a seguinte composição: 20 g/L Bacto triptona; 5 g/L Extrato de levedura; 0,5 g/L Cloreto de sódio; 0,186 g/L Cloreto de potássio; 2,4 g/L Sulfato de magnésio.

O pH foi ajustado para 7 com NaOH 2 mol/L. O meio SOC foi obtido com a adição de glucose 20 mmol/L ao meio SOB.

#### 3.4.1.5 Meio *Plant-Medium* (SAMBROOK et al, 1989)

O meio *Plant-Medium* tem a seguinte composição: 0,2g/L MgCl<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1g/L NaCl; 0,026g/L CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,00164g/L Fe-EDTA; 1,5g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5g/L Malato; 0,001g/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,001175g/L MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,0014g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,00004 g/L CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 0,00012g/L ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

#### 3.4.1.6 *Exsudato de milho e extrato de cana-de-açúcar*

Para o preparo do exsudato, 10 sementes de milho foram esterelizadas em fluxo laminar com solução de hipoclorito 1% e Tween 20 a 0,5%, seguido de adição de etanol 70% por 20 minutos. Após, as sementes foram lavadas com água ultrapura. As sementes foram então germinadas em placa de petri contendo papel filtro estéril e umedecido em meio *Plant-Medium* (SAMBROOK *et al.*, 1989). Após 2 dias as radículas foram submergidas em 60 mililitros de meio NFb-malato por 24 horas. Após o preparo, o exsudato obtido foi esterelizado em filtro (TPP 0,2µm) e armazenado em freezer. No momento do uso foram adicionados ao exsudato de milho 50 mL/L de solução estéril de fosfatos (159,4 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 17,8 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e fonte de nitrogênio NH<sub>4</sub>Cl 2 mmol/L ou 20 mmol/L, previamente autoclavados.

O extrato de cana-de-açúcar foi obtido por trituração do colmo de cana-de-açúcar. O extrato foi centrifugado a 2500 xg por 5 minutos, e o sobrenadante foi esterelizado em filtro (TPP 0,2µm) para ser adicionado ao meio NFb-malato em determinadas condições.

### 3.4.2 Antibióticos

As concentrações utilizadas de antibióticos estão listadas na tabela 4.

TABELA 4 – ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Abreviatura	Concentração final ( $\mu\text{g/mL}$ )
Ampicilina	(Amp)	250 <sup>a</sup>
Tetraciclina	(Tc)	10 <sup>a, b</sup>
Canamicina	(Km)	100 <sup>a</sup> , 500 <sup>b</sup>
Estreptomicina	(Sm)	20 <sup>a</sup> , 80 <sup>b</sup>
Cloranfenicol	(Cm)	30 <sup>a</sup>
Ácido Nalidíxico	(Nal)	10 <sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> *Escherichia coli*

<sup>b</sup> *Herbaspirillum seropedicae*

As soluções estoques dos antibióticos ampicilina, ácido nalidíxico e canamicina foram preparadas em água ultrapura, esterilizadas por filtração (Millipore HAWP 0,22  $\mu\text{m}$ ) e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As soluções estoque de tetraciclina e cloranfenicol foram preparadas em etanol, e igualmente armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  ao abrigo da luz.

### 3.4.3 Manutenção de estirpes bacterianas

As estirpes de *E. coli* foram mantidas em suspensão em solução de glicerol 50% a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As estirpes de *H. seropedicae* foram mantidas também em glicerol 50% a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou à temperatura ambiente em meio NFbHP-malato semi-sólido contendo 20 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

## 3.5 PURIFICAÇÃO DO DNA TOTAL DE *Herbaspirillum seropedicae*

A purificação do DNA total de *H. seropedicae* foi feita segundo SOUZA (1990), com modificações. Cinquenta mililitros de cultura saturada de *H. seropedicae* crescida em meio NFbHP-malato adicionado de 20 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e dos antibióticos adequados foram centrifugados a  $2.500\times g$  por 10 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . As células foram lavadas com 30 mL do tampão TES pH 8,0 (Tris-HCl 50 mmol/L, EDTA 20 mmol/L, NaCl 200 mmol/L) e ressuspensas em 20 mL do mesmo. As células

foram incubadas com lisozima (100 µg/mL) a 30°C, durante 1 hora e lisadas pela adição de 1% do detergente SDS e incubação a 55 °C por 10 minutos. A degradação das proteínas foi feita adicionando-se proteinase K (50 µg/mL) seguida de incubação a 50°C por 1 hora. A mistura foi extraída duas vezes com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e uma vez com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após a extração, o DNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 100 µL de água ultrapura.

### 3.6 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

O isolamento de plasmídeos de *E. coli* baseou-se no método da lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989), com modificações.

Cinco mililitros de cultura saturada de *E. coli* contendo o plasmídeo de interesse, crescida em meio LB adicionado dos antibióticos adequados foram transferidos para tubos plásticos de 1,5 mL. As células foram coletadas por centrifugação (13.000 xg, 1 minuto) e ressuspensas em 150 µL de solução GET que contém Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8,0; glucose 50 mmol/L e EDTA 10 mmol/L. A lise celular foi obtida com a adição de 150 µL de uma solução de lise que contém NaOH 0,2 mol/L e SDS 1% (m/v). As proteínas, o DNA cromossômico, os restos celulares e o SDS foram precipitados pela adição de 150 µL de acetato de potássio 3 mol/L pH 4,8 e incubação por 10 minutos em gelo. As amostras foram, então, centrifugadas (13.000 xg, 5 minutos) e o sobrenadante foi extraído com 100 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). O DNA plasmidial foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 70%, seco a vácuo e dissolvido em 30 µL de água ultrapura. O DNA purificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

### 3.7 AMPLIFICAÇÃO DE DNA

A amplificação de DNA foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) como descrito por KOCHER, WILSON (1991) em termociclador Gene Amp® PCR system 9700 (Applied Biosystems). Os oligonucleotídeos

iniciadores (“primers”) utilizados foram sintetizados pela Invitrogen. Para a maioria das reações de amplificação foram utilizados: tampão da Taq DNA polimerase 1X (MGM), 0,2 mmol/L dNTPs, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0,75 µL de DMSO, 1-10 ng de DNA genômico purificado (molde) e 2 U de Taq DNA polimerase (MGM) em um volume final de reação de 25µL. Algumas reações de PCR foram realizadas usando-se a enzima *Pfu* (Stratagene) ou Platinum<sup>®</sup> *Pfx* DNA Polimerase (Invitrogen), devido às suas capacidades revisoras 3′→5′, seguindo especificações do fabricante. *Pfu* foi utilizada para a amplificação do gene *hrpG*, enquanto que Platinum<sup>®</sup> *Pfx* foi utilizada para obtenção de resultados em 4.11 (pág. 92). Os parâmetros de ciclos de amplificação variaram conforme os oligonucleotídeos utilizados. Alternativamente, colônias isoladas ou culturas de células foram submetidas à fervura e usadas como DNA molde nas reações de PCR.

### 3.8 ELETROFORESE DE DNA

Esta metodologia foi utilizada para determinar o tamanho de fragmentos de DNA ou com a finalidade de purificação de fragmentos para clonagem.

Para eletroforese foram utilizados géis de ágar (1%), agarose (0,7 a 1%) ou agarose de baixo ponto de fusão (0,7 a 1%) em tampão TAE (Tris base 40 mmol/L, ácido acético 40 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, pH 8,0) em sistema de eletroforese horizontal da Hoeffer. As amostras foram diluídas em Fsuds (Tris-HCl 65 mmol/L pH 8,0, EDTA 1,75 mmol/L, Ficoll<sup>®</sup> 10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,02%) e aplicadas no gel. A voltagem e o tempo de corrida variaram de acordo com a amostra analisada.

Após eletroforese, os géis de ágar ou agarose foram corados com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL). O DNA foi visualizado sob luz ultravioleta (312 nm) em transiluminador EC3 System - UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CAUSA). O registro das imagens foi feito em papel térmico Sony (Video printer GraficUP860CE). Os géis de agarose de baixo ponto de fusão foram corados com azul de metileno 0,01% por 2 minutos sob agitação e descorados com água ultrapura até a visualização do DNA.

### 3.9 EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSÃO

Para a obtenção de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose de baixo ponto de fusão, foi realizado o procedimento descrito por BANKIER *et al.* (1987).

Após eletroforese o gel foi corado com azul de metileno 0,01%, lavado com água ultrapura e as bandas de DNA foram visualizadas em um transiluminador. A banda de interesse foi recortada e colocada em um tubo plástico de 1,5 mL. O gel foi fundido à temperatura de 65 °C e teve seu volume determinado. Após, foram adicionados 250 mmol/L de NaCl, 100 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0 e 1 mmol/L de EDTA (concentração final). Esta mistura foi aquecida novamente a 65 °C para a manutenção da agarose no estado líquido, sendo então adicionado 1 volume de fenol equilibrado (pH 8,0) para extração. A mistura foi agitada em “Vortex” e posteriormente centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e extraída com 1 volume de clorofórmio. A fase aquosa foi novamente transferida para outro tubo, e o DNA precipitado com a adição de 1 volume de isopropanol, em banho de gelo por 15 minutos. Após precipitação o DNA foi sedimentado por centrifugação a 13.000 rpm por mais 15 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 80%, seco e ressuspenso em água ultrapura.

### 3.10 DIGESTÃO DE DNA POR ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Para a digestão de DNA com enzimas de restrição foram utilizadas as condições especificadas pelo fabricante ou por SAMBROOK e colaboradores (1989). Uma unidade das diferentes enzimas de restrição foi utilizada para digestão de 0,2 – 1 µg de DNA em um volume de 20 µL durante 4 horas na presença do tampão recomendado e temperatura adequada para a enzima. As endonucleases foram extraídas com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), ou inativadas por calor.

### 3.11 PREPARO DOS VETORES

Os plasmídeos vetores foram submetidos à clivagem com as enzimas de restrição adequadas. Após a restrição, as enzimas foram desnaturadas por tratamento térmico, conforme instruções do fabricante, ou por extração com um volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). O DNA extraído foi precipitado com etanol absoluto, lavado, seco e dissolvido em água ultrapura (SAMBROOK *et al.*, 1989).

### 3.12 LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA NOS VETORES

O vetor linearizado (item 3.11) foi ligado ao inserto numa razão molar de aproximadamente 1:5. Para a ligação foram adicionados tampão de ligação, 1 U de T4 DNA ligase (Fermentas) e o sistema foi incubado a 16°C durante a noite. A mistura vetor-inserto foi aquecida a 50 °C por 1 minutos e resfriada em gelo antes da adição do tampão e da enzima (SAMBROOK *et al.*, 1989).

### 3.13 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

#### **3.13.1 Preparo de células de *E. coli* eletrocompetentes**

O preparo de células eletrocompetentes foi realizado com base em DOWER *et al.* (1988) e HANAHAN (1983).



Culturas saturadas de dois e meio mililitros de *E. coli* foram inoculadas em 250 mililitros de meio LB. A cultura foi cultivada sob agitação até D.O.<sub>600</sub> 0,5 a 1,0. As células foram coletadas por centrifugação a 2.500 xg por 5 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com água ultrapura gelada. Em seguida, foram lavadas com glicerol 15% gelado, centrifugadas novamente a 2.500 xg por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão, as células foram ressuspensas em 350 µL de glicerol 15%, separadas em alíquotas e estocadas em freezer a -70 °C.

### 3.13.2 Transformação bacteriana

O método utilizado foi indicado pelo fabricante do eletroporador (GIBCO-BRL). Meio a três microlitros (5 ng - 0,5 µg) da solução de DNA a ser eletroporada foram adicionados em 30 µL de células eletrocompetentes. A suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação e submetida a um campo elétrico (4KΩ, 330µF) para induzir a entrada do DNA na bactéria.

Após o choque elétrico, as células de *E. coli* foram transferidas para 1mL do meio SOC e mantidas em recuperação a 37°C, sob agitação de 150 rpm, por uma hora. A suspensão de bactérias foi plaqueada em meio sólido LA contendo os antibióticos adequados.

### 3.14 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS POR CONJUGAÇÃO

A transferência de plasmídeos por conjugação foi realizada segundo NOINDORF (2006). Os plasmídeos a serem transferidos para as estirpes de *H. seropedicae* foram mantidos em *E. coli* S17.1 (*tra*<sup>+</sup>). As estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas nos meios NFbHPN-malato e LB, respectivamente, na ausência de antibióticos, até uma D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 0,7. Em seguida, foram misturados 50 µL da cultura de *H. seropedicae* com 5 µL da cultura de *E. coli* e as células foram plaqueadas como uma gota em meio LA/NFbHPN-malato (1:3) contendo os antibióticos Sm e Nal, e incubadas a 30 °C durante 20 horas. A massa de células foi raspada, suspensa em 1 mL de NFb-

malato e plaqueada em meio NFbHP-malato acrescido de 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl e contendo os antibióticos adequados.

### 3.15 ANÁLISE DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

A seleção e análise dos plasmídeos recombinantes construídos foi realizada por seleção das colônias crescidas na presença de antibióticos, reação em cadeia da polimerase (PCR, descrita no item 3.7), digestão com enzimas de restrição (item 3.10) e sequenciamento (item 3.16). A seleção dos plasmídeos recombinantes construídos no vetor pETBlue-2 foi realizada por coloração em meio contendo X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) devido a inativação do gene *lacZ*.

### 3.16 SEQUENCIAMENTO DE DNA

#### 3.16.1 Purificação de DNA dupla fita para sequenciamento

A purificação de DNA plasmidial para posterior sequenciamento foi realizada basicamente como no item 3.6. Depois de dissolvido em água, o DNA foi incubado com RNase (concentração final de 10 µg/mL) por 3 horas a 37°C. Foi feita a extração com clorofórmio-álcool isoamílico, o DNA foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 80%, seco e dissolvido em aproximadamente 10 µL de água ultrapura.

Alternativamente, para o seqüenciamento de produto de PCR, a purificação foi realizada da seguinte maneira. O produto de PCR foi incubado com exonuclease I (Fermentas) na concentração final de 3,3 U para clivagem dos oligonucleotídeos, e SAP - "Shirimp Alkaline Phosphatase"- (USB) na concentração final de 0,66 U para defosfatização dos dNTPs restantes da reação de PCR. A reação foi realizada a 37 °C durante 1 hora e meia, conforme recomendação dos fabricantes, seguida de inativação das enzimas a 80 °C durante 20 minutos.

### 3.16.2 Reação de sequenciamento

O procedimento foi baseado na incorporação de dideoxynucleotídeos marcados com fluoróforos (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977). Nesta reação, para um volume final de 8  $\mu\text{L}$ , foram utilizados aproximadamente 0,5  $\mu\text{g}$  do DNA purificado, 2 pmols do oligonucleotídeo iniciador apropriado e 3,0  $\mu\text{L}$  de mistura para sequenciamento Sequencing Reagent Premix (DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, GE Healthcare). Os parâmetros no termociclador foram: 1 ciclo de 1 minuto a 95 °C seguido de 35 ciclos de 20 segundos a 94 °C e 1,5 minutos a 60 °C.

### 3.16.3 Tratamento da amostra após reação de sequenciamento

O produto da reação de sequenciamento foi precipitado com 2 volumes de isopropanol, lavado com etanol 80% e seco. O produto foi dissolvido em 4 $\mu\text{L}$  de Formamide Loading Dye (Applied Biosystems), desnaturado por 2 minutos a 96 °C e submetido à eletroforese em sequenciador automático da ABI-PRISM 377 (Applied Biosystems).

Os dados obtidos a partir do sequenciamento foram analisados com o programa BioEdit v.7 (HALL, 1999). As seqüências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados GENOPAR.

## 3.17 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES pVPET-HrpG, pVBLUE-HrcV, pVPET-HrcV, pVBLUE-HrcC E pVPET-HrcC

Os genes *hrpG*, *hrcV* e *hrcC* de *H. seropedicae* foram amplificados por PCR (item 3.7) utilizando oligonucleotídeos sintetizados quimicamente. As seqüências destes oligonucleotídeos foram baseadas em seqüências depositadas no Banco de Dados do Programa Genopar – [www.genopar.org](http://www.genopar.org). Para facilitar a clonagem dos produtos de PCR nos vetores de expressão, foram inseridos sítios de restrição para as enzimas *NdeI*, *EcoRI* ou *BamHI* nos “primers” complementares à região 5' de *hrpG*, *hrcC* e *hrcV*, respectivamente, e sítios para as enzimas *BamHI* ou

*Xho*I nos “primers” complementares à região 3' de *hrpG* e *hrcC/hrcV*, respectivamente. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados estão indicadas abaixo e os sítios de restrição inseridos são mostrados em destaque.

Nome do “primer”	seqüência
<i>hrpG</i> 5'	5' TGTCAG <u>CATATG</u> AACATCGCCTGT 3'
<i>hrpG</i> 3'	5' CAGC <u>GGATCC</u> GTCAGCTTTGATTGGC 3'
<i>hrcC</i> 5'	5' CAACG <u>GAATTC</u> CATCATGAACGCGCGTG 3'
<i>hrcC</i> 3'	5' CGGTT <u>CTCGAG</u> TTGAGGAAATATTTTTC 3'
<i>hrcV</i> 5'	5' CACAG <u>GGATCC</u> CGCCATGAAAGCCATG 3'
<i>hrcV</i> 3'	5' CGCAG <u>CTCGAG</u> CACCTCGATCATCCC 3'

Os parâmetros do termociclador para amplificação da região codificadora do gene *hrpG* foram: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C para a abertura inicial da dupla fita de DNA; 35 ciclos de 20 segundos a 94°C para a abertura das fitas, 20 segundos a 55°C para o anelamento dos oligonucleotídeos com a fita de DNA, e 2 minutos e meio a 72°C para a extensão da fita nascente. O produto de PCR foi extraído com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), precipitado com etanol, seco em bomba de vácuo e ressuspenso em água ultrapura. O produto de PCR foi digerido com as enzimas de restrição *Nde*I e *Bam*HI e ligado ao vetor pET28a digerido com as mesmas enzimas (itens 4.9, 4.10, 4.11). O plasmídeo originado, denominado de pVPET-*hrpG*, foi transformado em *E. coli* estirpe DH10B. A seleção de colônias contendo os plasmídeos recombinantes foi feita em meio LA contendo canamicina. A análise do plasmídeo recombinante foi realizada por meio de digestão com as enzimas *Hind*III e *Xba*I. O gene *hrpG* clonado foi sequenciado utilizando os oligonucleotídeos que flanqueiam o sítio de policlonagem do vetor pET28a para verificar sua integridade.

O gene *hrcV* foi amplificado com os mesmos parâmetros de termociclador que descrito para o gene *hrpG*. O produto amplificado foi purificado de forma semelhante e posteriormente digerido com as enzimas de restrição *HindIII* e *XhoI* para ligação aos vetores pETBLUE e pET28b. Os plasmídeos recombinantes foram denominados pVBLUE-*hrcV* e pVPET-*hrcV*, respectivamente. Após transformação em *E.coli* estirpe DH10B, foi feita a seleção de colônias contendo pVBLUE-*hrcV* em meio LA adicionado de X-gal e ampicilina; e a seleção de colônias contendo pVPET-*hrcV* foi feita em meio LA adicionado de canamicina. A análise dos plasmídeos recombinantes foi realizada por meio de digestão com as mesmas enzimas utilizadas na construção. O inserto foi seqüenciado para verificar a integridade do gene.

A construção do plasmídeo recombinante contendo a sequência do gene *hrcC* foi feita como descrita para o gene *hrcV*, com a utilização dos vetores de expressão pETBLUE e pET28b, excetuando que na reação de PCR a temperatura de anelamento utilizada foi 50°C. As enzimas de restrição utilizadas para digestão do fragmento obtido e dos vetores foram *EcoRI* e *XhoI*. Após a ligação do inserto aos vetores, foram obtidos os plasmídeos recombinantes denominados pVBLUE-*hrcC* e pVPET-*hrcC*. A seleção e análise dos clones foram feitas como descrito acima para o gene *hrcV*.

### 3.18 SUPEREXPRESSION DAS PROTEÍNAS HrpG, HrcV E HrcC DE *H. seropedicae* EM *E. coli*

A superexpressão das proteínas HrpG, HrcV e HrcC de *H. seropedicae* foi realizada em células de *E. coli*, contendo plasmídeos pVPET-*hrpG*, pVBLUE-*hrcV*, pVBLUE-*hrcC*, pVPET-*hrcV* ou pVPET-*hrcC*. Para análise de expressão em pequena escala, dez mililitros de meio LB foram inoculados na proporção de 1/100 com uma cultura crescida durante a noite. As células foram cultivadas a 37 °C sob agitação até DO<sub>600</sub> de 0,5. Neste momento foi adicionado IPTG 0,1 mM ou lactose 0,5% e a cultura foi incubada a 30 °C, 37 °C ou 20 °C, de 2,5h a 16h sob agitação de 120 rpm. A cultura foi centrifugada a 2.500 xg por 5 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de lise (50 mmol/L Tris-HCl pH 8, 500 mmol/L NaCl, 10% glicerol) e lisadas por sonicação (Ultrasonic Processor XL Heat Systems) com 6 ciclos de 15 segundos e 1 minuto de intervalo no gelo. Após a lise celular, o

extrato foi centrifugado a 30.000 xg por 30 minutos a 4 °C para a separação das frações solúvel e insolúvel. As proteínas presentes nessas frações foram analisadas por eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS–PAGE) como descrito por LAEMMLI (1970). As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

### 3.19 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-HrpG DE *H. seropedicae*

A proteína HrpG de *Herbaspirillum seropedicae* foi purificada na forma solúvel e insolúvel, ambas contendo a fusão de seis resíduos de histidina na porção N-terminal (His-HrpG). Para purificação da proteína His-HrpG na forma solúvel, duzentos mililitros de uma cultura de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) pLysS transformada com o plasmídeo pVPET-hrpG foi induzida com lactose 0,5% e crescida a 20°C por 16 horas, sob agitação de 120rpm. A cultura foi centrifugada a 2.500 xg por 5 minutos a 4°C para remoção do meio de cultura. As células contendo os plasmídeos para superexpressão foram ressuspensas em 5mL de tampão de lise (50 mmol/L Tris-HCl pH 8, 500 mmol/L NaCl, 10% glicerol). As células foram lisadas em “prensa francesa” a 15000psi. Após a lise celular o extrato foi centrifugado a 30.000 xg por 30 minutos para a separação das frações solúvel e insolúvel. A fração solúvel de proteínas foi purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna de 1mL HiTrap-Chelating-Ni<sup>2+</sup> (GE Healthcare) acoplada a uma bomba peristáltica. A coluna HiTrap foi carregada com NiCl<sub>2</sub> como descrito pelo fabricante. A coluna foi equilibrada com 5mL de tampão de lise (50 mmol/L Tris-HCl pH 8, 500 mmol/L NaCl, 10% glicerol), em seguida 5mL de extrato livre de células contendo a proteína HrpG expressa de forma solúvel e diluída em tampão de lise foram aplicados na coluna. A coluna foi lavada com 10 volumes de tampão TP1 (50 mmol/L Tris-HCl pH 6,8, 500 mmol/L NaCl, 10% glicerol), seguido de tampão TP2 (TP1 contendo 10 mmol/L imidazol). A eluição da proteína de fusão foi feita em tampão TP3 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 100 mmol/L NaCl, 10% glicerol) e concentração crescente de imidazol 50, 100, 300 ou 500 mmol/L. Após a coleta de frações de 1mL, as proteínas foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), como descrita no item 3.21. As frações de interesse foram dialisadas contra tampão contendo 50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 50% glicerol, e armazenadas a -70 °C. Todas as etapas da purificação foram realizadas a 4° C.

A fração insolúvel da proteína HrpG foi solubilizada com tampão de lise contendo uréia 5 mol/L, e purificada com os mesmos tampões descritos anteriormente, com adição de uréia 5 mol/L. Após purificação as frações de interesse foram agrupadas para serem utilizadas na produção de anticorpo anti-HrpG.

### 3.20 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-HrcV DE *H. seropedicae*

A proteína HrcV de *Herbaspirillum seropedicae* contendo sequências His-tag na porção N-terminal e C-terminal (His-HrcV) foi purificada em um único passo cromatográfico em coluna de afinidade ao níquel HiTrap-Chelating-Ni<sup>+2</sup>. Para purificação, oitocentos mililitros de uma cultura de *E. coli* BL21(λDE3) pLysS transformada com o plasmídeo pVPET-hrcV foi induzida com IPTG 0,1 mM a 30 °C durante 5 horas. A cultura foi centrifugada a 2500g por 5 minutos a 4 °C para remoção do meio de cultura. As células foram ressuspensas em 20 mL de tampão de lise (50 mmol/L Tris-HCl pH 8, 500 mmol/L NaCl, 10% glicerol) contendo 0,1% Tween 20. A lise celular foi realizada em “prensa francesa” a 15000psi. Após a lise o extrato foi centrifugado a 30.000 xg por 30 minutos para a separação das frações solúvel e insolúvel. A fração solúvel de proteínas foi aplicada na coluna de afinidade Hi-Trap Chelating Ni<sup>+2</sup> de 1 mL. A coluna foi carregada com NiCl<sub>2</sub> como descrito pelo fabricante. A coluna foi equilibrada com 5 mL de tampão de lise para HrcV (50 mmol/L Tris-HCl pH 8, 500 mmol/L NaCl, 10% glicerol) contendo 1% Tween 20. Em seguida, 20 mL de fração solúvel diluída em tampão de lise para HrcV foram aplicados na coluna. A coluna foi lavada com 10 volumes de tampão TP1 (50 mmol/L Tris-HCl pH 6,8, 500 mmol/L NaCl, 10% glicerol, 0,1% Tween 20), seguido de tampão TP2 (TP1 contendo 10 mmol/L imidazol). A eluição da proteína de fusão foi feita em tampão TP3 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 100 mmol/L NaCl, 10% glicerol, 0,1% Tween 20) e aumento de concentração de imidazol 50, 100, 300 ou 500 mmol/L. Após a coleta de frações de 1 mL, as proteínas foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). As frações foram armazenadas a -70 °C. Todas as etapas da purificação foram realizadas a 4 °C.

### 3.21 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)

As condições de eletroforese desnaturante foram realizadas segundo a metodologia descrita por LAEMMLI (1970). A concentração do gel de corrida variou de acordo com a massa molecular da proteína a ser analisada, sendo de 12,5% para as análises da proteína HrpG, e 7,5% para as análises de HrcV e HrcC.

As soluções estoque utilizadas estão descritas na tabela abaixo:

TABELA 5 – SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE DESNATURANTE

<b>Acrilamida</b>	30% Acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 37,5:1)	Armazenada a 4 °C
<b>Solução 2</b>	1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,3% SDS	Armazenada a 4 °C
<b>Solução 3</b>	0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4% SDS	Armazenada a 4 °C
<b>10% PA</b>	Persulfato de amônio 10% v/v em água	Armazenada a 4 °C
<b>Tampão de amostra</b>	2% SDS, 10% glicerol; 0,01% azul de bromofenol; 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8; 5% β-mercaptoetanol (adicionado no momento do uso)	Armazenada a 4 °C
<b>Tampão de corrida (10X)</b>	30 g Tris-base; 140 g Glicina; 10g SDS por litro	Armazenado a temperatura ambiente

Os volumes das soluções estoque utilizadas para preparar os géis de empilhamento estão descritas na tabela abaixo:

TABELA 6 – SOLUÇÕES PARA O PREPARO DO GEL DE EMPILHAMENTO

<b>Solução</b>	<b>Volume para 1 gel</b>
<b>Acrilamida</b>	0,375 mL
<b>Solução 3</b>	0,625 mL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,5 mL
<b>10% PA</b>	25 µL
<b>TEMED</b>	2,5 µL

Os volumes das soluções estoque utilizadas para preparar os géis de separação estão descritas na tabela abaixo:



TABELA 7 – VOLUMES DAS SOLUÇÕES PARA O PREPARO DO GEL DE SEPARAÇÃO

Componente	7,5% (1 gel)	10% (1 gel)	12,5% (1 gel)	15% (1 gel)
Acrilamida	1,25 mL	1,63 mL	2,05 mL	2,5 mL
Solução 2	1,25 mL	1,25 mL	1,25 mL	1,25 mL
H <sub>2</sub> O	2,5 mL	2,13	1,7 mL	1,25 mL
10% PA	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL

As eletroforeses foram realizadas em géis em placas, utilizando o sistema vertical MiniProtean (Biorad). As corridas foram realizadas a 100-200V em tampão de corrida 1X por 1 a 2 horas. Após a corrida o gel foi corado com Coomassie blue R250 0,1% em 10% de ácido acético e 40% de etanol e descorados em solução contendo 10% de ácido acético e 40% de etanol, ou transferido para membranas (“immunoblotting”) dependendo do ensaio.

### 3.22 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS HrpG E HrcV SUPEREXPRESSAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

#### 3.22.1 Retirada de proteínas dos géis de poliacrilamida

As proteínas de interesse submetidas à eletroforese SDS-PAGE foram retiradas dos géis de poliacrilamida para posterior análise por espectrometria de massa. A retirada foi feita com auxílio de uma ponteira de 1000 µL, estéril, com a ponta cortada, ou com auxílio de estilete novo. As tiras contendo as proteínas de interesse foram armazenadas em tubos de 1,5 mL em congelador a -70 °C até o momento da análise.

#### 3.22.2 Preparo das amostras para análise espectrométrica

O preparo das amostras para análise por MALDI-Tof foi feito conforme CHAVES (2004), com modificações.

Fragmentos de gel contendo as proteínas de interesse foram transferidos para tubos de 500  $\mu\text{L}$ , onde foi adicionado 30  $\mu\text{L}$  de solução 25 mmol/L de bicarbonato de amônio e 50% acetonitrila (ACN). A suspensão foi agitada em vórtex e deixada em repouso durante 10 minutos. Este procedimento foi repetido até total descoloração do gel.

A desidratação dos fragmentos de géis foram feitas com 3 lavagens de 25  $\mu\text{L}$  de acetonitrila 100% e em seguida os fragmentos de géis foram secos em sistema de centrifugação a vácuo durante 25 minutos a 30 °C.

A reidratação foi feita com 15  $\mu\text{L}$  de solução de tripsina gelada (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em tampão 50 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0). O gel foi coberto com tampão bicarbonato de amônio 40 mmol/L pH 8,0 e acetonitrila 10%. A solução contendo enzima e gel foi incubada a 37 °C por 12 horas, e após este período a solução com enzima foi removida. Para extração dos peptídeos, produtos da digestão com tripsina, foi adicionado 30 $\mu\text{L}$  de acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 5% (TFA) às amostras, que foram incubadas em banho de ultrassom (THORNTON T4) por 10 minutos. A solução sobrenadante contendo os peptídeos foi coletada e o procedimento de extração foi repetido 2 vezes. Após esse período a solução foi evaporada em sistema à vácuo a 30°C, em seguida os peptídeos foram resuspendidos em 2  $\mu\text{L}$  de TFA 0,1%. Uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$  de peptídeos diluídos em TFA foi adicionada à 1  $\mu\text{L}$  de matriz HCCA (5mg Ácido ciano-4-hidroxicinamínico/mL de solução ACN 5% e TFA 1/1) da Bruker Daltonics. Desta solução, 1  $\mu\text{L}$  foi aplicado na placa adequada à espectrometria de massa (MTP 384 massive MS target T da Bruker) onde os peptídeos se cristalizam junto com a matriz pela evaporação da solução. Alternativamente, para purificar a amostra, os peptídeos foram passados em uma ponteira contendo uma coluna cromatográfica de fase reversa "PerfectPure C-18 Tip" da Eppendorf. Inicialmente, essa ponteira foi pré-umidificada duas vezes com 10  $\mu\text{l}$  de 50% ACN, 0,1% TFA e equilibrada duas vezes com 10  $\mu\text{l}$  de 0,1% TFA. Em seguida, a amostra foi aspirada e expelida pelo menos cinco vezes. Lavou-se a ponteira por duas vezes com 0,1% TFA para retirar contaminantes da amostra. Os peptídeos foram eluídos da coluna em 2  $\mu\text{l}$  de 50% ACN, 0,1% TFA saturada com matriz HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxiamínico) da Bruker Daltonics, pela sucção da solução por pelo menos três vezes. A solução com os peptídeos foi dispensada diretamente na placa adequada à espectrometria de

massa. Todas as etapas de purificação foram executadas tomando-se o devido cuidado para evitar a entrada de ar na ponteira com a coluna.

### 3.22.3 Análise espectrométrica através de MALDI-Tof

Para a obtenção das massas moleculares dos peptídeos purificados e cristalizados, foi feita a introdução da placa no espectrômetro de massa tipo Maldi-Tof/MS “Autoflex” da Bruker Daltonics. Foram disparados pulsos de laser até que o espectro obtido fosse adequado a posterior identificação protéica. A detecção dos peptídeos foi feita no modo refletor com polaridade positiva. Os parâmetros do equipamento foram ajustados com o software “Flex control” para a detecção monoisotópica de peptídeos de massa molecular entre 900 e 3000 Da. A calibração foi feita com o padrão de peptídeos “Peptide calibration standard” da Bruker Daltonics, adequado para a faixa de massa molecular de 1000 a 3125 Da. Os espectros obtidos de cada amostra foram salvos em computador para posterior análise.

### 3.22.4 Identificação das proteínas

Com o auxílio do software “flexAnalysis” 2.0 (Bruker Daltonics) foi feita a calibração externa dos espectros de massa obtidos do ensaio espectrométrico e, em seguida, foi gerada a lista de massa moleculares dos peptídeos para cada proteína. Com o auxílio do programa computacional “Protein Prospector” v. 3.2.1 (<http://prospector.ucsf.edu/>), as massas peptídicas obtidas foram comparadas com o banco de dados local contendo dados dos peptídeos provenientes da digestão triptica *in silico* das proteínas anotadas pelo sequenciamento do genoma do *Herbaspirillum seropedicae* ([www.genopar.org](http://www.genopar.org)). O resultado da comparação é uma lista das proteínas candidatas (deduzidas por suas ORFs) classificadas em ordem decrescente de correspondência. Os parâmetros utilizados para confirmar ou excluir as proteínas candidatas foram a quantidade de peptídeos experimentais que foram correspondentes aos peptídeos teóricos da proteína encontrada no banco de dados, e a porcentagem que esses peptídeos cobrem do total da seqüência genômica da proteína identificada. O valor de erro padrão considerado limitante foi de 100ppm.

### 3.23 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA AS PROTEÍNAS HrpG E HrcV DE *H. seropedicae*

A proteína HrcV purificada foi concentrada por ultrafiltração (Amicon® Ultra-4, 10,000 NMWL MILLIPORE) conforme indicações do fabricante. As frações de proteína HrpG purificada e de HrcV concentrada foram aplicadas em gel preparativo de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% e 7,5%, respectivamente. As bandas correspondentes às proteínas de interesse foram retiradas dos géis com auxílio de estilete novo, e descoradas com solução de bicarbonato de amônia 75 mmol/L e etanol 40%. As tiras de gel contendo HrpG ou HrcV foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido. O macerado foi resuspenso em solução salina 500 mM.

O protocolo para obtenção de anticorpos seguiu os princípios éticos da experimentação animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi certificado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (processo n° 23075.009295/2007-96, certificado n° 212). Para a obtenção de anticorpos contra as proteínas de interesse foram realizadas 3 imunizações mensais em coelhos *Oryctolagus cuniculus* da raça Nova Zelândia. Foram injetadas aproximadamente 500 µg de proteína purificada em cada imunização, em dois locais diferentes, de forma intramuscular e subcutânea. Na primeira injeção a solução de proteína foi misturada com adjuvante completo de Freund a fim de se acentuar a resposta imune. As demais injeções foram feitas com adjuvante incompleto de Freund. Cinco dias após a última imunização, 20 mililitros de sangue foram coletados. O soro contendo o título de anticorpos foi separado por centrifugação a 10000g durante 10 minutos, e armazenado a -70°C. Os anticorpos obtidos foram analisados pela técnica de “immunoblotting” (HUERGO, 2006).

### 3.24 “IMMUNOBLOTTING”

A análise por “immunoblotting” foi baseada no protocolo descrito por HUERGO (2006). As amostras de proteína total ou purificada foram separadas em géis de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de PVDF (Hybon-P PVDF Membrane – GE Healthcare) utilizando um sistema de transferência semi-seco.

### 3.24.1 Tampões de transferência

A composição dos tampões de transferência de proteínas estão descritos abaixo:

TABELA 8 – TAMPÕES DE TRANSFERÊNCIA

<b>Reagentes</b>	<b>Ânodo (A1)</b>	<b>Ânodo (A2)</b>	<b>Cátodo (C)</b>
Tris 0,5M pH 10	150 mL	12,5 mL	12,5 mL
Metanol	50 mL	50 mL	50 mL
Água ultrapura	50 mL	187,5 mL	162,5 mL
Ácido capróico 0,4M	-	-	25 mL

Os tampões foram armazenados a 4°C.

### 3.24.2 Transferência

A placa posicionada no ânodo do sistema de transferência foi inicialmente coberta com 2 camadas de papel filtro previamente imersas no tampão A1. Uma camada de papel filtro contendo tampão A2 foi colocada no sistema, seguido da membrana de PDVF, previamente ativada em metanol 100% por 30 segundos, lavada em H<sub>2</sub>O destilada e imersa em tampão A2. O gel foi então colocado sobre a membrana sempre tomando o devido cuidado para evitar bolhas de ar no sistema. Três camadas de papel filtro contendo tampão C foram colocadas sobre o gel. Uma pipeta de vidro foi utilizada para comprimir o sistema de transferência e expelir eventuais bolhas de ar. A placa do cátodo foi colocada sobre as folhas de papel filtro, o sistema foi conectado a uma fonte de eletroforese a 80 mA por 1 hora. A transferência foi monitorada utilizando um marcador de proteína pré-corado (Invitrogen).

### 3.24.3 Tratamento da membrana

Todo tratamento da membrana foi realizado em tampão TBST (Tris pH 7,6 2,42g/L; NaCl 8g/L; tween 20 1mL/L). Após transferência a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado 5% em TBST durante a noite a 4°C.

Transcorrido esse período, a membrana foi lavada com TBST e colocada em 10 mL de solução com anticorpo primário, em uma diluição adequada, e incubada por duas horas em temperatura ambiente, sob leve agitação. A membrana foi lavada 1x em tampão TBST por 15 minutos e 3x por 5 minutos. Após lavagem a membrana foi incubada com 10mL de solução contendo o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase –GE Healthcare ) na diluição 1/5000 a temperatura ambiente por uma hora sob agitação leve. Após esse período a membrana foi novamente lavada com TBST (1x de 15 minutos e 3x de 5 minutos). A revelação foi feita por quimioluminescência, utilizando o Kit ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) segundo procedimento recomendado pelo fabricante. A luminescência foi capturada em imagem por sistema UVP.

### 3.25 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO DE MEMBRANA CELULAR DE *H. seropedicae*

Culturas de *H. seropedicae* foram crescidas em frascos de 1 L contendo 300 mL de meio NFbHP-malato líquido suplementado com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2 mmol/L ou 20 mmol/L por 18 horas a 30° C, sob agitação. As células foram coletadas por centrifugação a 4.000 rpm por 8 minutos, ressuspensas em 800  $\mu\text{L}$  de tampão SP ( $\text{NaCl}$  8.5g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g/L; pH 7.2) e sonicadas com 15 pulsos de 15 segundos com intervalos de 15 segundos no sonicador (Ultrasonic Processor XL Heat Systems) usando amplitude de 10  $\mu\text{m}$ . O extrato celular foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Uma fração (100  $\mu\text{L}$ ) do sobrenadante foi armazenada sendo denominada fração celular total (membrana + citoplasma). O restante do sobrenadante foi submetido a ultracentrifugação a 250.000  $\times g$  por 30 minutos 4 °C na ultracentrifuga Hitachi Himac CP90B (rotor P50A2). Uma alíquota (100  $\mu\text{L}$ ) da parte superior do sobrenadante foi armazenada, esta fração representa a fração citoplasmática do extrato. O precipitado foi lavado com 1 mL de tampão SP, submetido à nova ultracentrifugação (sob as mesmas condições). O precipitado foi finalmente ressuspenso em 100  $\mu\text{L}$  de tampão SP, e constitui a fração de membranas celulares.

### 3.26 CONSTRUÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE *hrpG* DE *H. seropedicae*

A construção da estirpe mutante *hrpG* de *H. seropedicae* foi feita conforme descrito por DEDECEK (2006).

#### 3.26.1 Construção do plasmídeo pSUPhrpGlacZ

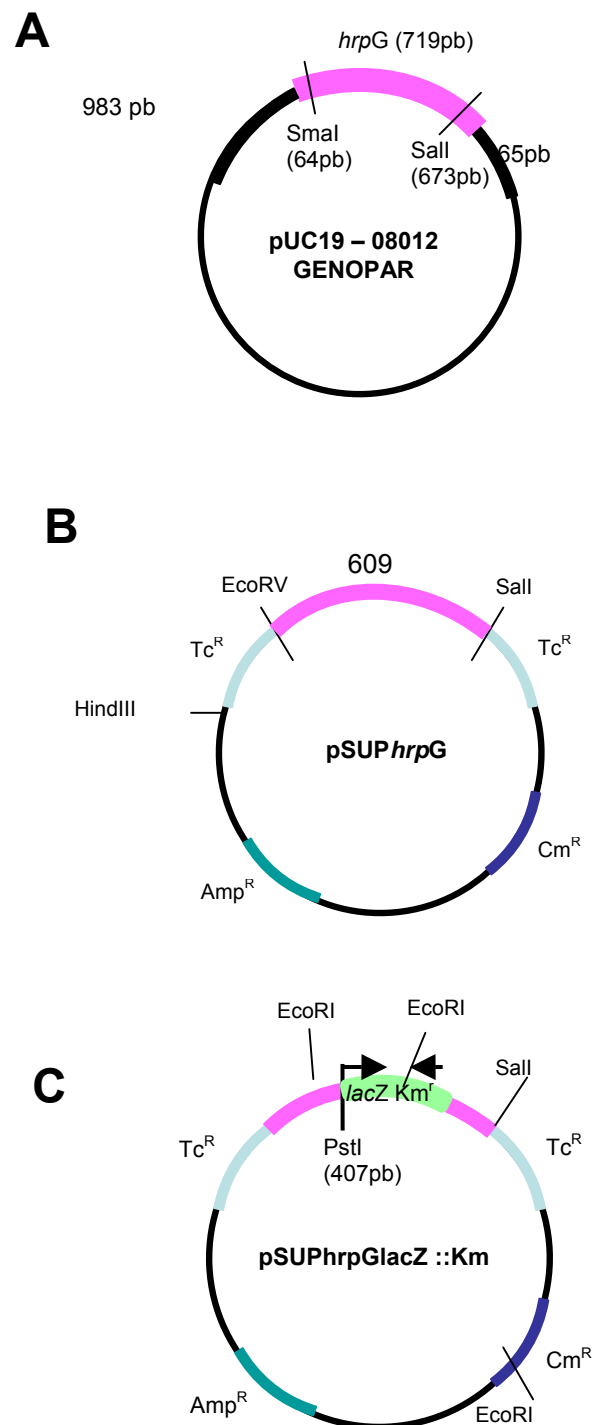
Um fragmento *Sall*/*SmaI* de 610 pb, correspondendo a parte central do gene *hrpG* de *H. seropedicae* foi isolado do plasmídeo HS08-FP-00-000-012-F01 (Programa Genopar – [www.genopar.org](http://www.genopar.org)) e subclonado no vetor pSUP202 nos sítios *Sall* e *EcoRV*, originando o plasmídeo pSUPhrpG (fig. 5). As colônias transformantes foram selecionadas pela sensibilidade a tetraciclina e resistência a ampicilina e cloranfenicol. Os clones sensíveis foram confirmados por perfil de restrição utilizando as enzimas *Sall* e *HindIII*. O plasmídeo pSUPhrpG foi digerido parcialmente com a enzima de restrição *PstI*, que possui dois sítios de reconhecimento dentro do gene *hrpG* (posições 407 e 609 do gene) e um sítio no gene para resistência a ampicilina. Após digestão parcial, o plasmídeo pSUPhrpG foi extraído com 3 volumes de etanol absoluto para remoção do fenol-clorofórmio (25:24) utilizado na inativação da enzima de restrição. Após purificação, o plasmídeo digerido parcialmente foi ligado a um cassete *lacZ-Km<sup>R</sup>* isolado do plasmídeo pKOK6.1 por digestão com a enzima de restrição *PstI* e extraído a partir de gel de agarose de baixo ponto de fusão. O plasmídeo resultante foi denominado pSUPhrpGlacZ::*Km* (figura 5). Este plasmídeo foi transformado em *E. coli* DH10B, e a seleção das colônias contendo o plasmídeo recombinante foi realizada por resistência a cloranfenicol, ampicilina e canamicina. Para a verificação da posição e orientação da entrada do cassete, foi analisado o perfil de restrição utilizando-se as enzimas *EcoRI* (que contém sítios de restrição nas posições 2452 e 5456 do cassete *lacZ-Km<sup>R</sup>*, e um sítio na posição 4780 do vetor pSUP202) e *Sall* (sítio de restrição na posição 652 do vetor pSUP202). Desta forma seriam gerados dois fragmentos de tamanho fixo: um proveniente dos dois sítios de restrição de *EcoRI* dentro do cassete *lacZ-Km<sup>R</sup>* com 3004 pb, e outro proveniente dos sítios de restrição *Sall* e *EcoRI* do vetor pSUP202 com 4128 pb. Dois outros fragmentos seriam obtidos de tamanhos variados de acordo com a posição de entrada do cassete no gene *hrpG* e sua orientação (fig. 5).

### 3.26.2 Obtenção da estirpe mutante *hrpG::lacZ* de *H. seropedicae*

Após a verificação da posição e orientação da entrada do cassete *lacZ*-Km<sup>R</sup> inserido no gene *hrpG*, o plasmídeo pSUPhrpGlacZ::Km foi utilizado para transformar *E. coli* estirpe S17.1. O transformante S17.1 pSUPhrpGlacZ::Km foi conjugado com *H. seropedicae* estirpe SmR1. Colônias contendo inserção do genoma foram selecionadas por crescimento em meio NFbHPN-malato sólido contendo os antibióticos estreptomicina (80 µg/mL), ampicilina (250 µg/mL) e canamicina (500 µg/mL). As estirpes mutantes resultantes de recombinação homóloga dupla foram identificadas pela sensibilidade ao cloranfenicol (100 µg/mL). A estirpe mutante de *H. seropedicae* foi denominada VShrpG. A posição da inserção do cassete no genoma da bactéria foi determinada por sequenciamento. Para isso, as estirpes SmR1 e VShrpG tiveram seu DNA genômico amplificado. A amplificação foi realizada segundo procedimento descrito no item 3.7, com a utilização de um “primer” iniciador 5' do gene *hrpG* e um “primer” que se anela no gene *lacZ* (SCHWAB, 2006) permitindo a amplificação para fora do mesmo em direção ao gene *hrpG*. O produto de PCR da estirpe VShrpG foi purificado e seqüenciado conforme descrito no item 3.16 de materiais e métodos.



FIGURA 5 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pSUPhrpGlacZ



A – Clone do programa GENOPAR. Em lilás o fragmento do gene *hrpG*. O tamanho do gene e as posições dos sítios de restrição *Sa*II e *Sma*I utilizados para digestão estão indicados. B – pSUP*hrpG*, em lilás o fragmento do gene *hrpG* com o tamanho do fragmento clonado e posições das enzimas de restrição utilizadas. C – pSUPhrpGlacZ, indicando o sítio *Pst*I e a sua posição no gene, onde ocorreu a inserção do cassete Km::*lacZ* retirado do vetor pKOK6.1. Os sítios de restrição para as enzimas *Hind*III, *Sa*II e *Eco*RI utilizadas na confirmação dos plasmídeos recombinantes também estão mostrados na figura.

### 3.27 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE

A atividade de  $\beta$ -galactosidase das culturas de *H. seropedicae* foi determinada segundo MILLER (1992) com modificações. As estirpes de *H. seropedicae* e do mutante *hrpG::lacZ-Km<sup>R</sup>* foram cultivadas por 14 horas a 30 °C em meio NFbHP-malato ou exsudato de semente de milho na presença de 2 mmol/L ou 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl e naringenina 50 $\mu$ M ou extrato do colmo de cana-de-açúcar 5%.

Alíquotas de 100  $\mu$ L das culturas foram coletadas e adicionadas a 900 $\mu$ L de tampão Z (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 60 mmol/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 40 mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1 mmol/L,  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mmol/L e SDS 0,0027% pH 7,0). Duas gotas de clorofórmio foram adicionadas ao sistema que foi agitado em vortex por 10 segundos e incubado a 30 °C. O início da reação foi determinado pela adição de 200  $\mu$ L de ONPG (*o*-nitrofenil  $\beta$ -D-galactosídeo; 4 mg/mL preparado em tampão Z). Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 500  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mol/L. A absorbância do cromóforo *o*-nitrofenol foi determinada em 420 nm e a turbidez da mistura em 550 nm. A atividade de  $\beta$ -galactosidase foi expressa em nmol *o*-nitrofenol/(min.mg proteína). O coeficiente de absortividade molar calculado do *o*-nitrofenol foi de 4190 L.mol<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>.

### 3.28 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) utilizando solução de albumina de soro bovino como padrão. O sistema de reação continha 1 mL de solução de Bradford (0,01% Coomassie Brilliant Blue G250, 4,7% etanol, 8,5% ácido fosfórico) e 100  $\mu$ L de amostra devidamente diluída. Essa mistura foi homogeneizada e a absorbância determinada a 595 nm. Para os testes de atividade  $\beta$ -galactosidase, as culturas foram previamente lisadas pela adição de mesmo volume de NaOH 0,2 mol/L e incubação mínima de 1 hora a temperatura ambiente.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema de secreção do tipo III é de grande importância na interação entre bactérias e hospedeiros animais ou vegetais, tendo como principal função a secreção de moléculas efetoras nas células eucarióticas (GALÁN, COLLMER, 1999; HUECK, 1998; CORNELIS, VAN GIJSEGEM, 2000). Em *H. seropedicae* a função do sistema de secreção tipo III é ainda desconhecida, mas acredita-se ser semelhante aos já descritos em outros organismos, devido à presença de genes similares em uma região genômica característica. Neste contexto o presente trabalho visa contribuir no esclarecimento deste sistema em *H. seropedicae*, através da análise das proteínas da estrutura do aparato de secreção HrcV e HrcC, e da proteína regulatória HrpG.

### 4.1 ANÁLISE *IN SILICO* DA SEQÜÊNCIA DO GENE *hrpG* DE *H. seropedicae*

O gene *hrpG* de *H. seropedicae* possui 720 pb e codifica uma proteína com 239 resíduos de aminoácidos e massa molecular calculada de aproximadamente 27 kDa. Este gene está localizado fora do “cluster” *hrp/hrc* de *H. seropedicae* (fig.4).

Quando comparada com o banco de dados (GenBank) através do programa BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1997) a seqüência deduzida de aminoácidos desta proteína apresentou similaridade com proteínas reguladoras de resposta de sistema de dois componentes, entre elas HrpG de *Xhantomonas oryzae* pv. *oryzae* e de *Ralstonia solanacearum* (50% e 51% de similaridade, respectivamente). O gene *hrpG* codifica para uma proteína membro da família OmpR de proteínas reguladoras de resposta de dois componentes responsável pela integração de diferentes sinais ambientais. Em *Xhantomonas campestris* pv. *vesictoria* e *Ralstonia solanacearum* a proteína HrpG controla a expressão de genes reguladores transcricionais, enzimas degradativas, adesinas, genes *hrp* e alguns efetores do sistema de secreção do tipo III (NOEL *et al.*, 2001; VALLS, GENIN, BOUCHER, 2006).

Através da utilização do programa PSORT (NAKAI, KANEHISA, 1991) foi possível prever a localização celular da proteína HrpG de *H. seropedicae*. A análise indicou que a proteína está localizada no citoplasma bacteriano. A presença de domínios na proteína foi verificada através do programa SMART (LETUNIC *et al.*,

2006). A proteína apresentou um domínio Rec de regulação de resposta de dois componentes (número de acesso ao SMART SM00448) e um domínio C-terminal de proteína regulatória transcricional (trans\_reg\_C) que pode ter a função de ligação ao DNA (número de acesso ao SMART PF00486). Através do programa ScanProsite (DE CASTRO *et al*, 2006) foi identificado um possível sítio de fosforilação no resíduo de aspartado na posição 51 da proteína HrpG de *Herbaspirillum seropedicae*.

A figura 6 mostra o alinhamento, através do programa ClustalW (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994), da proteína HrpG de *H. seropedicae* e outros organismos.

A fim de estudar a proteína HrpG de *H. seropedicae* o gene foi amplificado e clonado visando a superexpressão da proteína para a produção de anticorpos policlonais. Da mesma forma, um mutante de *H. seropedicae* contendo uma fusão cromossomal *hrpG::lacZ* foi obtido para verificar a expressão do gene.

FIGURA 6 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA HrpG DE *H. seropedicae* COM PROTEÍNAS SIMILARES DE OUTROS MICRORGANISMOS

Rs_HrpG	-----MKFAVLTSNPSSFAYVAACLAVQNVECVRFDDALTLRLRARRTEAFSLLMI	50
Xff_HrpG	-MNDHSPPNAGSVFLLTQDARLVSQVNASLAPLARNVSTFSDELELLRSLRHSPCELLIF	59
Xac_HrpG	-MNDHSPPNAGSVFLLTQDARLVSQVNASLAPLARNVSTFSDELELLRSLRHSPCELLIF	59
Xcv_HrpG	-MNDHSPPNAGSVFLLTQDARLVSQVNASLAPLARNVSTFSDELELLRSLRHSPCELLIF	59
Xoo_HrpG	-MNI PCPLAHGSAFLLTQDARLASQVNASIAPLSRNVSFVFSDELELLRSLRHSPCELLVF	59
Xoor_HrpG	-MNI PCPLAHGSAFLLTQDARLVSQVNASLAPLSRNVSFVFSDELELLRSLRHSPCELLVF	59
Xcc_HrpG	MMDAAANDRQGSFAVLTQDARLASQINASLATLVPEVTIFSDLELELLRSLRHSPCELLVF	60
Hs_HrpG	-----MNIACYIRNSNVFDQVRTALARVGYLPTQFDAETSLRLTLKRKTFDFVII	50
	. . . : : : * * . * * : . . . : : :	
Rs_HrpG	DAQQFRTAGQLVLSWRECNADMWCWPTLVFGQFADREDMAQAFEAGVDDLLTGHTAEELR	110
Xff_HrpG	DASCVAADDSSLLAWQRCHSGQPTPLIVLGRFDCADNILAWYRAGAQEV LALPFNSHELH	119
Xac_HrpG	DASYVAADDSSLLAWQRCHSGQPTPLIVLGRFDCADNILAWYRAGAQEV LALPFNSHELH	119
Xcv_HrpG	DASCVAADDSSLLAWQRCHSGQPTPLIVLGRFDCADNILAWYRAGAQEV LALPFNSHELH	119
Xoo_HrpG	DASCVADESLLAWQRCHSGHPTPLIVLGRFDCANDILDWYRAGAQEV LALPFNSHELQ	119
Xoor_HrpG	DASCVADESLLAWQRCHSGHPTPLIVLGRFDCANDILDWYRAGAQEV LALPFNSHELQ	119
Xcc_HrpG	DAHCVASDDSSLLAWQRCHSGHPTPLIVLGRFDCPDLLAWYRAGAHEVLSLPVNSHELH	120
Hs_HrpG	DLSSAESEDS-IFSWLSLRSQDPIPTLILSSASGGDVVARVLDNGADDFLQRPFD AVELV	109
	* : . : : * . : . * : : . : : * . : . * . . *	
Rs_HrpG	ARVQRVLRRESEQPRQNASMHVVVGPYRLCRLTRTATVNETPIRLTAREFATAWLLFSSPG	170
Xff_HrpG	VRAALAI SPVAHACP-ETQHLSVGPYQLIRDENTVYLEGKPIVLTAREFSIAWLLFSSPG	178
Xac_HrpG	VRAALAI SPVAHACP-ETQHLSVGPYQLIRDENTVYLDGKPIVLTAREFSIAWLLFSSPG	178
Xcv_HrpG	VRAALAI SPVAHACP-ETQHLSVGPYQLIRDENTVYLEGKPIALTAREFSIAWLLFSSPG	178
Xoo_HrpG	VRAALAI SPVAHACP-ETQQLSVGPYQLLRDENTVYLGKPIVLTAREFSIAWLLFSSPG	178
Xoor_HrpG	VRAALAI SPVAHACP-ETQQLSVGPYQLLRDENTVYLGKPIVLTAREFSIAWLLFSSPG	178
Xcc_HrpG	VRASLAIWPM AATCI-QAQQIKVGPYQLLREKNTVYLHETAIALTAREFSIAWLLFSSNG	179
Hs_HrpG	ARINAVMRRCAPKNN--RRVIEYAGFQLQRDTAKFSYQGMGIS-----	150
	. * : : : * * . . . *	
Rs_HrpG	TFLSRQQIASAVWGADASIVERSIEQHIYKLRKKLHFG-QETGVELKTVYARGYQLAVHE	229
Xff_HrpG	VCFRRCQLAKAVWGSHTFEFTDRTMEQHMYKLRKKLQLSSDSSAVRIRTVYSHGYKLELAL	238
Xac_HrpG	VCFRRCQLAKAVWGSHTFEFTDRTMEQHIYKLRKKLQLSSDSSAVRIRTVYSHGYKLELAL	238
Xcv_HrpG	VCFRRCQLAKAVWGSHTFEFTDRTMEQHIYKLRKKLQLSGDSSAVRIRTVYSHGYKLELAL	238
Xoo_HrpG	VCLRRCQLAKAVWGSHTFEFTDRTMEQHIYKLRKKLQLGNHNGAVRIRTVYSHGYKLELAL	238
Xoor_HrpG	VCFRRCQLAKAVWGSHTFEFTDRTMEQHIYKLRKKLQLGNHNGAVRIRAVYSHGYKLELAL	238
Xcc_HrpG	VCFRRCQLAKAVWGSHTFEFTDRTMEQHIYKLRKKLRLCNHSGAVRIRTVYSHGYKLELAL	239
Hs_HrpG	-----	

Alinhamento da sequência de proteína HrpG de *H. seropedicae* e proteínas homólogas de outros organismos. Rs, *R. solanacearum*, números de acesso no banco de dados GENBANK CAA07190.1; Xff, *X. fuscans* subsp. *fuscans* (GENBANK ABW87294.1); Xac, *X. axonopodis* pv. *citri* str. 306 (GENBANK NP641600.1); Xcv, *X. campestris* pv. *vesicatoria* str. 85-10 (GENBANK YP363045.1); Xoo, *X. oryzae* pv. *oryzae* (GENBANK AF404409.1); Xoor, *X. oryzae* pv. *oryzicola* (GENBANK AF82580.1); Xcc, *X. campestris* pv. *campestris* str. ATCC33913 (GENBANK NP636540.1); Hs, *H. seropedicae* e (banco de dados Programa Genopar – [www.genopar.org](http://www.genopar.org)). O alinhamento foi gerado pelo programa ClustalW (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994). (\*) indica aminoácidos idênticos em todas as proteínas comparadas; (●) indica substituições de aminoácidos conservada; (: ) indica substituições de aminoácidos semi-conservada; (-) indica espaços criados pelo programa a fim de fornecer o melhor alinhamento entre as sequências. Em negrito o provável resíduo de aspartato conservado que é fosforilado para sinalização da regulação.

#### 4.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA His-HrpG DE *H. seropedicae* EM *E. coli*

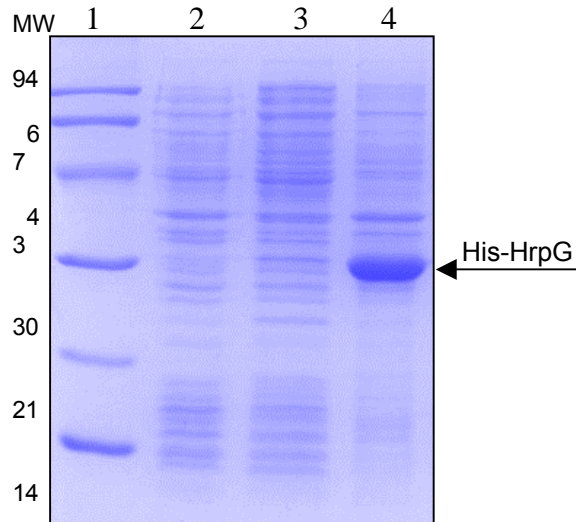
A expressão da proteína HrpG de *H. seropedicae* contendo 6 resíduos de histidina foi realizada em célula de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) pLysS transformada com o plasmídeo recombinante pVPET-hrpG, conforme descrito no item 3.13.1 de Materiais e Métodos. O vetor de expressão utilizado (pET28-a) foi escolhido por possuir o promotor forte do fago T7, sendo possível obter uma alta taxa de expressão da proteína de interesse após indução, além de codificar para um oligopeptídeo contendo seis resíduos de histidina que fica fusionado na região N-terminal da proteína expressa. Esta seqüência, denominada de cauda de histidina (His-tag), possibilita a purificação da proteína expressa em apenas um passo cromatográfico, utilizando cromatografia de afinidade, permitindo, desta forma, aumento da eficiência e do rendimento do processo. A estirpe de *E. coli* utilizada, BL21( $\lambda$ DE3) pLysS produz a polimerase do fago T7 sob controle do promotor *lacUV5*. A indução do promotor *lacUV5* por IPTG ou lactose leva a expressão da RNA polimerase do fago T7, necessária para a expressão da proteína de interesse a partir do vetor pET28-a.

A superexpressão em pequena escala da proteína His-HrpG em *E. coli* foi realizada conforme descrito no item 3.18 de Materiais e Métodos. A indução foi feita com IPTG 0,1 mM durante 2 horas e meia a 37 °C. A figura 7 mostra o perfil eletroforético das proteínas dos extratos solúvel e insolúvel de células superexpressando a proteína His-HrpG de *H. seropedicae*. Observa-se uma banda protéica presente na linha correspondente à fração insolúvel de células de *E. coli* transformada com o plasmídeo pVPET-hrpG que está ausente na linha controle correspondente ao extrato de células transformadas com pET28a. A proteína superexpressa apresenta migração na faixa de 30 kDa, conforme esperado para a proteína His-HrpG. Esses resultados indicam que a proteína His-HrpG foi superexpressa em *E. coli*, apesar de apresentar-se na sua maior parte na forma insolúvel do extrato celular.

### 4.3 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DA PROTEÍNA His-HrpG

A proteína superexpressa foi submetida à análise espectrométrica através de MALDI-Tof para confirmação de sua identidade. Para tanto, a banda foi retirada do gel e a amostra foi preparada conforme descrito no item 3.22 de Materiais e Métodos. Dos cinco valores de massa/carga ( $m/z$ ) utilizadas para realizar a busca no banco de dados local, quatro coincidiram com os valores de  $m/z$  dos peptídeos provenientes da digestão trípica *in silico* da ORF HrpG de *H. seropedicae*, confirmando a identidade da proteína superexpressa. Foi obtido 31% de cobertura, ou seja, a soma dos aminoácidos dos 4 peptídeos utilizados na análise correspondem a 31% do total de aminoácidos da amostra analisada). Os dados na figura 8 mostram os fragmentos de peptídeos provenientes da digestão *in silico* da amostra, bem como os fragmentos dos peptídeos da ORF do banco de dados local a que foram comparados. Os peptídeos que confirmaram a identidade da proteína HrpG estão sublinhados em azul.

FIGURA 7 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA His-HrpG DE *H. seropedicae* EM *E. coli* A PARTIR DO PLASMÍDEO pVPET-hrpG.



Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) do extrato celular de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)pLysS transformada com plasmídeo pET28a ou pVPET-hrpG. As células foram induzidas e o extrato celular obtido conforme descrito no item 4.2. Linha 2: extrato total de células contendo o plasmídeo pET28a. Linhas 3 e 4: fração solúvel e insolúvel do extrato de células contendo o plasmídeo pVPET-hrpG. A seta indica a proteína His-HrpG superexpressa. MW indica os marcadores de massa molecular em kDa (Linha 1). O gel foi corado com Coomassie Blue. Foram aplicados no gel 5  $\mu$ g de proteína total de cada fração.

FIGURA 8 – ALINHAMENTO DOS PEPTÍDEOS DE His-HrpG IDENTIFICADOS POR ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE MASSA MALDI-Tof

```

MNIACYIRNSNVFDQVRTALARVGYLPTQFDAETSLLRTLKRKTFDFVIIDLSSAESEDSIF
VGYLPTQFDAETSLLR

SWLSLRSGDPIPTLILSSASGGDVVARVLDNGADDFLQRPFD AVELVARINAVMRRCAPKNN
VLDNGADDFLQRPFD AVELVAR

RRVIEYAGFQLQRDTAKFSYQGMGISLTPREFSMAWLFSSPGVYISRETLGSVIWDSEI
VIEYAGFQLQR

AGRTIEQHVVYKLRKKLQIDNRNVVIRTAYSQGYRLDPVDNEGASPVSEANQS*
TAYSQGYRLDPVDNEGASPVSEANQS

```

Alinhamento dos peptídeos provenientes da digestão *in silico* da proteína His-HrpG superexpressa, com os peptídeos da ORF de *H. seropedicae*. Dados obtidos a partir do programa Protein Prospector v. 3.2.1 utilizando o banco local com ORFs de *H. seropedicae*. Os peptídeos que confirmaram a identidade da proteína HrpG estão sublinhados em azul.

#### 4.4 ENSAIOS DE SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA His-HrpG



Com o intuito de obter uma maior proporção de His-HrpG na forma solúvel, foram testadas diferentes condições para a indução da superexpressão, bem como diferentes tampões para lise celular.

#### **4.4.1 Efeito do pré-tratamento com choque térmico na solubilização da proteína His-HrpG**

Inicialmente foi testado o efeito de um choque térmico, imediatamente antes da adição do indutor, na solubilização da proteína His-HrpG. O choque térmico leva ao aumento da atividade de chaperonas que auxiliam na manutenção da conformação nativa de proteínas, podendo contribuir na diminuição da formação de agregados insolúveis. Para tanto, dez mililitros de cultura de células transformadas com o plasmídeo pVPET-hrpG foram crescidas a 30°C ou 37°C até atingirem a DO<sub>600</sub> de 0,5. Neste momento foram submetidas ao choque térmico de 45°C durante 15 minutos. Em seguida as culturas foram induzidas com lactose 0,5% ou IPTG 0,1 mM e mantidas novamente a 30 ou 37°C durante duas horas e meia. A incubação com lactose a 30°C após choque térmico levou a um baixo nível de expressão (resultados não apresentados). Isto pode ter ocorrido pelo fato da lactose ser consumida pela bactéria tornando seu metabolismo mais lento, ao contrário do que ocorre quando a indução é feita com IPTG. Desta forma, optamos por utilizar a temperatura de 37°C para a indução com lactose. No caso de IPTG a temperatura utilizada foi de 30°C uma vez que existem relatos do aumento de solubilidade de proteína superexpressa a esta temperatura (SCHEN, NOTEBORN, 1988). A figura 9 mostra o resultado obtido com a indução com lactose a 37°C ou com IPTG a 30°C. Em todos os ensaios a proteína His-HrpG foi superexpressa, entretanto, não foi observada nenhuma diferença em relação ao aumento de solubilidade de His-HrpG com o pré-tratamento de choque térmico, nem mesmo com a utilização de diferentes indutores (IPTG ou lactose) ou temperaturas (30°C ou 37°C).

#### 4.4.2 Efeito de diferentes tampões na solubilização da proteína His-HrpG

Em vista do resultado obtido, testamos diversos tampões para lise das células a fim de obter um aumento da solubilidade da proteína His-HrpG. Células de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) pLysS contendo o plasmídeo pVPET-hrpG superexpressando a proteína His-HrpG, foram resuspendidas em tampões de diferentes pHs e concentrações de sal. A escolha dos valores de pH utilizados no experimento baseou-se no  $pI$  teórico da proteína His-HrpG. Valores de pH diferentes do  $pI$  calculado de 7,83, poderiam aumentar a solubilidade da proteína. O aumento da concentração de sal também poderia contribuir com o aumento da solubilidade da proteína superexpressa. Contudo, não foi observada diferença na solubilidade de His-HrpG utilizando tampão 50 mmol/L de Tris-Cl pH 6,8 ou 8,8 na presença de 500 mmol/L de NaCl ou KCl (fig. 10A), ou em tampão 50 mmol/L Tris-Cl pH 8,0 na presença de 100, 300 ou 500 mmol/L de NaCl (fig. 10B).

#### 4.4.3 Utilização de diferentes estirpes de *E.coli* na expressão da proteína His-HrpG

Uma outra tentativa de tornar a proteína His-HrpG solúvel foi utilizar diferentes estirpes de *E. coli* para expressão da proteína. A estirpe de *E. coli* BL21-AI contém uma inserção cromossomal do gene que codifica para RNA polimerase do fago T7 dentro do locus de *araB* do operon *araBAD*, sendo a regulação da T7 RNA polimerase controlada pelo promotor *araBAD*, e portanto induzida por L-arabinose e reprimida por glucose. Esta estirpe permite um maior controle de regulação da expressão da RNA polimerase, podendo contribuir com o aumento da solubilidade da proteína heteróloga ao permitir uma expressão homogênea e em baixos níveis. A expressão de His-HrpG na estirpe BL21-AI foi realizada conforme recomendação do fabricante, entretanto, não houve um aumento na solubilidade da proteína His-HrpG utilizando estas condições de expressão na estirpe BL21-AI (resultados não apresentados).

A estirpe Tuner ( $\lambda$ DE3) pLacI é uma mutante de BL21 que contém deleção no gene *lacYZ*. Essa mutação na Lac permease (*lacY*) leva a entrada uniforme de IPTG nas células, que produz um homogêneo nível de indução, dependente da

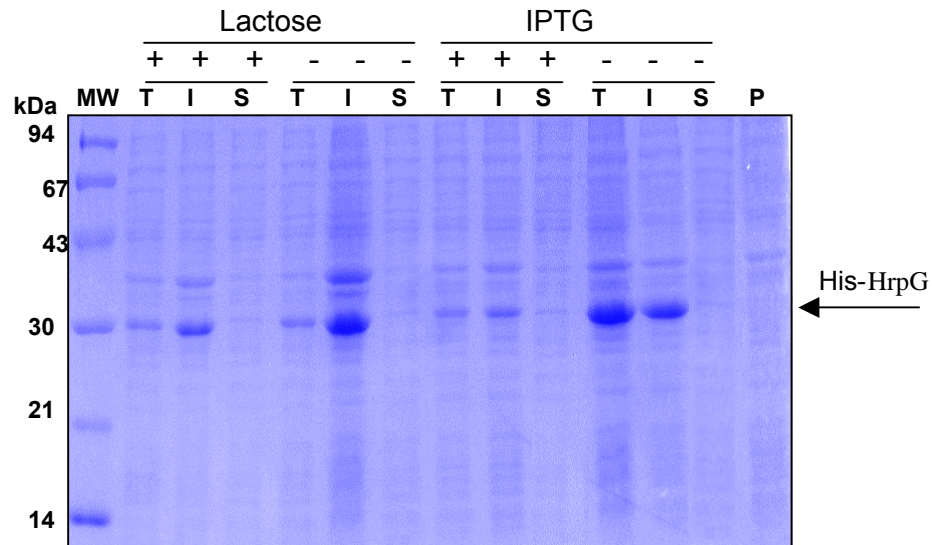
concentração de IPTG. Além disso a presença do plasmídeo pLacI proporciona a expressão suficiente do repressor *lac*, assegurando uma estridente repressão da proteína recombinante no estado não induzido. Controlando-se os níveis de expressão pode-se aumentar a solubilidade da proteína alvo, uma vez que a baixa expressão diminui a formação de corpos de inclusão. Neste ensaio, dez mililitros de cultura de *E. coli* estirpe Tuner contendo o plasmídeo pVPET-HrpG foram crescidos em meio LB a 30°C por 2 horas e meia, e induzidas com diferentes concentrações de IPTG de 0,0125 a 0,5 mM, conforme recomendações do fabricante. O resultado obtido é apresentado na figura 11. Conforme pode ser observado, a utilização da estirpe Tuner para a expressão da proteína His-HrpG não melhorou a expressão de His-HrpG em sua forma solúvel.

#### **4.4.4 Efeito da temperatura e tempo de indução na expressão da proteína His-HrpG solúvel**

Com o intuito de diminuir o metabolismo celular e proporcionar expressão da proteína His-HrpG lentamente, foi feita uma indução em *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) pLysS a 20°C durante 16 horas sob agitação de 120rpm. Foi utilizado como indutor 0,1mmol/L de IPTG ou 0,5% lactose. O resultado obtido é apresentado na figura 12. Nestas condições houve uma solubilização de cerca de 50% da proteína His-HrpG quando expressa com lactose.

Entre as diversas maneira de solubilizar proteínas heterólogas que são expressas na forma de corpos de inclusão, a adição de detergentes ao tampão de lise celular por exemplo, é comumente utilizada. Contudo, esta prática pode alterar a conformação da proteína de interesse, podendo afetar na sua atividade. Visando a realização de ensaios futuros de verificação da atividade da proteína HrpG de *H. seropedicae*, procurou-se obtê-la na forma solúvel em condições que não afetassem sua conformação. A condição que teve maior influência na solubilização de His-HrpG foi a indução em baixa temperatura durante um longo período de tempo. Esta condição, bem como as demais testadas neste trabalho pode afetar a solubilização de proteínas de forma variada, uma vez que vários fatores estão envolvidos, entre eles o vetor utilizado para superexpressão, o organismo hospedeiro e as propriedades intrínscas de cada proteína.

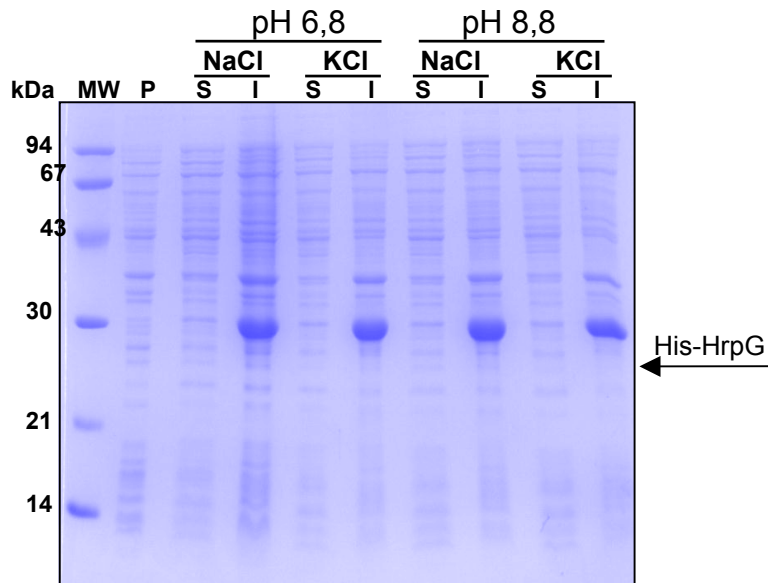
FIGURA 9 - EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTO COM CHOQUE TÉRMICO NA SUPEREXPRESSÃO DA PROTEÍNA His-HrpG



Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%SDS-PAGE) das proteínas presentes nas frações total (T), insolúvel (I) e solúvel (S) dos extratos de células expressando a proteína His-HrpG. A indução com lactose 0,5% foi realizada na temperatura de 37°C, enquanto que a indução com IPTG 0,1mM foi feita a 30°C. As células sofreram (+) ou não (-) pré-tratamento por choque térmico a 45°C por 15 minutos. Linha P mostra o extrato celular total de células contendo o plasmídeo pET28a. Linha MW indica os marcadores de massa molecular em kDa. A seta indica a proteína His-HrpG superexpressa. As proteínas foram coradas com Coomassie blue. Foram aplicados no gel 5 µg de proteína total de cada fração.

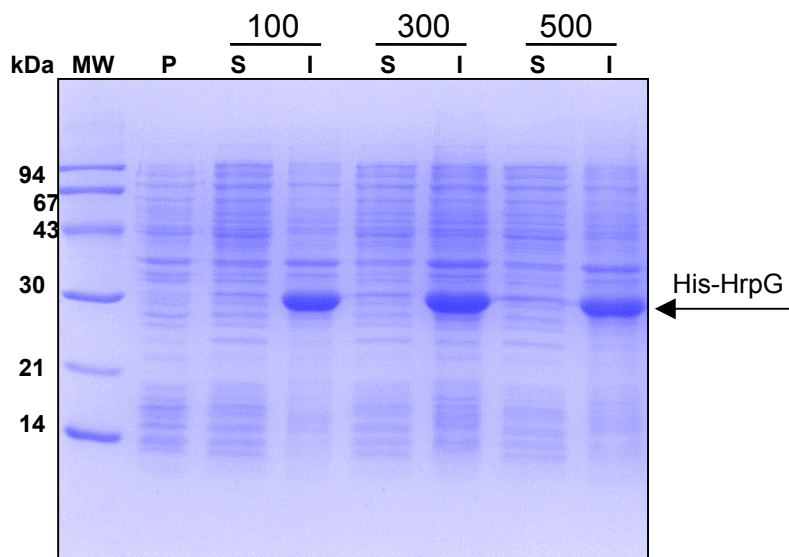
FIGURA 10 - EFEITO DA VARIAÇÃO DE pH E SAL NA SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA His-HrpG

A



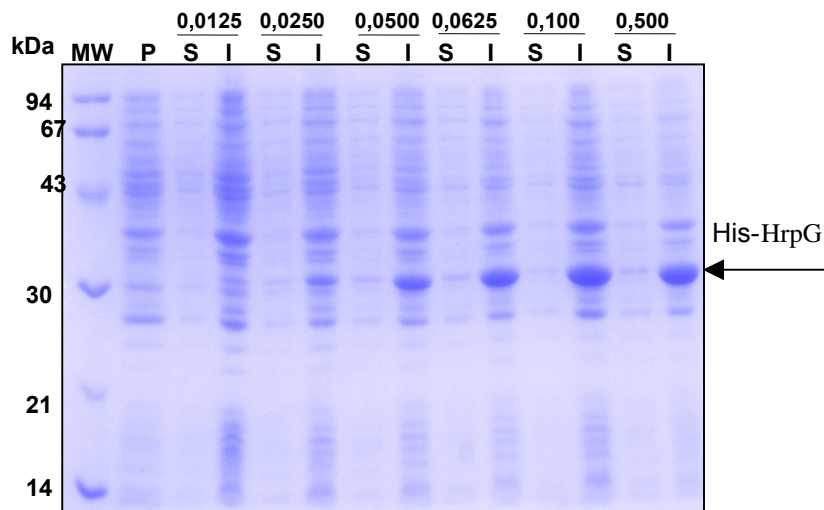
B

NaCl mmol/L:



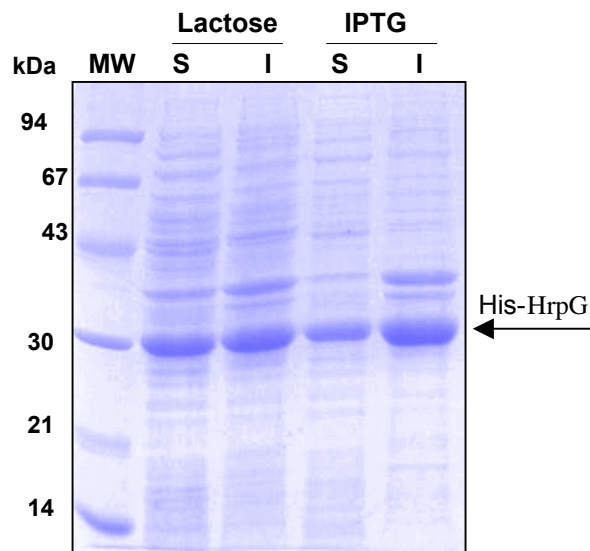
Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (12%SDS-PAGE) das proteínas presentes nas frações solúvel (S) e insolúvel (I) dos extratos de células expressando a proteína His-HrpG após indução com 0,5% lactose a 30°C. Painel A: efeito da variação de pH e tipo de sal (NaCl ou KCl 500 mmol/L). Painel B: efeito da variação da concentração de NaCl. Linhas MW indicam marcadores de massa molecular em kDa. Linhas P indicam o extrato de células transformadas com o vetor pET28a. As setas indicam a proteína His-HrpG superexpressa. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue. Foram aplicados no gel 5 µg de cada fração protéica.

FIGURA 11 – EFEITO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA His-HrpG EM *E. coli* ESTIRPE TUNER



Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) de extrato celular de *E. coli* Tuner transformada com plasmídeo pET28a (P) ou pVPET-hrpG). As células foram induzidas com gradiente de IPTG. A concentração de IPTG está expressa em mmol/L. (S) Fração solúvel e (I) insolúvel extrato de células contendo o plasmídeo pVPET-hrpG. A seta indica a proteína His-HrpG superexpressa. MW indica os marcadores de massa molecular em kDa. O gel foi corado com Coomassie Blue. Foram aplicados 5  $\mu$ g das frações protéicas.

FIGURA 12 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA His-HrpG SOLÚVEL



Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) de extrato celular de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)pLysS transformada com o plasmídeo pVPET-hrpG. As células foram induzidas com IPTG 0,1mmol/L ou lactose 0,5% durante 16 horas a 20°C. (S) Fração solúvel e (I) insolúvel do extrato de células expressando HrpG. A seta indica a proteína superexpressa. MW indica os marcadores de massa molecular em kDa. O gel foi corado com Coomassie Blue. Foram aplicados 10  $\mu$ g das frações protéicas no gel.

#### 4.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-HrpG DE *H. seropedicae*

A proteína His-HrpG de *Herbaspirillum seropedicae* foi purificada na forma solúvel e insolúvel. Para purificação da proteína His-HrpG na forma solúvel, duzentos mililitros de uma cultura de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) pLysS transformada com o plasmídeo pVPET-hrpG foi induzida e processada conforme descrito em Materiais e Métodos. As células foram lisadas em “prensa francesa” devido a sua maior eficiência na lise celular em grandes volumes de cultura. Após a lise celular o extrato foi separado em frações solúvel e insolúvel. A fração solúvel de proteínas foi aplicada na coluna de afinidade Hi-Trap Chelating Ni<sup>+2</sup> conforme descrito no 3.18 de Materiais e Métodos. A proteína His-HrpG foi eluída com diferentes graus de pureza nas concentrações de 100 a 500 mmol/L imidazol. A maior parte da proteína His-HrpG foi eluída com 300 mmol/L de imidazol (fig. 13). As frações eluídas com 300 mmol/L e 500 mmol/L de imidazol foram agrupadas separadamente e dialisadas contra tampão 50 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 100mmol/L NaCl, 50% glicerol.

Para avaliar o grau de pureza da proteína purificada, a fração dialisada foi submetida à nova eletroforese e corada com Comassie Blue (fig.14). A análise densitométrica realizada (programa LabWorks – UVP) indicou uma pureza de 96%. Os dados da purificação estão mostrados no quadro abaixo:

Volume de cultura*	Fração mais concentrada	Total de proteína purificada <sup>+</sup>	Pureza <sup>#</sup>
200 mL	2 mg/mL	4 mg	96%

\* Células de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) pLysS cultivadas em LB após indução com lactose 0,5%, aproximadamente 10<sup>9</sup> células por mL.

<sup>+</sup> Soma das proteínas totais presentes nas frações consideradas purificadas após a cromatografia e diálise.

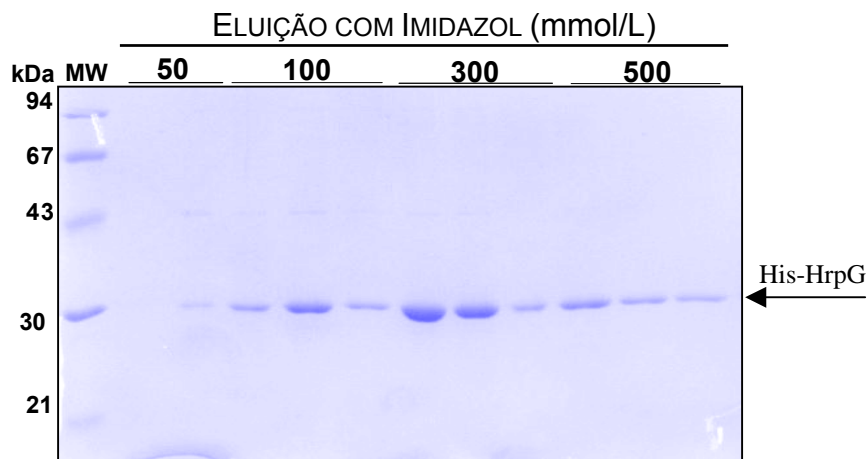
<sup>#</sup> Análise por densitometria de gel SDS-PAGE corado com Comassie Blue contendo 10  $\mu$ g de proteína purificada.

A fração da proteína His-HrpG dialisada foi armazenada a -70°C e poderá ser utilizada em análises futuras para verificação de atividade da proteína HrpG de ligação ao DNA.

A fração insolúvel da proteína HrpG foi ressuspensa em tampão de sonicação contendo uréia 5 mol/L e purificada como descrito acima para fração solúvel, sendo que os tampões de purificação continham uréia 5 mol/L, conforme descrito no item 3.19 de Materiais e Métodos. Foi obtido o mesmo padrão de

eluição, sendo a maior concentração de His-HrpG em 300 mmol/L de imidazol (resultados não apresentados). As frações eluídas com 300 mmol/L e 500mmol/L de imidazol, contendo His-HrpG purificada a partir de sua forma insolúvel, foram agrupadas para utilização na obtenção de anticorpos policlonais contra HrpG de *H. seropedicae*.

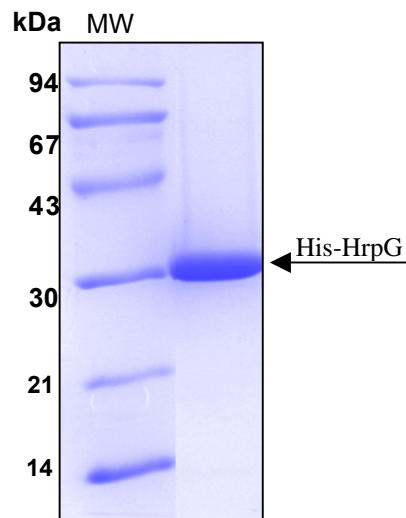
FIGURA 13 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-HrpG



Frações eluídas da coluna HiTrap-Chelating-Ni<sup>2+</sup> com 50, 100, 300 e 500 mmol/L imidazol. MW-marcador de massa molecular em kDa. Eletroforese em gel desnatante, com 12% de poliacrilamida. As proteínas foram coradas com Comassie Blue. A seta indica a proteína His-HrpG.



FIGURA 14 - DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA E CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA His-HrpG DE *H. seropedicae* APÓS DIÁLISE



Eletroforese em gel desnaturante (SDS PAGE 12%) contendo a proteína His-HrpG purificada e dialisada, submetido a análise densiométrica. Os marcadores de massa molecular estão indicados como MW em kDa. Linha 2 – 10 µg da proteína His-HrpG. O gel foi corado com Comassie Blue.

#### 4.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA PROTEÍNA His-HrpG DE *H. seropedicae*

A proteína His-HrpG de *H. seropedicae* purificada a partir da fração insolúvel de células de *E. coli* BL21(λDE3) pLysS transformadas com o plasmídeo pVPET-hrpG foi utilizada para a produção de anticorpos policlonais em coelhos. Estes anticorpos são de grande importância uma vez que poderão ser utilizados para a detecção da proteína HrpG em *H. seropedicae*, o que poderá contribuir para um maior entendimento do sistema de secreção do tipo III neste microrganismo.

Ensaio de imunodeteção foram realizados com o soro coletado após a terceira imunização. As figuras 15 e 16 mostram o resultado obtido por “Imunoblotting” utilizando os anticorpos policlonais. A detecção foi realizada utilizando anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase e reação por quimioluminescência, conforme descrito em Materiais e Métodos item 3.24.

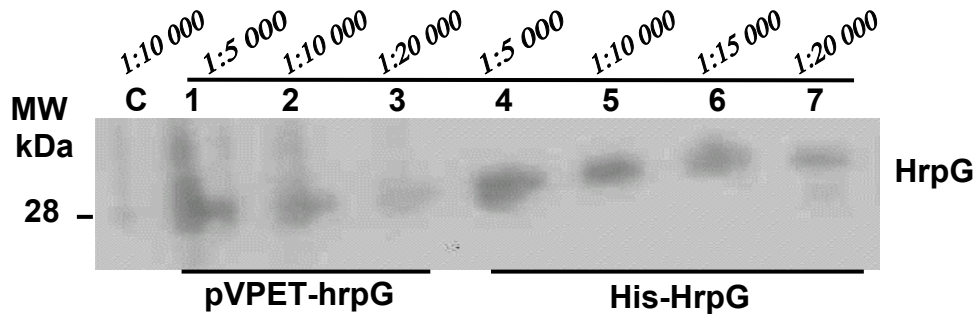
Inicialmente, os anticorpos obtidos foram testados para determinar a diluição adequada a ser utilizada nos testes posteriores. A figura 15 mostra o efeito da

diluição do anticorpo anti-HrpG contra extrato bruto de *E. coli* superexpressando a proteína His-HrpG, e contra a proteína His-HrpG purificada na sua forma insolúvel, a partir da expressão em *E. coli*. Foram utilizados 5 µg de proteína total do extrato de *E. coli* e 100 ng de proteína His-HrpG purificada. O anticorpo policlonal foi capaz de reconhecer a proteína His-HrpG em todas as diluições testadas, sendo escolhida a diluição 1: 10 000 para os ensaios seguintes. A aparente diferença na altura das bandas correspondentes às proteínas detectadas deve-se ao problema de corrida do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) ocorrido durante o experimento.

No intuito de testar a sensibilidade dos anticorpos policlonais anti-HrpG foram testadas diferentes quantidades de proteína HrpG purificada (2,5 a 100 ng). Como pode ser observado na figura 16, os anticorpos contra a proteína HrpG de *H. seropedicae*, na diluição 1:10<sup>4</sup> foram capazes de reconhecer até 2,5 ng da proteína de interesse.

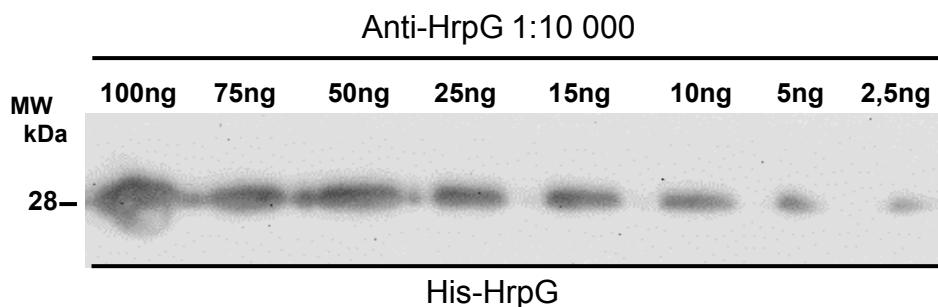
Uma vez verificada a capacidade de reconhecimento desses anticorpos em relação à proteína His-HrpG, foram realizados imunoenaios para detecção da proteína HrpG no organismo de interesse *H. seropedicae*. A bactéria foi crescida em 10 mL de meio de cultura mínimo NFbHP-malato, com adição de fonte de nitrogênio em baixa ou alta concentração (NH<sub>4</sub>Cl 2 mmol/L ou 20 mmol/L). O extrato total de células e as frações solúvel e insolúvel de proteínas foram utilizados em análise de “imunoblotting” para detecção da expressão da proteína HrpG. Nas condições ensaiadas não foi detectada a presença da proteína HrpG de *H. seropedicae* (dados não mostrados). Isto pode ter ocorrido devido à provável baixa expressão da proteína HrpG em *H. seropedicae*. Em *X. campestris* e em *R. solanacearum* HrpG apresenta baixa expressão, tanto em meio rico quanto em meio mínimo (WENGELNIK, VAN DEN ACKERVEKEN, BONAS, 1996; BRITO et al., 1999). Ensaio de imunoprecipitação deverão ser realizados a fim de detectar a presença da proteína HrpG.

FIGURA 15 - IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA His-HrpG EM DIFERENTES DILUIÇÕES DO ANTICORPO



Ensaio de imunodeteção utilizando diferentes diluições dos anticorpos policlonais produzidos contra a proteína His-HrpG de *H. seropedicae*. C – controle negativo, extrato de células de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) pLysS com o vetor pET28a e induzidas com IPTG 0,1mmol/L durante 16 horas a 20°C; linhas 1, 2 e 3 - extrato de células transformadas com o plasmídeo pVPET-hrpG expressando a proteína His-HrpG de *H. seropedicae* após indução com lactose 0,5% durante 16 horas a 20°C; linhas 4,5,6 e 7 – proteína His-HrpG de *H. seropedicae* purificada a partir de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) pLysS com o plasmídeo pVPET-hrpG. Foram aplicados 5 $\mu$ g de proteína total do extrato de *E. coli* e 100ng da proteína purificada. As diluições estão indicadas na figura.

FIGURA 16 - SENSIBILIDADE DO ANTICORPO CONTRA His-HrpG



Ensaio de imunodeteção utilizando anticorpos policlonais anti-HrpG para reconhecimento de diferentes concentrações da proteína His-HrpG de *H. seropedicae* purificada. O anticorpo foi utilizado na diluição 1:10000, conforme procedimentos descritos em Material e Métodos.

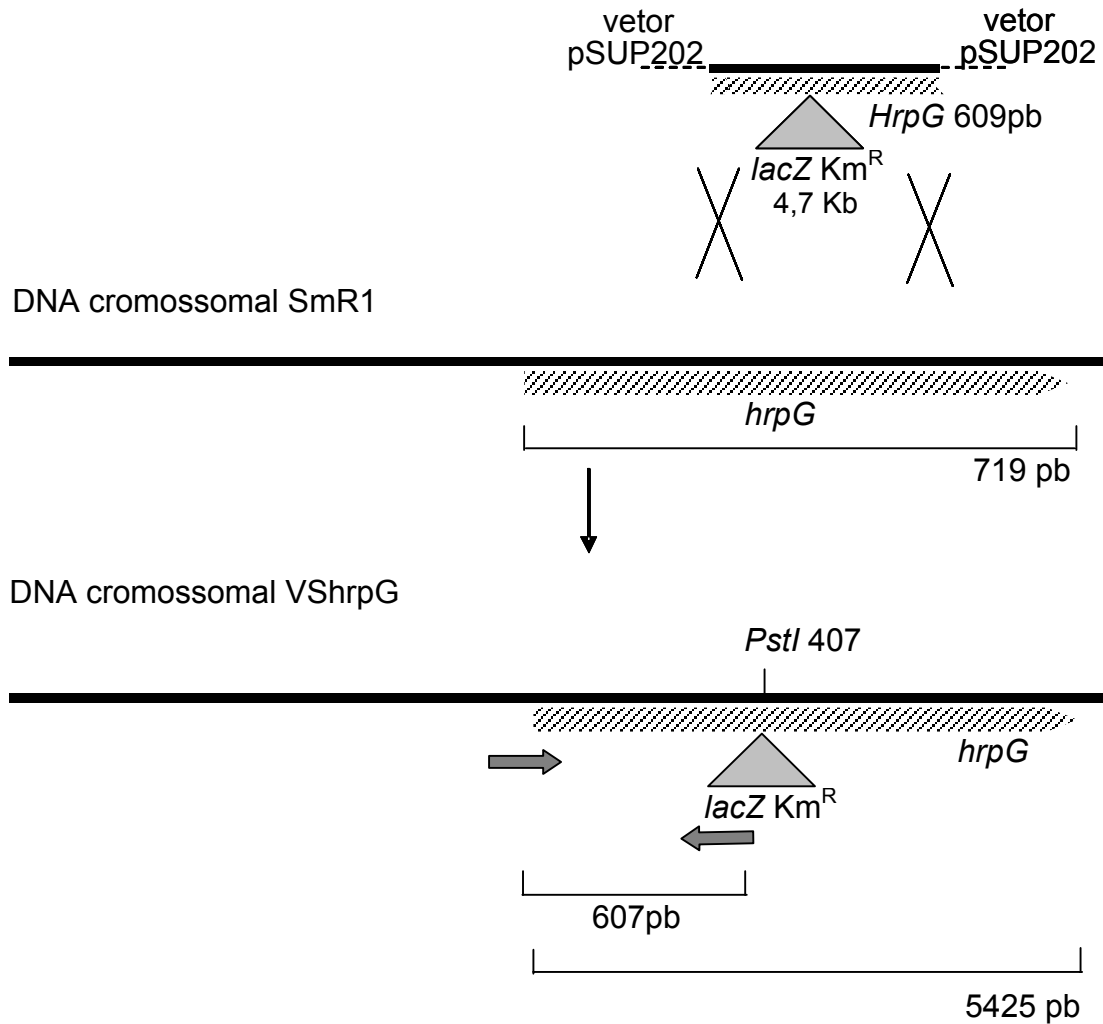
#### 4.7 OBTENÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE HrpG DE *H. seropedicae*

Com o objetivo de analisar a expressão do gene *hrpG* em *H. seropedicae* foi construída uma estirpe mutante contendo uma fusão cromossomal *hrpG::lacZ*. Este tipo de construção permite analisar a expressão do gene *hrpG* através da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, codificada pelo gene *lacZ*. Da mesma forma, o mutante também poderá ser utilizado como controle negativo nos ensaios de imunodeteção e na caracterização do gene *hrpG*, o que poderá contribuir para o esclarecimento da regulação do sistema *hrp/hrc* de *H. seropedicae*.

Para a obtenção da estirpe mutante *hrpG* de *H. seropedicae* (Material e Métodos, item 3.26), o plasmídeo pSUPhrpGlacZ::Km que contém a parte central do gene *hrpG* mutado por um cassete *lacZ::Km<sup>R</sup>* foi analisado por restrição para a verificação da posição e orientação de entrada do cassete. O plasmídeo selecionado possui o cassete no sítio *PstI* da posição 407 do gene e na orientação *lacZ::Km* (com o gene *lacZ* na mesma orientação do promotor de *hrpG*). O plasmídeo foi introduzido em *H. seropedicae* SmR1 por conjugação. Uma colônia, denominada VShrpG, onde a integração do cassete no genoma da bactéria ocorreu por recombinação homóloga dupla, foi selecionada através da resistência a canamicina e pela perda de resistência a cloranfenicol (fig. 5 e 17). A posição da inserção do cassete no genoma da bactéria foi determinada por sequenciamento. Para isso, as estirpes SmR1 e VShrpG tiveram seu DNA genômico amplificado e seqüenciado. A amplificação foi realizada segundo procedimento descrito em Materiais e Métodos item 3.7 e 3.25.2. Foi obtido um produto de amplificação do tamanho esperado, com aproximadamente 607 pb para a estirpe mutante VShrpG, e ausência de fragmento para a estirpe SmR1, uma vez que esta última não possui o gene *lacZ* para o anelamento de um dos “primers” utilizados na amplificação. O produto de PCR da estirpe VShrpG foi purificado e seqüenciado. Foi obtida a seqüência do início do gene *hrpG* que estava ausente no plasmídeo pSUPhrpGlacZ::Km confirmando que houve recombinação homóloga na posição esperada (resultados não apresentados).

FIGURA 17 – ESQUEMA DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA OCORRIDA PARA PRODUZIR A ESTIRPE VShrpG DE *H. seropedicae*

pSUPhrpGlacZ::Km



Para a obtenção do mutante *hrpG* de *H. seropedicae* o plasmídeo pSUPhrpGlacZ::Km, que contém a parte central do gene *hrpG* mutado pelo cassete *lacZ::Km<sup>R</sup>*, foi introduzido em *H. seropedicae* SmR1 por conjugação. Uma colônia, denominada VShrpG, onde a integração do cassete no genoma da bactéria ocorreu por recombinação homóloga dupla, foi selecionada. A posição de entrada do cassete no gene está indicada na figura. As flechas em cinza indicam a posição de anelamento dos “primers” utilizados na amplificação do gene mutado para sequenciamento e confirmação de sua posição no DNA cromossomal de *H. seropedicae*.

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DA FUSÃO *hrpG::lacZ* NA ESTIRPE VShrpG DE *H. seropedicae*

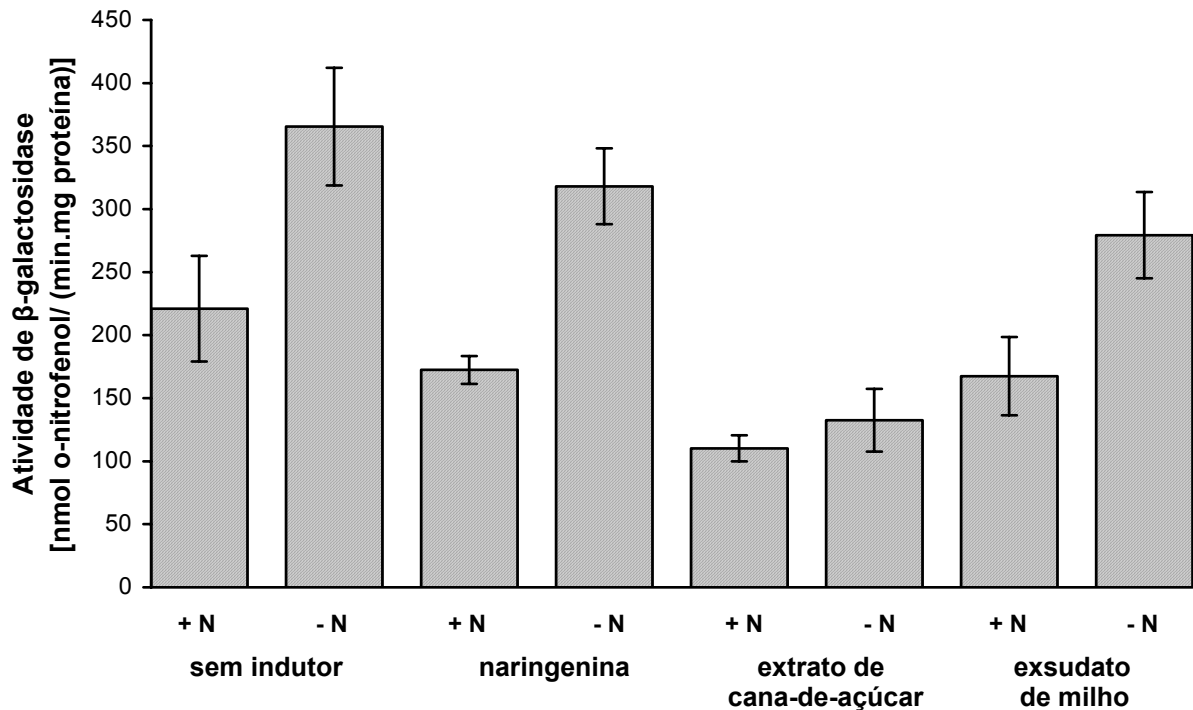
A expressão das proteínas regulatórias, do aparato estrutural, e das proteínas efetoras do sistema de secreção do tipo III parecem ser estimuladas pelo contato entre a bactéria e seu hospedeiro bem como por múltiplos fatores fisiológicos e ambientais, como pH, força osmótica e repressão catabólica (RAHME *et al.*, 1992; XIAO *et al.*, 1992; HUECK, 1998). A indução dos genes *hrp* é observada em meios com o mínimo de sais, enquanto que fontes complexas de nitrogênio, alto pH, alta osmolaridade e algumas fontes de carbono reprimem sua expressão em alguns microrganismos. Embora possa se conseguir a expressão dos genes *hrp/hrc* e a secreção das proteínas *in vitro*, não existe um consenso de condições ideais para a expressão destes genes uma vez que cada bactéria parece responder de forma diferente quando submetidas a diferentes fatores e condições (RAHME *et al.*, 1992; HUECK, 1998; LINDGREN, 1997; XIAO *et al.*, 1992).

Foi observado que a expressão dos genes *hrp* em muitos fitopatógenos é fortemente influenciada pelo ambiente de crescimento. Em *X. campestris* a expressão de *hrpG* é baixa em meio complexo e aumenta cerca de 4 vezes em meio mínimo (WENGELNIK; VAN DEN ACKERVEKEN; BONAS, 1996).

O controle da expressão do gene *hrpG* de *H. seropedicae* foi determinado na estirpe mutante VShrpG. A estirpe VShrpG contém um cassete *lacZ-Km<sup>R</sup>*, com o gene *lacZ* na mesma orientação do promotor do gene *hrpG*. Nesta construção, o gene *lacZ* não apresenta seqüência promotora e, portanto, a atividade de  $\beta$ -galactosidase observada é devido a atividade da seqüência promotora do gene *hrpG* presente no DNA cromossomal de *H. seropedicae*.

Visando observar a expressão do promotor *hrpG* de *H. seropedicae*, foi utilizado o meio mínimo NFbHP-malato, cuja única fonte de carbono é o malato. Foi adicionado ao meio a fonte de nitrogênio cloreto de amônio nas concentrações de 2 mmol/L ou 20 mmol/L com ou sem adição de componentes vegetais: naringenina 50 $\mu$ M, extrato de cana-de-açúcar 5% ou exsudato de milho, sendo este último utilizado como substituinte do meio NFbHP-malato. Os resultados são apresentados na figura 18.

FIGURA 18 - EFEITO DE  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , NARINGENINA, EXTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR E EXSUDATO DE MILHO NA ATIVIDADE DO PROMOTOR *hrpG* DA ESTIRPE VShrpG



A atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinada como descrito por MILLER (1992) e está expressa em nmol o-nitrofenol/(min.mg proteína). *H. seropedicae* estirpes SmR1 e VShrpG (*hrpG::lacZ-Km<sup>R</sup>*) foram cultivadas em meio NFbHP-malato suplementado com 2 mmol/L (-N) ou 20 mmol/L (+N) de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fonte de nitrogênio. Os indutores utilizados foram naringenina 50  $\mu\text{mol/L}$ , extrato de cana-de-açúcar 5% ou exsudato de milho, sendo este último substituinte do meio NFbHP-malato. As culturas foram crescidas a 30 °C sob agitação de 120rpm. A atividade de  $\beta$ -galactosidase na estirpe selvagem SmR1 foi inferior a 4 o-nitrofenol/(min.mg proteína). Os valores representam a média ( $\pm$  desvio padrão) de três experimentos independentes.

A expressão de *hrpG::lacZ* ocorreu em todas as condições testadas. Da mesma forma, em todas as condições testadas (com ou sem adição dos componentes vegetais ao meio) ocorreu uma diferença não significativa na expressão em baixa ou alta concentração de cloreto de amônio. Assim, o aumento da concentração da fonte de nitrogênio cloreto de amônio parece não estar envolvido na ativação da fusão *hrpG::lacZ* em *H. seropedicae*. Contudo, novos ensaios deverão ser realizados para determinar a influência de outras fontes de nitrogênio na expressão de *hrpG*, a exemplo do que ocorre em algumas bactérias onde a expressão dos genes *hrp* é apenas em meio de cultura deficiente em fonte de nitrogênio. Para *E. amylovora*, por exemplo, altas concentrações de cloreto ou sulfato de amônio, e fontes de nitrogênio como histidina e asparagina reprimem a expressão dos genes *hrp* para quantidades semelhantes à expressão em meio complexo (WEI, SNEATH, BEER, 1992). Em *R. solanacearum*, o crescimento em fontes complexas de nitrogênio (peptona, casaminoácidos) também inibe a expressão destes genes para 5% do observado em meio mínimo (ARLAT *et al.*, 1992).

Outros fatores que poderiam influenciar a expressão de *hrpG* seriam aqueles produzidos por plantas. Desta forma, foi utilizado como possível indutor o extrato de cana-de-açúcar, na concentração de 5%. Um estudo realizado por DUARTE-ALMEIDA e colaboradores (2006) revelou a identidade e quantidade de componentes fenólicos do extrato da cana-de-açúcar, mostrando a predominância de flavonas (derivados de apigenina, luteolina e tricina), misturado com flavonóides, hidroxicinâmicos, ácidos caféico e sinápico, ácidos fenólicos. A influência de compostos fenólicos e flavonóides na regulação da patogenicidade e simbiose já foi demonstrada em *Agrobacterium* e *Pseudomonas* spp, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, e *Sinorhizobia* spp (LONG, 1989; WININS, 1990; MO, GROSS, 1991; NESTER, GORDON, 1992). Em relações de simbiose *Rhizobium*-leguminosas, flavonóides induzem a expressão dos genes *nod* requeridos para a colonização e nodulação do hospedeiro (DÉNARIÉ, CULLIMORE 1993), enquanto que em bactérias fitopatogênicas estes compostos induzem a expressão de genes de virulência (RAHME *et al.*, 1992; PÜHLER *et al.*, 2004). Em associações não patogênicas e não simbióticas também tem sido observada a influência de flavonóides. Foi verificado que em *H. seropedicae*, luteolina e apigenina contribuem significativamente para a colonização de raízes de *Arabidopsis thaliana* (GOUGH *et al.*, 1997; WEBSTER *et al.*,



1998). Uma vez que *H. seropedicae* não promove a formação de nódulos nem causa doenças em vegetais, é possível que os flavonóides induzam a expressão de outros genes envolvidos com a colonização. Contudo, o mecanismo responsável pelo estímulo da colonização por flavonóides é ainda desconhecido. Sugere-se que sirvam como substrato ou promotor de crescimento bacteriano. COOPER, RAO (1995) demonstraram que *Rhizobium* é capaz de utilizar flavonóides como fonte de energia. Entretanto evidências sugerem que estes compostos podem também ter a função de aumentar a tolerância de bactérias contra toxinas de defesa da planta liberadas durante a colonização (PARNISKE, AHLBORN, WERNER, 1991). Nas condições testadas, a utilização de extrato de cana-de-açúcar como possível indutor da expressão da proteína HrpG de *H. seropedicae* não resultou em aumento de atividade de  $\beta$ -galactosidase da fusão *hrpG::lacZ*. Entretanto, será necessário realizar novos ensaios antes de concluir que extrato de cana-de-açúcar não afeta a expressão de *hrpG* em *H. seropedicae*. A presença de componentes como fontes de nitrogênio e de carbono no extrato de cana-de-açúcar, podem atuar como repressores da expressão de *hrpG*. Outro fator que pode afetar a expressão de *hrpG* é a alta densidade celular observada nesta condição de cultivo. Já foi demonstrado que em *R. solanacearum* a alta densidade celular é um indicador de suficiência de nutrientes que em resposta reprime o uso do T3SS (SHELL, 2000).

A naringenina é um composto fenólico com grande influência na expressão de genes envolvidos na colonização por bactérias patogênicas, simbióticas e comensais (GOETHALS *et al.* 1989; GOUGH *et al.*, 1997; WEBSTER *et al.*, 1998). Baixas concentrações de naringenina (50 $\mu$ mol/L) adicionada no meio de crescimento de plantas promoveram de forma significativa a colonização de *Azorhizobium caulinodans* ORS571 em monocotiledoneas e dicotiledôneas. Efeito semelhante foi observado em *H. seropedicae* e *Azospirillum brasilense* SP245 na colonização de *Arabidopsis thaliana* e trigo, respectivamente (GOUGH *et al.*, 1997; WEBSTER *et al.*, 1998). Assim como ocorre com outros flavonóides, o mecanismo do estímulo para colonização gerado pela naringenina é desconhecido. Embora a naringenina seja o mais eficiente indutor dos genes *nod* em *Azorhizobium caulinodans* ORS571 (GOETHALS *et al.* 1989), este composto parece estar envolvido na expressão de outros genes necessários para colonização (GOUGH *et al.*, 1997; WEBSTER *et al.*, 1998). Em *Rhizobium meliloti* foi observada sua influência no crescimento bacteriano (HARTWIG, JOSEPH, PHILLIPS, 1991), sugerindo que assim como

outros compostos fenólicos, a naringenina possa servir como fonte de carbono para obtenção de energia pela bactéria durante os primeiros estágios de colonização. A utilização de naringenina como indutor da expressão da fusão *hrpG::lacZ* de *H. seropedicae* não proporcionou uma diferença significativa na atividade de  $\beta$ -galactosidase. Pode ser que a expressão de HrpG em *H. seropedicae* seja semelhante a de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, cujo nível de expressão basal não se altera em condições de expressão dos demais genes *hrp/hrc* (WENGELNIK, VAN DEN ACKERVEKEN, BONAS, 1996; WENGELNIK, ROSSIER, BONAS, 1999; BRITO *et al.*, 1999).

Certos componentes de exsudatos de raízes podem servir como quimioatraentes para bactérias da rizosfera quando em concentrações baixas (em torno de  $10^{-9}$  mmol/L) (VAN OVERBEEK, ELSAS, 1995). Compostos aromáticos como benzoato, compostos fenólicos, sacarose, glucose, frutose, e certos aminoácidos atraem espécies de *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, e *Pseudomonas* (LOPEZ-DE-VICTORIA, LOVELL, 1993; BAUER, CAETANO-ANOLLE'S, 1991; ASHBY, WATSON, SHAW, 1987; NIKATA *et al.*, 1992; CHET, ZILBERSTEIN, HENIS, 1973). Genes de virulência (*vir*) de *Agrobacterium tumefaciens* são induzidos por acetosiringona (WINANS, 1992), e os genes *hrp* de *Erwinia amylovora* (WEI, SNEATH, BEER, 1992) e *Ralstonia solanacearum* (ARLAT *et al.*, 1992), bem como o gene de avirulência *avrD* de *Pseudomonas syringae* (SHEN, KEEN, 1993) são induzidas por vários componentes presentes em exsudatos de raiz. A utilização de exsudato de milho não proporcionou diferença significativa na expressão da fusão *hrpG::lacZ* de *H. seropedicae*.

Os resultados parecem indicar que a expressão do gene *hrpG* em *H. seropedicae* pode ser considerada constitutiva, a exemplo do que ocorre em *X. campestris* pv. *vesicatoria*, que possui um nível de expressão basal de *hrpG* mesmo em meios complexos, sendo a expressão levemente aumentada em meios mínimos. Como mencionado anteriormente, condições de expressão dos genes *hrp/hrc* não alteram a expressão de HrpG desta bactéria (WENGELNIK, VAN DEN ACKERVEKEN, BONAS, 1996; WENGELNIK, ROSSIER, BONAS, 1999; BRITO *et al.*, 1999). Em *R. solanacearum* o gene *hrpG* é constitutivamente expresso, tanto em meios complexos quanto em meios mínimos, sendo provável que o determinante da ativação do restante dos genes do sistema de secreção do tipo III seja a fosforilação de HrpG pela proteína quinase sensora (BRITO *et al.*, 1999). Contudo, a expressão

de *hrpG* é aumentada 20 vezes quando *R. solanacearum* é co-cultivada com células de *Arabidopsis* e de tomate, em comparação a expressão em meio sem células vegetais; e a expressão é ainda maior quando esta bactéria é inoculada na planta hospedeira (ALDON *et al.*, 2000). Estes dados mostram a necessidade de se testar outras condições de ensaio em *H. seropedicae*.

A expressão de HrpG de *R. solanacearum* parece ser influenciada por uma regulação dependente de Prh (BRITO *et al.*, 1999). A proteína de membrana PrhA é a provável receptora de sinal da planta (MARENDA *et al.*, 1998) e transmite o sinal à PrhR, que em resposta ativa PrhI. PrhI induz a transcrição de *prhJ*, levando a expressão de *hrpG*. A proteína HrpG ativa a expressão do gene *hrpB*, um ativador da transcrição de genes *hrp* e de outros genes localizados fora do cluster *hrp* cujos produtos de codificação são secretados via maquinaria do T3SS (GENIN *et al.*, 1992). No entanto foi observado que mutações da proteína PrhA não afetaram a expressão dos genes *hrp/hrc* em meio mínimo, nem quando a bactéria foi inoculada em tomate; somente mutantes HrpG alteram a expressão de HrpB e conseqüentemente dos demais genes do T3SS, o que comprova sua importância na regulação (MARENDA *et al.*, 1998).

Já em *X. campestris*, nenhum fator “upstream” afeta a expressão de *hrpG* (WENGELNIK, VAN DEN ACKERVEKEN, BONAS, 1996). Neste organismo, a atividade de HrpG parece ser controlada por um sinal não definido capaz de provocar sua fosforilação. Este indício foi demonstrado em experimentos de mutações pontuais próximas ao provável sítio de fosforilação de HrpG desta bactéria, o que levou a expressão constitutiva de genes *hrp* em meio complexo. Contudo mutações no domínio C-terminal ocasionaram o mesmo efeito, provavelmente pelo aumento da afinidade de HrpG ao DNA. Dessa forma se torna necessária a validação e esclarecimento de muitos aspectos do modelo regulatório de HrpG (WENGELNIK, ROSSIER, BONAS, 1999).

Na bactéria de estudo *H. seropedicae* não foi encontrada a presença de genes *prh* codificadores de proteínas envolvidas na regulação da transcrição dos demais genes *hrp/hrc* juntamente com a proteína chave HrpG. O produto de codificação de *hrpB* presente em *H. seropedicae* é similar a HrpB de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, onde faz parte do complexo da agulha de secreção, não estando envolvido na regulação dos genes *hrp/hrc* característicos do grupo II de bactérias fitopatogênicas (RAMOS *et al.*, 2007). É possível que HrpG de *H.*

*seropedicae* esteja envolvida na expressão de outros genes, a exemplo do que ocorre em *R. solanacearum*, numa via independente de HrpB, em que HrpG modula a expressão de outros genes necessários para a colonização da bactéria na planta hospedeira, como os genes de avirulência, codificantes da biossíntese de EPS e enzimas de degradação da parede celular de vegetais (VALLS, GENIN, BOUCHER, 2006).

Outro aspecto a ser considerado em *H. seropedicae*, é a presença do gene *hrpL* que codifica para um fator sigma necessário para a ativação dos genes *hrp/hrc* em bactérias do grupo I, representado por *P. syringae*. As proteínas reguladoras HrpR e HrpS de *P. syringae* (que se ligam ao promotor de *hrpL*) são constitutivamente ativas. Sua atividade parece ser controlada pela protease LonB e por HrpV (HUTCHESON, 2001). Pode ser que em *H. seropedicae* a proteína HrpG substitua a função de HrpR/S em ativar a transcrição de *hrpL*, o que a tornaria uma bactéria com um sistema híbrido do grupo I e II de regulação dos genes *hrp/hrc*. A regulação via HrpL está presente também em *P. fluorescens*, que assim como *H. seropedicae* é uma bactéria endofítica, o que reforça a necessidade de intensificação do estudo do sistema de secreção do tipo III em *H. seropedicae*, especialmente sua regulação.

#### 4.9 ANÁLISE IN SILICO DA SEQUÊNCIA DOS GENES HrcV E HrcC DE *H. seropedicae*

O gene *hrcV* de *H. seropedicae* possui 2088pb e codifica uma proteína com 695 resíduos de aminoácidos e massa molecular calculada de aproximadamente 76 kDa. É uma proteína formadora do poro da membrana interna do sistema de secreção do tipo III. As proteínas do complexo da membrana interna, incluindo HrcV de *H. seropedicae*, são estruturalmente similares aos componentes do corpo basal flagelar, indicando que provavelmente formem complexos em forma de anel com a função de servir como plataforma para a montagem das demais estruturas do complexo da agulha e promover a catalização de translocação de proteínas.

Análise realizada com o programa SMART (LETUNIC *et al.*, 2006) indicou que a proteína HrcV de *H. seropedicae* apresenta 7 domínios transmembrana e um potencial sítio de clivagem para seqüência sinal de exportação celular localizado entre os resíduos 39 e 40, identificado através do programa SignalP V3.0 (BENDTSEN *et al.*, 2004). Análise realizada com o programa PSORT (NAKAI e KANEHISA, 1991) indicou que a proteína HrcV está localizada muito provavelmente na membrana plasmática interna de *H. seropedicae*.

A análise realizada através do programa BLASTP revelou que a seqüência deduzida de aminoácidos desta proteína apresenta 65% de similaridade com a proteína YscV (LcrD) de *Y. enterocolitica*, 63% de similaridade com as proteínas EscV de *E. coli* e HrcV de *P. syringae* pv. tomato, além da alta similaridade com proteínas HrcV de outras bactérias fitopatogênicas.

O gene *hrcC* de *H. seropedicae* possui 2121pb e codifica uma proteína com 706 resíduos de aminoácidos e massa molecular calculada de aproximadamente 74 kDa. Este gene está localizado no final do “cluster” *hrp/hrc* de *H. seropedicae* (fig.4) e codifica para a proteína HrcC que está envolvida na formação do poro de membrana externa do sistema de secreção do tipo III. O complexo da membrana externa é parte do corpo basal da “agulha de secreção” e é formado por subunidades concêntricas de proteínas da família “Secretin”. A análise da presença de domínios na HrcC de *H. seropedicae* verificada através do programa SMART (LETUNIC *et al.*, 2006) revelou a presença, na parte central da proteína, de domínios tipo “Secretin N” (número de acesso do SMART PF03958) e “Secretin” (número de acesso do SMART PF00263) identificados por PFAM

(<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). As proteínas “secretin” compreendem uma grande família amplamente dispersas em muitas espécies de bactérias Gram-negativas. Estão presentes no T3SS (onde também são conhecidas como família de proteínas YscC) e também participam de vários processos de transporte macromolecular incluindo os sistemas de secreção do tipo II e IV (THANASSI , HULTGREN, 2000). Através da utilização do programa PSORT (NAKAI e KANEHISA, 1991), foi possível prever a localização celular da proteína HrcC de *H. seropedicae* . A análise indicou que esta proteína está localizada na membrana externa da bactéria. Foi localizado um potencial sítio de clivagem para seqüência sinal de exportação entre os resíduos 28 e 29, identificado através do programa SignalP V3.0 (BENDTSEN *et al.*, 2004).

Quando comparada com o banco de dados (GenBank) através do programa BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1997) a seqüência deduzida de aminoácidos da proteína HrcC de *H. seropedicae* apresentou similaridade com proteínas formadoras do poro da membrana externa do sistema de secreção do tipo III, entre elas HrcC de *Shigella entérica* e *P. syringae* pv. tomato (55% de similaridade), YscC de *Y. enterocolitica* (46% de similaridade). HrcC de *H. seropedicae* também apresentou similaridade com PulD de *P. aeruginosa* (46%), uma proteína com função semelhante dentro do sistema de secreção do tipo II (GENIN, BOUCHER, 1994). A proteína HrcC não apresentou homologia de seqüência com os componentes da membrana externa de flagelos. Análises das propriedades bioquímicas e estruturais da proteína MxiD de *Shigella flexneri* indicam que monômeros individuais destas proteínas associam-se em oligômeros estáveis 12 a 14 subunidades com um canal central de 5-10 nm de diâmetro (YIP , STRYNADKA, 2006). Sugere-se que HrcC de *H. seropedicae* tenha a função semelhante a descrita para MxiD de *Shigella flexneri*: envolver e sustentar a “agulha” de forma flexível (SANI *et al.*,2007).

#### 4.10 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS His-HrcV E His-HrcC DE *H. seropedicae*

Os ensaios de expressão das proteínas HrcV e HrcC de *H. seropedicae* foram realizados inicialmente em células de *E. coli* transformadas com os plasmídeos pVBLUE-HrcV e pVBLUE-HrcC, respectivamente. O vetor de expressão

utilizado (pETBlue-2) produz uma proteína heteróloga fusionada a uma cauda de histidina na região C-terminal podendo ser vantajoso para a expressão de proteínas de membrana. Além disso, o vetor pETBlue-2 permite a seleção dos plasmídeos recombinantes através de coloração em meio contendo X-gal por inativação do gene *lacZ*.

Diversas condições foram testadas, como por exemplo o tempo de indução, temperatura, composição de tampão de lise celular e bactéria hospedeira, entretanto, não foi observada a superexpressão das proteínas de interesse (resultados não apresentados).

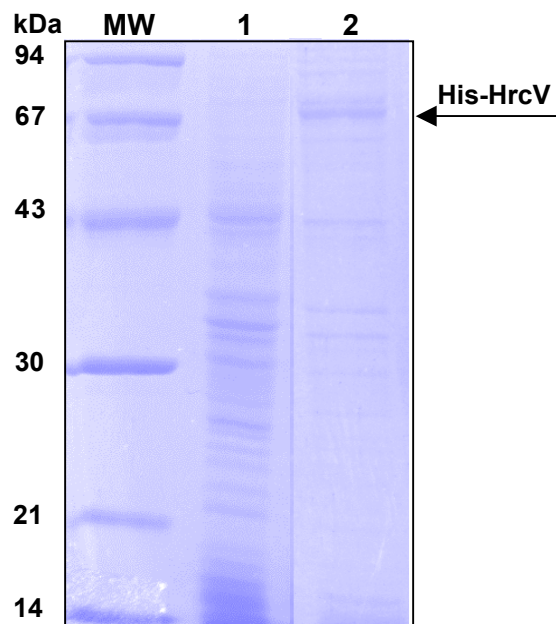
Considerando que não foi possível sequenciar inteiramente os produtos de amplificação dos genes *hrcV* e *hrcC*, devido ao tamanho extensivo de suas seqüências, não foi possível verificar a adição de mutações pela enzima DNA polimerase utilizada na reação de PCR, o que poderia por exemplo levar a expressão de proteínas truncadas. Diante disso optou-se por amplificar novamente os genes de interesse a partir do DNA cromossomal de *H. seropedicae* conforme descrito no item 3.7 de Materiais e Métodos, com a utilização da DNA polimerase com atividade revisora Platinum<sup>®</sup> Pfx (Invitrogen). As seqüências amplificadas dos genes *hrcV* e *hrcC* foram clonadas em vetor de expressão pET-28b, originando os plasmídeos pVPET-hrcV e pVPET-hrcC, respectivamente, conforme descrito no item 3.17. Este vetor é semelhante ao pET-28a utilizado para a expressão de HrpG (item 4.2), contendo seqüência para His-tag nas porções N-terminal e C-terminal e a subtração de um par de base na posição 198, permitindo a clonagem dos insertos sem alteração de sua fase de leitura pela RNA polimerase. Uma vez que os “primers” para amplificação de *hrcV* e *hrcC* não continham códon de parada de tradução, as proteínas originadas a partir do vetor de expressão pET-28b teriam duas caudas de histidina, nas posições N-terminal e C-terminal.

Os plasmídeos pVPET-hrcV e pVPET-hrcC foram transformados em célula *E. coli* BL21(λDE3) pLysS para a análise da expressão dos genes *hrcV* e *hrcC*. Dez mililitros de cultura foram crescidos e as células induzidas com IPTG. As frações protéicas totais foram analisadas em gel de poliacrilamida 7,5% sob condições desnaturantes. Observa-se na figura 19 a presença de uma banda protéica na linha 2, correspondente à fração total de células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pVPET-hrcV, que está ausente na linha controle (1) contendo a fração total de células de *E. coli* transformadas com o vetor pET28b. A banda superexpressa

apresenta migração na faixa de 70 kDa indicando a superexpressão da proteína His-HrcV.

A superexpressão da proteína HrcC a partir do plasmídeo pVPET-HrcC não foi observada nestas condições de ensaio (resultado não apresentado). Análises deverão ser realizadas para checar a integridade do gene.

FIGURA 19 – EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HIS-HRCV EM *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) pLysS A PARTIR DO PLASMÍDEO pVPET-HrcV



Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 7,5% (SDS-PAGE) de extrato celular de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)pLysS transformada com plasmídeo pET28b ou pVPET-hrcV. As células foram induzidas IPTG 0,1mmol/L por 5h a 30°C. Linha 1 - extrato total de células contendo o plasmídeo pET28b. Linha 2 - Fração total de extrato de células contendo o plasmídeo pVPET-hrcV. A seta indica a proteína His-HrcV superexpressa. MW indica os marcadores de massa molecular em kDa. O gel foi corado com Coomassie Blue. Foram aplicados 5 $\mu$ g de cada extrato protéico no gel.



#### 4.11 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HIS-HrcV DE *H. seropedicae*

A proteína HrcV de *Herbaspirillum seropedicae* contendo sequências His-tag na porção N-terminal e C-terminal foi purificada em um único passo cromatográfico em coluna de afinidade ao níquel HiTrap-Chelating-Ni<sup>2+</sup>, conforme descrito em Materiais e Métodos item 3.20. A fração solúvel do extrato celular foi aplicada na coluna de afinidade Hi-Trap Chelating Ni<sup>2+</sup>. As proteínas adsorvidas na coluna de afinidade foram eluídas em concentração crescente de imidazol, conforme descrito no item 3.20 de Materiais e Métodos. A proteína His-HrcV foi eluída com maior concentração em 300mmol/L de imidazol, e maior grau de pureza em 500mmol/L (fig. 20). A análise densitométrica realizada com as frações eluídas com 500mmol/L de imidazol (programa LabWorks – UVP) indicou uma pureza de 93%. Os dados da purificação estão mostrados no quadro abaixo:

Volume de cultura*	Fração mais concentrada	Total de proteína purificada <sup>+</sup>	Pureza <sup>#</sup>
800mL	0,5mg/mL	2,5mg	93%

\* Células de *E. coli* BL21(λDE3) *pLysS* cultivadas em LB após indução com IPTG, aproximadamente 10<sup>9</sup> células por mL.

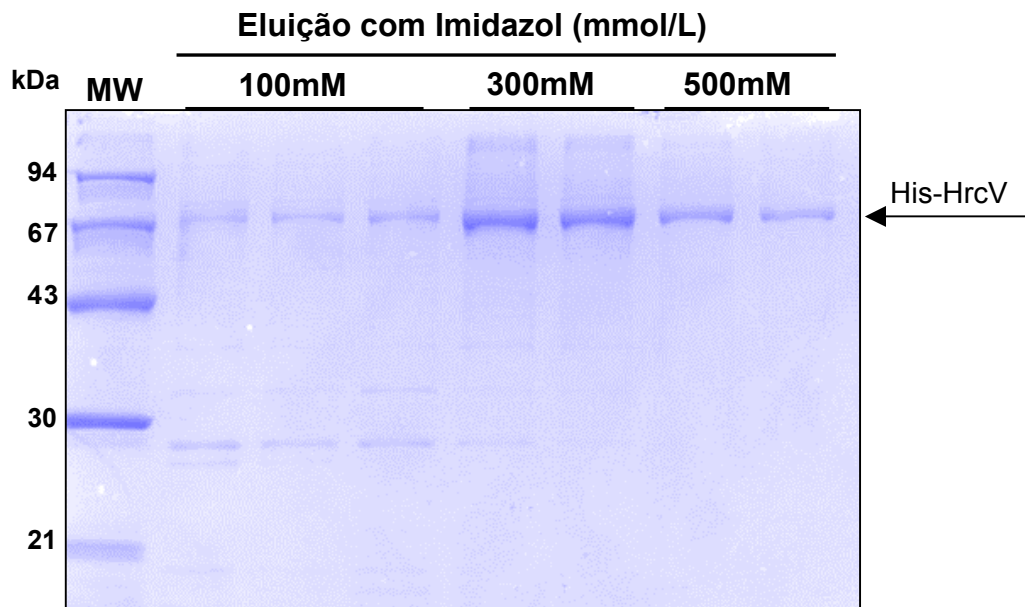
<sup>+</sup> Soma das proteínas totais presentes nas frações consideradas puras após a cromatografia.

<sup>#</sup> Análise por densitometria de gel SDS-PAGE corado com Comassie Blue contendo 2µg de proteína purificada.

#### 4.12 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DA PROTEÍNA His-HrcV

A proteína HrcV purificada foi submetida à análise espectrométrica através de MALDI-ToF para confirmação de sua identidade (fig.21). Para tanto, uma banda correspondente à eluição com 500mmol/L de imidazol, foi retirada do gel e a amostra foi preparada conforme descrito no item 3.22 de Materiais e Métodos. Dos dez valores de massa/carga (m/z) utilizadas para realizar a busca no banco de dados local, sete coincidiram com os valores de m/z dos peptídeos provenientes da digestão trípica *in silico* da ORF HrcV de *H. seropedicae*. Foi obtida uma cobertura de 12%. Todos os valores de erro padrão estão abaixo de 100ppm, tornando confiável a identificação da proteína como HrcV de *H. seropedicae*.

FIGURA 20 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-HrcV



Eletroforese em gel desnaturante (7,5% SDS-PAGE) de frações eluídas da coluna HiTrap-Chelating-Ni<sup>2+</sup> com 100, 300 e 500 mmol/L imidazol. MW-marcador de massa molecular em kDa. As proteínas foram coradas com Comassie Blue. A seta indica a proteína His-HrcV.

FIGURA 21 – ALINHAMENTO DOS PEPTÍDEOS DE His-HrcV IDENTIFICADOS POR ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE MASSA MALDI-Tof

```

MKAMGIVMLLNKFAIQLGKRAELAAALVIGIVFMLVLPMPDWLLDILIAMSLCASGLIVVAMYMAGPTAFSTFPVAVLLLTTLF
RLAISVSTTRLILLEADAGHIVETFGNFVVGNLVGLVIFLILTVVQFIVITKGSERVSEVSARFSLDAMPQMSIDSDLRAG
ILTPPEAKAKRAHLGQESQLHGAMDGAMKFVKGDAIAGICIVAINLIGGISIGIIQRGMDAGQAMQVYSILSIGDALIAQIPALL
RAHLGQESQLHGAMDGAMK
ISLGAGIITTRVSDNEEGETNIGRDIVGELFGPEKALLTAAGIMLLFGLIPGMPTVIFVALAVGLCVAGVVGMLKPLADAEMAR
ESEELEKNAGIVDLTSFAATTPFILRMNESMRGKAEAEVIRTAVRIMRNALERRGIPDLKPIDFEFSSMVPEGRVFFMMSEVP
NAGIVDLTSFAATTPFILR GIPDLKPIDFEFSSMVPEGR
KNAGIVDLTSFAATTPFILR RGIPDLKPIDFEFSSMVPEGR
LVDAEIMLGWSATRESLERVQELGFQGFERNIPGSRRRRVVVKTEDPEKLAEAGLLAESWEKVFASDIEVEMLRNCQMFVGVNEV
VQELGFQGFERN
IRFTRWAERRYPELGKEVVKTVTLRPLTEVVQRLTREGVSLRNARLLETTLDWAPKERDPDVIADYVRLAFKRQLCFEASREGL
EVILLSPELEDQLRNAMRQTSQGSYLDIDSELEQMILDRLNELSTNVSTPIVPPVLVTAADIRRSVRKLIIEEFFVPVFAFSE
EVILLSPELEDQLR
LTQHAKVKPVGMIEV

```

Alinhamento dos peptídeos provenientes da digestão *in silico* da proteína His-HrcV superexpressa, com os peptídeos da proteína HrcV de *H. seropedicae*. Dados obtidos a partir do programa Protein Prospector v. 3.2.1 utilizando o banco local com ORFs de *H. seropedicae*. Os peptídeos que confirmaram a identidade da proteína HrcV estão sublinhados em azul.

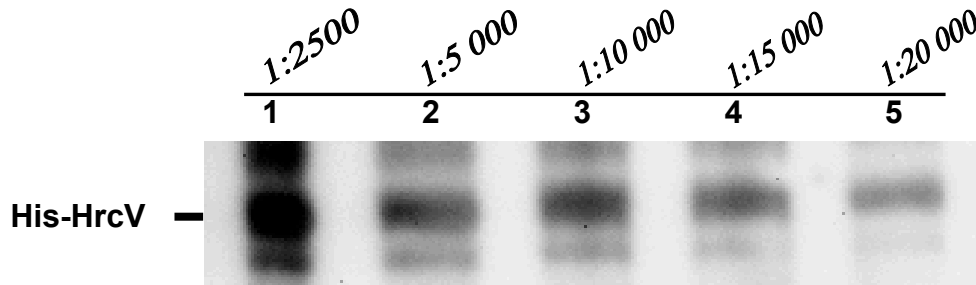
#### 4.13 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA PROTEÍNA His-HrcV DE *H. seropedicae*

A proteína His-HrcV de *H. seropedicae* purificada a partir de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) pLysS foi concentrada 3x para ser utilizada na produção de anticorpos policlonais em coelhos (conforme descrito no item 3.23). A obtenção de anticorpos policlonais contra a proteína HrcV de *H. seropedicae* é de grande importância, uma vez que se trata da proteína formadora do poro de membrana interna, e sua detecção através de imuno-ensaios poderá trazer informações a respeito da expressão de proteínas do sistema de secreção do tipo III de *H. seropedicae* e de seu funcionamento.

Ensaio de imunodeteção foram realizados com o soro coletado após a terceira imunização, conforme descrito em Materiais e Métodos item 3.24. Inicialmente, os anticorpos obtidos foram testados para determinar a diluição ideal a ser utilizada nos testes posteriores. A figura 22 mostra o efeito da diluição do anticorpo anti-HrcV contra a proteína His-HrcV purificada a partir da expressão em *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) pLysS. Foram utilizados 1  $\mu$ g de proteína total purificada. O anticorpo policlonal foi capaz de reconhecer a proteína His-HrcV em todas as diluições testadas, sendo escolhida a diluição 1:20 000 para os ensaios seguintes.

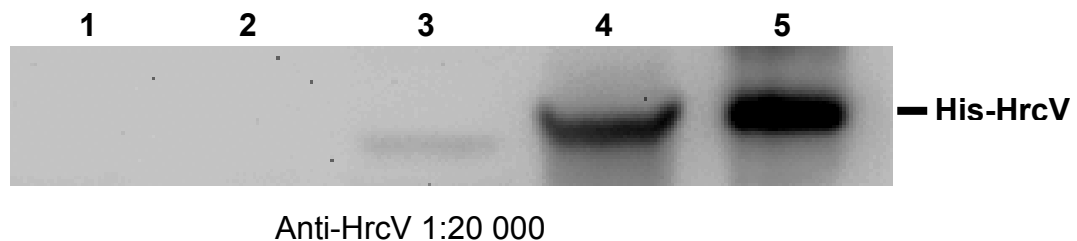
Para verificar a presença da proteína HrcV em *H. seropedicae*, ensaios de imunodeteção foram realizados utilizando extrato celular total de *H. seropedicae* e frações citoplasmática e de membrana (fig. 23). Os anticorpos anti-HrcV reconheceram uma proteína na fração de membrana de *H. seropedicae* com taxa de migração próximo ao esperado para HrcV (figura 23, linha 3). Entretanto, houve reconhecimento também de uma proteína presente no extrato celular total de *E. coli* transformada com o plasmídeo pET28b, com taxa de migração semelhante a His-HrcV. Análises realizadas com o programa BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1997) indicaram a proteína de flagelo FlhA de *E. coli* como possível candidata a resposta cruzada apresentada pelos anticorpos anti-HrcV devido à similaridade entre as duas proteínas (49%). Em vista do resultado obtido, até o momento, não é possível descartar a possibilidade de que a proteína reconhecida na fração de membrana de *H. seropedicae* seja a homóloga de FlhA neste organismo.

FIGURA 22 - IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA His-Hrcv PURIFICADA EM DIFERENTES DILUIÇÕES DO ANTICORPO



Ensaio de imunodeteção utilizando diferentes diluições dos anticorpos policlonais produzidos contra a proteína His-HrcV de *H. seropedicae*. Linhas 1 a 5 - proteína His-HrcV de *H. seropedicae* purificada a partir de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) pLysS contendo o plasmídeo pVPET-hrcV. Foram aplicados 1  $\mu$ g da proteína purificada. As diluições utilizadas estão indicadas na figura.

FIGURA 23 – IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA His-HrcV DE *H. seropedicae*



Ensaio de imunodeteção da proteína His-HrcV de *H. seropedicae*. (1) Fração celular total, (2) fração citoplasmática, e (3) fração de membrana de *H. seropedicae*. (4) Extrato de células de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) pLysS contendo o vetor pET28b. (5) 1  $\mu$ g da proteína His-HrcV purificada. Foram aplicados 10  $\mu$ g das demais frações protéicas. O anticorpo anti-HrcV foi utilizado na diluição de 1: 2x10<sup>4</sup>.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi realizada a expressão e purificação das proteínas HrpG e HrcV de *Herbaspirillum seropedicae*. Anticorpos policlonais contra as proteínas foram produzidos e utilizados para imunodeteção em extrato celular de *H. seropedicae*. Os anticorpos anti-HrcV reconheceram uma proteína com taxa de migração próximo ao esperado a HrcV na fração de membrana de *H. seropedicae*.

Análises utilizando anticorpos anti-HrpG não detectaram, nas condições testadas, a presença da proteína HrpG em extrato celular de *H. seropedicae*, sugerindo que a mesma encontra-se em baixa concentração na bactéria. Ensaio com um mutante construído contendo uma fusão cromossomal *hrpG::lacZ* indicam que a expressão de *hrpG* é constitutiva, porém ocorre em baixos níveis.

As ferramentas aqui obtidas contribuirão de forma significativa para o esclarecimento da função do sistema T3SS em *H. seropedicae*.

## 6 CONCLUSÕES

- Os genes *hrpG*, *hrcC* e *hrcV* foram clonados em vetores para superexpressão em *E. coli*.
- As proteínas His-HrpG e His-HrcV foram superexpressas e purificadas em um único passo cromatográfico utilizando uma coluna de afinidade HiTrap-Chelating-Ni<sup>+2</sup>.
- As proteínas His-HrpG e His-HrcV purificadas apresentaram taxa de pureza de 96% e 93%, respectivamente. A identidade das proteínas foi verificada por espectroscopia de massa do tipo MALDI-Tof.
- As proteínas purificadas His-HrpG e His-HrcV foram utilizadas para a obtenção de anticorpos policlonais em coelhos. Análises indicaram que a proteína HrpG em *H. seropedicae* encontra-se em baixas concentrações, dificultando a sua detecção nas condições utilizadas.
- Os anticorpos anti-His-HrcV foram capazes de reconhecer a proteína His-HrcV e proteínas similares em *E. coli*.
- Um mutante de *H. seropedicae* contendo uma fusão cromossomal *hrpG::lacZ* foi obtido. Resultados preliminares sugerem uma expressão constitutiva de *hrpG* em *H. seropedicae*.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALDON D.; BRITO, B.; BOUCHER, C.; GENIN, S. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. **EMBO J.** v. 19, p. 2304–2314, 2000.
- ALFANO, J.R.; COLLMER, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 179, p. 5655-5662, 1997.
- ALFANO, J.R.; CHARKOWSKI, A.O.; DENG, W.L.; BADEL, J.L.; PETNICKI-OCWIEJA, T.; VAN DIJK, K.; COLLMER, A. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plant. **Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A.** v.97, p.4856-4861, 2000.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLEER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDERSSON, K.; CARBALLEIRA, N.; MAGNUSSON, K.-E.; PERSSON, C.; STENDAHL, O.; WOLF-WATZ, H.; FA'LLMANN, M. YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis. **Mol. Microbiol.** v. 20, p. 1057–1069, 1996.
- ANDERSON, D.M.; SCHNEEWIND, O. Type III machines of Gram-negative pathogens: injecting virulence factors into host cells and more. **Curr. Opin. Microbiol.**, Oxford, v. 2, p. 18-24, 1999.
- ARLAT, M.; GOUGH, C.L.; ZISCHEK, C.; BARBERIS, P.A.; TRIGALET, A.; BOUCHER, C.A. Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 5, p. 187–193. 1992.
- ARNOLD, D.L.; PITMAN, A.; JACKSON, R.W. Pathogenicity and other genomic islands in plant pathogenic bacteria. **Mol. Plant Pathol.** v. 4, p.407-420, 2003.
- ASHBY, A.M.; WATSON, D.; SHAW, C.H.A. Ti-plasmid determined function is responsible for chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* towards the plant wound product acetosyringone. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 41, p. 189–192, 1987.
- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S.P. Signal in plant-microbe interactions. **Science.** v.276, p.726-732, 1997.

- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOEBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Intl. J. Sys. Bact.**, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI V.L.D., BALDANI, J.I., OLIVARES F.L.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seopedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**. v. 19, p. 65–73, 1992a.
- BALDANI, V.L.D.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Colonization of rice by the nitrogen-fixing bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Azospirillum brasilense*. In: **International Congress on Nitrogen Fixation**, 9, Cancun, México, 860 p., 1992b.
- BALDANI, V. L.D. ; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biol. Fertil. Soils**, Belgica, v. 30, p. 485-491, 2000.
- BANKIER, A.T.; WESTON, K.M.; BARREL, B.G. Random cloning and sequencing by the M13/dideoxynucleotide chain termination method. **Meth. Enzymol.**, New York, v. 155, p. 51-93, 1987.
- BAUER, W. D.; CAETANO-ANOLLE´S, G. Chemotaxis, induced gene expression and competitiveness in the rhizosphere, p. 155–162. In KLEISTER D. L. and CREGAN, P.B. (ed.), **The rhizosphere and plant growth**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1991.
- BAUER, D.W.; BOGDANOVE, A.J.; BEER, S.V.; COLLMER, A. *Erwinia chrysanthemi* *hrp* genes and their involvement in soft rot pathogenesis and elicitation of the hypersensitive response. **Mol. Plant Microbe Interact.** v.7, p. 573-581, 1994.
- BENDTSEN, J.D.; NIELSEN, H.; von HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **J. Mol. Biol.**, v. 340, p. 783-795, 2004.
- BOURRET, R.B., HESS, J.F.; SIMONS, M.I. Conserved aspartate residues and phosphorylation in served aspartate residues and phosphorylation in signal transduction by the chemotaxis protein CheY. **Pro.Natl.Acad.Sci.** v. 87, p. 41-45, 1990.
- BODDEY, R.M.; DE OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA S.; REIS, V.M.; DE OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant Soil**. v. 174, p. 195-209, 1995.
- BOGDANOVE, A.J.; BEER, S.V.; BONAS, U.; BOUCHER, C.A.; COLLMER, A.; COPLIN, D.L.; CORNELIS, G.R.; HUANG, H.C.; HUTCHESON, S.W.; PAPOULOS, J.J.; VAN GIJSEGEM, F. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. **Mol. Microbiol.** v.20, p.681-683, 1996.



- BONAS, U.; SCHULTE, R.; FENSELAU, S.; MINSAVAGE, G.V.; STASKAWICZ B.J.; STALL, R.E. Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. **Mol. Plant Microbe Interact.** v. 4, p. 81-88, 1991.
- BOUCHER, C.; MARTINEL, A.; BARBERIS, P.; ALLOING, G.; ZISCHEK, C. Virulence genes are carried by a megaplasmid of the pathogen *Pseudomonas solanacearum*. **Mol. Gen. Genet.**, New York, v. 205, p. 270-275, 1986.
- BOUCHER C.A., GOUGH C.L., ARLAT M. Molecular genetics of pathogenicity determinants of *Pseudomonas solanacearum* with special emphasis on *hrp* genes. **Annu Rev Phytopathol.** v. 30, p. 443-461, 1992.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRENCIC, A., WINANS, S.C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiol.Mol.Bio.Rev.** v. 69, p.155-194, 2005
- BRENTZ, J.; LOSADA, L.; LISBOA, K.; HUTCHESON, S.W. Lon protease functions as a negative regulator of type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. **Mol.Microbiol.** v. 45, p.397-409, 2002.
- BRITO, B.; MAREDA, M.; BARBERIS, P.; BOUCHER, C.; GENIN, S. *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. **Mol Microbiol.** v. 31, p. 237–251, 1999.
- BURRIS, R. H. Nitrogenases. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 9339-9342, 1991.
- BÜTTNER, D.; BONAS, U. Getting across – bacteria type III effector proteins on their way to the plant cell. **EMBO J.**, Oxford, v. 21, p. 5313-5322, 2002.
- CHAVES, D.J.S. **Análise proteômica das estirpes selvagem, ntrC e nifA de *Herbaspirillum seropedicae*.** p. 108 Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- CHET, I.; ZILBERSTEIN, Y.; HENIS, Y. Chemotaxis of *Pseudomonas lachrymans* to plant extracts and to water droplets collected from the leaf surfaces of resistant and susceptible plants. **Physiol. Plant Pathol.** v. 3, p.473–479, 1973.
- COG (“Cluster of Orthologous Groups of Proteins”). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>.

- COOPER, J.E.; RAO, J.R. Flavonoid metabolism in rhizobia – Mechanisms and products. **Simbiosis**, v.19, p.91-98, 1995.
- CORNELIS, G.R.; VAN GIJSEGEM, F. Assembly and function of tipe III secretory systems. **Ann. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.54, p.735-774, 2000.
- CORNELIS, G.R. The type III secretion injectisome. **Nature**, v.4, p. 811-824, 2006.
- CRUZ, L.M. SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. PEDROSA, F.O. 16S Ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **App. Environ. Microbiol.**, Washington, v.67, p. 2375–2379, 2001.
- CUNNAC, S.; OCCHIALINI, A.; BARBERIS, P.; BOUCHER, C.; GENIN, S. Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. **Mol. Microbiol.** v. 53, p.115–128, 2004.
- DE CASTRO, E.; SIGRIST, C.J.A.; GATTIKER, A.; BULLIARD, V.; LANGENDIJK-GENEVAUX, P.S.; GASTEIGER, E.; BAIROCH, A.; HULO, N. *ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins*. **Nucleic Acids Res.** v.34, p.1-4 (Web Server issue):W362-5. 2006.
- DEDECEK, A.S. **Análise da ilha genômica hrp/hrc de *Herbaspirillum seropedicae* e caracterização parcial dos genes hrcC, hrcV e hrpG**, p. 85. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- DÉNARIÉ, J.; CULLIMORE, J. Lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: A new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. **Cell.** v. 74, p.951-954, 1993.
- DENG, W.L.; PRESTON, G.; COLLMER, A.; CHANG, C.-J; HUANG, H.-C. Characterization of the *hrpC* and *hrpRS* operons of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, *tomato*, and *glycinea* and analysis of the ability of *hrpF*, *hrpG*, *hrcC*, *hrpT*, and *hrpV* mutants to elicit the hypersensitive response and disease in plants. **J.Bacteriol.** v. 180, p. 4523-4531, 1998.
- DENG, W.L.; HUANG, H.C. Cellular location of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HrcC and HrcJ proteins, required for harpin secretion via the type III pathway. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 181, p. 2298-2301, 1999.
- DENNY, T.P. *Ralstonia solanacearum*: a plant pathogen in touch with its host. **Trends Microbiol.** v. 8, p. 486–489, 2000.

- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621-631, 2004.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant-bacteria interaction: endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. **Cienc. Cult.**, v. 44, p. 310-313, 1992.
- DOWER, W.J.; MILLER, J.F.; RAGDALE, C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 6127-6145, 1988.
- DUARTE-ALMEIDA, J.M.; NOVOA, A.V.; LINARES, A.F. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. **Plant Foods Hum Nutr.** v. 61, p. 187–192, 2006.
- DUMON-SEIGNOVERT, L.; CARIOT, G.; VUILLARD, L. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21 (DE3), C41 (DE3), and C43(DE3). **Prot. Exp. Purific.** v.37, p.203-206, 2004.
- ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and *in planta* nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied and Environ. Microbiol.**, v.67, p.5285-5293, 2001.
- ENGLESBERG, E.; WILCOX, G. Regulation: positive control. **Annu. Rev. Genet.** v. 8, p. 219-242, 1974.
- FOUTS, D.E.; ABRAMOVITCH, R.B.; ALFANO, J.R.; BALDO, A.M.; ROBIN BUELL, C.; CARTINHO, S.; CHATTERJEE, A.K.; D'ASCENZO, M.; GWINN, M.L.; LAZAROWITZ, S.G.; LIN, N.; MARTIN, G.B.; REHM, A.H.; SCHNEIDER, D.J.; DIJK, K.; TANG, X.; COLLMER, A. Genome-wide identification of *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 99, p. 2275-2280, 2002.
- FREDERICK, R.D.; AHMAD, M.; MAJERCZAK, D.R.; ARROYO-RODRIGUEZ, A.S.; MANULIS, S.; COPLIN, D.L. Genetic organization of the *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* *hrp* gene cluster and sequence analysis of the *hrpA*, *hrpC*, *hrpN*, and *wtsE* operons. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 14, p.1213–1222, 2001.
- FRITZH-LINDSTEN, E.; DU, Y.; ROSQVIST, R.; FORSBERG, A. Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. **Mol. Microbiol.** v. 25, p. 1125–1139, 1997.
- FU, Z.Q.; GUO, M.; ALFANO, J.R. *Pseudomonas syringae* HrpJ is a type III secreted protein that is required for plant pathogenesis, injection of effectors, and secretion of the HrpZ1 Harpin. **J. Bacteriol.** v.188, p. 6060-6069, 2006.

- GALÁN, J.E.; COLLMER, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science**, Washington, v. 284, p. 1322-1328, 1999.
- GENIN, S.; GOUGH, C.L.; ZISCHEK, C.; BOUCHER, C.A. Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. **Mol. Microbiol.** v. 6, p. 3065–3076, 1992.
- GENIN, S., BOUCHER, C.A. A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain. **Mol. Gen. Genet.**, New York, v. 243, p. 112-118, 1994.
- GENOPAR, Programa de Sequenciamento Genômico da bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* . [www.genopar.org.br](http://www.genopar.org.br)
- GOETHALS, K.; GAO, M.; TOMEKPE, K.; VAN MONTAGU, M.; HOLSTERS, M. Common *nodABC* genes in *Nod* locus 1 of *Azorhizobium caulinodans*: nucleotide sequence and plant-inducible expression. **Mol. Gen. Genet.** v. 219, p. 289-298, 1989.
- GOUGH, C.; GALERA, C.; VASSE, J.; WEBSTER, G.; COCKING, E.; DÉNARIÉ, J. Specific flavonoids promote intercellular root colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. **MPMI.** vol. 10, p. 560–570, 1997.
- GOPALAN, S.; BAUER, D.W.; ALFANO, J.R.; LONIELLO, A.O.; HE, S.Y.; COLLMER, A. Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plant cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. **Plant Cell**, v. 8, p. 1095-1105, 1996.
- GRANT, S.R.; FISHER, E.; CHANG, J.H.; MOLE, B.M.; DANGL, J.L. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 60, p. 425-449, 2006.
- GRIMM, C.; AUFSATZ, W.; PANOPOULOS, N.J. The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* constitutes a complex regulatory unit. **Mol. Microbiol.** v.15, p.155–165, 1995.
- GUAN, K.; DIXON, J. E. Protein tyrosine phosphatase activity of na essential virulence determinant in *Yersinia*. **Science**, v. 249, p. 553–556, 1990.
- HACKSTADT, T.; FISCHER, E.R.; SCIDMORE, M.A.; ROCKEY, D.D.; HEINZEN, R.A. Origins and functions of the chlamydial inclusion. **Trends Microbiol.** v. 5, p. 288–293, 1997.
- HARTWIG, U.A.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiol.** v. 95, p. 797-803, 1991.

- HACKER, J., CARNIEL, E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. **EMBO reports**, v.2,p.376-381, 2001.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.**, v. 41, p,95-98, 1999.
- HANAHAH, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, p. 557-580, 1983.
- HE, S.Y.; NOMURA, K.; WHITTAM, T.S. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1694, p. 181-206, 2004.
- HENDRICKSON, E.L.; GUEVERA, P.; AUSUBEL, F.M. The alternative sigma factor RpoN is required for hrp activity in *Pseudomonas syringae* pv. maculicola and acts at the level of *hrpL* transcription. **J. Bacteriol.** v. 182, p. 3508–3516, 2000.
- HIGH, N.; MOUNIER, J.; PREVOST, M.-C.; SANSONETTI, P.J. IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. **EMBO J.** v. 11, p. 1991–1992, 1992.
- HUANG, H.H.; SCHUURINK, R.; DENNY, T.P.; ATKINSON, M. M.; BAKER, C.J.; YUCEL, I.; HUTCHESON, S.W.; COLLMER, A. Molecular cloning of a *Pseudomonas syringae* pv. *syreingae* gene cluster that enables *Pseudomonas fluorescens* to elicit the hypersensitive response in tobacco plants. **J.Bacteriol.** v. 170, p. 4748-4756, 1988.
- HUECK, C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, New York, v. 62, p. 379-433, 1998.
- HUERGO, L.F. **Regulação do metabolismo de nitrogênio em *Azospirillum brasilense***. p.187. Tese (Doutorado em Ciências -Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- HUTCHESON, S.W. The molecular biology of hypersensitivity to plant pathogenic bacteria. **J. Plant Pathol.**, v. 83, p. 151-172, 2001.
- HUTCHESON S.W.; BRETZ J.; SUSSAN T.; JIN S.; PAK K. Enhancer binding protein HrpR and HrpS interact to regulate *hrp*-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. **J.Bacteriol.** v. 183, p. 5589-5598, 2001.
- HUYNH, T.V.; DAHLBECK, D.; STASKAWICZ, B.J. Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. **Science.** v. 245, p.1374–1377, 1989.
- INNES, R.W.; BENT, A.F.; KUNKEL, B.N.; BISGROVE, S.R.; STASKAWICZ, B.J. Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative

- regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. **J. Bacteriol.** v. 175, p. 4859–4869, 1993.
- JACKSON, R.W.; PRESTON, G.M.; RAINEY, P.B. Genetic characterization of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 *rsp* gene expression in the phytosphere and in vitro. **J. Bacteriol.**, v.187, p. 8477–8488, 2005.
- JAMES, E.K.; OLIVARES F.L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 17, p. 77-119, 1998.
- JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W.L.; REDDY, P.M.; IANNETTA, P.P.M.; OLIVARES, F.L.; LADHA, J.K. Infection and Colonization of Rice Seedlings by the Plant Growth-Promoting Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Mol. Plant Microbe Interact.** v. 15, p. 894-906, 2002.
- KANIGA, K.; TUCKER, S.; TROLLINGER, D.; GALÁN, J.E. Homologs of the *Shigella* IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella typhimurium* entry into cultured epithelial cells. **J. Bacteriol.** v. 177, p. 3965–3971, 1995.
- KLASSEN, G; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 43, p. 887-891, 1997.
- KOCHER, T.D.; WILSON, A.C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In Brown, T. A., **Essential Molecular Biology: A Pratical Approach**, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, p.185-208, 1991.
- KOKOTEK, W.; LOTZ, W. Construction of a *lacZ*-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. **Gene**, v. 84, p. 467-471, 1989.
- KUBORI, T., MATSUSHIMA, Y., NAKAMURA, D., URALIL, J., LARA-TEJERO, M., SUKHAN, A., GALAN, J.E., AIZAWA, S. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. **Science** v. 280, p. 602–605, 1998.
- KUBORI, T.; SUKHAN, A.; AIZAWA, S.I.; GALAN, J.E. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.97, p. 10225-10230, 2000.
- KUTSU, S.; SANTERO, E.; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEISS, D. Expression of  $\sigma^{54}$  (*ntxA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. **Microbiol.Rev.** v. 53, p. 367-376, 1989.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, v.277, p. 680-685, 1970.

- LEISTER, R.T.; AUSUBEL, F.M.; KATAGIRI, F. Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the Arabidopsis genes RPS2 and RPM1. **Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 93 , p.15497– 15502, 1996.
- LINDGREN, P.B.; PEET, R.C.; PANOPOULOS, N.J. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. **J. Bacteriol.**, v. 168, p. 512-522, 1986.
- LETUNIC, I.; COPLEY, R.R.; PILS, B.; PINKERT, S.; SCHULTZ, J.; BORK, P. SMART 5: domains in the context of genomes and networks. **Nucleic Acids Res.**, v.34, p. 257-260, 2006.
- LONG, S.R. Rhizobium genetics. **Annu. Rev. Genet.** v. 23, p. 483-506, 1989.
- LOPEZ-DE-VICTORIA, G.; LOVELL, C.R. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 59, p. 2951–2955, 1993.
- MA, W.; DONG, F.F.T.; STAVRINIDES, J.; GUTTMAN, D. Type III effector diversification via both pathoadaptation and horizontal transfer in response to a coevolutionary arms race. **PLoS Genet.** v. 2, p.2131-2142, 2006.
- MARENDA, M.; BRITO, B.; CALLARD, D.; GENIN, S.; BARBERIS, P.; BOUCHER, C.; ARLAT, M. PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes in the presence of plant cells. **Mol. Microbiol.** v 27, p.437–453, 1998.
- MILLER J. H. **Experiments in Molecular Genetics**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1992.
- MOTA, L.J.; SORG, I.; CORNELIS, G.R.. Type III secretion: the bacteria-eukaryotic cell express. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 252, p.1-10, 2005.
- MO, Y-Y.; GROSS, D.C. Plant signal molecules activate the *syrB* gene, which is required for syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **J. Bacteriol.** v. 173, p.5784-5792, 1991.
- MO, Y.Y.; GEIBEL, M.; BONSALL, R.F.; GROSS, D.C. Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) leaves for plant signal molecules that activate the *syrB* gene required for synthesis of the phytotoxin, syringomycin, by *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. **Plant Physiol.** v. 107, p. 603–612, 1995.
- MURPHY, P.J.; WEXLER, M.; GRZEMSKI, W.; RAO, J.R.; GORDON, D.M. Rhizopines—their role in symbiosis and competition. **Soil. Biol. Biochem.** v. 27, p.525–529, 1995.

- NAKAI, K.; KANEHISA, M. Expert system for predicting protein localization sites in Gram-negative bacteria. **Proteins**, v.11, p. 95-110, 1991.
- NESTER, E.W.; GORDON, M.P. Molecular strategies in the interaction between *Agrobacterium* and its hosts. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.** v. 1, 1992.
- NIKATA, T.; SUMIDA, K.; KATO, J.; OHTAKE, H. Rapid method for analyzing bacterial behavioral responses to chemical stimuli. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 58, p. 2250–2254, 1992.
- NOËL, L.; THIEME, F.; NENNSTIEL, D.; BONAS, U. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Mol. Microbiol.** v. 41, p. 1271-1281, 2001.
- NOINDORF, L **Identificação e caracterização do operon *orf1glnkamtb* e do gene *amth* de *Herbaspirillum seropedicae*.** p. 157. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- NOVAGEN [www.emdbiosciences.com](http://www.emdbiosciences.com)
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biol. Fertil. Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.
- OLIVEIRA, A.L.M., URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant Soil**, v. 242, p. 205 – 215, 2002.
- PARNISKE, M.; AHLBORN, B.; WERNER, D. Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean rhizobia. **J.Bacteriol.** v. 173, p. 3432-3439, 1991.
- PARKINSON, J.S., KOFOID, E.C. Communication modules in bacterial signaling proteins. **Annu. Rev. Genet.** v.26, p. 71-112, 1992.
- PARSOT, C.; HAMIAUX, C.; PAGE, A. L. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. **Curr. Opin. Microbiol.**, Oxford, v. 6, p. 7-14, 2003.
- PEDROSA, F. O. Fixação biológica de nitrogênio: fértil idéia. **Ciência Hoje**, v. 6, p. 12-13, 1987.
- 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. 9, p. 189-195, 2001.
- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J., HIRANO, S. (Eds), **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag, p. 179-197, 1991.



PFAM <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>.

PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans*. and *Herbaspirillum seropedicae* . **Plant Soil**, v. 137, p. 61-65, 1991.

PRESTON, G.M., BERTRAND, N.; RAINEY, P.B. Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. **Mol. Microbiol.** v.41, p. 999-1014, 2001.

PROTEIN PROSPECTOR <http://prospector.ucsf.edu/>

PUGSLEY, A.P. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. **Microbiol.Rev.**, Washington, v. 57, p.50-108, 1993.

PÜHLER, A. ARLAT, M.; BECKER, A.; GOTTFERT, M.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F. What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 7, p. 137-147, 2004.

PULSEN, I.T.; PRESS, C.M.; RAVEL, J. KOBAYASHI, D.Y.; MYERS, G.S., *et al.* Complete genome sequence of the plant comensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **Nat. Biotechnol.** v.23, p.873-878, 2005.

RAHME, L. G.; MINDRINOS, M.N.; PANOPOULOS, N.J. Plant and environmental sensory signals control the expression of hrp genes in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. **J. Bacteriol.** v. 174, p.3499–3507, 1992.

RAMOS, A.R.; MORELLO, J.E.; RAVINDRAN, S.; DENG, W-L.; HUANG, H-C.; COLLMER, A. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. syringae 61 type III secretion system Hrp proteins that can travel the type III pathway and contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. **J. Bacteriol.** v. 189, p. 5773-5778, 2007.

RESSONICO, F. BINDER, C. DEFAGO, G.; MOENNE-LOCCOZ, Y. The type III secretion system of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* KD targets the phytopathogenic Chromista *Pythium ultimum* and promotes cucumber protection. **Mol. Plant Microbe Interact.** v.18, p. 991-1001, 2005.

RONCATO-MACCARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA. Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. **Symbiosis**, USA, v. 35, p. 01-10, 2003a

RONCATO-MACCARI, L.D.B; RAMOS, H.J.O; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v.45, p.39-47, 2003b

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.74, p.5463-5467, 1977.
- SANI, M.; ALLAOUI, A.; FUSETTI, F.; OOSTERGETEL, G.T.; KEEGSTRA, W.; BOEKEMA, E.J. Structural organization of the needle complex of the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. **Micron**, v. 38, p. 291-301, 2007.
- SHELL, M.A. Control of virulence and pathogenicity genes of *Rasltonia solanacearum* by an elaborate sensory network. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 38, p. 263-292, 2000.
- SCHWAB, S. **Identificação e análise de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pela disponibilidade de amônio**. p. 162. Tese (Ciências -Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- SCHULTE, R.; BONAS, U. Expression of the *Xhantomonas campestris* pv. *vesictoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. **J. Bacteriol.** v. 174, p. 815-823, 1992a.
- SCHULTE, R.; BONAS, U. A *Xanthomonas* pathogenicity locus is induced by sucrose and sulfur-containing amino acids. **Plant Cell.** v.4, p.79-8, 1992b.
- SHEIN, C.H.; NOTEBORN, M.H. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. **Bio/Technology**, v. 6, p.291-294, 1988.
- SHEN, H.; KEEN, N.T. Characterization of the promoter of avirulence gene D from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **J. Bacteriol.** v. 175, p. 5916-5924, 1993.
- SCOFIELD, S.R.; TOBIAS, C.M.; RATHJEN, J.P.; CHANG, J.H.; LAVELLE, D.T.; MICHELMORE, R. W.; STASKAWICZ, B.J. Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. **Science**, v. 274, p. 2063-2065, 1996.
- SOUZA, E.M. **Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*** . p.264. Tese (Doutorado Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1990.
- SOUZA, E.M.; MACHADO, H.B.; YATES, M.G. Deletions analysis of the promoter region of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae*. In: **Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications**. TIKHONOVICH, I.A.; NIKOLAI, A. P.; VASSILY, I.R.; WILLIAM, E.N. eds. X International Congress in Nitrogen Fixation. St. Petersburg, p.260, 1995.
- STACHEL, S.E.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P.C. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA

- transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**. v.318, p. 624–629, 1985.
- STOCK, J.B.; NINFA, A.J.; STOCK, A.M. Protein phosphorylation and regulation of adaptative responses in bacteria. **Microbiol. Rev.** v. 53 p. 450-490, 1989.
- STOCK, J.B.; STOCK, A.M.; MOTTONEN, J.M. Signal transduction in bacteria. **Nature**. v. 344, p. 395-400, 1990.
- STOCK, A.M.; ROBINSON, V.L.; GOUDREAU, P. N. Two-component signal transduction. **Annu. Rev. Biochem.** v. 69: 183-215, 2000.
- SIMON, R.; PRIEFFER, U.; PUHLER, A.A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **BioTechnology**, v. 1, p. 784-791, 1983.
- TANG, X.; FREDERICK, R.D.; ZHOU, J.; HALTERMAN, D.A.; JIA, Y.; MARTIN, G.B. *et al.* Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. **Science**, v. 274, p. 2060–2062, 1996.
- TANG, X.; XIAO, Y.; ZHOU, J. Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. **MPMI**. v.19, p.1159-1166, 2006.
- THANASSI, D.G.; HULTGREN, S.J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Curr. Opin. Cell Biol.** v.12, p.420-430, 2000.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** v. 22, p. 4673–4680, 1994.
- VALLS, M.; GENIN, S.; BOUCHER, C. Integrated Regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Raltonia solanacearum*. **PLoS Pathogens**. v.2, p. 798-807, 2006.
- VAN OVERBEEK, L.S.; ELSAS, J.D. Root Exudate-Induced Promoter Activity in *Pseudomonas fluorescens* Mutants in the Wheat Rhizosphere. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 890-898, 1995.
- WEBSTER, G.; JAIN, V.; DAVEY, M.R.; GOUGH, C.; VASSE, J.; COCKIN, E.C. The flavonoid naringenina stimulates the intracellular colonization of weat roots by *Azorhizobium caulinodans*. **Plant Cell Environ.** v. 21, p. 373-383, 1998.
- WEI, Z. M.; LABY, R.J.; ZUMOFF, C.H.; BAUER, D.W.; HE, S.Y.; COLLMER, A.; BEER, S.V. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. **Science**, Washington, v. 257, p. 85-88, 1992.

- WENGELNIK, K.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; BONAS, U. *HrpG*, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. **Mol. Plant Microbe Interact.**, Saint Paul, v. 9, p. 704-712, 1996.
- WENGELNIK, K.; BONAS, U. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **J. Bacteriol.** v. 178, p. 3462–3469, 1996.
- WENGELNIK, K.; ROSSIER, O.; BONAS, U. Mutations in regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 6828-6831, 1999.
- WEI, Z.-M.; SNEATH, B.J.; BEER, S.V. Expression of *Erwinia amylovora* *hrp* genes in response to environmental stimuli. **J. Bacteriol.** v. 174, p. 1875–1882, 1992.
- WINANS, S.C. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. **Microbiol. Rev.** v. 56, p. 12–31, 1992.
- WINANS, S. Transcriptional induction of an *Agrobacterium* regulatory gene at tandem promoters by plant-released phenolic compounds, phosphate starvation, and acidic growth media. **J. Bacteriol.** v. 172, p. 2433-2438, 1990.
- YIP, C. K.; STRYNADKA, N.C.J. **New structural insights into the bacterial type III secretion system.** TRENDS in Biochemical Science, v. 31, p. 223-230, 2006.
- YIP, C.K.; KIMBROUGH, T.G.; FELISE, H.B.; VUCKOVIC, M.; THOMAS, N.A.; PFUETZNER, R.A.; FREY, E.A.; FINLAY, B.B.; MILLER, S.I.; STRYNADKA, N.C.J. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. **Nature.** v.435, p.702-707, 2005.
- YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H. ; EVANS, H.J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation.** London: Chapman , Hall, New York, p. 43-86, 1992.
- XIAO, Y.; LU, Y.; HEU, S.; HUTCHESON, S. W. Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp* cluster. **J. Bacteriol.** v. 174, p.1734–1741, 1992.
- XIAO, Y.; HUTCHESON, S.W. A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs expression of pathogenicity and host range determinants in *Pseudomonas syringae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 176, p. 3089-3091, 1994.
- XIAO, Y.; HEU, S; YI, J.; LU, Y.; HUTCHESON, S.W. Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. **J. Bacteriol.** v. 176, p.1025–1036, 1994.

