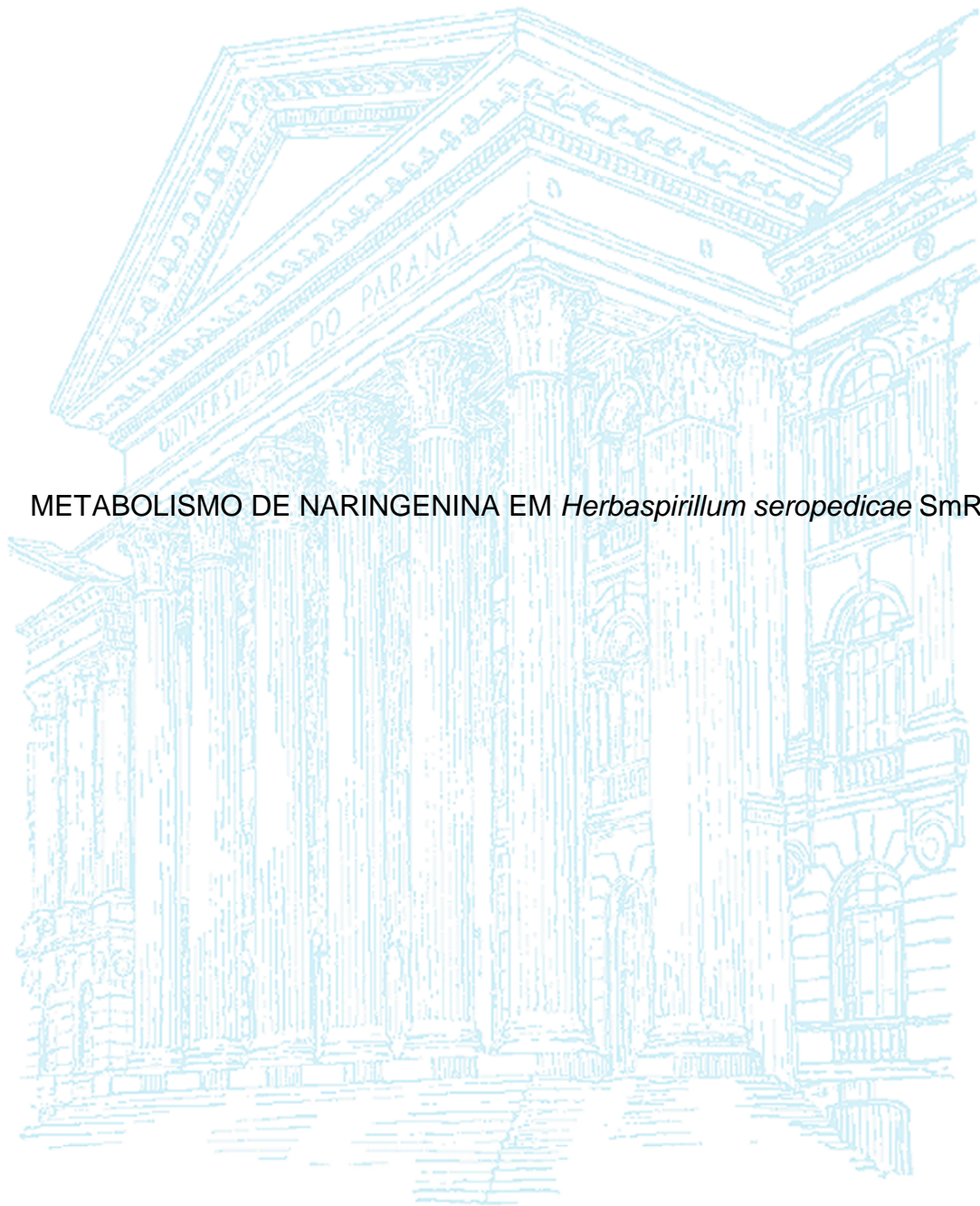


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



METABOLISMO DE NARINGENINA EM *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

CURITIBA

2013

ANELIS MARIA MARIN



METABOLISMO DE NARINGENINA EM *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Prof. Dra. Rose Adele Monteiro

Co-orientadora: Prof. Dra. Roseli Wassem

CURITIBA

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas orientadoras Dr^a. Rose Adele Monteiro e Dr^a Roseli Wassem por todos esses anos em que me orientaram, ajudaram e não me deixaram desanimar. Por todo o carinho, amizade, paciência, conselhos, e por todos os anos de orientação.

Ao Dr. Emanuel Maltempi de Souza, que de maneira igual me orientou. Por toda a ajuda, preocupação, conselhos e pela leitura criteriosa desta tese.

Aos Drs. Marcelo Müller dos Santos, Wanderson Duarte da Rocha, Leda Satie Chubatsu que foram meus avaliadores durante o doutorado. De maneira especial ao Dr. Marcelo Müller dos Santos que me acompanha desde o início deste projeto de doutorado, por todas as sugestões, e pela leitura criteriosa deste trabalho.

Aos demais professores do núcleo de fixação biológica de nitrogênio por todas as discussões, reuniões, sugestões e apoio.

Aos amigos Arquimedes Santana, Rinaldo Oliveira, Michelle Zibetti, Maria Augusta Schmidt, Carolina Heyse, Danilo Carneiro, Alison Batista, Nessana Dartora, Ana Helena Gracher, Mônia Maria Wanto e Diego Popó por todos os momentos divertidos, conselhos, amor e por me aguentarem durante todo este tempo. Amo vocês!

Ao Dr. Marco Aurélio Oliveira pela amizade, companheirismo e por toda a ajuda na correção dos resultados de ITC mostrados na tese.

Aos amigos do anexo: Thalita Tuleski, Helison Faoro, Eduardo Balsanelli, Marcelo Batista, Adriano Stefanello, Sarah Sacks e Denny Seccon por todos os momentos divididos, e aos demais amigos do laboratório.

Ao Valter Antônio de Baura por sempre estar pronto a ajudar no que preciso, e por toda a amizade.

À Roseli Prado e à Julieta Pie que sempre se preocupam e ajudam como mães.

Ao grupo de química de carboidratos deste departamento, em especial aos Drs. Guilherme Lanzi Sasaki e Lauro Mera de Souza, pela parceria no decorrer do trabalho, sugestões e amizade.

Aos Drs. Anderson Barison e Alfredo Oliveira do Departamento de Química da UFPR e a Dra. Francinete Campos do Departamento de Farmácia pela ajuda em alguns experimentos, que não estão presentes na tese, e amizade.

Ao Dr. Juan Luis Ramos e ao seu grupo de pesquisa na Estação Experimental do Zaidin em Granada (Espanha) por me aceitar durante o doutorado sanduíche. Por toda a ajuda e orientação. A sua esposa Dr. Estrella Duque por me receber com

carinho e por toda a ajuda. Aos amigos que fiz Carlos Molina, Zulema Rodriguez, Saray Santamaria, Marta Martinez, Adela Garcia, Andres Lugo, Miriam Rico, Hortencia Jimenez, Patricia Bernal, María Travieso, Ricardo Ezequiel, Alejandro Acosta, Daniel Pacheco, Ali Daddaoua, Nene Molina e Jesus de la Torre. Por me receberem, pelo carinho, amizade e ajuda. “Fue uma estancia preciosa”. Em especial ao Ali, Nene e Jesus, que além da amizade sempre me ajudaram nos experimentos.

A todos os amigos que fiz em Granada: Rebeca Alonso, Madeleide Martinez (mis eternas companeras de piso), Iviane Luna, Rodrigo Sanchez e Ricardo Minelli pela amizade e por todos os momentos compartilhados (QG Brasil na Espanha), sorrindo ou chorando; Maria Ivonete e Thiciana Souza, minhas últimas companheiras de morada; e Manoela Sosa, em quem descobri uma amiga.

À minha família, em especial a minha mãe Evanira Marin e ao meu irmão Carlos Alberto Marin, que são o meu porto seguro. Ao meu pai Santo Marin, que não está aqui para ver esta conquista, mas que sei que está feliz, e sempre está comigo. A minha sobrinha Laura, que deixou meus dias mais alegres. Por me incentivarem na busca do que quero e por entender minhas ausências desde que entrei na vida acadêmica. Pelo suporte emocional, financeiro, paciência e amor! Amo vocês de todo o coração!

À pós-graduação em Ciências (Bioquímica) da UFPR onde realizei meu mestrado e doutorado, pela oportunidade e por tudo que me proporcionou aprender.

À agência financiadora CAPES por conceder as bolsas de doutorado no Brasil e doutorado sanduíche, e ao INCT - Fixação Biológica de Nitrogênio.

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica que se associa endofiticamente com gramíneas de interesse comercial. Alguns genes de *H. seropedicae* têm a sua expressão regulada por naringenina, um flavonóide que pode ser liberado pela planta durante a interação com a bactéria. *H. seropedicae* possui um operon chamado de *fde* envolvido na degradação de naringenina. Este operon é composto por dez genes e sua transcrição é ativada pelo regulador transcricional FdeR, que é transcrito na direção oposta ao operon, e naringenina, crisina, luteolina e apigenina ativam a sua transcrição. Através de estudos de calorimetria de titulação isotérmica foram obtidas as constantes de afinidade entre FdeR e os flavonóides naringenina ou crisina que mostraram que FdeR tem maior afinidade por naringenina. Devido a sua similaridade com proteínas NodD de rizóbios, FdeR foi testada quanto a sua capacidade de induzir a transcrição do operon *nodABC* de *Rhizobium* sp. NGR234, e quanto a sua capacidade de desencadear o processo de nodulação em *Macroptilium atropurpureum* (siratro) e *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda). Os resultados mostraram que FdeR ativa parcialmente a transcrição de *nodABC*, porém não é capaz de induzir a formação de nódulos em estirpes mutantes *nodD*⁻ de *Rhizobium* sp. NGR234, provavelmente porque outras proteínas Nod são necessárias para a correta formação dos nódulos radiculares, proteínas estas não expressas por FdeR.. A estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae* utiliza naringenina como fonte única de carbono. Mutações em *fdeR* e *fdeE* eliminam a capacidade desta bactéria em utilizar naringenina como sua única fonte de carbono. A mutação em *fdeA* reduz a velocidade de degradação de naringenina substancialmente. Moléculas originadas do catabolismo da naringenina pela estirpe selvagem SmR1 foram identificadas por espectrometria de massas, permitindo propor uma via de degradação de naringenina em *H. seropedicae*. Neste microrganismo, o metabolismo da naringenina parece seguir quatro rotas distintas: (I) transformação em quercetina; (II) glicosilação; (III) clivagem do anel C; (IV) metoxilação. Considerando-se os metabólitos encontrados, e o fato de que as estirpes SmR1 (selvagem), DR2 (*fdeR*⁻) e AMM1 (*fdeA*⁻) utilizam quercetina como fonte de carbono, foi possível propor uma via de degradação para a quercetina. Uma vez que esta bactéria se associa com plantas, onde ocorre a biossíntese de flavonoides, e que estes compostos estão envolvidos no mecanismo de defesa da planta, possivelmente a degradação dos mesmos esteja associada a um mecanismo de detoxificação.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*; degradação de naringenina; genes *fde*

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is a diazotrophic bacteria that associates with several crops. Some of its genes are regulated by naringenin, a flavonoid that can be released by plants during the plant-bacteria interaction process. *H. seropedicae* has an operon named *fde* that encode proteins involved in naringenin degradation. This operon has 10 genes and its transcription is activated by the FdeR transcriptional regulatory protein, transcribed in opposite direction to the *fde* operon. This transcriptional regulator senses naringenin, chrysin, apigenin and luteolin activating the *fde* operon transcription. Isothermal titration calorimetry studies allowed to determine the dissociation constants of FdeR with naringenin or chrysin interaction. FdeR has higher affinity to naringenin. FdeR shares high similarity to rhizobia NodD proteins, and for this reason its ability to induce the transcription of the *nod* genes and the nodulation process in *Macroptilium atropurpureum* and *Vigna unguiculata* was evaluated. The results showed that FdeR is able to induce transcription of the *nodABC* from *Rhizobium* sp. NGR234, but was not able to induce the nodulation process in *nod* strains of NGR234, since other Nod proteins are necessary to the correct formation of the radicular nodules. The *H. seropedicae* wild type, SmR1, grows with naringenin as single carbon source, but mutations in *fdeR* and *fdeE* impairs growth with naringenin as single carbon source. Mutation in *fdeA* retards substantially naringenin degradation. Some molecules from naringenin catabolism were identified by mass spectrometry, allowing the proposition of a pathway for naringenin degradation in *H. seropedicae*. In this microorganism naringenin can follow four routes: (I) conversion to quercetin; (II) glycosylation; (III) direct C-ring opening; (IV) methoxylation. Considering the metabolites found and that SmR1 (wild type), DR2 (*fdeR*) and AMM1 (*fdeA*) strains are able to utilize quercetin as carbon source, it was possible to propose a pathway to quercetin degradation. Since flavonoids are involved in defense mechanisms by plants against microorganisms, flavonoid degradation may be associated with a detoxification mechanism in bacteria.

Keywords: *Herbaspirillum seropedicae*; naringenin degradation; *fde* genes

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1– ESTRUTURA BÁSICA DE UM FLAVONÓIDE..... | 14 |
| FIGURA 2 – VIA DE BIOSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES..... | 17 |
| FIGURA 3 – VIAS DE DEGRADAÇÃO DE FLAVONÓIDES PROPOSTAS EM RIZÓBIOS. | 19 |
| FIGURA 4 – VIA DE DEGRADAÇÃO DA QUERCITINA EM <i>P. putida</i> PML2. | 20 |
| FIGURA 5 – VIAS PROPOSTAS PARA A DEGRADAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM <i>Eubacterium ramulus</i> | 22 |
| FIGURA 6 - PROPOSTA PARA O MODELO DE ATIVAÇÃO DA CASCATA REGULATÓRIA EM NGR234 DE MANEIRA FLAVONÓIDE E NodD1-DEPENDENTE. | 25 |
| FIGURA 7– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM LTTR. | 26 |
| FIGURA 8 – ALINHAMENTO DO PROMOTOR <i>fdeR</i> POSSIVELMENTE DEPENDENTE DE FATOR σ^{70} ENCONTRADOS NA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES <i>fdeR</i> E <i>fdeA</i> DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i> E SEQÜÊNCIA CONSENSO PARA σ^{70} DE <i>E. coli</i> | 28 |
| FIGURA 9 - REGIÃO INTERGÊNICA ENTRE <i>fdeR</i> E <i>fdeA</i> EM <i>H. seropedicae</i> SmR1. | 28 |
| FIGURA 10 - ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>fde</i> EM DIFERENTES BACTÉRIAS. | 30 |
| FIGURA 11– VIAS PROPOSTAS PARA O METABOLISMO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS EM <i>H. seropedicae</i> | 34 |
| FIGURA 12 – ATIVAÇÃO DA EXPRESSÃO DO OPERON <i>fde</i> NA PRESENÇA DE FLAVONÓIDES..... | 59 |
| FIGURA 13 – INDUÇÃO DO OPERON <i>fde</i> NA PRESENÇA DE OUTROS COMPOSTOS AROMÁTICOS..... | 62 |
| FIGURA 14 – CALORIMETRIA POR TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DA PROTEÍNA FdeR DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i> TITULADA COM NARINGENINA E CRISINA. | 63 |
| FIGURA 15 – TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DA PROTEÍNA FdeR N-truncada DE <i>H. seropedicae</i> TITULADA COM CRISINA..... | 65 |
| FIGURA 16 - TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DA PROTEÍNA FdeR N-truncada DE <i>H. seropedicae</i> TITULADA COM NARINGENINA. | 66 |
| FIGURA 17 – ATIVAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>nodABC</i> SOB CONTROLE DE FdeR..... | 68 |
| FIGURA 18 – CRESCIMENTO DE <i>H. seropedicae</i> SmR1 E MUTANTES DR2 (<i>fdeR</i>) E AMM1 (<i>fdeA</i>) NA PRESENÇA DE NARINGENINA COMO FONTE DE CARBONO..... | 72 |
| FIGURA 19 – CRESCIMENTO DE <i>H. seropedicae</i> SmR1 E MUTANTES DR2 (<i>fdeR</i>) E AMM1 (<i>fdeA</i>) NA PRESENÇA DE QUERCETINA COMO FONTE DE CARBONO. | 73 |
| FIGURA 20 – A DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA REQUER A SÍNTESE DE NOVO DE PROTEÍNAS..... | 75 |
| FIGURA 21 – DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA POR EXTRATOS PROTEÍCOS LIVRES DE CÉLULAS. | 76 |
| FIGURA 22 – COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE DR2 COM O GENE <i>fdeR</i> | 77 |
| FIGURA 23 – COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE AMM1 COM O GENE <i>fdeA</i> | 78 |
| FIGURA 24 – COMPLEMENTAÇÃO DA ESTIRPE DR2. | 79 |
| FIGURA 25 - ANÁLISES DE CROMATOGRAFIA LÍQUICA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA DOS CONTROLES. | 80 |
| FIGURA 26 – CRESCIMENTO DE <i>H. seropedicae</i> ESTIRPE F6 UTILIZANDO NARINGENINA COMO FONTE DE CARBONO..... | 82 |
| FIGURA 27 – DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA PELA ESTIRPE F6..... | 83 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 28 – METABÓLITOS ORIGINADOS DA DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA POR <i>H. seropedicae</i> SmR1 (DO _{600nm} DE 0,6) EM NFbHPN-NARINGENINA..... | 85 |
| FIGURA 29 - ESPECTROGRAMA DA AMOSTRA ELUÍDA NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 7,2 MINUTOS. | 90 |
| FIGURA 30 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO (MS/MS) DOS ÍONS DETECTADOS ELUÍDOS NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 2,7 MINUTOS..... | 91 |
| FIGURA 31 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO (MS/MS) DOS ÍONS DETECTADOS ELUÍDOS NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 4,2 MINUTOS..... | 92 |
| FIGURA 32 – METABÓLITOS ORIGINADOS DA DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA POR <i>H. seropedicae</i> SmR1 (DO _{600nm} DE 0,6) EM NFbHP-NARINGENINA..... | 93 |
| FIGURA 33 - METABÓLITOS ORIGINADOS DA DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA POR <i>H. seropedicae</i> SmR1 (DO _{600nm} DE 1,2) EM NFbHPN-NARINGENINA E NFbHP-NARINGENINA. | 94 |
| FIGURA 34 – PERFIL DE METABÓLITOS PRODUZIDOS PELA ESTIRPE AMM1..... | 95 |
| FIGURA 35 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO (MS/MS) DOS ÍONS DETECTADOS ELUÍDOS NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 3,02 MINUTOS. | 99 |
| FIGURA 36 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO (MS/MS) DOS ÍONS DETECTADOS ELUÍDOS NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 2,49 MINUTOS. | 100 |
| FIGURA 37 - METABÓLITOS ORIGINADOS DA DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA POR <i>H. seropedicae</i> SmR1 NA PRESENÇA DE FLUOROACETATO DE SÓDIO. | 101 |
| Figura 38 – PROPOSTA DA VIA DE DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA EM <i>H. seropedicae</i> . FONTE: A AUTORA..... | 103 |
| FIGURA 39 – PRIMEIROS PASSOS DO METABOLISMO DE NARINGENINA POR <i>H. seropedicae</i> | 104 |
| FIGURA 40 – HIPÓTESE DA ROTA DE DEGRADAÇÃO DA QUERCETINA EM <i>H. seropedicae</i> | 105 |
| FIGURA 41 – FRAGMENTAÇÃO DOS ÍONS DETECTADOS NO PICO ELUÍDO EM 5,1 MINUTOS..... | 107 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 - CLASSES DOS FLAVONÓIDES..... | 14 |
| TABELA 2 – PROTEÍNAS CODIFICADAS PELO OPERON <i>fde</i> DE <i>H. seropedicae</i> E SUAS PROVÁVEIS FUNÇÕES | 31 |
| TABELA 3– BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO..... | 37 |
| TABELA 4 – ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS PARA O CULTIVO DE <i>E. coli</i> , <i>H. seropedicae</i> , E <i>Rhizobium</i> sp. NGR234..... | 43 |
| TABELA 5 – LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NO TRABALHO. | 47 |
| TABELA 6 – CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA DETERMINAR A INTERAÇÃO PROTEÍNA-LIGANTE..... | 54 |
| TABELA 7 – PARÂMETROS TERMODINÂMICOS OBTIDOS PARA FdeR LIGANDO Á NARINGENINA OU CRISINA..... | 64 |
| TABELA 8 – PARAMÊTROS TERMODINAMICOS OBTIDOS PARA FdeR N-TRUNCADA LIGANDO A CRISINA..... | 65 |
| TABELA 9 – PESO TOTAL DA PARTE AÉREA (g), NÚMERO E PESO DOS NÓDULOS DE <i>Vigna unguiculata</i> (feijão-de-corda).. | 69 |
| TABELA 10 - PESO TOTAL DA PARTE AÉREA (g), NÚMERO E PESO DOS NÓDULOS DE <i>Macroptilium atroporpureum</i> (siratro)..... | 69 |
| TABELA 11 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE SELVAGEM DE <i>H. seropedicae</i> NO TEMPO ZERO DO EXPERIMENTO. | 86 |
| TABELA 12 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS DA FRAGMENTAÇÃO (MS/MS) DA NARINGENINA DETECTADA NO MEIO DE CULTIVO DA ESTIRPE SELVAGEM DE <i>H. seropedicae</i> NO TEMPO ZERO DO EXPERIMENTO. | 86 |
| TABELA 13 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE SELVAGEM DE <i>H. seropedicae</i> APÓS 15 HORAS DE INCUBAÇÃO. | 86 |
| TABELA 14 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE SELVAGEM DE <i>H. seropedicae</i> APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO. | 87 |
| TABELA 15 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE SELVAGEM DE <i>H. seropedicae</i> APÓS 39 HORAS DE INCUBAÇÃO. | 88 |
| TABELA 16 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE SELVAGEM DE <i>H. seropedicae</i> NO TEMPO ZERO DO EXPERIMENTO. | 96 |
| TABELA 17 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE AMM1 DE <i>H. seropedicae</i> APÓS 15 HORAS DE INCUBAÇÃO..... | 96 |
| TABELA 18 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE AMM1 DE <i>H. seropedicae</i> APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO..... | 97 |
| TABELA 19 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE AMM1 DE <i>H. seropedicae</i> APÓS 39 HORAS DE INCUBAÇÃO..... | 98 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL | 13 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 13 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 2.1 FLAVONÓIDES | 14 |
| 2.1.1 Estrutura molecular | 14 |
| 2.1.2 Metabolismo | 16 |
| 2.1.3 Funções | 23 |
| 2.2 FAMÍLIA LysR DE REGULADORES DE TRANSCRIÇÃO | 23 |
| 2.3 GENES <i>fd</i> DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> | 27 |
| 2.4 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> | 33 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 35 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 37 |
| 4.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS | 37 |
| 4.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO | 39 |
| 4.2.1 Cultivo de <i>Escherichia coli</i> | 39 |
| 4.2.2 Cultivo de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> | 40 |
| 4.2.3 Cultivo de <i>Rhizobium</i> sp NGR234 | 41 |
| 4.2.4 Cultivo de siratro (<i>Macroptilium atropurpureum</i>) e feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>) cv. Red Caloona | 42 |
| 4.2.5 Antibióticos utilizados | 43 |
| 4.3 PURIFICAÇÃO DE DNA EM PEQUENA ESCALA | 44 |
| 4.4 DIGESTÃO DE DNA COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO | 44 |
| 4.5 PREPARO DO DNA PLASMIDIAL COMO VETOR DE CLONAGEM | 45 |
| 4.6 LIGAÇÃO DE DNA | 45 |
| 4.7 PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO | 45 |
| 4.7.1 Preparo de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i> | 45 |
| 4.8 CONJUGAÇÃO BACTERIANA | 46 |
| 4.9 ARMAZENAMENTO DAS ESTIRPES BACTERIANAS | 47 |
| 4.10 OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS | 47 |
| 4.11 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE MUTANTES ALEATÓRIOS | 48 |
| 4.11.1 Seleção dos mutantes | 48 |
| 4.12 ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA | 49 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.12.1 | Degradação de naringenina com células intactas..... | 49 |
| 4.12.2 | Dependência de proteínas para a degradação de naringenina..... | 50 |
| 4.12.3 | Análises por LC-MS..... | 50 |
| 4.12.4 | Degradação de naringenina na presença de extrato proteico..... | 51 |
| 4.13 | EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA FdeR E DO DOMÍNIO LysR DE FdeR 52 | |
| 4.14 | ENSAIO DE ITC (CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA)..... | 53 |
| 4.15 | DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE | 54 |
| 4.16 | ENSAIOS DE NODULAÇÃO | 55 |
| 4.16.1 | Construção do plasmídeo pnodD1fdeR | 55 |
| 4.16.2 | Ensaio de nodulação em <i>Macroptilium atropurpureum</i> (siratro) e <i>Vigna unguiculata</i> (feijão-de-corda) | 56 |
| 4.17 | ANÁLISES TRANSCRICIONAIS DE FdeR EM <i>Rhizobium</i> sp. NGR234..... | 57 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 59 |
| 5.1 | REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO OPERON fde EM <i>H. seropedicae</i> | 59 |
| 5.1.1 | Indução da expressão do operon fde por flavonóides e compostos aromáticos..... | 59 |
| 5.1.2 | Determinação das constantes de afinidade entre os flavonóides, FdeR e FdeR- truncada..... | 62 |
| 5.1.3 | FdeR no processo de nodulação em <i>Rhizobium</i> sp. NGR234 | 66 |
| 5.2 | METABOLISMO DE NARINGENINA EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> | 71 |
| 5.2.1 | Flavonóides como fonte de carbono | 71 |
| 5.2.2 | Degradação de naringenina..... | 73 |
| 5.2.3 | Construção de mutantes aleatórios e seleção de estirpes incapazes de degradar naringenina..... | 81 |
| 5.2.4 | Caracterização da via de degradação de naringenina em <i>H. seropedicae</i> | 84 |
| 5.2.5 | Proposta da via do metabolismo de naringenina em <i>H. seropedicae</i> | 102 |
| 6. | CONCLUSÕES | 110 |
| 7. | REFERÊNCIAS..... | 111 |

1. INTRODUÇÃO

As bactérias fixadoras de nitrogênio, também chamadas diazotróficas, estabelecem relações ecológicas com as plantas com as quais se associam. Estas relações podem ser simbióticas ou associativas, sendo a interação simbiótica a melhor estudada. Um exemplo de interação simbiótica é a associação leguminosa-rizóbio onde ocorre a formação do nódulo radicular. Um exemplo da interação associativa é a interação endofítica, que é o caso da associação gramínea-*Herbaspirillum*, onde as bactérias são encontradas nos espaços intercelulares do tecido vegetal, e não há formação de nódulos radiculares.

Não se sabe ao certo como ocorre a entrada de *H. seropedicae* nas raízes das plantas com as quais se associa, porém se conhecem vários genes cuja transcrição é regulada por naringenina (TADRA-SFEIR *et al.*, 2011; BALSANELLI *et al.*, 2010). Dentre estes, alguns estão relacionados com o processo de interação planta-bactéria, como é o caso de *rfbB* e *rfbC*, cujos mutantes tem a estrutura de LPS (lipopolissacarídeo) de membrana modificada (BALSANELLI *et al.*, 2010), e têm expressão aumentada na presença de naringenina. Gough e colaboradores (1997) observaram que *Arabidopsis thaliana* é colonizada por *H. seropedicae* através das fissuras das raízes laterais, e que na presença de naringenina 60% a mais destas raízes são colonizadas.

Em rizóbios, a formação do nódulo radicular depende da expressão dos genes *nod*, cuja transcrição é ativada pela proteína NodD, codificada pelo gene *nodD*. Esta proteína é uma reguladora de transcrição da família LysR, e, em muitos casos, tem sua atividade controlada por interação com flavonóides. Quando ativa, a NodD ativa a transcrição dos demais genes *nod* envolvidos no processo de nodulação. Além da função na interação leguminosa-rizóbio os flavonóides também podem estimular a colonização de arroz por *Serratia* spp. (BALACHANDAR *et al.*, 2006) e a colonização de *Arabidopsis thaliana* por *H. seropedicae* e *Azorhizobium caulinodans* ORS571 (GOUGH *et al.*, 1997).

Em *Herbaspirillum seropedicae*, uma bactéria diazotrófica endofítica encontrada em plantas da ordem Poales (BALDANI *et al.*, 1986) foi identificado um gene cuja proteína codificada apresenta 42/56% de identidade/similaridade a proteína NodD1 de *Rhizobium* sp. NGR234 (PEDROSA *et al.*, 2011). Esta proteína foi chamada

de FdeR e regula a expressão do operon *fde* (flavonoid degradation), que parece estar envolvido na degradação de flavonóides, tais como a naringenina (MARIN, 2009).

Em plantas, os flavonóides têm diversas funções, sendo uma delas a de agente antimicrobiano (XU E LEE, 2001; HASSAN E MATHESIUS, 2010), fazendo parte do mecanismo de defesa. Uma vez que *H. seropedicae* se associa com plantas, é possível que a degradação de naringenina realizada por este microrganismo faça parte de um mecanismo de detoxificação para que a bactéria consiga se manter viva no interior dos tecidos vegetais, onde é encontrada.

1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo elucidar o mecanismo de degradação do flavonóide naringenina em *H. seropedicae*, e propor sua via de degradação.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter estirpes mutantes incapazes de degradar naringenina, através da inserção aleatória do transposon Tn5 no genoma da estirpe SmR1 de *H. seropedicae*;
- Identificar por espectrometria de massa de alta resolução os intermediários do metabolismo de naringenina encontrados nas estirpes selvagem e mutantes;
- Determinar constante de afinidade e número de ligantes na interação FdeR-flavonóides por ITC (titulação calorimétrica isotérmica);
- Determinar se a proteína FdeR de *H. seropedicae* é capaz de ativar genes *nod* de *Rhizobium* sp. NGR234 e de promover a produção de nódulos em modelos experimentais de leguminosas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FLAVONÓIDES

2.1.1 Estrutura molecular

Flavonóides são metabólitos secundários, extremamente diversos, sendo encontrados em plantas vasculares e em alguns musgos (MARTENS E MITHÖFER, 2005). São formados por 2 anéis benzênicos (A e B) conectados por um anel pirano (Figura 1) (WILLIAMS *et al.*, 1986), apresentando um total de 15 átomos de carbono. Os flavonóides são divididos em classes de acordo com o nível de oxidação do anel C, enquanto que as diferenças entre os compostos dentro de uma mesma classe se devem a diferenças nos substituintes nos anéis A e B (REDDY *et al.*, 2007). A Figura 1 mostra a estrutura básica de um flavonóide, e a Tabela 1 mostra as classes dos flavonóides e estruturas de alguns compostos utilizados no decorrer deste trabalho.

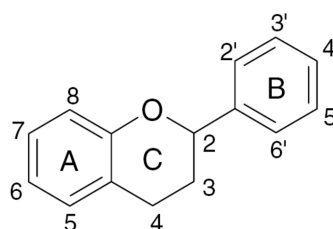
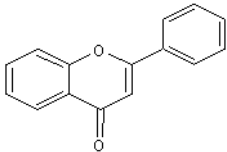
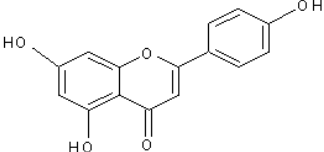
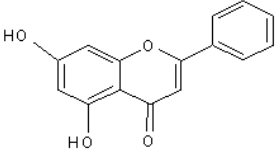
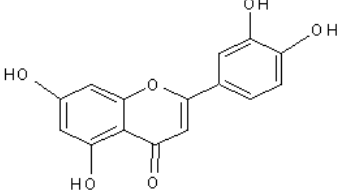
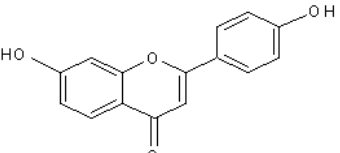
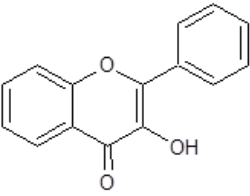
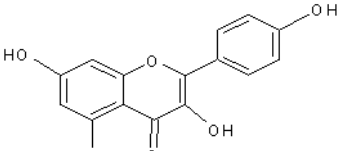
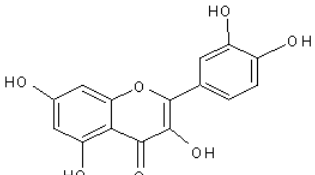
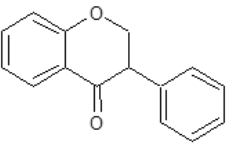
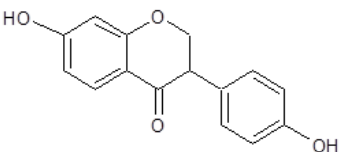


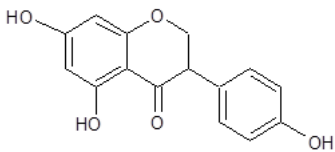
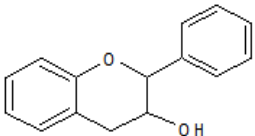
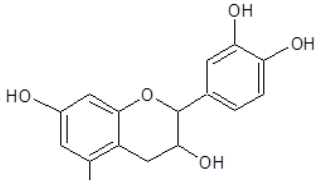
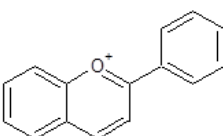
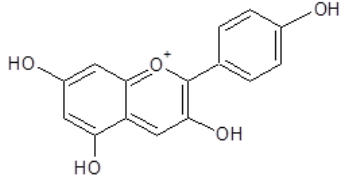
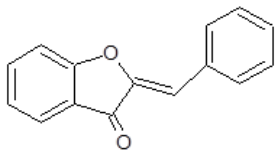
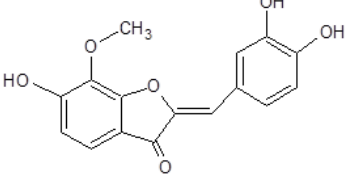
FIGURA 1– ESTRUTURA BÁSICA DE UM FLAVONÓIDE. Os flavonóides contêm os anéis A, B e C, sendo que os carbonos do anel B são identificados por um apóstrofo para diferenciá-los dos carbonos dos anéis A e C.

FONTE: WILLIAMS, 1986

TABELA 1 - CLASSES DOS FLAVONÓIDES. Classes: Chalcona, flavonona, flavona, isoflavona, flavonol, flavanol, antocianidina e aurona. Os flavonóides utilizados neste trabalho estão marcados com (*).

| Classe | Estrutura básica | Exemplo |
|---------------|------------------|-----------------------------------|
| Chalcona (*) | | Isoliquiritigenina (*) |
| Flavonona (*) | | Naringenina (*) Continua |

| | | |
|--------------------|---|---|
| <p>Flavona (*)</p> |  | <p>Continuação</p>  <p>Apigenina (*)</p>  <p>Crisina (*)</p>  <p>Luteolina (*)</p>  <p>4',7-dihidroxi flavona (*)</p> |
| <p>flavonol</p> |  |  <p>Kaempferol (*)</p>  <p>Quercetina (*)</p> |
| <p>Isoflavona</p> |  |  <p>Daidzeína (*)</p> <p>Continua</p> |

| | | |
|---------------|---|--|
| | | <p>Continuação</p>  <p>Genisteína (*)</p> |
| Flavanol |  |  <p>Catequina (*)</p> |
| Antocianidina |  |  <p>Pelargonidina</p> |
| Aurona |  |  <p>Leptosidina</p> |

FONTE: A AUTORA

2.1.2 Metabolismo

A principal reação da via de biossíntese de flavonóides (Figura 2) é a condensação de uma molécula de *p*-cumaril-CoA com 3 moléculas de malonil-CoA, originando uma chalcona intermediária (tetrahidroxi-chalcona). A partir desta chalcona é que as demais classes de flavonóides se originam (REDDY *et al.*, 2007).

Nas plantas, os flavonóides são encontrados como glicosídeos, e ao menos 8 diferentes monossacarídeos podem se ligar aos grupos hidroxila da forma aglicona do flavonóide, resultando nos muitos tipos de flavonóides descritos. As unidades glicosídicas mais comuns, encontradas nos flavonóides, são a D-glucose e a L-ramnose (WILLIAMS *et al.*, 1986).

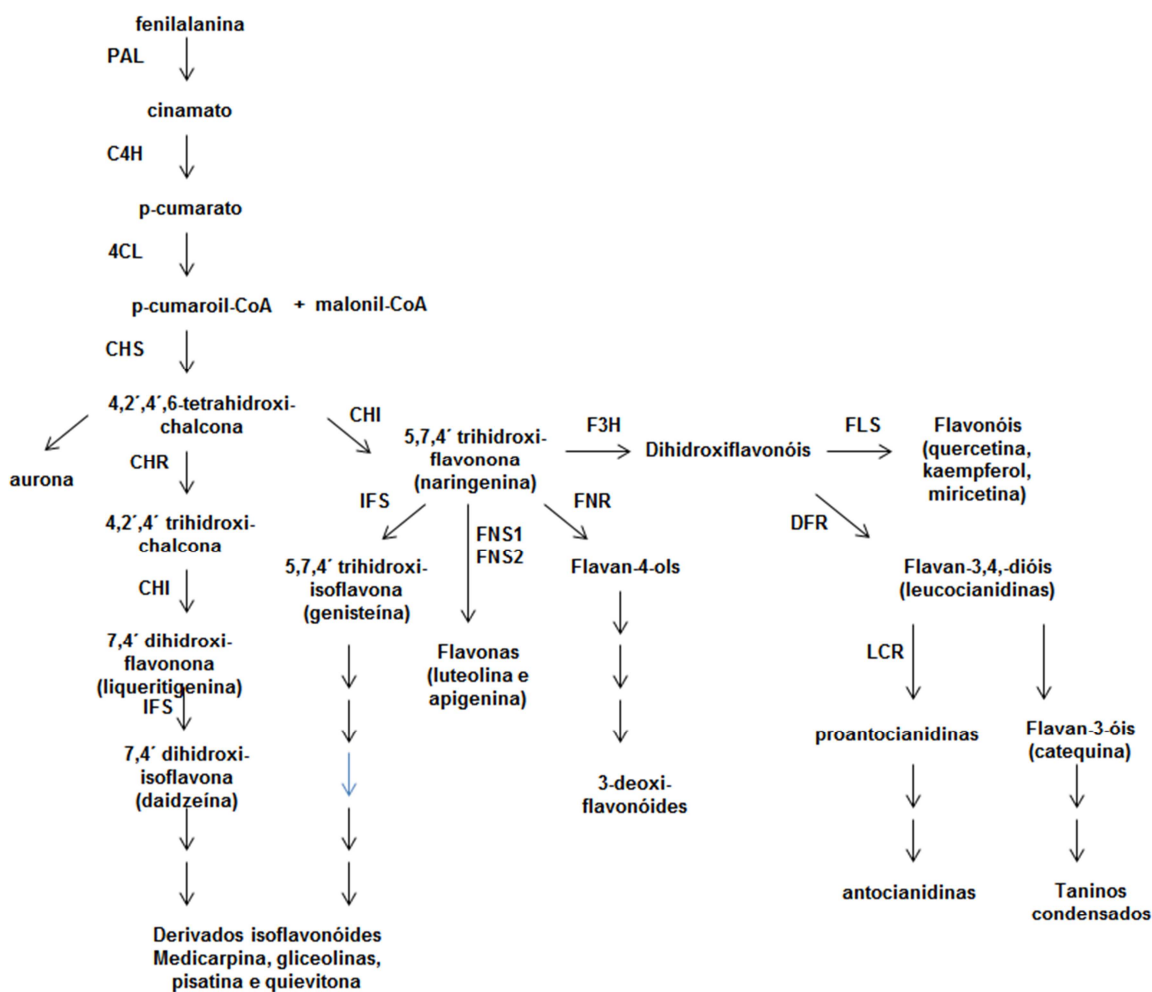
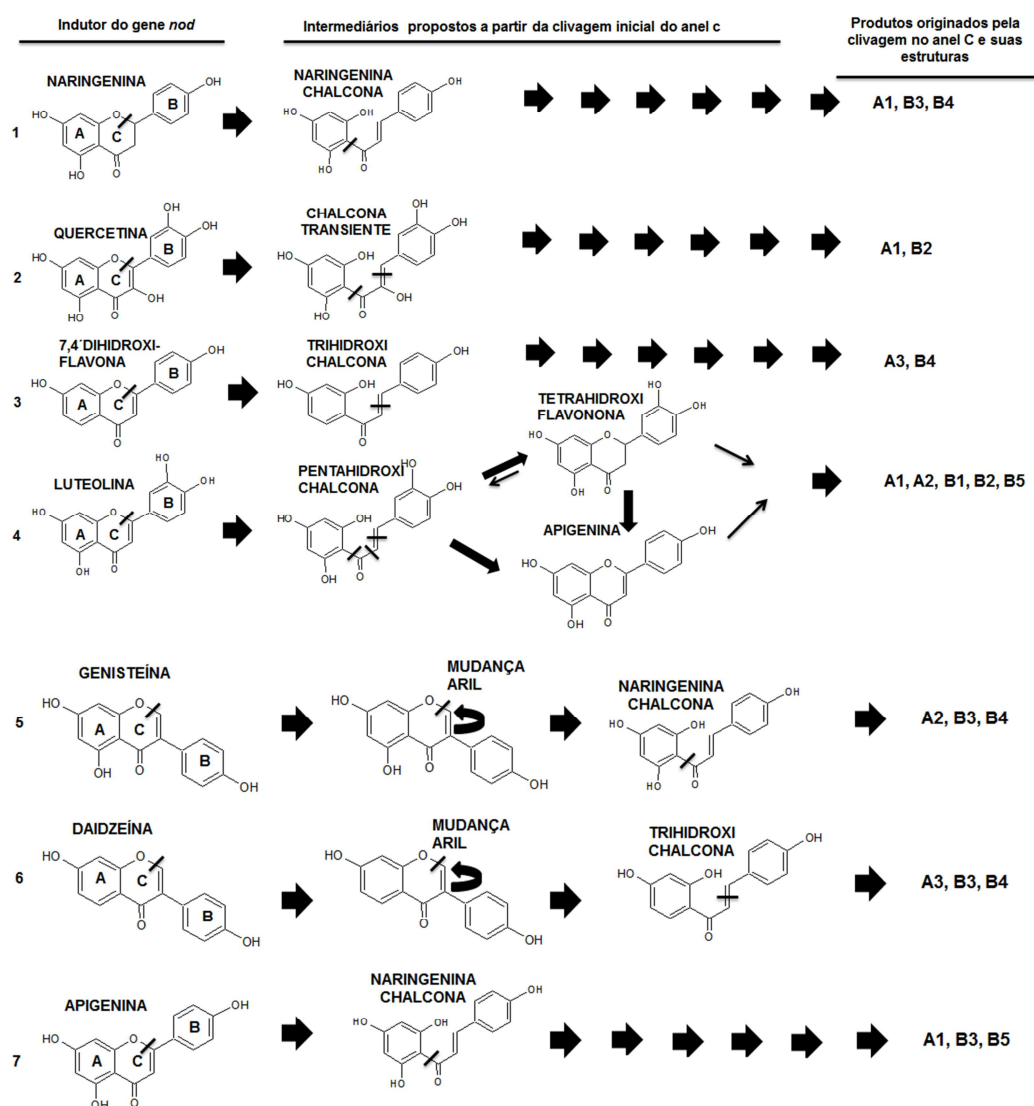


FIGURA 2 – VIA DE BIOSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES. PAL, fenilalanina amônia-liase; 4CL, 4-cumarato-CoA ligase; C4H, ácido 4-hidroxilase cinâmico; CHI, chalcona isomerase, CHR, chalcona redutase; CHS, chalcona sintase; DFR, dihidroflavonol 4-redutase; F3H, flavona 3-hidroxilase; FLS, flavonol sintase; FNR, flavona 4-redutase; FNS, flavona sintase; IFS, isoflavona sintase; LCR, leucoantocianidina redutase; PAL, fenilalanina amônia liase.

FONTE: MODIFICADO DE REDDY *et al.*, 2007

No processo de interação simbiótica, caso da interação leguminosa-rizóbio, as raízes liberam flavonóides que agem como moléculas sinalizadoras atraindo as bactérias, que então se movimentam até as raízes. Uma das proteínas-chave neste processo é a NodD. A proteína NodD ligada a flavonóides irá ativar a expressão dos genes *nod*, responsáveis pela síntese dos fatores Nod. Este processo desencadeia uma cascata regulatória que culmina no desenvolvimento dos nódulos fixadores de nitrogênio (BRENCIC E WINANS, 2005; DÉNARIÉ *et al.*, 1992; MULLIGAN E LONG, 1985). Além de estarem envolvidos na interação planta-bactéria, os flavonóides podem ser utilizados como fonte de carbono e de energia pelos microrganismos, ou simplesmente serem degradados como um mecanismo de detoxificação (RAO E

COOPER, 1994). Algumas vias de degradação dos flavonóides foram propostas e parcialmente caracterizadas, contudo as enzimas e intermediários não foram completamente descritos (BARZ 1970; PILLAI E SWARUP, 2002; RAO E COOPER, 1994; RAO *et al.*, 1991; RAO E COOPER, 1995; ARUNACHALAM *et al.*, 2003; HOOPER E MAHADEVAN, 1997; SCHOEFER *et al.*, 2003; WINTER *et al.*, 1989; BRAUNE *et al.*, 2001; JEFREY *et al.*, 1972). Rao e Cooper (1994) formularam alguns mecanismos de clivagem e seus intermediários em rizóbios (Figura 3).



Continua

Continuação

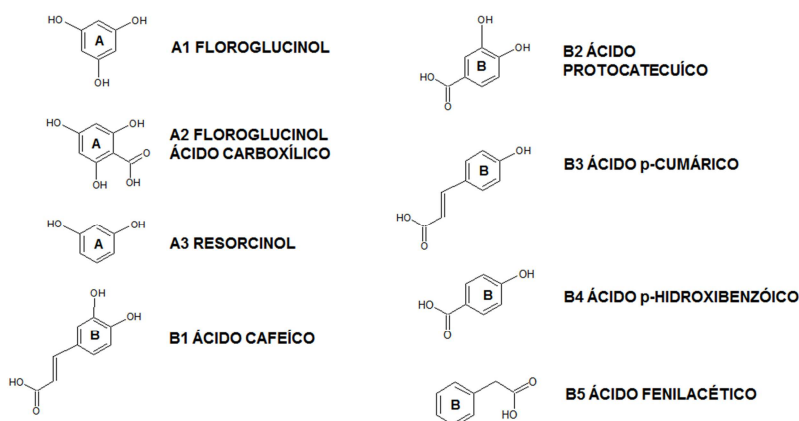


FIGURA 3 – VIAS DE DEGRADAÇÃO DE FLAVONÓIDES PROPOSTAS EM RIZÓBIOS. (1) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*; (2) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*; (3) *R. leguminosarum* bv. *trifolii*; (4) *R. meliloti*; (5) *R. fredii*; (6) e (7) *Rhizobium* sp. NGR234.
 FONTE: ADAPTADO DE RAO E COOPER, 1994

Rhizobium leguminosarum bv. *phaseoli* e *trifolii* degradam quercetina e 4',7-dihidroxiflavona, respectivamente, enquanto *R. melilotii* degrada luteolina, *R. fredii* degrada genisteína e *Rhizobium* sp. NGR234 degrada daidzeína e apigenina, contudo não se conhecem as enzimas envolvidas (RAO E COOPER, 1994). Em rizóbios, o primeiro passo da degradação é a abertura do anel-C dos flavonóides, liberando os anéis-A e B. Em 2002, Pillai e Swarup descreveram a via para a degradação da quercetina em *Pseudomonas putida* PML2, que começaria pela abertura do anel-C (Figura 4), enquanto Rao e Cooper (1994) mostraram que a degradação da quercetina se inicia pelo anel-A em *P. putida* DSM3226, indicando que o mecanismo de clivagem pode variar entre as diferentes estirpes de uma mesma espécie.

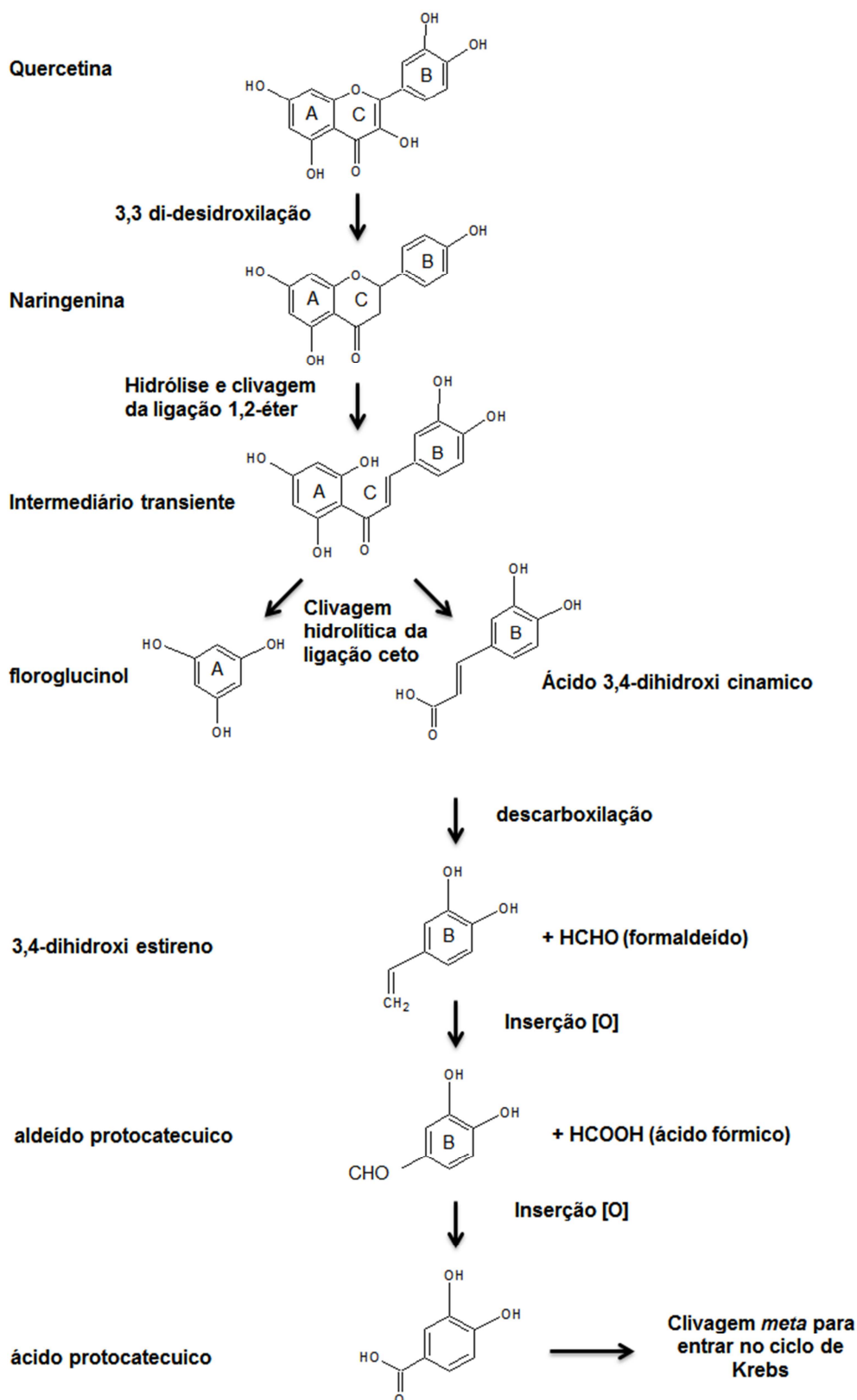


FIGURA 4 – VIA DE DEGRADAÇÃO DA QUERCETINA EM *P. putida* PML2. (I) Quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona); (II) Naringenina (4',5,7-trihidroxi flavonona); (III) intermediário instável; (IVa) Phloroglucinol; (IVb) 3,4-dihidroxi ácido cinâmico; (V) 3,4-dihidroxi estireno; (VI) aldeído protocatecuico; (VII) ácido protocatecuico. Todos os compostos foram encontrados na estirpe selvagem PML2, mas não na estirpe mutante Flav 1-9.

FONTE: ADAPTADO DE PILLAI E SWARUP, 2002

P. putida PML2 é descrita como uma estirpe capaz de utilizar vários flavonóides, tais como flavonóis, flavononas, flavonas e isoflavononas como fonte de carbono, sendo a quercetina (flavanol) um dos mais rapidamente metabolizados por este microrganismo (PILLAI E SWARUP, 2002). O primeiro passo dessa via é a desidroxilação da quercetina para produzir a naringenina, que é então progressivamente degradada até produzir ácido protocatecuico que entra na via *orto* (intradiol) ou *meta* (extradiol) de clivagem de anéis aromáticos. Após várias etapas, os intermediários succinil-CoA e acetil-CoA são gerados e entram no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (HARWOOD E PARALES, 1996).

Chalcona, isoliquiritigenina, genisteína, daidzeína, fisetina e outros flavonóides são biotransformados pelo metabolismo microbiano (DAS E ROSAZZA, 2006). Em muitos casos foram observadas moléculas intermediárias comuns oriundas da degradação de muitos flavonóides por bactérias aeróbicas. Por exemplo, floroglucinol e ácido protocatecuico são originados do metabolismo da quercetina (RAO *et al.*, 1991; RAO E COOPER, 1994) e da catequina (ARUNACHALAM *et al.*, 2003; HOOPER E MAHADEVAN, 1997) através da abertura do anel-C. O ácido 3,4-dihidroxifenilacético e o ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiônico assim como o floroglucinol foram observados a partir da degradação de certos flavonóides por bactérias anaeróbicas (WINTER *et al.*, 1989; SCHOEFER *et al.*, 2003; BRAUNE *et al.*, 2001; SCHNEIDER E BLAUT, 2000). Estirpes de *Clostridium* isoladas de conteúdo fecal humano degradam quercetina e rutina em ácido 3,4-dihidroxifenilacético (WINTER *et al.*, 1989). *Clostridium orbiscindens* degrada quercetina e taxifolina em ácido 3,4-dihidroxifenilacético, e luteolina e eriodictiol em ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-propiônico (SCHOEFER *et al.*, 2003). *Eubacterium ramulus* degrada quercetina em ácido 3,4-dihidroxifenilacético, apigenina em naringenina e subsequentemente em ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiônico, e luteolina em eriodictiol e subsequentemente em ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-propiônico (SCHNEIDER E BLAUT, 2000). As Figuras 5A e 5B mostram o mecanismo de degradação da quercetina e da luteolina, respectivamente, pela bactéria anaeróbica *E. ramulus* (BRAUNE *et al.*, 2001).

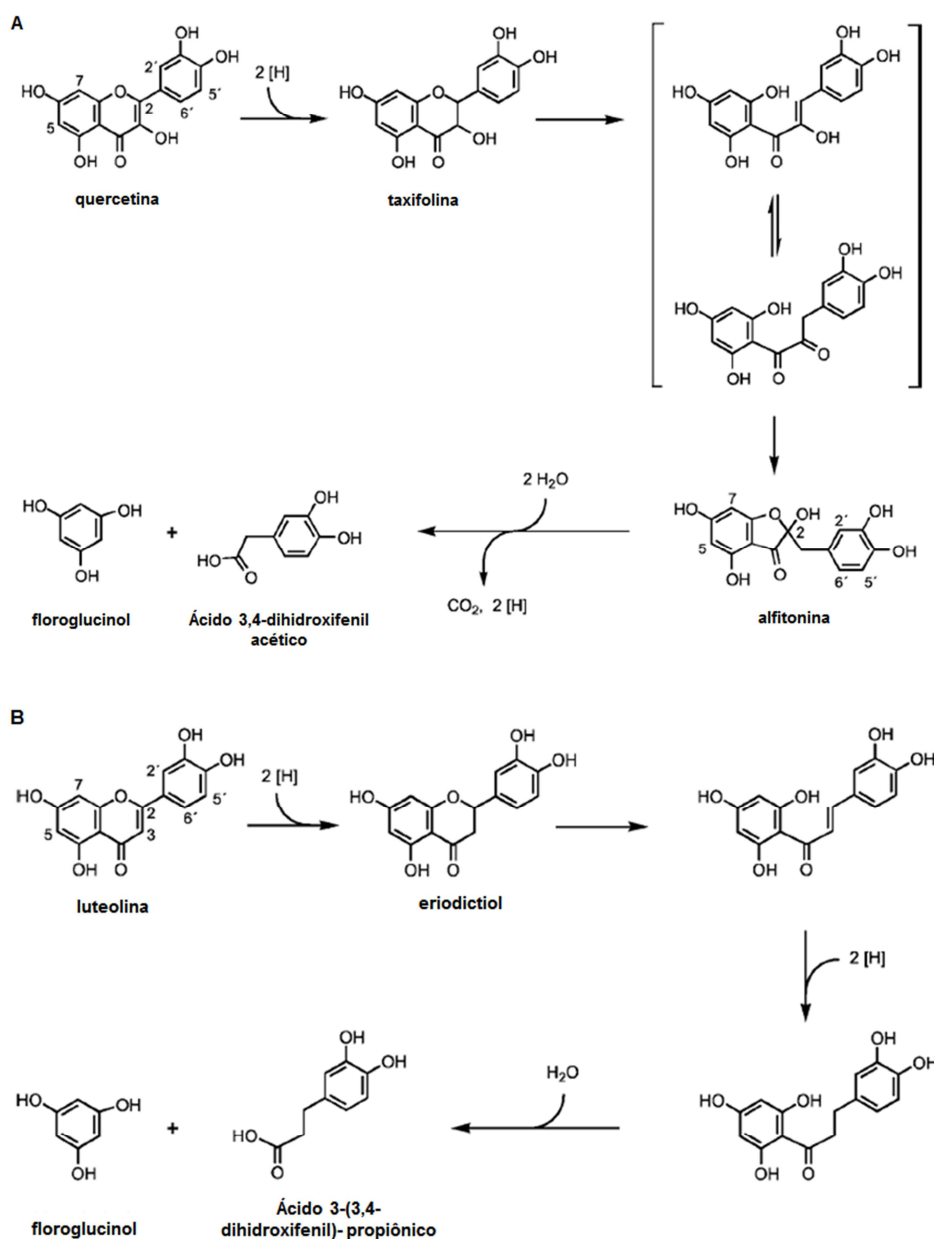


FIGURA 5 – VIAS PROPOSTAS PARA A DEGRADAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM *Eubacterium ramulus*. (A) via proposta para a degradação da quercetina; (B) via proposta para a degradação da luteolina. FONTE: ADAPTADO DE BRAUNE *et al.*, 2001

Em *Bacillus subtilis* foram encontradas duas proteínas com a função de clivar o flavonol quercetina: uma é a QueD (SCHAAB *et al.*, 2006) e a outra é a YxaG (BOWATER *et al.*, 2004). Ambas são chamadas de quercetina 2,3-dioxigenase, dependem de Fe^{2+} , e convertem a quercetina e o oxigênio molecular em ácido 2-protocatecuilfloroglucinol carboxílico e monóxido de carbono, em condições aeróbicas. A diferença entre as duas é que QueD possui 2 domínios bicupina, e YxaG possui apenas 1 domínio bicupina.

2.1.3 Funções

Os flavonóides estão envolvidos em vários processos em plantas tais como interação planta-bactéria, proteção contra patógenos, atração do rizóbio até as raízes, germinação de esporos de micorrizas, ramificação de hifas de fungos, mediação de interações alelopáticas, e sensoriamento populacional (HASSAN E MATHESIUS, 2012). Além destas funções também foi descrito aumento na degradação de xenobióticos originados da poluição ambiental, como o clorobifenil que é degradado por bactérias pré-cultivadas na presença de flavonóides (SINGER, 2006). Pham e colaboradores (2012) reportaram que a conversão de 4-clorobifenil em 4-clorobenzoato é maior quando células de *Pandoraea pnomenusa* B356 são crescidas na presença de isoflavona e acetato de sódio do que quando crescidas na presença de acetato de sódio e bifenil, ou seja, o flavonóide age como uma molécula sinal para que a bactéria comece a degradar o xenobiótico.

Reddy e colaboradores (2007) relataram que os flavonóides podem agir como reguladores de crescimento em algumas espécies de rizóbios. Em *R. meliloti* foi observado que os flavonóides contendo grupo hidroxila nas posições C₅ e C₇ (ex. luteolina e quercetina) aumentam a taxa de crescimento deste microrganismo, e este efeito provavelmente não envolve a proteína NodD, uma vez que mesmo uma estirpe mutada em todos os genes *nodD* mantém a resposta ao crescimento na presença de luteolina e quercetina (HARTWIG *et al.*, 1991; REDDY *et al.*, 2007). Além disto, o flavonóide que induz o crescimento pode não ser o mesmo que induz a ativação dos genes *nod* via NodD, como é o caso da quercetina, que aumenta o crescimento mas não induz a expressão da fusão *nodC::lacZ* por NodD1 em *R. meliloti* (HARTWIG *et al.*, 1991; PETERS E LONG, 1988). Em *Bradyrhizobium japonicum* a luteolina é o flavonóide que aumenta a taxa de crescimento (REDDY *et al.*, 2007; HARTWIG *et al.*, 1991).

2.2 FAMÍLIA LysR DE REGULADORES DE TRANSCRIÇÃO

A família LysR (LTTRs - LysR Type Transcriptional Regulators – HENIKOFF *et al.*, 1988) constitui o maior grupo de reguladores de transcrição presentes em procariotos (revisado por MADDOCKS E OYSTON, 2008), sendo amplamente

distribuídas (revisado por MADDOCKS E OYNSTON, 2008). A grande maioria das LTTR tem sua atividade regulada por moléculas pequenas que podem ser substratos, metabólitos intermediários ou produtos finais das vias nas quais os genes alvo estão envolvidos. Esta família de reguladores de transcrição está envolvida na regulação de diversos processos metabólicos, como degradação de catecol (CatR - ROTHMEL *et al.*, 1990; CatM - ROMERO-ARROYO *et al.*, 1995), benzoato (BenM - COLLIER *et al.*, 1998), biossíntese da lisina (LysR - de onde vem o nome da família - STRAGIER *et al.*, 1983) e cisteína (CysB - VAN DER PLOEG *et al.*, 1997), motilidade e quimiotaxia (LrhA - LEHNEN *et al.*, 2002), biossíntese de exopolissacarídeos (SyrM - BARNETT *et al.*, 1998), sensoriamento populacional (ToxR - KIM *et al.*, 2004 - e QseA - SPERANDIO *et al.*, 2002), simbiose (NodD - MULLIGAN E LONG, 1985), resposta ao estresse oxidativo (OxyR - FARR E KOGOMA, 1991), entre outros (MADDOCKS E OYSTON, 2008; SCHELL, 1993). Em *Rhizobium* sp. NGR234 são descritas duas proteínas NodD: NodD1 e NodD2, sendo a primeira essencial no processo de nodulação (KOBAYASHI *et al.*, 2004). NodD1, após interagir com os flavonóides liberados pelas raízes das plantas, ativa a transcrição de diversos genes, cujas proteínas codificadas estão envolvidas na formação dos nódulos (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Dentre estes genes estão os genes *nodABC*, cujas proteínas codificadas são responsáveis pela síntese dos fatores Nod, que são fatores essenciais no início do processo de infecção através dos pelos radiculares (BROUGHTON *et al.*, 2000). Além disto, NodD1 também ativa a expressão de *ttsI*, cuja proteína codificada regula a transcrição do sistema de secreção do tipo III, e também ativa a transcrição de *syrM2*. SyrM2, por sua vez, ativa a transcrição de *nodD2*, cujo produto NodD2 regula a expressão de proteínas envolvidas na síntese de exopolissacarídeos (KOBAYASHI *et al.*, 2004). NodD2 também pode reprimir a expressão de NodD1, independente da presença de flavonóides, de maneira a regular seus níveis. A Figura 6 mostra o esquema de como ocorre esta regulação.

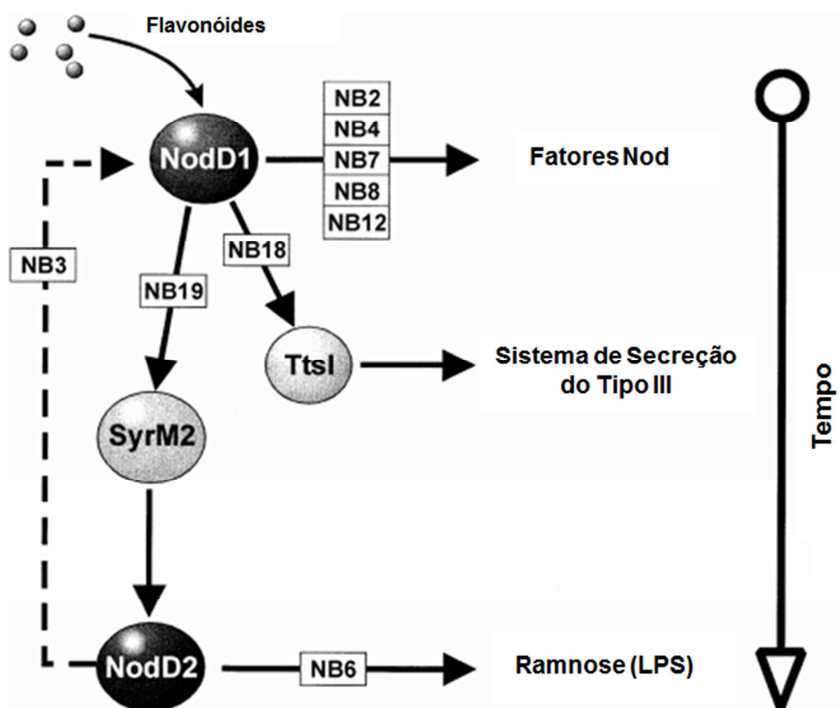


FIGURA 6 - PROPOSTA PARA O MODELO DE ATIVAÇÃO DA CASCATA REGULATÓRIA EM NGR234 DE MANEIRA FLAVONÓIDE E NodD1-DEPENDENTE. Neste modelo, os genes ativados estão mostrados pelas setas sólidas. A repressão da expressão de *nodD1* por NodD2 está mostrada pela seta descontinua. NB: *nod*-box. NB2: *nodZnoeLnoIK*; NB3: *nodD1*; NB4: *noIL*; NB6: *fixF*; NB7: *noeE*; NB8: *nodABCIJnoIOnoeI*; NB12: *nodSU*; NB18: *ttsI*; NB19: *syrM2*.
 FONTE: ADAPTADO DE KOBAYASHI *et al.*, 2004.

As proteínas da família LysR apresentam dois domínios: o domínio HTH (do inglês Helix-Turn-Helix), responsável pela ligação destas proteínas ao DNA, e o motivo LysR, responsável pela ligação ao substrato. Em geral, o domínio HTH é encontrado do resíduo 1 a 65, podendo apresentar variações de tamanho. Do resíduo 66 até o final da proteína, encontra-se o domínio LysR que é subdividido em 3 subdomínios: 2 subdomínios na região central envolvidos com o reconhecimento e/ou resposta ao indutor (resíduos 95-173 e 196-206) e um subdomínio envolvido na multimerização (resíduos 227-253) (revisto por TROPEL E VAN DER MEER, 2004). Segundo Maddocks e Oyston (2008) na região entre os aminoácidos 20 e 80 estão os resíduos mais conservados destas proteínas e que estão envolvidos na interação com o sulco principal do DNA. A Figura 7 mostra um esquema dos domínios encontrados nas proteínas desta família.

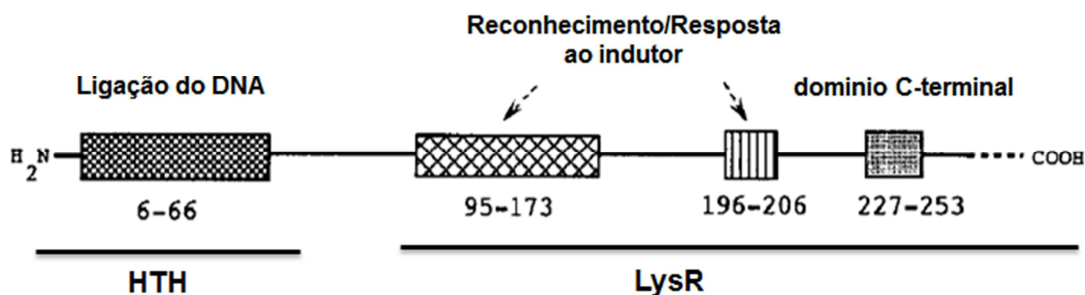


FIGURA 7– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM LTRR. O domínio HTH na região N-terminal e o domínio LysR de ligação ao substrato.
 FONTE: SCHELL, 1993

Muraoka e colaboradores (2003) elucidaram a estrutura tridimensional de CbnR, uma LTRR ativadora da expressão do operon *cbnABCD*, responsável pela degradação de 3-clorobenzoato em *Ralstonia eutropha* NH9. CbnR foi cristalizada na forma de um tetrâmero, sendo que cada monômero contém dois domínios: HTH do resíduo 1-58 e um domínio regulatório do resíduo 88-294, sendo que a ligação entre estes dois domínios é feita por uma hélice que vai dos resíduos 59-87. Apesar das 4 subunidades serem idênticas, elas assumem conformações diferentes; duas delas (A e P) adotam uma forma compacta, enquanto as outras duas (B e Q) adotam uma forma estendida e, por isso, o tetrâmero pode ser chamado de um dímero de dímeros (MURAOKA *et al.*, 2003). A ligação do efetor e subsequente ativação da transcrição resultam da modificação da dobra no DNA provocada pela ligação da LTRR sob condições não indutoras (PÉREZ-MARTÍN, *et al.*, 1997). Estudos mostram que, na ausência de indutores, essa proteína (a LTRR) se liga perto da região -65 e a presença do indutor causa uma mudança conformacional na proteína que libera o sítio -35 do promotor, que é o sítio de ligação da RNA polimerase, fazendo uma dobra no DNA e assim ativando a transcrição (revisto por SCHELL, 1993). Maddocks e Oyston (2008) referem que essa proteína se liga entre as posições -35 a +20 pb do promotor, onde estão o sítio de ligação ao ribossomo e o sítio autoregulatório, e entre as posições -40 a -20 pb onde está o sítio de ligação do ativador. O DNA é dobrado pela ligação da proteína na posição -55 pb. Entre -20 e -75 pb encontra-se o LTTR-box (T-N₁₁-A) (revisto por MADDOCKS E OYSTON, 2008). A proteína com e sem indutor apresenta diferença na sua afinidade pelos LTTR-box, afetando a ligação ao DNA. Como consequência da ligação do indutor ocorre a dobra no DNA que pode afetar a interação com a RNA polimerase na região promotora. Na regulação por CatR a forma sem

indutor está ligada ao sítio de ligação ao ribossomo, enquanto que a forma com o co-indutor está ligada apenas no sítio de ativação (PARSEK *et al.*, 1994b).

Algumas outras características que as proteínas dessa família apresentam em comum são: tamanho variando de 276 a 324 resíduos; ligam-se a seqüências regulatórias do DNA com posição e motivos similares; são divergentemente transcritas a partir de um promotor que é muito próximo ou até mesmo se sobrepõe ao promotor do gene que regula. Essa sobreposição permite controle simultâneo e bidirecional da transcrição dos 2 promotores divergentes, e assim muitas LTTRs reprimem a sua própria transcrição para manter seus níveis constantes. LTTRs permanecem ligadas à região proximal do promotor do gene alvo, independente da presença de indutores (revisto por SCHELL, 1993).

2.3 GENES *fde* DE *Herbaspirillum seropedicae*

Os produtos do operon *fde* de *H. seropedicae* estão envolvidos no catabolismo da naringenina (MARIN, 2009). Estas proteínas têm similaridade com proteínas envolvidas em processos de degradação de compostos aromáticos. A expressão deste operon é ativada pela proteína FdeR na presença de alguns flavonóides, como por exemplo a naringenina.

O regulador FdeR contém 309 resíduos de aminoácidos e tem 56,8% de similaridade com a proteína NodD1 de *Rhizobium* sp. NGR234. Quando comparada com o banco nr do genbank (ALTSCHUL *et al.*, 1997) a similaridade é maior (75%) com uma proteína de nodulação D1 de *Burkholderia multivorans* CGD1, e em seguida uma LysR de *B. vietnamiensis* G4 (74%).

Através de análise bioinformática da seqüência de aminoácidos da proteína FdeR, foram encontrados dois domínios estruturais comuns de proteínas da família LysR de reguladores transcricionais. O domínio HTH (do inglês Helix-Turn-Helix) de ligação ao DNA encontra-se na região N-terminal e o outro domínio, de ligação a indutores, encontra-se na região C-terminal. A mesma seqüência de aminoácidos foi submetida ao programa Helix-Turn-Helix Motif Prediction (DODD E EGAN, 1990), que prevê a localização do motivo hélice-volta-hélice. Segundo este programa o motivo de ligação ao DNA de FdeR, se estende do resíduo 21 ao resíduo 42.

Sabendo que proteínas LysR, geralmente, regulam a expressão de genes próximos ao gene *lysR* e com transcrição divergente a ele (revisto por SCHELL, 1993), foi realizada uma busca na região do gene *fdeR* de *H. seropedicae*, sendo encontrado um operon próximo e com transcrição divergente, porém sem função conhecida. Na região intergênica entre *fdeR* e o primeiro gene do operon vizinho (denominado *fdeA*) foram encontradas duas seqüências promotoras dependentes do fator σ^{70} , que tem uma seqüência característica nas posições -35/-10 em relação ao início de transcrição do gene. O alinhamento entre os potenciais promotores de *fdeR* e *fdeA*, bem como a comparação com a seqüência consenso de promotores -35/-10 de *E. coli* estão na Figura 8.

| | |
|----------------|-----------------------|
| <i>E. coli</i> | TTGACA(N17)TATAAT |
| <i>pfdeR</i> | TTGATC(N18)CATGAT |
| | **** ** ** |
| <i>E. coli</i> | TTGACA(N17)TATAAT |
| <i>pfdeA</i> | TTGATC(N17)TAAGCT |
| | **** ** * |

FIGURA 8 – ALINHAMENTO DO PROMOTOR *fdeR* POSSIVELMENTE DEPENDENTE DE FATOR σ^{70} ENCONTRADOS NA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES *fdeR* E *fdeA* DE *H. seropedicae* E SEQÜÊNCIA CONSENSO PARA σ^{70} DE *E. coli*. Entre parênteses está o número de nucleotídeos de espaçamento entre a região -35 e -10 dos promotores. Os nucleotídeos idênticos, entre a seqüência consenso e os promotores analisados, foram assinalados com um asterisco (*).
 FONTE: WASSEM R., NÃO PUBLICADO.

A região intergênica foi clonada em um vetor para a criação de uma fusão transcricional (pPW452 e pMP220), em ambas as direções, originando os plasmídeos pSU11 (*fdeR::lacZ*) e pSU1 (*fdeA::lacZ*). A Figura 9 mostra a região intergênica com os possíveis promotores.

GGTGAGGAACGGCGAGACGCCGCCCTCGAAGGCATAGGCTGCAGGCCCGG
 CGGCCATGGTCAGCAGCGCGCAAGTTGCCAGCCGGCATGCCGGCACGAAT
 CCTCTCTTCACGTCTGTCTCCTTGTCTCCTACCCTGCCTGGCGGGGTGTG
 GCCGCTATCGGGCGGTTGTTCATGGCCAGGCTCAACAGCGGCGCATCCAGT
 GCGAGTGCGCCGCCGGCTTGCCGCGCCAGCCCTTTCTGGTGGGGCCATGC
 AGCGGATGAGTGAAGCTTAAGAGTGAGCTTGATA**TTGATCAAATGGATTG**
 TTTTGATT**CATGATATGGACGGCATCAATACATTGACCACCCCATCCGTC**
 GTCTATCCGAGGGTCCGCAAGAACAAGCACAACAACGGAGACCAGCGCCA
 TGCGTTTCAACAAGCTCGACCTCAATCTTCTGGTCGCCCTGGATGCACTG
 CTCACGGAGATGAGCATCAGCCGCGCCGCGAAAAGATCCATCTGAGCCA

↑ *fdeA*
 -35/-10 *pfdeR*
 -35/-10 *pfdeA*
 ↓ *fdeR*

FIGURA 9 - REGIÃO INTERGÊNICA ENTRE *fdeR* E *fdeA* EM *H. seropedicae* SmR1. Em roxo está mostrado o início da região codificadora de *fdeA* e em vermelho, o início da região codificadora de *fdeR*. Em azul está mostrada a seqüência da região intergênica. Os nucleotídeos em vermelho, dentro da região intergênica é o provável promotor σ^{70} de *fdeR*, e os nucleotídeos mostrados com fundo amarelo é o provável promotor σ^{70} de *fdeA*.

FONTE: A AUTORA

Os resultados dos ensaios de β -galactosidase obtidos com as fusões acima descritas, em *H. seropedicae*, mostraram que não há autoregulação da expressão de FdeR. A expressão de *fdeR* é basal e independe da presença de FdeR ou flavonóides, uma vez que na presença desses não houve aumento em seus níveis de expressão. Porém, a expressão do operon *fde* é dependente da presença de FdeR e de certos flavonóides como naringenina, crisina e apigenina, uma vez que nestas condições foi observado um grande aumento da expressão do operon (MARIN, 2009).

Uma vez que não se conhecia a função deste operon, e como análises *in silico* das proteínas codificadas por ele mostraram que estas podem estar envolvidas em processos catabólicos de compostos aromáticos, uma estirpe mutante no gene *fdeA* foi obtida (AMM1) (MARIN, 2009). Esta nova estirpe mutante, junto com as estirpes DR2 (*fdeR*-) e SmR1 (selvagem), foram testadas quanto à capacidade de degradar o flavonóide naringenina (indutor da expressão deste operon). Os resultados mostraram que as estirpes mutantes perderam a habilidade em degradar tal composto quando comparado com a estirpe selvagem (MARIN, 2009), indicando o envolvimento do operon *fde* e de *fdeR* no catabolismo de naringenina em *H. seropedicae*.

Sabendo-se do envolvimento de FdeR e das proteínas codificadas pelo operon *fde* na degradação de naringenina, análises bioinformáticas foram realizadas. Com isto foi possível observar que as proteínas codificadas pelo operon *fde* possuem domínios estruturais semelhantes aos domínios estruturais encontrados em proteínas presentes em diversas vias de degradação de compostos aromáticos (Tabela 2).

O operon *fde* também é encontrado em outros microrganismos (Figura 10) como *Burkholderia vietnamiensis* G4, *Burkholderia ambifaria* MC40-6, *Marinomonas* sp. MWYL1 e *Xanthobacter autotrophicus* Py2. Estas bactérias têm grande versatilidade metabólica e, com exceção de *X. autotrophicus*, são encontradas na rizosfera ou na superfície dos tecidos de gramíneas. *B. vietnamiensis* G4 e *B. ambifaria* MC40-6 podem metabolizar mais de 200 compostos orgânicos, e contêm em seus genomas muitas oxigenases e dioxigenases, possivelmente relacionadas com o metabolismo de compostos aromáticos, presentes nos exudatos de plantas. Além das bactérias acima mencionadas, o operon *fde* está presente também no genoma de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 e *Bradyrhizobium* sp. BTAi1. Ambos são simbioses de leguminosas e são capazes de degradar alguns flavonóides. Além do fato de as espécies acima mencionadas degradarem compostos orgânicos, elas também fixam N₂ atmosférico (exceto *Marinomonas* sp. MWYL1), assim como *H. seropedicae*.

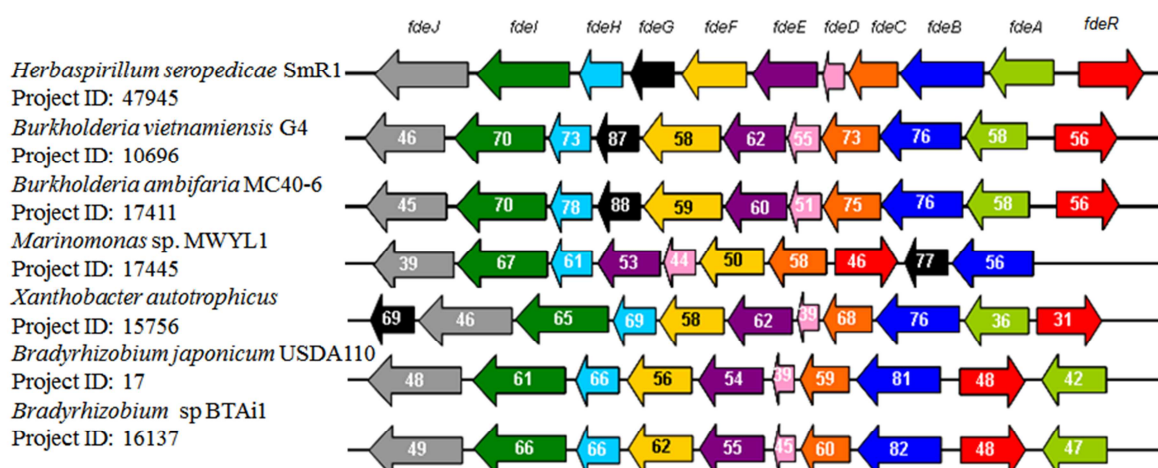


FIGURA 10 - ORGANIZAÇÃO DOS GENES *fde* EM DIFERENTES BACTÉRIAS. Os genes correspondentes estão mostrados com as mesmas cores. Os números no interior das setas indicam a identidade(%) dos aminoácidos entre as proteínas de *H. seropedicae* SmR1 e as proteínas correspondentes nas bactérias mostradas.

FONTE: MARIN *et al.*, 2013.

TABELA 2 – PROTEÍNAS CODIFICADAS PELO OPERON *fde* DE *H. seropedicae* E SUAS PROVÁVEIS FUNÇÕES

| Gene | Tamanho do polipeptídeo | Função atribuída | Homólogo representativo Número de acesso Identidade/similaridade (%) |
|-----------------------------|-------------------------|--|--|
| <i>fdeA</i> (Hsero_1003) | 305 aa | COG4313: Proteína envolvida na via meta de degradação de fenol [conversão e produção de energia] | Proteína hipotética conservada [<i>Burkholderia</i> sp. H160]; ZP_03267423; 59/77 Proteína envolvida na via meta de degradação de fenol [<i>Burkholderia cenocepacia</i> MC0-3]; YP_001778131; 30/46 COG4313 Proteína envolvida na via meta de degradação de fenol [<i>Ralstonia solanacearum</i> MolK2]; YP_002255467; 29/43 |
| <i>fdeB</i> (Hsero_1004) | 386 aa | COG1647: Esterase/lipase [somente predição geral] COG1506: Dipeptidil aminopeptidases/acilaminoacil-peptidases [metabolism e transporte de aminoácidos] COG0412: hidrolase dienolactona e enzimas relacionadas [biosíntese, transporte de catabolismo de metabolitos secundários] COG0429: hidrolase com dobramento alfa/beta-hidrolases [somente predição geral] | Proteína hipotética PP_3195 [<i>Pseudomonas putida</i> KT2440]; NP_745339; 81/88 Hidrolases ou aciltransferases (superfamília alfa/beta hidrolase) [<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84]; YP_002546769; 52/66 Provável hidrolase [<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25]; YP_002871575; 59/71 |
| <i>fdeC</i> (Hsero_1005) | 308 aa | cd08343: domínio C-terminal do tipo I, extradiol dioxigenase classe II; domínio catalítico; cd07258: domínio C-terminal da 2,3-dihidroxi-p-cumato-3,4-dioxigenase; pfam 00903: Glioxalase/proteína de resistência a bleomicina/superfamília das dioxigenases; TIGR02295: HpaD (3,4-dihidroxifenilacetato 2,3-dioxigenase) | Glioxalase/proteína de resistência a bleomicina/dioxigenase [<i>Burkholderia multivorans</i> CGD2M]; ZP_03570622; 76/83 Provável dioxigenase [<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315]; YP_002234454; 34/49 Extradiol dioxigenase que quebra anel [<i>Ralstonia eutropha</i> H16]; YP_728900; 34/47 |
| <i>fdeD</i> (Hsero_1006) | 112 aa | cd03467: domínio rieske cd03474: proteína efetora do complexo Tolueno-4-monooxigenase; pfam00355: Domínio Rieske [2Fe-2S]; COG4638 (HcaE): Fenilpropionato dioxigenase e dioxigenases relacionadas com hidroxilação de anel | Domínio rieske (2Fe-2S) [<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4]; YP_001119474; 55/71 |
| <i>fdeE</i> (Hsero_1007) | 376 aa | TIGR03219: salicilato 1-monooxigenase; pfam00070: Piridina nucleotideo-disulfeto oxidoreductase; PRK06183: 3-(3-hidroxifenil)propionato hidroxilase; | monooxigenase que se liga a FAD [<i>Azospirillum</i> sp. B510]; YP_003452214; 68/79 Monooxigenase, liga a FAD [<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM12444]; YP_001165824; 39/57 YetM [<i>Bacillus cereus</i> H3081.97]; ZP_03236616.1; 30/46 |

| | | | |
|-----------------------------|--------|--|--|
| <i>fdeF</i> (Hsero_1008) | 384 aa | PF07690: superfamília MFS (do inglês Major Facilitator Superfamily) | Superfamília de permeases MFS [<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1]; YP_001238036; 61/76 |
| <i>fdeG</i> (Hsero_1009) | 271 aa | COG1878: quinurenina formamidase [metabolismo e transporte de aminoácidos]; pfam04199: provável ciclase; TIGR03035: arilformamidase. | Família de proteínas ciclase [<i>Comamonas testosteroni</i> KF-1]; ZP_03544237; 92/96 Provável ciclase [<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110]; NP_772699; 69/77 |
| <i>fdeH</i> (Hsero_1010) | 196 aa | pfam07883: Domínio cupina; esta família representa o domínio barril conservado da superfamília cupina | Cupina 2, domínio barril conservado [<i>Burkholderia multivorans</i> CGD2M]; ZP_03570617; 79/86 |
| <i>fdeI</i> (Hsero_1011) | 327 aa | pfam01557: família fumarilacetoacetato (FAA) hidrolase; COG0179 (MhpD): 2-ceto-4-pentenoato hidratase/ácido 2-oxohepta-3-ene-1,7-dióico hidratase (via do catecol); PLN02856 e TIGR01266: fumarilacetoacetase | Fumarilacetoacetato (FAA) hidrolase [<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6]; YP_001811490; 70/78 2-ceto-4-pentenoato hidratase/ácido 2-oxohepta-3-ene-1,7-dióico hidratase (via do catecol) [<i>Agrobacterium vitis</i> S4]; YP_002547322; 61/73 |
| <i>fdeJ</i> (Hsero_1012) | 320 aa | cd05238: nucleosídeo-difosfato-açúcar 4-epimerase; cd08946: SDRs estendidos são diferentes dos SDRs clássicos; cd0527: L-treonina desidrogenase, SDRs estendida; COG1087: UDP-glucose 4-epimerase [biogênese de envelope celular, membrana externa]; pfam01073: 3-beta hidroxisteroide desidrogenase/família isomerase | Proteína Hipotética PP_3206 [<i>Pseudomonas putida</i> KT2440]; NP_745350; 49/65 Epimerase NAD-dependente/desidratase [<i>Azospirillum</i> sp. B510]; YP_003452206; 49/63 |

FONTE: MARIN *et al.*, 2013.

2.4 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria gram-negativa, diazotrófica, ou seja, fixadora de nitrogênio, pertencente à subclasse Beta das Proteobactérias. Suas células têm de 0,6 a 0,7 μm de diâmetro e 1,5 a 5 μm de comprimento, de característica vibrióide, e com dois (ocasionalmente, um ou três) flagelos em um ou ambos os pólos celulares. *H. seropedicae* fixa nitrogênio em condições microaeróbicas, tem a capacidade de usar muitos açúcares como fonte de carbono e coloniza endofiticamente plantas da família Poaceae (BALDANI *et al.*, 1986), como milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (BALDANI *et al.*, 1984; PIMENTEL *et al.*, 1991; BODDEY *et al.*, 1995). *H. seropedicae* foi encontrado também em Musaceae (*Musa* sp.) e Bromeliaceae (*Ananas* sp.) (WEBER *et al.*, 1999).

H. seropedicae possui todos os genes codificadores de enzimas das vias da pentose fosfato e Entner-Doudoroff. É capaz de transformar D-glucose, D-frutose e D-manose em piruvato, através da via da pentose fosfato e de Entner-Doudoroff, uma vez que não possui a PFK-1 (fosfofrutoquinase-1) e, portanto a via glicolítica é incompleta. Além destas vias *H. seropedicae* possui em seu genoma genes provavelmente codificadores de enzimas envolvidas na degradação de compostos aromáticos tais como benzoato, benzamida, benzonitrila, hidroxibenzoato, vanilato, catecol, ácido nicotínico, ácido fenilacético e ácido protocatecuico. A Figura 11 mostra um esquema geral do metabolismo de compostos aromáticos em *H. seropedicae* (PEDROSA *et al.*, 2011).

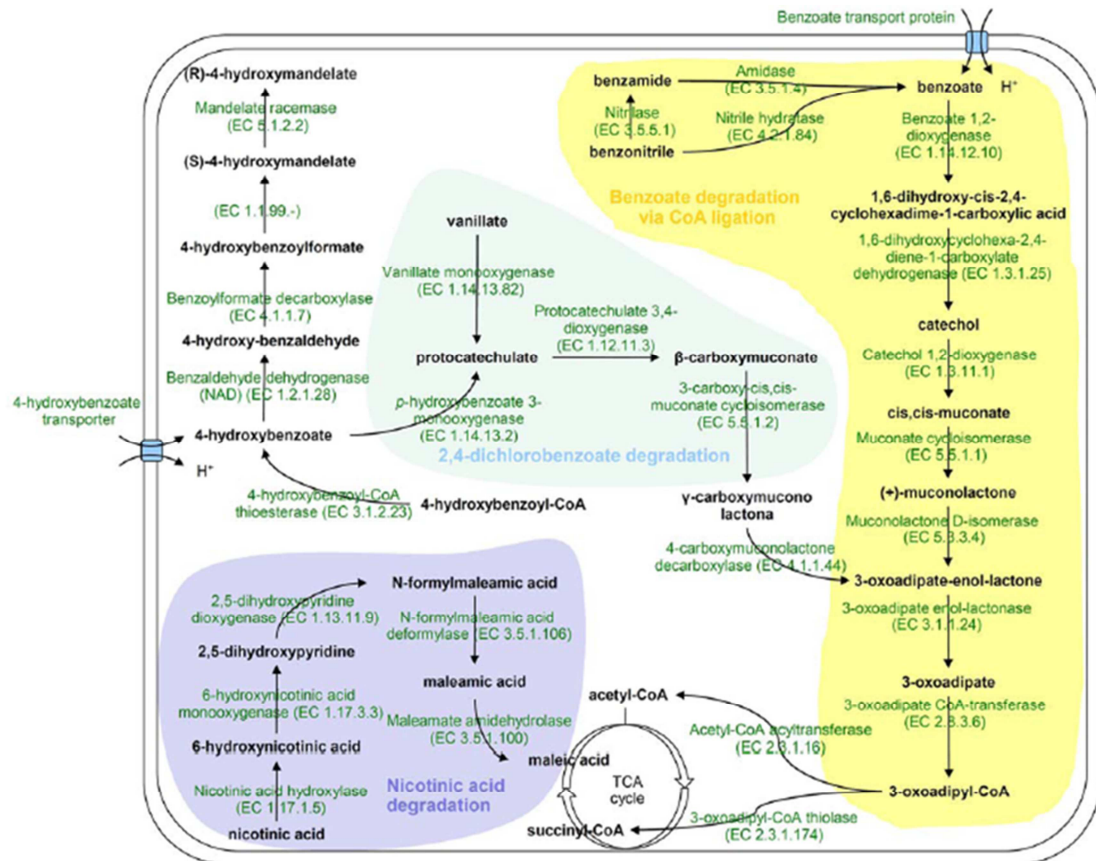


FIGURA 11– VIAS PROPOSTAS PARA O METABOLISMO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS EM *H. seropedicae*.
 FONTE: PEDROSA *et al.*, 2011

3. JUSTIFICATIVA

Nos estágios iniciais do processo de interação rizóbio-leguminosa ocorre a ativação dos genes de nodulação, através da proteína NodD, homóloga a FdeR de *H. seropedicae*, que interage com certos flavonóides. Em rizóbios este processo de interação é bem conhecido, sabendo-se a importância dos flavonóides. Contudo, no caso dos endofíticos não se conhecem todos os mecanismos moleculares envolvidos nos estágios iniciais da interação planta-bactéria, e tampouco se sabe se os flavonóides estão envolvidos. Estudos anteriores mostraram que o flavonóide naringenina está envolvido na regulação de genes envolvidos na síntese de exopolissacarídeos, auxinas (TADRA-SFEIR *et al.*, 2011) e lipopolissacarídeos (BALSANELLI *et al.*, 2010). Além disto, estudos de transcriptômica mostraram que a naringenina é capaz de regular a expressão de outros genes de *H. seropedicae* como transportadores de membrana do tipo ABC, genes envolvidos no catabolismo de compostos aromáticos, como ácido protocatecuico, ácido fenilacético e catecol (TADRA-SFEIR, M. Z., não publicado).

O operon *fde* tem sua expressão ativada pela proteína FdeR quando esta está ligada a naringenina, e as proteínas codificadas por ele parecem estar envolvidas no catabolismo deste flavonóide (MARIN, 2009). Sabe-se que vários microrganismos tem a capacidade de degradar flavonóides, e alguns mecanismos de clivagem foram propostos (PILLAI E SWARUP, 2002; RAO E COOPER, 1994; ARUNACHALAM *et al.*, 2003; HOOPER E MAHADEVAN, 1997; DAS E ROSAZZA, 2006). Contudo as proteínas que realizam estes processos de clivagem não são conhecidas. Uma das funções atribuídas aos flavonóides é a de agente antimicrobiano. As plantas, durante os estágios iniciais da interação planta-bactéria podem liberar flavonóides como um mecanismo de defesa. A bactéria, por sua vez, ao degradar estes compostos mantém os seus níveis controlados, e desta maneira consegue colonizar a planta, seja esta colonização simbiótica ou endofítica. Além disto, ao utilizar a naringenina como uma fonte alternativa de carbono a bactéria tem uma vantagem adaptativa sobre outras bactérias que não a realizam. Desta maneira, a via catabólica codificada pelo operon *fde* pode estar relacionada com o mecanismo de detoxificação mantendo os níveis de naringenina controlados, uma vez que este composto é importante na ativação da transcrição de genes

relacionados com o mecanismo de interação *Herbaspirillum*-planta, e desta maneira a bactéria consegue se manter viva e colonizar a planta. Por este motivo o estudo da função do operon *fde* torna-se importante.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As bactérias e plasmídeos que foram utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 3.

TABELA 3– BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO

| Estirpes | Características/Fenótipo | Referência |
|-----------------------------------|--|--|
| <i>Herbaspirillum seropedicae</i> | | |
| SmR1 | Estirpe selvagem, Sm ^R | MACHADO <i>et al.</i> , 1996 |
| DR2 | Inativação cromossomal do gene <i>fdeR</i> através de recombinação homóloga dupla e inserção do cassete de canamicina | CORAL, 2005 |
| AMM1 | Inativação cromossomal do gene <i>fdeA</i> através de recombinação homóloga simples conferindo resistência a canamicina | MARIN, 2009 |
| F6 | Inativação cromossomal do gene <i>fdeE</i> através da inserção do mini-transposon Tn5, conferindo resistência a canamicina | MARIN, 2013 |
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| DH10B | Sm ^R | GRANT <i>et al.</i> , 1990; INVITROGEN |
| S17.1 | Sm ^R , contém genes <i>tra</i> | SIMON <i>et al.</i> , 1983 |
| BL21 (DE3) | Expressa RNA polimerase do fago T7. | NOVAGEN |
| CC118 λpir | Estirpe doadora do plasmídeo pUTKm mini-Tn5 durante a conjugação; resistente a canamicina | HERRERO <i>et al.</i> , 1990 |

Continua

Rhizobium sp. NGR234

Continuação

| | | |
|---------------------------|---|------------------------------|
| NGR234 | Estirpe selvagem, Rif ^R | LEWIN <i>et al.</i> , 1990 |
| NGR Ω <i>nodD1</i> | Derivado do NGR234 contendo um interposon em <i>nodD1</i> , Rif ^R , Sp ^R | RELÌC <i>et al.</i> , 1993 |
| NGR Ω <i>nodD2</i> | Derivado do NGR234 contendo um interposon em <i>nodD2</i> , Rif ^R , Km ^R | FELLAY <i>et al.</i> , 1995. |
| Plasmídeos | | |
| pET28(a) | Promotor T7, <i>lacI</i> , Km ^R , sequência codificadora para a cauda de histidinas | NOVAGEN INC. |
| pTZ57R/T | Vetor TA para clonagem de produtos de PCR, Ap ^R | FERMENTAS |
| pLAFR3.18 | Cosmídeo contendo o sítio de policlonagem do pTZ18; Tc ^R | MACHADO <i>et al.</i> , 1996 |
| pLAFR 3.18 cm | Cosmídeo contendo o sítio de policlonagem do pTZ18; Tc ^R , Cm ^R | SOUZA E.M. não publicado |
| pET28aLysR | pET28a contendo a sequência codificadora para o domínio LysR da proteína FdeR de <i>H. seropedicae</i> SmR1; fragmento de PCR de 753 pb (do nucleotídeo 199 ao 930) | Este trabalho |
| pDEN4 | pET28a contendo toda a sequência codificadora da proteína FdeR; fragmento <i>NdeI/BamHI</i> de 930 pb | SECCON, 2004 |
| pLAFRfdeR | Vetor pLAFR3.18cm contendo o gene <i>fdeR</i> sob o controle do promotor <i>lac</i> ; Tc ^R , Cm ^R ; fragmento <i>XbaI/HindIII</i> de 950 pb originado do plasmídeo pDEN4. | Este trabalho |
| pLAFRfdeA | Vetor pLAFR3.18 contendo o gene <i>fdeA</i> sob controle do próprio promotor; fragmento retirado <i>SphI/KpnI</i> de 2360 pb do clone pB10; Tc ^R | Este trabalho |
| pB10 | Clone da biblioteca genômica de <i>H. seropedicae</i> ; HS23-RN-00-000-059-B10, em vetor pUC19; Amp ^R , fragmento de 2335 pb. | PEDROSA <i>et al.</i> , 2011 |
| pSU1 | pPW452 contendo o fragmento <i>EcoRI/PstI</i> de 820 pb referente a região promotora de <i>fdeA</i> ligado ao gene repórter <i>lacZ</i> | MARIN <i>et al.</i> , 2013 |

Continua

Continuação

| | | |
|-------------|--|--------------------------------------|
| pMP-pnodD1 | Fragmento de 700 pb do promotor de <i>nodD1</i> de <i>Rhizobium</i> sp. NGR234 clonado em pMP220 | KOBAYASHI <i>et al.</i> , 2004 |
| pTZ57pnodD1 | Vetor pTZ57R/T contendo o produto de PCR de 800 pb do plasmídeo pMP-pnodD1 | Este trabalho |
| pDEN4pnodD1 | Plasmídeo pDEN4 contendo a região promotora de <i>nodD1</i> (800 pb <i>XbaI/NdeI</i> do pTZ57pnodD1) | Este trabalho |
| pnodD1fdeR | Fragmento de 1600 pb <i>XbaI/HindIII</i> contendo a fusão <i>pnodD1::fdeR</i> ligado ao vetor pLAFR3.18 cm | Este trabalho |
| pGT-NB8 | Fragmento de 300 pb contendo a região promotora de <i>nodABC</i> de NGR234 fusionada ao gene repórter <i>gfp</i> , Gm ^R | WASSEM <i>et al.</i> , em preparação |
| pUTKm | Plasmídeo que contém o Tn5; Km ^R | HERRERO <i>et al.</i> , 1990 |
| pRK600 | plasmídeo mobilizador utilizado nas conjugações triparentais; contém os genes <i>tra</i> , Cm ^R | MOLINA-HENARES <i>et al.</i> , 2009 |

FONTE: A AUTORA

4.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

4.2.1 Cultivo de *Escherichia coli*

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB a 37°C (SAMBROOK *et al.*, 1989), sob agitação (150 rpm). A composição do meio LB está descrita abaixo:

| | |
|-----------------------|------|
| Triptona | 10 g |
| Extrato de levedura | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| Água destilada q.s.p. | 1 L |

O pH do meio é ajustado para 6,8 com NaOH. O meio LA, utilizado para o cultivo das estirpes de *E. coli* em meio sólido foi obtido pela adição de ágar bacteriológico (15 g/L) ao meio líquido LB.

Para o preparo de células eletrocompetentes o meio utilizado foi o SOB (HANAHAN, 1983), cuja composição está descrita abaixo:

| | |
|-----------------------|---------|
| Bacto triptona | 20 g |
| Extrato de levedura | 5 g |
| Cloreto de sódio | 0,584 g |
| Cloreto de potássio | 0,186 g |
| Água destilada q.s.p. | 1 L |

O pH do meio foi ajustado para 7,0 com NaOH.

Para a recuperação das células eletrocompetentes de *E. coli* o meio utilizado foi o SOC, cuja composição está descrita abaixo:

| | |
|-----------------------|--------|
| Bacto triptona | 20 g |
| Extrato de levedura | 5 g |
| Cloreto de sódio | 0,6 g |
| Cloreto de potássio | 0,19 g |
| Cloreto de magnésio | 0,94 g |
| Sulfato de magnésio | 1,2 g |
| Glucose | 3,6 g |
| Água destilada q.s.p. | 1 L |

4.2.2 Cultivo de *Herbaspirillum seropedicae*

Para o cultivo das estirpes de *H. seropedicae* foi utilizado o meio NFb-malato (KLASSEN *et al.*, 1997) acrescido de 50 mL/L de mistura de fosfatos (K_2HPO_4 17,8 g/L; KH_2PO_4 159,5 g/L; pH 5,8), que foi denominado NFbHP-malato. Quando foi utilizado 20 mmol/L de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio o meio foi

denominado NFbHPN-malato. As culturas foram incubadas a 30°C em agitador rotatório a 120 rpm. A composição de sais do meio NFb-malato segue abaixo:

| | |
|--------------------------------------|----------------------------|
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 2 x 10 ⁻¹ g/L |
| NaCl | 1 x 10 ⁻¹ g/L |
| CaCl ₂ | 2 x 10 ⁻² g/L |
| Ácido nitrilo-triacético (NTA) | 5,6 x 10 ⁻² g/L |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 2 x 10 ⁻² g/L |
| Biotina | 1 x 10 ⁻⁴ g/L |
| Solução de microelementos | 10 mL/L |
| Malato de potássio | 5 g/L |

Solução de microelementos:

| | |
|---|----------------------------|
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 1 g/L |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 1,175 g/L |
| H ₃ BO ₃ | 1,4 g/L |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 4 x 10 ⁻² g/L |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 1,2 x 10 ⁻¹ g/L |

Os meios NFbHPN-malato sólido e semi-sólido foram obtidos após adição de 15 g/L e 1,75 g/L de ágar bacteriológico, respectivamente, ao meio líquido.

Para determinar a capacidade de crescimento das estirpes de *H. seropedicae* em fontes alternativas de carbono foi utilizado o meio NFbHPN, mas sem adição de ácido málico.

4.2.3 Cultivo de *Rhizobium* sp NGR234

Para cultivar *Rhizobium* sp. NGR234 foram utilizados 2 meios de cultivo. Um destes meios é o TY (triptone-yeast), cuja composição segue abaixo:

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Extrato de levedura | 3 g/L |
| CaCl ₂ .H ₂ O | 0,87 g/L |
| Triptona | 5 g/L |

O pH do meio de cultura foi corrigido para 6,8 com NaOH. A esterilização foi realizada em autoclave a 121°C por 20 minutos. Para o meio TY sólido foi adicionado 1,5% de ágar bacteriológico.

O outro meio utilizado foi o meio mínimo RMS. Este meio foi preparado a partir de soluções estoque individuais. A composição destas soluções segue abaixo:

| | |
|---------------------------------|---|
| Solução I-A | 205 g/L K ₂ HPO ₄ /145 g/L KH ₂ PO ₄ /15 g/L NaCl |
| Solução I-B | 50 g/L NH ₄ NO ₃ |
| Solução II | 50 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O |
| Solução III | 2,5 g/L CaCl ₂ .2H ₂ O |
| Solução IV (para 100mL) | 123 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O/87 g/L K ₂ SO ₄ /0,34 g/L MnSO ₄ .H ₂ O/0,25 g/L H ₃ BO ₃ /0,29 g/L ZnSO ₄ .7H ₂ O/0,1 g/L CuSO ₄ .5H ₂ O/0,06g/L CoSO ₄ .7H ₂ O/0,05 g/L Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O |
| Solução de vitaminas de Gamborg | 1000X (Sigma) |
| Succinato de sódio | 324 g/L |

As soluções I-A, I-B, II, III e IV foram autoclavadas, enquanto que a solução de succinato foi filtrada.

Para o preparo de 1 litro de meio RMS foram adicionados 10 mL das soluções I-A, I-B e II e 1 mL das soluções III, IV e de vitaminas. Como fonte de carbono foram adicionados 10 mL de solução de succinato de sódio.

4.2.4 Cultivo de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) e feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) cv. Red Caloona

Para o cultivo de leguminosas o meio utilizado foi o B+D (BROUGHTON E DILWORTH, 1971). A composição deste meio segue abaixo:

| | |
|------------|--|
| Solução A | CaCl ₂ .2H ₂ O 294,1 g/L |
| Solução B1 | KH ₂ PO ₄ 136,1 g/L |
| Solução B2 | K ₂ HPO ₄ 174,2 g/L |
| Solução C | Fe-citrato 6,7 g/L |
| Solução D | Solução de microelementos 211,5 g/L |

Para preparar 10 L de B+D são utilizados 5 mL de cada uma das soluções acima, o pH ajustado para 7 utilizando HCl 1 mol/L ou KOH 1 mol/L.

A solução de microelementos é composta pelos sais listados abaixo:

| | |
|---|-----------|
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 123,3 g/L |
| K ₂ SO ₄ | 87 g/L |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 0,338 g/L |
| H ₃ BO ₃ | 0,247 g/L |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,288 g/L |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,1 g/L |
| CoSO ₄ .7H ₂ O | 0,056 g/L |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,048 g/L |

4.2.5 Antibióticos utilizados

A Tabela 4 mostra os antibióticos utilizados e suas concentrações para o cultivo de *E. coli*, *H. seropedicae* e *Rhizobium* sp. NGR234.

TABELA 4 – ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS PARA O CULTIVO DE *E. coli*, *H. seropedicae*, E *Rhizobium* sp. NGR234

| antibiótico | <i>E. coli</i> | <i>H. seropedicae</i> | <i>Rhizobium</i> |
|----------------------|----------------|-----------------------|------------------|
| Estreptomicina (Sm) | 10 µg/mL | 80 µg/mL | * |
| Tetraciclina (Tc) | 10 µg/mL | 10 µg/mL | * |
| Canamicina (Km) | 50 µg/mL | 500 µg/mL | 50 µg/mL |
| Ampicilina (Ap) | 250 µg/mL | * | * |
| Cloranfenicol (Cm) | 30 µg/mL | 120 µg/mL | * |
| Espectinomicina (Sp) | * | * | 50 µg/mL |
| Rifampicina (Rif) | * | * | 100 µg/mL |

* este antibiótico não foi utilizado para a seleção desta bactéria

4.3 PURIFICAÇÃO DE DNA EM PEQUENA ESCALA

A extração de plasmídeos de células de *E. coli* foi realizada segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989), com modificações. Estirpes de *E. coli*, contendo os plasmídeos de interesse foram cultivadas por aproximadamente 16 horas em meio LB, contendo os antibióticos adequados. As suspensões bacterianas foram transferidas para tubos plásticos de 1,5 mL, centrifugadas a 12.100 x g por 2 minutos e o sedimento ressuspense em 200 µL de tampão GET (Tris.HCl 25 mmol/L, pH 8,0; glucose 50 mmol/L e EDTA 10 mmol/L). A lise das células ocorreu após a adição de 200 µl de solução de lise (NaOH 0,2 mol/L e SDS 1% (v/v)). Em seguida foram adicionados 200 µL de solução de kacf (acetato de potássio 3 mol/L e ácido fórmico 1,8 mol/L), e a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 12.100 x g. Ao sobrenadante foram adicionados 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), a amostra foi agitada, e centrifugada por 10 minutos a 12.100 x g. A fase aquosa foi coletada e a mistura de DNA plasmidial foi precipitada pela adição de 1 volume de isopropanol, e centrifugado por 15 minutos a 12.100 x g. O precipitado foi lavado com 500 µl de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 12.100 x g. O sobrenadante foi dispensado, e o precipitado foi seco à vácuo e dissolvido em 30 µL de água ultra pura estéril.

A eletroforese de DNA plasmidial foi realizada em gel de ágar ou agarose em cuba horizontal (SAMBROOK *et al.*, 1989). Para a corrida eletroforética, foi utilizado o tampão TBE 1 X (solução 10 X: tris base 108 g/L; ácido bórico 55 g/L, EDTA 7,5 g/L), e o gel foi tratado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta a 312 nm em transluminador EC₃ System - UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA/EUA).

4.4 DIGESTÃO DE DNA COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO

A digestão de DNA foi feita de acordo com o fabricante da enzima de restrição (Invitrogen, NEB ou Fermentas).

4.5 PREPARO DO DNA PLASMIDIAL COMO VETOR DE CLONAGEM

Os vetores foram submetidos à digestão com endonucleases de interesse, e após completa digestão, as enzimas foram inativadas por aquecimento ou pela adição de 40% (v/v) de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), dependendo da recomendação do fabricante. Após este tratamento o DNA foi precipitado com a adição de 1 volume de isopropanol, lavado com etanol, seco à vácuo, e dissolvido em água.

4.6 LIGAÇÃO DE DNA

Para a reação de ligação, foram utilizados de 5 a 20 ng do vetor digerido, e 3 a 5x mais de inserto em relação a massa de vetor. Ao sistema foi adicionado tampão de ligação (1x) e 0,5 a 1U de enzima T4 DNA Ligase. O sistema foi incubado a 16°C por aproximadamente 24 horas.

A ligação dos produtos de PCR aos vetores pTZ57R/T foi feita de acordo com a recomendação do fabricante.

4.7 PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO

4.7.1 Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli*

Para o preparo de células eletrocompetentes, as estirpes S17.1 e DH10B de *E. coli* foram cultivadas em meio SOB a 37°C sob agitação de 150rpm até atingir uma D.O.₆₀₀ de 0,6. As células foram então resfriadas em banho de gelo por 30 minutos, ressuspensas em água ultra pura estéril gelada e centrifugadas a 4514 x g por 5 min. Esta etapa foi repetida e em seguida, as células foram lavadas com glicerol 15% gelado, centrifugadas a 4514 x g por 5 min, e ressuspensas em 1 mL de glicerol 15% gelado.

A eletroporação foi realizada com 100 µL de células eletrocompetentes onde foram adicionados 0,5 µL de DNA plasmidial, ou 1 µL do sistema de reação de ligação. A mistura de células e DNA foi transferida para cubas de eletroporação e submetida a um choque elétrico de 330-400 µF, 200 Ω e 4 KV/cm por cerca de 6-10 ms (eletroporador Cell-porator – Gibco BRL). As células foram então ressuspensas em 1 mL de meio SOC sem antibiótico e incubadas a 37°C por 30 minutos. Após este período as células foram inoculadas em meio LA contendo os antibióticos adequados. Colônias isoladas foram visualizadas nas placas após incubação a 37°C.

4.8 CONJUGAÇÃO BACTERIANA

As estirpes S17.1 de *E. coli* (doadora) e SmR1 de *H. seropedicae* (receptora) foram cultivadas em meio LB a 37°C por 3 horas (*E. coli*), e em meio NFbHPN-malato a 30°C por 6 horas (*H. seropedicae*), ambos sem antibiótico. Após o tempo de crescimento, 100 µL da cultura de S17.1 foram misturadas a 1 mL da cultura de *H. seropedicae*, e a mistura foi incubada a 30°C por 30 minutos, e centrifugada por 30 segundos à 13.400 rpm. O sedimento de células foi ressuspensão e transferido como uma gota para meio NFb-malato sólido e LA (3:1). As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas.

Após este período de incubação, a massa de células formada foi raspada e ressuspensa em 1 mL de meio NFb-malato líquido. 100 µL desta suspensão foram inoculados em meio NFb malato sólido, na presença dos antibióticos adequados. Os sistemas foram incubados a 30°C por 48 horas.

Para a conjugação de *Rhizobium* sp. NGR234, as células das estirpes de *Rhizobium* sp. NGR234 (receptor) e S17.1 foram cultivadas em meio TY e LB, respectivamente, e então co-inoculadas em meio TY sólido e incubadas por 16 horas a 30°C. A massa de células resultante foi coletada com alça esterilizada e transferida para o meio TY sólido contendo os antibióticos seletivos. Após 4 - 5 dias as colônias resistentes foram coletadas e armazenadas em glicerol (item 4.9).

4.9 ARMAZENAMENTO DAS ESTIRPES BACTERIANAS

As estirpes de *E. coli* e *Rhizobium* sp. NGR234 foram armazenadas em glicerol 50% a -20°C, enquanto que as estirpes de *H. seropedicae* foram armazenadas em meio NFbHPN-malato sólido e semi-sólido, e repicadas periodicamente (de 3 em 3 meses).

4.10 OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS

Os oligonucleotídeos utilizados estão na Tabela 5.

TABELA 5 – LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NO TRABALHO. T_m: temperatura de anelamento experimental.

| Oligonucleotídeo | Sequência | T _m (°C) | Referência |
|------------------|--|---------------------|--|
| TNEXT2 | 5'CTTTATTGATTCCATTTTTACT 3' | 57°C | MOLINA-HENARES <i>et al.</i> , 2009. |
| CEKG2B | 5'GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNN NCGCC 3' | 78°C | MOLINA-HENARES <i>et al.</i> , 2009. |
| ARB1A | 5'CCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNN GATAT 3' | 71°C | MOLINA-HENARES <i>et al.</i> , 2009. |
| ARB2A | 5' CCACGCGTCGACTAGTAC 3' | 59°C | MOLINA-HENARES <i>et al.</i> , 2009. |
| TNINT | 5' GACCTGCAGGCATGCAAGCTTCGGC 3' | 79°C | MOLINA-HENARES <i>et al.</i> , 2009. |
| LysRuni | 5' GCGCCCATATGCTCAAGGAT | 57°C | Este trabalho SECCON, 2004. WASSEM, R. comunicação pessoal |
| nodDfim | 5' CCCAGCGTGGATCCGC 3' | 58°C | |
| pMPfor | 5' GCTCAACCCCAAAATGGCA 3' | 52°C | |
| nodD1rev | 5' CATATGCTGGCGAATCCACAG 3' | 61°C | WASSEM, R. comunicação pessoal |

FONTE: A AUTORA

4.11 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE MUTANTES ALEATÓRIOS

Para construir a biblioteca de mutantes aleatórios (MOLINA-HENARES *et al.*, 2009), foi realizada uma conjugação triparental, utilizando a estirpe de *E. coli* CC118 λ pir pUTkm (Tabela 3), a estirpe de *E. coli* HB101 contendo o plasmídeo helper pRK600 (Tabela 3), e como receptora a estirpe SmR1 de *H. seropedicae*. O plasmídeo pUTkm não é replicado em *H. seropedicae* SmR1, por isto as colônias resistentes são resultado da inserção aleatória do mini transposon Tn5 no genoma da bactéria receptora, originando estirpes mutantes. Para a conjugação foram misturados 10 mL de cada cultura das três estirpes bacterianas e a mistura foi incubada a 30°C por aproximadamente 1 hora. Após este tempo, as bactérias foram centrifugadas (2708 x g) por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio NFb-malato líquido. Alíquotas de aproximadamente 100 μ L foram pipetadas em filtros de nitrocelulose sobre placas de NFbHPN-malato: LA (3:1).

Após 24 horas a 30°C, a massa de bactérias foi raspada do filtro e ressuspensa em 1 mL de meio NFb-malato. Deste volume foram retirados 500 μ L onde foram adicionados 500 μ L de meio NFb-malato líquido. Foram inoculados 750 μ L da suspensão em placa (30 x 30 cm) contendo 750 mL de meio LA (Luria Agar) com os antibióticos estreptomicina e canamicina nas concentrações indicadas para *H. seropedicae*. Após 2 dias a 30°C, as colônias foram repicadas para placas de 96 poços contendo meio NFbHPN-malato líquido e os antibióticos estreptomicina e canamicina.

4.11.1 Seleção dos mutantes

Após o crescimento, as estirpes mutantes foram repicadas para placas de 96 poços contendo meio NFbHPN contendo como fonte de carbono malato (37 mmol/L) ou naringenina (10 mmol/L). Após 3 a 5 dias de crescimento (30°C e 120 rpm) as placas foram inspecionadas visualmente para identificação de estirpes mutantes incapazes de crescer utilizando naringenina como fonte de carbono. Para identificar o gene mutado, foi realizada uma PCR utilizando oligonucleotídeos que anelam no

final do mini transposon Tn5 (TNEXT 2 e TNINT - Tabela 5) e oligonucleotídeos degenerados para anelar no gene onde o Tn5 foi inserido (CEKG2B, ARB1A e ARB2A).

A PCR aplicada foi dividida em 2 passos. Na primeira etapa foram utilizados os oligonucleotídeos ARB1A, CEKG2B e TNEXT2 (Tabela 5). O oligonucleotídeo TNEXT2 anela no interior do gene de resistência à canamicina, enquanto CEKG2B e ARB1 são oligonucleotídeos degenerados que anelam em sequências aleatórias no genoma. Esta PCR gera diversos fragmentos de DNA, que são utilizados como molde para a segunda reação de PCR. Para esta PCR são utilizados os oligonucleotídeos TNINT, que se anela na extremidade 3' do gene de resistência à canamicina, e ARB2A (Tabela 5). ARB1A, ARB2A e CEKG2B possuem a mesma sequência básica, contudo ARB1A e CEKG2B possuem uma sequência degenerada, e CEKG2 é maior que ARB1A. Assim, os produtos de PCR obtidos pela primeira reação de PCR são reconhecidos pelo oligonucleotídeo ARB2A. Além disto, esta segunda PCR restringe os produtos obtidos, uma vez que ARB2A não é degenerado.

O DNA da banda mais intensa, obtido pela PCR, foi purificado do gel de eletroforese e sequenciado utilizando o oligonucleotídeo TNINT.

4.12 ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA

4.12.1 Degradação de naringenina com células intactas

As estirpes SmR1, DR2 e AMM1 de *H. seropedicae* foram cultivadas em NFbHPN-malato contendo 0,2 mmol/L de naringenina. Um mililitro de suspensão bacteriada foi coletado nos tempos indicados, centrifugado a 12.100 x g por 5 minutos e filtrado (0,22 µm) antes das análises por TLC (cromatografia em camada delgada) e LC (cromatografia líquida).

Para as TLCs as amostras foram extraídas 2 vezes com clorofórmio (1 volume), secas, dissolvidas em 10 µL de clorofórmio, aplicadas em placas de sílica gel (60Å e com indicador de fluorescência 254 nm) e corridas em

clorofórmio:metanol (84:16 v/v). As placas foram fotografadas sobre luz UV (254nm) e a intensidade das bandas quantificadas utilizando o software Image Master (GE Healthcare).

Para as análises dos metabólitos por LC-MS, foram utilizados os sobrenadantes das culturas. A estirpe SmR1 foi inoculada em 500 mL de meio NFbHPN-malato contendo 0,2 mmol/L de naringenina (DO_{600nm} inicial de 0,2). Nesta etapa a naringenina foi utilizada para induzir a expressão do operon *fde*. Após alcançar DO_{600nm} de 0,6 ou 1,2, conforme indicado nos resultados, a cultura foi centrifugada, as células lavadas e ressuspensas em 20 mL de meio NFbHP contendo 10 mmol/L de naringenina como fonte de carbono. A estirpe selvagem SmR1 foi testada nas seguintes condições: presença e ausência de 20 mmol/L de NH_4Cl como fonte de nitrogênio, presença e ausência de 10 mmol/L de fluoroacetato de sódio, que é um inibidor do ciclo de Krebs. O sobrenadante de cultivo da estirpe AMM1 foi preparado da mesma maneira e também analisado. Para as análises foram retiradas alíquotas de 2 mL de cultura nos tempos 0, 15, 24 e 39 horas, que foram centrifugadas, filtradas (0,22 μm) e analisadas por LC-MS.

4.12.2 Dependência de proteínas para a degradação de naringenina

Para confirmar que a capacidade de degradar naringenina depende da síntese *de novo* de proteínas, células de *H. seropedicae* SmR1, DR2 e AMM1, crescidas durante a noite em NFbHPN-malato, foram coletadas e ressuspensas ($DO_{600nm}=1,0$) em um novo meio contendo 0,2 mmol/L de naringenina, com ou sem tetraciclina (10 $\mu g/mL$ inibindo a síntese de proteínas). Estas culturas foram incubadas por 0, 1, 2, 3 e 4 horas a 30°C e 120 rpm. Os sobrenadantes foram extraídos e analisados por TLC como descrito acima (item 4.12.1).

4.12.3 Análises por LC-MS

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido UPLC (Waters Acquity H class) acoplado a um analisador de massas Q-TOF (quadrupolo - tempo de voo)

(WATERS modelo LCT Premier XE). A coluna utilizada para a separação foi uma Acquity HSS T3 (2.1 mm X 100 mm), eluída com gradiente acetonitrila contendo 0,1% de ácido trifluoroacético (5% até 5 minutos; 5-95% 15 minutos; fluxo de 0,3 mL/minuto). A coluna foi mantida a 40°C para as análises e as amostras a 4°C. Foram injetados 10 µL de amostra na coluna. Os cromatogramas apresentados neste trabalho mostram a detecção do espectrômetro de massas, e não do detector de fluorescência do UPLC. Além disto, os cromatogramas estão mostrados até os 8 minutos de corrida, pois após este tempo não foram observados outros picos.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas pelo Q-TOF. Como padrão foi utilizado o formato de sódio e a calibração realizada entre 112,905 e 1132,975 u.m.a. (unidades de massa atômica). A fonte de ionização utilizada foi o electrospray (temperatura 100°C) e o gás Hélio foi utilizado na colisão (fluxo de 20L/hora).

Quercetina e naringenina (Sigma-Aldrich) foram utilizados como padrões nas análises.

Os espectros foram analisados utilizando-se o software MassLynx v4.1 da Waters. Todos os picos cromatográficos de todas as condições e tempos testados foram analisados separadamente.

4.12.4 Degradação de naringenina na presença de extrato proteico

Para obter os extratos livres de células, as estirpes SmR1, DR2 e AMM1 foram incubadas (DO_{600nm} 0,2) em NFbHPN-malato com e sem 0,2 mmol/L de naringenina. Após 6 horas, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas, ressuspensas em tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L; pH 7,0 contendo PMSF 0,1 mmol/L, e lisadas por sonicação. Após centrifugação (20.000 x g, 30 min, 4°C), o sobrenadante (10 µg de proteína total) foi utilizado para o ensaio de degradação de naringenina (0,2 mmol/L). O sistema de reação continha: 10 µg de proteína total, tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,0) PMSF 0,1 mmol/L e naringenina 0,2 mmol/L, em um volume final de 2 mL. Os sistemas de reação foram incubados a 30°C e alíquotas de 200 µL foram retiradas nos tempos 0, 1, 2 e 14 horas. O mesmo

sistema de reação foi realizado com os extratos previamente incubados a 100°C por 15 minutos (controle negativo). Os produtos de reação foram extraídos e analisados por TLC (item 4.12.1).

4.13 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA FdeR E DO DOMÍNIO LysR DE FdeR

Para a expressão de FdeR e de FdeR N-truncada (FdeR sem o domínio HTH de ligação ao DNA), os plasmídeos pDEN4 e pET28aLysR (Tabela 3), respectivamente, foram transformados em *E. coli* BL21(DE3). As células transformadas foram inoculadas em 10 mL de meio LB. As culturas foram incubadas a 37°C até atingir uma DO_{600nm} de 0,5, quando então IPTG (250 $\mu\text{mol/L}$) foi adicionado às culturas para a indução da expressão das proteínas. Antes da adição de IPTG, 1 mL de cada cultura foi coletado (fração não induzida). Após 4 horas de indução na presença de IPTG, as culturas foram centrifugadas a 4°C, 12.100 x g por 10 minutos e as células ressuspensas em tampão de ressuspensão (25 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0 e 500 mmol/L de NaCl) para comparar com as frações não induzidas.

As amostras não induzido e fração bruta induzida foram analisadas por eletroforese em gel de 12% de poliacrilamida com tampão glicina (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970).

Após verificar que os transformantes estavam expressando as proteínas, foi realizado o mesmo procedimento, porém em maior escala, para a purificação das proteínas de estudo. Para isto, todas as colônias da placa foram coletadas e inoculadas em 500 mL de meio LB e cultivadas a 37°C até atingir uma DO_{600nm} de 0,5, quando então o IPTG (250 $\mu\text{mol/L}$) foi adicionado, e a cultura foi incubada a 18°C por 16 horas. Após este tempo a cultura foi centrifugada a 9029 x g por 20 minutos, e as células ressuspensas em 30 mL de tampão de purificação A (50 mmol/L Tris-HCl pH 8, 300 mmol/L NaCl, 10% glicerol, 0,1% Triton X-100 e 20 mmol/L imidazol). Foram adicionados lisozima (0,02 mg/mL) e o inibidor de protease PMSF (0,1 mmol/L), e deixados a temperatura ambiente por 30 minutos. As células foram rompidas com o auxílio da prensa de French, centrifugadas a 20000g por 30

minutos para a separação das frações solúvel e insolúvel. À fração insolúvel foram adicionados 30 mL de tampão de ressuspensão (25 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0 e 500 mmol/L de NaCl) para posterior análise por SDS-PAGE.

A proteína FdeR foi purificada através de cromatografia líquida de afinidade, utilizando o sistema AKTA (GE Healthcare). Duas fases móveis foram utilizadas: tampão A (50 mmol/L Tris-HCl pH 8, 300 mmol/L NaCl, 10% glicerol, 0,1% Triton X-100 e 20 mmol/L imidazol) e tampão B (50 mmol/L Tris-HCl pH 8, 300 mmol/L NaCl, 10% glicerol, 0,1% Triton X-100 e 1 mol/L imidazol) em um gradiente linear utilizando 4 volumes de coluna até chegar em 70% de tampão B, sob fluxo de 1 mL/min. A coluna utilizada foi a Hi-Trap Chelating 5 mL (GE Healthcare), carregada com NiCl₂. As frações coletadas na cromatografia de afinidade foram analisadas por SDS-PAGE, juntamente com amostras da fração não induzida, fração bruta e fração insolúvel.

Após a purificação, as proteínas foram dialisadas contra diferentes tampões. A composição do tampão de diálise onde a proteína se manteve solúvel por maior tempo continha HEPES 50 mmol/L pH 8, NaCl 500 mmol/L, glicerol 10% e DTT 1 mmol/L. O tampão de diálise da proteína FdeR N-truncada continha Tris-HCl 50 mmol/L pH 8, NaCl 500 mmol/L e glicerol 10%.

4.14 ENSAIO DE ITC (CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA)

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma técnica empregada para se obter os valores de parâmetros termodinâmicos da interação molecular em solução através da variação de entalpia do sistema. Os parâmetros avaliados pela técnica são: estequiometria da reação, afinidade, variação de entalpia, variação de entropia e variação de energia livre de Gibbs.

O equipamento utilizado para as análises foi o microcalorímetro VP-ITC da MicroCal, e todas as análises foram realizadas a 25°C.

As proteínas utilizadas no estudo foram a FdeR e a FdeR N-truncada purificadas (item 4.13). Uma vez que não se conhecia a constante de afinidade entre

estas proteínas e os ligantes testados (flavonóides), foram testadas várias concentrações dos ligantes e das proteínas até se encontrar a melhor condição de ligação. As soluções titulantes foram preparadas no mesmo tampão em que a proteína foi dialisada para os ensaios. A análise dos resultados e ajuste das linhas de base de cada experimento foram realizadas utilizando o programa Origin 5.0. Os controles com água e tampão também foram realizados.

A Tabela 6 mostra a concentração de proteínas e ligantes utilizada nos ensaios, o tempo das injeções (tempo total da injeção, que é o tempo em que a agulha se manteve liberando o ligante nas proteínas em solução) bem como o intervalo de tempo entre uma injeção e outra (espaçamento).

TABELA 6 – CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA DETERMINAR A INTERAÇÃO PROTEÍNA-LIGANTE.
* A concentração de proteína utilizada para os ensaios foi de 10 µmol/L.

| Proteína * | Ligante | Tempo de injeção (segundos) (1ª e 2ª) | Intervalo de tempo entre as injeções (segundos) |
|-----------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---|
| FdeR | Crisina (1 mmol/L) | 1,6 e 3,2 | 300 |
| FdeR | Naringenina (1 mmol/L) | 1,6 e 6,4 | 400 |
| FdeR | Quercetina (0,5 mmol/L) | 1,6 e 6,4 | 400 |
| FdeR | Ácido protocatecúico (0,5 mmol/L) | 1,6 e 6,4 | 400 |
| FdeR N-truncada | Crisina (0,5 mmol/L) | 1,6 e 6,4 | 400 |
| FdeR N-truncada | Naringenina (1 mmol/L) | 1,6 e 6,4 | 400 |

FONTE: A AUTORA

4.15 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE

A determinação da atividade de β -galactosidase foi feita segundo MILLER, 1972. As células das estirpes SmR1, DR2 e AMM1 de *H. seropedicae* carregando o plasmídeo pSU1 (Tabela 3) foram inoculadas em meio NFbHPN-malato e incubadas por 16 horas. Após este período, as células foram centrifugadas, ressuspensas nas em um novo meio de cultivo variando os indutores (DO_{600nm} inicial de 0,2). Os seguintes compostos foram utilizados como indutores do operon *fde*, todos na

concentração de 0,2 mmol/L: fenilalanina, triptofano, tirosina, ácido benzóico, ácido salicílico, ácido nicotínico, ácido indolacético, resorcinol, naftaleno, quercetina, naringenina, crisina, apigenina, luteolina, kaempferol, daidzeína, genisteína, catequina, flavona, flavonona, 4',7-dihidroxiflanova, isoliquiritigenina, luteolina e etanol (solvente utilizado na diluição dos flavonóides). Estas novas culturas foram incubadas a 30°C por 6 horas a 120 rpm, quando então foi realizado o ensaio de β -galactosidase.

O sistema de reação continha 100 μ L de suspensão bacteriana, 900 μ L de tampão Z (SDS 0,27% e β -mercaptoetanol 0,39% em $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mmol/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mmol/L, KCl 10 mmol/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mmol/L, pH 7,0), e 25 μ L de clorofórmio. Esta mistura foi agitada por 10 segundos e incubada a 30°C por 5 minutos. Foram adicionados 200 μ L do substrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG 4 mg/mL) em tampão Z em cada tubo de ensaio, incubados por 30 minutos, ou até que fosse observada a coloração amarela. A reação foi interrompida com a adição de 500 μ L de Na_2CO_3 1 mol/L. Os tubos de reação foram centrifugados por 2 minutos a 12.100 x g para que o clorofórmio e as células lisadas ficassem no fundo do tubo e não interferissem na leitura da absorbância. Após centrifugação, 200 μ L da reação foram transferidos para placa de 96 poços e a absorbância foi determinada a 415 nm e 550 nm em leitor de microplacas (ELX-800 BioTek Instruments, Inc.).

A atividade específica de β -galactosidase foi calculada como descrito (WASSEM *et al.*, 2002; SCHWAB *et al.*, 2007) expressa em nanomols de *o*-nitrofenol (ONP) formado por minuto por miligrama de proteína total (nmol ONP/min/mg proteína). Para a determinação da concentração de proteínas o método utilizado foi o descrito por BRADFORD (1976), utilizando-se solução de albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Previamente, a lise das células foi realizada pela adição de 1 volume de NaOH 0,2 mol/L e incubação por no mínimo 1 hora, a temperatura ambiente.

4.16 ENSAIOS DE NODULAÇÃO

4.16.1 Construção do plasmídeo pnodD1fdeR

Ensaio de nodulação foram realizados para verificar se a proteína FdeR é capaz de regular a expressão dos genes *nod* de rizóbio, desencadeando a formação do nódulo radicular. Para isto foi construído um plasmídeo que expressa FdeR sob controle do promotor do gene *nodD1* de *Rhizobium* sp. NGR234 (*pnodD1::fdeR*). A construção deste plasmídeo foi realizada em várias etapas. A primeira foi o isolamento do promotor do gene *nodD1*, que foi realizada pela amplificação da região promotora e ligação ao vetor pTZ57R/T (Tabela 3). O molde para a amplificação foi o plasmídeo pMP-nodD1 (Tabela 3) e a amplificação da região promotora foi realizada com os oligonucleotídeos nodD1rev (5' CATATGCTGGCGAATCCACAG 3' Tm: 61°C), que contém sítio de restrição para a endonuclease de restrição *NdeI*, e pMP220for (5' GCTCACCCCAAAAATGGCA 3' Tm: 52°C - Tabela 5). Como as temperaturas de anelamento dos dois oligonucleotídeos são diferentes, a reação de PCR foi realizada com um gradiente de temperaturas (53°C, 56°C e 58°C). A temperatura ótima foi de 56°C. O produto de amplificação foi ligado ao vetor comercial pTZ57R/T e a mistura de ligação transformada em células eletrocompetentes da estirpe DH10B de *E. coli*. O plasmídeo resultante desta ligação foi chamado pTZ57pnodD1 (Tabela 3), e a integridade do inserto confirmada por seqüenciamento. Este plasmídeo foi digerido com as endonucleases *XbaI/NdeI*, e o fragmento resultante liberado foi ligado ao plasmídeo pDEN4 (Tabela 3), previamente digerido com as mesmas enzimas. O novo plasmídeo resultante, chamado de pDEN4nodD1, foi digerido com as endonucleases *XbaI/HindIII*, liberando um fragmento de aproximadamente 1.600 pb que contém a região promotora do gene *nodD1* de NGR234 ligada ao gene *fdeR* de SmR1. Este fragmento foi ligado ao vetor pLAFR3.18 (vetor estável em *Rhizobium* sp. NGR234) previamente digerido com *XbaI/HindIII*, resultando no plasmídeo pnodD1hs. Este plasmídeo foi transformado na estirpe S17.1 de *E. coli* que foi a doadora do plasmídeo na conjugação com as estirpes de *Rhizobium* sp. NGR234 selvagem e mutantes.

4.16.2 Ensaio de nodulação em *Macropitilium atropurpureum* (siratro) e *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda)

Os transconjugantes obtidos foram inoculados em *M. atropurpureum*, que é nodulado por uma ampla variedade de rizóbios, e *V. unguiculata*, que é uma leguminosa que estabelece simbiose com *Rhizobium* sp. NGR234. As condições testadas foram: estirpe selvagem NGR234 portando ou não o plasmídeo pnodD1fdeR; NGR Ω nodD1 portando ou não pnodD1fdeR; NGR Ω nodD2 portando ou não pnodD1fdeR. Nas plântulas inoculadas com a estirpe NGR Ω nodD1 com e sem pnodD1fdeR a nodulação foi testada na presença ou ausência de uma mistura de flavonoides. Esta mistura de flavonóides contém naringenina, crisina, apigenina, kaempferol e genisteína (10 μ mol/L de cada) e foi adicionada ao inoculante no momento da inoculação.

Para os ensaios de nodulação as sementes foram desinfectadas superficialmente com H₂SO₄ concentrado por 10 minutos. Após este tempo, as sementes foram lavadas dez vezes em água estéril e transferidas para placas de cultivo contendo 0,8% ágar:B+D, e deixadas germinar por 2 dias no escuro a 25°C.

Após a germinação as plântulas foram transferidas para caixas magenta (Sigma-Aldrich) contendo meio B+D líquido. Como substrato para as plântulas utilizou-se vermiculita estéril. Após 2 dias as plântulas foram inoculadas com 10⁷ células de cada estirpe e deixadas em casa de vegetação (ciclo 10 horas escuro e 14 horas claro a 23°C) por 6 semanas. Após este tempo as plantas foram retiradas das caixas e os nódulos contados e pesados. A parte aérea de cada planta também foi pesada.

4.17 ANÁLISES TRANSCRICIONAIS DE FdeR EM *Rhizobium* sp. NGR234

Para determinar a capacidade de FdeR em ativar a expressão dos genes *nodABC*, o plasmídeo pGT-NB8 (Tabela 3) foi introduzido por eletroporação na estirpe S17.1 de *E. coli*, que foi então utilizada para as conjugações com as estirpes NGR234 e suas derivadas NGR Ω nodD1 (*nodD1*⁻) e NGR Ω nodD2 (*nodD2*⁻). Estas três estirpes portando ou não o plasmídeo pGT-NB8, foram inoculadas em meio TY, reinoculadas em meio mínimo RMS contendo diferentes flavonoides (10 μ mol/L). Alíquotas de 0,2 mL dos cultivos foram retiradas nos tempos 0, 6, 12, 22 e 48 horas e a densidade óptica da cultura (DO_{600nm}) e a absorbância de fluorescência medidas

em espectrofluorímetro Tecan's Infinite $\text{\textcircled{R}}200$. A expressão foi avaliada através da fluorescência da amostra - fluorescência do branco/ $\text{DO}_{600\text{nm}}$ - $\text{DO}_{600\text{nm}}$ (branco), e é adimensional. O comprimento de onda de excitação foi de 485 nm e o de emissão 535 nm. A leitura foi feita com um feixe de luz superior.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO OPERON *fde* EM *H. seropedicae*

5.1.1 Indução da expressão do operon *fde* por flavonóides e compostos aromáticos

A proteína regulatória FdeR ativa a expressão do operon *fde* de *H. seropedicae* na presença dos flavonóides naringenina, crisina e apigenina (MARIN, 2009). Estes flavonoides pertencem à classe das flavonas (crisina e apigenina) e das flavononas (naringenina). Com o objetivo de encontrar características estruturais comuns entre os indutores, novos ensaios de β -galactosidase foram realizados utilizando-se outros flavonóides (Figura 12).

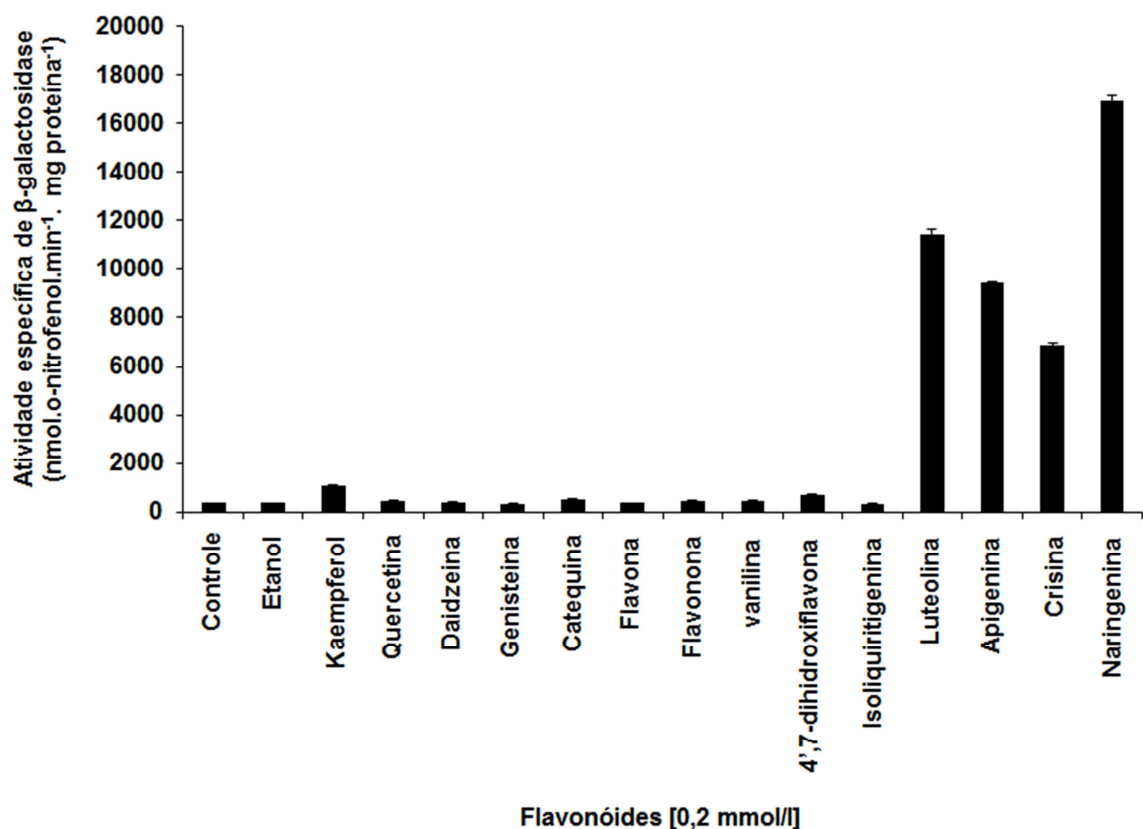


FIGURA 12 – ATIVAÇÃO DA EXPRESSÃO DO OPERON *fde* NA PRESENÇA DE FLAVONÓIDES. A fusão pSU1 (*fdeA::lacZ*) foi introduzida na estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae*. A estirpe bacteriana foi cultivada por 6 horas em meio NFbHPN-malato contendo 0,2 mmol/L dos flavonóides indicados. Após este período de incubação foi determinada a atividade de β -galactosidase. O etanol foi o solvente utilizado para solubilizar os flavonóides e por isto também foi testado.

FONTE: A AUTORA

Dos novos flavonóides testados somente a luteolina (flavona) induziu a expressão de *fde*. Os outros flavonóides testados não induziram a expressão de *fde*. Comparando-se as estruturas dos flavonóides utilizados (Tabela 1), algumas características gerais parecem ser importantes no reconhecimento de FdeR por estas moléculas. Dentre elas, a presença da hidroxila em C₃ parece impedir a ativação de FdeR: a quercetina e o kaempferol, ambos com C₃ hidroxilado, não induzem a expressão de *fdeA*. A hidroxilação do anel-B parece não afetar a capacidade indutora das moléculas. Por outro lado, as hidroxilas no anel-A (em C₅ e C₇) são importantes, uma vez que as estruturas básicas das flavonas e flavononas não são indutoras. Contudo, a genisteína também possui estas hidroxilas neste anel e não é indutora. Isso, provavelmente, se deve ao fato de que o anel-B das isoflavonas (daidzeína e genisteína) está na posição C₃ ao invés de C₂, como nas outras classes.

As proteínas NodD de rizóbios também são da família LysR e são ativadas por flavonóides (DÈNARIÈ *et al.*, 1992), reconhecendo diferentes estruturas desta classe de moléculas (BASSAM *et al.*, 1988). Proteínas NodD de rizóbios que possuem estreita faixa de hospedeiros (por exemplo, *R. meliloti*, *R. leguminosarum*, e *R. trifolii*) respondem a poucos flavonoides (BASSAM *et al.*, 1988). Por outro lado proteínas NodD de rizóbios com grande variedade de hospedeiros, como é o caso de *Rhizobium* sp. NGR234, respondem a vários flavonóides (BASSAM *et al.*, 1988). Geralmente, as flavonas e flavononas são os indutores de NodD de rizóbios, porém a NodD de *Bradyrhizobium* spp. é geralmente ativada pelas isoflavonas (SCHLAMMAN *et al.*, 1992). Em *R. leguminosarum*, a naringenina é o indutor preferencial dos genes *nod* (DÈNARIÈ *et al.*, 1992), que é o flavonóide que mais induz a expressão dos genes *fde* em *H. seropedicae* (Figura 12). Como a NodD de *R. leguminosarum* bv trifolli tem 47/59% (identidade/similaridade) com a FdeR de *H. seropedicae*, sendo a maior similaridade encontrada dentre as NodD de rizóbios, seria esperado que a naringenina fosse o melhor indutor da atividade de FdeR. Outra característica relevante encontrada em flavonóides ativadores de NodD é a posição do radical hidroxila em C₇ e C₄ (BRENCIC E WINANS, 2005), como é o caso da naringenina, apigenina e luteolina que induziram a expressão de FdeR (Figura 12). Contudo, a presença das hidroxilas nestas posições não é o suficiente para que o flavonóide seja indutor de FdeR, uma vez que o composto 4',7-

dihidroxiavona não induziu a expressão de *fde* (Figura 12 e estrutura na Tabela 1). Peters e Long (1988) observaram que a luteolina é o flavonóide mais potente para a indução de genes *nod* de *R. meliloti*. A adição de certos flavonóides, juntamente com luteolina, causa redução da indução, ou seja, estes flavonóides agem como anti-indutores da luteolina. Analisando estruturalmente estes compostos, foi proposto que qualquer modificação na estrutura da luteolina causa diminuição da atividade. A adição de grupos hidroxila na posição 2' (morina) ou 3' (quercetina), a remoção de grupos hidroxila na posição 3' (apigenina) e 4' (crisina), ou da dupla ligação entre C₂-C₃ (eriodictiol) diminuem ou eliminam por completo a atividade do flavonóide (REDDY *et al.*, 2007). Em *H. seropedicae* foi observado que a quercetina e o kaempferol (ambos flavonóis com hidroxila na posição 3) não induziram a expressão, sugerindo que a hidroxila nesta posição diminui o efeito indutor dos flavonóides, uma vez que as hidroxilas nas posições C₃', C₄', C₅ e C₇ encontradas na quercetina também são encontradas na luteolina (indutor), e as hidroxilas nas posições C₄', C₅ e C₇ encontradas no kaempferol também são encontradas na apigenina (indutor).

Uma vez que certos compostos aromáticos podem ser originados a partir da degradação de flavonóides, alguns destes compostos foram utilizados como possíveis indutores, tais como ácido benzóico, ácido fenilacético e resorcinol (Figura 13). Porém, nenhum destes compostos foi capaz de induzir a expressão do operon, reforçando a hipótese de que FdeR reconhece especificamente flavonóides.

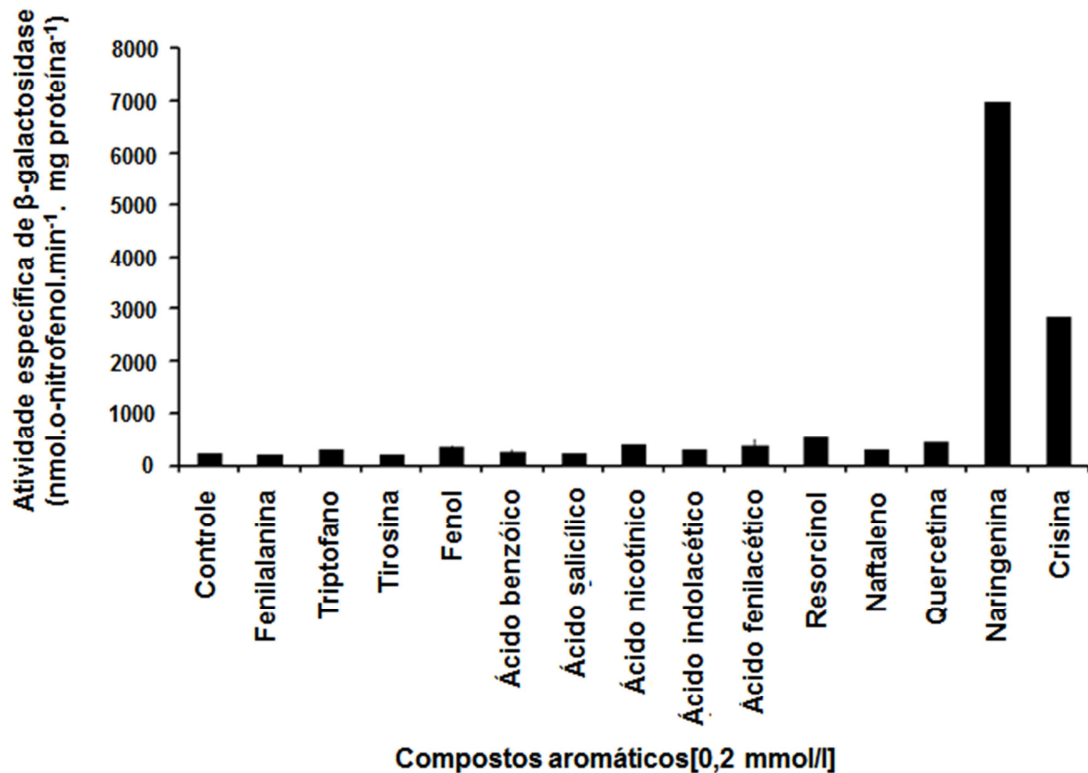


FIGURA 13 – INDUÇÃO DO OPERON *fde* NA PRESENÇA DE OUTROS COMPOSTOS AROMÁTICOS. A fusão pSU1 foi introduzida na estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae*. Os cultivos bacterianos foram cultivados por 6 horas em meio NFbHPN-malato contendo 0,2 mmol/L dos compostos indicados. Após este período de incubação foi realizado o ensaio de β-galactosidase. A quercetina foi utilizada como controle negativo, e a naringenina e crisina como controles positivos. FONTE: A AUTORA

5.1.2 Determinação das constantes de afinidade entre os flavonóides, FdeR e FdeR N-truncada.

As estruturas tridimensionais de algumas proteínas da família LysR já foram obtidas (SMIRNOVA *et al.*, 2004; MURAOKA *et al.*, 2003; RUANGPRASERT *et al.*, 2010). Porém estes trabalhos não mostram a ligação ao indutor natural. Além disto, não se conhece as constantes de afinidade (proteína-indutor) para proteínas desta família. Estudos de ITC foram realizados para determinar os valores dos parâmetros termodinâmicos da ligação FdeR-flavonóide.

A proteína FdeR purificada foi utilizada nos ensaios de ITC (item 4.13). As curvas de titulação isotérmica da proteína FdeR com crisina e naringenina estão mostradas na Figura 14. Os parâmetros termodinâmicos obtidos estão mostrados na Tabela 6.

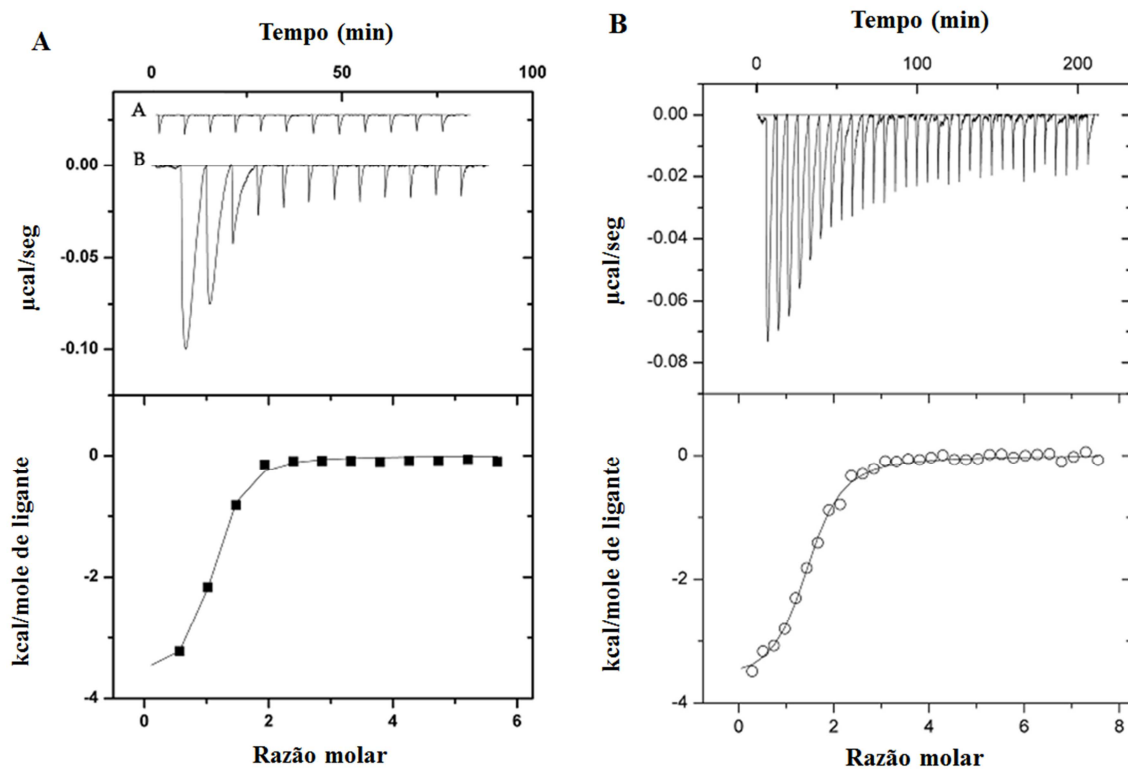


FIGURA 14 – CALORIMETRIA POR TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DA PROTEÍNA FdeR DE *H. seropedicae* TITULADA COM NARINGENINA E CRISINA. A titulação de FdeR com os ligantes foi realizada em um microcalorímetro VP-ITC (Microcal) e os dados gerados foram analisados com o auxílio do programa Origin 5.0. A concentração de proteína no experimento foi de $10 \mu\text{mol/L}$ e a solução titulante foi preparada a 1 mmol/L . A razão molar é dada pela relação (concentração do ligante/concentração de FdeR) na célula de reação. O ajuste da curva sigmóide foi obtido considerando que a proteína tem um único sítio de ligação e está na forma monomérica. (A) 1 mmol/L de naringenina como titulante; (B) 1 mmol/L de crisina como titulante. Dentro da figura (A) há uma subdivisão, onde (A) é a titulação de tampão de diálise contendo o 1 mmol/L de naringenina em tampão de diálise (controle).

FONTES: A AUTORA

Como controles negativos foram realizados ensaios com o flavonóide quercetina, que não induz a expressão do operon *fde* (Figura 12) e ácido protocatecuico. Em ambos os casos não foi observada ligação, indicando que os experimentos de ITC mostram a ligação específica dos flavonóides naringenina e crisina à proteína FdeR.

TABELA 7 – PARÂMETROS TERMODINÂMICOS OBTIDOS PARA FdeR LIGANDO À NARINGENINA OU CRISINA. K_B : constante de afinidade; ΔH : variação de entalpia; T: temperatura absoluta (Kelvin); ΔG : variação de energia livre de Gibbs; N: número de ligantes; ligação: se há união ao indutor.

| FdeR 10 μ M | K_B (M ⁻¹) | ΔH kcal/mol | ΔG kcal/mol | N | ligação |
|--------------------|--|------------------------|------------------------|---------------------|---------|
| Crisina 1mM | 4,93 10 ⁵ ± 7,6 10 ⁴ | -2,293 ± 0,77 | -7,76 ± 0,092 | 2,1 ± 0,051 | sim |
| Naringenina 1mM | 1,73 10 ⁶ ± 3,6 10 ⁵ | -3,693 ± 0,143 | -8,51 ± 0,125 | 0,948 ± 0,026 | sim |

FONTES: A AUTORA

Os dados obtidos mostram que a proteína FdeR tem afinidade maior pela naringenina (1,73 x 10⁶ M⁻¹) do que pela crisina (4,93 x 10⁵ M⁻¹) (Tabela 7). A titulação mostrada na Figura 14A mostra que após a 4^a injeção do titulante (naringenina) sobre a proteína FdeR em solução na célula de reação, não houve mais modificação na resposta, e por este motivo os dados após a 12^a injeção foram retirados. Concentrações menores de naringenina foram utilizadas, mas nestas condições não houve ligação. Também foi observada a ligação de crisina (Figura 14B), porém com afinidade menor do que aquela observada para naringenina (Tabela 7).

Os dados obtidos nos experimentos de titulação calorimétrica indicam estequiometrias diferentes para a ligação de crisina e naringenina (Tabela 7). Aparentemente, a proteína FdeR possui dois sítios para ligação de crisina e um sítio para ligação de naringenina, como é possível observar pelo número de ligantes (N) na Tabela 7.

Além de FdeR nativa também foi testada uma variante N-truncada desta proteína. Esta variante foi utilizada para observar se há algum tipo de modificação na resposta aos indutores, uma vez que possui somente o domínio de interação com o indutor. As condições do experimento estão na Tabela 6 (item 4.14), e a curva de titulação está mostrada na Figura 15. Os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos pela interação entre o domínio C-terminal de FdeR e crisina (Tabela 8; Figura 15).

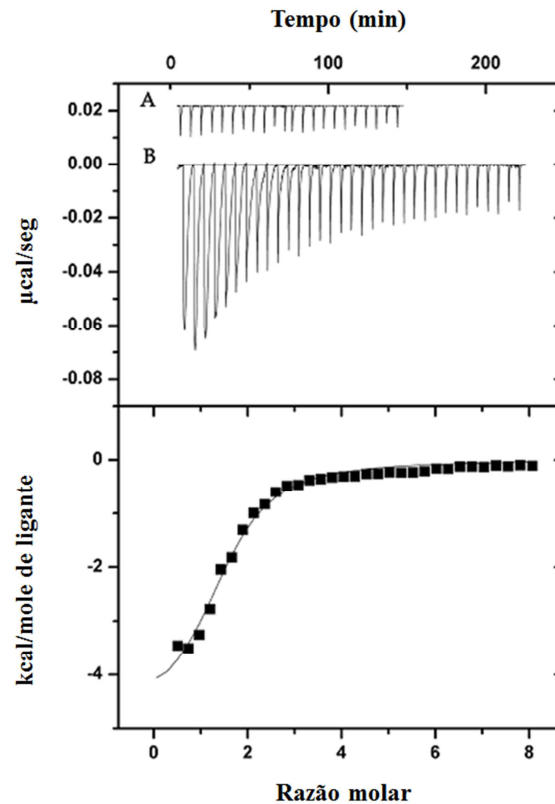


FIGURA 15 – TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DA PROTEÍNA FdeR N-truncada DE *H. seropedicae* TITULADA COM CRISINA. A titulação de FdeR com os ligantes foi realizada em um microcalorímetro VP-ITC (Microcal) e os dados gerados foram analisados com o auxílio do programa Origin 5.0. A concentração de proteína FdeR N-truncada no experimento foi de 10 $\mu\text{mol/L}$ e crisina 0,5 mmol/L . A razão molar é dada pela relação (concentração do ligante/concentração de proteína) na célula de reação. O ajuste da curva sigmóide foi feito considerando que a proteína tem um único sítio de ligação e está em sua forma monomérica. Dentro da figura (A) há uma subdivisão, onde (A) é a titulação de tampão de diálise contendo 0,5 mmol/L de crisina em tampão de diálise (controle). (B) Titulação do tampão de diálise contendo 0,5 mmol/L de crisina em FdeR N-truncada.
 FONTE: A AUTORA

TABELA 8 – PARÂMETROS TERMODINÂMICOS OBTIDOS PARA FdeR N-TRUNCADA LIGANDO A CRISINA. K_B : constante de ligação; ΔH : variação de entalpia; T: temperatura absoluta (Kelvin); ΔG : variação de energia livre de Gibbs; N: número de ligantes; ligação: se há união da proteína ao indutor.

| LysR 10 μM | K_B (M^{-1}) | ΔH kcal/mol | ΔG kcal/mol | N | ligação |
|--------------------------|---|------------------------|------------------------|--------------------|---------|
| Crisina 0.5mM | $3,76 \cdot 10^5 \pm$ $5,6 \cdot 10^4$ | $-4,819 \pm$ 0,269 | $-7,6 \pm$ 0.089 | $1,48 \pm$ 0.06 | sim |
| Naringeni na | - | - | - | - | não |

FONTE: A AUTORA

A proteína N-truncada foi capaz de ligar crisina, com uma afinidade semelhante àquela encontrada para a proteína inteira (Tabelas 7 e 8). No entanto, em relação à interação desta proteína com a naringenina, na condição testada não houve saturação da proteína pelo ligante (Figura 16). Por este motivo não foi possível obter os valores dos parâmetros para esta interação.

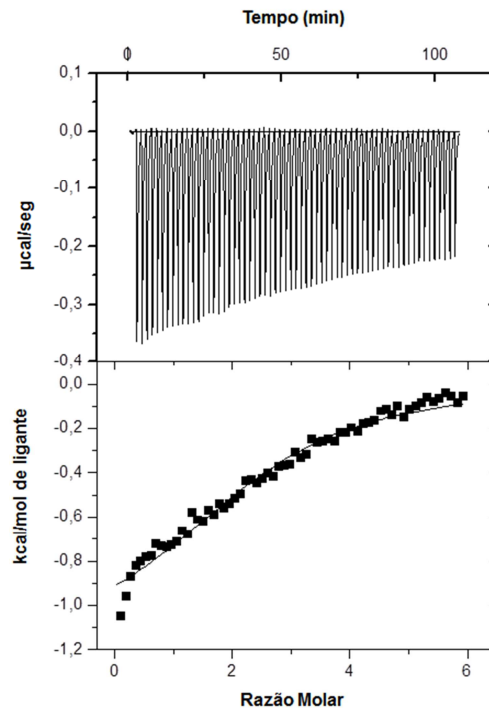


FIGURA 16 - TITULAÇÃO ISOTÉRMICA DA PROTEÍNA FdeR N-truncada DE *H. seropedicae* TITULADA COM NARINGENINA. A titulação de FdeR com os ligantes foi realizada em um microcalorímetro VP-ITC (Microcal) e os dados gerados foram analisados com o auxílio do programa Origin 5.0. A concentração de proteína FdeR N-truncada no experimento foi de 10 $\mu\text{mol/L}$ e naringenina 1 mmol/L . A razão molar é dada pela relação (concentração do ligante/concentração de proteína) na célula de reação. O ajuste da curva sigmóide foi feito considerando que a proteína tem um único sítio de ligação e está em sua forma monomérica.
 FONTE: A AUTORA

5.1.3 FdeR no processo de nodulação em *Rhizobium* sp. NGR234

Uma vez que FdeR tem 42/56% de identidade/similaridade com a NodD de *Rhizobium* sp. NGR234, foram realizados dois tipos de experimentos para determinar se FdeR é capaz de substituir as proteínas NodD1 e NodD2 de *Rhizobium* sp. NGR234 ativando a transcrição e desencadeando a formação de nódulos radiculares em *Macroptilium atropurpureum* e *Vigna unguiculata*.

5.1.3.1 Ativação transcricional do operon *nodD1* de *Rhizobium* sp. NGR234 pela proteína FdeR de *H. seropedicae*

Para as análises transcricionais foram utilizadas as estirpes selvagem, NGR Ω *nodD1* e NGR Ω *nodD2* de *Rhizobium* sp. NGR234 nas quais foram introduzidos os plasmídeos pLAFRfdeR e pGT-NB8 (Tabela 3). Este experimento foi realizado para avaliar a capacidade de FdeR, codificada a partir do plasmídeo pLAFRfdeR, em ativar a transcrição dos genes *nod*, a partir do promotor fusionado com o gene *gfp* em pGT-NB8, uma vez que FdeR reconhece e se liga ao promotor *nodABC* de NGR234 (Roseli Wassem, comunicação pessoal). As bactérias foram cultivadas em meio TY, transferidas para meio RMS e reinoculadas neste mesmo meio na presença de uma mistura de flavonóides que continha naringenina, crisina, apigenina, kaempferol e genisteína (10 μ mol/L de cada). As medidas de fluorescência foram realizadas nos tempos 0, 6, 12, 22 e 48 horas após o inóculo.

A Figura 17 mostra o perfil de expressão de *nodABC* em diferentes condições testadas. Os resultados deste experimento mostram que FdeR complementa a estirpe *nodD1*⁻ apenas quando os flavonóides estão presentes. Entretanto, a complementação é parcial, uma vez que a ativação pela estirpe selvagem NGR234 é cerca de 9 vezes maior que a complementada. Uma vez que FdeR está sendo expressa a partir do promotor *lac*, é possível que seus níveis não sejam equivalente aos de NodD1, e por este motivo ocorra a complementação parcial.

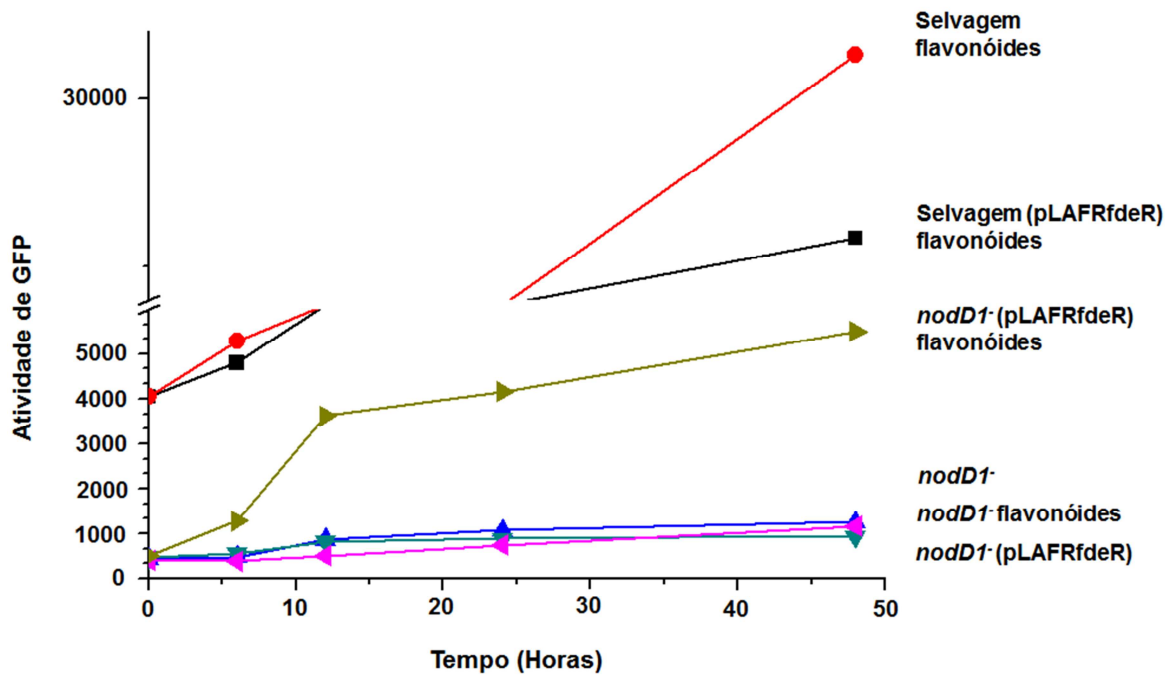


FIGURA 17 – ATIVAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *nodABC* SOB CONTROLE DE FdeR. O resultado apresentado no gráfico é representativo de todos os experimentos realizados. Em todas as condições descritas nas legendas desta figura o plasmídeo pGT-NB8 esteve presente. Para este experimento as bactérias foram cultivadas em meio RMS nas condições acima descritas, e analisadas nos tempos indicados. No tempo 0 a suspensão de bactérias foi coletada no momento da adição dos flavonóides. FONTE: A AUTORA

5.1.3.2 Complementação fenotípica *NodD*⁻ de *Rhizobium* sp. NGR234

Como FdeR apresenta 42/56% (identidade/similaridade) com a proteína NodD de rizóbios, a mesma foi testada para complementar fenotipicamente os mutantes *nodD*⁻ de *Rhizobium* sp. NGR234. Para tal, o plasmídeo *pnodD1fdeR*, que contém a região promotora do gene *nodD1* de *Rhizobium* sp. NGR234 fusionado ao gene *fdeR* de *H. seropedicae*, foi introduzido nas estirpes selvagem, NGR Ω *nodD1* e NGR Ω *nodD2* de *Rhizobium* sp. NGR234. Em *Rhizobium* sp. NGR234 a proteína NodD1 é a responsável pela ativação dos genes *nod* levando à formação do nódulo (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Portanto, o promotor de *nodD1* foi escolhido para garantir que os níveis de expressão da proteína FdeR fossem semelhantes aos de NodD.

As estirpes bacterianas contendo o plasmídeo *pnodD1fdeR* foram cultivadas em meio RMS para serem inoculadas em duas leguminosas: *Vigna unguiculata* e *Macroptilium atropurpureum* que são hospedeiras naturais de *Rhizobium* sp.

NGR234. As plantas inoculadas com a estirpe *nodD1*⁻ contendo o plasmídeo *pnodD1fdeR* foram tratadas com uma mistura de flavonóides que contém apigenina, crisina, genisteína, kaempferol e naringenina (10 µmol/L de cada). Após 6 semanas as partes aéreas das plantas foram pesadas, e os nódulos radiculares contados e pesados. Os resultados estão nas Tabelas 9 e 10.

TABELA 9 – PESO TOTAL DA PARTE AÉREA (g), NÚMERO E PESO DOS NÓDULOS DE *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda). Foram utilizadas duas plantas para cada estirpe inoculada.

| Estirpe inoculada | Peso médio da parte aérea das duas plantas (g) ± desvio padrão | Número médio de nódulos das duas plantas ± desvio padrão | Peso médio dos nódulos das duas plantas (g) ± desvio padrão | Cor dos nódulos |
|--|--|--|---|-----------------|
| NGR234 | 3,34 ± 0,44 | 61,5 ± 4,94 | 0,18 ± 0,03 | Rosas |
| NGR234 pLAFRfdeR | 2,90 ± 0,62 | 33,0 ± 4,24 | 0,26 ± 0,007 | Rosas |
| NGRΩ <i>nodD1</i> | 0,98 ± 0,05 | Sem nódulos | | |
| NGRΩ <i>nodD1</i> ⁻ + mistura de flavonóides | 1,02 ± 0,07 | Sem nódulos | | |
| NGRΩ <i>nodD1</i> pLAFRfdeR | 0,71 ± 0,36 | Sem nódulos | | |
| NGRΩ <i>nodD1</i> pLAFRfdeR + flavonóides | 1,06 ± 0,11 | Sem nódulos | | |
| NGRΩ <i>nodD2</i> | 1,51 ± 0,19 | 30,5 ± 7,77 | 0,15 ± 0,014 | Rosas |
| NGRΩ <i>nodD2</i> pLAFRfdeR | 1,60 ± 0,93 | 43,5 ± 14,84 | 0,30 ± 0,26 | Rosas |

FONTE: A AUTORA

TABELA 10 - PESO TOTAL DA PARTE AÉREA (g), NÚMERO E PESO DOS NÓDULOS DE *Macroptilium atropurpureum* (siratro). Foram utilizadas quatro plantas para cada estirpe inoculada.

| Estirpe inoculada | Peso médio da parte aérea das quatro plantas (g) ± desvio padrão | Número médio de nódulos das quatro plantas ± desvio padrão | Peso médio dos nódulos das quatro plantas (g) ± desvio padrão | Cor dos nódulos |
|--|--|--|---|----------------------|
| NGR234 | 0,87 ± 0,28 | 21,2 ± 3,7 | 0,13 ± 0,01 | Rosas |
| NGR234 pLAFRfdeR | 0,81 ± 0,29 | 19,7 ± 5,5 | 0,09 ± 0,04 | Rosas Continuação |
| NGRΩ <i>nodD1</i> | 0,24 ± 0,08 | Sem nódulos | | Continua |
| NGRΩ <i>nodD1</i> ⁻ + mistura de flavonóides | 0,28 ± 0,05 | Sem nódulos | | |
| NGRΩ <i>nodD1</i> pLAFRfdeR | 0,27 ± 0,04 | Sem nódulos | | |
| NGRΩ <i>nodD1</i> pLAFRfdeR + flavonóides | 0,26 ± 0,02 | Sem nódulos | | |
| NGRΩ <i>nodD2</i> | 0,31 ± 0,07 | 28,75 ± 5,79 | 0,08 ± 0,01 | Brancos |
| NGRΩ <i>nodD2</i> pLAFRfdeR | 0,27 ± 0,03 | 32,75 ± 6,07 | 0,08 ± 0,03 | Brancos |

Em *V. unguiculata* (Tabela 9) as estirpes selvagem e NGR Ω *nodD2* com ou sem o plasmídeo *pnodD1fdeR* formaram nódulos. Em todos os casos os nódulos apresentaram coloração rosa, indicando que estava havendo fixação de nitrogênio. A estirpe NGR Ω *nodD1*, incapaz de ser noduladora, não foi complementada por *FdeR* de *H. seropedicae*.

Quando inoculadas em *M. atropurpureum* (Tabela 10) o mesmo resultado foi obtido, exceto que os nódulos encontrados nas plantas contendo NGR Ω *nodD2* sem e com *pnodD1fdeR* mostraram coloração branca, sugerindo que são Fix^- . A estirpe NGR Ω *nodD2* pode formar nódulos verdadeiros (rosas), onde há bactérias fixando nitrogênio, ou pseudonódulos (brancos), dependendo da planta com que se associa.

A presença da mistura de flavonóides não modificou a formação de nódulos. Três dos flavonóides presentes na mistura (apigenina, crisina e naringenina) são indutores de *FdeR*, como visto nos ensaios de β -galactosidase em *H. seropedicae* (Figura 12). Ensaios de interação DNA-proteína (footprinting) mostram que *FdeR* reconhece o *nod* box presente no promotor de *nodABC* de NGR234 (Roseli Wassem, comunicação pessoal), que contém um motivo LysR muito semelhante ao encontrado na região intergênica entre *fdeR* e *fdeA* de *H. seropedicae*. Logo, *FdeR* é capaz de se ligar a região promotora de *nodABC* e ativar, ao menos em parte, a transcrição destes genes (Figura 17), mas não leva à formação dos nódulos. Este processo depende da ativação de outros genes (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Possivelmente *FdeR* não reconhece os demais *nod*-boxes necessários para a correta formação dos nódulos radiculares. Portanto, *FdeR* não é uma *NodD stricto sensu*.

Em *Rhizobium* sp. NGR234 há uma cascata regulatória que desencadeia o processo de nodulação (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Nesta cascata *NodD1* tem papel principal, regulando a expressão de vários genes envolvidos na síntese de fatores *Nod*, incluindo os genes do TTSS (do inglês, Type Three Secretion System) e de *SyrM2*. *SyrM2* por sua vez está envolvida na regulação de *NodD2* e de genes envolvidos na síntese de LPS (lipopolissacarídeos). Além disso, *NodD2* também reprime *NodD1*. Mutantes *nodD2* $^-$ podem apresentar nódulos Fix^+ ou Fix^- dependendo da planta com que interagem. Por isto diz-se que *NodD2* está envolvida na determinação de especificidade pelos hospedeiros. Fellay e colaboradores (1998)

encontraram nódulos Fix⁻ em plantas inoculadas com a estirpe *nodD2⁻* de NGR234, apesar de os nódulos encontrados serem rosas (indicativo de fixação de nitrogênio). Nos experimentos mostrados neste trabalho, viu-se que *nodD2⁻* induz a formação de nódulos possivelmente Fix⁻ em *V. unguiculata* e em *M. atropurpureum*, e FdeR não interfere neste processo.

5.2 METABOLISMO DE NARINGENINA EM *Herbaspirillum seropedicae*

5.2.1 Flavonóides como fonte de carbono

Sabendo-se que *H. seropedicae* SmR1 é capaz de degradar o flavonóide naringenina, e que os mutantes DR2 (*fdeR⁻*) e AMM1 (*fdeA⁻*) não o realizam (MARIN, 2009), foi testada a capacidade destas estirpes em utilizar este composto, assim como a quercetina, como fonte de carbono. A quercetina também foi testada por não ser indutora da expressão de *fde*, e desta maneira poderia se sugerir uma possível especificidade da via em estudo pela degradação de naringenina.

Como os flavonóides são pouco solúveis em soluções aquosas, foi utilizado o composto 2,2,4,4,6,8,8-heptametilnonano no preparo das soluções estoques. Ao se adicionar este composto em meios aquosos ocorre a formação de duas fases, uma vez que este alceno não é hidrossolúvel. Este composto não é utilizado pela bactéria como fonte de carbono (dado não mostrado), e disponibiliza o flavonóide para a bactéria de maneira lenta e contínua. Assim tornou-se possível observar se a bactéria utiliza ou não tais flavonóides como fonte de carbono.

As bactérias foram inoculadas em meio NFbHPN na presença de 10 mmol/L de naringenina (30°C e 120 rpm). O número de UFC (unidades formadoras de colônias) foi determinado nos dias 0, 1, 2, e 3. O resultado das contagens está mostrado na Figura 18.

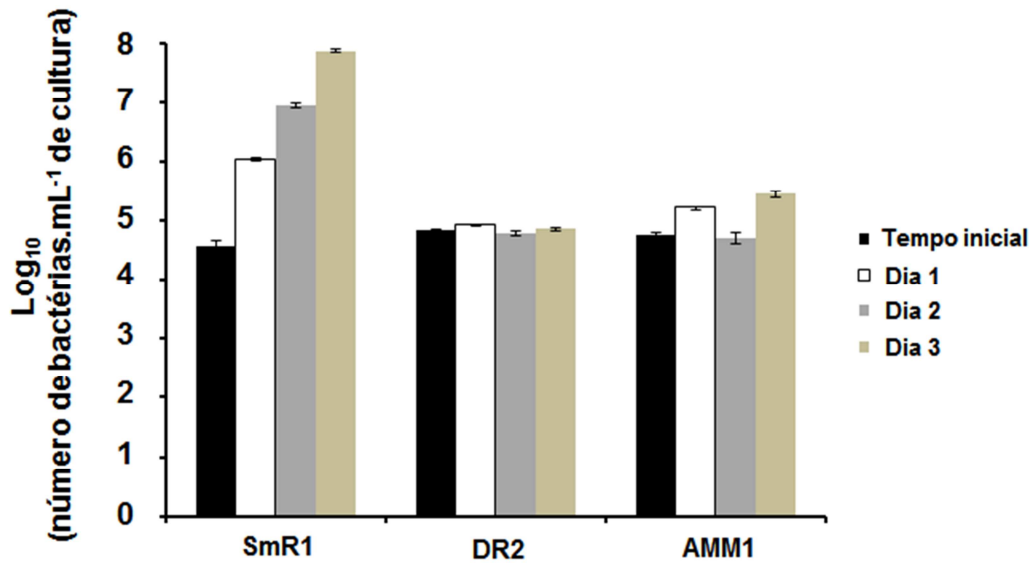


FIGURA 18 – CRESCIMENTO DE *H. seropedicae* SmR1 E MUTANTES DR2 (*fdeR*) E AMM1 (*fdeA*) NA PRESENÇA DE NARINGENINA COMO FONTE DE CARBONO. Foram adicionadas 10^5 células, no início do experimento, ao meio de cultivo (NFbHPN) contendo 10 mmol/L de naringenina como única fonte de carbono. Amostras foram coletadas diariamente, diluídas, e inoculadas em meio sólido em triplicata de 5 μ L de cada diluição em meio NFbHPN-malato.
 FONTE: A AUTORA

Os resultados mostraram que a estirpe selvagem SmR1 utiliza a naringenina como fonte de carbono, porém as estirpes mutantes DR2 e AMM1 não. O meio de cultura da estirpe DR2 permaneceu sem crescimento bacteriano após 3 dias de incubação. Porém o meio de cultura da estirpe AMM1 apresentou coloração amarela depois dos 3 dias de cultivo, assim como a estirpe SmR1, indicando que esta estirpe mutante ainda possui a capacidade de metabolizar este composto, mas que este consumo não aumenta a sua biomassa (Figura 18). Logo, a estirpe AMM1 metaboliza naringenina, mas não a utiliza como fonte de carbono. Esta metabolização realizada pela estirpe AMM1 pode estar ocorrendo devido a um não bloqueio completo da transcrição do operon pela estratégia empregada na construção do mutante.

A coloração amarela do meio de cultivo, após o crescimento destas estirpes bacterianas na presença de naringenina, possivelmente se deve a algum produto originado da degradação deste flavonóide. Contudo não se até o momento não se conhece a sua identidade.

Além da naringenina, a quercetina também foi testada como fonte de carbono. Os resultados estão na Figura 19.

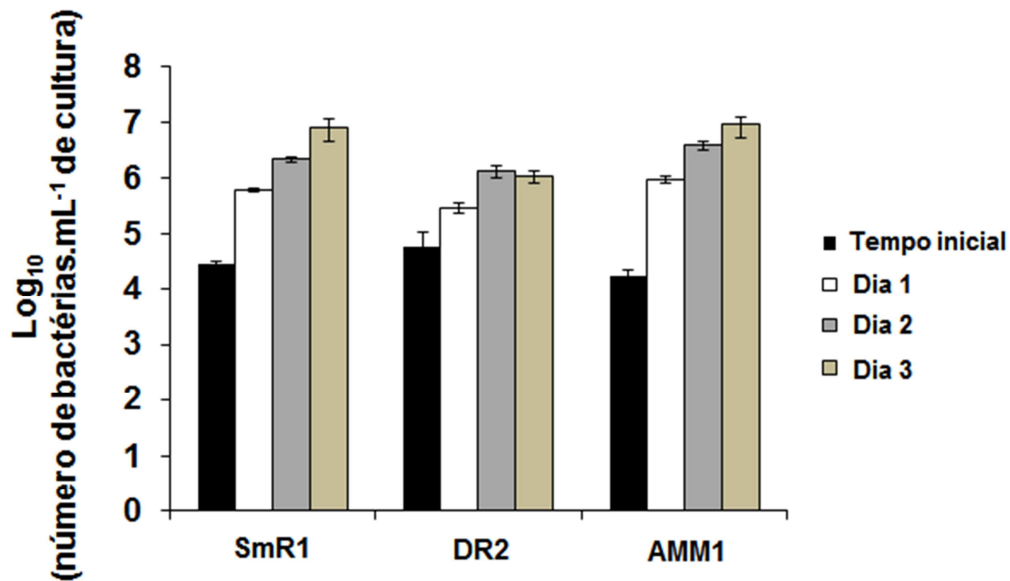


FIGURA 19 – CRESCIMENTO DE *H. seropedicae* SmR1 E MUTANTES DR2 (*fdeR*) E AMM1 (*fdeA*) NA PRESENÇA DE QUERCETINA COMO FONTE DE CARBONO. Foram adicionadas 10^5 células, no início do experimento, ao meio de cultivo (NFbHPN) contendo 10 mmol/L de quercetina como única fonte de carbono. Amostras foram coletadas diariamente, diluídas, e palqueada em triplicata de 5 μ L em meio NFbHPN-malato.

FONTE: A AUTORA

A quercetina também pode ser utilizada como fonte de carbono pela estirpe selvagem de *H. seropedicae*, porém as estirpes mutantes também a utilizam (Figura 19). O resultado sugere que os genes *fde* codificam proteínas especificamente envolvidas na via de degradação da naringenina.

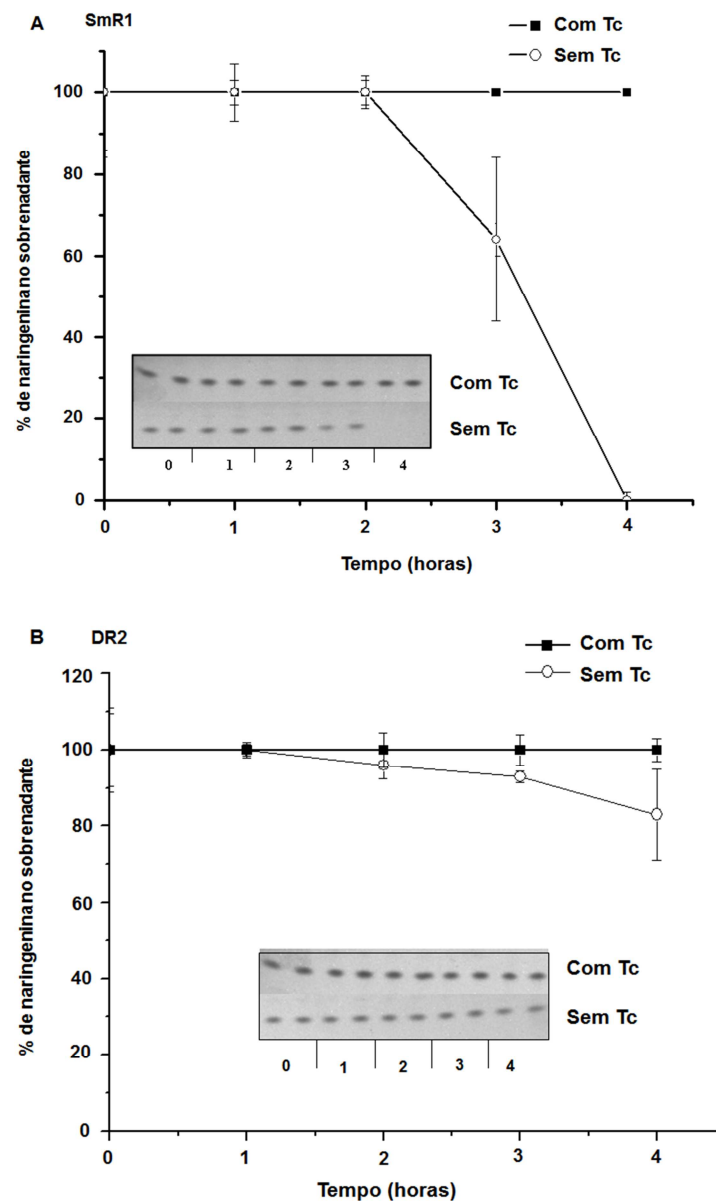
Em outros microrganismos já havia sido descrita a capacidade de utilizar flavonóides como fonte de carbono. Pillai e Swarup (2002) mostraram que *P. putida* PML2 pode crescer utilizando quercetina como fonte de carbono. Arunachalam e colaboradores (2003) relataram que *Acinetobacter calcoaceticus* MTC 127 pode utilizar (+)-catequina como única fonte de carbono.

5.2.2 Degradação de naringenina

Para confirmar o envolvimento dos genes *fde* na degradação de naringenina procuramos demonstrar a necessidade da síntese de proteínas para que este metabolismo ocorra. A atividade do extrato livre de células complementa estes resultados.

5.2.2.1 A degradação de naringenina requer a síntese *de novo* de proteínas por *H. seropedicae* SmR1

As estirpes SmR1, DR2 e AMM1 foram cultivadas durante a noite em meio NFbHPN-malato, centrifugadas e ressuspensas para atingir uma DO_{600nm} igual a 1,0 em um novo meio contendo 0,2 mmol/L de naringenina, na presença ou ausência de tetraciclina (10 $\mu\text{g/mL}$), que é um inibidor da síntese de proteínas em bactérias. O resultado está representado na Figura 20.



Continua

Continuação

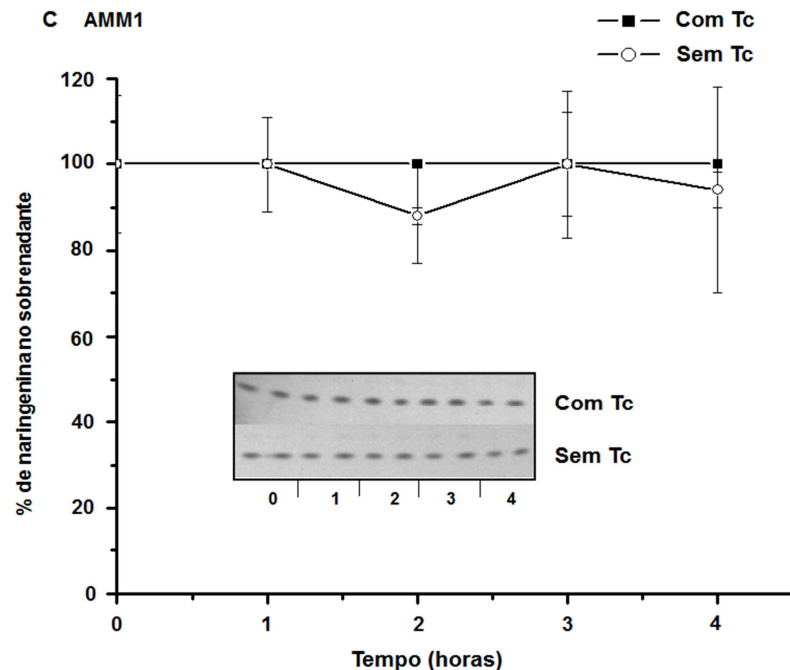


FIGURA 20 – A DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA REQUER A SÍNTESE DE NOVO DE PROTEÍNAS. As culturas foram incubadas a 30°C e 120 rpm. Amostras foram coletadas nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas após a adição de naringenina. No centro de cada figura são mostrados os cromatogramas que foram utilizados para o cálculo da intensidade relativa das bandas (item 4.13.2). Todas as amostras foram analisadas em duplicata e foram realizados 3 experimentos independentes. As figuras aqui apresentadas são representativas de um destes experimentos. (A) SmR1, (B) DR2 e (C) AMM1.

FONTE: A AUTORA

Após 4 horas de incubação a estirpe selvagem (Figura 20A) na ausência de tetraciclina havia consumido toda a naringenina presente no meio de cultivo, uma vez que a naringenina deixou de ser detectada (bandas escuras nas cromatografias), enquanto nenhuma das estirpes mutantes foi capaz de consumi-la (Figuras 20B e 20C). Na presença de tetraciclina nenhuma das estirpes foi capaz de consumir naringenina, mostrando que seu catabolismo é dependente da síntese *de novo* de proteínas. Nas estirpes mutantes a naringenina não foi consumida, mesmo quando a maquinária de síntese protéica estava ativa (sem tetraciclina). Isto reforça a conclusão de que a síntese de proteínas é essencial para o catabolismo de naringenina, e que os produtos dos genes *fde* são necessários. Além disto, com este experimento foi determinado um método de acompanhamento da degradação da naringenina, uma vez que as curvas de crescimento mostraram que este composto é utilizado por *H. seropedicae* SmR1 (Figura 18).

5.2.2.2 Degradação de naringenina por extrato protéico livre de células

Utilizando-se extrato protéico livre de células, que contém grande parte das proteínas citoplasmáticas expressas pela bactéria, é possível observar como o sistema funciona excluindo o envolvimento da membrana citoplasmática que pode afetar o transporte de naringenina. Além disto, a membrana pode deixá-la indisponível, uma vez que devido à sua hidrofobicidade a naringenina pode permanecer na bicamada lipídica.

Para este experimento as estirpes SmR1 (selvagem), DR2 (*fdeR*) e AMM1 (*fdeA*⁻) de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHPN-malato na presença ou ausência de 0,2 mmol de naringenina. Após 6 horas, o extrato protéico livre de células foi preparado, e 10 µg de proteína total foram utilizados para os ensaios. Amostras foram coletadas nos tempos indicados na Figura 21 e a presença de naringenina foi analisada por TLC (bandas escuras).

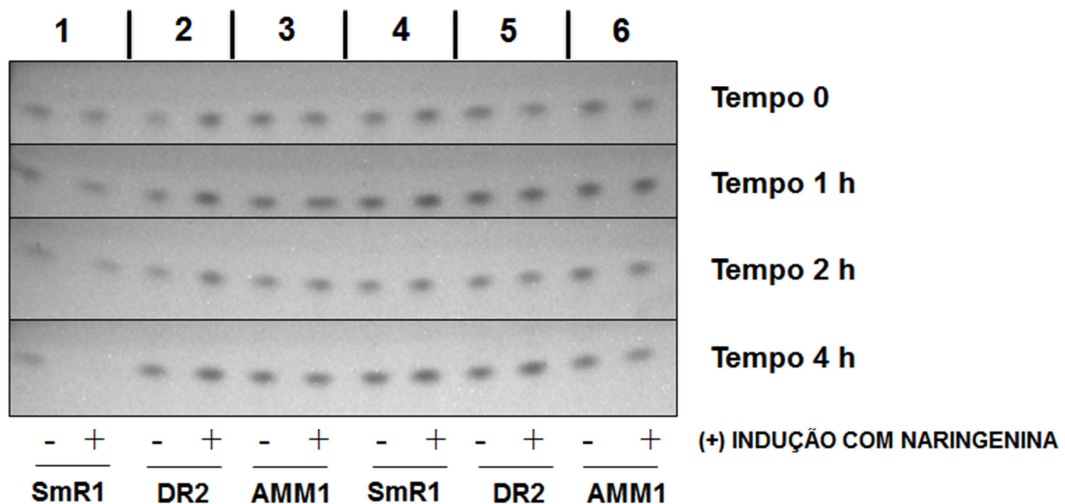


FIGURA 21 – DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA POR EXTRATOS PROTEÍCOS LIVRES DE CÉLULAS. As estirpes SmR1, DR2 e AMM1 foram incubadas durante 6 horas em meio NFbHPN-malato sem naringenina (-) e com naringenina (+). Após este tempo as culturas foram processadas (item 4.13.3) e os extratos protéicos obtidos. De 1 a 3 estão as duplicatas da degradação dos extratos não desnaturados; de 4 a 6 estão as duplicatas da degradação dos extratos incubados a 100°C para a desnaturação protéica.

FONTE: A AUTORA

Somente o extrato protéico da estirpe SmR1 cultivada na presença de naringenina foi capaz de degradá-la, confirmando o envolvimento das proteínas

codificadas pelo operon *fde* na degradação, e a necessidade de indução. Como controle, alíquotas dos extratos foram aquecidas a 100°C por 15 minutos e a atividade avaliada. Após a inativação térmica a naringenina não foi degradada.

Com este método de análise foi possível excluir o envolvimento da membrana no desaparecimento da naringenina, e corroborar o envolvimento das proteínas codificadas pelo operon *fde* neste processo.

5.2.2.3 Complementação dos mutantes DR2 e AMM1 com os genes *fdeR* e *fdeA*

Como as estirpes mutantes (DR2 e AMM1) se mostraram incapazes de degradar a naringenina, foram construídos 2 plasmídeos para realizar complementações *in trans* dos genes mutagenizados (pLAFRfdeR e pLAFRfdeA). Estes plasmídeos foram introduzidos nas estirpes mutantes acima mencionadas por eletroporação, e as estirpes resultantes foram utilizadas em ensaios de degradação de naringenina, como mostrado nas Figuras 22 e 23.

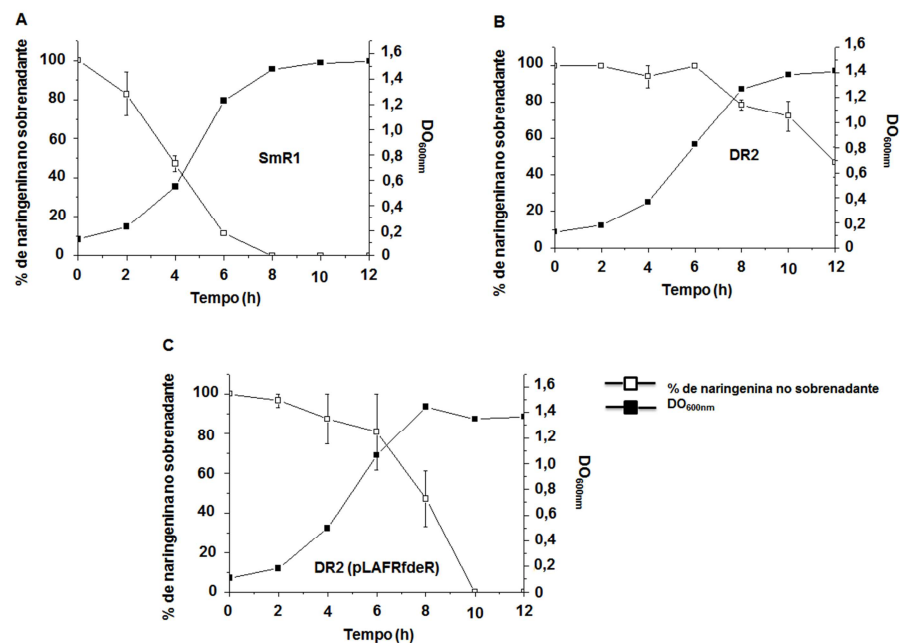


FIGURA 22 – COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE DR2 COM O GENE *fdeR*. No início do ensaio as células das estirpes SmR1, DR2 e DR2 (pLAFRfdeR) foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em meio NFbHPN-malato contendo 0,2 mmol/L de naringenina. A DO_{600nm} das culturas foi ajustada para 0,1 e em seguida incubadas sob agitação. Nos tempos indicados nos gráficos acima, 1 mL de cada cultura foi coletado, a DO_{600nm} medida, e após centrifugação a naringenina foi extraída (item 4.13.1). As análises foram realizadas por TLC, e os pixels quantificados pelo programa Image Master. (A) SmR1, (B) DR2, (C) DR2 (pLAFRfdeR).

FONTE: A AUTORA

O controle negativo continha todos os componentes, mas não bactéria, e mostrou que o flavonóide não é quimicamente degradado durante o experimento (dado não mostrado).

Como mostra a Figura 22 a estirpe DR2 (pLAFRfdeR) (Figura 22C) foi capaz de degradar a naringenina assim como a estirpe selvagem (Figura 22A), apesar de o realizar mais lentamente. Esta diferença no tempo de degradação pode ser explicada pelo fato de o gene *fdeR* estar sob controle do promotor *lac*, presente no vetor, e não sob o controle do seu próprio promotor. Contudo, a complementação ainda que parcial, comprova que a proteína FdeR é necessária para o catabolismo da naringenina.

A estirpe AMM1 contendo ou não o plasmídeo pLAFRfdeA, também foi analisada. A Figura 23 mostra que não houve complementação, uma vez que mesmo com o plasmídeo pLAFRfdeA a estirpe AMM1 não degradou a naringenina. Isto sugere que a mutação no gene *fdeA* afetou a expressão dos demais genes do operon, e que a melhor maneira de tentar complementar este mutante é construindo um plasmídeo que contenha todo o operon. Contudo, não foi possível obter esta construção.

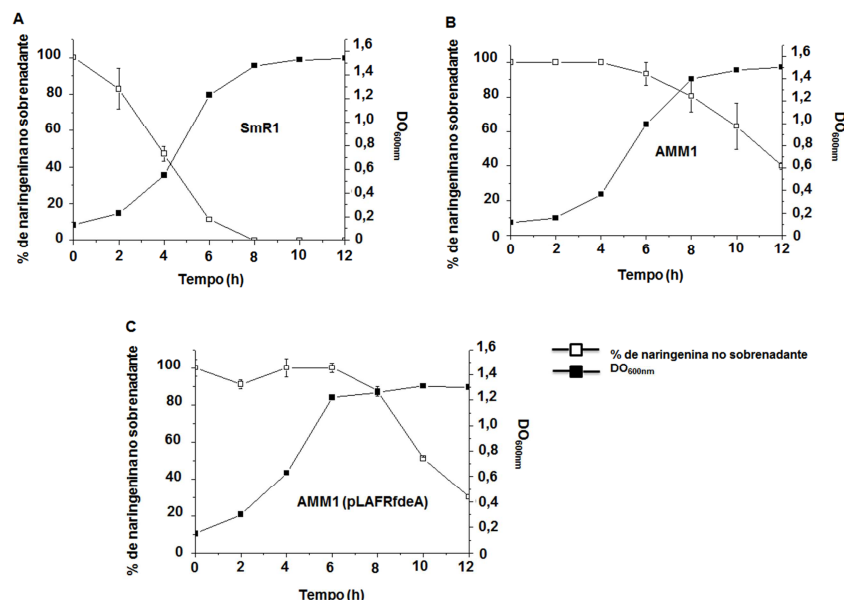


FIGURA 23 – COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE AMM1 COM O GENE *fdeA*. No início do ensaio as células das estirpes SmR1, AMM1 e AMM1 (pLAFRfdeA) foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em meio NFbHPN-malato contendo 0,2 mmol/L de naringenina. A DO_{600nm} das culturas foi ajustada para 0,1 e em seguida incubadas sob agitação. Nos tempos indicados nos gráficos acima, 1 mL de cada cultura foi coletado, a DO_{600nm} medida, e após centrifugação a naringenina foi extraída (item 4.13.1). As análises foram realizadas por TLC, e os pixels quantificados pelo programa Image Master. (A) SmR1, (B) AMM1, (C) AMM1 (pLAFRfdeA).

FONTE: A AUTORA

Além de análises por cromatografia em camada delgada (Figuras 22 e 23), o sobrenadante de cultivo do mutante DR2 contendo o plasmídeo pLAFRfdeR também foi analisado por cromatografia líquida (Figura 24). As culturas de *H. seropedicae* estirpes SmR1, DR2 e DR2 (pLAFRfdeR) foram crescidas por 48 horas em meio NFbHPN contendo 10 mmol/L de naringenina. Após este tempo, alíquotas de 1 mL de cada cultura foram centrifugadas, filtradas (0,22 μ m) e analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa.

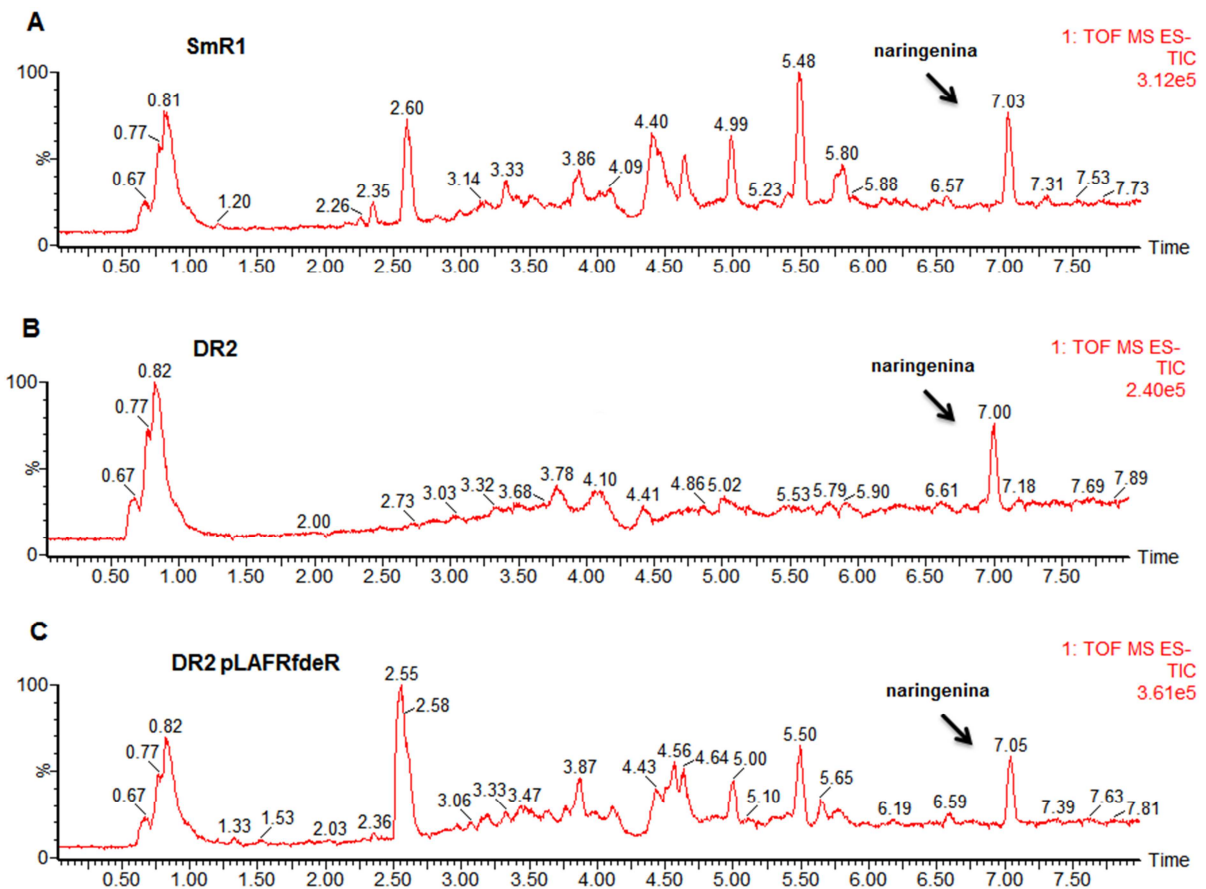


FIGURA 24 – COMPLEMENTAÇÃO DA ESTIRPE DR2. *H. seropedicae* SmR1 (A), DR2 (B) e DR2 pLAFRfdeR (C) foram cultivadas (10^5 células iniciais) em meio NFbHPN contendo 10 mmol/L de naringenina como fonte de carbono. Após 48 horas alíquotas foram coletadas, processadas e analisadas por cromatografia líquida (item 4.13.2). O pico eluído em aproximadamente 7 minutos, indicado pela seta, é a naringenina, conforme comparação com o padrão (dado não mostrado). Os picos eluídos antes de 7 minutos são originados do catabolismo da naringenina em *H. seropedicae*. O pico eluído em 0,8 minutos não se origina do metabolismo do flavonóide em estudo, uma vez que aparece em sobrenadantes de culturas na ausência de naringenina.

FONTE: A AUTORA

Após 48 horas de incubação, a naringenina (pico com tempo de retenção de 7,03 minutos, indicado pela seta na Figura 24) não foi degradada pela estirpe DR2 (Figura 24B). Isto pode ser evidenciado por duas maneiras: o pico da naringenina

continua sendo detectado (pico em 7,00 minutos), e outros picos (por exemplo, picos em 2,6, 4,6 e 5,48 minutos na Figura 24A) provavelmente originados da degradação da naringenina pela estirpe selvagem, não estão presentes (Figura 24B). Após a complementação com o plasmídeo pLAFRfdeR (Figura 24C), a estirpe DR2 se tornou capaz de degradar o flavonóide de maneira semelhante à estirpe selvagem (Figura 24A), mostrando a complementação fenotípica realizada por este plasmídeo.

Como controles foram utilizados: meio de cultivo com e sem naringenina e o sobrenadante de cultivo da estirpe SmR1 sem naringenina, após 24 horas de incubação (Figura 25). A Figura 25A mostra o tempo de eluição da naringenina em 7,03 minutos, sendo esta corrida considerada como referência ou padrão. Nas Figuras 25B e C não foi detectado nenhum eluato neste mesmo tempo de retenção. Os picos mostrados na figura 25C foram analisados, mas a identificação por espectrometria de massa não forneceu possíveis fórmulas moleculares. Como a naringenina não havia sido adicionada ao cultivo sugere-se que estes picos sejam provenientes do metabolismo normal da bactéria, não estando relacionadas ao metabolismo de naringenina.

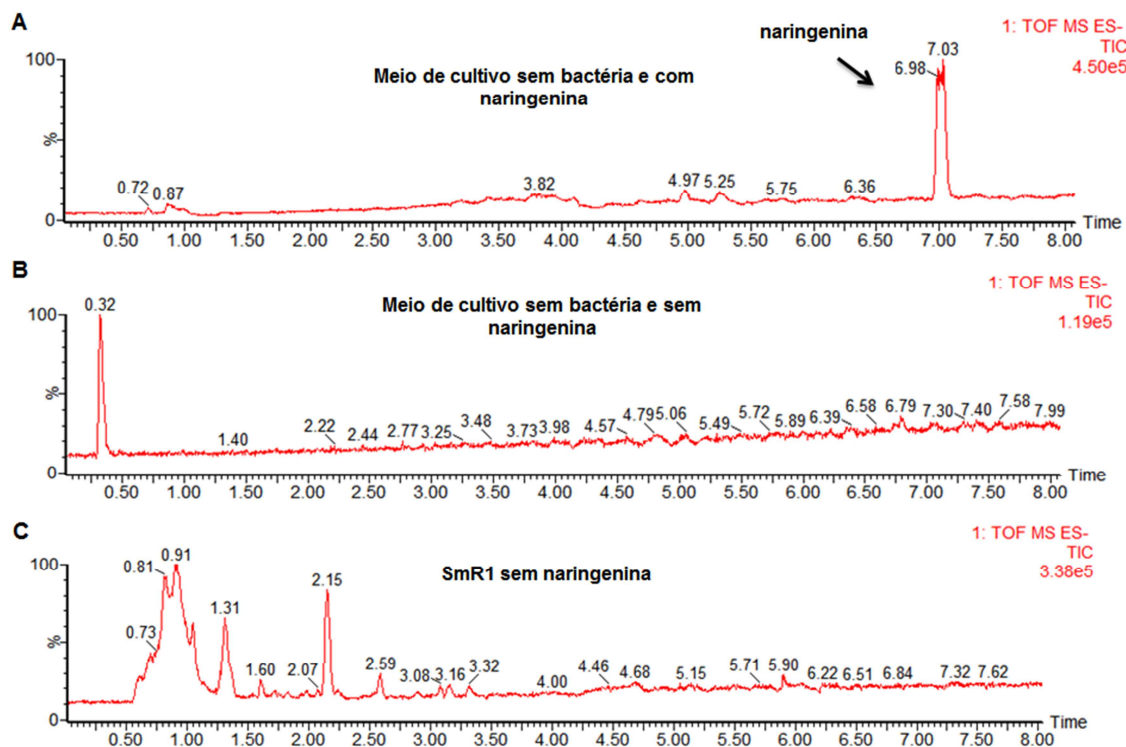


FIGURA 25 - ANÁLISES DE CROMATOGRÁFIA LÍQUICA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA DOS CONTROLES. (A) meio de cultivo sem bactéria e com naringenina indicada pela seta; (B) meio de cultivo sem bactéria e sem naringenina; (C) sobrenadante de cultivo da estirpe SmR1 em meio sem fonte de carbono, após 24 horas de incubação.

FONTE: A AUTORA

5.2.3 Construção de mutantes aleatórios e seleção de estirpes incapazes de degradar naringenina

Sabendo-se que *H. seropedicae* é capaz de degradar naringenina e que as proteínas codificadas pelo operon *fde* estão envolvidas neste processo, foi construída uma biblioteca de mutantes aleatórios, por inserção do mini-transposon Tn5, para identificar outros genes no genoma que pudessem estar envolvidos no catabolismo deste flavonóide.

Para se obter os mutantes, foi realizada uma conjugação triparental entre *H. seropedicae* SmR1, a *E. coli* CC118 λ pir e a *E. coli* contendo o plasmídeo mobilizador pRK600. Após esta conjugação foram obtidos aproximadamente 4000 mutantes, que foram testados quanto à habilidade em crescer em meio contendo 10 mmol/L de naringenina como fonte única de carbono. Este procedimento nos permitiu encontrar uma estirpe mutante incapaz de usar naringenina como fonte de carbono. Através de sequenciamento (item 4.11.1) foi possível identificar o ponto de inserção do transposon no gene Hsero_1007, que faz parte do operon *fde* (*fdeE*) (Figura 10; Tabela 2), confirmando a função das proteínas codificadas por este operon. Esta estirpe foi chamada de F6 e foi melhor caracterizada quanto à capacidade de metabolizar naringenina.

Como é possível observar (Figura 26), a estirpe mutante F6 não foi capaz de crescer em naringenina como fonte única de carbono, em contraste com a estirpe selvagem SmR1 (Figura 18).

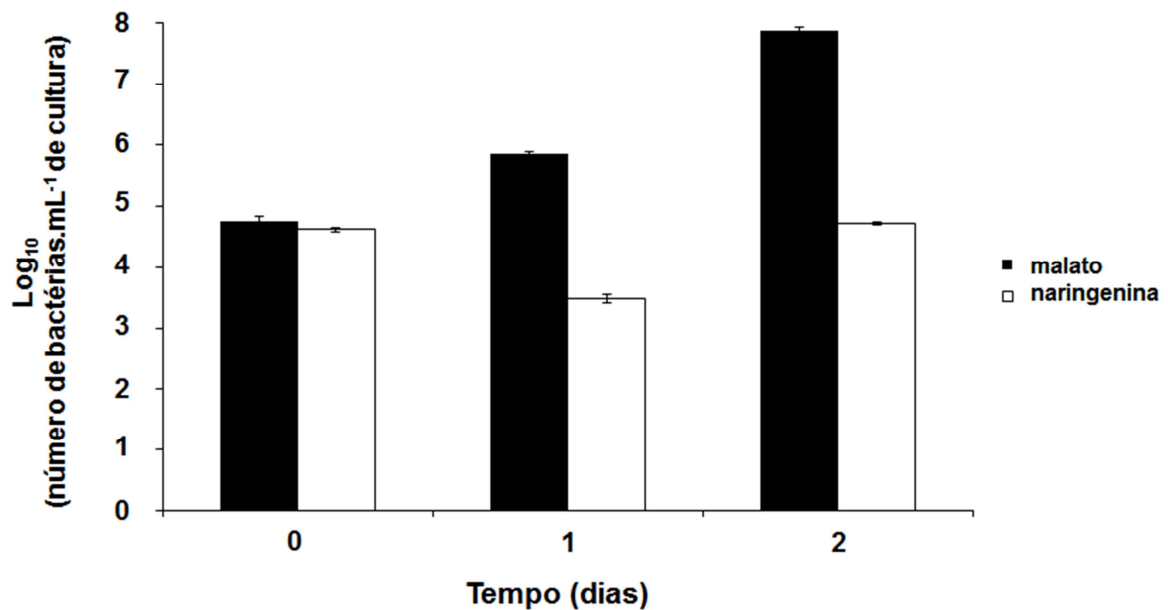


FIGURA 26 – CRESCIMENTO DE *H. seropedicae* ESTIRPE F6 UTILIZANDO NARINGENINA COMO FONTE DE CARBONO. Foram adicionadas 10^5 células/mL, no início do experimento, ao meio de cultivo (NFbHPN) contendo 10 mmol/L de naringenina como única fonte de carbono. Amostras da suspensão bacteriana foram coletadas nos tempos indicados, diluídas, e inoculadas em meio sólido em triplicata de 5 μ L de cada diluição em meio NFbHPN-malato. Após 1 dia de incubação, as unidades formadoras de colônia foram contadas.

FONTE: A AUTORA

A proteína codificada pelo gene *fdeE* possivelmente está envolvida nas primeiras etapas da clivagem do flavonóide, uma vez que a estirpe mutante F6 não consegue utilizar a naringenina como fonte de carbono. Pérez-Pantoja e colaboradores (2009) relataram a necessidade de oxigenases que preparam anéis aromáticos para a sua clivagem. A preparação destes anéis se dá através de hidroxilação inserindo 1 ou 2 átomos de oxigênio nos substratos. Estas reações, em condições aeróbias, são catalisadas por complexos que contêm oxigenases e proteínas transportadoras de elétrons (PÉREZ-PANTOJA *et al.*, 2009). A proteína que provavelmente é uma transportadora de elétrons deve ser FdeD, uma Rieske não-heme (Tabela 2). A reação subsequente à preparação do anel seria a sua clivagem, realizada por dioxigenases. Existem 2 grupos de dioxigenases descritas: intradiol dioxigenases, que catalisam a abertura de anéis entre 2 carbonos que contenham hidroxilas vicinais (clivagem em orto); e extradiol dioxigenases, que catalisam a abertura de anéis entre carbonos adjacentes a hidroxilas (clivagem em meta) (HARWOOD E PARALES, 1996). A dioxigenase codificada pelo operon *fde* (FdeC) é semelhante a extradiol dioxigenases (Tabela 2). Poucos trabalhos relatam o mecanismo de clivagem da naringenina. Rao e Cooper (1994) descrevem o

mecanismo de abertura da naringenina em *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, que ocorre via anel C, originando ácido p-cumárico ($C_9H_8O_3$; massa monoisotópica exata: 164.047344), ácido p-hidroxibenzóico ($C_7H_6O_3$; massa monoisotópica exata: 138.031694). Ambos seriam originados do anel B. Além destas moléculas eles relatam o floroglucinol ($C_6H_6O_3$; massa monoisotópica exata: 126.031694) (Figura 3).

O sobrenadante da cultura de *H. seropedicae* F6 foi analisado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. Foi possível observar que após 48 horas de cultivo a naringenina ainda estava presente no meio de cultivo (Figura 27B) e os outros picos, produzidos pela estirpe selvagem (Figura 27A) não foram detectados, ou seja, esta estirpe não é capaz de metabolizar o flavonóide em comparação com a estirpe selvagem. Além disto, quando esta estirpe foi cultivada em meio NFbHPN-malato contendo 10 mmol/L de naringenina, a cultura não apresentou a coloração amarela, característica da metabolização de tal flavonóide pela estirpe selvagem SmR1 (dado não mostrado). Por estas evidências pode-se sugerir que FdeE está envolvida no passos iniciais da degradação da naringenina em *H. seropedicae* SmR1.

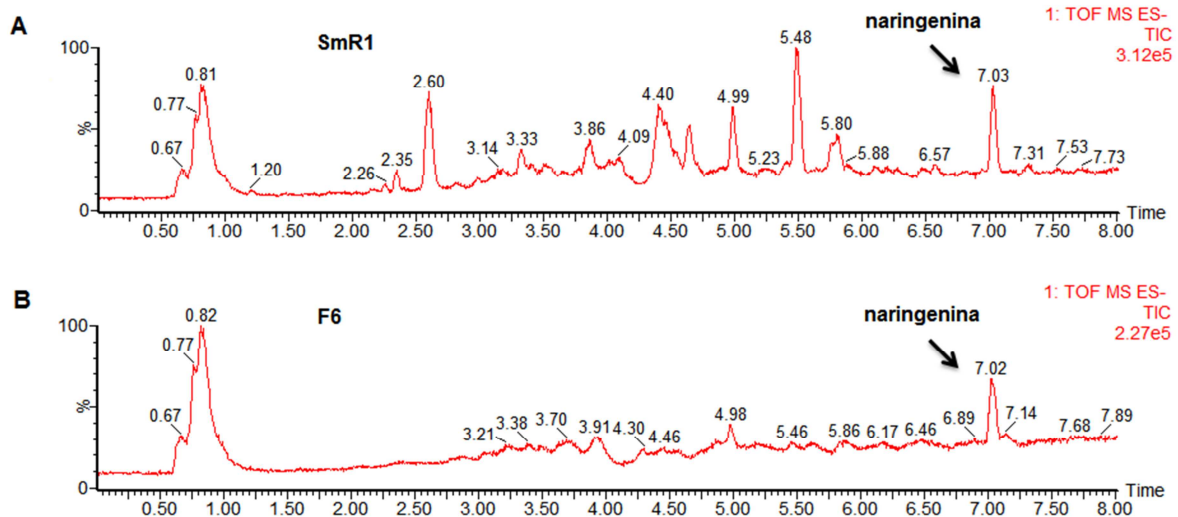


FIGURA 27 – DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA PELA ESTIRPE F6. (A) estirpe SmR1 e (B) estirpe F6. Inicialmente foram adicionadas 10^5 células ao meio de cultivo. Após 48 horas foi retirada uma alíquota da cultura, que foi centrifugada, filtrada e analisada por cromatografia líquida. O pico eluído em 7,0 minutos corresponde à naringenina. O pico eluído em 0,8 minutos corresponde à uma mistura de íons e aparece em amostras originadas de cultivos sem naringenina (Figura 25B), e por isto não foi analisado. Os picos que aparecem entre 0,8 e 7,0 minutos (em A) são produtos da degradação da naringenina por *H. seropedicae* SmR1.

FONTE: A AUTORA

5.2.4 Caracterização da via de degradação de naringenina em *H. seropedicae*

Para identificar intermediários da degradação da naringenina por *H. seropedicae* SmR1 foram realizadas algumas variações nas condições de crescimento. Foram realizados cultivos iniciais de 500 mL em meio NFbHPN-malato, contendo 0,2 mmol/L de naringenina, até o crescimento celular alcançar as fases exponencial (DO_{600nm} de 0,6) e estacionária (DO_{600nm} de 1,2) (item 4.12.1). As suspensões resultantes foram centrifugadas, e as células lavadas e ressuspensas em 20 mL meio NFbHP-naringenina (10 mmol/L), e submetidas a diferentes condições: presença e ausência de NH_4Cl (20 mmol/L) como fonte de nitrogênio, e presença e ausência de fluoroacetato de sódio (10 mmol/L), que é um inibidor do ciclo de Krebs. Alíquotas de 2 mL foram coletadas nos tempos 0, 15, 24 e 39 horas e os sobrenadantes analisados por LC-MS (item 4.12.3). Pequenas diferenças nos tempos de retenção dos íons detectados foram observadas entre as corridas, independentemente da condição testada. Porém cada pico foi analisado separadamente (corrida por corrida) para confirmar que nos diferentes tempos de análise são encontrados os mesmos íons nos mesmos tempos de retenção.

5.2.4.1 Metabólitos da naringenina produzidos por *H. seropedicae* SmR1 na presença e ausência de amônio e por AMM1 na presença de amônio

Para observar se a presença de NH_4Cl durante o cultivo da estirpe SmR1 influenciaria no metabolismo de naringenina, foram realizados ensaios de degradação de naringenina na presença e ausência de NH_4Cl 20 mmol/L. Uma vez que para a estirpe SmR1 não foram observadas diferenças entre as condições com (Figura 28) e sem (Figura 32) NH_4Cl 20 mmol/L, a estirpe AMM1 teve o seu perfil de metabólitos, originados da degradação da naringenina, analisado somente na presença de NH_4Cl 20 mmol/L (Figura 34).

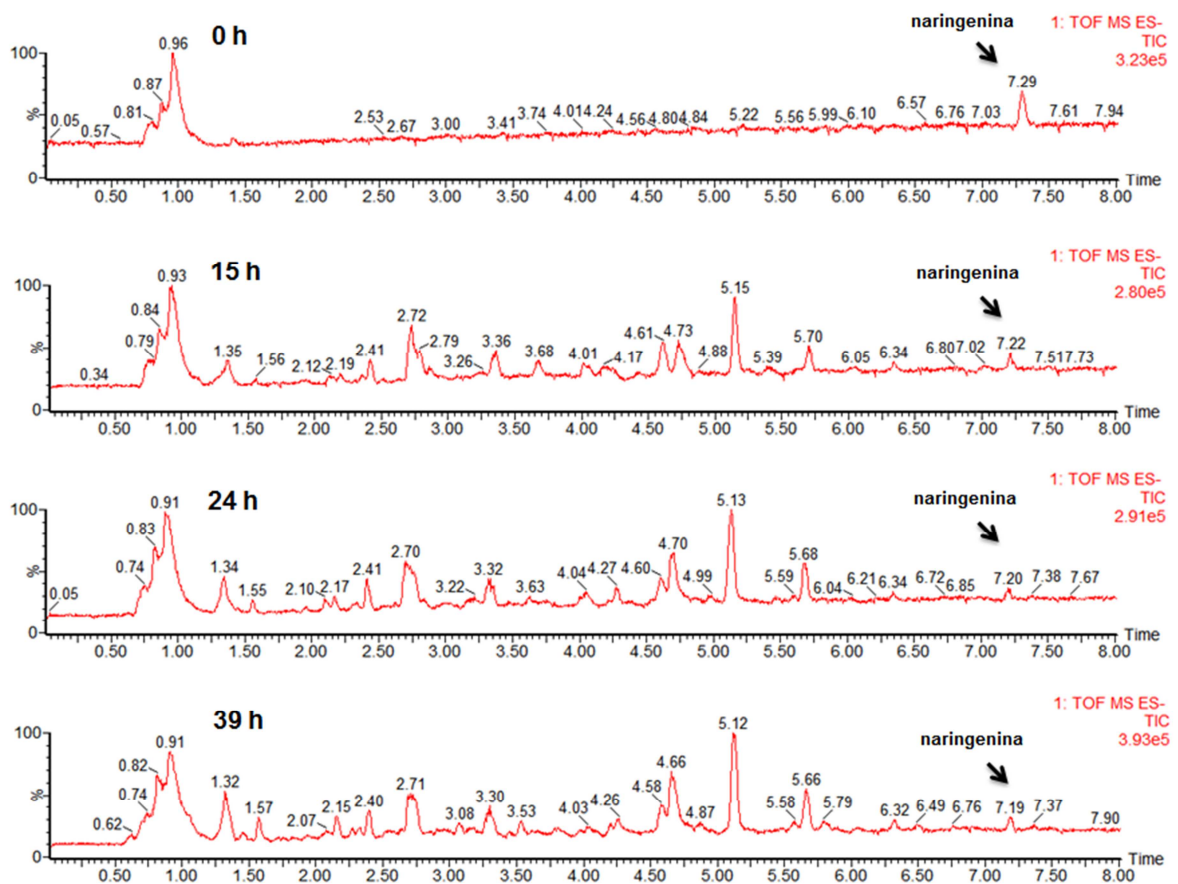


FIGURA 28 – METABÓLITOS ORIGINADOS DA DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA POR *H. seropedicae* SmR1 (DO_{600nm} DE 0,6) EM NFbHPN-NARINGENINA. A cultura de 500 mL foi incubada até atingir a DO_{600nm} de 0,6. Após a centrifugação e lavagem das células, estas foram ressuspensas em meio NFbHPN contendo 10 mmol/L de naringenina, e alíquotas nos tempo 0, 15, 24 e 39 horas foram coletadas para a análise por LC-MS. O pico de naringenina está indicado pela seta no cromatograma referente ao tempo 0. Nos tempos posteriores ela não foi detectada. Controle em meio NFbHPN-malato com naringenina foi realizado, e a naringenina se manteve presente no meio de cultivo durante as 39 horas de incubação.

FONTE: A AUTORA

Os picos que aparecem no início da corrida (entre 0 e 1 minuto) são referentes a uma mistura complexa de íons, dificultando a sua identificação individual. Para a identificação dos metabólitos presentes neste intervalo de tempo será necessária uma melhor separação cromatográfica. Além disto, como estes picos são detectados também no tempo 0 (sem naringenina no meio de cultivo – Figura 25), não devem ser originados da degradação da naringenina. Não foi possível obter as possíveis fórmulas moleculares dos íons detectados em 3,3; 3,08; 2,2; 2,15 e 1,57 (Figura 28). Na Tabela 11 está mostrado o íon identificado, relativo à naringenina no meio de cultivo no tempo 0 do experimento, e na Tabela 12 estão mostrados os íons filhos originados da fragmentação (MS/MS) da naringenina.

TABELA 11 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE SELVAGEM DE *H. seropedicae* NO TEMPO ZERO DO EXPERIMENTO.

| Tempo de retenção (min) | Massa experimental (u.m.a) | Massa teórica (u.m.a) | Erro (ppm) | Fórmula molecular do íon (-H) |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------|------------|--|
| 7,29 | 271,0612 | 271,0606 | 2,2 | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ |

NOTA: u.m.a: unidade de massa atômica

FONTE: A AUTORA

A análise de MS/MS deste pico gerou alguns fragmentos filhos, que estão mostrados na Tabela 12.

TABELA 12 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS DA FRAGMENTAÇÃO (MS/MS) DA NARINGENINA DETECTADA NO MEIO DE CULTIVO DA ESTIRPE SELVAGEM DE *H. seropedicae* NO TEMPO ZERO DO EXPERIMENTO.

| m/z do íon detectado | m/z calculada pelo software MassLynx para o íon detectado | Erro (ppm) | Fórmula molecular do íon (-H) |
|----------------------|---|------------|--|
| 151,0029 | 151,0031 | -1,3 | C ₇ H ₃ O ₄ |
| 119,0490 | 119,0487 | 2,5 | C ₈ H ₇ O |
| 107,0131 | 107,0133 | -0,2 | C ₆ H ₃ O ₂ |

NOTA: u.m.a: unidade de massa atômica

FONTE: A AUTORA

As mesmas análises foram realizadas após 15, 24 e 39 horas de incubação. Os íons detectados com 15 horas de cultivo estão na Tabela 13.

TABELA 13 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE SELVAGEM DE *H. seropedicae* APÓS 15 HORAS DE INCUBAÇÃO.

| Tempo de retenção (min) | Massa encontrada (u.m.a) | Massa calculada (u.m.a) | Erro (ppm) | Fórmula molecular do íon (-H) |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------|---|
| 7,22 | 301,0710 | 301,0712 | -0,7 | C ₁₆ H ₁₃ O ₆ |
| | 271,0608 | 271,0606 | 0,7 | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ |
| 5,7 | 161,0605 | 161,0603 | 1,2 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 5,15 | 867,3033 | Não identificou | | |
| | 547,1053 | Não identificou | | |
| | 433,1129 | 433,1135 | -1,4 | C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ |
| | 271,0608 | 271,0606 | 0,7 | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ |
| 4,72 | 257,0455 | 257,0450 | 1,9 | C ₁₄ H ₉ O ₅ |
| | 161,0603 | 161,0603 | 0 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 4,6 | 455,1324 | Não identificou | | |
| | 207,0646 | Não identificou | | |
| | 163,0758 | 163,0759 | -0,6 | C ₁₀ H ₁₁ O ₂ |
| 4,16 | 203,0698 | Não identificou | | |
| | 179,055 | 179,0556 | -0,6 | C ₁₀ H ₁₁ O ₃ |
| | 135,0434 | Não identificou | | |
| 4,01 | 209,0816 | 209,0814 | 1,0 | C ₁₁ H ₁₃ O ₄ |
| | 205,0457 | 205,0591 | -2,0 | C ₁₁ H ₉ O ₄ |

| | | | | |
|------|--|---|------------------------|--|
| | 161,0591 149,0581 | Não identificou Não identificou | | |
| 3,68 | 135,0446 | 135,0446 | 0 | C ₈ H ₇ O ₂ |
| 2,72 | 603,0763 301,0348 257,0444 223,0602 213,0420 179,0695 121,0290 | Não identificou 301,0348 257,0450 223,0606 Não identificou Não identificou 121,0290 | 0 -2,3 -1,8 0 | C ₁₅ H ₉ O ₇ C ₁₄ H ₉ O ₅ C ₁₁ H ₁₁ O ₅ C ₇ H ₅ O ₂ |
| 2,41 | 225,0750 145,0653 119,0489 | Não identificou 145,0653 Não identificou | 0 | C ₁₀ H ₉ O ₃ |
| 1,35 | 167,0204 | Não identificou | | |

NOTA: *H. seropedicae* SmR1 CULTIVADO EM MEIO CONTENDO NH₄Cl E NARINGENINA. A BACTÉRIA FOI RESSUSPENSA A PARTIR DA DO_{600nm} INICIAL DE 0,6;

u.m.a: unidade de massa atômica;

não identificou: o software MassLynx v.4.1 mostrou a relação m/z do íon, mas não sugeriu as possíveis fórmulas moleculares para estes íons.

FONTE: A AUTORA

Na Tabela 13 estão listados os íons detectados após 15 horas de incubação. No tempo 0 somente a naringenina foi detectada, e após as 15 horas vários outros íons foram detectados, sugerindo que estes metabólitos são originados a partir da degradação da naringenina por *H. seropedicae*. Após 24 horas de cultivo alguns outros metabólitos, além dos detectados com 15 horas de cultivo, foram detectados e estão mostrados na Tabela 14.

TABELA 14 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE SELVAGEM DE *H. seropedicae* APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO.

| Tempo de retenção (min) | Massa encontrada (u.m.a) | Massa calculada (u.m.a) | Erro (ppm) | Fórmula molecular do íon (-H) |
|-------------------------|--|---|----------------------|--|
| 7,2 | 301,0704 | 301,0712 | -2,7 | C ₁₆ H ₁₃ O ₆ |
| 5,67 | 161,0606 | 161,0603 | 1,9 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 5,13 | 867,3033 547,1053 433,1129 271,0608 | Não identificou Não identificou 433,1135 271,0606 | -1,4 0,7 | C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ C ₁₅ H ₁₁ O ₅ |
| 4,68 | 257,0447 213,0546 | 257,0450 213,0552 | -1,2 -2,8 | C ₁₄ H ₉ O ₅ C ₁₃ H ₉ O ₃ |
| 4,6 | 455,1324 397,1271 349,1149 207,0657 163,0753 135,0357 | Não identificou 397,1287 Não identificou 207,0657 163,0759 Não identificou | -4,0 -3,5 -3,7 | C ₂₂ H ₂₁ O ₇ C ₁₁ H ₁₁ O ₄ C ₁₀ H ₁₁ O ₂ |
| 4,27 | 203,0705 161,0597 119,0476 | 203,0708 161,0603 Não identificou | -1,5 -3,7 | C ₁₂ H ₁₁ O ₃ C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 4,04 | 257,0444 213,0546 209,0816 | Não identificou Não identificou Não identificou | | |

| | | | | |
|------|--|--|------------------|---|
| | 205,0457 161,0600 149,0581 | Não identificou 161,0603 Não identificou | -1,5 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 3,62 | 233,0426 189,0529 161,0605 145,0170 119,0453 | Não identificou Não identificou 161,0603 Não identificou Não identificou | 1,2 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 2,7 | 257,0444 223,0602 121,0290 | 257,0450 223,0606 121,0290 | -1,0 0,8 0 | C ₁₄ H ₉ O ₅ C ₁₁ H ₁₁ O ₅ C ₇ H ₅ O ₂ |
| 2,41 | 225,0750 145,0653 119,0489 | Não identificou 145,0653 Não identificou | 0 | C ₁₀ H ₉ O ₃ |
| 1,35 | 167,0204 | Não identificou | | |

NOTA: *H. seropedicae* SmR1 CULTIVADO EM MEIO CONTENDO NH₄Cl E NARINGENINA. A BACTÉRIA FOI RESSUSPensa A PARTIR DA DO_{600nm} INICIAL DE 0,6;

u.m.a: unidade de massa atômica;

não identificou: o software MassLynx v.4.1 mostrou a relação m/z do íon, mas não sugeriu as possíveis fórmulas moleculares para estes íons.

FONTE: A AUTORA

Como é possível observar na Tabela 14 (Figura 28), após 24 horas de incubação a naringenina foi completamente consumida. O perfil metabólico de 24 horas é muito semelhante ao perfil metabólico de 15 horas (Figura 28; Tabela 13). O perfil de metabólitos também foi analisado após 39 horas de cultivo, e está mostrado na Tabela 15.

TABELA 15 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE SELVAGEM DE *H. seropedicae* APÓS 39 HORAS DE INCUBAÇÃO.

| Tempo de retenção (min) | Massa encontrada | Massa calculada | Erro (ppm) | Fórmula molecular (-H) |
|-------------------------|--|---|--------------------------------------|--|
| 7,2 | 301,0709 | 301,0712 | -1,7 | C ₁₆ H ₁₃ O ₆ |
| 5,6 | 161,0609 | 161,0603 | 3,7 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 5,11 | 867,3033 547,1053 433,1129 271,0608 | Não identificou Não identificou 433,1135 271,0606 | -1,4 0,7 | C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ C ₁₅ H ₁₁ O ₅ |
| 4,65 | 603,0765 301,0341 257,0447 213,0546 187,0397 | 603,0775 301,0348 257,0450 Não identificou 187,0395 | -1,7 -2,3 -0,8 1,1 | C ₃₀ H ₁₉ O ₁₄ C ₁₅ H ₉ O ₇ C ₁₄ H ₉ O ₅ C ₁₁ H ₇ O ₃ |
| 4,58 | 455,1324 397,1276 349,1274 207,0648 163,0756 135,0357 | 455,1342 397,1287 349,1287 207,0657 163,0759 Não identificou | -4,4 -2,8 -3,7 -4,3 -1,8 | C ₂₄ H ₂₃ O ₉ C ₂₂ H ₂₁ O ₇ C ₁₈ H ₂₁ O ₇ C ₁₁ H ₁₁ O ₄ C ₁₀ H ₁₁ O ₂ |
| 4,26 | 203,0705 161,0612 119,0491 | 203,0708 Não identificou 119,0497 | -1,5 -5,0 | C ₁₂ H ₁₁ O ₃ C ₈ H ₇ O |
| 4,2 | 179,0704 | 179,0708 | -2,2 | C ₁₀ H ₁₁ O ₃ |

| | | | | |
|------|--|---|---------------------|---|
| | 135,0440 | 135,0446 | -4,4 | C ₈ H ₇ O ₂ |
| 4,01 | 257,0444 205,0457 161,0600 | Não identificou Não identificou Não identificou | | |
| 3,53 | 489,0802 233,0440 189,0529 161,0605 119,0453 | 489,0822 233,0450 Não identificou Não identificou Não identificou | -4,1 -4,3 1,2 | C ₂₆ H ₁₇ O ₁₀ C ₁₂ H ₉ O ₅ C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 2,7 | 223,0604 179,0707 121,0291 | 223,0606 179,0708 121,0290 | -0,9 -0,6 0,8 | C ₁₄ H ₉ O ₅ C ₁₀ H ₁₁ O ₃ C ₇ H ₅ O ₂ |
| 2,4 | 225,0760 145,0656 119,0486 | 225,0763 145,0653 Não identificou | -1,3 2,1 | C ₁₁ H ₁₃ O ₅ C ₁₀ H ₉ O |
| 1,31 | 167,0204 | Não identificou | | |

NOTA: *H. seropedicae* SmR1 CULTIVADO EM MEIO CONTENDO NH₄Cl E NARINGENINA. A BACTÉRIA FOI RESSUSPensa A PARTIR DA DO_{600nm} INICIAL DE 0,6;

u.m.a: unidade de massa atômica;

não identificou: o software MassLynx v.4.1 mostrou a relação m/z do íon, mas não sugeriu as possíveis fórmulas moleculares para estes íons.

FONTE: A AUTORA

Comparando o perfil de metabólitos entre as Tabelas 13, 14 e 15 poucas diferenças podem ser vistas. Quase todos os metabólitos são produzidos entre 0 e 15 horas. Não se pode garantir que todos estes metabólitos sejam originados da naringenina. Uma vez que *H. seropedicae* SmR1 possui vias metabólicas de compostos aromáticos (Figura 11), este pode originar substratos para alguma das outras vias, resultando nos diversos metabólitos detectados.

Algumas variações interessantes na identificação dos compostos podem ser observadas (Figura 28; Tabelas 13, 14 e 15). Por exemplo, o pico em 7,29 minutos no cromatograma do tempo 0 corresponde à naringenina (m/z 271,0606; C₁₅H₁₁O₅), e nenhum outro íon foi detectado. Após 15 horas de incubação, além do pico correspondente à naringenina, outro pico, com tempo de retenção muito próximo (7,18 minutos), contendo o íon m/z 301,0712 (C₁₆H₁₃O₆) foi detectado. Após 24 horas, somente o íon m/z 301,0712 (C₁₆H₁₃O₆) estava presente nas análises, mostrando que a naringenina havia sido completamente degradada (Figura 29).

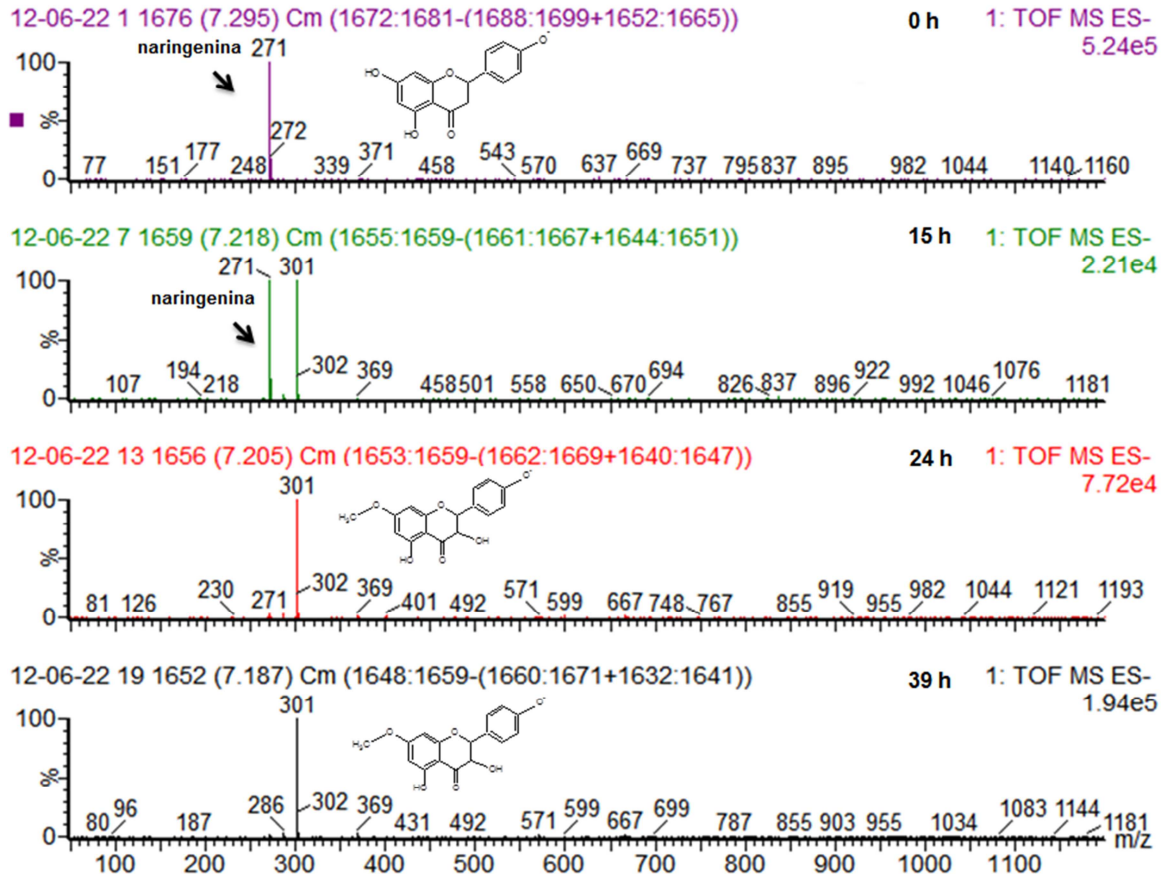


FIGURA 29 - ESPECTROGRAMA DA AMOSTRA ELUÍDA NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 7,2 MINUTOS. A naringenina (m/z 271,0606; $C_{15}H_{11}O_5$) está indicada pelas setas nos espectrogramas dos tempos 0 e 15 horas. O espectrograma do tempo 15 horas mostra 2 íons: a naringenina e o íon (m/z 301,0712; $C_{16}H_{13}O_6$). Os espectrogramas dos tempos 24 e 39 horas mostram apenas o íon (m/z 301,0712; $C_{16}H_{13}O_6$).

FONTE: A AUTORA

Análises de fragmentação (MS/MS) dos metabólitos da naringenina foram realizadas, auxiliando na proposição das estruturas. Os metabólitos encontrados em 2,7 minutos (Tabela 15) foram fragmentados (Figura 30).

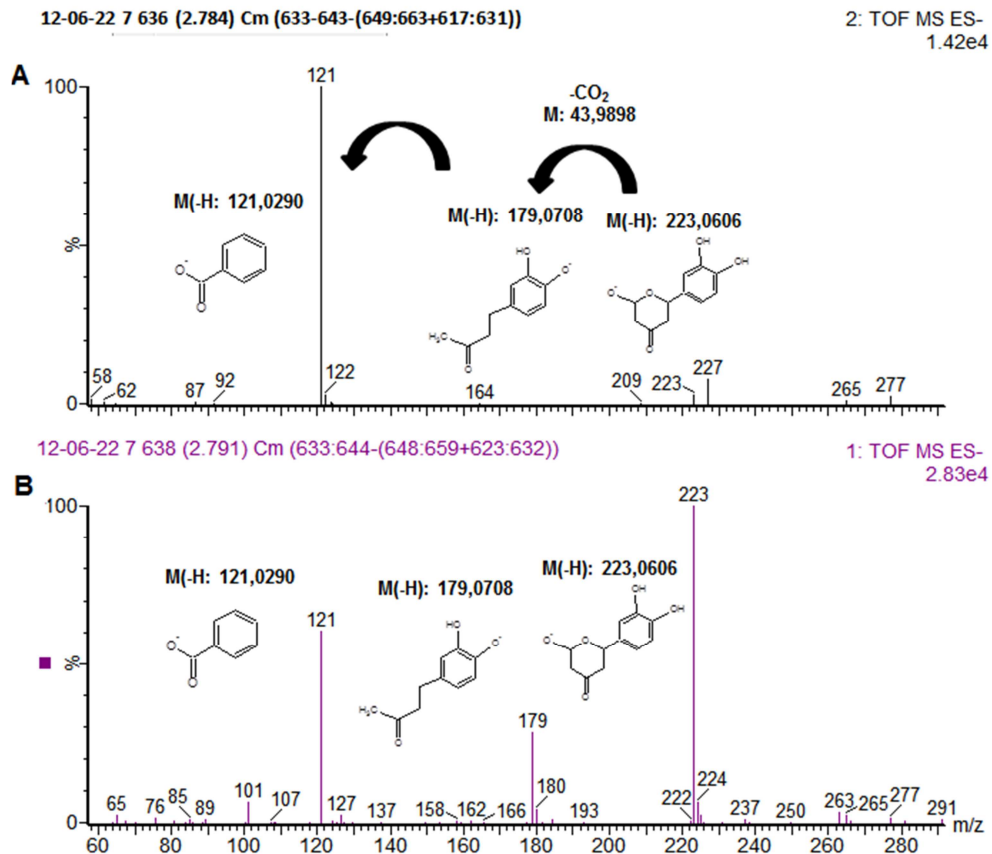


FIGURA 30 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO (MS/MS) DOS ÍONS DETECTADOS ELUÍDOS NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 2,7 MINUTOS. (A) íons filhos obtidos após fragmentação (MS/MS) do sinal 223,0606, mostrando o pico 121,0290 (C₇H₅O₂); (B) MS dos íons detectados no tempo de retenção de 2,7 minutos.

FONTE: A AUTORA

A análise do perfil de fragmentação dos íons detectados no tempo de retenção de 2,7 minutos sugere que o íon m/z 121,0290 (C₇H₅O₂) é originado da fragmentação dos íons m/z 223,0606 (C₁₁H₁₁O₅) e m/z 179,0708 (C₁₀H₁₁O₃). As análises sugerem também que o íon m/z 223,0606 sofre uma descarboxilação originando o íon m/z 179,0708, que dá origem ao íon m/z 121,0290. Na Tabela 13 estão listados outros íons também encontrados no tempo de retenção de 2,7 minutos. O íon m/z 603,0775 que provavelmente apresenta a fórmula molecular C₃₀H₁₉O₁₄ parece ser um dímero do íon m/z 301,0348, que provavelmente apresenta a fórmula molecular C₁₅H₉O₇. Contudo o perfil de fragmentação destes íons não permitiu esta confirmação.

Os metabólitos encontrados em 4,2 minutos também foram fragmentados, e o resultado sugere que a descarboxilação do íon m/z 179,0708 resulta no íon m/z 135,0446 (Figura 31).

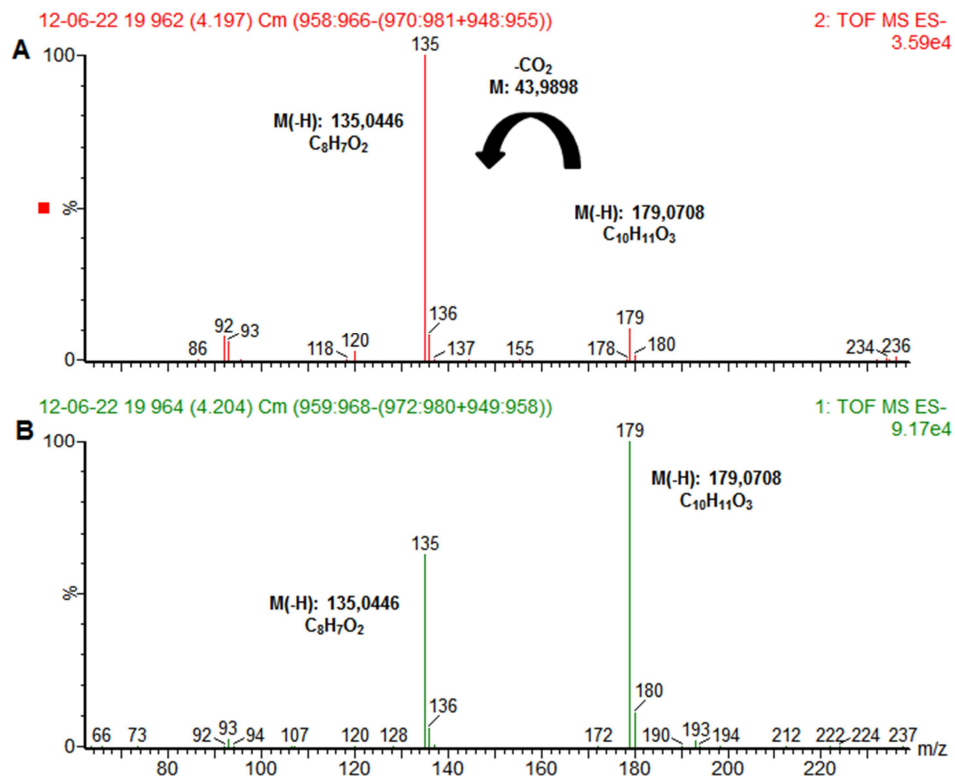


FIGURA 31 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO (MS/MS) DOS ÍONS DETECTADOS ELUÍDOS NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 4,2 MINUTOS. (A) íons filhos obtidos após fragmentação (MS/MS) do sinal 179,0708, mostrando o pico 135,0446 ($C_8H_7O_2$); (B) MS dos íons detectados no tempo de retenção de 4,2 minutos.

FONTE: A AUTORA

O mesmo ensaio foi realizado utilizando-se meio de cultura sem a adição de NH_4Cl para investigar por possíveis diferenças no perfil de metabólitos. Comparando as condições com cloreto de amônio (Figura 28) e sem cloreto de amônio (Figura 32) sugere-se que o metabolismo de naringenina não depende do metabolismo de nitrogênio em *H. seropedicae*, nas condições testadas (DO_{600nm} inicial de 0,6).

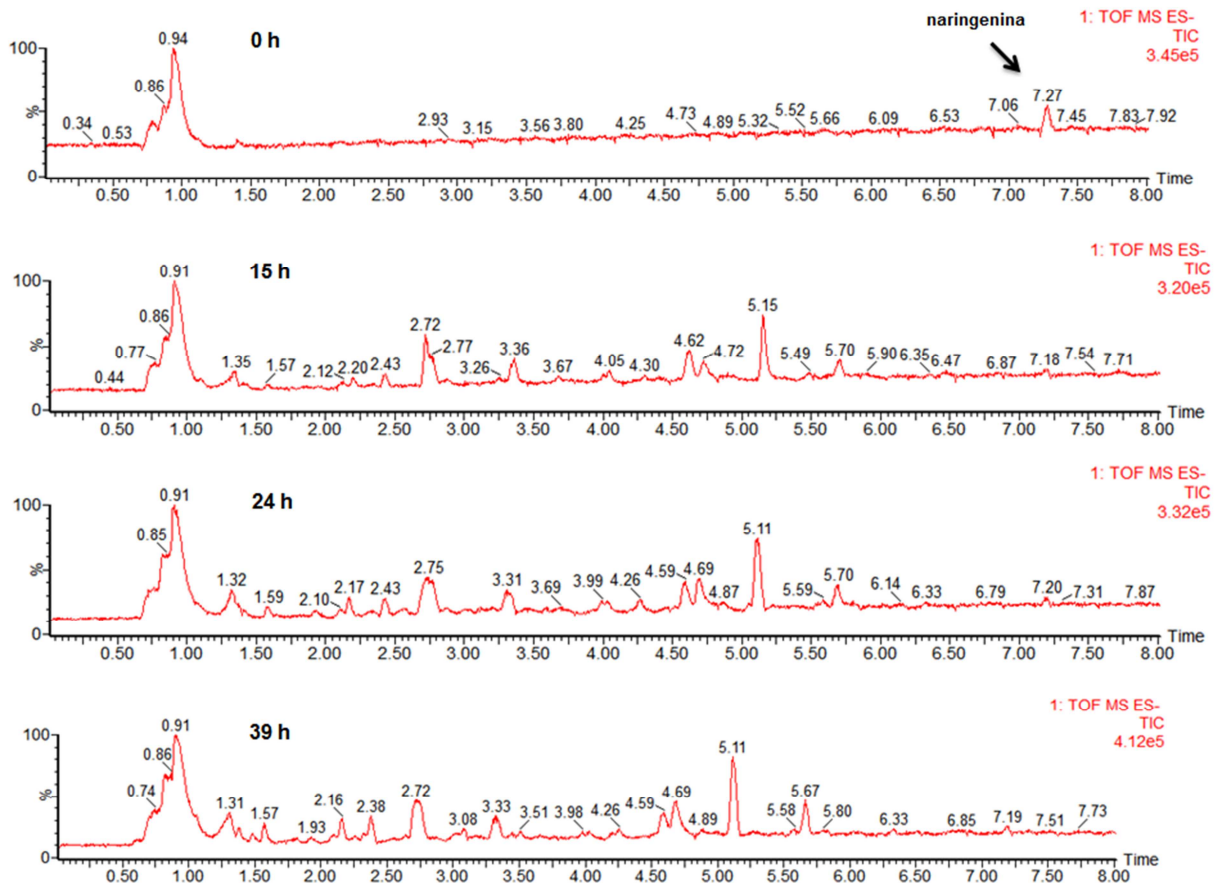


FIGURA 32 – METABÓLITOS ORIGINADOS DA DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA POR *H. seropedicae* SmR1 (DO_{600nm} DE 0,6) EM NFbHP-NARINGENINA. A cultura de 500 mL foi incubado até atingir a DO_{600nm} de 0,6. Após a centrifugação e lavagem das células, estas foram ressuspensas em meio NFbHP (sem NH₄Cl) contendo 10 mmol/L de naringenina, e alíquotas nos tempo 0, 15, 24 e 39 horas foram coletadas para a análise por LC-MS. O pico de naringenina está indicado pela seta no cromatograma do tempo 0.

FONTE: A AUTORA

A naringenina (m/z 271,0606; C₁₅H₁₁O₅) aparece em 7,27 minutos no cromatograma referente ao tempo 0 (Figura 32). Nos tempos de 24 e 39 horas foi detectada a presença de um íon em 7,18 minutos (m/z 301,0709; C₁₆H₁₃O₆), e a naringenina deixou de ser detectada em ambos. O mesmo já havia sido observado nas culturas contendo NH₄Cl 20 mmol/L (Figuras 28 e 29). Nenhum outro íon foi identificado além dos descritos nas Tabelas 13, 14 e 15. Não foi possível identificar diferenças no perfil cromatográfico das 2 condições testadas, seja em relação aos sinais encontrados ou em relação à intensidade.

A estirpe SmR1 também foi ressuspensa em DO_{600nm} de 1,2 para se observar se haviam mudanças no perfil de intermediários da naringenina, estando a cultura em fase estacionária. As condições testadas foram as mesmas descritas no início deste item: presença ou ausência de NH₄Cl 20 mmol/L e/ou fluoroacetato de

sódio 10 mmol/L. Podem ser observadas algumas diferenças em relação a condição da Figura 28. A naringenina ainda pode ser encontrada na ausência de amônio (Figura 33B), enquanto que na presença de amônio (Figura 33A) ela foi completamente consumida. Além disto, o pico em 5,11-5,12 minutos (que contém os mesmos íons; Tabelas 13, 14 e 15) está menos intenso na ausência de amônio, enquanto que os picos em 4,68-4,6 minutos (que contém os mesmos íons; Tabelas 13, 14 e 15) está mais intenso na ausência de amônio.

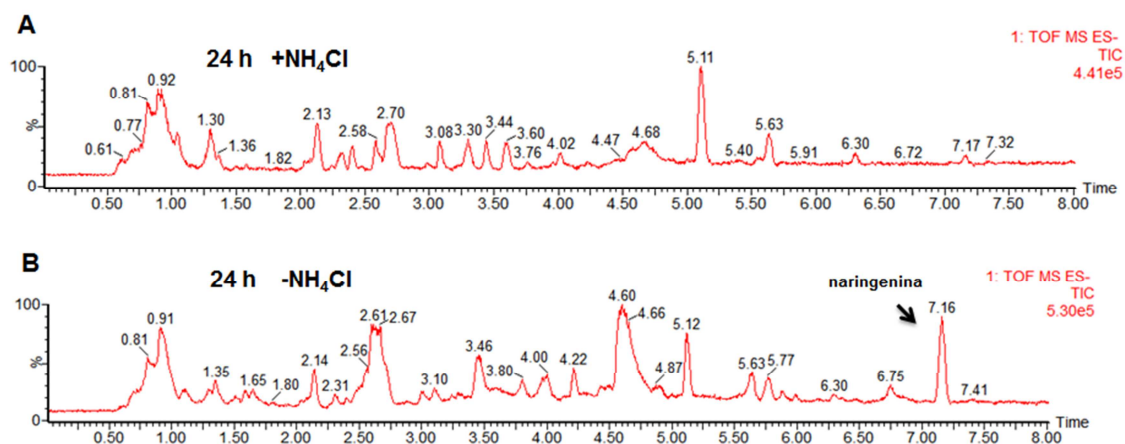


FIGURA 33 - METABÓLITOS ORIGINADOS DA DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA POR *H. seropedicae* SmR1 (DO_{600nm} DE 1,2) EM NFbHPN-NARINGENINA E NFbHP-NARINGENINA. Cultivos de 500 mL de meio foram incubados até atingir a DO_{600nm} de 1,2. Após a centrifugação e lavagem das células, estas foram ressuspensas em meio (A) NFbHPN e (B) NFbHP (sem NH₄Cl) contendo 10 mmol/L de naringenina, e alíquotas nos tempo 0, 15, 24 e 39 horas foram coletadas para a análise por LC-MS. O cromatograma do sobrenadante de 24 horas está mostrado acima. A naringenina está indicada pela seta.

FONTE: A AUTORA

Os resultados mostrados nas Figuras 28, 32 e 33 sugerem que o metabolismo de nitrogênio não está relacionado ao metabolismo de naringenina em *H. seropedicae* SmR1. Além disto, pode ser observado que há uma grande modificação no perfil de metabólitos produzidos por esta estirpe na presença de naringenina (Figura 28) em comparação com a ausência de naringenina (Figura 25C), indicando que os metabólitos mostrados nas Tabelas 13, 14 e 15 são originados do catabolismo de naringenina por *H. seropedicae*.

O sobrenadante de cultura da estirpe AMM1 também foi analisado após crescimento em meio NFbHPN contendo 10 mmol/L de naringenina. Algumas diferenças no perfil metabólico podem ser observadas. A Figura 34 mostra o perfil da estirpe AMM1 nos tempos de análise indicados.

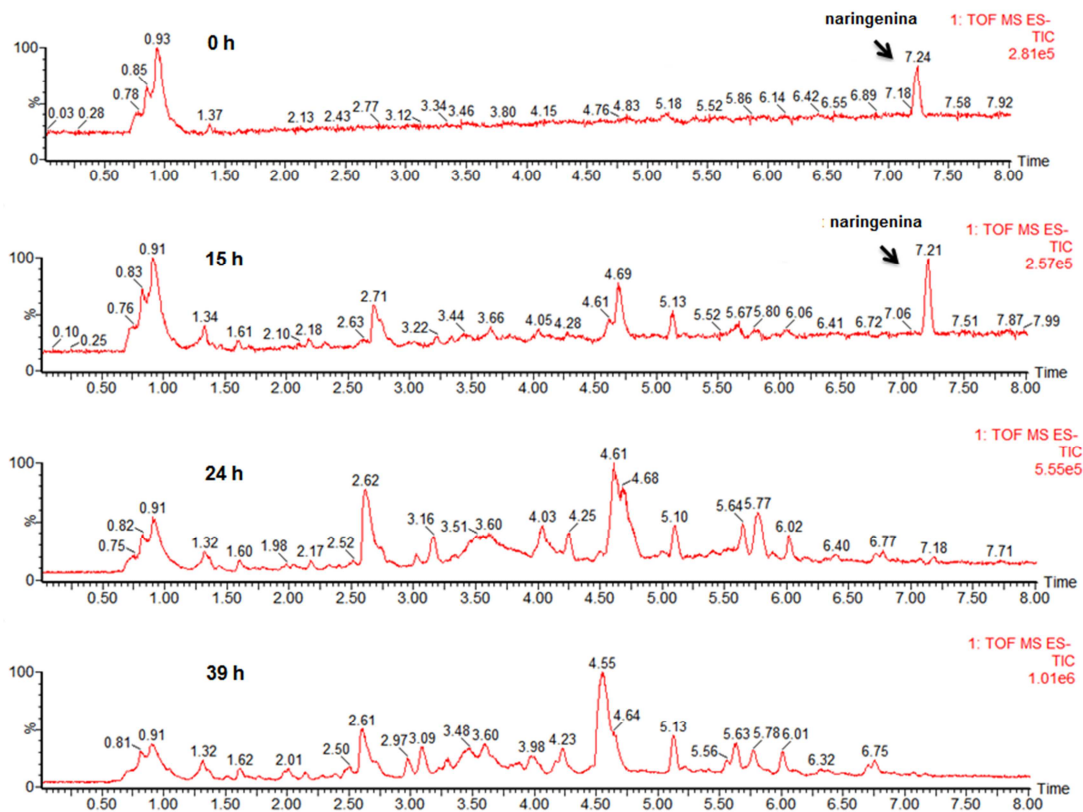


FIGURA 34 – PERFIL DE METABÓLITOS PRODUZIDOS PELA ESTIRPE AMM1. As culturas de 500 mL foram incubadas até atingir a DO_{600nm} de 0,6. Após a centrifugação e lavagem das células, estas foram ressuspensas em meio NfbHPN contendo 10 mmol/L de naringenina. Aliquotas nos tempo 0, 15, 24 e 39 horas foram coletadas para a análise por LC-MS. A seta nos cromatogramas referentes aos tempos 0 e 15 horas indicam a naringenina.

FONTE: A AUTORA

A estirpe AMM1 ainda é capaz de metabolizar a naringenina, mas é mais lenta quando comparada com a estirpe selvagem sob as mesmas condições de análise (Figura 28). A estirpe selvagem após 15 horas de cultivo degradou praticamente toda a naringenina presente, enquanto que na estirpe AMM1 ainda pode ser detectada grande quantidade deste flavonóide em seu sobrenadante (Figura 34). Porém, alguns íons encontrados nos sobrenadantes de cultivo da estirpe mutante não foram encontrados nos sobrenadantes da estirpe selvagem. As Tabelas 16, 17, 18 e 19 mostram os íons originados do metabolismo de naringenina pela estirpe AMM1.

TABELA 16 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE SELVAGEM DE *H. seropedicae* NO TEMPO ZERO DO EXPERIMENTO.

| Tempo de retenção (min) | Massa encontrada (u.ma.) | Massa calculada (u.ma.) | Erro (ppm) | Fórmula molecular (-H) |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------|--|
| 7,24 | 271,0602 | 271,0606 | -1,5 | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ |

NOTA: u.m.a: unidade de massa atômica

FONTE: A AUTORA

Após 15 horas de incubação muitos metabólitos podem ser observados, de maneira semelhante à estirpe selvagem, como está mostrado na Tabela 17.

TABELA 17 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE AMM1 DE *H. seropedicae* APÓS 15 HORAS DE INCUBAÇÃO.

| Tempo de retenção (min) | Massa encontrada (u.m.a) | Massa calculada (u.m.a) | Erro (ppm) | Fórmula molecular (-H) |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------|---|
| 7,21 | 271,0606 | 271,0606 | 0 | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ |
| 5,67 | 287,0545 | 287,0556 | -3,8 | C ₁₅ H ₁₁ O ₆ |
| | 161,0606 | 161,0603 | 1,9 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 5,13 | 433,1129 | 433,1135 | -1,4 | C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ |
| | 271,0608 | 271,0606 | 0,7 | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ |
| 4,69 | 257,0446 | 257,0450 | -1,6 | C ₁₄ H ₉ O ₅ |
| | 161,0603 | 161,0603 | 0 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 4,61 | 207,0648 | 207,0657 | -4,3 | C ₁₁ H ₁₁ O ₄ |
| | 163,0758 | 163,0759 | -0,6 | C ₁₀ H ₁₁ O ₂ |
| 4,05 | 205,0501 | 205,0501 | 0 | C ₁₁ H ₉ O ₄ |
| | 161,0583 | Não identificou | | |
| 3,66 | 233,0445 | 233,0450 | -2,1 | C ₁₂ H ₉ O ₅ |
| | 189,0548 | 189,0552 | -2,1 | C ₁₁ H ₉ O ₃ |
| | 161,0580 | Não identificou | | |
| | 135,0446 | Não identificou | | |
| | 119,0381 | Não identificou | | |
| 3,22 | 203,0712 | 203,0708 | 2,0 | C ₁₂ H ₁₁ O ₃ |
| | 161,0596 | 161,0603 | -4,3 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 2,71 | 257,0444 | 257,0450 | -2,3 | C ₁₄ H ₉ O ₅ |
| | 213,0420 | 213,0423 | -1,8 | C ₁₃ H ₉ O ₃ |
| | 121,0292 | 121,0290 | 1,7 | C ₇ H ₅ O ₂ |

NOTA: *H. seropedicae* AMM1 CULTIVADO EM MEIO CONTENDO NH₄Cl E NARINGENINA. A BACTÉRIA FOI RESSUSPensa A PARTIR DA DO_{600nm} INICIAL DE 0,6;

u.m.a: unidade de massa atômica

não identificou: o software MassLynx v.4.1 mostrou a relação m/z do íon, mas não sugeriu as possíveis fórmulas moleculares para estes íons.

FONTE: A AUTORA

Assim como a estirpe SmR1, a estirpe AMM1 também consumiu a naringenina adicionada ao meio de cultura, porém o realizou mais lentamente. Com 15 horas de incubação somente o íon da naringenina foi detectado no tempo de 7,21 minutos (Tabela 17). Neste tempo de incubação, no perfil metabólico da estirpe selvagem, além da naringenina foi detectado o íon m/z 301,0712 C₁₆H₁₃O₆. Contudo,

com 24 e 39 horas de incubação (Tabelas 18 e 19) este íon foi detectado, mostrando que a estirpe mutante degrada naringenina mais lentamente.

TABELA 18 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE AMM1 DE *H. seropedicae* APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO.

| Tempo de retenção (min) | Massa encontrada (u.m.a) | Massa calculada (u.m.a) | Erro (ppm) | Fórmula molecular (-H) |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------|---|
| 7,18 | 301,0712 | 301,0712 | 0 | C ₁₆ H ₁₃ O ₆ |
| | 271,0605 | 271,0606 | -0,4 | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ |
| 7,07 | 443,0753 | 443,0767 | -3,2 | C ₂₅ H ₁₅ O ₈ |
| 6,77 | 517,1057 | 517,1041 | -3,2 | C ₁₇ H ₂₅ O ₁₈ |
| | 247,0602 | 247,0606 | -1,6 | C ₁₃ H ₁₁ O ₅ |
| | 203,0707 | 203,0708 | -0,5 | C ₁₂ H ₁₁ O ₃ |
| | 185,0578 | Não identificou | | |
| | 119,0481 | Não identificou | | |
| 6,71 | 349,1069 | 349,1076 | -2,0 | C ₂₁ H ₁₇ O ₅ |
| 5,64 | 161,0604 | 161,0603 | 0,6 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 5,1 | 433,1129 | 433,1135 | -1,4 | C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ |
| | 271,0608 | 271,0606 | 0,7 | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ |
| 4,6 | 603,0771 | 603,0775 | -0,7 | C ₃₀ H ₁₉ O ₁₄ |
| | 463,1027 | 463,1029 | -0,4 | C ₂₅ H ₁₉ O ₉ |
| | 301,0341 | 301,0348 | -2,3 | C ₁₅ H ₉ O ₇ |
| | 257,0450 | 257,0450 | 0 | C ₁₄ H ₉ O ₅ |
| | 213,0549 | 213,0552 | -1,4 | C ₁₃ H ₉ O ₃ |
| | 161,0603 | 161,0603 | 0 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| | 119,0498 | 119,0497 | 0,8 | C ₈ H ₇ O |
| 4,25 | 203,0706 | 203,0708 | -1,0 | C ₁₂ H ₁₁ O ₃ |
| | 161,0600 | 161,0603 | -1,9 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| | 119,0495 | 119,0495 | -1,7 | C ₈ H ₇ O |
| 4,03 | 257,0446 | 257,0450 | -2,3 | C ₁₄ H ₉ O ₅ |
| | 247,0602 | 247,0606 | -1,6 | C ₁₃ H ₁₁ O ₅ |
| | 205,0501 | 205,0501 | 0 | C ₁₁ H ₉ O ₄ |
| | 161,0600 | 161,0603 | -1,9 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| | 119,0498 | 119,0497 | 0,8 | C ₈ H ₇ O |
| 3,60 | 135,0446 | 135,0446 | -4,4 | C ₈ H ₇ O ₂ |
| 3,16 | 275,0557 | 275,0556 | 0,4 | C ₁₄ H ₁₁ O ₆ |
| | 203,0710 | 203,0708 | 1,0 | C ₁₂ H ₁₁ O ₃ |
| | 161,0605 | 161,0603 | 1,2 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 3,02 | 197,0083 | 197,0086 | -1,5 | C ₈ H ₅ O ₆ |
| | 153,0187 | 153,0188 | -0,7 | C ₇ H ₅ O ₄ |
| | 121,0290 | 121,0290 | 0 | C ₇ H ₅ O ₂ |
| | 109,0312 | Não identificou | | |
| 2,61 | 603,0768 | 603,0775 | -1,2 | C ₃₀ H ₁₉ O ₄ |
| | 301,0350 | 301,0348 | 0,7 | C ₁₅ H ₉ O ₇ |
| | 257,0452 | 257,0450 | 0,8 | C ₁₄ H ₉ O ₅ |
| | 213,0534 | Não identificou | | |

NOTA: *H. seropedicae* AMM1 CULTIVADO EM MEIO CONTENDO NH₄Cl E NARINGENINA. A BACTÉRIA FOI RESSUSPENSADA A PARTIR DA DO_{600nm} INICIAL DE 0,6;

u.m.a: unidade de massa atômica

não identificou: o software MassLynx v.4.1 mostrou a relação m/z do íon, mas não sugeriu as possíveis fórmulas moleculares para estes íons.

FONTE: A AUTORA

Após 24 horas de incubação outros metabólitos foram detectados, inclusive o íon m/z 301,0712, que foi detectado no sobrenadante de cultivo de 39 horas (Tabela 19).

TABELA 19 – LISTA DE ÍONS ENCONTRADOS NO SOBRENADANTE DA CULTURA DA ESTIRPE AMM1 DE *H. seropedicae* APÓS 39 HORAS DE INCUBAÇÃO.

| Tempo de retenção (min) | Massa encontrada (u.m.a) | Massa calculada (u.m.a) | Erro (ppm) | Fórmula molecular (-H) |
|-------------------------|--------------------------|------------------------------------|------------|---|
| 7,16 | 301,0712 | 301,0712 | 0 | C ₁₆ H ₁₃ O ₆ |
| 7,07 | 443,0753 | 443,0767 | -3,2 | C ₂₅ H ₁₅ O ₈ |
| 6,77 | 517,1057 | 517,1041 | -3,2 | C ₁₇ H ₂₅ O ₁₈ |
| | 247,0602 | 247,0606 | -1,6 | C ₁₃ H ₁₁ O ₅ |
| | 203,0707 | 203,0708 | -0,5 | C ₁₂ H ₁₁ O ₃ |
| | 185,0578 119,0481 | Não identificou Não identificou | | |
| 6,71 | 349,1069 | 349,1076 | -2,0 | C ₂₁ H ₁₇ O ₅ |
| 5,64 | 161,0604 | 161,0603 | 0,6 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 5,1 | 433,1129 | 433,1135 | -1,4 | C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ |
| | 271,0608 | 271,0606 | 0,7 | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ |
| 4,6 | 603,0771 | 603,0775 | -0,7 | C ₃₀ H ₁₉ O ₁₄ |
| | 463,1027 | 463,1029 | -0,4 | C ₂₅ H ₁₉ O ₉ |
| | 301,0341 | 301,0348 | -2,3 | C ₁₅ H ₉ O ₇ |
| | 257,0450 | 257,0450 | 0 | C ₁₄ H ₉ O ₅ |
| | 213,0549 | 213,0552 | -1,4 | C ₁₃ H ₉ O ₃ |
| | 161,0603 | 161,0603 | 0 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 4,25 | 203,0706 | 203,0708 | -1,0 | C ₁₂ H ₁₁ O ₃ |
| | 161,0600 | 161,0603 | -1,9 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| | 119,0495 | 119,0495 | -1,7 | C ₈ H ₇ O |
| 3,6 | 135,0446 | 135,0446 | 0 | C ₈ H ₇ O ₂ |
| 3,16 | 275,0557 | 275,0556 | 0,4 | C ₁₄ H ₁₁ O ₆ |
| | 203,0710 | 203,0708 | 1,0 | C ₁₂ H ₁₁ O ₃ |
| | 161,0605 | 161,0603 | 1,2 | C ₁₀ H ₉ O ₂ |
| 3,02 | 197,0083 | 197,0086 | -1,5 | C ₈ H ₅ O ₆ |
| | 153,0187 | 153,0188 | -0,7 | C ₇ H ₅ O ₄ |
| | 121,0290 | 121,0290 | 0 | C ₇ H ₅ O ₂ |
| | 109,0312 | Não identificou | | |
| 2,61 | 603,0768 | 603,0775 | -1,2 | C ₃₀ H ₁₉ O ₄ |
| | 301,0350 | 301,0348 | 0,7 | C ₁₅ H ₉ O ₇ |
| | 257,0452 | 257,0450 | 0,8 | C ₁₄ H ₉ O ₅ |
| | 213,0534 | Não identificou | | |
| 2,49 | 181,0497 | 181,0501 | -2,2 | C ₉ H ₉ O ₄ |
| | 121,0287 | 121,0290 | -2,5 | C ₇ H ₅ O ₂ |

NOTA: *H. seropedicae* AMM1 CULTIVADO EM MEIO CONTENDO NH₄Cl E NARINGENINA. A BACTÉRIA FOI RESSUSPENSA A PARTIR DA DO_{600nm} INICIAL DE 0,6;

u.m.a: unidade de massa atômica

não identificou: o software MassLynx v.4.1 mostrou a relação m/z do íon, mas não sugeriu as possíveis fórmulas moleculares para estes íons.

FONTE: A AUTORA

Em tempos de incubação maiores foi detectado, muito próximo à naringenina um íon de relação m/z 301,0712 C₁₆H₁₃O₆, que é o mesmo íon observado no metabolismo da estirpe selvagem (Figuras 28 e 32) Alguns íons

detectados nos sobrenadantes da estirpe mutante não foram detectados nos sobrenadantes da estirpe selvagem. Dentre estes íons estão os de relação m/z 153,0185, 181,0497, 197,0084, e 275,0552. Este resultado sugere que somente a estirpe AMM1 produza estas moléculas. Nos picos eluídos em 1,6; 2; 2,15; 5,77 e 6,01 minutos não foi possível identificar os íons presentes.

Análises de fragmentação de alguns dos íons encontrados também foram realizadas. O perfil de fragmentação dos íons encontrados no pico eluído em 3,02 minutos (Tabela 19) está mostrado na Figura 35.

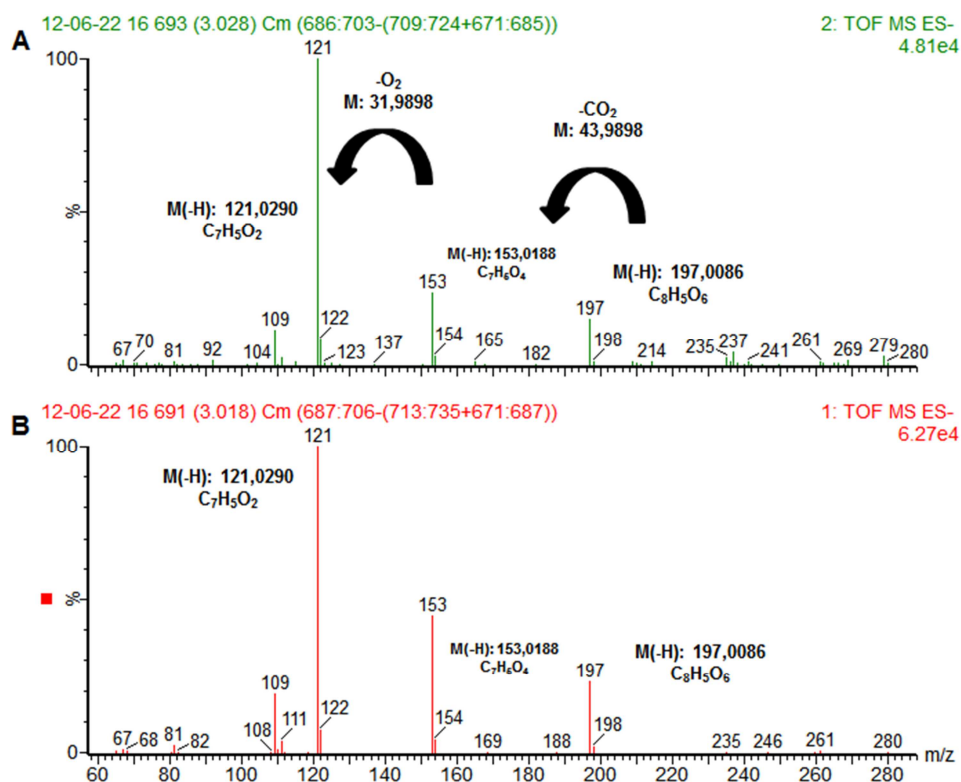


FIGURA 35 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO (MS/MS) DOS ÍONS DETECTADOS ELUÍDOS NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 3,02 MINUTOS. (A) íons filhos obtidos da fragmentação (MS/MS) do sinal 197,0086, mostrando somente os pico 121,0290 ($C_7H_5O_2$), 153,0188 ($C_7H_5O_4$) e 197,0086 ($C_8H_5O_6$); (B) MS dos íons detectados no tempo de retenção de 3,02 minutos.

FONTE: A AUTORA

O perfil de fragmentação mostrado na Figura 35 sugere que o íon m/z 197,0086 é descarboxilado, originando o íon m/z 153,0188. Este, por sua vez, perde um átomo de oxigênio molecular (O_2) resultando no íon m/z 121,0290. O íon m/z 153,0188 pode se tratar do íon molecular do ácido protocatecuico em modo negativo, e o íon m/z 121,0290 pode se tratar do íon molecular do ácido benzóico em modo negativo.

As análises do sobrenadante do cultivo da estirpe AMM1 com 39 horas de incubação mostraram um novo pico sendo eluído em 2,49 minutos (Tabela 19). Neste pico foram encontrados dois íons. O íon m/z 181,0501 ($C_9H_9O_4$) e o íon m/z 121,0290 ($C_7H_5O_2$). O perfil de fragmentação destes íons sugere que o íon m/z 181,0501 produz o íon m/z 121,0290, como está mostrado na Figura 36.

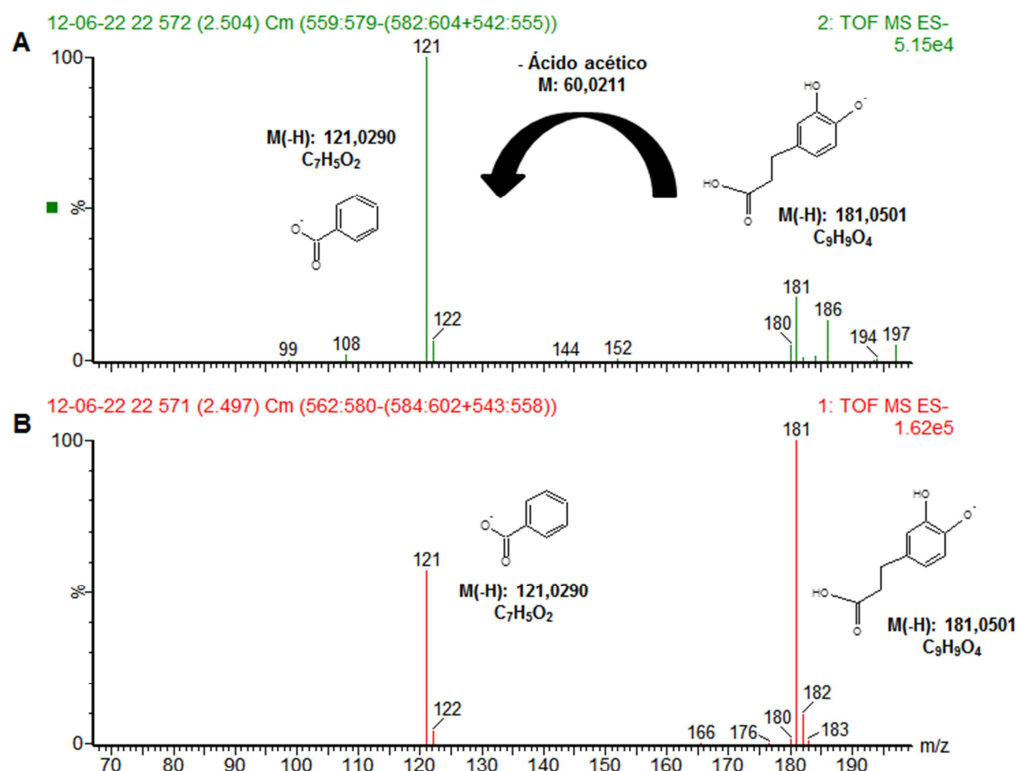


FIGURA 36 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO (MS/MS) DOS ÍONS DETECTADOS ELUÍDOS NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 2,49 MINUTOS. (A) íon filho obtido após fragmentação (MS/MS) do sinal 181,0501, mostrando somente os pico 121,0290 ($C_7H_7O_2$), e 181,0501 ($C_9H_9O_4$); (B) MS dos íons detectados no tempo de retenção de 2,49 minutos.

FONTE: A AUTORA

5.2.4.2 Metabólitos encontrados no cultivo da estirpe SmR1 na presença e ausência de fluoroacetato de sódio

O fluoroacetato em alguns organismos interrompe o ciclo de Krebs, formando flúor-citrato, que não é posteriormente metabolizado pelo ciclo. A hipótese era de que a naringenina seria clivada a ácido protocatecuico, e este originaria succinil-CoA e acetil-CoA, que são substratos do ciclo de Krebs. O ciclo de Krebs estando inibido poderia causar a inibição da degradação da naringenina. Contudo, a naringenina continuou sendo clivada (Figura 37), sugerindo que dehalogenases

presentes em *H. seropedicae* estariam retirando o flúor incorporado às moléculas de citrato, permitindo o funcionamento normal do ciclo de Krebs e do metabolismo bacteriano. Isto explica o fato de a bactéria sobreviver ao fluoracetato, e com seu metabolismo ativo (uma vez que a naringenina continuou sendo degradada) na presença deste composto.

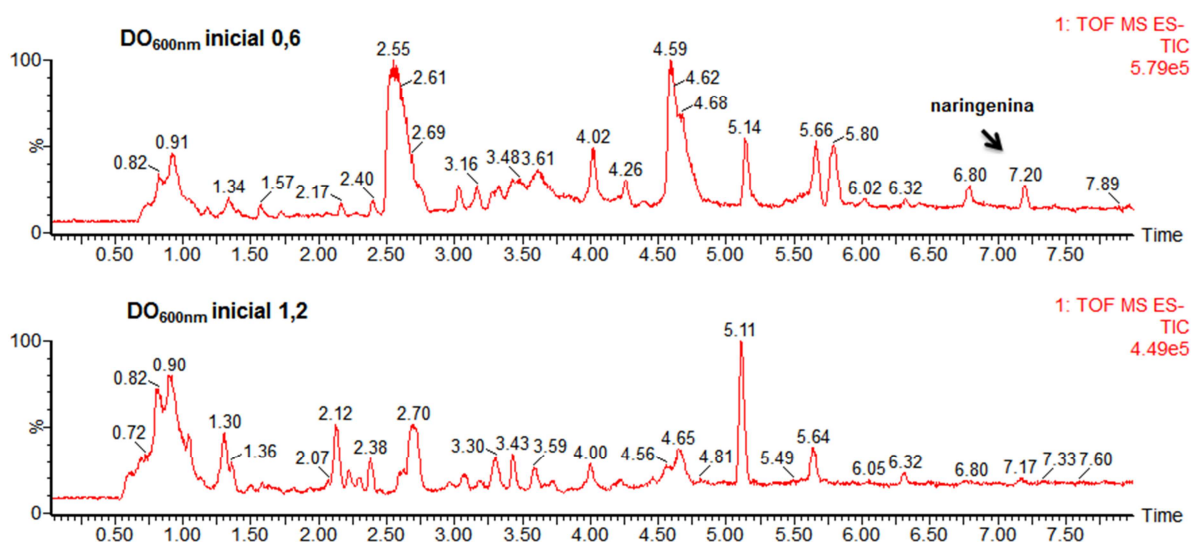


FIGURA 37 - METABÓLITOS ORIGINADOS DA DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA POR *H. seropedicae* SmR1 NA PRESENÇA DE FLUOROACETATO DE SÓDIO. Os cultivos de 500 mL foram incubados até atingir a DO_{600nm} de 0,6 e 1,2, como indicado na figura. Após a centrifugação e lavagem das células, estas foram ressuspensas em meio NFbHPN contendo 10 mmol/L de naringenina e 10 mmol/L de fluoroacetato de sódio. Aliquotas nos tempo 0, 15, 24 e 39 horas foram coletadas para a análise por LC-MS. O exposto é referente ao tempo de 24 horas de cultivo.

FONTE: A AUTORA

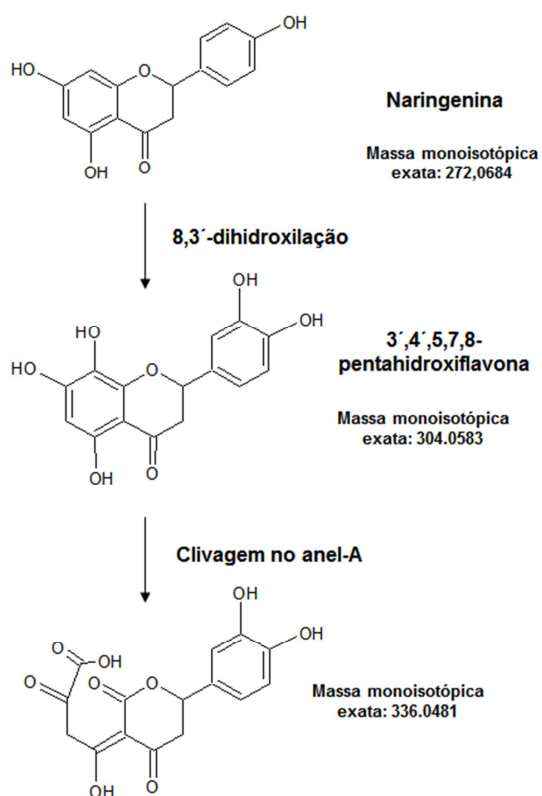
Algumas diferenças no perfil cromatográfico das duas condições testadas (alta e baixa DO_{600nm} - Figura 37) podem ser observadas. Porém, *H. seropedicae* é capaz de metabolizar a naringenina na presença de fluoroacetato de sódio.

Comparando o crescimento na presença de fluoroacetato com as análises das culturas contendo NH₄Cl (Figuras 28), algumas diferenças podem ser observadas. Na presença de fluoroacetato de sódio, na DO_{600nm} de 0,6 foi detectado um pico com tempo de retenção de 5,8 minutos. Neste pico foram identificados dois íons; (m/z experimental 247,0610 u.m.a, não mostrado) que deve corresponder ao íon C₁₃H₁₁O₅ (erro 1,6 ppm; m/z teórico 247,0606 u.m.a), o que não parece ser um metabólito da naringenina, uma vez que o que distingue as duas moléculas é a presença de 2 carbonos a mais na naringenina. É pouco provável que uma enzima catalise um processo para retirar apenas dois carbonos de um anel aromático que é

estável. O outro íon presente neste pico (m/z experimental 437,1236) provavelmente corresponde a $C_{24}H_{21}O_8$ (erro 0 ppm).

5.2.5 Proposta da via do metabolismo de naringenina em *H. seropedicae*

Baseado em estudos anteriores (BARZ 1970; PILLAI E SWARUP, 2002; RAO E COOPER, 1994; RAO *et al.*, 1991; RAO E COOPER, 1995; ARUNACHALAM *et al.*, 2003; HOOPER E MAHADEVAN, 1997; SCHOEFER *et al.*, 2003; WINTER *et al.*, 1989; BRAUNE *et al.*, 2001; JEFREY *et al.*, 1972), e na análise de algumas vias metabólicas presentes em *H. seropedicae*, foi proposto inicialmente um mecanismo de degradação de naringenina, mostrado na Figura 38.



Continua

Continuação

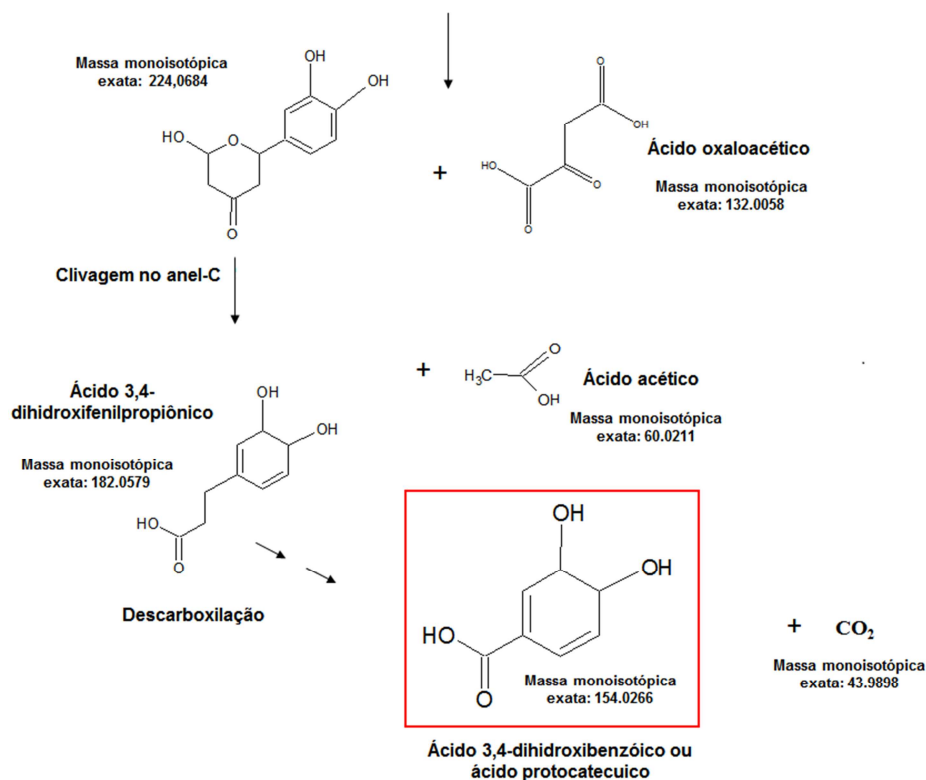


FIGURA 38 – PROPOSTA DA VIA DE DEGRADAÇÃO DE NARINGENINA EM *H. seropedicae*. FONTE: A AUTORA

Inicialmente, a naringenina seria hidroxilada no anel-A para então ser clivada, possivelmente por uma intradiol dioxigenase (FdeC). A via originaria ácido protocatecuico, que seria metabolizado pelos produtos dos genes *pca*, encontrados no genoma de *H. seropedicae*. Considerando as moléculas encontradas nas análises (item 5.2.4.1) é possível propor uma via diferente da exposta na Figura 38. A Figura 39 mostra a parte inicial desta nova via proposta.

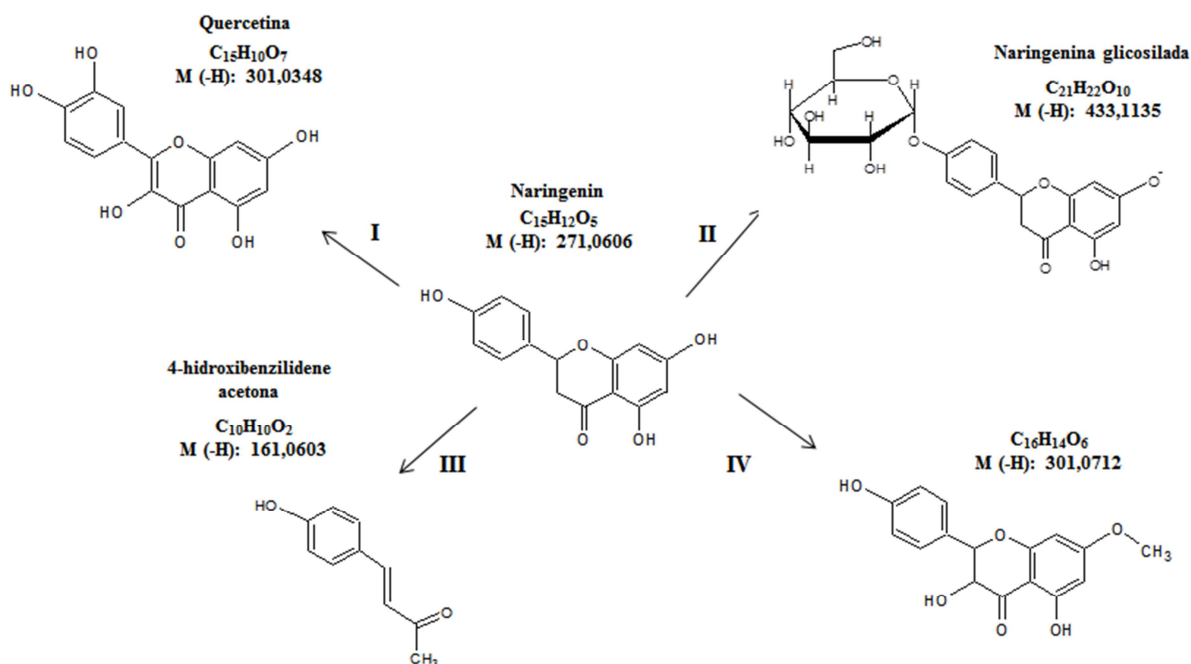


FIGURA 39 – PRIMEIROS PASSOS DO METABOLISMO DE NARINGENINA POR *H. seropedicae*. Aparentemente, o metabolismo da naringenina se dá por pelo menos 4 diferentes rotas, que estão indicadas pelos algarismos romanos de I a IV.

FONTE: A AUTORA

De acordo com as fórmulas moleculares e relações m/z dos íons encontrados (Tabela 13, 14 e 15), pode-se propor 4 rotas iniciais para o metabolismo da naringenina em *H. seropedicae* (Figura 39, I a IV).

Um dos íons identificados apresenta relação m/z 301,0349 e provavelmente corresponde a um composto de fórmula molecular C₁₅H₉O₇ (-H) (Figura 39, rota I). Este íon foi identificado em 2 pontos do cromatograma: em 2,7 e 4,7 minutos (Tabelas 13, 15 e 18), e além deste íon, outros também foram detectados.

A partir dos dados obtidos sugere-se que a molécula detectada trata-se da quercetina. Para comprovar isto, foi realizado um LC-MS com o padrão de quercetina (Sigma-Aldrich), a partir do qual foi possível confirmar a identidade desta molécula, uma vez que o tempo de retenção e a massa teórica, calculada pelo software MassLynx v4.1, coincidiram com os mesmos parâmetros obtidos na análise das amostras. O tempo de retenção da quercetina (padrão comercial), sob as condições analisadas (item 4.13.2), foi de 4,65 minutos com m/z experimental 301,0354, m/z teórica 301,0348 (erro 2 ppm) C₁₅H₉O₇. Segundo o banco de dados PubChem a massa exata do anión da quercetina é de 301,034828. Estes resultados

sugerem que a quercetina é originada do metabolismo da naringenina em *H. seropedicae*. Se isto for real, a degradação da quercetina deve ocorrer por outra via metabólica, e não por *fde*, uma vez que os mutantes DR2 e AMM1 são capazes de utilizar este flavonóide como fonte de carbono de maneira semelhante à estirpe selvagem (Figura 19).

Após análise do perfil de metabólitos da naringenina produzidos pela estirpe mutante AMM1 (Tabelas 17, 18 e 19) foi possível observar que esta estirpe metaboliza o flavonóide mais lentamente, quando comparado à estirpe selvagem. Esta metabolização pode estar ocorrendo devido a um escape na expressão do operon, uma vez que a estirpe AMM1 foi obtida por recombinação homóloga simples. Devido a esta metabolização lenta foi possível detectar a presença de certos íons, que não foram identificados nos sobrenadantes produzidos pela estirpe selvagem, e com isto foi possível propor uma via de degradação da quercetina, originada da naringenina, por *H. seropedicae* (Figura 40).

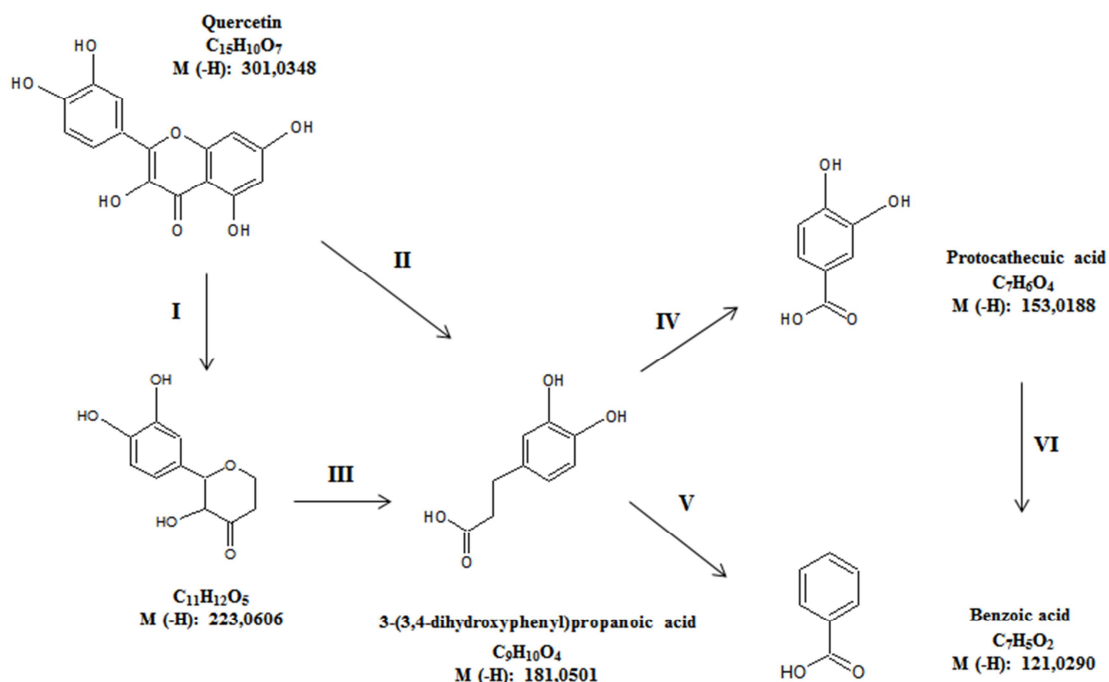


FIGURA 40 – HIPÓTESE DA ROTA DE DEGRADAÇÃO DA QUERCETINA EM *H. seropedicae*. Os algarismos romanos de I a VI mostram os possíveis passos desta via. Todas as moléculas propostas nesta figura tiveram seus íons detectados neste trabalho, podendo ser encontradas nas Tabelas 8 e 9.

FONTE: A AUTORA

Após análise dos íons aqui encontrados pode-se propor um mecanismo de clivagem inicial da quercetina. Este pode se iniciar via anel A, liberando o íon m/z 223,0605 $C_{11}H_{11}O_5$, (I) que por sua vez seria clivado no anel C originando 181,0497 $C_9H_9O_4$ (III), ou a quercetina pode ser clivada via anel C liberando diretamente o íon 181,0497 $C_9H_9O_4$ (II). O íon 181,0497 $C_9H_9O_4$ pode ser descarboxilado à ácido protocatecúico 153,0185 $C_7H_5O_4$ (IV) ou descarboxilado e/ou desidroxilado à ácido benzoico 121,0290 $C_7H_5O_2$ (V).

A quercetina pode ser clivada via anel-A e/ou anel-C como mostra a figura 35. O íon 181,0497 $C_9H_9O_4$ pode se tratar do ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-propiónico, que já foi descrito como intermediário da degradação da luteolina por *Clostridium orbiscindens* (SCHOEFER *et al.*, 2003) e *Eubacterium ramulus* (BRAUNE *et al.*, 2001).

O íon 181,0497 $C_9H_9O_4$ e o íon 161,0605 $C_{10}H_9O_2$ podem ser originados da clivagem da quercetina e da naringenina, respectivamente, através da abertura do anel C de ambas as moléculas. Isto sugere que há 2 vias diferentes em *H. seropedicae*. Em *Eubacterium ramulus* foi observado que a degradação da quercetina e da luteolina ocorre via anel C originando 2 moléculas distintas, o ácido 3,4-dihidroxifenilacético e o ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-propiónico. Segundo os mesmos autores o fato de terem sido encontradas duas moléculas diferentes suporta a hipótese de vias diferentes para a degradação de cada molécula (BRAUNE *et al.*, 2001).

Outro íon encontrado tem relação m/z 433,1135 $C_{21}H_{21}O_{10}$ (Figura 39, rota II) provavelmente é a naringenina glicosilada, contudo a parte monossacarídica não foi detectada, e por este motivo esta parte da molécula não está descrita nos resultados. A análise de MS/MS deste íon valida a hipótese de que neste pico o íon 271,0604 $C_{15}H_{11}O_5$ é originado da fragmentação do 433,1130 $C_{21}H_{21}O_{10}$ (Figura 41).

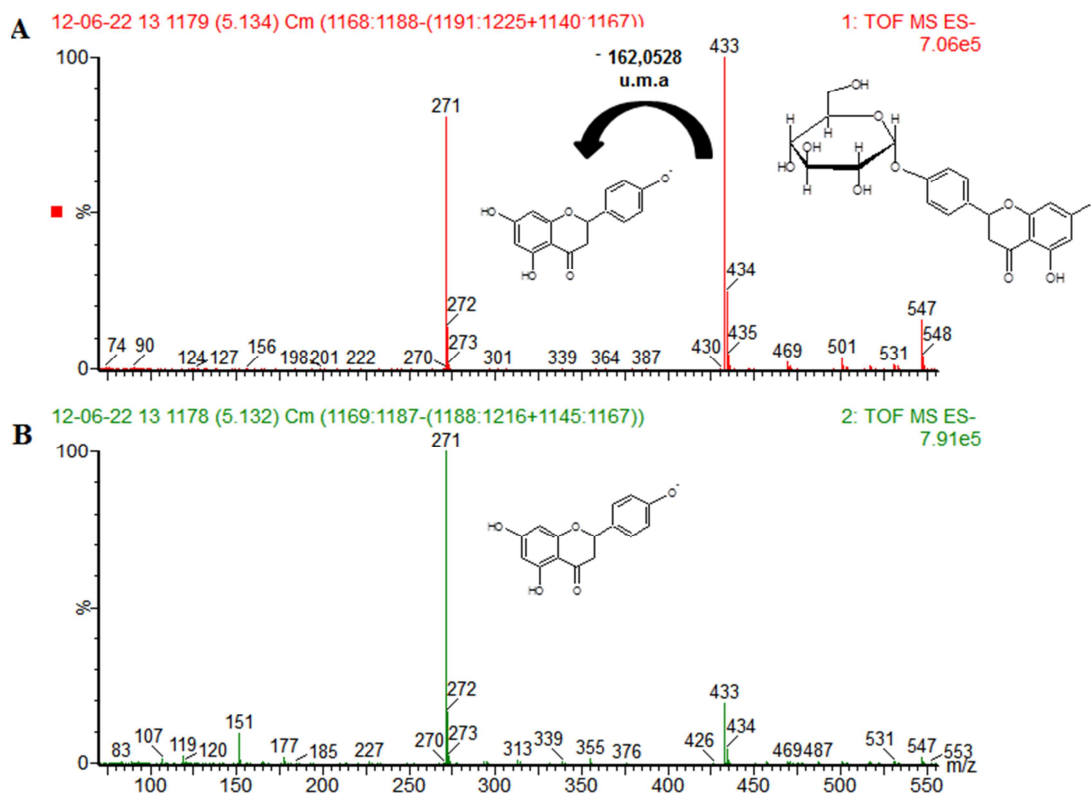


FIGURA 41 – FRAGMENTAÇÃO DOS ÍONS DETECTADOS NO PICO ELUÍDO EM 5,1 MINUTOS. (A) MS, mostrando a presença dos íons m/z 271,0604 $C_{15}H_{11}O_5$ e 433,1130 $C_{21}H_{21}O_{10}$ e (B) MS/MS dos mesmos íons, mostrando que após MS/MS há menor quantidade do íon m/z 433,1130 em relação ao m/z 271,0604.

FONTE: A AUTORA

A diferença de massa entre o íon m/z 433,1135 e o íon m/z 271,0606 é de 162,0528 u.m.a. Este fragmento seria resultado da fragmentação do íon m/z 433,1135 entre a porção flavonóide e a porção monossacarídica. Hexoses quando ligadas apresentam relação m/z 162,0528, que é a diferença observada entre a relação m/z do íon 433,1135 e do íon 271,0606. O íon correspondente à glucose não pôde ser observado devido ao método de análise. Para que este fosse possível a sua observação deve-se trabalhar em modo positivo, e utilizando um gradiente (fase móvel) de pH.

A terceira rota por onde a naringenina pode seguir é a sua clivagem direta, através do anel-C, originando a molécula, cuja forma iônica apresenta m/z 161,0603 $C_{10}H_9O_2$ (Figura 39, rota III) que então passa por outras transformações. Apesar dos vários íons detectados (Tabelas 13, 14 e 15) ainda é difícil propor uma rota para esta parte da via.

Outra molécula originada a partir da naringenina apresentou um íon de m/z 301,0708 $C_{16}H_{13}O_6$ (Tabelas 13, 14 e 15), e segundo o banco de dados PubChem a massa exata deste anión é 301,071213. Esta massa coincide com a massa esperada, calculada pelo software MassLynx v4.1. Nesse banco de dados podem ser encontradas algumas moléculas descritas com esta mesma massa, mas considerando o produto de partida (naringenina), pode-se propor que ocorra uma metoxilação originando o íon de m/z 301,0708 $C_{16}H_{13}O_6$. A Figura 29 mostra o perfil de aparecimento deste íon com concomitante desaparecimento da naringenina.

Outras moléculas foram identificadas e são descritas nas Tabelas 13 a 15 e 17 a 19, contudo ainda é muito difícil saber como a via funciona, como ocorre a transformação de uma molécula em outra. *H. seropedicae* possui em seu genoma várias vias de degradação de compostos aromáticos. Isto dificulta a proposição de uma via para a degradação da naringenina (utilizando-se somente análises da estirpe selvagem) uma vez que o produto de uma via pode servir de substrato para outra via, dependendo de quais intermediários estão sendo originados. Com os resultados obtidos, sugere-se que a monooxigenase (*fdeE* Hsero_1007) está envolvida no 1º passo, uma vez que o mutante F6, obtido pela construção da biblioteca genômica por inserção do Tn5, não é capaz de degradar naringenina e utilizá-la como fonte de carbono (Figuras 26 e 27). No sistema de degradação do composto 2,4-dinitrotolueno (2,4-DNT) de *Burkholderia* sp., a proteína DntA (2,4-dinitrotolueno-dioxigenase), é a 1ª enzima a atuar na via, dioxigenando o 2,4-DNT em 4-metil-5-nitrocatecol (4M5NC) (SUEN E SPAIN, 1993). Quando este composto é produzido, o meio de cultivo apresenta coloração amarela devido à presença do 4M5NC, contudo a mutação neste gene deixa a bactéria incapaz de produzir tal composto (DE LA HERAS *et al.*, 2011). Algo semelhante ocorre na via em estudo de *H. seropedicae*, onde a mutação na monooxigenase causa o acúmulo da naringenina e ausência da coloração amarela na cultura, característica da degradação deste composto. Após as análises por LC-MS dos cultivos, se tentou encontrar a massa do composto 4M5NC (massa monoisotópica exata: 169,0375), mas não foi possível encontrá-lo, indicando que o composto de coloração amarela, produzido por *H. seropedicae* durante a degradação da naringenina, não é o 4M5NC.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a naringenina é a molécula sinalizadora para a sua própria degradação. Sabe-se que esta classe de moléculas está envolvida no processo de interação planta-bactéria simbiótica (rizóbio-leguminosa), e que, assim como *H. seropedicae* SmR1, vários rizóbios (RAO E COOPER, 1994) possuem a capacidade de degrada-las. Ao se tornar capaz de utilizar fontes alternativas de carbono, a bactéria tem uma vantagem adaptativa sobre outras espécies de bactérias que utilizam apenas as fontes de carbono usuais. Ou seja, *H. seropedicae* SmR1 ao utilizar a naringenina como fonte alternativa de carbono pode se associar com plantas que liberam estes compostos, de uma maneira mais eficiente do que as bactérias que não possuem a capacidade de degrada-la. Esta é a vantagem em se ter o operon *fde*, uma vez que as proteínas codificadas por ele estão envolvidas na degradação da naringenina por *H.seropedicae* SmR1. Contudo, mais estudos são necessários para confirmar isto e para confirmar o mecanismo de degradação da naringenina proposto aqui.

6. CONCLUSÕES

- *H. seropedicae* contém um grupo de genes envolvidos na degradação de naringenina, o que pode lhe conferir uma vantagem adaptativa no processo de interação planta-bactéria, pois pode utilizar a naringenina como fonte alternativa de carbono, devido à presença destes genes;
- Algumas características na estrutura dos flavonóides parecem ser importantes, uma vez que, dentre os flavonóides testados, somente a naringenina, crisina, apigenina e luteolina induziram a atividade de FdeR;
- Apesar de FdeR ter induzido parcialmente a expressão dos genes *nodABC* de *Rhizobium* sp. NGR234, não foi capaz de induzir a formação de nódulos radiculares em leguminosas, uma vez que este processo é finamente regulado e depende de outros fatores não reconhecidos por FdeR;
- FdeR é essencial para a degradação de naringenina por *H. seropedicae*, uma vez que o mutante neste gene perde completamente a capacidade de utilizar naringenina como fonte de carbono;
- Os resultados obtidos sugerem que FdeE está envolvida nos passos iniciais da degradação de naringenina em *H. seropedicae*;
- Após análises de espectrometria de massas foi possível sugerir uma parte da via de degradação da naringenina em *H. seropedicae*, e comprovar a degradação de naringenina, uma vez que foi possível identificar metabólitos originados da degradação deste flavonóide.

7. REFERÊNCIAS

- ARUNACHALAM, M., MOHAN, N., SUDAGEV, R., CHELLAPPAN, P. E MAHADEVAN, A. Degradation of (+)-catechin by *Acinetobacter calcoaceticus* MTC 127. **Biochim Biophys Acta**, v.1621, p.261-265, 2003.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., and LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.
- BALACHANDAR, D., SANDHIYA, G.S., SUGITHA, T.C.K. and KUMAR, K. Flavonoids and growth hormones influence endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.22, p.707-712, 2006.
- BARZ, W. Isolation of rhizosphere bacterium capable of degrading flavonoids. **Phytochemistry**, v.9, p.1745-1749, 1970.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DOBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **Anais da Academia Brasileira Ciências**, v.56, p.365, 1984.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.86-93, 1986.
- BALSANELLI, E.; SERRATO, R.V.; BAURA, V.A.; SASSAKI, G.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; MONTEIRO, R.A. *Herbaspirillum seropedicae* *rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology** v.12(8), p.2233-2244, 2010.
- BARNETT, M. J., SWANSON, J. A. AND LONG, S. R. Multiple genetic controls on *Rhizobium meliloti* *syxA*, a regulator of exopolysaccharide abundance. **Genetics**, v.148, p.19–32, 1988.
- BASSAM, B. J., M. A. DJORDJEVIC, J. W. REDMOND, M. BATLEY, B. G. ROLFE Identification of a *nodD*-dependent locus in the *Rhizobium* strain NGR234 activated by phenolic factors secreted by soybeans and other legumes. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.1, p.161-168, 1988.
- BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v.174, p. 195-209, 1995.
- BOWATER, L.; FAIRHURST, S.A., JUST, V.V., BORNEMANN, S. *Bacillus subtilis* YxaG is a novel Fe-containing quercetin 2,3-dioxygenase. **FEBS Letters**, v.557, p.45-48, 2004.

BRAUNE, A., GÜTSCHOW M., ENGST, W. AND BLAUT, M. Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p.5558-5567, 2001.

BRENCIC, A. E WINANS, S.C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology Molecular Biology Review**, v.69, p.155-194, 2005.

BROUGHTON, W.J. AND DILWORTH, M.J. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. **Biochemical Journal**, v.125, p.1075-1080, 1971.

BROUGHTON, W.J., JABBOURI, S., PERRET, X. Keys to symbiotic harmony. **Journal of Bacteriology**, v.182(20), p.5641-5652, 2000.

COLLIER, L. S., GAINES, G. L. AND NEIDLE, E. L. Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.2493–2501, 1998.

CORAL, J. Obtenção de mutante do gene *nodD* de *Herbaspirillum seropedicae*. **Relatório de Iniciação Científica**. 2005.

DAS, S. AND ROSAZZA, J.P.N. Microbial and enzymatic transformation of flavonoids. **Journal Natural Products**, v.69, p.499-508, 2006.

DE LA HERAS, A., CHAVARRÍA, M AND LORENZO, V. Association of *dnt* genes of *Burkholderia* sp. DNT with the substrate-blind regulator DntR draws the evolutionary itinerary of 2,4-dinitrotoluene biodegradation **Molecular Microbiology**, v.82(2), p.287-299, 2011.

DÉNARIÉ J., DEBELLE, F. E ROSENBERG, C. Signalling and host range variation in nodulation **Annual Review Microbiology**, v.46, p.497-531, 1992.

DODD, I. B., and J. B. EGAN., Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences **Nucleic Acids Research**, v.18, p.5019-5026, 1990.

FARR, S. B. AND KOGOMA, T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* **Microbiology Review**, v.55, p.561–585, 1991.

FELLAY, R., PERRET, X., VIPREY, V., BROUGHTON, W.J., AND BRENNER, S. Organization of host-inducible transcripts on the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. **Molecular Microbiology**, v.16, p.657–667, 1995.

GOUGH, C., GALERA, C., VASSE, J., WEBSTER, G., COCKING, E.C. AND DÉNARIÉ, J. Specific flavonoids promote intracellular root colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.10, p.560-570, 1997.

GRANT, S.G.; JESSEE, J.; BLOOM, F.R.; HANAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.87(12), p.4645-4649, 1990.

HANANAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v.166(04), p. 930-937, 1983.

HARTWIG, U.A.; JOSEPH, C.M.; PHILIPS, D.A. Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, v.95, p.797-803, 1991.

HARWOOD, C.S E PARALES, R.E. The β -ketoacid pathway and the biology of self-identity. **Annual Review Microbiology**, v.50, p.553-590, 1996.

HASSAN, S. AND MATHESIUS, U. The role of flavonoid in root-rhizosphere signaling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interaction. **Journal of Experimental Botany**, 1-16, 2012.

HENIKOFF, S.; HAUGHN, G.W.; CALVO, J.M.; WALLACE, J.C. A large family of bacterial activator proteins **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.85, p.6602-6606, 1988.

HERRERO, M.; DE LORENZO, V.; TIMMIS, K.N. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.172(11), p. 6557-6567, 1990.

HOOPER, W. AND MAHADEVAN, A. Degradation of catechin by *Bradyrhizobium japonicum*. **Biodegradation**, v.8, p.159-165, 1997.

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. **The American Phytopathological Society**, v.15(9), p.894-906, 2002.

KIM, J., KIM, J. G., KANG, Y., JANG, J. Y., JOG, G. J., LIM, J. Y., KIM, S., SUGA, H., NAGAMATSU, T. & HWANG, I. Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae* **Molecular Microbiology**, v.54, p.921-934, 2004.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43(9), p.887-891, 1997.

KOBAYASHI, H.; NACIRI-GRAVEN, Y.; BROUGHTON, W.J.; PERRET, X. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod*-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. **Molecular Microbiology**, v.51(2), p.335-347, 2004.

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

LEHNEN, D., BLUMER, C., POLEN, T., WACKWITZ, B., WENDISCH, V. F. & UNDEN, G. LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and

chemotaxis genes in *Escherichia coli* **Molecular Microbiology** v.45, p.521–532, 2002.

LEWIN, A., CERVANTES, E., WONG, C.H., AND BROUGHTON, W.J. *nodSU*, two new *nod* genes of the broad host range *Rhizobium* strain NGR234 encode host-specific nodulation of the tropical tree *Leucaena leucocephala*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.3, p.317–326, 1990.

MACHADO, I.M.; YATES, M.G.; MACHADO, H.B.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29(12), p.1599-1602, 1996.

MADDOCKS, S. AND OYSTON, P.C.F. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. **Microbiology**, v.154, p.3609-3623, 2008.

MARIN, A.M. Caracterização estrutural e funcional da região do gene *nodD* de *Herbaspirillum seropedicae*. **Dissertação**. 2009.

MARIN, A.M., SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O., SOUZA, L.M., SASSAKI, G.L., BAURA, V.A., YATES, M.G., WASSEM, R., MONTEIRO, R.A. Naringenin degradation by the endopythic diazotroph *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **Microbiology**, v.159, p.167-175, 2013.

MARTENS, S. AND MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**, v.66, p.2399-2407, 2005.

MILLER, J. **Experiments in molecular genetics**, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y, p.352-355, 1972.

MULLIGAN, J.Y. AND LONG, S.R. Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudate requires *nod*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.83, p.6609-6613, 1985

MULLIGAN, T.J. AND LONG, S.R. A Family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Genetics**, v.122, p.7-18, 2002.

MURAOKA, S.; OKUMURA, R.; OGAWA, N.; TAKAMASA NONAKA, T.; KIYOTAKA MIYASHITA, K.; SENDA, T. Crystal Structure of a Full-length LysR-type Transcriptional Regulator, CbnR: Unusual Combination of Two Subunit Forms and Molecular Bases for Causing and Changing DNA Bend. **Journal of Molecular Biology**, v.328, p.555-566, 2003.

PARSEK, M.R.; YE, R.W.; PUN, P. AND CHAKRABARTY, A.M. Critical nucleotides in the interaction of a LysR-type regulator with its target promoter region. *catBC* promoter activation by CatR. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.11279–11284, 1994b.

PEDROSA, F.O., MONTEIRO, R.A., WASSEM, R., CRUZ, L.M., AYUB, R.A., COLAUTO, N.B., FERNANDEZ, M.A., FUNGARO, M.H.P., GRISARD, E.C. E other authors. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v.7(5), e1002064. doi:10.1371/journal.pgen.1002064, 2011.

PÉREZ-MARTÍN, J. AND DE LORENZO, V. Clues and consequences of DNA bending in transcription. **Annual Review Microbiology**, v.51, p.593–628, 1997.

PÉREZ-PANTOJA, D., DE LA IGLESIA, R., PIEPER, D.H. AND GONZÁLES, B. Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. **FEMS Microbiology Review**, v.32, p.736-794, 2008.

PÉREZ-PANTOJA, D.; GONZÁLES, B; PIEPER, D.H. Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009.

PETERS, N.K. E LONG, S.R. Alfalfa Root Exudates and Compounds which Promote or Inhibit Induction of *Rhizobium meliloti* Nodulation Genes. **Plant Physiology**, v.88, p.396-400, 1988.

PHAM, T.T.M.; TU, Y.; SYLVESTRE, M. Remarkable abilities of *Pandoraea pnomenusa* B356 biphenyl dioxygenase to metabolize simple flavonoids. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78(10), p.3560-3570, 2012.

PILLAI, B.V.S. E SWARUP, S. Elucidation of the flavonoid catabolism pathway in *Pseudomonas putida* PML2 by comparative metabolic profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68(01), p.143-151, 2002.

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.

RAO, J.R., SHARMA, N.D., HAMILTON, J.T.G., BOYD, D.R. E COOPER, J.E. Biotransformation of the pentahydroxy flavone quercetin by *Rhizobium loti* and *Bradyrhizobium* strains (*Lotus*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.1563-1565, 1991.

RAO, J.R. AND COOPER, J.E. Rhizobia catabolize *nod* gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanism. **Journal of Bacteriology**, v.176(17), p.5409-5413, 1994.

RAO, J.R. E COOPER, J.E. Soybean nodulating rhizobia modify *nod* genes inducers daidzein and genistein to yield aromatic products that can influence gene-inducing activity. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.8, p.855-862, 1995.

REDDY, P.M .; RENDÓN-ANAYA, M.; del RÍO, M.D.S.; KHANDUAL, S. Flavonoids as signaling molecules and regulators of root nodule development. **Dynamic Soil, Dynamic Plant**, v.1(2), p.83-94, 2007.

ROMERO-ARROYO, C.E., SCHELL, M.A., GAINES III, G.L. & NEIDLE, E.L. *catM* encodes a LysR-type transcriptional activator regulating catechol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of Bacteriology** v.172, p.5891-5898, 1995.

ROTHMEL, R.K., ALDRICH, T.L., HOUGHTON, J.E., COCO, W.M., ORNSTON, L.N. E CHAKRABARTY, A.M. Nucleotide sequencing and characterization of *Pseudomonas putida catR*: a positive regulator of the *catBC* operon is a member of the LysR family. **Journal of Bacteriology**, v.172, p.922-931, 1990.

RUANGPRASERT, A.; CRAVEN, S.H.; NEIDLE, E.L. AND MOMANY, C. Full-length structures of BenM and two variants reveal different oligomerization schemes for LysR-type transcriptional regulators. **Journal of Molecular Biology**, v.404, p.568-586, 2010.

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

SCHAAB, M.R.; BARNEY, B.M.; FRANCISCO, W.A. Kinetic and spectroscopic studies on the quercetin 2,3-dioxygenase from *Bacillus subtilis*. **Biochemistry**, v.45, p.1009-1016, 2006.

SCHELL, M.A. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. **Annual Review Microbiology**, v.47, p.597-626, 1993.

SCHLAMMAN, H. R., OKKER, R. J. E LUGTENBERG, B. J. Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.5177–5182, 1992.

SCHOEFER, L., MOHAN, R., SCHWIERTZ A., BRAUNE, A. E BLAUT, M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5849-5854, 2003.

SCHNEIDER, H AND BLAUT, M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. **Archives in Microbiology**, v.173, p.71-75, 2000.

SCHWAB, S.; RAMOS, H.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; YATES, M.G.; CHUBATSU, L.S.; RIGO, L.U. Identification of NH₄⁺ - regulated genes of *Herbaspirillum seropedicae* by random insertional mutagenesis. **Archives of microbiology**, v.187(5), p.379-386, 2007.

SECCON, D.M. Clonagem, superexpressão e purificação da proteína NodD de *Herbaspirillum seropedicae*. **Relatório de Iniciação Científica**. 2004.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. **BioTechnology**, v.1, p.784-791, 1983.

SINGER, A. 2006. The chemical ecology of pollutant biodegradation. Bioremediation and phytoremediation from mechanistic and ecological perspectives. 5-19. *In* M.

Mackova, Dowling, D.N., Macek, T (ed.), **Phytoremediation and rhizoremediation. Theoretical background**, Springer, Dordrecht.

SMIRNOVA, I.A., DIAN, C., LEONARD, G.A., MCSWEENEY, S., BIRSE, D. AND BRZEZINSKI, P. Development of a bacterial biosensor for nitrotoluenes: the crystal structure of the transcriptional regulator DntR. **Journal of Molecular Biology**, v.340, p.405–418, 2004.

SPERANDIO, V., LI, C. C. AND KAPER, J. B. Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. **Infection and Immunity**, v.70, p.3085–3093, 2002.

SUEN, W.C. E SPAIN, J.C. Cloning and characterization of *Pseudomonas* sp. strain DNT genes for 2,4-dinitrotoluene degradation. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.1831-1837, 1993.

TADRA-SFEIR, M.Z., SOUZA, E.M., FAORO, H., MÜLLER-SANTOS, M., BAURA, V.A., TULESKI, T.R., RIGO, L.U., YATES, M.G., WASSEM, R., PEDROSA, F.O., MONTEIRO, R.A. Naringenin regulates expression of genes involved in the cell wall synthesis in *Herbaspirillum seropedicae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77(6), p.2180-2183, 2011.

TROPEL, D. E van der MEER, J.R. Bacterial Transcriptional Regulators for Degradation Pathways of Aromatic Compounds. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.68(3), p.474-500, 2004.

VAN DER PLOEG, J. R., IWANICKA-NOWICKA, R., KERTESZ, M. A., LEISINGER, T. AND HRYNIEWICZ, M. M. Involvement of CysB and Cbl regulatory proteins in expression of the *tauABCD* operon and other sulfate starvation-inducible genes in *Escherichia coli* **Journal of Bacteriology**, v.179, p.7671– 7678, 1997.

XU, H.X. AND LEE, S.F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. **Phytotherapy Research**, v.15, p.39-43, 2001.

WASSEM, R.; PEDROSA, F.O.; YATES, M.G.; REGO, F.G.; CHUBATSU, L.S.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M. Control of autogenous activation of *Herbaspirillum seropedicae nifA* promoter by the IHF protein. **FEMS Microbiology Letters**, v.212(02), p.177- 182, 2002.

WEBER, O.B.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in banana and pineapple plants. **Plant Soil**, v.210, p.103-113, 1999.

WILLIAMS CA, HARBORNE JB. IN: HARBORNE JB, editor. **The Flavonoids. Advances in research since 1986**. London7 Chapman E Hall; 1994. p.337- 85, 1986.

WINTER, J., MOORE, L.H., DOWELL JR, V.R. E BOKKENHEUSER, V.D. C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1203-1208, 1989.