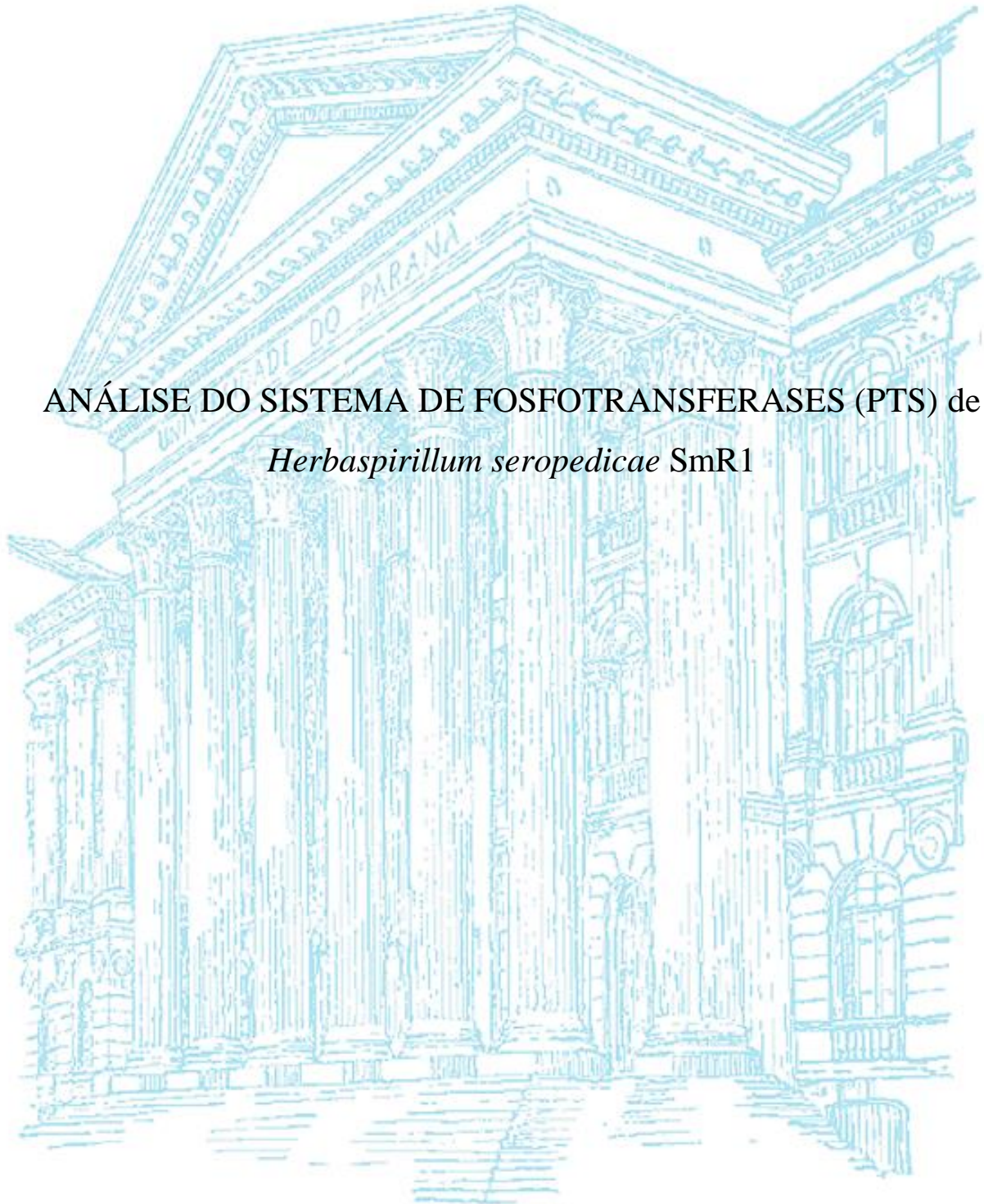


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCAS ZANON MONTEIRO

ANÁLISE DO SISTEMA DE FOSFOTRANSFERASES (PTS) de  
*Herbaspirillum seropedicae* SmR1



Curitiba

2014

LUCAS ZANON MONTEIRO

ANÁLISE DO SISTEMA DE FOSFOTRANSFERASES (PTS) de  
*Herbaspirillum seropedicae* SmR1

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências  
(Bioquímica), Departamento de  
Bioquímica e Biologia Molecular,  
Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná,  
para obtenção do título de Mestre  
em Bioquímica..

Orientador:  
Prof. Marcelo Müller dos Santos.

Co-orientador:  
Prof. Emanuel Maltempi de  
Souza.

Curitiba

2014

**TERMO DE APROVAÇÃO**

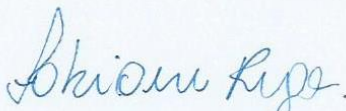
**LUCAS ZANON MONTEIRO**

**ANÁLISE DO SISTEMA DE FOSFOTRANSFERASES (PTS) de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1**

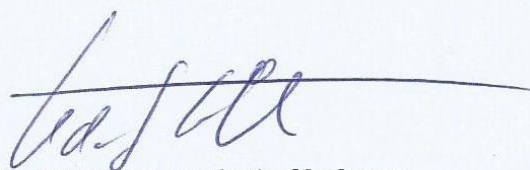
**Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica), no Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela banca examinadora formada pelos professores:**



**Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos (Orientador)**  
**Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**  
**UFPR**



**Prof.ª. Dr.ª. Fabiane Gomes de Moraes Rego**  
**Departamento de Análises Clínicas**  
**UFPR**



**Prof.ª. Dr.ª. Leda Satie Chubatsu**  
**Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**  
**UFPR**

**Curitiba, 31 de março de 2014.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos pela paciência e profissionalismo ao lidar com minhas limitações e também por seu exemplo de dedicação à vida científica, assim como por suas idéias e críticas

Aos demais professores do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, e do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR.

Às professoras que aceitaram compor a banca Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Leda Satie Chubatsu – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fabiane Gomes de Moraes Rego – Departamento de Análises Clínicas – UFPR.

Aos colegas da turma de mestrado e aos colegas de laboratório por toda ajuda, disposição e descontrações ao longo dessa jornada.

Aos técnicos Roseli Prado, Valter Baura e Alexsandro Albani que facilitaram muito o andamento do trabalho.

À toda minha família e amigos que me apoiaram e me aguentaram em todos os momentos ao longo desse período.

À coordenação de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular e a todas as Instituições Financiadoras, particularmente ao INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio pelo apoio financeiro e a CAPES pela bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS .....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	2
2.2 Visão geral sobre o Sistema de Fosfotransferases .....	3
2.3 Organização do Sistema PTS-Ntr em Bactérias .....	8
2.4 Funções dos Sistemas PTS em Bactérias .....	10
2.4.1 Repressão Catabólica.....	10
2.4.2 Outros Processos Controlados Direta ou Indiretamente Pelo Sistema PTS-Ntr.....	13
3. JUSTIFICATIVA .....	18
4. OBJETIVOS.....	19
5. MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
5.1 Microrganismos e Condições de Cultivo .....	19
5.2 Métodos de Manipulação Gênica .....	20
5.3 Eletroforese de DNA .....	20
5.4 Sequenciamento de DNA.....	20
5.5 Transformação bacteriana.....	21

5.5.1	Preparo de células <i>E. coli</i> quimiocompetentes .....	21
5.5.2	Transformação bacteriana por choque térmico .....	21
5.6	Purificação de DNA plasmidial .....	21
5.7	Transferência de plasmídeos por conjugação .....	21
5.8	Construção das Estirpes Mutantes dos Genes PTS de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	21
5.9	Procedimento para seleção dos mutantes .....	22
5.10	Superexpressão e Purificação das Proteínas PTS de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	23
5.11	Eletroforese de proteínas .....	24
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
6.1	Obtenção dos produtos de deleção gênica .....	25
6.2	Obtenção do mutante <i>AptsM</i> .....	29
6.3	Obtenção dos genes pts íntegros.....	36
6.4	Expressão de PtsM e PtsO .....	40
7.	CONCLUSÕES .....	52
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema Representativo dos Sistemas PTS Identificados em Bactérias .....	4
<b>Figura 2.</b> Alinhamento das sequencias de PtsI de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e PtsI de <i>Escherichia coli</i> . .....	6
<b>Figura 3.</b> Alinhamento das sequencias de NPr de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e NPr de <i>Escherichia coli</i> . .....	7
<b>Figura 4.</b> Alinhamento das sequencias de PtsN de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e PtsN de <i>Escherichia coli</i> . .....	7
<b>Figura 5.</b> Organização Genômica do Sistema PTS-Ntr em Diferentes Classes de Proteobactérias .....	8
<b>Figura 6.</b> Eletroforese em gel de agarose do produto de deleção do gene <i>ptsM</i> (Hsero_0088). .	28
<b>Figura 7.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de deleção dos genes <i>ptsO</i> (Hsero_0089) e <i>ptsI</i> (Hsero_0090).....	29
<b>Figura 8.</b> Demonstrativo do alinhamento e esquema dos sequenciamentos dos produtos de deleção dos genes <i>ptsM</i> (Hsero_0088), <i>ptsO</i> (Hsero_0089) e <i>ptsI</i> (Hsero_0090) obtidos através da ferramenta BLAST.	
<b>A.</b> $\Delta ptsM$ (Hsero_0088).....	30
<b>B.</b> $\Delta ptsO$ (Hsero_0089).....	31
<b>C.</b> $\Delta ptsI$ (Hsero_0090).....	32
<b>Figura 9.</b> Eletroforese em gel de agarose da reação de PCR para confirmar a inserção do plasmídeo no genoma de <i>H. seropedicae</i> . .....	33
<b>Figura 10.</b> Eletroforese da reação de PCR feita nas colônias provindas do simples recombinante ( <i>ptsM</i> / $\Delta ptsM$ ) após crescimento na ausência de antibióticos.....	34
<b>Figura 11.</b> Eletroforese das reações de PCR feitas das colônias provindas do simples recombinante ( <i>ptsM</i> / $\Delta ptsM$ ), com pressão seletiva em diferentes meios de cultivo.	
<b>A)</b> NFB-Malato com 20 mmol/L de cloreto de amônio. ....	35
<b>B)</b> NFB-Malato com 0,2% de casaminoácidos.....	36
<b>C)</b> NFB-Glucose com 20 mmol/L de cloreto de amônio. ....	37
<b>D)</b> NFB-Glucose com 0,2% de casaminoácidos.....	38

<b>Figura 12.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR correspondendo aos genes <i>pts</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1.....	40
<b>Figura 13.</b> Eletroforese em gel de agarose da dupla digestão dos clones pTZ18R:: <i>ptsO</i> e pTZ18R:: <i>ptsM</i> .....	41
<b>Figura 14.</b> Eletroforese em gel de agarose da digestão dos clones pTZ18R:: <i>ptsN</i> .....	42
<b>Figura 15.</b> Eletroforese em gel de agarose da digestão dos clones pTZ18R:: <i>hprK</i> .....	43
<b>Figura 16.</b> Eletroforese em gel de agarose da reação de PCR para confirmar a presença de <i>ptsM</i> e <i>ptsO</i> em <i>E. coli</i> BL21.....	44
<b>Figura 17.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão preliminar de PtsM. ....	45
<b>Figura 18.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão preliminar de PtsO. ....	46
<b>Figura 19.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão de PtsO com diferentes concentrações de KCl e pH 7,0.....	47
<b>Figura 20.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão de PtsO com diferentes concentrações de NaCl.....	48
<b>Figura 21.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão de PtsO nas condições de 1 a 4. ....	49
<b>Figura 22.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão de PtsO nas condições de 5 a 8. ....	50
<b>Figura 23.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida da superexpressão e purificação de PtsM.....	51
<b>Figura 24.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida da superexpressão de purificação de PtsO ....	52
<b>Figura 25.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida de PtsM purificada pós-diálise .....	53
<b>Figura 26.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida de PtsO purificada pós-diálise.....	54

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Genes do sistema PTS encontrados em *Herbaspirillum seropedicae* SmR1.....4

## LISTA DE ABREVIATURAS

µl – Microlitro

aa – aminoácido

AHAS - acetohidróxi ácido sintase

AMP – adenosina monofosfato

ATP - adenosina trifosfato

BME - β- mercaptoetanol

cAMP – adenosina monofosfato cíclico

CRP – Proteína receptora de AMPcíclico

Da - Dalton

D.O.600 – Absorbância em 600 nanômetros

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DTT – Ditioneitol

F1B - frutose-1-fosfato

g - Grama

kDa - Quilodalton

mg - Miligrama

ml - Mililitro

mmol/L – Milimol por litro

mM - Milimolar

ng – Nanograma

nt – Nucleotídeo

ORF – Janela de leitura aberta (“Open reading frame”)

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PEP – Fosfoenolpiruvato

PTS – Sistema de Fosfotransferases

PTS-Ntr – Sistema de Fosfotransferases homólogo ao PTS

pI - Ponto isoelétrico

rpm - Rotações por minuto

SDS - Dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio

## RESUMO

Sobre *Herbaspirillum seropedicae* já se sabe muito da regulação de seu metabolismo e fixação de nitrogênio, mas pouco se sabe sobre a integração dos metabolismos de carbono e nitrogênio. Vários níveis de regulação atuam na assimilação e no fluxo de carbono e nitrogênio em bactérias. Um dos sistemas que atua na regulação destes dois metabolismos em bactérias é o sistema de fosfotransferases denominado PTS. Analisando o genoma de *H. seropedicae*, foram localizados os seguintes genes desse sistema: *ptsI* - EINtr, *ptsO* - NPr, *ptsN* – EIIANtr, *ptsM* - EIIAMan e *hprK* – HPrK, este último que atua na regulação de PTS. Assim, neste trabalho, são apresentados os primeiros passos para a caracterização funcional de PTS nesta bactéria. A primeiro momento, EIIAMan parece ser de maior importância que a esperada para a bactéria, visto que apesar de diversas tentativas e utilizando diferentes condições, não foi possível a produção de uma estirpe defectiva para esta enzima. Apesar de duas de três proteínas do sistema terem sido purificadas, não foi possível a realização da interação *in vitro* entre elas pois o iniciador da transferência de fosfato não foi obtido.

## ABSTRACT

A lot is known about *Herbaspirillum seropedicae*'s metabolism regulation and nitrogen fixation, but there is almost no information about carbon and nitrogen metabolisms integration. Several regulation levels act in the assimilation and intake of both carbon and nitrogen in bacteria. One of the acting systems in these metabolism regulations in bacteria is the phosphotransferase system, called PTS. Analysing *H. seropedicae*'s genome, the following genes were found: *ptsI* - EINtr, *ptsO* - NPr, *ptsN* – EIIANtr, *ptsM* - EIIAMan and *hprK* – HPrK, the last acts regulating PTS. Therefore, are shown below the first steps towards the functional characterization of PTS in this bacterium. At first sight, EIIAMan seems to have greater importance than expected for *H. seropedicae*, because despite various attempts and using different conditions, the defective strain for this enzyme could not be generated. Even having two out of three enzymes in the system pure, *in vitro* interaction was not accomplished due to the lack of the phosphate transfer starter, which did not get expressed.

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria, da classe Beta-proteobacteria, aeróbica, prototrófica, endofítica, fixadora de nitrogênio e promotora do crescimento vegetal. Essas características a tornam um alvo potencial para aplicação como inoculante de gramíneas de interesse econômico, tais como, arroz, milho e trigo.

No caso de *H. seropedicae*, vários trabalhos descrevem boa parte dos sistemas que atuam na regulação do metabolismo nitrogenado e na fixação de nitrogênio. No entanto, pouco se sabe nesta, e em outras bactérias, de que forma os metabolismos de nitrogênio (N) e carbono (C) são integrados. Sabe-se que vários níveis de regulação (transcricional, pós-transcricional e pós-traducional) atuam na assimilação e no fluxo de C e N em bactérias. Um dos sistemas que atua na regulação destes dois metabolismos em bactérias é o sistema de fosfotransferases denominado PTS.

Existem dois sistemas PTS relatados em bactérias: (i) sistema PEP (fosfoenolpiruvato) : carboidrato PTS, que atua na regulação do transporte e fosforilação de alguns carboidratos e, (ii) sistema PTS do metabolismo de nitrogênio (PTS-Ntr), que não atua no transporte de carboidratos, porém exerce diversas funções regulatórias. Em ambos os sistemas, o grupo fosforil do PEP é transferido para enzima II (EIIA), através de duas proteínas fosfotransferases: enzima I (EI) e proteína histidina receptora de fosfato (HPr ou NPr). No sistema PEP : carboidrato PTS, EI transfere o grupo fosforil para HPr, que fosforila uma proteína associada a membrana EIIA que juntamente com as proteínas de transporte EIIB e EIIC atua no processo de assimilação de carboidratos. No sistema paralelo PTSNtr, a proteína EINtr fosforila NPr, que por sua vez fosforila EIIANtr, uma proteína homóloga a EIIA do sistema PEP : carboidrato PTS, e não existem análogos as proteínas EIIB e EIIC. Sendo assim, no sistema PTSNtr a proteína efetora EIIA-Ntr tem principalmente uma função regulatória que pode atuar nos metabolismos de C e N.

Através de análise comparativa do sequenciamento genômico de *H. seropedicae*, foram localizados genes do sistema de fosfotransferases (PTS), sendo três deles homólogos a genes PTS-Ntr de outras bactérias (*ptsI* - EINtr, *ptsO* - NPr, *ptsN* - EIIANtr). Também foi localizado o gene *ptsM* que expressa uma proteína EIIA putativa regulatória do transporte de manose e *hprK* o qual codifica uma enzima bifuncional quinase/fosfatase que atua na regulação da atividade de

NPr e/ou HPr. As proteínas EIIB e EIIC que normalmente são encontradas no sistema PTS PEP : carboidrato de enterobactérias não foram encontradas em *H. seropedicae* SmR1, o que indica que provavelmente o sistema PTS em nesta bactéria tenha um papel principalmente regulatório. A organização genômica desse sistema em *H. seropedicae* não é convencional em comparação a outras bactérias, o que torna esta bactéria um modelo de interesse para o estudo funcional desse sistema. Desta forma, este projeto propõe caracterizar funcionalmente o sistema PTS de *H. seropedicae*.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 *Herbaspirillum seropedicae***

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria da classe beta proteobacteria com as seguintes características: aeróbica, prototrófica, endofítica, fixadora de nitrogênio e promotora do crescimento de plantas (PEDROSA *et al.*, 2011). A ocorrência de *H. seropedicae* no interior de plantas de interesse comercial, tais como milho, cana-de-açúcar, arroz e sorgo, sem ocasionar doença, já foi relatada previamente por diversos estudos (PIMENTEL *et al.*, 1991; OLIVARES *et al.*, 1996; OLIVARES *et al.*, 1997; JAMES *et al.*, 1997; JAMES *et al.*, 2002). Esta bactéria tem baixa sobrevivência quando livre no solo, e a fixação de nitrogênio ocorre somente em condições limitantes de nitrogênio e oxigênio (BALDANI *et al.*, 1996). A expressão de genes *nif* (que expressam proteínas envolvidas na fixação de nitrogênio) já foi observada *in planta* sugerindo que esta bactéria pode fornecer nitrogênio fixado à planta colonizada justificando sua utilização como um biofertilizante (ELBELTAGY *et al.*, 2001; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003).

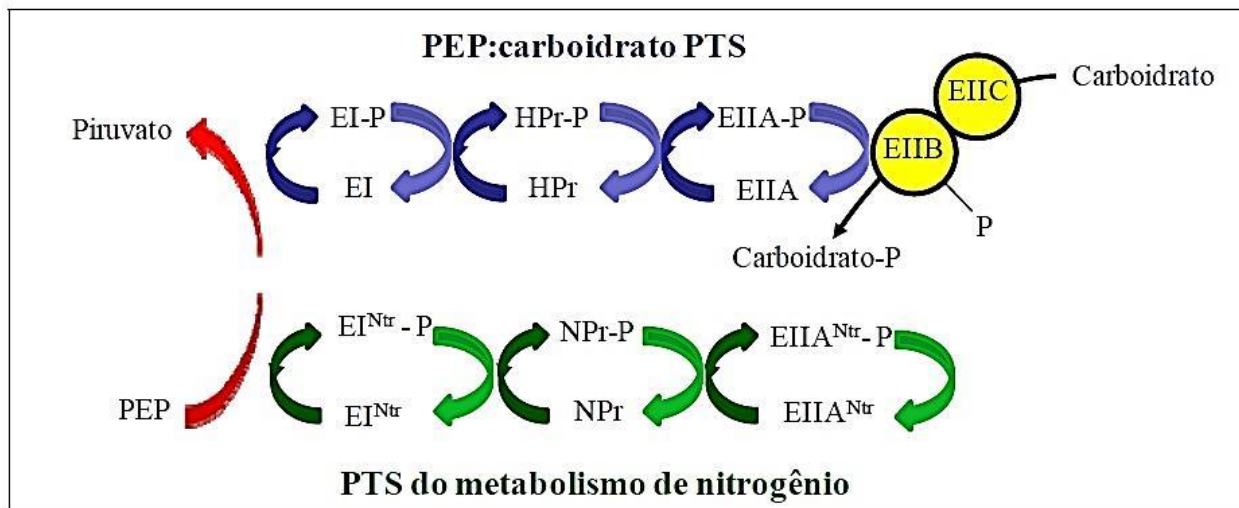
O metabolismo de nitrogênio, especificamente a fixação de nitrogênio e a sua regulação, tem sido estudado em detalhes nesta bactéria (revisado por PEDROSA *et al.*, 2001 e CHUBATSU *et al.*, 2011). Porém, pouco se sabe sobre o metabolismo de carbono e especialmente sobre a coordenação entre os metabolismos de C e N em *H. seropedicae*. Com as informações adquiridas no projeto de sequenciamento genômico de *H. seropedicae* (PEDROSA *et al.*, 2011), o estudo de sistemas que atuam na coordenação dos metabolismos de C e N surge como uma frente importante para se entender melhor processos celulares básicos (como crescimento, sobrevivência, produção de polihidroxicanoatos e exopolissacarídeos) e a interação desta bactéria com gramíneas. Por tais, o estudo do sistema de fosfotransferases PTS de *H. seropedicae* é proposto neste projeto.

## 2.2 Visão geral sobre o Sistema de Fosfotransferases

Desde a década de 60, o sistema PTS tem sido encontrado em várias bactérias (DEUTSCHER et al., 2006). O sistema mais conhecido é chamado PEP : carboidrato PTS, que consiste de três proteínas que transmitem em cascata um grupamento fosforil até proteínas de membrana que em conjunto executam o transporte e a fosforilação de carboidratos (POSTMA et al., 1993) (Figura 1). Um sistema de fosfotransferases homólogas também ocorre em diversas bactérias, porém com funções regulatórias e não de transporte e fosforilação de carboidratos. Os genes codificadores de duas fosfotransferases deste sistema (ptsO e ptsN) foram localizados pela primeira vez próximas ao do fator sigma 54 (rpoN). Como o fator sigma 54 normalmente está envolvido na transcrição de genes do metabolismo de nitrogênio, este sistema foi denominado PTS-Ntr (POWELL et al., 1995).

No entanto, vários trabalhos recentes têm mostrado que PTS-Ntr tem um amplo papel regulatório não somente no metabolismo de nitrogênio, mas também no metabolismo de carbono, na expressão de fatores de virulência e na homeostase de K<sup>+</sup> (PFLÜGER-GRAU & GÖRKE, 2010). Em *Herbaspirillum seropedicae*, até o momento não se conhece qual é o papel do sistema PTS na regulação de seus processos celulares.

**Figura 1 – Esquema Representativo dos Sistemas PTS Identificados em Bactérias.**



A seta em vermelho mostra a conversão de fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato. O grupo fosforil retirado do PEP pode ser transferido para dois sistemas independentes. Na parte superior, o fosforil é transferido para o sistema PEP : carboidrato PTS e, na parte inferior, para o sistema PTS-Ntr.

Ambos os sistemas possuem 3 fosfotransferases, que pela ordem de fosforilação são EI, HPr e EIIA (ou no sistema PTS-Ntr, EIANtr, NPr e EIIANtr). Na parte superior, EIIA-P interage com um complexo de membrana formado por EIIB e EIIC (em amarelo). EIIA-P transfere o grupo fosforil para um resíduo de cisteína em EIIB. EIIB-P transfere o fosforil para o açúcar que é translocado com o auxílio de EIIC. No sistema PTS-Ntr, a proteína EIIANtr-P não transfere o fosfato para EIIB já que esta proteína não está presente neste sistema. Portanto, PTS-Ntr é normalmente relacionado a funções regulatórias e não de transporte e fosforilação de carboidratos indicação '-P' indica o estado fosforilado. (adaptado de REIZER *et al.*, 1996).

No genoma de *H. seropedicae*, cinco genes potencialmente envolvidos com o sistema de fosfotransferase PTS foram localizados e reanotados, baseados em homologia de sequência, como dispostos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Genes do sistema PTS encontrados em *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

Identificação da ORF no genoma	Identificação do gene no projeto	Tamanho do gene (nt)	Tamanho da proteína (aa)	Domínios presentes <sup>a</sup>
Hsero_0088	<i>ptsM</i>	477	158	EIIA-Man
Hsero_0089	<i>ptsO</i>	270	89	Phosphocarrier protein PTS-HPr
Hsero_0090	<i>ptsI</i>	1788	595	PEP-utilising enzyme PEP_utilizer_N/C
Hsero_3911	<i>ptsN</i>	474	157	PTS_EIIA_2
Hsero_3912	<i>hprK</i>	939	312	Hpr_Serine_Kinase_N/C

a – domínios depositados no banco Pfam (Wellcome Trust Sanger Institute).

A reanotação dos genes *ptsI*, *ptsO* e *ptsN* (**a partir da anotação inicial de *pstP*, *pstH* e qual a outra?**) foi realizada após comparação com as sequências dos genes *pts* de *E. coli*. Os dados da comparação de sequências de PtsI de *H. seropedicae* (PtsI\_Hs) e *Escherichia coli* (PtsI\_Ec) estão dispostos na Figura 2. Como pode ser observado, a maioria dos resíduos conservados em PtsI de outros organismos também encontram-se conservados em PtsI\_Hs. Interessantemente, alguns resíduos conservados em PtsP de outros organismos também foram observados em PtsI\_Hs. A principal diferença entre as proteínas PtsI e PtsP é a presença de um domínio GAF na porção amino-terminal, inexistente em *H. seropedicae* mas homólogo ao encontrado em proteínas NifA.

Há dois tipos de proteínas carreadoras de grupo fosforil em sistema PTS: a proteína HPr, que atua no sistema PEP : carboidrato PTS e, a proteína NPr que atua nos sistema PTS-Ntr. A comparação entre a NPr de *E. coli* (NPr\_Ec) e a NPr de *H. seropedicae* (NPr\_Hs) mostrou que a maioria dos resíduos conservados em NPr de diferentes organismos estão presentes em NPr\_Hs. Na Figura 3, os resíduos destacados em verde em torno da histidina 15 provavelmente constituam a região de interação e de reconhecimento por PtsI (RABUS et al., 1996).

**Figura 2.** Alinhamento das sequencias de PtsI de *Herbaspirillum seropedicae* e PtsI de *Escherichia coli*.

PtsI_Hs	MASFSLHGIAVSQGIAGRAHLMAPAALDVKHYLIAADQVEAEIERLKSAVKAVHQELHT	60
PtsI_Ec	----MISGILASPGIAFGKALLLKEDEIVDRKKISADQVDQEVERFLSGRAKASAQLET	56
	: ** .* ***:** * : : : : *:*:*: *:*:* * . . :*.*	
PtsI_Hs	IRSELPREAPPELGAFIDVHSLILSDPMLAEVQDIIRHRYNAEWALVTQIEELSAQFD	120
PtsI_Ec	IKTKAGETFGEKEAIFEGHIMLLEDEELEQEIIALIKDKHMTADAAAHEVIEGQASALE	116
	*::: . * *::: * :*. * * : :*::: .*: * ** :: ::	
PtsI_Hs	EIEDPYLRERKADIQQVGERILKVLVTGSATHLPPSGEAAANIIIVAHDISPADMLQFRES	180
PtsI_Ec	ELDDEYLKERAADVDRDIGKRLLRNILG--LKIIDLSAIQDEVILVAADLTPSETAQLNLK	174
	*::* **:* **:::***:***: : * : : . :*:* **:*:: *:. .	
PtsI_Hs	TFAGFVTDLGPNNSHTAIVARSLAIPA AVGMHNASVLVKHDDVLIIDGDAGVVIVDPSPL	240
PtsI_Ec	KVLGFI TDAGGRSHTS IMARSL ELPA IIVGTGSVTSQVKNDYLLILDVNNQVYVNPTE	234
	.. **:* ** .***:*:*:* *:* * * . : : **:* **:* . . * *:*:	
PtsI_Hs	VLAQYRARQERLLRERKKLSRLKKTPAITQDGEPIITLLANIELPGDAVTAFEAGAMGIGL	300
PtsI_Ec	VIDKMRAVQEQVASEKAELAKLKDLPAILTDGHQVEVCANIGTVRDVEGAERNGAEGVGL	294
	*: : ** *::: * : *:::*. **** *. : : *** * . * . ** *:*:	
PtsI_Hs	FRSEFLFMGRAGHLEKFPSEDEQFEHYKQAVIAMKGRSVTIRTLVDVGADKPLD-EDEETA	359
PtsI_Ec	YRTEFLFMDR----DALPTEEEQFAAYKAVAEACGSQAVIVRTMDIGGDKELPYMNFPE	350
	*:*:*:*.* : :*:*:* ** .. * .::* :*:*:*.* * : .	
PtsI_Hs	LNPALGLRAIRYCLSE PQMFLTQLRAILRASAFGPIKLVPMMAHAFEIDQTLAMIDQAK	419
PtsI_Ec	ENPFLGWRAIRIAMDRREILRDQLRAILRASAFGKLRIMFPMIISVEEVRALRKEIEIYK	410
	** ** **** . : . : : : ***** : : : . * : * : *	
PtsI_Hs	QQLRERKQKFDEEIPVGAMIEIPAAALALPLFVKRLDFLSIGTNDLIQYTLAIDRDHEV	479
PtsI_Ec	QELRDEGKAFDESIEIGVMVETPAAATIARHLAKEVDFFSIGTNDLTQYTLAVDRGNMI	470
	*:*:. : **.* :*. * * * * : . : * : * : * : * : * : * : * : *	
PtsI_Hs	AHLYDPLHPAVLFLLSTVISQGRKAGIPVSVCGEMAGDLKWTRLLLGMLLEFSMHPSQI	539
PtsI_Ec	SHLYQPMSPSVLNLKQVIDASHAEGKWTGMCGELAGDERATLLLLGMLDEFMSAIS	530
	*:*:*: *:* *:. ** . : * . : * : * : * : * : * : * : * . *	
PtsI_Hs	LSVKNEILNSDLRLLPEQVKVLRATEPAAITAAMTQLQALQAEPVVTEAKVARRR	595
PtsI_Ec	PRIKIIIRNTN---FEDAKVLAEQALAQPTTDELMTLVNKFIEEKTIC-----	575
	*: * * : : * . : * . : * * : : * . :	

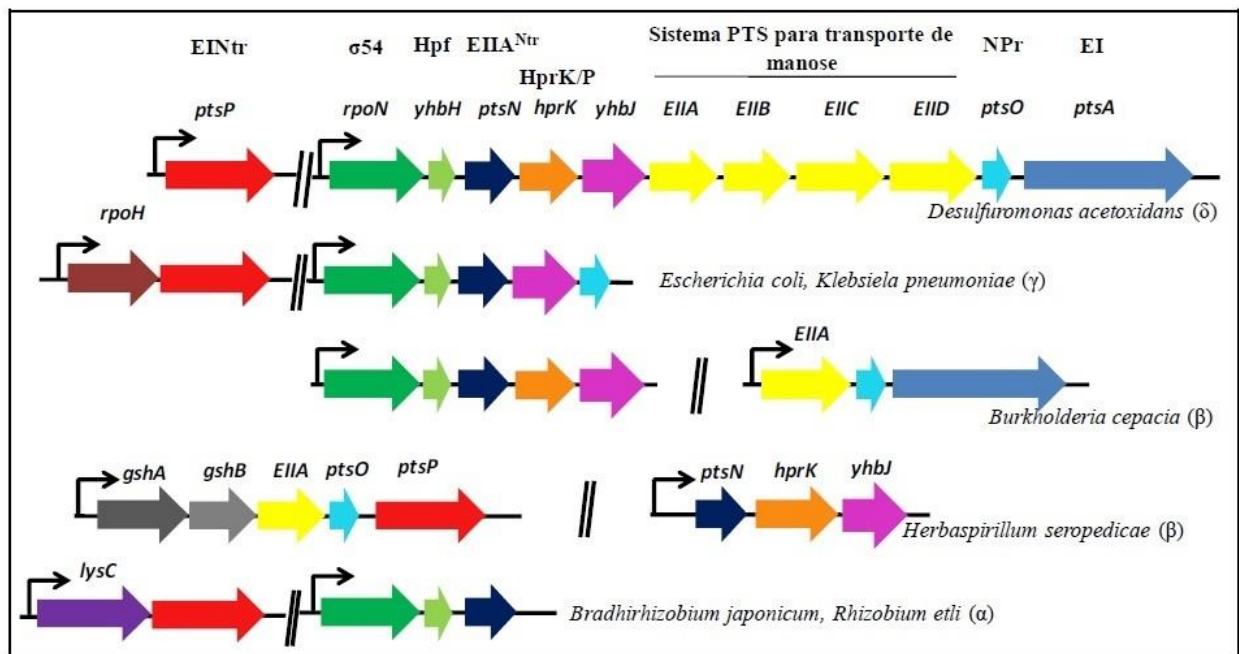
Os resíduos destacados em cinza são conservados em PtsI e PtsP de *E. coli*. Os resíduos destacados em vermelho são aqueles conservados apenas em PtsI de diversas bactérias. Os resíduos destacados em verde são os resíduos conservados apenas em PtsP de diversas bactérias. Abaixo dos alinhamentos “\*” indica aminoácidos iguais, “:” indica aminoácidos diferentes, porém com radicais de mesma classe e “.” indica aminoácidos diferentes com radicais de classes diferentes.



### 2.3 Organização do Sistema PTS-Ntr em Bactérias

A organização genômica do sistema PTS-Ntr difere entre as classes de bactérias (Figura 5). Os genes *ptsI* (EINtr), *ptsO* (NPr) e *ptsN* (EIIANtr) são normalmente encontrados. Uma exceção é o caso de algumas beta proteobactérias como *Burkholderia cepacia* que não apresentam o gene *ptsI*. Normalmente, os genes *ptsN* e *ptsO* são co-localizados com genes do operon do fator sigma 54 (*rpoN*, *yhbH* e *yhbJ*), sendo que no caso de *H. seropedicae* isto não é observado (Figura 5).

**Figura 5 – Organização Genômica do Sistema PTS-Ntr em Diferentes Classes de Proteobactérias**



A letra grega ao lado do nome de cada bactéria representa a classe.

*H. seropedicae* possui genes que codificam algumas das proteínas do sistema PTS. Os genes para a expressão das proteínas EINtr (*ptsI*), EIIA-Man (*ptsM*), NPr (*ptsO*), EIIANtr (*ptsN*) e HprK/P (*hprK*) foram encontrados no cromossomo de *H. seropedicae* (PEDROSA et al., 2011). *H. seropedicae* apresenta algumas peculiaridades na organização genômica de seu sistema PTS. O primeiro ponto a ser ressaltado é que o sistema está incompleto já que genes exclusivos do sistema PTS PEP : carboidrato, tais como EIIB e EIIC, não foram encontrados nem na anotação, nem por homologia de sequência; isto indica que possivelmente o sistema não regule o transporte

de açúcares e, portanto, tenha uma ação regulatória. Os genes *ptsM*, *ptsO* e *ptsI* estão a jusante dos genes *gshA* (glutamato-cisteína ligase - GshA) e *gshB* (glutathiona sintetase - GshB), no entanto, possivelmente *ptsM* não possui um promotor próprio, o que indica que *ptsM* e *ptsO* sejam co-transcritos com *gshA* e *gshB*. Já entre os genes *ptsO* e *ptsI* de *H. seropedicae*, há cerca de 300 pares de bases e sequências consenso putativas para reconhecimento do fator sigma70, o que indica que possivelmente *ptsI* tenha um promotor independente. As proteínas GshA e GshB atuam na biossíntese de glutathiona. Apesar desta organização genômica também ter sido verificada em outras bactérias da classe beta, tais como, *Herminiimonas arsenicoxydans*, *Minibacterium massiliensis*, *Cupriavidus metallidurans* e *Ralstonia pickettii*, a correlação entre genes PTS e a biossíntese de glutathiona ainda não foi investigada.

Os genes *ptsN*, *hprK* e *yhbJ* encontram-se reunidos e provavelmente formando uma única unidade transcricional. Esta organização já foi relatada anteriormente para betaproteobactérias, porém ainda não há evidências claras se a proteína regulatória YhbJ atua em conjunto com o sistema PTS-Ntr (BROEL *et al.*, 2003). YhbJ foi investigada em *E. coli* e sua atividade regula indiretamente a expressão de GlmS (glucosamina-6-fosfato sintase) através da regulação da atividade de um RNA curto denominado GlmZ (KALAMORZ *et al.*, 2007).

Em gamaproteobactérias, normalmente não é encontrado o gene *hprK* que expressa HprK/P, uma enzima bifuncional quinase:fosfatase. Este gene é normalmente encontrado em Firmicutes e em algumas alfavroteobactérias e betaproteobactérias. O papel de HprK/P tem sido bem explorado em Firmicutes, porém em Gram-negativas sua função ainda é pouco conhecida (PINEDO & GAGE, 2009). Trabalhos recentes em *Sinorhizobium meliloti* mostraram que a deleção de *hprK* leva ao surgimento de fenótipos envolvendo a síntese de exopolissacarídeos (EPS), assimilação de cobalto e modificação na repressão catabólica por succinato (PINEDO & GAGE, 2009).

A presença do gene *ptsN* indica que, apesar da organização genômica do sistema PTS em *H. seropedicae* não ser convencional (co-localizado com *rpoN*), provavelmente este sistema seja homólogo ao sistema PTS-Ntr relatado para outras bactérias. O fato de *H. seropedicae* ter os genes do sistema PTS-Ntr e *hprK* o torna um microrganismo modelo para se investigar possíveis interações entre HprK/P e proteínas PTS.

## 2.4 Funções dos Sistemas PTS em Bactérias

Tanto em bactérias gram-negativas como gram-positivas, o papel do sistema PTS tem sido mais bem estudado no processo de repressão catabólica mediada por carbono (CCR, carbon catabolite repression) (DEUTSCHER, 2006). Neste caso, os componentes do sistema PTS formam uma cascata de transmissão de fosforil proveniente de fosfoenolpiruvato. Por esse motivo, há uma correlação do estado de fosforilação das proteínas do sistema PTS com o estado metabólico da célula. Em enterobactérias, a proteína EIIAGlc (EIIA específica para transporte de glucose) tem um papel central na regulação do transporte e assimilação de glucose. Já em Firmicutes, a proteína HPr assume o mesmo papel, sendo que esta proteína pode ser fosforilada em um resíduo de histidina (His-15) pela proteína EI ou em um resíduo de serina (Ser-46) pela proteína quinase-fosfatase HprK, em uma reação dependente de ATP. Tanto EIIAGlc quanto HPr, dependendo do nível de fosforilação, podem interagir com seus alvos e desempenhar papéis regulatórios importantes na repressão catabólica mediada por carbono (DEUTSCHER et al., 2006).

### 2.4.1 Repressão Catabólica

Em enterobactérias, a proteína EIIAGlc não fosforilada é capaz de interagir e inibir a atividade de transportadores de açúcares ditos não-PTS, por exemplo maltose, lactose, melibiose e rafinose. Estes açúcares são chamados não-PTS, pois as proteínas EIIA, IIB e IIC não atuam no seu transporte. Nas bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, a proteína EIIAGlc interage com a lactose permease LacY, inibindo sua ação no transporte de lactose (SONDEJ et al., 1999). Como lactose e maltose podem atuar como indutores de genes do catabolismo de carboidratos, a inibição da entrada destes açúcares na célula é chamada de exclusão do indutor (REIZER et al., 1983; SAIER et al., 1983; DEAN et al., 1990; TITGEMEYER et al., 1994). O transportador MalK de *S. typhimurium*, que atua no transporte de maltose, também é inibido pela interação com EIIAGlc (BLÜSCHKE et al., 2006). Além de interagir com transportadores de carboidratos, EIIAGlc já foi relatada em interações com outros alvos, por exemplo, regulando alostericamente a atividade da enzima glicerol quinase pela inibição da reação de fosforilação de glicerol em *E. coli* (HURLEY et al., 1993). A forma fosforilada de EIIAGlc (P-EIIAGlc) interage com a adenilato ciclase (CyaA) ativando a produção de AMP cíclico (cAMP) a partir de

ATP (PETERKOFISKY et al., 1993; PARK et al., 2006). Já a sua forma defosforilada também é capaz de se ligar a CyaA, mas não a ativa (PARK et al., 2006). A ativação de CyaA leva ao aumento dos níveis intracelulares de cAMP, que por sua vez, ativa a proteína CRP (cAMP Receptor Protein), também denominada CAP (catabolite activator protein), participante como um ativador transcricional de vários genes envolvidos no catabolismo (NINFA, 2007). Portanto, através do mecanismo de ativação da adenilato ciclase e da atuação do complexo CRP-cAMP, o sistema PTS pode controlar globalmente o nível de repressão catabólica (DEUTSCHER, 2008). Este mecanismo é utilizado para se explicar um efeito denominado diauxia, observado durante o cultivo de algumas bactérias na presença de duas fontes de carbono, como por exemplo, glucose e lactose. A diauxia ocorre porque normalmente as bactérias apresentam preferência catabólica por um dos dois componentes da mistura. Quando *E. coli* é cultivada na presença de glucose, EIIAGlc é fosforilada pelo sistema PTS e entrega seu grupo fosforil para EIIB e EIIC que fosforilam as moléculas de glucose que são transportadas para dentro da célula (Figura 1, parte superior). Portanto, quando há um alto fluxo de glucose entrando na célula, a maior parte de EIIAGlc está na sua forma defosforilada (NINFA, 2007). A EIIAGlc na sua forma defosforilada inibe os transportadores de açúcares, tais como lactose e maltose (exclusão do indutor). Quando a glucose do meio é exaurida, a transferência de grupo fosforil de EIIAGlc para glucose é reduzida, aumentando a concentração de P-EIIAGlc que passa a regular positivamente a atividade da adenilato ciclase.

Em Firmicutes, a proteína HPr tem o papel central na regulação da repressão catabólica (DEUTSCHER, 2008). Porém, HPr pode ser fosforilada de duas maneiras: (i) pela EI do sistema PTS e (ii) pela enzima bifuncional quinase-fosfatase HPrK/P. A HPr, quando fosforilada por EI, tem o grupo fosforil ligado ao resíduo de histidina 25 (His-25), enquanto a HPr fosforilada por HPrK/P apresenta o grupo fosforil ligado ao resíduo de serina 46 (Ser-46). Durante a assimilação de fontes preferenciais de carbono, as concentrações de alguns metabólitos são aumentadas, tais como, frutose-1,6-bifosfato (FBP), ATP e PPi. Estes metabólitos estimulam a atividade quinase da HPrK/P, levando a formação de P-Ser-HPr que regula negativamente a atividade de transportadores do tipo ABC de açúcares não-PTS (DOSSONNET et al., 2000; MONEDERO et al., 2001). A fosforilação de HPr na Ser-46 parece ser um fator importante para o mecanismo de repressão catabólica em Firmicutes, já que estudos com mutante HPr Ala-46 de *Lactobacillus casei* mostraram que glucose perde seu efeito repressivo (MONEDERO et al., 2007). Além da exclusão de indutores mediada por P-Ser46-HPr, o sistema PTS também pode controlar a

repressão catabólica a nível transcricional em Firmicutes. O principal regulador transcricional que atua na repressão catabólica em Firmicutes é a proteína CcpA (*Catabolite control protein A*) (HENKIN et al., 1991; CHAUAUX, 1996; WARNER & LOLKEMA, 2003) que liga-se ao DNA através do reconhecimento de sítios denominados cre (*catabolic response elements*). Entretanto, para se ligar fortemente a estes sítios CcpA necessita da interação com P-Ser-HPr e intermediários da via glicolítica, como a frutose-1,6-bisfosfato e glucose-6-fosfato (DEUTSCHER et al., 2006). Detalhes estruturais desta interação foram obtidos com a resolução do complexo CcpA/P-Ser-HPr/cre na presença de frutose-1,6-bisfosfato (FBP) e glucose-6-fosfato (G6P) (SCHUMACHER et al., 2007). A interação com os efetores de baixa massa, FBP e G6P, fortalece a relação entre P-Ser-HPr e CcpA ajustando finamente a sinergia do complexo com os sítios cre (SCHUMACHER et al., 2007).

Outro ponto de regulação importante na repressão catabólica de Firmicutes é a atividade da enzima HPrK/P. Além de fazer parte do sistema PTS em Firmicutes, esta enzima também ocorre em algumas bactérias Gram-negativas (BOËL et al., 2003). Quando HPrK fosforila HPr em um resíduo de serina, indiretamente o nível de fosforilação de EIIA é reduzido, já que P-Ser-HPr inibe a atividade de EI, diminuindo a fosforilação de HPr no resíduo de histidina. EIIA é fosforilada somente a partir de P-His-HPr. A presença de HprK em *H. seropedicae* traz pontos importantes que podem ser investigados. Em *H. seropedicae*, não foi identificado um regulador com alta homologia a CcpA, porém alguns reguladores do tipo LacI foram identificados. Até o momento, pouco se sabe sobre a atuação de P-Ser-HPr em reguladores transcricionais em proteobactérias (BOËL et al., 2003).

Recentemente, um estudo realizado com mutantes defectivos no gene *hprK* em *Sinorhizobium meliloti* mostrou claramente o envolvimento de HprK na repressão catabólica mediada por succinato (PINEDO & GAGE, 2009). No caso de *S. meliloti*, somente após a exaustão do succinato do meio, a bactéria inicia o catabolismo de carboidratos, como lactose, maltose e rafinose. Os mutantes que não continham o gene *hprK* ou que continham variantes de HPr não fosforiláveis (substituição de serina por alanina no sítio de fosforilação) aumentaram a repressão catabólica mediada por succinato (PINEDO & GAGE, 2009). Experimentos adicionais mostraram que os mutantes defectivos em *hprK* produziram mais exopolissacarídeos, porém formaram nódulos que não fixavam nitrogênio (PINEDO & GAGE, 2009).

O estudo da regulação da repressão catabólica em outras proteobactérias tem apontado para outros mecanismos do que os utilizados por Enterobactéria e Firmicutes (Deutscher, 2008). No

caso do gênero *Pseudomonas*, algumas espécies possuem um regulador homólogo a CRP e um sistema PTS que regula o transporte de glicose como em *P. aeruginosa*, sendo que outras espécies (p. ex.: *P. putida*) possuem como único regulador a proteína Crc (*catabolite repression control*). A repressão mediada pelo regulador Crc é disparada quando *P. putida* é cultivada em succinato como fonte de carbono ou com aminoácidos. A sua repressão afeta a expressão de vários genes de enzimas catabólicas (Morales *et al.*, 2004). Além disso, também foi relatada a repressão de genes envolvidos com a degradação de alcanos e compostos benzóicos por Crc em *P. putida* (Yuste e Rojo, 2001; Moreno e Rojo, 2008). Um mecanismo mais complexo que envolve a proteína PtsN foi proposto para a repressão de genes de degradação de tolueno e xileno, do plasmídeo TOL de *P. putida* (Aranda-Olmedo, Ramos e Marques, 2005; Aranda-Olmedo *et al.*, 2006). Assim como em Enterobactérias, em Pseudomonades o gene *ptsN* é colocalizado com *rpoN* (fator sigma 54 ou sigma N). Portanto, PtsN poderia ter uma função na coordenação dos metabolismos de C e N. Uma evidência disto é que PtsN parece estar envolvida com a regulação da biossíntese de polihidroxibutirato em *P. putida* e seu estado de fosforilação varia de acordo com as condições de cultivo utilizadas (Velázquez *et al.*, 2007; Pflüger e de Lorenzo, 2007). Recentemente, a estrutura e o mecanismo pelo qual age o regulador Cra de *P. aeruginosa* foram resolvidos. O regulador Cra (*catabolite activator/repressor*), também denominado FruR, funciona como um sensor e um regulador transcricional de vários genes envolvidos no metabolismo central de bactérias Gram-negativas (Chavarria *et al.*, 2011). Os estudos com efetores mostraram que Cra liga com maior afinidade frutose-1-fosfato (F1B) e que o complexo Cra-F1B aumenta a afinidade de Cra pelo seu sítio na molécula de DNA. F1B poderia ser o metabólito gerado pela fosforilação de frutose pela proteína EIIFru que faz parte do sistema PTS em *P. putida*.

#### **2.4.2 Outros Processos Controlados Direta ou Indiretamente Pelo Sistema PTS-Ntr**

Na seção acima, foi resumido o que se sabe até o momento do envolvimento do sistema PTS na repressão catabólica mediada pela disponibilidade de carbono. No entanto, a descoberta do sistema paralelo chamado PTS-Ntr mostrou que vários outros processos celulares podem ser regulados direta ou indiretamente por este sistema.

Inicialmente, PTS-Ntr foi considerado como sendo um componente atuante na regulação do metabolismo de nitrogênio, devido a sua localização genômica ser próxima a *rpoN* (POWELL *et*

al., 1995). O mutante do gene *ptsN* (que codifica para EIIANtr) de *Klebsiella pneumoniae* mostrou que a mutação implica em níveis elevados de fixação de nitrogênio (MERRICK & COPPARD, 1989). Os altos níveis de fixação de nitrogênio da estirpe mutada em *ptsN* puderam ser comprovados através do aumento da expressão de genes com promotores dependentes de *rpoN*, tais como *nifL*, *nifH* e *glnA* (glutamina sintetase) (MERRICK & COPPARD, 1989). Entretanto, mutantes do gene *ptsO* (que codifica a proteína NPr) foram incapazes de fosforilar EIIANtr e mostraram uma redução na expressão dos genes *nif* e *glnA*, indicando que somente a forma fosforilada de EIIANtr é capaz de ativar a expressão e que provavelmente a sua forma não-fosforilada atue como um repressor da expressão de genes dependentes de *rpoN*.

Já em *E. coli*, o papel de PTS-Ntr parece ser pleiotrópico, tendo em vista os vários fenótipos que foram descritos para mutantes deste sistema. O mutante defeutivo em *ptsN* apresentou alterações na assimilação de nitrogênio. O mutante *ptsN* de *E. coli* cresce em várias fontes orgânicas de nitrogênio (p. ex.: aminoácidos e nucleotídeos), porém o crescimento foi inibido quando intermediários do ciclo do ácido cítrico ou açúcares foram adicionados como fonte de carbono (POWELL et al., 1995). POWELL e colaboradores, em 1995, concluíram que de alguma forma, a atividade de EIIANtr é importante para a assimilação de nitrogênio combinada a uma fonte externa de carbono. Além da atuação na assimilação de compostos nitrogenados, o sistema PTS-Ntr está envolvido na biossíntese de aminoácidos com cadeias alifáticas (leucina, isoleucina e valina) (LEE et al., 2005). No mutante *ptsN* de *E. coli*, a atividade da enzima acetohidróxi ácido sintase (AHAS), que catalisa a primeira etapa da biossíntese de aminoácidos alifáticos, é diminuída, já que a expressão dos dois genes constituintes de AHAS, *ilvB* (subunidade grande) e *ilvN* (subunidade pequena) foi reduzida (LEE et al., 2007). A redução na expressão dos genes constituintes de AHAS foi explicada por um efeito indireto ocasionado pelo aumento na concentração intracelular de  $K^+$  observada no mutante *ptsN* (LEE et al., 2007).

Exemplos de atuação direta do sistema PTS-Ntr no metabolismo de nitrogênio já foram relatadas. No caso de *Bradyrhizobium japonicum*, a interrupção do gene *ptsI* (EINtr) ou do gene a jusante *lysC* eliminaram o transporte de peptídeos nessa bactéria (KING & O'BRIAN, 2001). *LysC*, que é uma aspartoquinase que catalisa a formação do primeiro intermediário comum na biossíntese de lisina, treonina e metionina, se liga a EINtr e inibe sua autofosforilação (KING & O'BRIAN, 2001). Quando EINtr se mantém não-fosforilada, há um sinal que ativa o transporte de peptídeos. No entanto, o ponto exato em que EINtr opera, ou se o complexo LysC-EINtr executa a ativação do transporte de peptídeos, é incerto.

O envolvimento de PTS-Ntr no metabolismo de carbono também já foi relatado em algumas bactérias. Em *Azotobacter vinelandii* e *P. putida*, mutantes do sistema PTS-Ntr têm alterações na produção de polihidroxialcanoatos (PHA), um importante polímero que serve à bactéria como estoque de carbono e de equivalentes redutores (ANDERSON & DAWES, 1990; SEGURA & ESPÍN, 1998; NOGUEZ et al., 2008; VELÁZQUEZ et al., 2007). Em ambas as bactérias, a falta de EI e NPr diminuíram a produção de PHA, sendo que a falta de EIINtr levou a um aumento da produção (SEGURA & ESPÍN, 1998; NOGUEZ et al., 2008; VELÁZQUEZ et al., 2007). Em *A. vinelandii*, foi mostrado que EIINtr possui papel regulatório e que sua forma não-fosforilada reprime a expressão de *phbR* que codifica para um ativador transcricional que atua na expressão de *phbBAC*, genes que codificam enzimas essenciais para a produção do polímero (NOGUEZ et al., 2008). Em *P. putida*, os detalhes do envolvimento de PTS-Ntr na biossíntese de PHA ainda não foram explorados.

Recentemente, novos modelos para atuação de PTS-Ntr no metabolismo de carbono foi proposto (DOZOT et al., 2010; PFLÜGER-GRAU et al., 2011). Ensaio de interação *in vitro* mostraram que PtsM (homóloga de EIIA-Man, que regula o transporte de manose) de *Brucella melitensis* interage com o componente EI da enzima 2-oxoglutarato desidrogenase (DOZOT et al., 2010). Com essa nova interação, os autores propõem que provavelmente PTS-Ntr integra o metabolismo de C e N nesta bactéria, via sinalização por 2-oxoglutarato, cujos níveis são interpretados por EINtr pelo domínio GAF na porção N-terminal, que interage com 2-oxoglutarato. No caso de proteínas do tipo PtsI esta extensão amino-terminal não ocorre (RABUS et al. 1996). De uma maneira ainda não esclarecida, a interação com 2-oxoglutarato regula a atividade de PTS-Ntr que por sua vez regula a atividade de 2-oxoglutarato desidrogenase, uma enzima componente do ciclo do ácido cítrico (DOZOT et al., 2010). Recentemente, foi mostrado que PtsI de *E. coli* é modulada negativamente pela interação com alfa-cetoglutarato (DOUCETTE et al., 2011). Em *P. putida*, a forma não-fosforilada de PtsN interage com o componente EI da enzima piruvato desidrogenase e diminui sua atividade (VELÁZQUEZ et al., 2007). Esta enzima é considerada chave para manter o fluxo de C proveniente do catabolismo de carboidratos acoplado ao ciclo do ácido cítrico.

Talvez um dos processos mais bem descritos envolvendo PTS-Ntr, seja a regulação da homeostase de  $K^+$  em *E. coli*. Quando a concentração extracelular de  $K^+$  é alta, o sistema de captação de  $K^+$  operante é o sistema de baixa afinidade constituído pelas proteínas translocase TrkG (ou TrkH) e pela proteína periférica TrkA. EIINtr não-fosforilada interage diretamente

com TrkA e diminui sua atividade (LEE et al., 2007). O mutante *ptsN* de *E. coli* mostrou maior captação de  $K^+$ , no entanto o mutante *ptsO* diminuiu a captação, indicando que somente a forma não-fosforilada apresentou atividade regulatória. Como já mencionado nesta revisão, outro fenótipo observado para o mutante *ptsN* de *E. coli* foi a menor atividade acetohidróxi ácido sintase (AHAS) medida, que pôde ser parcialmente explicada, já que o aumento na concentração de  $K^+$  diminui a expressão dos genes *ilvB* e *ilvN* (LEE et al., 2007). A diminuição na expressão dos genes *ilvB* e *ilvN* leva a uma redução no crescimento da bactéria com leucina ou peptídeos que contém leucina. Esta inibição no crescimento ocorre pela inibição de enzimas da via de biossíntese de aminoácidos alifáticos pela própria leucina. Recentemente, estudos por abordagem transcriptômica mostraram que no mutante *ptsN* de *E. coli* a ampla maioria dos genes com a transcrição reprimida são dependentes do fator sigma 70, enquanto os genes que tem transcrição aumentada são dependentes do fator sigma S, normalmente relacionado com resposta antiestresse (LEE et al., 2010; VENTURI, 2003). Estudos de transcrição *in vitro* com uma competição entre sigma 70 e sigma S apontaram que a alta concentração de  $K^+$  no mutante *ptsN* faz com que a RNA polimerase ligue-se preferencialmente ao fator sigma S. Com menor formação de complexos RNA polimerase com sigma 70, a transcrição de genes sigma 70 dependentes é diminuída, como é o caso dos genes *ilvB* e *ilvN*, o que causa a sensibilidade a leucina (LEE et al., 2010). Quando a concentração de  $K^+$  torna-se limitante, somente a atividade do sistema Trk é incapaz de manter a captação de potássio. Em condições limitantes, o sistema de captação de  $K^+$  de alta afinidade constituído por uma ATPase do tipo-P (KdpFABC) é expresso (HAUPT et al., 2005). A expressão dos genes do operon *kdpFABC* é induzida por baixas concentrações de  $K^+$  via um sistema de dois-componentes formado pela proteína histidina quinase KdpD que se autofosforila e transfere o grupo fosforil para KdpE, que atua como ativador transcricional dos genes *kdpFABC* (JUNG et al., 1997). A forma não-fosforilada de EIIANtr atua como ativadora de KdpD, aumentando sua taxa de autofosforilação e de fosforilação de KdpE, o que resulta em maior nível de expressão do operon *kdpFABC*. Esta é uma nova função atribuída ao sistema PTS-Ntr, que neste caso atua como um conector entre sistemas de dois-componentes e seus genes regulados, ajustando a atividade de um dos componentes. Com a atividade moduladora nos dois sistemas de captação de  $K^+$  (TrkGA de baixa afinidade e KdpFABC de alta afinidade), PTS-Ntr parece atuar como um dispositivo lógico que inibe a atividade do sistema de baixa afinidade e ativa a expressão do sistema de alta afinidade em condições limitantes de  $K^+$ , o que resulta em melhor adaptabilidade para a bactéria.

PTS-Ntr também tem atraído atenção quanto ao seu papel inesperado na regulação da expressão de fatores de virulência de certas bactérias (PFLÜGER-GRAU e GÖRKE, 2010). Em *Legionella pneumophila*, a proteína EINtr foi identificada como um fator de virulência (EDELSTEIN et al., 1999). Mutações no gene *ptsI* (que codifica EINtr) reduziram a capacidade de multiplicação de *L. pneumophila* no pulmão de cobaias (HIGA e EDELSTEIN, 2001). Em *Pseudomonas aeruginosa*, um importante patógeno oportunista, mutação no gene *ptsI* levou a redução de patogenicidade em *Arabidopsis thaliana*, camundongos e, reduziram a taxa de morte de *Caenorhabditis elegans* em ensaios *in vitro* (TAN et al., 1999a; TAN et al., 1999b). O mecanismo pelo qual mutantes *ptsI* causam menor mortalidade no ensaio com *C. elegans* pode ser explicado pela menor produção de fenazinas, tal como a piocianina (MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999). A piocianina produzida por *P. aeruginosa* causa a morte de *C. elegans* e, EINtr regula a produção de piocianina nesta bactéria (MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999; XU et al., 2005). A produção de piocianina é dependente dos sistemas de dois-componentes que atuam no quorum sensing em *P. aeruginosa*, LasR–LasI e RhlR–RhlI (WHITELEY, LEE, GREENBERG, 1999; PESCI et al., 1997). A expressão dos genes *lasR-lasI* e *rhlR-rhlI* é reprimida pelo repressor QscR (CHUGANI et al., 2001; LEDGHAM et al., 2003). A presença de EINtr parece regular negativamente a expressão de *qscR* levando a um aumento da expressão de *lasR-lasI* e *rhlR-rhlI*, portanto ao aumento da biossíntese de piocianina (XU et al., 2005). Além de atuar modulando a virulência de *P. aeruginosa*, EINtr também se mostrou importante para a resistência desta bactéria frente a uma proteína surfactante produzida no pulmão, a colectina SP-A (ZHANG et al., 2005).

Provavelmente, a perda de EINtr acarreta no enfraquecimento da membrana celular de *P. aeruginosa* o que ocasiona a penetração da colectina SP-A e a morte da bactéria (ZHANG et al., 2005).

### 3. JUSTIFICATIVA

A utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio e promotoras de crescimento vegetal associadas a culturas de interesse econômico surge como uma alternativa viável ao uso de fertilizantes químicos. Vantagens desta substituição podem ser estimadas tanto a nível econômico quanto ambiental. Baseado nisto, vários grupos ao redor do mundo tem unido esforços para caracterizar em detalhes os processos de regulação da fixação de nitrogênio, bem como a interação planta-bactéria e o benefício que esta pode trazer para o aumento de produtividade vegetal. Os sequenciamentos genômicos de várias bactérias diazotróficas capazes de se associarem com plantas, como por exemplo, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasilense*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus sp.*, *Azotobacter vinelandii* e *Sinorhizobium meliloti* entre outras, fornecem informações importantes para se avançar na caracterização fisiológica e bioquímica destes microrganismos. Especificamente neste projeto, objetivou-se caracterizar um sistema de fosfotransferases (PTS-Ntr) que ocorre em diversas bactérias, mas que sua função ainda não é totalmente conhecida. Em bactérias diazotróficas e endofíticas, pouco se sabe sobre a contribuição de PTS-Ntr para a fixação de nitrogênio e interação planta-bactéria. Além disso, o envolvimento de PTS-Ntr na integração dos metabolismos de C e N como já descrito para outras bactérias, como *E. coli*, ainda necessita ser comprovado para outras espécies como em *H. seropedicae*. A descoberta de fenótipos inesperados para mutantes defectivos no sistema PTSNtr tem mostrado que este sistema de fosforilação pode atuar na regulação de vários processos celulares, o que representa grande potencial para novas descobertas na área de bioquímica e fisiologia de microrganismos.

## 4. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi analisar o sistema de fosfotransferases (PTS e PTS-Ntr) de *Herbaspirillum seropedicae*, inicialmente, a partir da construção das estirpes mutantes dos genes PTS (*ptsI*, *ptsO*, *ptsM*, *ptsN* e *hprK*) e determinação de seus fenótipos, assim como a interação e atividade fosforilase *in vitro* das proteínas PTS purificadas.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Microrganismos e Condições de Cultivo

Durante todo o projeto foi utilizada a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1. A bactéria foi normalmente cultivada em meio NFb - Malato contendo por litro os seguintes componentes: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g; NaCl 0,1 g; malato de sódio 5,0 g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 20 mg; ácido nitrilo-triacético 56 mg; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 20 mg; biotina 0,1 mg, solução de microelementos 10 mL e água destilada para 1 L (modificado de PEDROSA & YATES, 1984). A solução de microelementos contém por litro os seguintes componentes: Na<sub>2</sub>Mo<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 1 g; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1,175 g; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1,4 g; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,04 g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,12 g e água destilada para 1 L. O pH do meio foi ajustado para 6,5 e o mesmo foi autoclavado por 20 minutos, 120°C a 1 atm. No momento do uso foi misturada a fonte de nitrogênio a ser utilizada, 20 mL de cloreto de amônio (solução estoque a 1 M) e 50 mL de uma mistura de fosfatos (159,4g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 17,8g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) para 1 L de meio. Para o preparo dos meios sólidos foi adicionado agar bacteriológico para concentração final de 1,5 % (m/v). Os cultivos líquidos foram realizados em frascos Erlenmeyer sob agitação em incubadores orbitais a 30°C e 120 rpm, enquanto os cultivos em placas de ágar foram incubados em estufa microbiológica a 30°C.

Para clonagens foi utilizada *Escherichia coli* estirpe Top10 (Invitrogen, EUA). A bactéria foi cultivada em meio LB contendo 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl por litro de água destilada a pH 7. Os cultivos foram incubados em incubadores orbitais a 160 rpm e 37°C. Para cultivos em placas de ágar foram utilizadas placas de LB ágar com mesma composição do meio LB porém com 1,5% (m/v) de ágar bacteriológico. Os cultivos em placa foram incubados em estufa microbiológica a 37°C. Para expressão de proteínas foi utilizada a

estirpe de *E. coli* BL21(DE3). Para conjugação de plasmídeos entre *E. coli* e *H. seropedicae* foi utilizada a estirpe de *E. coli* S17-1 (SIMON et al., 1983). Quando necessário foram utilizados antibióticos nas seguintes concentrações em µg/mL: ampicilina (150), canamicina (100 para *E. coli* e 500 para *H. seropedicae*), cloranfenicol (30 para *E. coli* e 100 para *H. seropedicae*), estreptomicina (80), ácido nalidíxico (5) e tetraciclina (10).

## 5.2 Métodos de Manipulação Gênica

As reações de PCR com *Taq* DNA polimerase para amplificação dos genes de interesse, eletroforese de DNA em gel de agarose, isolamento de fragmentos de DNA em gel de agarose, digestão com enzimas de restrição, ligação de fragmentos de DNA com T4 DNA ligase, transformação em *E. coli*, conjugação bacteriana, purificação de DNA cromossomal ou plasmidial, foram realizados conforme metodologias previamente descritas (SAMBROOK et al., 1989; BANKIER et al., 1987; KIMMEL e BERGER, 1987) ou indicação do fabricante dos reagentes utilizados (Fermentas<sup>®</sup>, Invitrogen<sup>®</sup>, New England Biolabs<sup>®</sup>, Promega<sup>®</sup>).

## 5.3 Eletroforese de DNA

A eletroforese de DNA foi feita em gel de agarose horizontal como descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989), na concentração de 0,8%. O tampão utilizado foi TBE 1X (Tris-ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 2 mmol/L, pH 8,3). O DNA foi visualizado após tratamento com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) sob luz ultravioleta (312 nm) em transiluminador EC3 System (UVP BioImaging Systems, EUA).

## 5.4 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento foi baseado na metodologia desenvolvida por Sanger e colaboradores (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977) empregando a incorporação de dideoxynucleotídeos marcados com fluoróforos. Foram utilizados aproximadamente 0,5 µg do DNA plasmidial purificado, 2 pmols do oligonucleotídeo iniciador apropriado e 3,0 µL de mistura para sequenciamento “Sequencing Reagent Premix” (BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit, Invitrogen Life Science Technologies). O volume final da reação foi de 10 µL. As reações foram

realizadas em termociclador e os parâmetros foram: 1 ciclo de 1 minuto a 95°C e 30 ciclos de 20 segundos a 94°C e 1,5 minutos a 60°C. O produto do sequenciamento foi precipitado com etanol 100% centrifugado, lavado e precipitado com etanol 70%. Foi então, dissolvido em 4 µL de “Formamide Loading Dye” (Applied Biosystems), desnaturado por 2 minutos a 96°C e submetido à eletroforese em um sequenciador automático de DNA da ABI 3500 (Applied Biosystems).

## **5.5 Transformação bacteriana**

### **5.5.1 Preparo de células *E. coli* quimiocompetentes**

Cinquenta microlitros de uma cultura saturada de *E. coli* foram inoculadas em 5 mL de meio LB. A cultura foi crescida até uma D.O.<sub>600</sub> de  $\cong 0,2-0,5$ . Foram aliqotados em microtubos e centrifugados (2.500 x g por 10 minutos, 4°C). O sobrenadante foi removido e a massa celular depositada no fundo ressuspensa em 100 µL de solução TSS por mL de cultura (LB contendo 10% (m/v) polietileno glicol, 5% (v/v) dimetil sulfóxido e 50 mM MgCl<sub>2</sub> em pH 6,5) em banho de gelo.

### **5.5.2 Transformação bacteriana por choque térmico**

As células ressuspensas em TSS foram mantidas em gelo e foi adicionado 10 µL de DNA, quando reações de ligação, ou 1 µL de DNA, quando plasmídeo integral. As células e o DNA ficaram em gelo por aproximadamente 30 minutos. Passado o tempo, foram incubados por 45 segundos a 42°C e colocados imediatamente em gelo por 2 minutos. Após o choque térmico as células foram recuperadas em 1 mL de LB por aproximadamente 1 hora a 37°C e plaqueadas nos meios contendo os antibióticos adequados.

## **5.6 Purificação de DNA plasmidial**

O isolamento de plasmídeos de *E. coli* baseou-se no método da lise alcalina descrito por Sambrook e colaboradores (1989), com modificações. A bactéria *E. coli* contendo o plasmídeo de interesse foi crescida em 5 mL de meio LB adicionado dos antibióticos adequados até uma D.O.<sub>600</sub>  $\cong 1,5$ . A cultura foi transferida para tubos plásticos de 1,5 mL e as células foram coletadas por centrifugação (13.000 x g, 1 minuto) e ressuspensas em 200 µL de uma solução

contendo Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8,0; glucose 50 mmol/L e EDTA 10 mmol/L (GET) gelada. Procedeu-se a lise celular através da adição de 200 µL de uma solução contendo NaOH 0,2 mol/L e SDS 1% (m/v) (solução de lise). Proteínas, DNA cromossômico, restos celulares e o SDS foram precipitados pela adição de 200 µL de solução Kacf (3 mol/L de acetato de potássio e 2 mol/L de ácido acético, pH 4,8) e incubação por 10 minutos em gelo. As amostras foram, então, centrifugadas (13.000 x g, 5 minutos) e a solução aquosa foi extraída com 100 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O DNA plasmidial foi precipitado com 0,5 mL de 2-propanol, lavado com 1 mL de etanol 70%, seco, e dissolvido em 30 µL de água ultrapura estéril. O DNA purificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

### **5.7 Transferência de plasmídeos por conjugação**

Os plasmídeos transferidos para as estirpes de *H. seropedicae* foram mantidos em *E. coli* S17.1 (*tra*<sup>+</sup>). As estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas nos meios NFbHPN-malato e LB, respectivamente, na ausência de antibióticos, até uma D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 0,3 e 0,5. Em seguida, foram misturados 100 e 50 µL da cultura de *H. seropedicae* com 2 e 15 µL da cultura de *E. coli*, em tubos distintos, e as duas misturas foram plaqueadas como gotas em meio LA/NFb-malato (1:3) com 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl e incubadas a 30 °C durante 20 horas. A massa de células foi coletada com um palito estéril, suspensa em 1 mL de NFb-malato e plaqueada em meio NFb-malato acrescido de 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl contendo os antibióticos adequados.

### **5.8 Construção das Estirpes Mutantes dos Genes PTS de *Herbaspirillum seropedicae***

Para deleção dos genes PTS de *H. seropedicae* foi utilizada a técnica de deleção gênica em fase. As sequências flanqueadoras destes genes, em torno de 500 pb, foram amplificadas por reações de PCR. Estes fragmentos foram ligados entre si mantendo a mesma fase de leitura, gerando um produto de deleção que foi identificado como Δ seguido do nome do gene mutagenizado. O produto de deleção foi clonado no plasmídeo pTZ18R e sequenciado, sendo posteriormente clonado no plasmídeo pK18*mobsacB* (SCHAFER *et al.*, 1994). O plasmídeo pK18*mobsacB* não contém origem de replicação reconhecida em *H. seropedicae*, contém gene de resistência a canamicina, gene de sensibilidade a sacarose (*sacB*) e o sítio de policlonagem do

vetor pUC18. Como este plasmídeo não é replicado em *H. seropedicae*, as colônias que se tornarem resistentes a canamicina obrigatoriamente sofrerão uma etapa de recombinação integrando o plasmídeo ao seu genoma. As construções foram transformadas em *E. coli* S17-1 e conjugadas para *H. seropedicae* SmR1. Após a simples recombinação, as colônias de *H. seropedicae* se tornaram resistentes a canamicina e sensíveis a sacarose a 10% (m/v), já que o gene *sacB* de *Bacillus subtilis* expressa uma levansucrase, uma enzima que catalisa a hidrólise de sacarose e a produção de levananas que são polímeros de frutose de alto peso molecular (PELICIC *et al.*, 1996). Estes polímeros se acumulam excessivamente no interior de bactérias Gram-negativas levando a sua lise.

### 5.9 Procedimento para seleção dos mutantes

Após conjugar o vetor contendo o inserto de interesse, colônias transconjugantes isoladas foram inoculadas em meio NFb-Malato HPN sem antibióticos. A ausência de antibióticos nesta etapa é importante para a ocorrência do segundo evento de recombinação.

Após este cultivo prévio, foram plaqueados 250 µL (diluição final de  $1 \times 10^3$  e  $1 \times 10^7$  em relação a cultura crescida) em meio NFb-Malato com baixa concentração de fosfatos (15,94 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 1,78 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 20 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10% de sacarose, estreptomicina 80 µg/mL, ácido nalidíxico 5 µg/mL. Colônias isoladas que cresceram nas placas, foram re-plaqueadas em duas placas distintas, a primeira igual à anterior, e a segunda sem sacarose e com canamicina 500 µg/mL. Nessa fase, as colônias que cresceram na presença de sacarose seriam aquelas que sofreram dupla recombinação e, portanto perderam a sequência do vetor inclusive do gene *sacB*. Estas colônias foram analisadas quanto a resistência à canamicina e aquelas que não resistentes à canamicina foram analisadas por PCR para verificar se a deleção ocorreu no sítio de interesse e com o tamanho esperado. Após confirmação da deleção do gene de interesse, as estirpes mutantes geradas seriam utilizadas para os ensaios de caracterização fenotípica.

### 5.10 Superexpressão e Purificação das Proteínas PTS de *Herbaspirillum seropedicae*

As proteínas PTS (EINtr, NPr, EIIAMan, HprK e EIIANtr) foram expressas a partir do vetor pET28a, portanto as proteínas recombinantes tem uma cauda de 6 histidinas na porção N-terminal e foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna HiTrap-Chelating

equilibrada com  $\text{NiCl}_2$ . A estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) foi cultivada em 400 mL de meio LB a 37°C sob agitação constante de 160 rpm até atingir uma  $\text{D.O.}_{600}$  de aproximadamente 0,4. A indução da expressão das proteínas foi iniciada pela adição de IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo) para concentração final 0,1 mM, a 37°C por 4 horas. Após indução, as células foram coletadas por centrifugação (20.000 x g, 10 min a 4°C) e ressuspensas em 40 mL de tampão de sonicação TS (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 20 mM de imidazol e 10 % (m/v) de glicerol). Após sonicação, o extrato foi aplicado em uma coluna HiTrap-Chelating- $\text{Ni}^{2+}$  de 5 mL. As proteínas foram eluídas da coluna com gradiente crescente de imidazol de 20 mM a 1M.

### 5.11 Eletroforese de proteínas

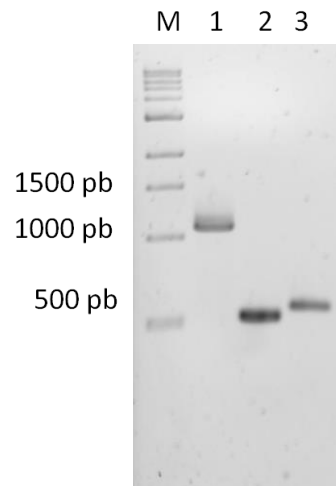
As eletroforeses para visualização da pureza das proteínas foram realizadas em gel de poliacrilamida desnaturante conforme protocolo descrito por Laemmli (1970). Foi utilizado um gel separador com uma concentração de 15% (m/v) de poliacrilamida e gel de empilhamento a 4% (m/v) de poliacrilamida. Foi utilizado sistema vertical para as eletroforeses, segundo as orientações do fabricante (Hofer®). As amostras foram tratadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6,8, 5% de  $\beta$ - mercaptoetanol) e fervidas antes da aplicação para total desnaturação protéica. A voltagem de corrida utilizada foi de 150V, utilizando o tampão Laemmli (3 g/L de Tris-base, 14 g/L de Glicina e 1 g/L de SDS). Terminada a eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com corante Coomassie Blue R-250.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Obtenção dos produtos de deleção gênica

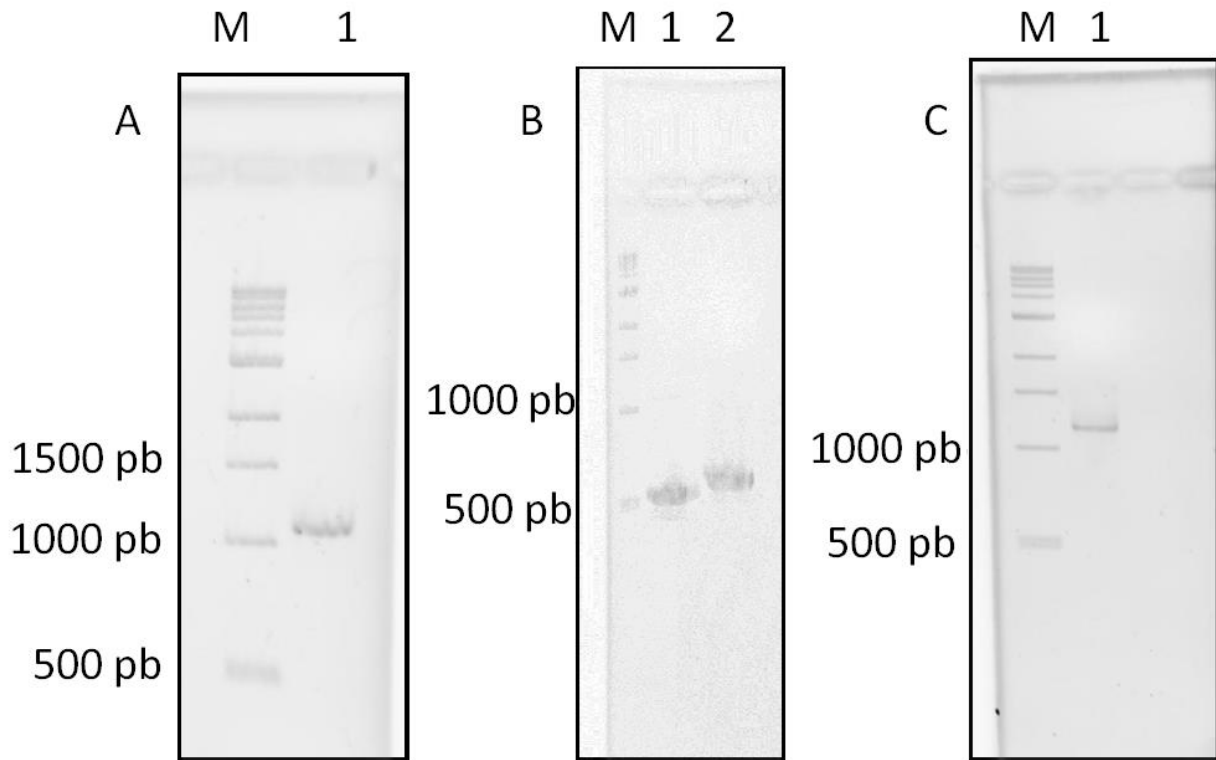
Foram obtidos três produtos de deleção gênica ( $\Delta ptsM$ ,  $\Delta ptsO$ ,  $\Delta ptsI$ ) contendo fragmentos de cerca de 500 pares de bases das regiões a montante e a jusante (Figuras 6 e 7). Os produtos de fusão  $\Delta ptsM$ ,  $\Delta ptsO$  e  $\Delta ptsI$  já foram clonados e sequenciados (Figura 8 A, B e C), confirmando a identidade dos produtos de PCR amplificados. Os produtos de PCR para obtenção dos produtos de deleção dos genes *ptsN* e *hprK* foram obtidos, entretanto, seus produtos de deleção ainda não foram obtidos.

**Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose do produto de deleção do gene *ptsM* (Hsero\_0088).



Gel de agarose a 0,8%, utilizando tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio e revelado sob luz ultravioleta em transiluminador. M – marcador de número de bases (500 – 10.000 pb) (1kb ladder - New England Biolabs), 1 – produto de fusão dos fragmentos a montante e a jusante de Hsero\_0088 (*ptsM*), 2 – produto a montante de Hsero\_0089 e 3 – produto a jusante de Hsero\_0089.

**Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de deleção dos genes *ptsO* (Hsero\_0089) e *ptsI* (Hsero\_0090).



Géis de agarose a 0,8%, utilizando tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio e revelado sob luz ultravioleta em transiluminador. A) M – marcador de número de bases (500 – 10.000 pb) (1kb ladder - New England Biolabs), 1 – produto de fusão dos fragmentos a montante e a jusante de Hsero\_0089; B) M – marcador de número de bases (500 – 10.000 pb) (1kb ladder - New England Biolabs), 1 – produto de PCR a montante de Hsero\_0090, 2 – produto de PCR a jusante de Hsero\_0090; C) M – marcador de número de bases (500 – 10.000 pb) (1kb ladder - New England Biolabs), 1 – produto de fusão dos fragmentos a montante e a jusante de Hsero\_0090.

**Figura 8.** Demonstrativo do alinhamento e esquema dos sequenciamentos dos produtos de deleção dos genes *ptsM* (Hsero\_0088), *ptsO* (Hsero\_0089) e *ptsI* (Hsero\_0090) obtidos através da ferramenta BLAST.

**A.** *ΔptsM* (Hsero\_0088).



O alinhamento do início da sequência obtida tem 98% de identidade com o gene a montante e com a parte inicial de *ptsM*, e do final tem 99% de identidade com a parte final de *ptsM* e com o gene a jusante. No esquema representativo, pode ser visto, entre os marcadores alaranjados, a porção de *ptsM* que foi deletada.

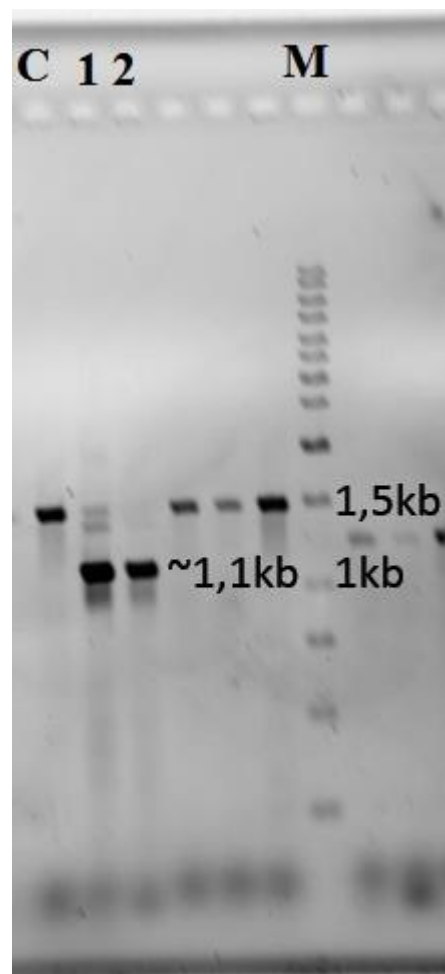
## B. *ΔptsO* (Hsero\_0089)



O alinhamento do início da sequência obtida tem 99% de identidade com o gene a montante e com a parte inicial de *ptsO*, e do final tem 97% de identidade com a parte final de *ptsO* e com o gene a jusante. No esquema representativo, pode ser visto, entre os marcadores alaranjados, a porção de *ptsO* que foi deletada.



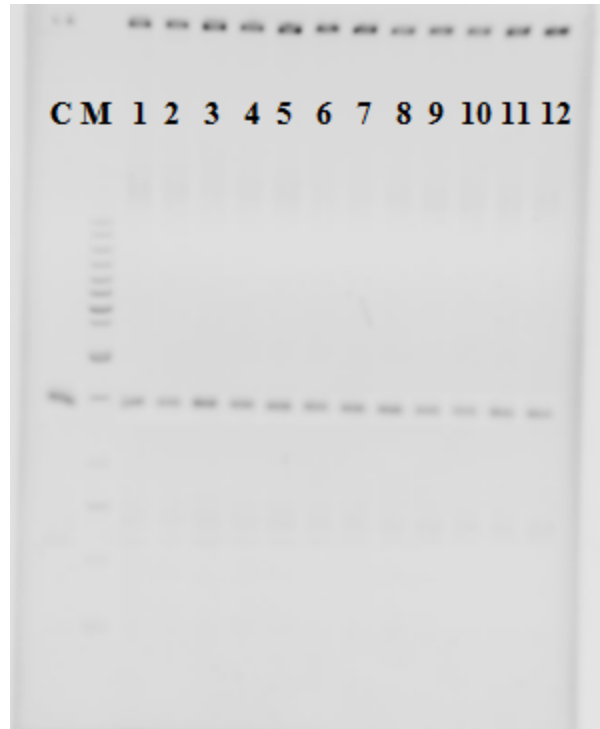
**Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose da reação de PCR para confirmar a inserção do plasmídeo no genoma de *H. seropedicae*.



Gel de agarose a 0,8%, utilizando tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio e revelado sob luz ultravioleta em transiluminador. M – marcador de número de bases (250 – 10.000 pb) (1kb ladder - New England Biolabs), C – controle da reação, molde utilizado DNA genômico de *H. seropedicae* SmR1, 1 – reação de PCR de colônia contendo o plasmídeo integrado ao genoma, notável pela presença das 2 bandas, referentes à cópia selvagem (aproximadamente 1500 pares de base), assim como em C, e à cópia deletada (aproximadamente 1100 pares de base), 2 – reação de PCR de outra colônia contendo o plasmídeo integrado ao genoma, notável pela presença da banda referente a cópia deletada (aproximadamente 1100 pares de base).

As bactérias que inseriram o plasmídeo no genoma foram utilizadas para triagem do duplo recombinante por PCR e resistência a sacarose assim como sensibilidade a canamicina. Após o crescimento na ausência de antibióticos, para que as bactérias descartem uma das cópias presentes, todas as colônias obtidas descartaram a cópia deletada do gene, restituindo apenas a cópia selvagem (Figura 10).

**Figura 10.** Eletroforese da reação de PCR feita nas colônias provindas do simples recombinante (*ptsM*/ $\Delta$ *ptsM*) após crescimento na ausência de antibióticos.



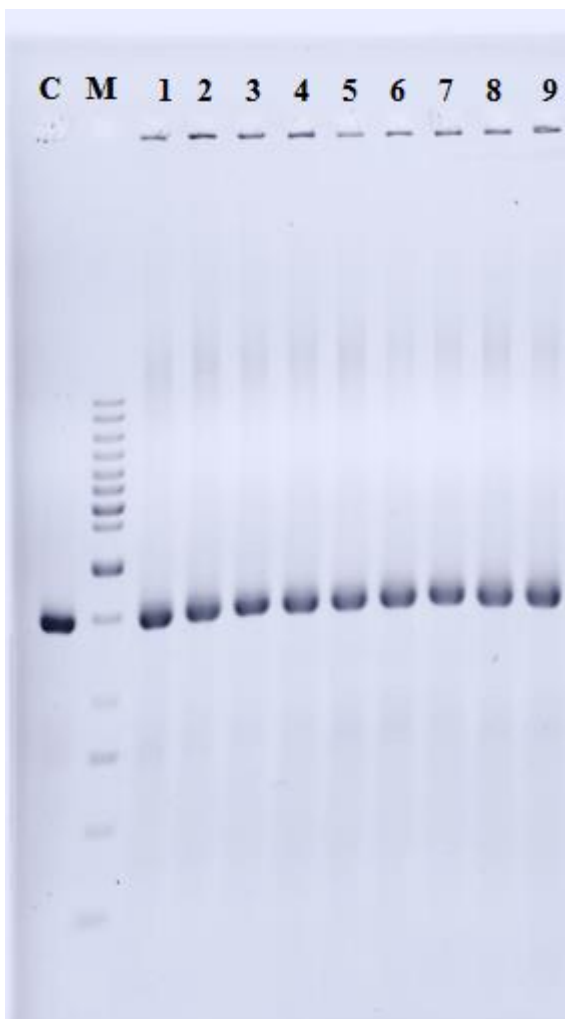
Gel de agarose a 0,8%, utilizando tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio e revelado sob luz ultravioleta em transiluminador. M – marcador de número de bases (250 – 10.000 pb) (1kb ladder - New England Biolabs), C – controle da reação, molde utilizado DNA genômico de *H. seropedicae* SmR1. As bandas de 1 a 12 referem-se às reações de PCR feitas a partir de colônias isoladas provenientes do cultivo em ausência de antibiótico das que haviam integrado o plasmídeo, nota-se a presença apenas da banda referente à cópia selvagem (aproximadamente 1500 pares de base), assim como em C, e a cópia deletada (aproximadamente 1100 pares de base) não se encontra mais presente.

Devido a isso, e com base em publicação prévia que mostra a deleção de homólogos a *ptsM* na betaproteobactéria *Ralstonia eutropha* (KADDOR e STEINBÜCHEL, 2011), foi decidido utilizar diferentes meios com diferentes fontes de carbono e nitrogênio para realizar a pressão seletiva, que foram: 1) NFB-Malato com 20 mmol/L de cloreto de amônio, 2) NFB-Malato com 0,2% de casaminoácidos, 3) NFB-Glucose com 20 mmol/L de cloreto de amônio, 4) NFB-Glucose com 0,2% de casaminoácido e 5) meio LB. Exceto as alterações indicadas, todas as

outras condições foram mantidas. Ainda assim, as bactérias descartaram a cópia deletada, mantendo apenas a cópia selvagem do gene (Figura 11 A, B, C e D).

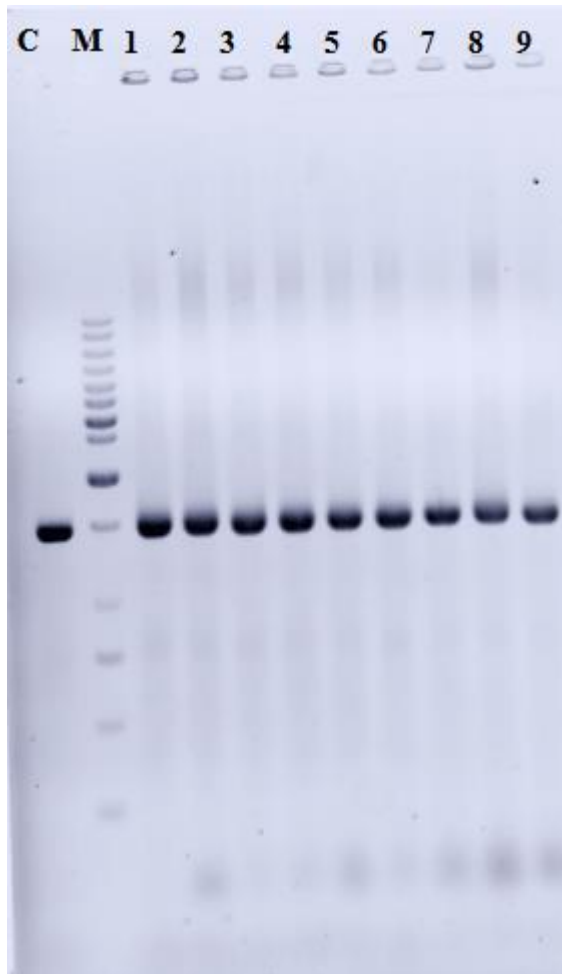
**Figura 11.** Eletroforese das reações de PCR feitas das colônias provindas do simples recombinante (*ptsM/ΔptsM*), com pressão seletiva em diferentes meios de cultivo.

A) NFB-Malato com 20 mmol/L de cloreto de amônio.



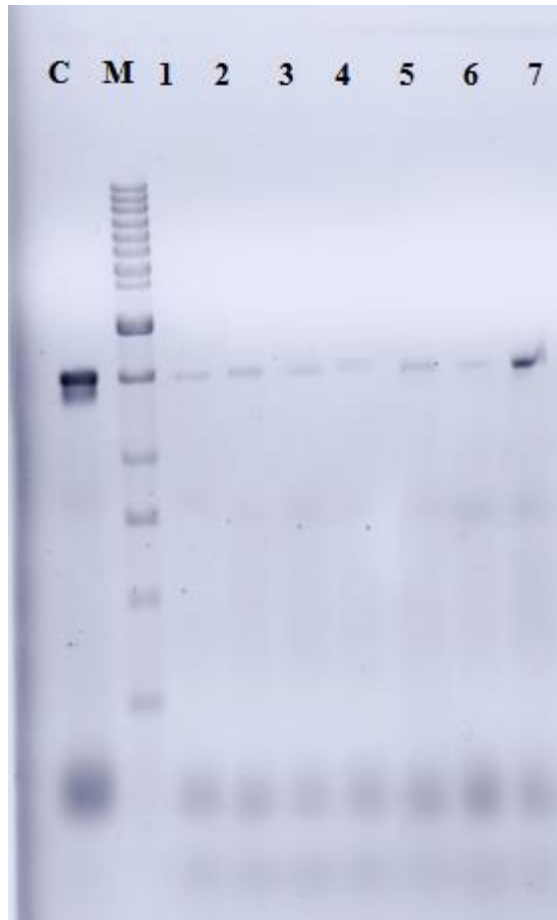
Gel de agarose a 0,8%, utilizando tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio e revelado sob luz ultravioleta em transiluminador. M – marcador de número de bases (250 – 10.000 pb) (1kb ladder - New England Biolabs), C – controle da reação, molde utilizado DNA genômico de *H. seropedicae* SmR1. As bandas de 1 a 9 referem-se às reações de PCR feitas a partir de colônias isoladas provenientes do cultivo em ausência de antibiótico das que haviam integrado o plasmídeo, nota-se a presença apenas da banda referente à cópia selvagem (aproximadamente 1500 pares de base), assim como em C, e à cópia deletada (aproximadamente 1100 pares de base) não se encontra mais presente.

**B) NFB-Malato com 0,2% de casaminoácidos**



Gel de agarose a 0,8%, utilizando tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio e revelado sob luz ultravioleta em transiluminador. M – marcador de número de bases (250 – 10.000 pb) (1kb ladder - New England Biolabs), C – controle da reação, molde utilizado DNA genômico de *H. seropedicae* SmR1. As bandas de 1 a 9 referem-se às reações de PCR feitas a partir de colônias isoladas provenientes do cultivo em ausência de antibiótico das que haviam integrado o plasmídeo, nota-se a presença apenas da banda referente à cópia selvagem (aproximadamente 1500 pares de base), assim como em C, e à cópia deletada (aproximadamente 1100 pares de base) não se encontra mais presente.

C) NFB-Glucose com 20 mmol/L de cloreto de amônio.



Gel de agarose a 0,8%, utilizando tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio e revelado sob luz ultravioleta em transiluminador. M – marcador de número de bases (250 – 10.000 pb) (1kb ladder - New England Biolabs), C – controle da reação, molde utilizado DNA genômico de *H. seropedicae* SmR1. As bandas de 1 a 7 referem-se às reações de PCR feitas a partir de colônias isoladas provenientes do cultivo em ausência de antibiótico das que haviam integrado o plasmídeo, nota-se a presença apenas da banda referente à cópia selvagem (aproximadamente 1500 pares de base), assim como em C, e à cópia deletada (aproximadamente 1100 pares de base) não se encontra mais presente.

**D) NFB-Glucose com 0,2% de casaminoácidos**



Gel de agarose a 0,8%, utilizando tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio e revelado sob luz ultravioleta em transiluminador. M – marcador de número de bases (250 – 10.000 pb) (1kb ladder - New England Biolabs), C – controle da reação, molde utilizado DNA genômico de *H. seropedicae* SmR1, SR – simples recombinante, aplicado como segundo controle. As bandas de 1 a 5 referem-se às reações de PCR feitas a partir de colônias isoladas provenientes do cultivo em ausência de antibiótico das que haviam integrado o plasmídeo, nota-se a presença apenas da banda referente à cópia selvagem (aproximadamente 1500 pares de base), assim como em C, e à cópia deletada (aproximadamente 1100 pares de base) não se encontra mais presente.

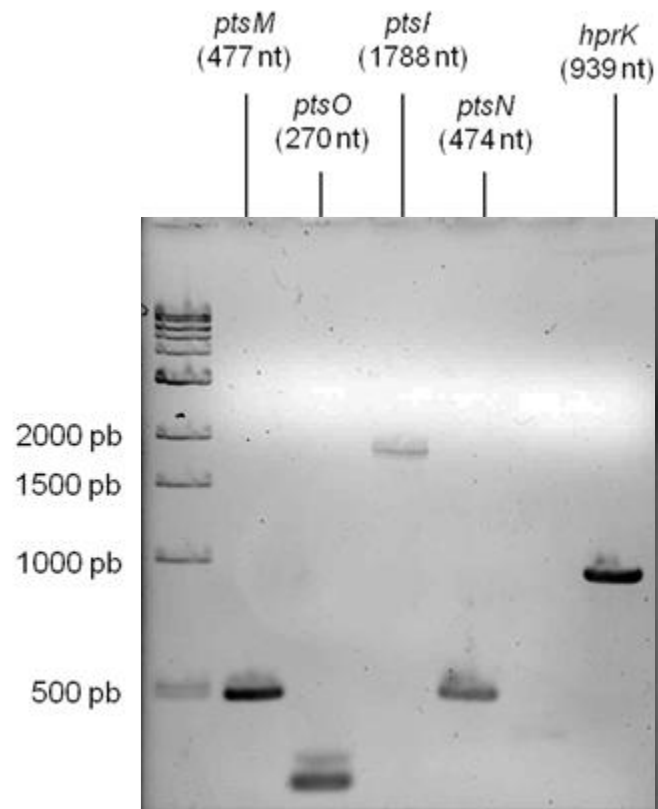
Após as diversas tentativas em diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio, não foi possível a obtenção do mutante  $\Delta ptsM$  em *H. seropedicae*, indicando que a proteína PtsM possa ter um papel essencial para a bactéria nas condições testadas. Há na literatura, o relato de Dozot e colaboradores (2010) que apesar de várias tentativas também não foi possível a deleção

de um gene homólogo ao *ptsM* de *H. seropedicae* na alfaproteobactéria . Os autores encontraram que PtsM interage com a subunidade SucA da 2-oxoglutarato desidrogenase e, no seu modelo, previram que a interação deva inibir a atividade desta enzima. Até o momento, ainda não há estudos sobre o efeito de PtsM na atividade 2-oxoglutarato desidrogenase em *B. melitensis* ou em qualquer outro organismo que possua proteínas do sistema PTS.

### **6.3 Obtenção dos genes pts íntegros**

Uma segunda frente deste trabalho foi a superexpressão em *E. coli* e purificação das proteínas do sistema PTS de *H. seropedicae* para posterior estudos de atividade *in vitro*. Como observado na Figura 12, todos os genes puderam ser amplificados por reação de PCR. Os tamanhos dos produtos de PCR esperados são: *ptsM* (477 nt), *ptsO* (270 nt), *ptsN* (474 nt), *ptsI* (1788 nt) e *hprK* (939 nt). Todas as bandas amplificadas correspondem ao tamanho esperado.

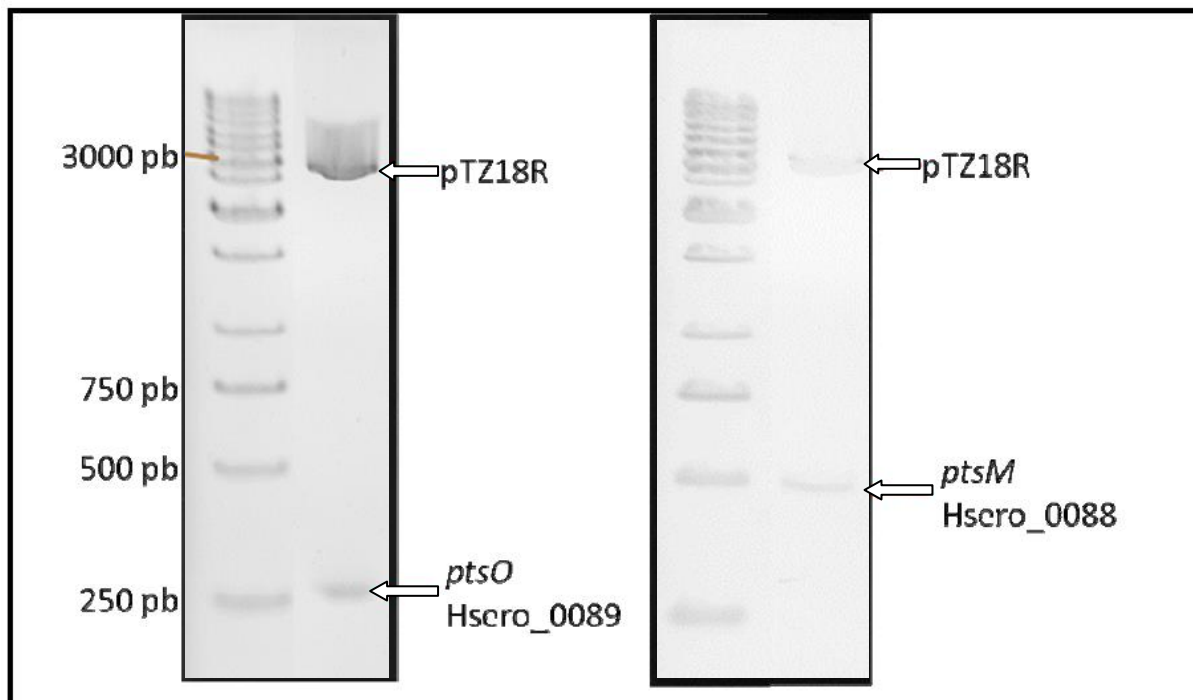
**Figura 12.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR correspondendo aos genes *pts* de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1.



Gel de agarose a 0,8%, utilizando tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio e revelado sob luz ultravioleta em transiluminador. O marcador de número de bases (500 – 10.000 pb) (1kb ladder - New England Biolabs) está com as indicações das bandas de interesse ao lado. As outras bandas são referentes às diferentes reações de PCR utilizando os pares de primers desenhados para cada gene. Acima estão os tamanhos que cada reação deveria ter amplificado concordando com os tamanhos encontrados pela eletroforese.

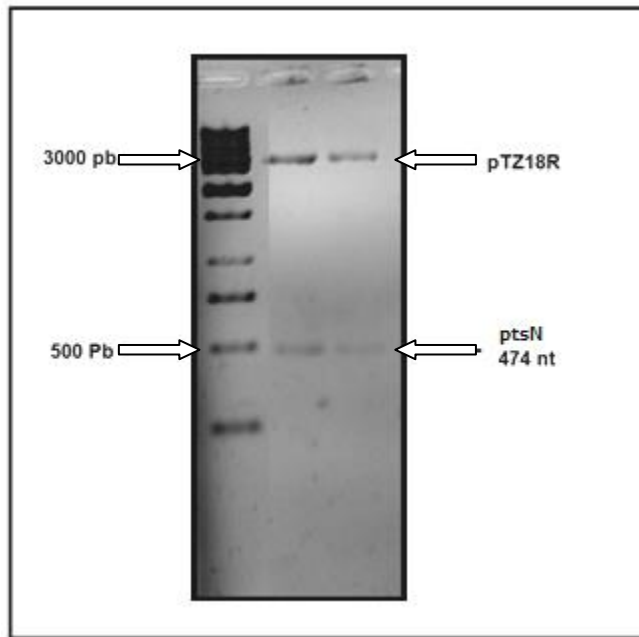
Nas Figuras 13, 14 e 15, observa-se que as reações para clonagem dos genes PTS em pTZ18R (2861 pares de bases) ocorreram com sucesso para os genes *ptsM*, *ptsO*, *ptsN* e *hprK*, tendo sido confirmadas por dupla digestão, podendo, dessa forma, ser vista tanto a banda referente ao plasmídeo, quanto a referente ao gene. Portanto, estes genes foram mantidos para posterior clonagem em pET28a.

**Figura 13.** Eletroforese em gel de agarose da dupla digestão dos clones pTZ18R::*ptsO* e pTZ18R::*ptsM*.



Géis de agarose a 0,8%, utilizando tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio e revelado sob luz ultravioleta em transiluminador. O marcador de número de bases (250 – 10.000 pb) (1kb ladder - New England Biolabs) está com as indicações das bandas de interesse ao lado. As outras bandas são referentes às diferentes reações de dupla digestão para cada gene, sendo visíveis bandas referentes ao plasmídeo (em torno de 2800 pares de bases) e aos genes *ptsO* (em torno de 270 pares de bases) e *ptsM* (em torno de 477 pares de bases).

**Figura 14.** Eletroforese em gel de agarose da digestão dos clones pTZ18R::*ptsN*.



Gel de agarose a 0,8%, utilizando tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio e revelado sob luz ultravioleta em transiluminador. O marcador de número de bases (250 – 10.000 pb) (1kb ladder - New England Biolabs) está com as indicações das bandas de interesse ao lado. As outras bandas são referentes às diferentes reações de dupla digestão para *ptsN*, sendo visíveis bandas referentes ao plasmídeo (em torno de 2800 pares de bases) e a *ptsN* (em torno de 474 pares de bases).

**Figura 15.** Eletroforese em gel de agarose da digestão dos clones pTZ18R:: *hprK*.

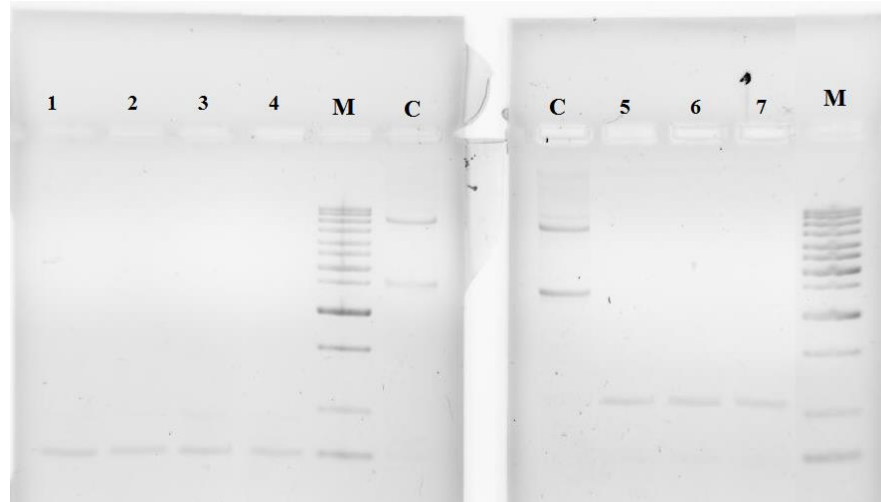


Gel de agarose a 0,8%, utilizando tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio e revelado sob luz ultravioleta em transiluminador. As bandas presentes são referentes as diferentes reações de dupla digestão para *hprK*, sendo visíveis bandas referentes ao plasmídeo (mais acima) e a *hprK* (mais abaixo).

#### 6.4 Expressão de PtsM e PtsO

Após a confirmação por PCR dos genes *ptsM* e *ptsO* em pTZ18R (Figura 16), os genes foram transferidos para o plasmídeo pET28a e transformados em *E. coli* estirpe BL21 (DE3) para as expressões das proteínas.

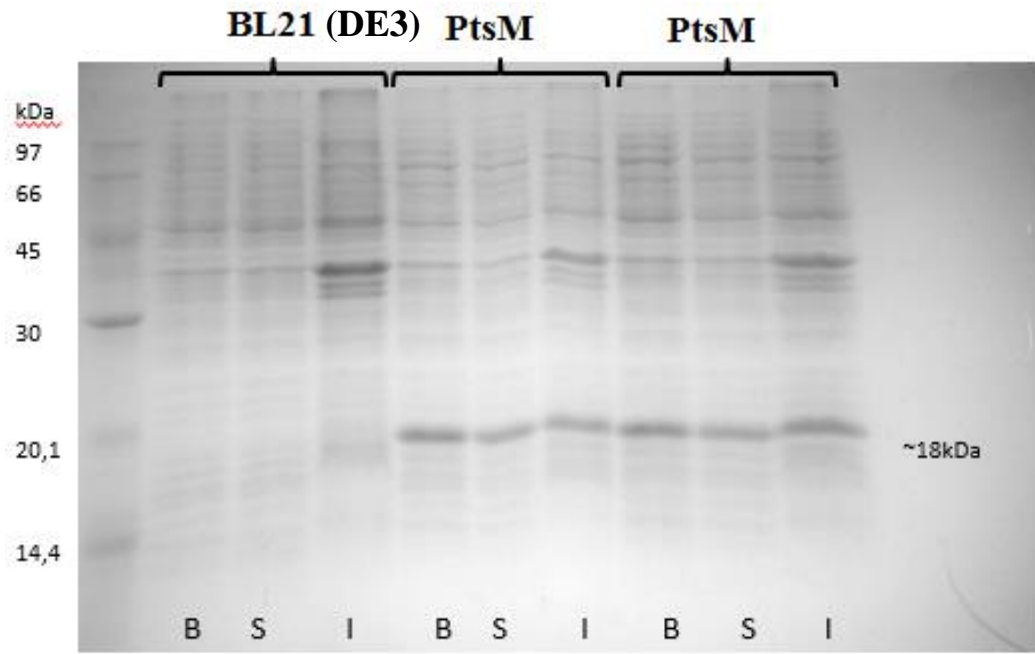
**Figura 16.** Eletroforese em gel de agarose da reação de PCR para confirmar a presença de *ptsM* e *ptsO* em *E. coli* BL21 (DE3).



Géis de agarose a 0,8%, utilizando tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio e revelado sob luz ultravioleta em transiluminador. M – marcador de número de bases (250 – 10.000 pb) (1kb ladder - New England Biolabs), C – controle da reação utilizando o plasmídeo sem inserto. As bandas de 1 a 4 são referentes às confirmações dos genes *ptsO* e 5 a 7 *ptsM*.

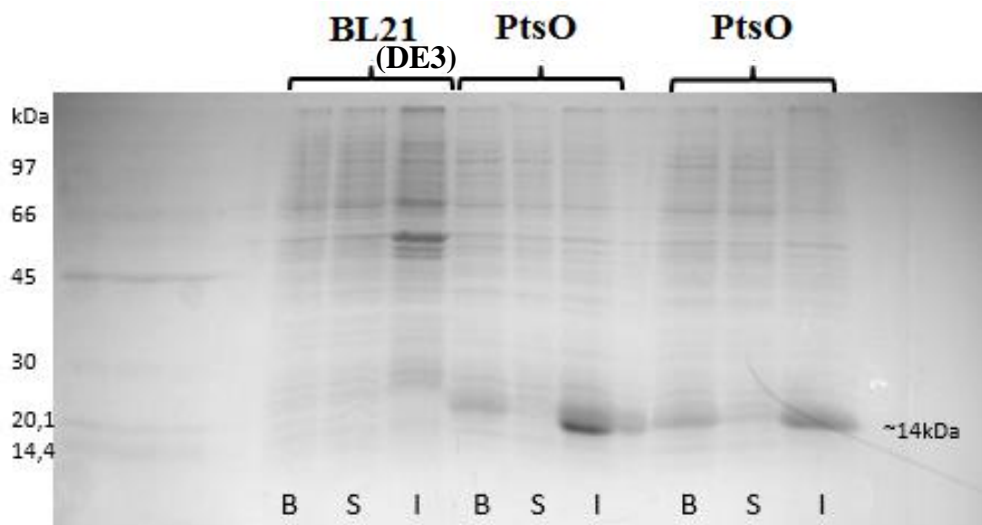
Foi realizada uma expressão preliminar para que fosse verificada a solubilidade das proteínas. Após a lise das culturas por meio de sonicação, utilizando tampão com 150mM de NaCl, 50mM de Tris-HCl pH 8,0 e 10% de glicerol, foram fracionados os extratos, bruto, solúvel e insolúvel, os quais foram aplicados em gel de poliacrilamida 12%, utilizando as mesmas frações provindas de uma cultura de *E. coli* BL21 (DE3) como controle para que fossem verificadas apenas as proteínas diferencialmente expressas. Foi verificada a expressão tanto de PtsM quanto de PtsO, sendo que esta foi encontrada majoritariamente na fração insolúvel (Figura 18), enquanto aquela encontrava-se suficientemente na fração solúvel (Figura 17).

**Figura 17.** Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão preliminar de PtsM



Gel de poliacrilamida a 15%, utilizando tampão Tris-Glicina, corado com Coomassie Blue R-250. B – fração bruta, S – fração solúvel, I – fração insolúvel. À esquerda o marcador de massa molecular com indicações de cada banda. Acima BL21(DE3) expressão controle e PtsM expresso em duplicata. É visível a banda diferencialmente expressa em torno de 18kDa, condizente com a massa teórica de 18,4 kDa de PtsM mais a cauda de histidinas N-terminal, assim como sua presença na fração solúvel.

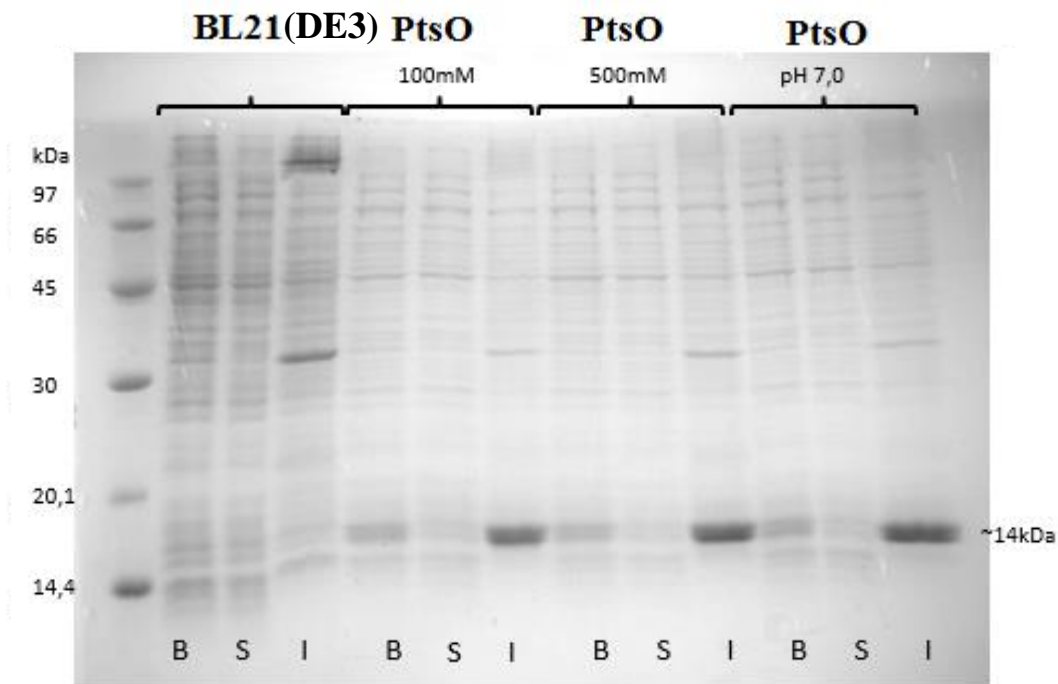
**Figura 18.** Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão preliminar de PtsO



Gel de poliacrilamida a 15%, utilizando tampão Tris-Glicina, corado com Coomassie Blue R-250. B – fração bruta, S – fração solúvel, I – fração insolúvel. À esquerda o marcador de massa molecular com indicações de cada banda. Acima BL21(DE3) expressão controle e PtsO expresso em duplicata.. É visível a banda diferencialmente expressa em torno de 14kDa, condizente com a massa teórica de PtsO, e sua presença nas frações bruta e insolúvel.

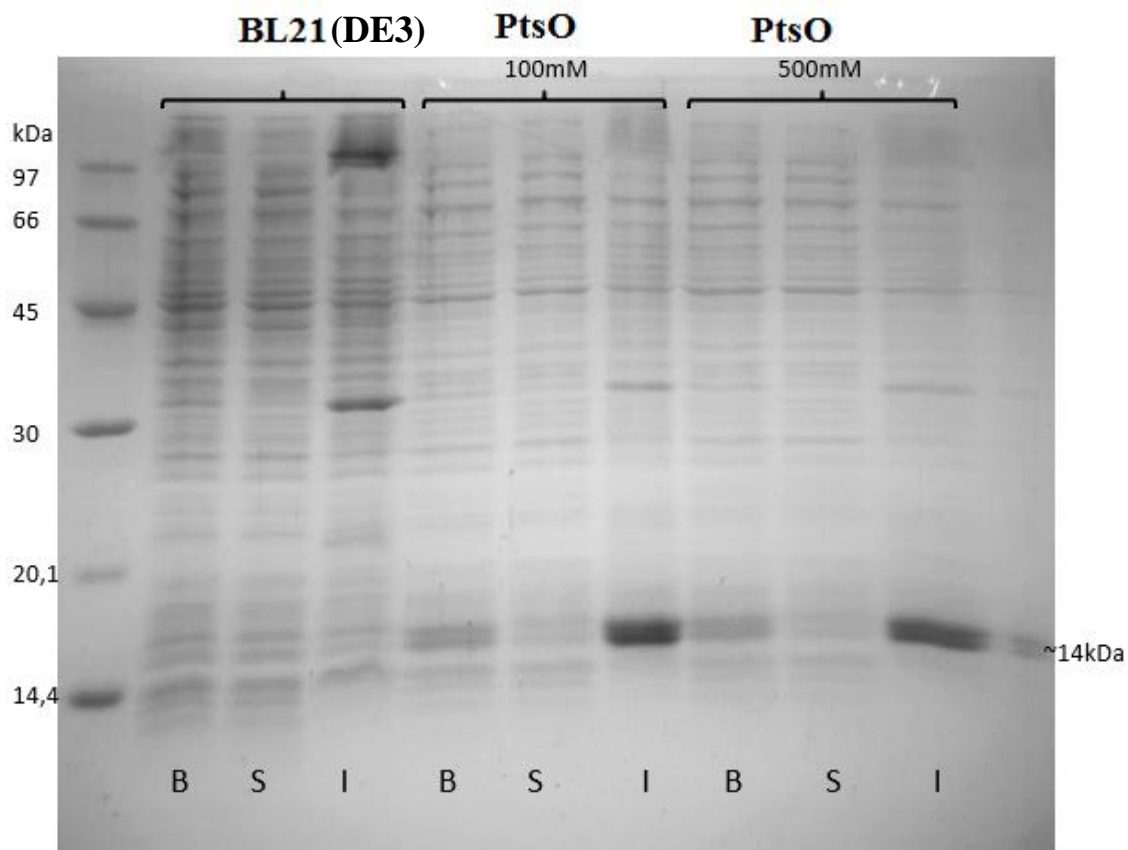
Pelo fato de PtsO se encontrar na fração insolúvel utilizando este tampão, são necessárias alterações nos tampões de sonicação assim como na temperatura de expressão na tentativa de encontrá-la na fração solúvel, pois apenas desta forma ela poderá ser purificada para que seja utilizada em experimentos. Para tal, foram utilizadas alterações no tampão como: alterar o pH para 7,0, diferentes concentrações de KCl (Figura 19), diferentes concentrações de NaCl (Figura 20), e verificou-se que estas alterações realizadas nos tampões não melhoraram a solubilidade da proteína.

**Figura 19.** Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão de PtsO com diferentes concentrações de KCl e pH 7,0



Gel de poliacrilamida a 15%, utilizando tampão Tris-Glicina, corado com Coomassie Blue R-250. B – fração bruta, S – fração solúvel, I – fração insolúvel. À esquerda o marcador de massa molecular com indicações de cada banda. Os poços marcados com 100mM e 500mM são referência a concentração de KCl presente nas expressões. Os poços marcados com pH 7,0, teve o tampão alterado apenas em seu pH, as outras concentrações de sais se mantêm. É visível a banda diferencialmente expressa em torno de 14kDa, condizente com a massa teórica de PtsO, ainda na fração insolúvel.

**Figura 20.** Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão de PtsO com diferentes concentrações de NaCl



Gel de poliacrilamida a 15%, utilizando tampão Tris-Glicina, corado com Coomassie Blue R-250 B – fração bruta, S – fração solúvel, I – fração insolúvel. À esquerda o marcador de massa molecular com indicações de cada banda. Os poços marcados com 100mM e 500mM são referência a concentração de NaCl presente nas expressões. É visível a banda diferencialmente expressa em torno de 14kDa e verifica-se que estas alterações realizadas nos tampões não melhoraram a solubilidade da proteína.

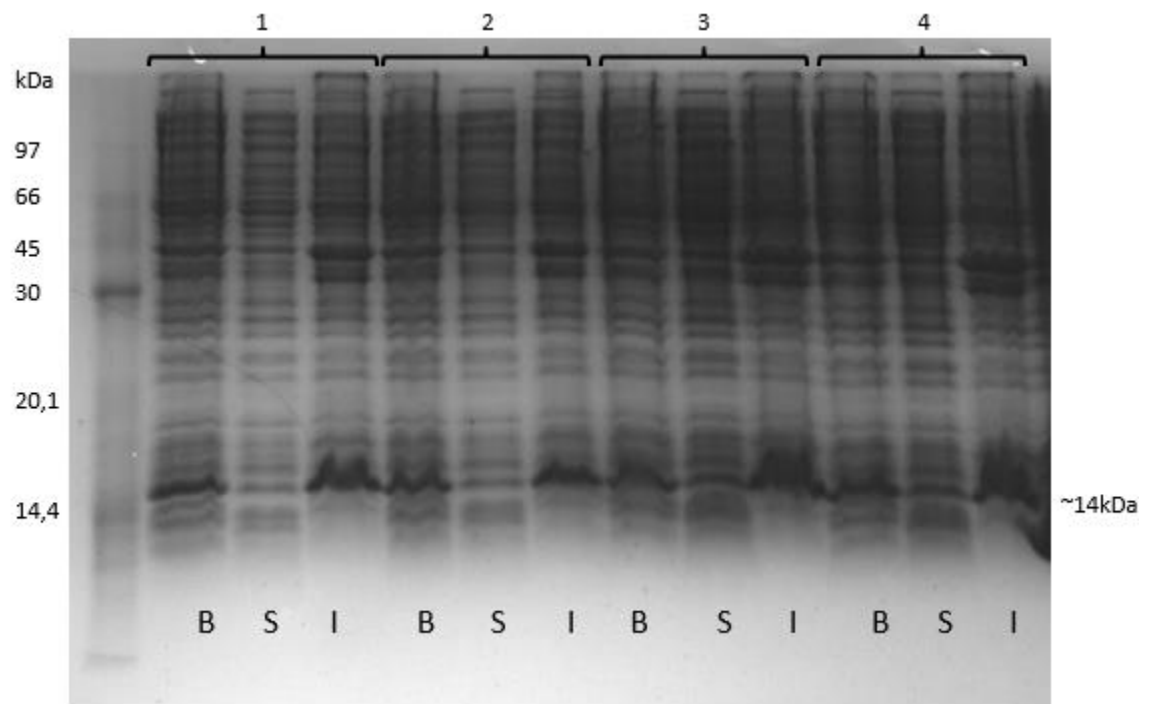
Devido a necessidade de encontrar uma condição de solubilização da proteína PtsO, foram testados diversos tampões descritos a seguir.

- 1) 50mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM NaCl, 5mM BME;
- 2) 50mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM NaCl, 5mM DTT;
- 3) 50mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM NaCl, 10% glicerol, 0,1% Triton X-100;
- 4) 50mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM NaCl, 10% glicerol, 0,1% Triton X-100, 5mM BME;
- 5) 50mM Tris-HCl pH8,0, 150mM NaCl, 10% glicerol, 0,1% Triton X-100, 5mM DTT;

- 6) PBS pH 7,4, 10% glicerol, 0,1% Triton X-100;
- 7) PBS pH 7,4, 10% glicerol, 0,1% Triton X-100, 5mM BME;
- 8) PBS pH 7,4, 10% glicerol, 0,1% Triton X-100, 5mM DTT

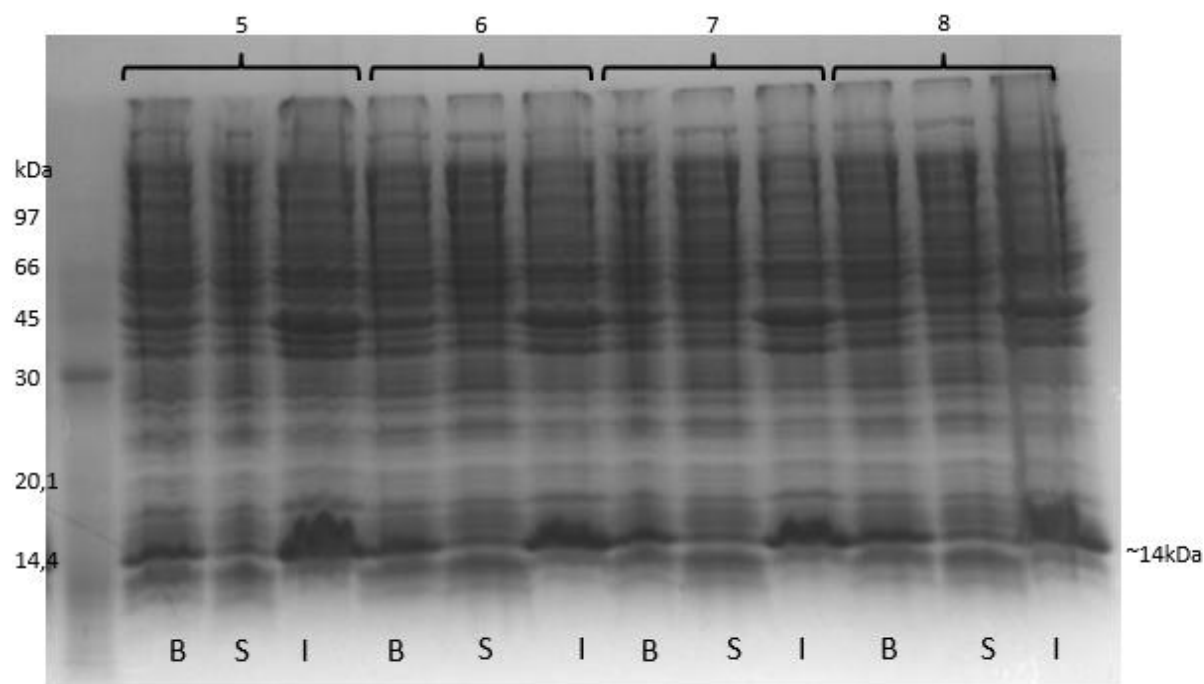
As condições testadas foram divididas em 2 géis de poliacrilamida, tendo sido aplicadas de quatro em quatro como indicadas pelas Figuras 21 e 22.

**Figura 21.** Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão de PtsO nas condições de 1 a 4.



Gel de poliacrilamida a 15%, utilizando tampão Tris-Glicina, corado com Coomassie Blue R-250. B – fração bruta, S – fração solúvel, I – fração insolúvel. À esquerda o marcador de massa molecular com indicações de cada banda. Os poços marcados com 1, 2, 3 e 4 são referência aos tampões descritos acima. É visível a banda diferencialmente expressa em torno de 14kDa e verifica-se que estas alterações realizadas nos tampões melhoraram a solubilidade da proteína com os tampões 3 e 4.

**Figura 22.** Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão de PtsO nas condições de 5 a 8.

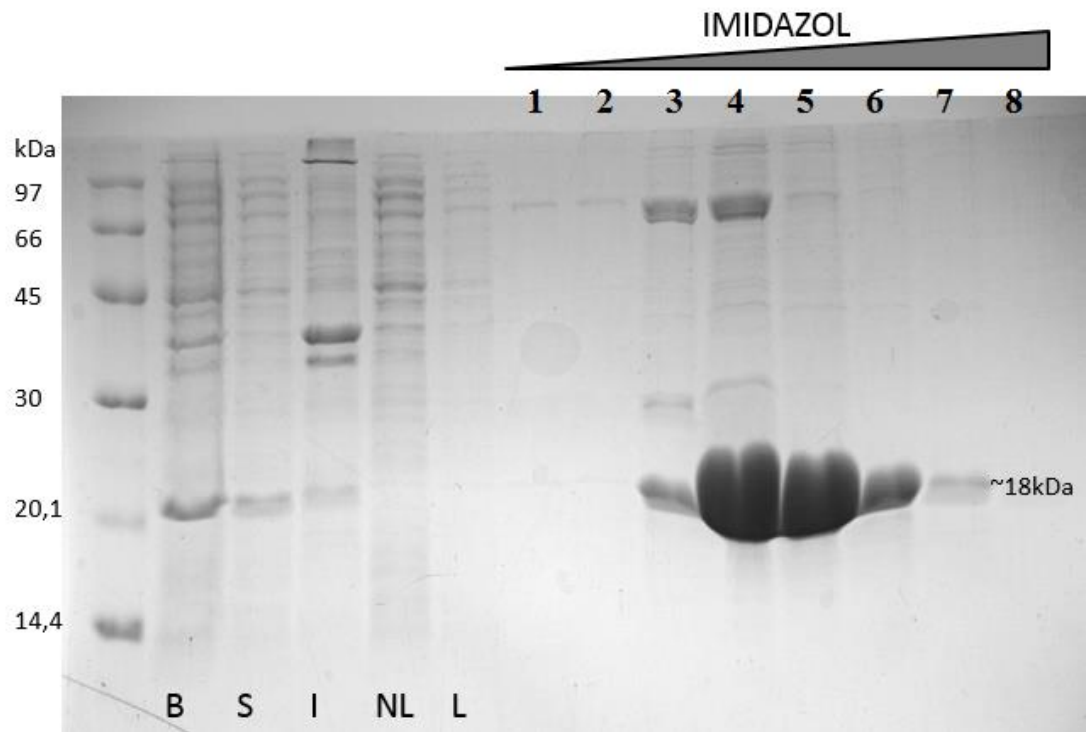


Gel de poliacrilamida a 15%, utilizando tampão Tris-Glicina, corado com Coomassie Blue R-250. B – fração bruta, S – fração solúvel, I – fração insolúvel. À esquerda o marcador de massa molecular com indicações de cada banda. Os poços marcados com 5, 6, 7 e 8 são referência aos tampões descritos acima. É visível a banda diferencialmente expressa em torno de 14kDa e verifica-se que estas alterações realizadas nos tampões pouco mudaram na solubilidade da proteína.

Com base nos resultados das condições testadas, foram definidas as condições para purificar PtsM (50mM de Tris-HCl pH 8,0, 150 mM de NaCl e 10% de glicerol) e, para PtsO foi definido o tampão 4 (50mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM NaCl, 10% glicerol, 0,1% de Triton X-100, 5 mM BME).

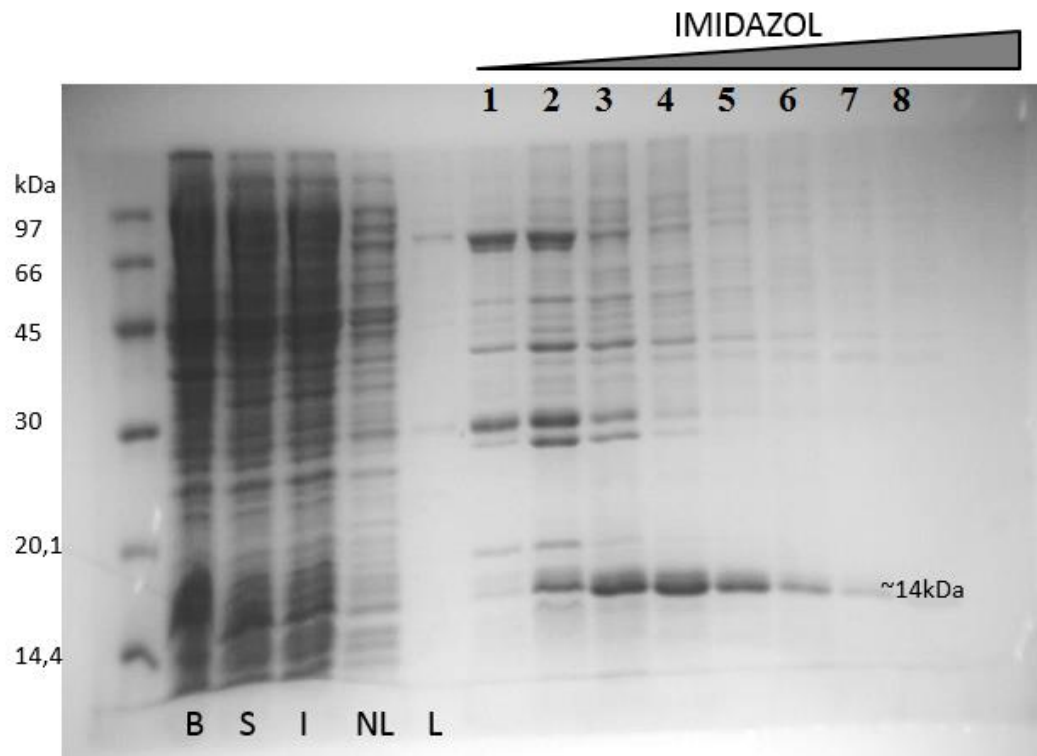
Com as condições definidas, foi seguido o protocolo de superexpressão e purificação das proteínas PtsM (Figura 23) e PtsO (Figura 24). Por conter cauda de histidina, as proteínas ligam-se á coluna HiTrap Chelating®, por meio do pré-carregamento desta com uma solução de  $Ni^{2+}$ , que vai complexar com a cauda, liberando-se apenas com a adição de imidazol, para tal, é feito um gradiente crescente de imidazol até que a proteína de interesse desligue-se da coluna, impedindo que outras proteínas presentes no extrato proteico contaminem as frações finais.

**Figura 23.** Eletroforese em gel de poliacrilamida da superexpressão e purificação de PtsM.



Gel de poliacrilamida a 15%, utilizando tampão Tris-Glicina, corado com Coomassie Blue R-250. B – fração bruta, S – fração solúvel, I – fração insolúvel, NL – fração que não se ligou à coluna, L – fração eluída na lavagem da coluna. À esquerda o marcador de massa molecular com indicações de cada banda. A marcação indica o gradiente de imidazol aumentando 100 mM a cada poço do gel. É visível a banda diferencialmente expressa em torno de 18kDa, condizente com a massa teórica de PtsM. Os poços 3 a 7 depois do início do gradiente apresentam a proteína de interesse, sendo que 3 e 4 possuem mais contaminantes, e 5 a 7 estão mais puros, e foram divididas frações de tal forma.

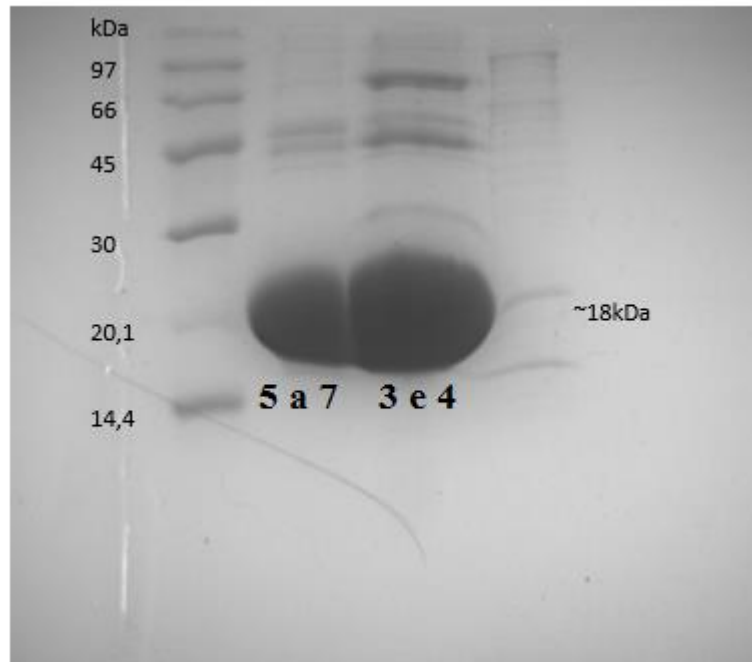
**Figura 24.** Eletroforese em gel de poliacrilamida da superexpressão de purificação de PtsO



Gel de poliacrilamida a 15%, utilizando tampão Tris-Glicina, corado com Coomassie Blue R-250. B – fração bruta, S – fração solúvel, I – fração insolúvel, NL – fração que não ligou na coluna, L – fração que saiu na lavagem da coluna. À esquerda o marcador de massa molecular com indicações de cada banda. A marcação indica o gradiente de imidazol aumentando 100mM a cada poço do gel. É visível a banda diferencialmente expressa em torno de 14kDa. Os poços 2 a 6 depois do início do gradiente apresentam a proteína de interesse, sendo que 2 e 3 possuem mais contaminantes, e 4 a 6 estão mais puros.

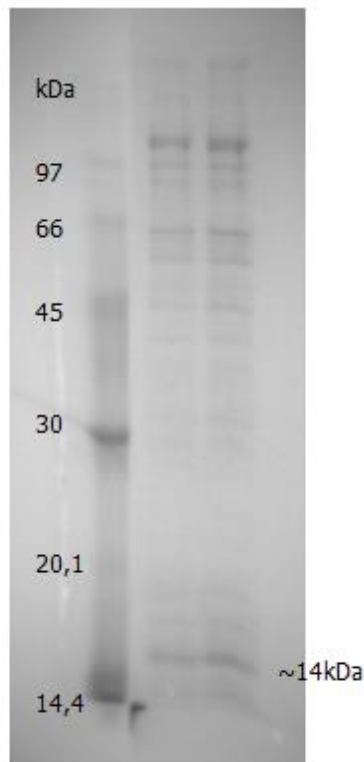
Após as purificações, as proteínas foram dialisadas contra seus próprios tampões de sonicação, com intuito de remover o imidazol presente. Em sequência, foram aplicadas novamente em géis de poliacrilamida para que fossem visualizadas no estado em que seriam conservadas (Figuras 25 e 26).

**Figura 25.** Eletroforese em gel de poliacrilamida de PtsM purificada pós-diálise



Gel de poliacrilamida a 15%, utilizando tampão Tris-Glicina, corado com Coomassie Blue R-250. A esquerda o marcador de massa molecular com indicações de cada banda. É visível a banda em torno de 18kDa, condizente com a massa teórica de PtsM. As indicações abaixo de cada banda mostram as frações que foram juntamente dialisadas.

**Figura 26.** Eletroforese em gel de poliacrilamida de PtsO purificada pós-diálise



Gel de poliacrilamida a 15%, utilizando tampão Tris-Glicina, corado com Coomassie Blue R-250. À esquerda o marcador de massa molecular com indicações de cada banda. É visível a banda em torno de 14kDa, que aparentemente foi bastante perdida durante o processo de diálise ficando em menor concentração que os contaminantes presentes na amostra.

A massa teórica de PtsO contendo a cauda de histidinas N-terminal corresponde a 11.7 kDa, uma massa bastante diferente do que observou-se por análises de SDS-PAGE. Na prática observou-se uma massa superior a 14.4 kDa. Uma das características a ser remarcada para His<sub>6</sub>-PtsO é sua quantidade de resíduos básicos (Arg, Lys e His) que totalizam 20 aminoácidos de 109. Sendo assim, o pI teórico da proteína recombinante é de 8,86 e essa característica pode explicar a migração aparente mais lenta, que é típica de proteínas com pI básico. Além disso, a redução na concentração de His<sub>6</sub>-PtsO após diálise indica que a proteína tenha atravessado os poros da membrana de diálise, já que nenhuma precipitação foi observada após diálise. Como a

membrana utilizada tem um limite de exclusão de 12 kDa é possível que His<sub>6</sub>-PtsO, por ter uma massa inferior ao limite de exclusão, tenha migrado para o tampão de diálise.

## 7. CONCLUSÕES

Apesar das diversas tentativas, não foi possível a construção do mutante *ptsM* em *Herbaspirillum seropedicae*, indicando a possibilidade de PtsM ter um papel relevante, ou até mesmo essencial para a bactéria. A fusão  $\Delta ptsI$  está pronta e sequenciada, podendo prontamente ser utilizada para a construção do respectivo mutante. O mutante *ptsO* foi construído e é possível perceber um fenótipo quanto a morfologia da colônia na placa quando comparada com a morfologia da colônia da estirpe selvagem.

As proteínas PtsM e PtsO foram expressas e purificadas. Para a proteína PtsO, foi encontrada uma condição de solubilização, porém é necessária uma alternativa para remoção de sais e imidazol, já que a proteína foi perdida na etapa de diálise. Os demais genes do sistema PTS poderão ser clonados em pET28a e expressos em *E. coli*, para se estudar a atividade das proteínas *in vitro*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson, A.J., and Dawes, E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev* 54: 450-472.

Aranda-Olmedo, I., Ramos, J.L., and Marques, S. (2005) Integration of signals through Crc and PtsN in catabolite repression of *Pseudomonas putida* TOL plasmid pWW0. *Appl Environ Microbiol* 71: 4191-4198.

Aranda-Olmedo, I., Marin, P., Ramos, J.L., and Marques, S. (2006) Role of the *ptsN* gene product in catabolite repression of the *Pseudomonas putida* TOL toluene degradation pathway in chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol* 72: 7418-7421.

Bankier, A.T., Weston, K.M., Barrell, B.G. (1987) Random cloning and sequencing by the M13 dideoxynucleotide chain termination method. *Methods in Enzymology* 155: 51-93.

Blüschke, B., Volkmer-Engert, R., and Schneider, E. (2006) Topography of the surface of the signal-transducing protein EIIA(Glc) that interacts with the MalK subunits of the maltose ATPbinding cassette transporter (MalFGK2) of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 281: 12833-12840.

Boël, G., Mijakovic, I., Maze, A., Poncet, S., Taha, M.K., Larribe, M. et al. (2003) Transcription regulators potentially controlled by HPr kinase/phosphorylase in Gram-negative bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 5: 206-215.

Chavarria, M., Santiago, C., Platero, R., Krell, T., Casasnovas, J.M., and de Lorenzo, V. (2011) Fructose 1-phosphate is the preferred effector of the metabolic regulator Cra of *Pseudomonas putida*. *J Biol Chem* 286: 9351-9359.

Chubatsu, L., Monteiro, R., de Souza, E., de Oliveira, M., Yates, M., Wassem, R. et al. (2011) Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil*: 1-11.

Chugani, S.A., Whiteley, M., Lee, K.M., D'Argenio, D., Manoil, C., and Greenberg, E.P. (2001) QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 2752-2757.

Dean, D.A., Reizer, J., Nikaido, H., and Saier, M.H., Jr. (1990) Regulation of the maltose transport system of *Escherichia coli* by the glucose-specific enzyme III of the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system. Characterization of inducer exclusion-resistant mutants and reconstitution of inducer exclusion in proteoliposomes. J Biol Chem 265: 21005-21010.

Deutscher, J. (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. Curr Opin Microbiol 11: 87-93.

Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P.W. (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 70: 939-1031.

Dossonnet, V., Monedero, V., Zagorec, M., Galinier, A., Perez-Martinez, G., and Deutscher, J. (2000) Phosphorylation of HPr by the bifunctional HPr Kinase/P-ser-HPr phosphatase from *Lactobacillus casei* controls catabolite repression and inducer exclusion but not inducer expulsion. J Bacteriol 182: 2582-2590.

Doucette C.D., Schwab D.J., Wingreen N.S., Rabinowitz J.D. (2011) Alpha-ketoglutarate coordinates carbon and nitrogen utilization via enzyme I inhibition. Nature Chemical Biology 7894–901.

Dozot, M., Poncet, S., Nicolas, C., Copin, R., Bouraoui, H., Maze, A. et al. (2010) Functional characterization of the incomplete phosphotransferase system (PTS) of the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. PLoS One 5.

Edelstein, P.H., Edelstein, M.A., Higa, F., and Falkow, S. (1999) Discovery of virulence genes of *Legionella pneumophila* by using signature tagged mutagenesis in a guinea pig pneumonia model. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 8190-8195.

Henkin, T.M., Grundy, F.J., Nicholson, W.L., and Chambliss, G.H. (1991) Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacl* and *galR* repressors. Mol Microbiol 5: 575-584.

Higa, F., and Edelstein, P.H. (2001) Potential virulence role of the *Legionella pneumophila* *ptsP* ortholog. Infect Immun 69: 4782-4789.

Hurley, J.H., Faber, H.R., Worthylake, D., Meadow, N.D., Roseman, S., Pettigrew, D.W., and Remington, S.J. (1993) Structure of the regulatory complex of *Escherichia coli* III<sub>Glc</sub> with glycerol kinase. Science 259: 673-677

James, E.K.; Olivares, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. CRC Crit. Rev. Plant Sci. v. 17, p.77–119, 1997.

James, E.K.; Gyaneshwar, P.; Mathan, N. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growthpromotion bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. Mol. Plant-Microbe Interact. v. 15, p. 894–906, 2002.

Kaddor, C. and Steinbüchel, A. (2011) Implications of various phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system mutations on glycerol utilization and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in *Ralstonia eutropha* H16. AMB Express.2011;1: 16.

Kalamorz, F., Reichenbach, B., Marz, W., Rak, B., and Gorke, B. (2007) Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlnS expression depends on the small RNA GlnZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 65: 1518-1533.

Kimmel, A.R., Berger, S.L. (1987) Preparation of cDNA and the generation of cDNA libraries: overview. Methods In Enzymology 152: 307-316.

King, N.D., and O'Brian, M.R. (2001) Evidence for direct interaction between enzyme I(Ntr) and aspartokinase to regulate bacterial oligopeptide transport. *J Biol Chem* 276: 21311-21316.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. *Nature* 227: 680-685.

Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J.N., and Lazdunski, A. (2003) Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol Microbiol* 48: 199-210.

Lee, C.R., Koo, B.M., Cho, S.H., Kim, Y.J., Yoon, M.J., Peterkofsky, A., and Seok, Y.J. (2005) Requirement of the dephospho-form of enzyme IANtr for derepression of *Escherichia coli* K-12 *ilvBN* expression. *Mol Microbiol* 58: 334-344.

Lee, C.R., Cho, S.H., Yoon, M.J., Peterkofsky, A., and Seok, Y.J. (2007) *Escherichia coli* enzyme IANtr regulates the K<sup>+</sup> transporter TrkA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 4124-4129.

Lee, C.R., Cho, S.H., Kim, H.J., Kim, M., Peterkofsky, A., and Seok, Y.J. (2010) Potassium mediates *Escherichia coli* enzyme IIA(Ntr) -dependent regulation of sigma factor selectivity. *Mol Microbiol* 78: 1468-1483.

Mahajan-Miklos, S., Tan, M.W., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M. (1999) Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96: 47-56.

Merrick, M.J., and Coppard, J.R. (1989) Mutations in genes downstream of the *rpoN* gene (encoding sigma 54) of *Klebsiella pneumoniae* affect expression from sigma 54-dependent promoters. *Mol Microbiol* 3: 1765-1775.

Monedero, V., Kuipers, O.P., Jamet, E., and Deutscher, J. (2001) Regulatory functions of serine-46-phosphorylated HPr in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 183: 3391-3398.

Monedero, V., Maze, A., Boel, G., Zuniga, M., Beaufils, S., Hartke, A., and Deutscher, J. (2007) The phosphotransferase system of *Lactobacillus casei*: regulation of carbon metabolism and connection to cold shock response. *J Mol Microbiol Biotechnol* 12: 20-32.

Morales, G., Linares, J.F., Beloso, A., Albar, J.P., Martinez, J.L., and Rojo, F. (2004) The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *J Bacteriol* 186: 1337-1344.

Moreno, R., and Rojo, F. (2008) The target for the *Pseudomonas putida* Crc global regulator in the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator. *J Bacteriol* 190: 1539-1545.

Ninfa, A.J. (2007) Regulation of carbon and nitrogen metabolism: adding regulation of ion channels and another second messenger to the mix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 4243-4244.

Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernandez, A., Juarez, K., and Espin, G. (2008) Enzyme I NPr, NPr and IIA Ntr are involved in regulation of the poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 15: 244-254.

Olivares F.L., Baldani V.L.D., Reis V.M., Baldani J.I., Döbereiner J. (1996). Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of *Gramineae*. *Biology and Fertility of Soils* 21, 197-200.

Olivares F.L., James E.K., Baldani J.I., Döbereiner J. (1997). Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist*, 135.

Park, Y.H., Lee, B.R., Seok, Y.J., and Peterkofsky, A. (2006) In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 281: 6448-6454.

Pedrosa, F.O., Yates, M.G. (1984) Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. *FEMS Microbiol Lett* 23: 95-101.

Pedrosa F.O., Monteiro R.A., Wassem R., Cruz L.M., Ayub R.A., Colauto N.B., Fernandez M.A., Fungaro M.H., Grisard E.C., Hungria M. et al. (2011). Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. PLoS Genet. 7(5):e1002064

Pellicic, V., Reyrat, J.M., Gicquel, B. (1996) Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. J Bacteriol 178: 1197 – 1199.

Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C., and Iglewski, B.H. (1997) Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 179: 3127-3132.

Peterkofsky, A., Reizer, A., Reizer, J., Gollop, N., Zhu, P.P., and Amin, N. (1993) Bacterial adenylyl cyclases. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 44: 31-65.

Pfluger, K., and de Lorenzo, V. (2007) Growth-dependent phosphorylation of the PtsN (EIINtr) protein of *Pseudomonas putida*. J Biol Chem 282: 18206-18211.

Pfluger-Grau, K., and Gorke, B. (2010) Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. Trends Microbiol 18: 205-214.

Pfluger-Grau, K., Chavarria, M., and de Lorenzo, V. (2011) The interplay of the EIIA(Ntr) component of the nitrogen-related phosphotransferase system (PTS(Ntr)) of *Pseudomonas putida* with pyruvate dehydrogenase. Biochim Biophys Acta.

Pimentel, D., McLaughlin, L., Zepp, A., Lakitan, B., Kraus, T., Kleinman, P., Vancini, F., Roach, J., Graap, E., Keeton W.S., Seli, G. (1993). Environmental and economic effects of reducing pesticide use in agriculture. Agriculture, Ecosystems and Environment.46:273-288.

Pinedo, C.A., and Gage, D.J. (2009) HPrK regulates succinate-mediated catabolite repression in the gram-negative symbiont *Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol 191: 298-309.

Postma, P.W., Lengeler, J.W., and Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 57: 543-594.

Powell, B.S., Court, D.L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X. et al. (1995) Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. Enzyme IIANtr affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an erats mutant. *J Biol Chem* 270: 4822-4839.

Rabus, R., Reizer, J., Paulsen, I., Saier, M. H., Jr. (1999) Enzyme I(Ntr) from *Escherichia coli*. A novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor, NPr. *Journal of Biological Chemistry*. v. 274, p. 26185 – 91.

Reizer, J., Novotny, M.J., Panos, C., and Saier, M.H., Jr. (1983) Mechanism of inducer expulsion in *Streptococcus pyogenes*: a two-step process activated by ATP. *J Bacteriol* 156: 354-361.

Reizer, J., Reizer, A., Merrick, M.J., Plunkett, G., 3rd, Rose, D.J., and Saier, M.H., Jr. (1996) Novel phosphotransferase-encoding genes revealed by analysis of the *Escherichia coli* genome: a chimeric gene encoding an Enzyme I homologue that possesses a putative sensory transduction domain. *Gene* 181: 103-108.

Saier, M.H., Jr., Novotny, M.J., Comeau-Fuhrman, D., Osumi, T., and Desai, J.D. (1983) Cooperative binding of the sugar substrates and allosteric regulatory protein (enzyme III<sub>Glc</sub> of the phosphotransferase system) to the lactose and melibiose permeases in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 155: 1351-1357.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 1989.

Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Puhler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *E. coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145: 69–73.

Schumacher, M.A., Seidel, G., Hillen, W., and Brennan, R.G. (2007) Structural mechanism for the fine-tuning of CcpA function by the small molecule effectors glucose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate. *J Mol Biol* 368: 1042-1050.

Schumacher, M.A., Allen, G.S., Diel, M., Seidel, G., Hillen, W., and Brennan, R.G. (2004) Structural basis for allosteric control of the transcription regulator CcpA by the phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell* 118: 731-741.

Segura, D., and Espin, G. (1998) Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly-beta-hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 180: 4790-4798.

Simon, R., Priefer, U., Puhler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vitro* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *BioTechnology* 1: 784-791.

Sondej, M., Sun, J., Seok, Y.J., Kaback, H.R., and Peterkofsky, A. (1999) Deduction of consensus binding sequences on proteins that bind IIAGlc of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system by cysteine scanning mutagenesis of *Escherichia coli* lactose permease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3525-3530.

Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S., and Ausubel, F.M. (1999) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 715-720.

Tan, M.W., Rahme, L.G., Sternberg, J.A., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2408-2413.

Titgemeyer, F., Mason, R.E., and Saier, M.H., Jr. (1994) Regulation of the raffinose permease of *Escherichia coli* by the glucose-specific enzyme IIA of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J Bacteriol* 176: 543-546.

Velazquez, F., Pfluger, K., Cases, I., De Eugenio, L.I., and de Lorenzo, V. (2007) The phosphotransferase system formed by PtsP, PtsO, and PtsN proteins controls production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 189: 4529-4533.

Venturi, V. (2003) Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? *Mol Microbiol* 49: 1-9.

Warner, J.B., and Lolkema, J.S. (2003) CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 475-490.

Whiteley, M., Lee, K.M., and Greenberg, E.P. (1999) Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13904-13909.

Xu, H., Lin, W., Xia, H., Xu, S., Li, Y., Yao, H. et al. (2005) Influence of *ptsP* gene on pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 253: 103-109.

Yuste, L., and Rojo, F. (2001) Role of the *crc* gene in catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway. *J Bacteriol* 183: 6197-6206.

Zhang, S., Chen, Y., Potvin, E., Sanschagrín, F., Levesque, R.C., McCormack, F.X., and Lau, G.W. (2005) Comparative signature-tagged mutagenesis identifies *Pseudomonas* factors conferring resistance to the pulmonary collectin SP-A. *PLoS Pathog* 1: 259-268.