

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CÍCERO SILVANO TEIXEIRA

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE POLIHIDROXIALCANOATO SINTASES EM
Herbaspirillum seropedicae ESTIRPE SmR1**



CURITIBA
2015

CÍCERO SILVANO TEIXEIRA

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE POLIHIDROXIALCANOATO SINTASES
EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SmR1**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências - Bioquímica do Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Berenice Reynaud Steffens.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos.

CURITIBA

2015

TERMO DE APROVAÇÃO

CÍCERO SILVANO TEIXEIRA

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE POLIHIDROXIALCANOATO SINTASES EM *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE SmR1

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Fabio de Oliveira Pedrosa
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Helisson Faoro
Instituto Carlos Chagas
Fiocruz-Paraná

Prof. Dr. Doumit Camillos Neto
Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego
Departamento de Análises Clínicas
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 18 de maio de 2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Eulália (*in memorium*) e João, pelo exemplo de ser humano, pelo amor e carinho destinado aos seus filhos. A minha Sandra, pelo amor e companheirismo desde a minha graduação. Ao meu Carlos Eduardo, que faz desse mundo um lugar melhor para se viver desde a sua chegada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Maria Berenice Steffens, pela orientação durante todo este trabalho e pelos sábios conselhos para a minha melhoria como cientista. Agradeço-lhe a atenciosa e singela recepção quando vim conhecer o Núcleo de Fixação de Nitrogênio em 2010 e a ajuda contínua durante este doutorado.

Ao meu orientador, Marcelo Müller, pelo exemplo de cientista e pela dedicação e sinceridade. Agradeço-lhe os conselhos e incentivos na busca do conhecimento.

À minha banca interna composta pelos professores Fábio de Oliveira Pedrosa e Leda Satie Chubatsu. Agradeço-lhes as sugestões para melhoria do trabalho escrito.

Às professoras Leda Satie Chubatsu e Rose Adele Monteiro que acompanharam a minha tese durante o doutorado através dos relatórios anuais. Agradeço-lhes as sugestões para o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores Emanuel Maltempo de Souza e Fábio de Oliveira Pedrosa, pelo exemplo como cientistas e por proporcionar todas as condições para a execução deste trabalho. Agradeço-lhes o intercâmbio contínuo com outros cientistas, que muito contribuiu para o meu desenvolvimento pessoal e científico.

Ao professor Ray Dixon. A sua leitura do manuscrito e a sugestão de experimentos contribuíram para o enriquecimento do trabalho.

Aos demais professores do Núcleo de Fixação de Nitrogênio, pela disponibilidade. Em especial, à professora Roseli Wassem sempre solícita quando a questioneei a respeito de algum assunto acadêmico.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, pela atenção e pelos ensinamentos.

Aos técnicos Alex, Marilza, Roseli Prado, Valter Baura, pelo apoio. Em especial a minha amiga Roseli, pelo seu companheirismo e a sua atenção que foram muito importantes no desenvolvimento desta tese. Ao Valter, pela disponibilidade e principalmente pela paciência no ensino do uso do ÄKTA e ajuda na purificação das proteínas para a produção dos anticorpos.

Ao companheiro e irmão Luis Paulo. Um parceiro que não mediu esforços em me ajudar dentro e fora do lab. Obrigado companheiro, o teu auxílio foi deveras importante.

Aos companheiros Marco Aurélio e Marco Kadowaki. Para mim, dois exemplos de jovens cientistas e inteligência. Marco Aurélio, obrigado pelos conselhos sempre serenos e pelo empenho em me ajudar bem como outros membros do Lab.

Aos demais amigos da sala 279, Alan, as Fernandas Holthmam e Pinheli, Lucão, Marina, Maritza e Vivian. Amigos, os momentos de descontração e os bons conselhos foram de grande valia para minha formação pessoal.

Aos amigos do Anexo. Em especial, Adriano, um companheiro sempre solícito.

Ao companheiro Marcelo Batista. A doação das estirpes mutantes Δfnr , os experimentos relacionados ao meu trabalho e o auxílio em ensaios do lab contribuíram para o enriquecimento da minha tese.

À Michelle, pela realização do transcriptoma e orientação para extrair dados deste experimento. Este transcriptoma abre um leque para uma maior compreensão do envolvimento de genes cujo produto tem função desconhecida em *H. seropedicae*.

Aos companheiros Joseph e Rodrigo. Agradeço-lhes a ajuda com as ferramentas de bioinformática, que proporcionaram uma maior compreensão dos dados do transcriptoma.

Ao Glaucio Valdameri que me ajudou com os experimentos de citometria de fluxo.

À Geisa Caprini, pela identificação das PHA sintases de *H. seropedicae* por meio da técnica de Espectrometria de massas.

À Carol Kukulj. A sua ajuda na purificação de proteínas a partir de SDS-PAGE foi importante na produção de anticorpos contra as PHA sintases de *H. seropedicae*.

Aos amigos das salas 271 e 272. Em especial, Edileusa, Paloma e Rafaela pela ajuda em experimentos que contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais amigos do Núcleo de Fixação de Nitrogênio. Os momentos de descontração na sala do cafezinho foram fundamentais.

Aos amigos do “WAR”, Bel, Bruno, Marco Aurélio, Sara e Tirapelle. Obrigado pelos momentos de muitos risos. Os seus conselhos foram importantes para a minha formação pessoal.

Aos amigos Arquimedes, Lauro e Popó que foram sempre muito prestativos.

Ao camarada Edvar. Apesar da distância, o amigo contribuiu tanto para a minha formação acadêmica quanto para a pessoal.

Ao casal Djan e Marcela. Apesar da distância, sinto-me lisonjeado pela sua amizade e solicitude.

Aos amigos Fred e Laércio, que foram muito prestativos e que me acolheram quando cheguei à Curitiba. Eternamente grato.

Às agências financeiras, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro e bolsa concedida.

Quanto mais sabemos, melhor entendemos a vastidão de nossa ignorância e mais perguntas somos capazes de fazer, perguntas que, previamente, nem poderiam ter sido sonhadas.

Daniel W. Graham

SUMÁRIO

LISTAS DE QUADROS.....	XII
LISTAS DE FIGURAS.....	XIII-XIV
LISTAS DE TABELAS.....	XV
LISTAS DE ABREVIATURAS.....	XVI-XVII
RESUMO.....	XVIII
ABSTRACT.....	XIX
1. INTRODUÇÃO.....	1-2
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. FUNDAMENTAÇÃO TEORICA.....	4-26
3.1. BIOPOLÍMEROS.....	4-6
3.2. POLIHIDROXIALCANOATOS.....	6-13
3.3. METABOLISMO DO PHA.....	13-22
3.3.1. β -cetoacil-CoA tiolase.....	15-16
3.3.2. Acetoacetil-CoA redutase.....	16-17
3.3.3. PHB sintase.....	18-22
3.4. O ENVOLVIMENTO DE REGULADORES GLOBAIS SENSÍVEIS A OXIGÊNIO NO METABOLISMO DE PHA.....	22-23
3.5. O METABOLISMO DE PHB EM <i>H. seropedicae</i>	24-26
4. METODOLOGIA.....	27-47
4.1. ANÁLISE UTILIZANDO FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA.....	27
4.1.1 Análise das sequências de genes alvos.....	27
4.2. MATERIAIS GERAIS E MÉTODOS DE MICROBIOLOGIA.....	28-32
4.2.1. Bactérias e plasmídeos.....	28-29

4.2.2. Meios de cultura, condições de cultivo e estoque dos microrganismos..	30-31
4.2.3. Antibióticos.....	32
4.3. MÉTODOS DE MANIPULAÇÃO DE DNA.....	32-36
4.3.1. Métodos e purificação de DNA genômico de <i>H. seropedicae</i>	32-34
4.3.2. Reação em cadeia da DNA polimerase.....	33
4.3.3. Clonagem em vetor contendo o gene repórter <i>lacZ</i>	34
4.3.4. Minipreparação de plasmídeo por lise alcalina.....	34
4.3.5. Sequenciamento de DNA.....	34-35
4.3.6. Clivagem do DNA com enzimas de restrição.....	35
4.3.7. Ligação de DNA inserto a vetores.....	35
4.3.8. Eletroforese de DNA.....	36
4.4. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	36-37
4.4.1. Transformação por choque térmico em <i>E. coli</i>	36
4.4.2. Transferência de DNA plasmidial por conjugação bacteriana biparental..	37
4.5. ESTRATÉGIA DE CONSTRUÇÃO DO MUTANTE PARA O GENE <i>phaR</i> DE <i>H.seropedicae</i>	37-38
4.6. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO <i>IN VIVO</i> DAS SINTASES DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i>	39-41
4.6.1. Determinação da atividade de β -galactosidase.....	39
4.6.2. Determinação da atividade β -Galactosidase em <i>H. seropedicae</i> cultivado em diferentes concentrações de oxigênio.....	40
4.6.3. Quantificação de PHA.....	40-41
4.6.3.1. Avaliação da produção de PHA nas estirpes selvagem (SmR1) e mutante (Δ <i>phaC1</i>) de <i>H. seropedicae</i>	41
4.7. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO <i>IN VIVO</i> DAS PROTEÍNAS Fnr DE <i>H. seropedicae</i>	41-42
4.7.1. Determinação da atividade de β -galactosidase.....	41
4.7.2. Determinação da atividade de β -galactosidase de <i>H. seropedicae</i> cultivado em diferentes aerações (250 e 120 rpm).....	42
4.7.3. Avaliação da produção de PHA nas estirpes selvagem (SmR1) e mutantes Δ <i>fnr</i> de <i>H. seropedicae</i>	42

4.8. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO MUTANTE $\Delta phaC1$ DE <i>H. seropedicae</i>	43-46
4.8.1. Resistência a diferentes condições de estresse.....	43-44
4.8.1.1. Curva de crescimento de <i>H. seropedicae</i> submetido a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	43
4.8.1.2. Curva de crescimento de <i>H. seropedicae</i> submetido a diferentes concentrações de metilviolgênio.....	43
4.8.1.3. Determinação dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio por citometria de fluxo.....	44
4.8.2. Determinação de atividade nitrogenase de <i>H. seropedicae</i> SmR1 e $\Delta phaC1$	44-45
4.8.3. Análise do perfil transcriptômico das estirpes selvagem SmR1 e mutante $\Delta phaC1$ <i>H. seropedicae</i>	45-46
5.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47-111
<i>H. seropedicae</i> APRESENTA QUATRO GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS HOMÓLOGAS ÀS PHA SINTASES.....	47-55
5.1. PRODUÇÃO DE PHB NAS ESTIRPES SELVAGEM E MUTANTE $\Delta phaC1$ de <i>H. seropedicae</i>	56-57
5.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS PROMOTORES DOS GENES CODIFICANTES DE PHA SINTASES.....	58-69
5.3. PRODUÇÃO DE PHB NOS DIFERENTES MUTANTES Δfnr DE <i>H. seropedicae</i>	70-71
5.4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS PROMOTORES DO GENE <i>fnr1</i> e OPERON <i>fixNOP</i>	71-73
5.5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE <i>fnr1</i> SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE AERAÇÃO EM <i>H. seropedicae</i>	74-76
5.6. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE <i>phaC2</i> SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO.....	77-78
5.7. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO MUTANTE ($\Delta phaC1$) DE <i>H. seropedicae</i>	79-111

5.7.1. Determinação dos níveis de EROs.....	79-80
5.7.2. Determinação de atividade nitrogenase de <i>H. seropedicae</i> SmR1 e $\Delta phaC1$ e da expressão do promotor do gene <i>nifB</i>	81-84
5.7.3. Curva de crescimento de <i>H. seropedicae</i> exposto a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	85-86
5.7.4. Curva de crescimento de <i>H. seropedicae</i> exposto a diferentes concentrações de um gerador de superóxido.....	87-88
5.7.5. Avaliação da expressão do promotor do gene <i>fnr1</i> sob diferentes condições de aeração e acompanhada pela determinação dos níveis de EROS em <i>H. seropedicae</i>	89-91
5.7.6. Análise transcriptômica das estirpes selvagem SmR1 e mutante $\Delta phaC1$ de <i>H. seropedicae</i>	92-111
5.7.6.1. Perfil de transcrição de genes envolvidos no metabolismo de PHB em <i>H. seropedicae</i>	95-99
5.7.6.2. Perfil de transcrição de genes codificantes de proteínas associadas ao grânulo de PHB em <i>H. seropedicae</i>	99-100
5.7.6.3. Perfil de transcrição de genes envolvidos no metabolismo de carbono.	101-111
6.0. CONCLUSÕES	112-114
7.0. LITERATURA CITADA	115-136
8.0 ANEXOS	137-143

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Propriedades dos biopolímeros.....	5
Quadro 2. Alguns monômeros constituintes dos PHAs.....	9
Quadro 3. Características cinéticas de enzimas envolvidas na síntese de PHB.....	17
Quadro 4. Classes de PHA sintases.....	19
Quadro 5. Lista de estirpes e plasmídeos utilizados.....	28-29
Quadro 6. Componentes constituintes do meio LB.....	30
Quadro 7. Componentes constituintes do meio SOB.....	30
Quadro 8. Componentes constituintes do meio SOC.....	30
Quadro 9. Componentes constituintes do meio NFb-malato.....	31
Quadro 10. Antibióticos utilizados e suas respectivas concentrações.....	32
Quadro 11. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação das regiões promotoras.....	33
Quadro 12. Sequência de temperaturas para a reação de sequenciamento....	35
Quadro 13. Compostos constituintes do tampão Z completo.....	39
Quadro 14. Categorias funcionais do COG.....	143

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura subcelulares formadas por biopolímeros.....	6
Figura 2. Biossíntese de polihidroxicanoatos (PHAs) catalisada por polihidroxicanoato sintase (PhaC).....	7
Figura 3. Estrutura geral dos polihidroxicanoatos.....	7
Figura 4. Grânulos de PHB em <i>Ralstonia eutropha</i>	12
Figura 5. Proteínas requeridas para a homeostase de PHB e estrutura do grânulo proposta.....	12
Figura 6. Via metabólicas envolvidas na biossíntese de PHA em <i>Pseudomonas</i> e PHB em <i>Ralstonia</i>	15
Figura 7. Estrutura primária das PHA sintases.....	20
Figura 8. Mecanismo catalítico proposto para a reação de polimerização pela PHB sintase.....	22
Figura 9. Alinhamento entre PHA sintases de <i>H. seropedicae</i> e <i>R. eutropha</i>	53
Figura 10. Árvore filogenética construída usando alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos de várias PHA sintases.....	54
Figura 11. Correlação entre os grupos filogenéticos e organização dos domínios das PHA sintases.....	55
Figura 12. Acúmulo de PHB nas estirpes selvagem SmR1 e mutante $\Delta phaC1$ de <i>H. seropedicae</i>	57
Figura 13 Atividade β -galactosidase das estirpes de <i>H. seropedicae</i> smr1 e $\Delta phaC1$ transformadas.....	61
Figura 14 Atividade β -galactosidase da estirpe de <i>H. seropedicae</i> $\Delta phap12$ transformadas.....	65
Figura 15. Atividade β -galactosidase das estirpes de <i>H. seropedicae</i> SmR1 e $\Delta phaR$ transformadas.....	66
Figura 16 Atividade β -galactosidase das estirpes SmR1 e diferentes mutantes Δfnr	68

Figura 17. Operon <i>Hsero_0262ptaackAphaC3</i> e a região à montante deste operon.....	69
Figura 18. Produção de PHB nas estirpes selvagem SmR1 e mutantes Δfnr (MB1, MB2, MB3, MB21, MB23, MB13 E MB231).....	71
Figura 19. Atividade β -galactosidase das estirpes de <i>H. seropedicae</i> SmR1, $\Delta phaC1$ e triplo mutante <i>fnr</i> (MB231).....	73
Figura 20. Atividade β -galactosidase das estirpes de <i>H. seropedicae</i> SmR1 E $\Delta phaC1$ transformadas com a fusão transcricional.....	76
Figura 21. Análise transcricional da fusão transcricional <i>phaC2-lacZ</i> (<i>pCST3</i>) em diferentes concentrações de oxigênio.....	78
Figura 22. O efeito das diferentes condições de aeração (250 ou 120 rpm) na produção em células das estirpes selvagem SmR1.....	80
Figura 23. Atividade nitrogenase na estirpe SmR1, mutante $\Delta phaC1$ e mutante $\Delta phaC1$ complementado.....	83
Figura 24. Análise transcricional da fusão transcricional <i>nifB-lacZ</i> em diferentes concentrações de oxigênio (4% e 20,8%).....	84
Figura 25. Curva de crescimento das estirpes selvagem SMR1 e mutante $\Delta phaC1$ na presença de diferentes concentrações.....	86
Figura 26. Curva de crescimento das estirpes selvagem SmR1 e mutante $\Delta phaC1$ na presença de diferentes concentrações de MV.....	88
Figura 27. Atividade β -galactosidase e produção total de EROS das estirpes SmR1 e $\Delta phaC1$ de <i>h. seropedicae</i> transformadas.....	91
Figura 28. Classificação segundo o COG dos genes diferencialmente expressos na comparação dos dados do transcriptoma do mutante.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identidade e similaridade de PHA sintases de <i>H. seropedicae</i> SmR1...	48
Tabela 2. Identidade e similaridade de PHA sintases de <i>H. seropedicae</i> SmR1 e <i>R. eutropha</i> H16.....	49
Tabela 3. Resumo do mapeamento das sequências obtidas com o genoma de <i>H. seropedicae</i>	93
Tabela 4. Perfil de transcrição dos genes envolvidos no metabolismo de PHB em <i>H. seropedicae</i>	97
Tabela 5. Perfil de transcrição de genes codificantes proteínas associadas aos grânulos de PHB.....	100
Tabela 6. Genes diferencialmente expressos envolvidos no metabolismo carbono em <i>H. seropedicae</i>	103-104

LISTA DE ABREVIATURAS

Å - Angstrom

ADP - Adenosina difosfato

ATP - Adenosina trifosfato

BSA - Albumina de soro bovino

cDNA - DNA complementar

CoA - Coenzima A

COG - *Clusters of Orthologous Groups*

Da - Dalton

DCF - 2', 7' - Diclorofluoresceína

DCFH-DA - 2', 7' - Diacetato de diclorofluoresceína

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

D.O.₆₀₀ - Densidade óptica a 600 nm

DP - Desvio padrão

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GC - Cromatografia gasosa

IPTG - Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo

MV - Metilviologênio

m/v - Relação massa e volume

MW - Massa molecular

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NADPH - Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NADP⁺ - Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado

ONPG - O-nitrofenil-β-D-galactosídeo

ORF - Região codificadora da proteína

pb - pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PEG - Polietileno glicol
PHA - Polihidroxialcanoato
PHB - Polihidroxibutirato
PSC - Peso seco da cultura de células
RNA - Ácido ribonucleico
mRNA - RNA mensageiro
rRNA - RNA ribossomal
rpm - Rotações por minuto
SDS - Dodecilsulfato de sódio
TAE - Tampão Tris-acetato-EDTA
TBE - Tampão Tris-borato-EDTA
Tris - Tris (hidroximetil)-aminometano
UV - Ultravioleta
x *g* - Aceleração da Gravidade

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria da classe Betaproteobacteria que pode colonizar plantas de forma endofítica e epifítica, e promover o crescimento vegetal. Esta propriedade está relacionada à sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, produzir fitormônios e colonizar o interior dos tecidos vegetais. Além disso, produz polihidroxialcanoatos (PHAs), uma classe de polímeros biodegradáveis constituídos de resíduos de ácidos 3-hidroxialcanóicos sintetizados como reserva de energia e carbono. O polihidroxibutirato (PHB) é o PHA melhor caracterizado. Este polímero é sintetizado em condições limitantes de crescimento e é armazenado na forma de grânulos no interior da célula bacteriana. O genoma de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 apresenta 13 genes potencialmente envolvidos no metabolismo de PHA, dentre os quais quatro foram anotados como codificadores de PHA sintases. O objetivo deste trabalho foi investigar o papel das PHA sintases de *H. seropedicae* codificadas pelos genes *phaC1*, 2, 3 e 4, bem como, os efeitos fisiológicos causados pela ausência deste polímero. O nível de transcrição destes genes foi avaliado nas estirpes selvagem SmR1 e $\Delta phaC1$ (deficiente na síntese de PHB), contendo fusões transcricionais com o gene repórter *lacZ*. Somente o promotor *phaC2* no mutante $\Delta phaC1$ apresentou expressão inferior. Um possível efeito da proteína reguladora PhaR ou da proteína sensora de níveis redox, Fnr, na baixa taxa de transcrição de *phaC2*, na estirpe $\Delta phaC1$, foi investigado. Não houve alteração do nível de expressão dos genes *phaC* no mutante $\Delta phaR$. Também não houve expressão diferencial dos genes *phaC1*, 3 e 4 nos mutantes Δfnr , mas *phaC2* foi reprimido principalmente nos mutantes *fnr1* e 3. Estes resultados sugerem que a expressão do gene *phaC2* seja dependente de Fnr e não de PhaR. Como o gene *phaC2* apresentou baixo nível de transcrição nas estirpes $\Delta phaC1$ e Δfnr , foi investigado se a expressão diminuída de *phaC2* estaria relacionada com a ausência de PHB e se esta ausência poderia afetar negativamente a atividade de Fnr. Todos os mutantes Δfnr produziram quantidades de PHB similares a estirpe selvagem SmR1 e isto indica que é a deleção dos genes *fnr* que afeta a transcrição de *phaC2* e não a ausência de PHB. Assim, conclui-se que é a deleção dos genes *fnr* que afeta a transcrição de *phaC2* e não a ausência de PHB. Ensaio com fusões transcricionais *fnr1-lacZ* e *fixN-lacZ*, cujas expressões dependem de Fnr, mostraram que ambos os genes apresentam expressão diminuída na estirpe $\Delta phaC1$, indicando um efeito negativo da ausência de PHB na atividade de Fnr. Em relação à fixação biológica de nitrogênio (BNF), a estirpe $\Delta phaC1$ apresentou uma redução de 89% na capacidade de reduzir o acetileno e isto indica que a mutação também interfere na BNF. Em relação à sensibilidade ao estresse oxidativo, a estirpe $\Delta phaC1$ foi mais sensível ao metilviologênio (gerador de superóxido) e produziu mais EROs que a estirpe SmR1, em condições padrão de crescimento. O ambiente desfavorável provocado pela produção mais elevada de EROs pela estirpe $\Delta phaC1$ afeta negativamente os grupamentos Fe-S das metaloproteínas como Fnr e Nitrogenase. Provavelmente, o metabolismo do PHB em *H. seropedicae* funcione como um ciclo que pode estocar carbono e oxidar NADPH durante sua síntese e liberar carbono e reduzir NAD⁺ durante sua mobilização. Este metabolismo modula a disponibilidade de equivalentes redutores que reduzem o estresse oxidativo, que é um desequilíbrio do controle e da sinalização do estado redox. Os resultados desta Tese mostram a importância da produção de PHB no controle oxidativo e na proteção das proteínas Fnr e Nitrogenase e poderão contribuir para a elucidação do controle redox via a produção de PHB também em outras bactérias produtoras deste polímero, sugerindo uma nova função ao PHB além de estoque de carbono e energia.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*; PHA sintases; PHB.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is a bacterium that belongs to β -proteobacteria class, which is able to establish endophytic associations and to promote plant growth. This property is related to its ability to fix atmospheric nitrogen and to produce phytohormones. Furthermore, it produces polyhydroxyalkanoates (PHAs), which are a class of biodegradable polymers containing 3-hydroxyalkanoic acid monomers synthesized as a carbon and energy source. PHB is the best characterized PHA. This polymer is synthesized under limited nutrient conditions and stored as granules inside bacteria cells. The genome of *H. seropedicae* SmR1 revealed 13 genes potentially involved in PHA metabolism and 4 of these were annotated as PHA synthases. The aim of this work was to investigate the role of the PHA synthases from *H. seropedicae* encoded by *phaC1*, 2, 3 and 4 genes, as well as physiological effects produced by the absence of this polymer. Transcription level of these genes was evaluated in wild-type SmR1 and $\Delta phaC1$, which does not produce PHB, carrying out *lacZ* transcriptional fusions. The *phaC2* promoter showed lower expression only in $\Delta phaC1$ mutant. A possible effect of transcriptional regulators PhaR and/or Fnr in lower transcription in $\Delta phaC1$ strain was investigated. There was not expression change of *phaC* genes in $\Delta phaR$ mutant. There was not expression change of *phaC1*, 3 e 4 genes in Δfnr mutants either, but *phaC2* was repressed mainly *fnr1* and 3 mutants. These results suggest that *phaC2* showed an Fnr-dependent expression and independent of PhaR. Since *phaC2* did shown low transcription in $\Delta phaC1$ and Δfnr mutant strains, it was investigated if low expression of *phaC2* would be related to the PHB absence and/or if the lacking of PHB would affect negatively the Fnr activity. The PHB accumulation was measured in Δfnr mutants and all of them produced similar PHB moieties as compared to SmR1. Therefore, it is possible to conclude that the *fnr* deletions, instead the lack of PHB, affect the *phaC2* transcription. Assays with *fnr1-lacZ* e *fixN-lacZ* transcriptional fusions, whose expressions depend on Fnr, showed that both genes exhibited lower expression in $\Delta phaC1$ strain, indicating a negative effect of PHB absence in the Fnr activity. With regard to biological nitrogen fixation (BNF), $\Delta phaC1$ strain showed an 89% reduction in acetylene reduction, indicating that the lack of PHB affects BNF as well. Concerning sensitivity to oxidative stress, the $\Delta phaC1$ was more susceptible to methyl viologen (a superoxide generator) and produces more ROS than SmR1. The unfavorable environment created by more elevated production of ROS in $\Delta phaC1$ strain affects negatively the Fe-S cluster of metalloproteins, such as Fnr and nitrogenase. Possibly PHB metabolism in *H. seropedicae* functions as cycle which can store carbon and oxidize NADPH in its synthesis and, release carbon and reduce NAD⁺ in its mobilization. This metabolism modulates the availability of reducing equivalents that alleviates the oxidative stress, which is a disruption of redox signaling and control. The results of this work showed the importance of PHB synthesis in oxidative control and possibly for protection of metalloproteins, and may contribute to elucidate the redox control through PHB synthesis in other PHB-accumulating bacteria, bring a new function to PHB further the carbon and energy storage.

Key-words: *Herbaspirillum seropedicae*; PHA synthases; PHB.

1. INTRODUÇÃO

Herbaspirillum seropedicae é uma betaproteobactéria, endofítica e fixadora de nitrogênio, que promove o crescimento de plantas de interesse agrícola, tais como milho, arroz, trigo e cana de açúcar (BALDANI *et al.*, 1986; JAMES e OLIVARES, 1998; JAMES *et al.*, 2002; RONCATO-MACARI *et al.*, 2003; PEDROSA *et al.*, 2011). Devido ao fato de *H. seropedicae* fixar nitrogênio e excretá-lo para a planta associada (RONCATO-MACARI *et al.*, 2003; PANCKIEVICZ *et al.*, 2015), este microrganismo apresenta grande potencial de aplicação como biofertilizante na substituição de fertilizantes químicos que causam impactos econômicos e ambientais negativos à produção agrícola (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI e BALDANI, 2005).

O genoma de *H. seropedicae* estirpe SmR1 foi sequenciado e anotado pelo Programa Genopar, revelando informações importantes sobre vários aspectos do seu metabolismo (PEDROSA *et al.*, 2011). Dentre os 4804 genes anotados, foram identificados 13 genes potencialmente envolvidos na síntese de polihidroxicanoatos (PHAs) que são polímeros formados pela esterificação de hidroxídeos de diversos comprimentos de cadeias carbônicas. A produção de PHAs ocorre quando há excesso de carbono e escassez de algum outro nutriente que possa limitar o crescimento celular ou o funcionamento do metabolismo central do microrganismo. Neste caso, o fluxo de acetil-CoA é redirecionado do ciclo do ácido cítrico para a síntese de PHAs (HAYWOOD *et al.*, 1988). A síntese de PHAs consome equivalentes redutores, que são regenerados durante a degradação deste polímero. Portanto, além de atuar como um estoque de carbono, os PHAs são considerados como componentes importantes para manter o tamponamento de equivalentes redutores na célula (BABEL, 1992; De EUGENIO *et al.*, 2010; ESCAPA *et al.*, 2012). O mutante *phbC* deficiente na síntese de PHB em *Azorhizobium caulinodans* apresentou atividade nitrogenase reduzida, enquanto que o mutante *phaC* de *Rhizobium etli* também deficiente na síntese de PHB demonstrou maior capacidade de fixar nitrogênio do que a estirpe selvagem (MANDON *et al.*, 1998; CEBALLOS *et al.*, 1996). A incapacidade de sintetizar PHB nestes mutantes afeta a fixação

de nitrogênio, possivelmente através de um desequilíbrio redox e do aumento da razão $[NADH]/[NAD^+]$ (MANDON *et al.*, 1998; CEBALLOS *et al.*, 1996).

Além disso, foi observado que poli-3-hidroxi-butirato (PHB), que é o PHA mais estudado, está envolvido na resistência contra várias condições de estresse, tais como deficiência nutricional, radiação ultravioleta, calor, choque osmótico, dissecação e crescimento na presença de peróxido de hidrogênio (TAL e OKON, 1985; OKON e ITZIGSOHN, 1992; KADOURI *et al.*, 2002; 2003 e 2005). PHB é fonte de energia e carbono para os microrganismos que vivem em ambientes nutricionalmente pobres. Desse modo, PHB garante uma vantagem competitiva em relação às outras bactérias, que são incapazes de sintetizar polímeros de reserva (ANEJA *et al.*, 2005; KADOURI *et al.*, 2005). Por exemplo, a capacidade do microrganismo produtor de PHB *Sinorhizobium meliloti* competir com outros microrganismos pelos recursos nutricionais limitados provenientes do solo é um fator importante para o estabelecimento de uma simbiose com planta *Medicago sativa*, alfafa (ANEJA *et al.*, 2005).

A espécie *Herbaspirillum seropedicae* foi nomeada a partir de bactérias isoladas da rizosfera, interior e superfície de raízes de milho, sorgo e arroz (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1991). Catalán e colaboradores (2007) observaram que as estirpes de *H. seropedicae* Z67, Z69 e Z78 foram capazes de produzir PHB quando cultivadas com diferentes fontes de carbono e o copolímero poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) quando cultivadas com ácido nonanoico como única fonte de carbono. *H. seropedicae* SmR1 é um mutante espontâneo resistente a estreptomicina e oriundo da estirpe Z78 (PEDROSA *et al.*, 1997). Estudos sobre o metabolismo de PHB em *H. seropedicae* SmR1 indicaram que o regulador transcricional PhaR regula a transcrição dos genes *phaP1* e *phaR* e que a proteína PhaC1 é a principal responsável pela síntese de PHB nesta bactéria (KADOWAKI *et al.*, 2011; TIRAPELLE *et al.*, 2013), no entanto pouco se sabe a respeito da regulação da expressão dos genes que codificam PHA sintases e como a ausência deste polímero afeta a fisiologia desta bactéria.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar os genes codificantes das polihidroxicanoato (PHA) sintases de *H. seropedicae* e avaliar o impacto fisiológico que a ausência de polihidroxibutirato (PHB) causa à bactéria.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Determinar o nível de transcrição dos genes *phaC1*, *phaC2*, *phaC3* e *phaC4* na estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae* e nos mutantes em genes envolvidos no metabolismo de PHA ($\Delta phaC1$, $\Delta phaP12$, $\Delta phaR$) e em genes codificantes das proteínas Fnr1, Fnr2 e Fnr3;
- ✓ Caracterizar fenotipicamente o mutante $\Delta phaC1$ quanto à resistência a fatores de estresse abióticos e quanto à fixação biológica do nitrogênio.
- ✓ Analisar o perfil transcriptômico das estirpes selvagem SmR1 e mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae* no início das fases exponencial e estacionária.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Biopolímeros

Diversos tipos de biopolímeros são produzidos pelos seres vivos e constituem a principal fração do peso seco da célula (PÖTTER e STEINBÜCHEL, 2005). Conforme a sua estrutura química, os biopolímeros são classificados em oito classes: 1) ácidos nucleicos, como DNA e RNA; 2) poliamidas, tais como proteínas e poli (peptídeos); 3) polissacarídeos, como amido, celulose e dextranas; 4) polioésteres (PTEs), tal como poli (3-mercaptoproprianato); 5) polianidridos, como polifosfatos; 6) polisoprenoides, como a borracha; 7) polifenóis, tal como lignina; 8) polioxoésteres orgânicos, tais como polihidroxialcanoatos (PHAs), polimalato e cutina (PÖTTER e STEINBÜCHEL, 2005). A diferença entre essas classes baseia-se na composição química, regularidade e variabilidade de certos elementos químicos (PÖTTER e STEINBÜCHEL, 2005). O Quadro 1 contém algumas das características, que diferenciam esses biopolímeros, tais como variedade de composição monomérica, molécula iniciadora do processo de polimerização, tamanho do polímero e do grânulo.

Polímero (Fonte)	Monômero	Molécula iniciadora	Tamanho do grânulo	Tamanho do polímero
Amido (Vegetal)	ADP-Glc	Maltoligossacarídeo ou amilose	Variável (1-100 µm)	Amilose ($9,0 \times 10^4$ a $3,0 \times 10^6$ Da); Amilopectina ($3,8 \times 10^8$ Da)
Glicogênio (Humano)	UDP-Glc	Glicogenina	Variável	$> 10^6$ Da
Glicogênio (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	ADP-Glc	ADP-Glc	Nenhum grânulo detectável	$> 10^6$ Da
Polifosfato (Bactéria)	ATP	Oligômero de fosfato	Depende da fonte	$7,0 \times 10^4$ Da
Cianoficina (Cianobactérias)	Asp e Arg	Oligômero de Asp-Arg	0,2-0,5 µm	$2,5 \times 10^4$ a 10^6 Da
Látex (<i>Hevea brasiliensis</i>)	IPP	Geranilpirosfosfato	~1,0 µm	~ 10^6 Da
Polihidroxibutirato (Bactéria)	HB-CoA	HB-CoA	~0,5 µm	~ 10^6 Da

QUADRO 1. PROPRIEDADES DOS BIOPOLÍMEROS. FONTE: STUBBE *et al.*, 2005.

Muitos biopolímeros são compostos de reservas e são frequentemente armazenados no citoplasma, como grânulos ou corpos de inclusão insolúveis (HOPPERT e MAYER, 1999). Estas estruturas constituem os grânulos polifosfatos, carboxissomos, grânulos de poliglucose (glicogênio e amido), grânulos de polihidroxibutirato (PHB), corpos lipídicos e grânulos de cianoficina (Figura 1). A estocagem desses compostos na forma de estruturas insolúveis proporciona maior estabilidade da osmolaridade celular, fato que permite o acúmulo desses biopolímeros (OBST e STEINBÜCHEL, 2006). Um dos compostos de armazenagem mais bem estudados em bactérias são os PHAs,

cujo acúmulo é resultado da presença, em excesso, de fonte de carbono com concomitante limitação do crescimento bacteriano, pela deficiência de outro nutriente essencial como nitrogênio ou oxigênio. Logo, PHAs servem como reserva de carbono e energia em condições limitantes de nutrientes (PÖTTER e STEINBÜCHEL, 2005).

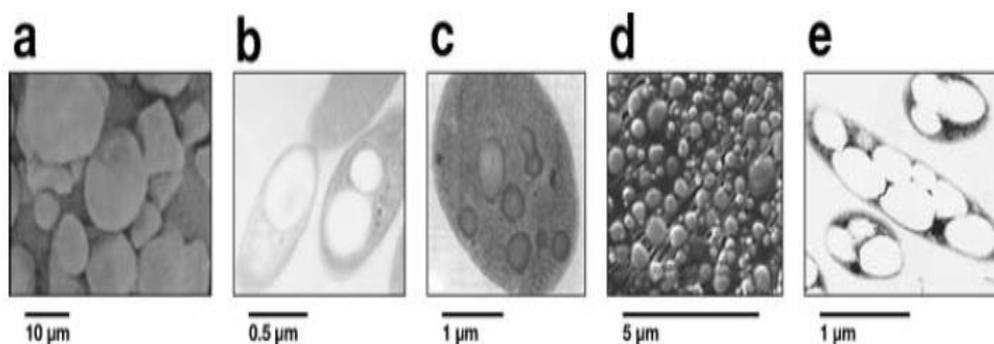


FIGURA 1. ESTRUTURA SUBCELULARES FORMADAS POR BIOPOLÍMEROS. Exemplo de inclusões celulares em bactérias e plantas: a) grânulo de amido em *Zea mays*, b) grânulo de polifosfato em *Vibrio cholerae*, c) grânulo de cianoficina em *Aphanocapsa* 6308, d) grânulo látex em *Hevea brasiliensis*, e) Grânulo de PHB em *Waurtesia eutropha*. A barra indica a escala na figura. FONTE: STUBBE *et al.*, 2005.

3.2. Polihidroxicanoatos (PHAs)

PHAs são poliésteres gerados a partir de ésteres 3-hidroxicanoato-CoA com a liberação de coenzima A (CoA) concomitante à formação de ésteres (Figura 2). Os PHAs apresentam massa molecular que varia de 2×10^5 a 3×10^6 dáltons, dependendo do microrganismo e das condições de crescimento (BYROM *et al.*, 1994). Esses polímeros acumulam intracelularmente e podem constituir até 90% do peso seco da célula, sob condições de deficiência nutricional e são produzidos em diferentes fases do crescimento bacteriano (MADISON e HUISMAN, 1999). Em condições adequadas de nutrientes para bactérias produtoras de PHAs, esses polímeros são degradados a monômeros, que são usados como fonte de energia para biossíntese, além de fornecer NADH, equivalente redutor essencial no

metabolismo energético (SENIOR e DAWES, 1973; DOI *et al.*, 1990). Foi observado em *Azospirillum brasilense*, que a estirpe selvagem produtora de PHA foi mais resistente do que a estirpe mutante, não produtora de PHA, a diferentes condições de estresse, como choque térmico, irradiação por UV, exposição a agentes oxidantes e choque osmótico (KADOURI *et al.*, 2003).

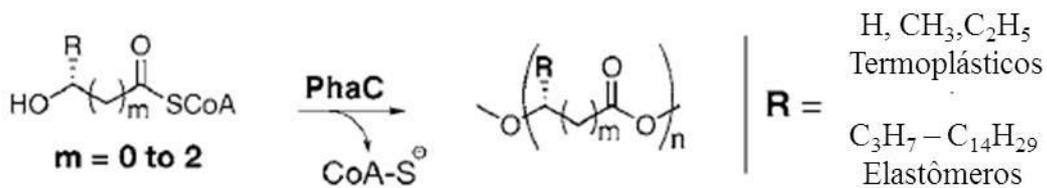


FIGURA 2. BIOSÍNTESE DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) CATALISADA POR POLIHIDROXIALCANOATO SINTASE (PhaC). FONTE: STUBBE *et al.*, 2005.

A estrutura final dos PHAs varia de acordo com o número de carbonos (1-13) do grupo alquil (R) na posição C3 de cada monômero (MADISON e HUISMAN, 1999) (Figura 3). De acordo com o comprimento do grupo alquil de cada monômero, esses polímeros são subdivididos em duas classes: PHAs de cadeia curta (sci-PHA) [3-5 carbonos] e PHAs de cadeia média (mcl-PHAs) [6-16 carbonos] (REDDY *et al.*, 2003).

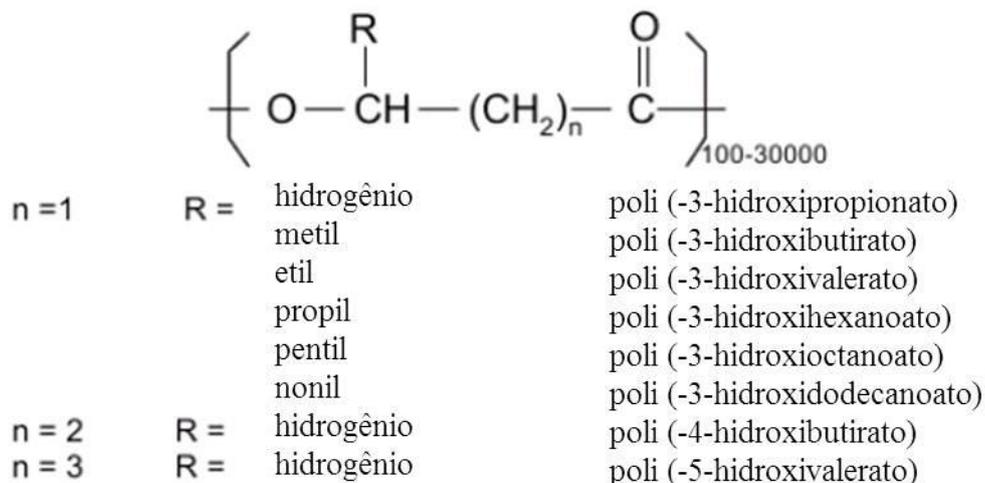


FIGURA 3. ESTRUTURA GERAL DOS POLIHIDROXIALCANOATOS. fonte: OJUMU *et al.*, 2004.

A diversidade na composição monomérica de PHAs depende da fonte de carbono fornecida, como por exemplo, glucose, alcanos e alcenos (ZINN *et al.*, 2001). A oxidação completa da glucose produz acetil-CoA, que é utilizado como substrato para produzir PHAs de cadeia curta. Os PHAs de cadeia média são formados a partir de ácidos 3-hidroxicarboxílicos oriundos da síntese *de novo* de ácidos graxos e intermediários da β -oxidação (REHM *et al.*, 1998; FIEDLER *et al.*, 2002). DE SMET e colaboradores (1983) descobriram os mcl-PHAs quando cultivaram *Pseudomonas oleovorans* na presença de ácido octanóico. Mais de 150 monômeros diferentes já foram relatados na constituição de PHAs (STEINBÜCHEL e VALETIN, 1995; KESSLER *et al.*, 2001; STEINBÜCHEL e LÜTKE-EVERSLOH, 2003) e alguns deles são listados no quadro 2.

Ácidos Hidroxi	3-	Ácidos 3-hidroxi (insaturados)	Ácidos 3-hidroxi (ramificados)	Ácidos 3-hidroxi (*CL substituída)	Ácidos 3-hidroxi (outros)
Propiônico		2-Butanóico	2-Metilbutírico	Ciclohexilbutírico	4-hidroxibutírico
Butírico		4-Pentanóico	2-Metilvalérico	5-Fenilvalérico	4-Hidroxivalérico
Valérico		4-Hexanóico	2,6-Dimetil-5-heptanóico	7-Fluoroheptanóico	4-Hidroxihexanóico
Hexanóico		5-Hexanóico	4-Metilhexanóico	9-Fluorononanóico	4-Hidroxiheptanóico
Heptanóico		6-Heptanóico	5-Metilhexanóico	6-Clorohexanóico	4-Hidroxioctanóico
Octanóico		6-Octanóico	6-Metiloctanóico	8-Clorooctanóico	5-Hidroxivalérico
Nonanóico		7-Octanóico	7-Metiloctanóico	3-Bromohexanóico	5-Hidroxihexanóico
Decanóico		8-Nonanóico	6-Metilnonanóico	8-Bromooctanóico	Ácido Málico
Undecanóico		9-Decanóico	7-Metilnonanóico	11-Bromoundecanóico	
Dodecanóico		10-Undecanóico	8-Metilnonanóico	7-Cianoheptanóico	
Tetradecanóico		6-Dodecanóico	7-Metildecanóico	9-Cianononóico	
		5-Tetradecanóico	9-Metildecanóico	12-hidroxidodecanóico	
		5,8-Tetradecadienóico		Ácido succínico metil éster	
		5,8,11-Tetradecatrienóico		Ácido adípico metil éster	
		4-Hexadecanóico		Ácido adípico metil éster	
		4,7-Hexadecadienóico		Ácido subérico metil éster	
				Ácido subérico etil éster	
				Ácido pimélico propil éster	
				Ácido sebásico metil éster	

QUADRO 2. ALGUNS MONÔMEROS CONSTITUINTES DOS PHAs. *CL: Cadeia lateral.
 FONTE: ZINN *et al.*, 2001.

PHAs têm recebido grande atenção da indústria porque, dependendo do tamanho da sua cadeia lateral de alquila (R, figura 2), os polímeros resultantes têm propriedades que vão desde termoplásticas (R = H, metil, etil) a elastômeros ($C_3H_7 - C_{14}H_{29}$) (STEINBÜCHEL e HEIN, 2001). Além disso, PHAs são biodegradáveis. Bilhões de resíduos plásticos são gerados anualmente de plásticos de polietileno e polipropileno oriundos do petróleo (STUBBE *et al.*, 2005). Dessa forma, há um interesse crescente em produzir polímeros de termoplásticos biodegradáveis a partir poliésteres de fontes biorenováveis. Atualmente, têm-se focado na produção desses biopolímeros com menor custo. O entendimento do metabolismo do PHA é um ponto importante para obtenção deste polímero, em escala industrial, a partir de células bacterianas.

O PHB é o PHA melhor caracterizado. Este biopolímero foi descoberto em 1926 por Maurice Lemoigne, no Instituto Pasteur-Paris, a partir de um lisado de células de *Bacillus megaterium* (LEMOIGNE, 1926). É um homopolímero de D-3-hidroxibutirato (3HB), onde o seu grupo R é um metil (CH_3), altamente esteroespecífico com carbono assimétrico apresentando configuração D, que contribui para sua cristalinidade, que é uma propriedade importante na organização da cadeia polimérica e na sua seleção para diferentes aplicações. Possui temperatura de fusão de 170 °C, fato que dificulta o seu processo de modelagem com fins industriais (STEINBÜCHEL, 1991), mas que tem sido resolvido com a síntese do copolímero polihidroxibutirato-hidroxicvalerato [P(3HB-Co-3HV)], que resulta na diminuição da sua temperatura de fusão e conseqüentemente com a diminuição da sua degradação térmica durante a fabricação de embalagens (OJUMU *et al.*, 2004).

Sob condições limitantes de crescimento, o grânulo de PHB ocupa um grande volume do interior da célula bacteriana (FIGURA 4). O tamanho dos grânulos varia de 0,2 a 0,5 μm (STUBBE e TIAN, 2003). O grânulo de PHB é constituído por lipídeos e proteínas. Fato observado na análise dos grânulos de *Bacillus megaterium* que exibiram a seguinte composição: PHB (97,7%), fosfolipídios (0,46%) e proteínas (0,47%) (GRIEBEL *et al.*, 1968). Por outro lado, evidências recentes obtidas por criotomografia mostram que em *Ralstonia eutropha*, o grânulo é constituído de PHB revestido por proteínas, descartando a possibilidade de que haja um filme fosfolipídico envolvendo o grânulo

(BEEBY *et al.*, 2012). Estes pesquisadores sugerem que a presença de fosfolípidos observada por Griebel e colaboradores (1968) foi devido à contaminação de membrana plasmática, ou ainda, a artefatos criados pela manipulação das bactérias para obtenção dos grânulos, por exemplo, lise celular, sonicação, centrifugação, etc. Já na criotomografia quase não há manipulação da bactéria, com exceção do congelamento, o que reduz a presença de contaminantes. Portanto, a gênese dos grânulos de PHB ainda deverá ser estudada em outros organismos também por criotomografia, para que se tenha uma conclusão definitiva sobre a formação e a constituição dos grânulos.

Na superfície dos grânulos de PHB são encontradas diversas proteínas que atuam na síntese, degradação e estrutura do grânulo (FIGURA 5). A proteína mais abundante é denominada fasina (PhaP), com 24 kDa de massa molecular e reveste o grânulo, controlando seu tamanho e número dentro da célula (WIECZOREK *et al.*, 1995). A presença de fasinas durante o processo de síntese de PHB, pela enzima PHB sintase, tem se mostrado importante (PÖTTER *et al.*, 2002). Em *R. eutropha*, a ausência da principal fasina PhaP1 gera grânulos coalescidos que ocupam um grande espaço celular (PÖTTER *et al.*, 2005). Quando o gene *phaR* que expressa um regulador negativo de *phaP* é deletado, a superexpressão de *phaP* gera mais grânulos de tamanho menor em comparação ao selvagem e a quantidade de PHB no mutante é reduzida (PÖTTER *et al.*, 2002).

O regulador negativo PhaR também é encontrado associado ao grânulo. Acredita-se que a associação de PhaR ao grânulo faça parte de um modelo de desrepressão transcricional já demonstrado em outras bactérias, como *P. denitrificans*, *R. eutropha* e *H. seropedicae* (MAEHARA *et al.*, 2002, YORK *et al.*, 2002, PÖTTER *et al.*, 2002, KADOWAKI *et al.*, 2011).

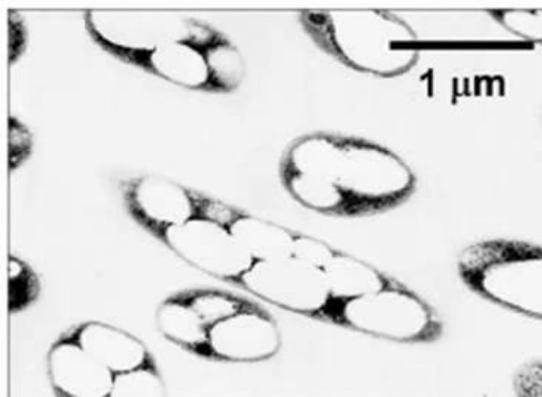


FIGURA 4. GRÂNULOS DE PHB EM *Ralstonia eutropha*. Microscopia de transmissão eletrônica de células de *R. eutropha* crescendo em condições permissivas para a produção de PHB. Os grânulos podem ser vistos como aglomerados brancos no interior das células. FONTE: STUBBE e TIAN, 2003.

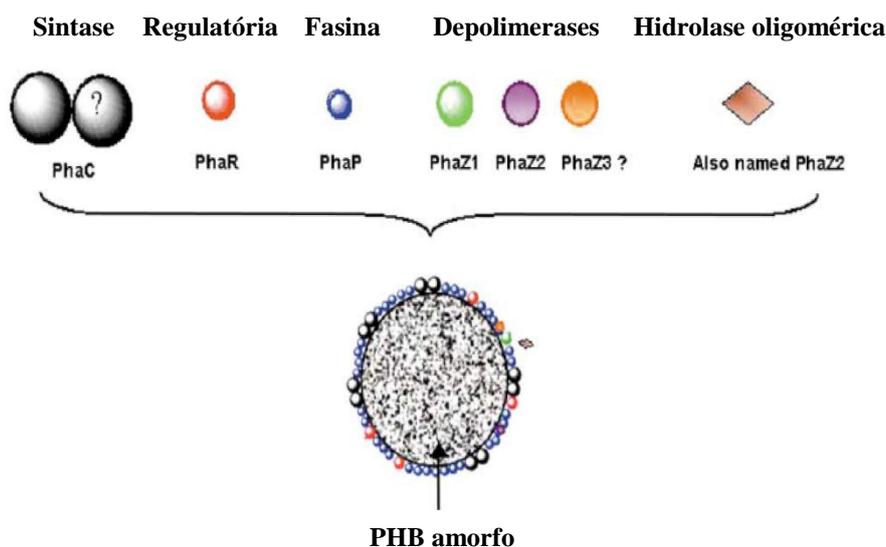


FIGURA 5. PROTEÍNAS REQUERIDAS PARA A HOMEOSTASE DE PHB E ESTRUTURA DO GRÂNULO PROPOSTA PARA *Ralstonia eutropha*. FONTE: STUBBE e TIAN, 2003.

As PHA sintases associam-se ao grânulo durante o processo de síntese das cadeias do poliéster. De fato, acredita-se que a PHA sintase dimeriza-se ao iniciar a síntese de PHB e ao dímero, ligado à cadeia de PHB, também ocorra à associação de fasinas que auxiliariam no empacotamento das cadeias de PHB em grânulos (CHO *et al.*, 2012).

Além das enzimas de síntese, também são encontradas as enzimas que atuam na hidrólise dos grânulos de PHA, as PHA depolimerases e PHB

oligômeros hidrolase. Estudos de caracterização da atividade de PHA sintase e depolimerase associadas ao grânulo mostraram que ambas as enzimas estão ativas ao mesmo tempo sem, no entanto, criar um ciclo fútil de síntese e degradação de PHA (REN *et al.*, 2009). A atividade PHA depolimerase é importante para a produção de PHA. Em altas razões [Acetil-CoA]/[CoA] e [NADH]/[NAD], as depolimerases degradam PHA, liberando ácidos 3-hidroxicarboxílico que posteriormente são ativados a 3-hidroxiacil-CoAs, que são acumulados e utilizados na síntese PHA (REN *et al.*, 2009). Com isto, REN e colaboradores (2009) sugeriram que a síntese e degradação de PHA pode constituir um ciclo metabólico importante para redirecionar outras vias como o catabolismo/síntese de ácidos e o próprio ciclo do ácido cítrico, cuja direção depende dos níveis de CoA ou acetil-CoA.

Outras proteínas têm sido relatadas associadas aos grânulos de PHA. Proteínas do tipo histona que são capazes de interagir com os grânulos e com o DNA simultaneamente foram recentemente descritas em *R. eutropha* e *P. putida* (PFEIFFER *et al.*, 2011; GALÁN *et al.*, 2011; TIRAPELLE *et al.*, 2013). A descoberta destas proteínas sugeriu um novo papel para os grânulos de PHA, que seria auxiliar a compactação da cromatina bacteriana e também, fornecer grânulos para células filhas recém-formadas. Galán e colaboradores (2013) mostraram que durante a replicação do DNA uma parte dos grânulos se liga a nova molécula de DNA e segrega-se juntamente com ela para a célula filha. Provavelmente, a presença de grânulos de PHA, já em um estágio inicial de desenvolvimento, possa ser importante para adaptação do microrganismo, fornecendo carbono e energia, ou para que as PHA sintases já contidas no grânulo possam iniciar a síntese de novos grânulos.

3.3. Metabolismo de PHA

O metabolismo de PHA em bactérias não é limitado aos genes que codificam proteínas envolvidas especificamente na síntese de PHA, utilização, regulação e formação dos grânulos (De EUGENIO *et al.*, 2009; GALAN *et al.*, 2011), mas também implica na sua conexão com outras vias do metabolismo central (ESCAPA *et al.*, 2012). Em bactérias do gênero *Pseudomonas*, a

síntese de PHA depende da β -oxidação de ácidos graxos e síntese *de novo* de ácidos graxos que convertem intermediários provenientes de ácidos graxos e carboidratos em diferentes (R)-3-hidroxiacil-CoA (Figura 6). Esses metabólitos são utilizados como substratos pelas PHA sintases, que catalisam a biossíntese de PHA de cadeia média (PHA_{MCL}) e finalizando com a produção de um poliéster composto de ácidos (R)-3-hidroxicarboxílicos de 6 a 14 carbonos (PIETRO *et al.*, 2007).

Na maioria das bactérias como, por exemplo, *R. eutropha*, a via de biossíntese do PHB consiste de três reações enzimáticas catalisadas por três diferentes enzimas: β -cetoacil-CoA tiolase (PhbA), acetoacetyl-CoA redutase (PhbB), PHB sintase (PhbC) (FIGURA 6, PEOPLES e SINSKEY, 1989). A degradação do grânulo de PHB é realizada por PHB depolimerases intracelulares. Além destas, o metabolismo do PHB envolve a proteína fasina (PhaP), responsável pela manutenção do tamanho e número dos grânulos, e a proteína regulatória (PhaR em *R. eutropha*), envolvida na regulação da sua própria expressão e expressão de PhaP (WIECZOREK *et al.*; 1995; POTTER *et al.*; 2002). Em *R. eutropha*, tanto PhaP como PhaR se ligam ao grânulo de PHB (STUBBE e TIAN, 2003).

A organização dos genes envolvidos na biossíntese de PHA apresenta uma diversidade, devido às várias vias biossintéticas conhecidas. Em 1999, MADISON e HUISMAN caracterizaram os genes envolvidos na síntese de PHA de 18 espécies diferentes e dividiram esses genes em seis loci gênicos: 1) operon completo *phbCAB*, 2) loci *phb* interrompido, 3) loci *phb* incompleto, 4) loci *phb* de organismos que codificam sintases com duas subunidades, 5) locus *phbCJ* de *Aeromonas caviae* envolvido na biossíntese do copolímero polihidroxi-butirato-hidroxi-valerato (3HB-3HV) e 6) loci *pha* para síntese de PHA de cadeia média (mclPHA) em *Pseudomonas*.

As características das proteínas citadas acima envolvidas na síntese de 3-hidroxi-butirato bem como na constituição e regulação da formação do grânulo de PHB serão detalhadas a seguir.

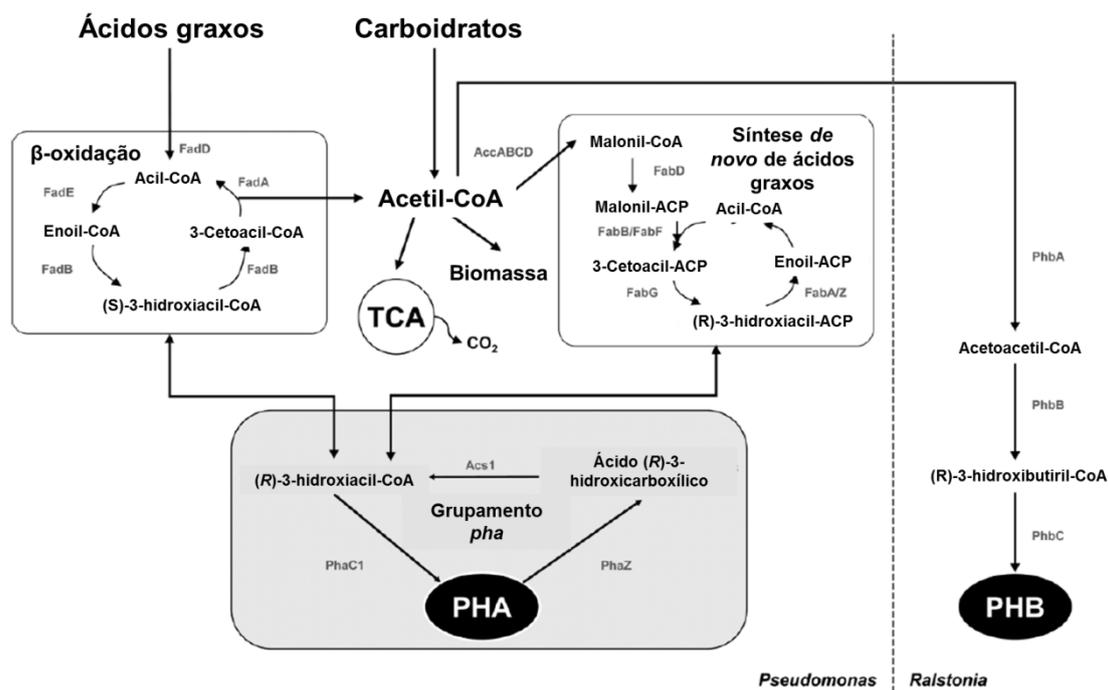


FIGURA 6. VIA METABÓLICAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DE PHA EM *Pseudomonas* sp. E NA SÍNTESE DE PHB EM *Ralstonia* sp. Fonte: ESCAPA *et al.*, 2012.

3.3.1. β -cetoacil-CoA tiolase (PhbA)

β -cetoacil-CoA tiolase (PhbA) catalisa o primeiro passo na formação do PHB. Esta enzima é membro de uma família de enzimas responsáveis pela clivagem de grupo tiol do substrato, produzindo acil-CoA mais acetil-CoA (Figura 6, Tabela 3). As cetoacil-CoA tiolases são encontradas em procariontos e eucariotos. Além disso, estas enzimas são divididas em dois grupos com base na especificidade pelo substrato: o primeiro grupo consiste de tiolases com uma ampla especificidade para β -cetoacil-CoAs, variando de 6 a 14 átomos de carbonos. Esta classe de enzimas está envolvida principalmente na degradação de ácidos graxos e está localizada no citoplasma de procariontos e nas mitocôndrias e peroxissomos de células vegetais e de mamíferos (MADISON e HUISMAN, 1999). A segunda classe de tiolases é considerada biossintética e tem especificidade para ácidos graxos de cadeia curta, compreendendo de 3 a 5 átomos carbonos. Essas tiolases biossintéticas atuam em várias vias, tais como formação de corpos cetônicos, biossintese de

isoprenóides, de esteróides e de PHB. A tiolase envolvida na síntese de PHB é uma enzima que tem especificidade por acetoacetil-CoA (MADISON e HUISMAN, 1999). A primeira etapa do mecanismo enzimático de síntese de PhbA consiste na condensação de duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA (FIGURA 6).

3.3.2. Acetoacetil-CoA redutase (PhbB)

Acetoacetil-CoA redutase (PhbB) é uma (R)-3-hidroxiacil-CoA desidrogenase que catalisa o segundo passo da via de síntese de PHB, a conversão de acetoacetil-CoA em 3-hidroxiacil-CoA (FIGURA 6, QUADRO 3). Essas enzimas são encontradas em várias bactérias (HAYWOOD *et al.*, 1988). Na bactéria *Zoogloea ramigera* é um homotetrâmero, onde cada subunidade tem massa molecular de 25 kDa e atua como uma redutase dependente de NADPH (PLOUX *et al.*, 1988). *R. eutropha* tem duas acetoacetil-CoA redutases uma dependente de NADPH e a outra de NADH e são tetrâmeros com massas moleculares de 150 e 84 kDa, respectivamente. Os produtos da redução de acetoacetil-CoA pelas enzimas dependentes de NADPH e NADH foram identificados como D-(-) e L-(+)-3-hidroxiacil-CoA, respectivamente. O L-(+)-3-hidroxiacil-CoA não participa da via de biossíntese de PHB, uma vez que não é reconhecido pela PHB sintase (HAYWOOD *et al.*, 1988).

Diferentemente de *R. eutropha*, *Azotobacter vinelandii* UWD sintetiza uma acetoacetil-CoA redutase com cinco vezes mais afinidade por NADPH do que por NADH. Acetoacetil-CoA redutase de *A. vinelandii* foi inibida por 100 μ M de NADP^+ (MANCHAK e PAGE, 1994), enquanto que as enzimas de *Azotobacter beijerinckii* (SENIOR e DAWES, 1973) e *R. eutropha* (HAYWOOD *et al.*, 1988) não foram inibidas por NADP^+ .

As reações enzimáticas envolvidas na síntese de PHB e outros PHAs têm sido estudadas intensivamente por meio de análises bioquímicas e fornecem informações sobre esta via (QUADRO 3).

Enzimas e espécies	Km (mM)	Substrato	Produto
Tiolase (condensação) <i>Z. ramigera</i>	0,33	Acetil-CoA	Acetoacetil-CoA
Tiolase (tiólise) <i>Z. ramigera</i>	0,024	Acetoacetil-CoA	Acetil-CoA
	0,46	Acetoacetil-panteteína	Acetil-CoA + acetil-panteteína
	0,073	Acetoacetil-panteteína-11-pivalato	Acetil-CoA + acetil-panteteína-11-pivalato
	(50%) ^a	3-Cetovaleril-CoA	Acetil-CoA + propionil-CoA
Tiolase (tiólise) <i>R. eutropha</i>	0,044	Acetoacetil-CoA	Acetil-CoA
	(3%) ^b	3-Cetovaleril-CoA	Acetil-CoA + propionil-CoA
	(0%) ^b	3-Cetohexanoil-CoA	Acetil-CoA + butanoil-CoA
Redutase dependente de NADPH <i>Z. ramigera</i>	0,002	Acetoacetil-CoA	3-Hidroxiacetil-CoA
	0,002	3-Cetovaleril-CoA	3-Hidroxiacetil-CoA
	0,010	3-Cetohexanoil-CoA	3-Hidroxiacetil-CoA
	0,99	Acetoacetil-panteteína-11-pivalato	3-Hidroxiacetil-CoA + panteteína-11-pivalato
<i>R. eutropha</i>	0,005	Acetoacetil-CoA	3-Hidroxiacetil-CoA
	(18%) ^b	3-Cetovaleril-CoA	3-Hidroxiacetil-CoA
	(3,6%) ^b	3-Cetohexanoil-CoA	3-Hidroxiacetil-CoA
P(3HB) sintase <i>R. eutropha</i>	0,72	3-Hidroxiacetil-CoA	P(3HB)
	0,16	3-Hidroxiacetil-CoA	PHV
	ND ^c	3-Hidroxiacetil-CoA + panteteína-11-pivalato	Nenhum

QUADRO 3. CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DE PHB E OUTROS PHAs. ^a $V_{m\acute{a}x}$ em relação a acetil-CoA; ^b Atividade relativa em relação a acetil-CoA e 3-hidroxiacetil-CoA; ^c ND, não determinada. FONTE: MADISON e HUISMAN, 1999.

3.3.3. PHB sintase

PHB sintase é membro da família das PHA sintases (MADISON e HUISMAN, 1999) e é a terceira enzima da via biossintética de produção do PHB, responsável por catalisar a polimerização de (R)-3-hidroxi-butiril-CoA a PHB com a liberação de Coenzima A (FIGURA 6). O primeiro gene descrito que codifica para uma PHB sintase (*phbC*) foi relatado em *R. eutropha* (PEOPLES e SINSKEY, 1989). Este gene foi isolado por complementação de mutantes deficientes na síntese de PHB e mapeamento da região promotora do gene *phbC* e outros genes do operon *phb*.

A análise da sequência de nucleotídeos de 59 genes codificadores de sintases de 45 bactérias diferentes permitiu dividir as PHA sintases em quatro classes, com base na estrutura primária, número de subunidades e especificidade pelo substrato (REHM, 2003 e QUADRO 4). As enzimas das classes I e II das sintases são monômeros com massa molecular entre 61 a 72 kDa. Sintases da classe I utilizam preferencialmente como substrato tioésteres de CoA de ácidos (R)-3-hidroxicarboxílicos de 3 a 5 carbonos enquanto que as sintases da classe II utilizam como substratos tioésteres de CoA de ácidos (R)-3-hidroxicarboxílicos de 6 a 14 carbonos (SLATER *et al.*, 1992; AMARA e REHM, 2003). As sintases das classes I e II melhor caracterizadas são as de *R. eutropha* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente (SLATER *et al.*, 1988; PEOPLES e SINSKEY, 1989; LANGENBACH *et al.*, 1997).

As sintases da classe III são dímeros com duas subunidades diferentes: PhaC e PhaE. A primeira, com massa molecular aproximada de 40 kDa, exibe 21-28% de similaridade de sequência de aminoácidos com as sintases das classes I e II, e a segunda com massa molecular de 40 kDa, não apresenta similaridade com outras sintases de PHA. Essas sintases reconhecem como substratos tioésteres de CoA de ácidos (R)-3-hidroxicarboxílicos de 3 a 5 carbonos (LIEBERGESELL *et al.*, 1992; YUAN *et al.*, 2001), contudo alguns ácidos (R)-3-hidroxicarboxílicos de cadeia média de 6 a 8 carbonos são incorporados (AMARA e REHM, 2003). A sintase da classe III melhor caracterizada é a de *Allochromatium vinosum* (LIEBERGESELL e STEINBÜCHEL, 1992; JIA *et al.*, 2000). As sintases da classe IV são

representadas por enzimas encontradas em *Bacillus megaterium* e assemelham-se as sintases de classe III, contudo a subunidade PhaE é substituída por PhaR, que é uma proteína distinta do regulador transcricional PhaR encontrado em *R. eutropha*, com massa molecular de 20 kDa (McCOOL e CANNON, 2001).

Exceções a esta classificação são as sintases de *Thiocapsa pfennigii*, que possui uma subunidade PhaC com alta identidade, cerca de 85%, com a subunidade PhaC da sintase da classe III de *A. vinosum*; a de *Aeromonas punctata* que apresenta uma subunidade PhaC com similaridade, aproximadamente 45%, com as sintases da classe I e as de *Pseudomonas sp.* 61-3, PhaC1 e PhaC2, com 80% de identidade com as sintases da classe II, em relação à especificidade pelo substrato (FUKUI e DOI, 1997; MATSUSAKI *et al.*, 1998; LIEBERGESELL *et al.*, 2000). A PHA sintase de *T. pfennigii* apresenta especificidade por PHA_{SCL} de 3 a 5 carbonos e PHA_{MCL} de 6 a 14 carbonos (LIEBERGESELL *et al.*, 2000). A proteína PHA sintase de *A. punctata* catalisa a síntese de um copolímero constituído de 3-hidroxi-butirato e 3-hidroxi-hexanoato (FUKUI e DOI, 1997). As proteínas PhaC1 e PhaC2 de *Pseudomonas sp.* 61-3 catalisam a síntese de um copolímero constituído de 3-hidroxi-butirato e PHA_{MCL} (MATSUSAKI *et al.*, 1998).

Classe	Subunidade	Espécie	Substrato
I	 ~60-73 kDa	<i>Cupriavidus necator</i>	3HA _{SCL} -CoA (~C3-C5) 4HA _{SCL} -CoA, 5HA _{SCL} -CoA, 3MA _{SCL} -CoA
II	 ~60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3HA _{MCL} -CoA (~≥C5)
III	 ~40 kDa ~40 kD	<i>Allochromatium vinosum</i>	3HA _{MCL} -CoA (3HA _{MCL} -CoA [~C6-C8], 4HA-CoA, 5HA-CoA
IV	 ~40 kDa ~22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA _{SCL} -CoA

QUADRO 4. CLASSES DE PHA SINTASES. FONTE: REHM, 2006.

In vitro, as sintases podem existir em um equilíbrio entre as formas monoméricas ou diméricas. A dimerização é aumentada na presença do substrato ou análogo trímérico CoA, (3-hidroxi-butiril)₃-CoA (WODZINSKA *et al.*, 1996, REHM *et al.*, 2001; REHM, 2006).

O alinhamento múltiplo de seqüências primárias de sintases exibiu seis seqüências conservadas (blocos), oito resíduos de aminoácidos conservados e um domínio α/β hidrolase no C-terminal (REHM e STEINBÜCHEL, 1999; REHM *et al.*, 2002; REHM, 2003, REHM, 2007) (FIGURA 7). Além disso, todas as PHA sintases contêm um motivo lipase 'box' (GX[S/C]XG), no qual o resíduo essencial de serina do sítio ativo das lipases é substituído por um resíduo de cisteína. Este resíduo de cisteína é encontrado em todas as PHA sintases e atua como nucleófilo no sítio catalítico, sendo essencial para atividade (REHM, 2003).

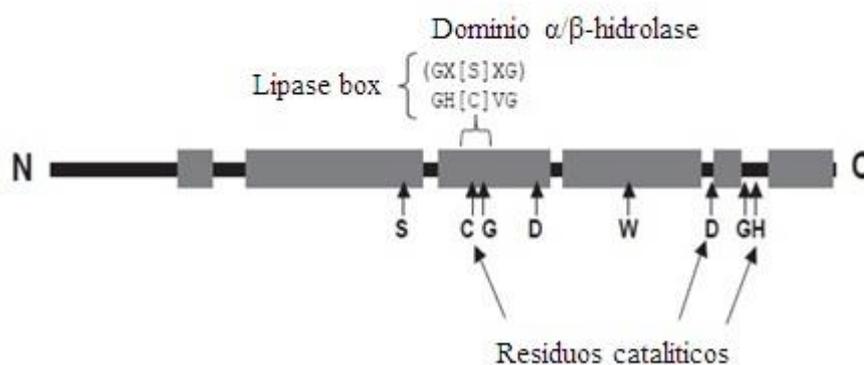


FIGURA 7. ESTRUTURA PRIMÁRIA DAS PHA SINTASES. Os 6 blocos conservados estão indicados por retângulos cinzas. Os 8 resíduos de aminoácidos conservados são indicados por setas. O domínio α/β hidrolase está na parte superior da figura. FONTE: REHM *et al.*, 2002.

Na busca por identidade de seqüência com o uso da ferramenta Blast, a PhaC sintase da classe III de *Allochrochromatium vinosum* mostrou 42% de identidade com lipases, principalmente com a lipase de *Pseudomonas cepacia* em que a cisteína 149 (Cys-149) do sítio ativo da sintase alinhava com a serina (Ser-87) do sítio ativo da lipase (JIA *et al.*, 2000). Este dado demonstra a

conservação desse resíduo de cisteína em diferentes sintases e a importância desse aminoácido para a atividade enzimática.

O modelo do mecanismo da reação de polimerização catalisada pelas sintases indica que dois grupos tióis participem da catálise covalente (BALLARD *et al.*, 1987; DOI *et al.*, 1992). Para a PhaC de *R. eutropha*, foi demonstrado por mutagênese que um dos grupos está na cisteína-319 (GERNGROSS *et al.*, 1994). Na tentativa de encontrar um segundo grupo tiol na mesma subunidade, o resíduo Cys-459 foi mutado por serina, mas a enzima manteve 90% da atividade em relação ao tipo selvagem (GERNGROSS *et al.*, 1994). Concluiu-se então que a cisteína (Cys-319) é o resíduo do sítio ativo essencial para atividade (UEDA *et al.*, 1996) e demonstrou-se que um segundo grupo tiol é provido pela outra subunidade da sintase homodimérica, formando assim um homodímero durante a catálise (REHM e STEINBÜCHEL, 1999). ZHANG e colaboradores (2000) observaram que a sintase homodimérica produz uma única cadeia do polímero e propuseram que os dois grupos tióis são providos pela Cys-319 de cada subunidade do homodímero e que essas duas cisteínas formam um único sítio catalítico (FIGURA 8). Devido esses dois grupos tióis ser idênticos, eles podem funcionar alternativamente como acceptor do monômero (substrato) e âncora para ligação covalente da cadeia polimérica crescente. De acordo com este mecanismo, a cadeia polimérica se movimenta para frente e para trás, covalentemente, entre os dois grupos de tiol para cada etapa da propagação. Este modelo assume que o homodímero é a única forma ativa da sintase e um único resíduo de cisteína não é suficiente para catálise (ZHANG *et al.*, 2003).

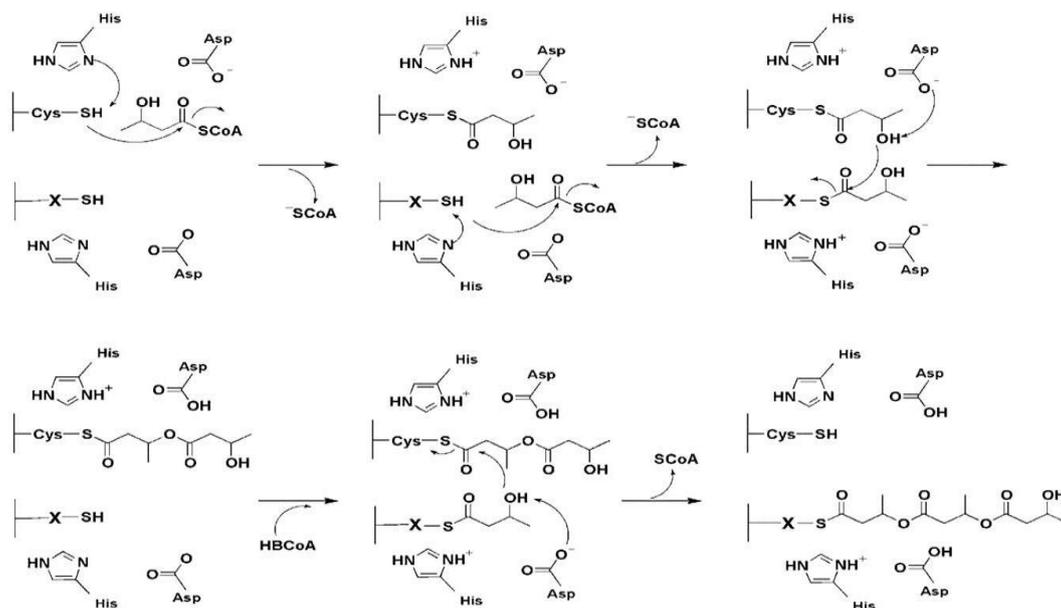


FIGURA 8. MECANISMO CATALÍTICO PROPOSTO PARA A REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO PELA PHB SINTASE. Sítio ativo com dois grupos tióis envolvido na reação catalítica de síntese de PHB. (Fonte: STUBBE e TIAN, 2003).

3.4. O ENVOLVIMENTO DE REGULADORES GLOBAIS SENSÍVEIS A OXIGÊNIO NO METABOLISMO DE PHA

Dentre os mecanismos de controle global em microrganismos aeróbios existem aqueles sensíveis às diferentes concentrações de oxigênio. Em *E.coli*, a transição do metabolismo aeróbio para o anaeróbio modula expressão de vários genes (TRIBELLI, 2011) e respostas adaptativas a esta transição são coordenadas principalmente por ArcA e Fnr (GUNSALUS, 1992). Fnr e membros da família Fnr apresentam dois domínios: N-terminal que contém um grupamento $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ que é sensível a oxigênio e promove a dimerização de Fnr e, desse modo, aumentando a sua capacidade de se ligar de forma específica ao DNA; C-terminal apresenta um motivo-hélice-volta-hélice que se liga a uma sequência palindrômica TTGATNNNNATCAA, regulando a transcrição de vários genes sensíveis a oxigênio (CRACK *et al.*, 2003; GREEN *et al.*, 2009; FLEISCHHACKER e KYLE, 2011). Na presença de oxigênio, o grupamento $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ é convertido em $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ com a inativação

consecutiva de Fnr, assumindo a forma monomérica (CRACK *et al.*, 2003). *E. coli* não produz PHB e mesmo que expresse o operon *phaBAC* de *Azotobacter* sp., que contém genes para síntese de PHB, e com gene *arcA* não deletado não produziu PHB em condições de microaerofilia. Entretanto, estirpes expressando o operon *phaBAC* e mutantes no gene *arcA* produziram PHB (NICKEL *et al.*, 2006). Estes resultados sugerem que o gene *arcA* desempenha um papel na síntese heteróloga de PHB em microaerofilia (NICKEL *et al.*, 2006). Em *Pseudomonas extremaustralis*, *anr* codifica um regulador transcricional tipo Fnr e foi observado que o mutante *anr* produz menos PHB do que a estirpe selvagem em condições de microaerofilia (TRIBELLI *et al.*, 2010). Além disso, os genes *phaR* e *phaC* apresentaram expressões diferenciais diminuídas neste mutante.

CydR, um regulador transcricional da família Fnr, também demonstrou envolvimento na biossíntese de PHB (WU *et al.*, 2001). Um mutante *cydR* de *Azotobacter vinelandii* quando cultivado em baixa aeração produziu mais PHB na fase exponencial do que a estirpe selvagem. Entretanto, a estirpe parental produziu mais PHB do que o mutante *cydR* na fase estacionária (WU *et al.*, 2001). Outra proteína do tipo Fnr, FixK₂, presente em *Bradyrhizobium japonicum* também está envolvida na regulação da biossíntese de PHB. Dados do transcriptoma do mutante *fixK₂* em relação a estirpe selvagem demonstraram que o gene *phaC2* foi reprimido em condições de microaerofilia e anaerobiose (PESSI *et al.*, 2007; MESA *et al.*, 2008).

Uma vez que reguladores globais sensíveis a oxigênio estão envolvidos na síntese de PHB em diversos microrganismos, o estudo da influência dos reguladores globais Fnr de *H. seropedicae* sobre o metabolismo PHB nesta bactéria é interessante uma vez que a interação bactéria-planta é endofítica e se dá em condições de microaerofilia. Além disso, na natureza existem vários ambientes em microaerofilia, onde é necessário compreender a fisiologia bacteriana nestes ambientes e a ação dos reguladores que possibilitam o crescimento microbiano nestas condições.

3.5. METABOLISMO DO PHB EM *Herbaspirillum seropedicae*

A produção de PHB pela bactéria diazotrófica *H. seropedicae* foi investigada por CATALÁN *et al.* (2007) em três estirpes diferentes (Z67, Z69 e Z78). A produção foi observada quando estas bactérias foram cultivadas em diferentes fontes de carbono, tais como glucose, xilose, manitol, galactose, ácido succínico e nonanóico. As três estirpes produziram um polímero composto por monômeros de 3-hidroxi-butirato, entretanto, quando cultivadas com ácido nonanóico como única fonte de carbono ocorreu a produção de 3-hidroxi-valerato.

A disponibilidade de vários nutrientes, tais como carbono, nitrogênio e fósforo contribuem para o acúmulo de PHB nos microrganismos produtores deste biopolímero (LEES e POSTGATE, 1973; ANDERSON e DAWES, 1990). Outro fator importante na síntese de PHB é a concentração de oxigênio da cultura. SENIOR E DAEWS (1971) propuseram que baixa concentração de oxigênio favorece o aumento da biossíntese de PHB, visto que NADH se acumula e inibe a enzima citrato sintase, que é essencial no ciclo do ácido cítrico. Dessa forma, há o aumento da concentração de acetil-CoA, que pode ser destinado para a biossíntese de PHB.

Quanto à concentração de nitrogênio, alta concentração de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20 mmol/L) no meio de cultivo provocou a redução da síntese de PHB em *H. seropedicae* Z69 (CATALÁN *et al.*, 2007). Somente no final da fase estacionária, quando a concentração de amônio diminuiu (4,5 mmol/L), ocorreu um aumento na produção de PHB (CATALÁN *et al.*, 2007). Uma possível relação entre a concentração de nitrogênio fixado e a quantidade de PHB produzido foi investigada em *H. seropedicae*. A proteína NtrC é um dos constituintes do sistema de dois componentes (NtrB-NtrC) que tem como função o sensoriamento do nível de nitrogênio celular (MERRICK e EDWARDS, 1995). Sacomboio (2014) observou que o mutante *ntrC* produz mais PHB (20 a 100%) do que estirpe selvagem SmR1 e independente da fonte de carbono utilizada as maiores produções de PHB foram observadas em concentrações de amônio menores do que 5 mmol/L. Além disso, a complementação deste mutante com uma cópia íntegra do gene *ntrC* de *H.*

seropedicae SmR1 restaurou a produção de PHB à quantidades similares à estirpe selvagem (SACOMBOIO, 2014). Estes resultados sugerem que NtrC exerce um papel regulador na síntese de PHB em *H. seropedicae*. As proteínas PII, encontradas em *Bacteria*, *Archaea* e plantas, auxiliam a coordenar a assimilação de carbono e nitrogênio pela regulação da atividade de enzimas transdutoras de sinais em resposta ao *status* de carbono e nitrogênio na célula (NINFA e ATKINSON, 2000). CORRÊA (2014) observou que o mutante *glnK*, que codifica proteína PII, de *H. seropedicae* produziu a mesma concentração de PHB que estirpe selvagem SmR1 em baixo (5 mmol/L) e alto amônio (20 mmol/L), enquanto que o mutante *glnB*, que também codifica proteína PII, produziu menos PHB do que a estirpe selvagem em ambas as concentrações de amônio. Estes resultados sugerem que o gene *glnK* não exerça um papel significativo na síntese de PHB em *H. seropedicae*, porém o gene *glnB* desempenha um papel importante na síntese deste polímero (CORRÊA, 2014). O mutante *glnD* (gene que codifica a enzima bifuncional GlnD, que catalisa a uridililação ou desuridililação de PII) produziu quantidade de PHB similar à estirpe SmR1 em ambas as concentrações de cloreto de amônio (CORRÊA, 2014). Este resultado sugere que *glnD* não desempenha um papel significativo na síntese deste poliéster neste microrganismo. O gene *amtB*, que codifica o transportador de amônio e é co-transcrito com o gene *glnK*, tem expressão aumentada em concentrações limitantes de nitrogênio (NOINDORF *et al.*, 2006). A estirpe mutante *amtB* de *H. seropedicae* produziu menos PHB do que a estirpe selvagem SmR1 tanto em baixo quanto em alto amônio (CORRÊA, 2014). Este resultado sugere que o gene *amtB* exerça um papel importante na síntese de PHB neste microrganismo. O envolvimento de *amtB* na síntese de PHB em *H. seropedicae* ainda não está clara, provavelmente AmtB module a atividade de PII conforme sugerido por Blauwkamp e Ninfa (2003), dessa forma, interfira na síntese de PHB (CORRÊA, 2014).

O Núcleo de Fixação de Nitrogênio da UFPR obteve dados de regulação transcricional da proteína PhaR, anteriormente nomeada PhbF, em *H. seropedicae* SmR1. Kadowaki e colaboradores (2011) observaram que a proteína PhaR de *H. seropedicae* foi capaz de se ligar a 11 promotores putativos de genes envolvidos no metabolismo do PHB. Através de análises

transcricionais dos promotores *phaP1* e *phaR* foi mostrado que PhaR atua como um repressor, controlando a expressão de genes relacionados ao metabolismo do PHB (KADOWAKI *et al.*, 2011). Tirapelle e colaboradores (2013) analisaram proteínas associadas ao grânulo de PHB e caracterizaram parcialmente a função das fasinas de *H. seropedicae*, através de análise espectrométrica de massas de peptídeos tripticos. Várias proteínas associadas ao grânulo de PHB foram identificadas, entre elas PhaP1, PhaR, PhaC1, aconitase, leucil aminopeptidase e uma proteína tipo-histona. Além disso, foram construídos mutantes dos genes *phaP1* e *phaP2* com o intuito de investigar a função das fasinas no metabolismo do PHB. Ambas as fasinas foram encontradas associadas ao grânulo de PHB e a expressão das mesmas somente ocorre quando o grânulo é sintetizado. Entretanto, a expressão de PhaP2 somente acontece na ausência de PhaP1, sugerindo diferenças na ativação da transcrição dos genes por fatores ainda desconhecidos.

Além disso, *H. seropedicae* apresenta três genes codificantes de proteínas Fnr, denominadas de Fnr 1, 2 e 3 (PEDROSA *et al.*, 2011; BATISTA *et al.*, 2013). Dados do transcriptoma do triplo mutante *fnr* (MB231) de *H. seropedicae* em relação à estirpe selvagem mostraram que os genes *phaC1*, *phaC2* e *phaC3* apresentaram expressões diferenciais diminuídas e o gene *phaC4* não foi diferencialmente expresso neste transcriptoma. Esses dados sugerem o provável envolvimento das proteínas Fnr de *H. seropedicae* no anabolismo de PHB.

O entendimento do metabolismo do polihidroxibutirato em *H. seropedicae*, com especial enfoque nas PHA sintases e das consequências metabólicas que a ausência deste polímero causa a bactéria, poderá contribuir para o avanço do conhecimento do metabolismo desta bactéria e eventualmente auxiliar no processo de seleção de estirpes mais eficientes na interação com plantas e na promoção do crescimento vegetal.

4. METODOLOGIA

4.1. Análise utilizando ferramentas de bioinformática

4.1.1. Análise das sequências de genes e proteínas alvos

A análise da sequência dos genes *phaC1*, *phaC2*, *phaC3* e *phaC4* assim como das regiões a montante e a jusante destes foram realizadas por programas de bioinformática de acesso público na internet. O Artemis (RUTHERFORD *et al.*, 2000) foi utilizado para a identificação das ORFs e o PRODORIC (MÜNCH *et al.*, 2005) foi utilizado para a identificação de possíveis sequências promotoras. Os mapas de restrição e as sequências de aminoácidos traduzidas a partir das sequências de nucleotídeos foram obtidos e editados com o programa BioEdit (HALL, 2001).

Índices de similaridade assim como de identidade das sequências de aminoácidos foram obtidos pela submissão das sequências ao programa BlastP (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). O processo de alinhamento e a avaliação da conservação de aminoácidos e domínios foram realizados pelo programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). As sequências de comparação para o alinhamento foram obtidas do banco de dados GeneBank DataBase (<http://ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). A árvore filogenética entre as sequências de aminoácidos de várias PHA sintases foi obtida com o programa MEGA 6.06 utilizando o método de máxima verossimilhança (*Maximum likelihood*). O agrupamento em classes considera a presença do domínio α/β Hidrolase e presença ou ausência dos domínios N-terminais PHBC e PhaC.

4.2. MATERIAIS GERAIS E MÉTODOS DE MICROBIOLOGIA

4.2.1. Bactérias e plasmídeos

As estirpes de bactérias e os plasmídeos que foram utilizados neste trabalho estão relacionadas no Quadro 5.

Estirpes e plasmídeos	Genótipo	Referência
<i>E. coli</i>		
TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-crBC)$ $\Phi80lacZ$ $\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>ara</i> $\Delta 139$ $\Delta (ara-leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen
S17.1	Sm ^R Tra ⁺	SIMON <i>et al.</i> , 1983.
<i>H. seropedicae</i>		
SmR1	Estirpe parental Sm ^R , Nif ⁺	PEDROSA <i>et al.</i> , 1997
SmR1 ($\Delta phaC1$)	Estirpe mutante Sm ^R , deleção cromossomal do gene <i>phaC1</i>	TIRAPELLE, 2012.
SmR1 ($\Delta phaP12$)	Estirpe mutante Sm ^R , deleção cromossomal dos genes <i>phaP1e2</i>	TIRAPELLE, 2012.
SmR1 ($\Delta phaR$)	Estirpe mutante Sm ^R , deleção cromossomal do gene <i>phaR</i>	Este trabalho
SmR1 (MB1)	Estirpe mutante Sm ^R , deleção cromossomal do gene <i>fnr1</i>	BATISTA <i>et al.</i> , 2013
SmR1 (MB2)	Estirpe mutante Sm ^R , deleção cromossomal do gene <i>fnr2</i>	BATISTA <i>et al.</i> , 2013
SmR1 (MB3)	Estirpe mutante Sm ^R , deleção cromossomal do gene <i>fnr3</i>	BATISTA <i>et al.</i> , 2013
SmR1 (MB21)	Estirpe mutante Sm ^R , deleção cromossomal dos genes <i>fnr 2 e 1</i>	BATISTA <i>et al.</i> , 2013
SmR1 (MB23)	Estirpe mutante Sm ^R , deleção cromossomal dos genes <i>fnr 2 e 3</i>	BATISTA <i>et al.</i> , 2013
SmR1 (MB13)	Estirpe mutante Sm ^R , deleção cromossomal dos genes <i>fnr 1 e 3</i>	BATISTA <i>et al.</i> , 2013
SmR1 (MB231)	Estirpe mutante Sm ^R , deleção cromossomal dos genes <i>fnr 1, 2 e 3</i>	BATISTA <i>et al.</i> , 2013
Plasmídeos		
pTZ57R/T	<i>lacZ</i> , amp ^R	Fermentas Inc.
pTZ18R	<i>lacZ</i> , amp ^R	Fermentas Inc.
pMP220	Tc ^R , vetor contendo gene repórter <i>lacZ</i> sem promotor	SPAINK <i>et al.</i> , 1987.
pPW452	Tc ^R , vetor contendo gene repórter <i>lacZ</i> sem promotor e com o sítio de policlonagem do vetor pMP220 na direção oposta ao <i>lacZ</i>	WODLEY, PAUL.
pK18 <i>mobsacB</i>	<i>sacB</i> , <i>lacZ</i> e Km ^R	SCHÄFER, 1994
pCST1	Fragmento <i>EcoRI</i> / <i>Bam</i> HI contendo 567 pb da região promotora do gene <i>phaC1</i> clonado no vetor pMP220. Fusão transcricional <i>phaC1-pMP</i>	Este trabalho

pCST2	Fragmento <i>EcoRI/BamHI</i> contendo 567 pb da região promotora do gene <i>phaC1</i> clonado no vetor pPW452. Fusão transcricional <i>phaC1-pPW</i>	Este trabalho
pCST3	Fragmento <i>BglII/XbaI</i> contendo 575 pb da região promotora do gene <i>phaC2</i> clonado no vetor pMP220. Fusão transcricional <i>phaC2-pMP</i>	Este trabalho
pCST4	Fragmento <i>BglII/XbaI</i> contendo 575 pb da região promotora do gene <i>phaC2</i> clonado no vetor pPW452. Fusão transcricional <i>phaC2-pPW</i>	Este trabalho
pCST5	Fragmento <i>XbaI/PstI</i> contendo 514 pb da região promotora do gene <i>phaC3</i> clonado no vetor pMP220. Fusão transcricional <i>phaC3-pMP</i>	Este trabalho
pCST6	Fragmento <i>XbaI/PstI</i> contendo 514 pb da região promotora do gene <i>phaC3</i> clonado no vetor pPW452. Fusão transcricional <i>phaC3-pPW</i>	Este trabalho
pCST7	Fragmento <i>EcoRI/PstI</i> contendo 545 pb da região promotora do gene <i>phaC4</i> clonado no vetor pMP220. Fusão transcricional <i>phaC4-pMP</i>	Este trabalho
pCST8	Fragmento <i>EcoRI/PstI</i> contendo 545 pb da região promotora do gene <i>phaC1</i> clonado no vetor pPW452. Fusão transcricional <i>phaC4-pPW</i>	Este trabalho
pCST24	Produto de deleção do gene <i>phaR</i> (1082 pb) clonado no sítio <i>SmaI</i> do vetor pTZ18R	Este trabalho
pCST25	Fragmento <i>BamHI/PstI</i> do pCST24 clonado no vetor pK18 <i>mobsacB</i>	Este trabalho
pMPFNR1	Fragmento <i>PstI/BglII</i> contendo região promotora do gene <i>fnr1</i> clonado no vetor pMP220. Fusão transcricional <i>fnr1-lacZ</i>	BATISTA, 2011
pPWPFN	Fragmento <i>PstI/BglII</i> contendo região promotora do operon <i>fixNOP</i> clonado no vetor pPW452. Fusão transcricional <i>fixN-lacZ</i>	BATISTA et al., 2013
pRAMM1	Tc ^R , vetor pLAFR 3.18 contendo o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e sob controle do promotor <i>lac</i>	MONTEIRO, R.A
PEMS140	Tc ^R , vetor pPW452 contendo a região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i>	REGO et al., 2006

QUADRO 5. LISTA DE ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS.

4.2.2. Meios de cultura, condições de cultivo e estoque dos microrganismos

As estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas em meio LB (SAMBROOK *et al.*, 1989) sob agitação a 130 rpm e a 37 °C, ou em estufa a 37 °C em meio LA, que é composto de meio LB mais 15 g/L de ágar. O meio LB possui composição:

Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L
pH	7,0

QUADRO 6. COMPONENTES CONSTITUINTES DO MEIO LB. FONTE: SAMBROOK *et al.*, 1989.

Para o cultivo de *E.coli* com a finalidade de preparar células eletrocompetentes, foi utilizado o meio SOB que possui composição:

Triptona	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	0,584 g/L
KCl	0,186 g/L
pH	7,0

QUADRO 7. COMPONENTES CONSTITUINTES DO MEIO SOB. FONTE: SAMBROOK *et al.*, 1989.

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

Triptona	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	0,06 g/L
KCl	0,019 g/L
MgCl₂	0,094 g/L
MgSO₄	0,12 g/L
Glucose	0,36 g/L

QUADRO 8. COMPONENTES CONSTITUINTES DO MEIO SOC. FONTE: SAMBROOK *et al.*, 1989.

As células de *E. coli* foram estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em glicerol 50% ou a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em glicerol 15% (SAMBROOK *et al.*, 1989).

A estirpe de *H. seropedicae* SmR1 foi cultivada a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação a 120 rpm, durante 16 horas em meio NFbHPN (KLASSEN *et al.*, 1997). O meio NFb-malato (pH 6,8) possui composição:

MgSO₄.7H₂O	2 x 10⁻¹ g/L
NaCl	1 x 10 ⁻¹ g/L
CaCl₂	2 x 10 ⁻² g/L
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 ⁻² g/L
FeSO₄. 7H₂O	2 x 10 ⁻² g/L
Malato de sódio	5 g/L
Biotina	1 x 10 ⁻⁴ g/L
Na₂MoO₄.2H₂O	2 x 10 ⁻³ g/L
MnSO₄.H₂O	2,35 x 10 ⁻³ g/L
H₃BO₃	2,8 x 10 ⁻³ g/L
CuSO₄.5H₂O	8 x 10 ⁻⁵ g/L
ZnSO₄.7H₂O	2,4 x 10 ⁻⁴ g/L

QUADRO 9. COMPONENTES CONSTITUINTES DO MEIO NFb-MALATO. FONTE: KLASSEN *et al.*, 1997.

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

4.2.3. Antibióticos

Os antibióticos utilizados nos meios de cultura:

ANTIBIÓTICO	ABREVIATURA	CONCENTRAÇÃO FINAL	ORGANISMO
Ampicilina	Amp	250 µg/mL	<i>E. coli</i>
Canamicina	Km	100 µg/mL	<i>E. coli</i>
		500 µg/mL	<i>H. seropedicae</i>
Cloranfenicol	Cm	30 µg/mL	<i>E. coli</i>
		100 µg/mL	<i>H. seropedicae</i>
Estreptomicina	Sm	80µg/mL	<i>E. coli</i>
		80µg/mL	<i>H. seropedicae</i>
Tetraciclina	Tc	10µg/mL	<i>E. coli</i>
		10µg/mL	<i>H. seropedicae</i>

QUADRO 10. ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES. FONTE: SAMBROOK *et al.*, 1989.

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

4.3. MÉTODOS DE MANIPULAÇÃO DE DNA

4.3.1. Extração e purificação de DNA genômico de *H. seropedicae*

H. seropedicae SmR1 foi cultivado em meio NFbHPN e as células foram coletadas por centrifugação a 12.000 x g por 1 minuto. A massa de células foi ressuspendida, por agitação em “vortex”, em tampão GET (50 mmol/L glucose, 25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0; 10 mmol/L EDTA pH 8,0). As células foram incubadas com lisozima 100 µg/mL a 37 °C por 20 minutos e depois lisadas com adição de SDS 1% seguido de incubação a temperatura ambiente por cinco minutos. O material foi incubado com Pronase 50 µg/mL a 37 °C por 16 horas e a mistura foi extraída sequencialmente uma vez com fenol equilibrado,

uma vez com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e duas vezes com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após a extração, o DNA genômico foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto, depois foi lavado com 1 mL de etanol 70%, seco e ressuspendido em 100 µL de água ultra pura estéril.

4.3.2. Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)

O sistema de reação (20 µL) foi composto de: 1-5 ng/mL de DNA genômico de *H. seropedicae*, 0,5 pmol/µL de cada *primer*, 0,2 mmol/L de dNTPs, tampão de reação GC ou HF contendo 50 mmol/L de cloreto de magnésio, DMSO 3% e 0,2 µL de *Phusion* DNA Polimerase (2 U/µL, Thermo Fischer Scientifics, MA, EUA). A amplificação foi realizada com o seguinte programa de 30 ciclos: 10 segundos a 98 °C, 30 segundos para anelamento e 30 segundos a 72 °C para a extensão. A amplificação das regiões promotoras selecionadas foi realizada utilizando uma curva de temperatura de 55 a 68 °C para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores.

Os oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados para a amplificação das regiões promotoras destinadas aos estudos *in vivo* estão listados no quadro 11.

OLIGOS	ORF	SEQUÊNCIA	ENZIMAS DE RESTRIÇÃO
PphaC1/F	<i>Hsero2999</i>	5' <u>GAATTC</u> CTGAGTTTCTGGATCGAAGG 3'	<i>EcoRI</i>
PphaC1/R	<i>Hsero2999</i>	5' GAATCCGGGATTGGAATTG 3'	<i>BamHI</i>
PphaC2/F	<i>Hsero2405</i>	5' <u>AGATCT</u> ATCATGGGCATGCTC3'	<i>BglII</i>
PphaC2/R	<i>Hsero2405</i>	5' TCTAG <u>ACC</u> AGCTGTTGTGTC 3'	<i>XbaI</i>
PphaC3/F	<i>Hsero0265</i>	5' TCTAGATGAGCAAGCCATTGG 3'	<i>XbaI</i>
PphaC3/R	<i>Hsero0265</i>	5' <u>CTGCAGG</u> TCCGGAATAGTAC 3'	<i>PstI</i>
PphaC4/F	<i>Hsero2625</i>	5' <u>GAATTC</u> ATTGTCTTCACCGACCATGC 3'	<i>EcoRI</i>
PphaC4/R	<i>Hsero2625</i>	5' <u>CTGCAGT</u> TCTTGCGGTTGATC 3'	<i>PstI</i>

QUADRO 11 – OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES PROMOTORAS. * F: oligonucleotídeo 5', R: oligonucleotídeo 3'. Os sítios de restrição que foram introduzidos estão sublinhados. Oligos: Oligonucleotídeos; P: promotor.

Todos os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pTZ57R/T e confirmados por sequenciamento para então serem utilizados em clonagens posteriores.

4.3.3. Clonagem em vetor contendo o gene repórter *lacZ*

Os vetores pMP220 e pPW452 (ANEXO 6) foram utilizados para os estudos de expressão dos genes *phaC1*, *phaC2*, *phaC3* e *phaC4* *in vivo*. Estes vetores possuem o gene repórter *lacZ* desprovido de promotor (SPAINK *et al.*, 1987; WOODLEY, P). A clonagem de regiões promotoras de interesse permite observar a expressão gênica como uma medida indireta da atividade da proteína β -galactosidase descrita na seção 4.7.1.

As regiões promotoras dos genes *phaC1*, *phaC2*, *phaC3* e *phaC4*, contendo 567 pb, 575 pb, 514 pb e 545 pb foram clonadas nos vetores pMP220 e pPW452.

4.3.4. Minipreparação de plasmídeo por lise alcalina

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

4.3.5. Sequenciamento de DNA

A reação de sequenciamento foi realizada segundo o método de Sanger (SANGER & COULSON, 1977), aonde os didesoxinucleotídeos foram utilizados como terminadores de cadeia. O sistema de reação foi constituído de aproximadamente 0,1 μ g de DNA de fita dupla, 0,5 μ L de oligonucleotídeo iniciador (10 pmol/ μ L), 3,0 μ L tampão de sequenciamento *BigDye Terminator* v3.1 (5x), 1,0 μ L de reagente *BigDye Terminator* (*BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems, EUA) que contém os cromóforos fluorescentes como terminadores de cadeia e água ultra pura suficiente para 10,0 μ L. O sistema foi incubado em termociclador a 96 °C por 1 minuto e 15 segundos e depois utilizou a seguinte sequência de temperaturas por 30 ciclos:

TEMPERATURAS	TEMPO
96 °C	15 segundos
X	15 segundos
60 °C	4 minutos

QUADRO 12. SEQUÊNCIA DE TEMPERATURAS PARA A REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO. * X: temperatura de anelamento foi diferente para cada oligonucleotídeo.

Em seguida o produto das reações foi transferido para um novo tubo contendo 2 μL de acetato de amônio (7,5 mol/L) e 60 μL de etanol absoluto para a sua purificação. Após precipitação, a amostra de DNA foi centrifugada a 12.000 x g por 20 minutos, lavada uma vez com etanol 70% e seca. O DNA foi ressuspendido em 4 μL de *Hi-Di Formamide* (*Applied Biosystems*, EUA), desnaturado por 2 minutos a 96 °C e aplicado no gel do sequenciador automático de DNA 3500xL Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, EUA).

4.3.6. Clivagem do DNA com enzimas de restrição

Os sistemas de restrição foram compostos pelas enzimas apropriadas, tampão de reação e DNA purificado, e foram incubados em temperatura e tempo, conforme sugerido pelos fabricantes.

4.3.7. Ligação de DNA inserto a vetores

A reação de ligação foi composta de: 2 μL de vetor (aproximadamente 50 ng/ μL); 5 μL de inserto (aproximadamente 100 ng/ μL); 2 μL de tampão para a enzima T4 DNA Ligase (10X) e 0,5 U de T4 DNA Ligase, para um volume final de 20 μL . A reação foi incubada a 4 °C durante um período de 12 horas. O produto de ligação foi introduzido por choque térmico na estirpe *E. coli* TOP10 (ITEM 4.4.1) e os transformantes foram selecionados pela resistência a antibiótico(s).

4.3.8. Eletroforese de DNA

Eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose em cuba horizontal como descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989). Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e os perfis eletroforéticos foram registrados em transluminador de luz ultravioleta com sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

4.4. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

4.4.1. Transformação por choque térmico em *E. coli*

O preparo das células de *E. coli* competentes ao choque térmico foi realizado segundo CHUNG *et al.* (1989). Células de *E. coli* crescidas por 16 horas foram reinoculadas em 10 mL de meio LB na proporção de 1:100. A cultura de células foi mantida sob agitação (160 rpm) a 30 °C até atingir D.O.₆₀₀ entre 0,3-0,4. As células foram centrifugadas a 5000 x g por 1 minutos a 4 °C e o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL da solução TSS filtrada e gelada (PEG 8000 10% m/v, DMSO 5% v/v, MgSO₄ ou MgCl₂ 20-50 mM, em meio LB pH 6,5).

A solução de células foi separada em alíquotas de 100 µL que foram misturadas com a solução de plasmídeo (5 ng - 0,5 µg/µL). O sistema foi incubado por 30 minutos em gelo, 45 segundos a 42 °C e 2 minutos em gelo. Após o choque térmico, as células foram recuperadas em 0,9 mL de meio LB e mantidas por 60 minutos em estufa 37 °C sem agitação. Em seguida, 200 µL da suspensão de bactérias transformadas foram plaqueados em meio LA contendo os antibióticos necessários para a seleção dos clones e as placas foram mantidas a 37 °C durante 16 horas.

4.4.2 Transferência de DNA plasmidial por conjugação bacteriana biparental

Plasmídeos contendo as fusões transcricionais (*phaC1*-pMP220, *phaC1*-pPW452, *phaC2*-pMP220, *phaC2*-pPW452, *phaC3*-pMP220, *phaC3*-pPW452, *phaC4*-pMP220 e *phaC4*-pPW452) foram transformados em *E. coli* S17.1. As estirpes selvagem SmR1, simples mutantes (Δ *phaC1*, Δ *phaR*, MB1, MB2, M3), duplos mutantes (Δ *phaP12*, MB21, MB23 e MB13) e triplo mutante (MB231) de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* S17.1 (doadora) foram cultivadas por 16 horas em meio NFbHPN e LB, respectivamente. Em seguida, 1 mL da cultura de *H. seropedicae* SmR1 foi centrifugado a 2.000 *xg* por 30 segundos e o *pellet* foi ressuspensão em 100 μ L de meio NFbHPN. As células foram misturadas com 50 μ L da cultura de *E. coli* S17.1 contendo o plasmídeo desejado e depositada em forma de gota em meio LA/NFbHPN-malato na proporção de 1:3 e sem antibióticos. As placas foram mantidas a 30 °C por 12h. A massa celular foi raspada da placa e ressuspensão em 1 mL de meio NFb-malato e diluída (1:100 e 1:1000). As diluições foram plaqueadas em meio NFbHPN-malato contendo os antibióticos adequados e as placas foram mantidas a 30 °C por 48 horas.

4.5. ESTRATÉGIA DE CONSTRUÇÃO DO MUTANTE PARA O GENE *phaR* DE *H.seropedicae*

O mutante Δ *phaR* de *H. seropedicae* foi construído a partir da deleção do gene *phaR*. O mutante cromossomal do gene *phaR* foi obtido por *overlapping PCR* (HECKMAN e PEASE, 2007). Para construção do mutante *phaR* foram construídos dois pares de iniciadores: um par de oligonucleotídeos abrange a região a montante do gene e o seu início (fragmento *phaR_UP*) e o outro par de oligonucleotídeos abrangendo o fim do gene e a jusante do códon de terminação (fragmento *phaR_DOWN*). Dessa maneira o amplicon flanqueia o gene que se deseja deletar. Para amplificação do fragmento *phaR_UP*: iniciadores Fw_*phaR_UP* (5'-GAGGATCCCGTGACCGTCAACACCGTCT-3') e Rev_*phaR_UP* (5'-agatctcttaggtcgtctctaTGCAGTAGTCATCTGAAGTCCAGTC-3') foram usados, que produziram um fragmento de 556 pb. Para amplificação do fragmento *phaR_DOWN*: iniciadores Fw_*phaR_DOWN* (5'-

tagagacgacctaagagatctATGTTTCGGCACCTTCCCC-3') e Rev_phaR_DOWN (5'-GTTCTGCAGTTGCCGCGATTCATGGTGG-3') foram usados, que produziram um fragmento de 510 pb. Iniciadores Rev_phaR_UP e Fw_phaR_DOWN, que contêm uma sequência complementar de 21 bp nas suas respectivas extremidades 5' (letra minúscula), foram necessários para *overlapping PCR*. Os produtos de *PCR* das duas ampliações foram purificados do gel de agarose e usados como molde para *overlapping PCR*, que utilizou os seguintes iniciadores Fw_phaR_UP e Rev_phaR_DOWN para amplificar o fragmento de deleção com o tamanho de 1087 bp (Δ phaR) que foi purificado e ligado no vetor pTZ18R digerido com *SmaI*, que originou o plasmídeo pCST24. Após, a integridade da sequência do produto clonado no plasmídeo pTZ18R foi confirmada por reação de sequenciamento, o fragmento Δ phaR foi subclonado nos sítios *BamHI* e *PstI* do plasmídeo pK18mobsacB, que originou o plasmídeo pCST25. O plasmídeo pCST25 foi transformado em *E. coli* S17-1 e conjugado para *H. seropedicae* SmR1 por conjugação biparental, os transconjugantes com primeiro evento de recombinação homóloga foram selecionados em meio NFbHPN-malato ágar com Sm 80 μ g mL⁻¹, Nal 5 μ g mL⁻¹ and Km 500 μ g mL⁻¹. Uma colônia do primeiro evento de recombinação foi coletada e cultivada 3 mL of NFbHPN-malato sem antibióticos. A ausência de antibióticos nesta etapa é importante para a ocorrência do segundo evento de recombinação.

A cultura foi diluída em série e plaqueada em NFbHN-malato com baixas concentrações de fosfato (15,94 g/L de KH₂PO₄ e 1,78 g/L de K₂HPO₄) suplementado 5% de sacarose. As colônias crescidas em sacarose foram examinadas quanto à sensibilidade a canamicina. Finalmente, as colônias resistentes à sacarose e sensíveis canamicina foram averiguadas por *PCR* com seguintes iniciadores FO_phaF (5'-GGTTTCGGTCGCATCATCAA-3') e RO_phaF (5'-CTTCATCGGACTTGACCAGG-3') construídos para anelar 115 bp à montante e 123 pb à jusante da região deletada, respectivamente, com objetivo de identificar o mutante no gene *phaR* (Δ phaR, ANEXO 5).

4.6. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* DAS SINTASES DE *H. seropedicae*

4.6.1. Determinação da atividade de β -galactosidase

A atividade de β -galactosidase em *H. seropedicae* SmR1, simples mutantes ($\Delta phaC1$, $\Delta phaR$, MB1, MB2, M3), duplos mutantes ($\Delta phaP12$, MB21, MB23 e MB13) e triplo mutante (MB231) cultivadas no meio mínimo NFbHPN, foi determinada segundo MILLER (1972).

O sistema de reação foi composto de 900 μ L de tampão Z, 25 μ L de clorofórmio e 100 μ L de cultura que foi em seguida misturado e incubado por 5 minutos a 30 °C. O tampão Z completo possui a seguinte composição:

Na₂HPO₄	60 mmol/L
NaH₂PO₄	40 mmol/L
KCl	10 mmol/L
MgSO₄	1 mmol/L
β-mercaptoetanol	50 mmol/L
SDS	0,1% (m/v)
pH	7,0

QUADRO 13. COMPOSTOS CONSTITUINTES DO TAMPÃO Z COMPLETO. FONTE: MILLER, 1972.

A reação foi iniciada pela adição de 200 μ L do substrato ONPG (4 mg/mL) e interrompida pela adição de 500 μ L de Na₂CO₃ (1 mol/L). As amostras foram submetidas à leitura de absorvância do o-nitrofenol (420 nm), turbidez da mistura (550 nm) e densidade celular (600 nm).

A atividade foi expressa em unidades Miller segundo a fórmula:

Unidades Miller = $1000 \times (DO_{420nm} - 1,75 \times DO_{550nm}) / (D.O.600_{nm} \times t \times v)$,
onde t = tempo de reação (minutos) e v = volume de cultura (mL).

Nos ensaios em *H. seropedicae*, a atividade foi seguida durante o crescimento celular e os ensaios foram realizados em triplicata técnica e em triplicata biológica.

4.6.2. Determinação da atividade β -Galactosidase em *H. seropedicae* cultivado em diferentes concentrações de oxigênio

Para avaliar o efeito do oxigênio na expressão do gene *phaC2*. Atividade β -Galactosidase da fusão *phaC2-lacZ* (pCST3) foi determinada sob diferentes concentrações iniciais de oxigênio de 2%, 6%, 4%, 8% e ar (20,8%). As estirpes (SmR1, Δ *phaC1*, MB2, MB13 e MB231) foram ressuspensas em meio NFbHPN-malato para uma $O.D_{600} = 0.05$ e cultivadas por três horas sob diferentes concentrações de oxigênio como descrito acima. As concentrações de oxigênio no início do ensaio foram ajustadas como descrito por Batista e colaboradores (2013). Após o tempo de incubação, 100 μ L da amostra foram ressuspensos em 900 μ L de tampão Z e utilizados na determinação da atividade β -galactosidase como descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em unidades Miller (MU).

4.6.3. Quantificação de PHA

Durante os cultivos, a quantidade de PHA nas amostras foi determinada por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (FID) baseado no método de BRAUNEGG *et al.* (1978) com modificações sugeridas por HUIJBERTS *et al.* (1994). O precipitado de células liofilizado (10 mg) foi pesado em um tubo Pyrex® com tampa para ser metanolizado com 2 mL de uma solução de metanol e H_2SO_4 a 3% (v/v). A mistura foi incubada a 100°C durante 3,5 horas para assegurar que todo o material foi esterificado. Após o tempo de reação, os tubos foram resfriados em banho de gelo e extraídos com 2 mL de $NaHCO_3$ aquoso (1M). A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica extraída duas vezes com água destilada. Após separação das fases, a fase inferior que contém os ésteres metílicos de ácido 3-hidróxibutírico foi seca com Na_2SO_4 . Os ésteres foram quantificados por cromatografia gasosa. Foi utilizada uma coluna capilar CP-Sil-5CB (Varian Inc.) de 30 m x 0.25 mm. Como gás de arraste foi utilizado argônio em um fluxo de 0,7 mL/min. A temperatura do injetor foi mantida em 250°C, com rampa de temperatura na coluna iniciando em 50°C, subindo até 250°C a 40°C/min. A quantificação foi realizada utilizando uma curva padrão feita com padrão de 3-hidróxibutirato (Sigma Aldrich-Co),

realizada por cromatografia gasosa utilizando detector de ionização por chama (FID).

4.6.3.1. Avaliação da produção de PHA nas estirpes selvagem (SmR1) e mutante ($\Delta phaC1$) de *H. seropedicae*

Para avaliar a produção de PHA foi utilizado meio NFbHPN-malato. Tanto a estirpe selvagem SmR1 quanto o mutante $\Delta phaC1$ foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 60 mL contendo 10 mL de meio e este foi inoculado com 100 μ L de um pré-inóculo desenvolvido no dia anterior durante 16 horas. O cultivo foi incubado a 30 °C e agitado a 120 rpm. Após as culturas de células atingirem DO_{600nm} de 1,0, amostras de 10 mL do meio foram coletadas e centrifugadas para determinar a quantidade de PHA sintetizado.

4.7. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* DAS PROTEÍNAS Fnr DE *H. seropedicae*

4.7.1. Determinação da atividade de β -galactosidase

Atividade β -galactosidase de *H. seropedicae* SmR1, $\Delta phaC1$ e MB231 transformadas com as fusões *fnr1-lacZ* e *fixN-lacZ* foi determinada. As estirpes foram cultivadas em meio NFbHPN-malato sob agitação de 120 rpm a 30 °C por 16 horas. Após esse período de cultivo, a cultura de células foi ressuspensa em meio NFbHPN-malato para uma DO_{600nm} = 0,01 e cultivadas até atingir DO_{600nm} = 1,2 ou por 12 horas. Após o tempo de incubação, 100 μ L da amostra foram ressuspensos em 900 μ L de tampão Z e utilizados na determinação da atividade β -galactosidase como descrito no item 4.6.1. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica e em triplicata biológica.

4.7.2. Determinação da atividade de β -galactosidase de *H. seropedicae* cultivado em diferentes aerações (250 e 120 rpm)

Atividade β -Galactosidase de *H. seropedicae* SmR1, $\Delta phaC1$ transformadas com a fusão *fnr1-lacZ* foi determinada. As estirpes foram cultivadas em meio NFbHPN-malato sob agitação de 250 rpm a 30 °C por 16 horas. Após esse período de cultivo, a cultura de células foi utilizada como inóculo em meio NFbHPN-malato para uma $DO_{600nm} = 0,09$ e cultivadas até atingir $DO_{600nm} = 0,3$, período **C**, controle, que é o tempo antes da troca de aeração (mudança de rotação de 250 para 120 rpm). Após este tempo de incubação, 100 μ L da amostra foram ressuspensos em 900 μ L de tampão Z e utilizados na determinação da atividade β -galactosidase como descrito no item 4.6.1. Após o tempo **C** uma parte da cultura de células foi agitada a 250 rpm e a outra foi agitada a 120 rpm, a cada 2 horas alíquotas de 100 μ L foram coletadas e ensaiadas para atividade β -galactosidase por um período de 6 horas que corresponde aos períodos **T2** corresponde ao tempo de 2 horas após a troca de aeração das culturas de células; **T4** corresponde a 4 horas e **T6** equivale ao tempo de 6 horas de incubação. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica e em triplicata biológica.

4.7.3. Avaliação da produção de PHA nas estirpes selvagem (SmR1) e mutantes Δfnr de *H. seropedicae*

Para avaliar a produção de PHA foi utilizado meio NFbHPN-malato. Tanto a estirpe selvagem SmR1 quanto os mutantes Δfnr foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 60 mL contendo 10 mL de meio e este foi inoculado com 100 μ L de um pré-inóculo desenvolvido no dia anterior durante 16 horas. O cultivo foi incubado a 30 °C e 120 rpm. Após a cultura de células atingir DO_{600nm} de 1,0, amostras de 10 mL do meio foram coletadas e centrifugadas para determinar a quantidade de PHA sintetizado, conforme descrito no item 4.6.4.

4.8. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO MUTANTE $\Delta phaC1$ DE *H. seropedicae*

4.8.1. RESISTÊNCIA A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE

4.8.1.1. Curva de crescimento de *H. seropedicae* submetido a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

As estirpes selvagem e mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae* foram cultivadas em 10 mL de meio NFBHPN-malato com estreptomicina (80 $\mu\text{g/mL}$), sob agitação de 120 rpm e mantidas a 30 °C até atingir a $OD_{600\text{ nm}} = 0,5$. Em seguida, diferentes concentrações de H_2O_2 (2,0 mM; 3,0 mM e 5,0 mM) foram adicionadas à cultura de células. Após isso, a cada 30 minutos durante um período de 7 horas, 200 μL da amostra foram coletados no intuito de medir o crescimento celular. Como controle, ambas as estirpes foram cultivadas sem adição de H_2O_2 .

4.8.1.2. Curva de crescimento de *H. seropedicae* submetido a diferentes concentrações de metilviolgênio

As estirpes selvagem e mutante ($\Delta phaC1$) de *H. seropedicae* foram cultivadas em 10 mL de meio NFBHPN-malato suplementado com estreptomicina (80 $\mu\text{g/mL}$), sob agitação de 120 rpm e mantidas a 30 °C até atingir a $OD_{600\text{ nm}} = 0,5$. Em seguida, diferentes concentrações de paraquat (0,5 mM; 2,0 mM; 5,0 mM and 10 mM) foram adicionadas à cultura de células. Após isso, a cada 30 minutos durante um período de 7 horas, 200 μL da amostra foram coletados no intuito de medir o crescimento celular. Como controle, ambas as estirpes foram cultivadas sem adição de metilviolgênio.

4.8.1.3. Determinação dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio por citometria de fluxo

As estirpes SmR1 e mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae* foram cultivadas em 10 mL de meio NFBHPN-malato com estreptomicina (80 $\mu\text{g/mL}$), sob agitação de 250 ou 120 rpm, a 30 °C. A densidade ótica inicial a 600 nm da cultura de células foi de 0,09. Foram coletadas amostras nos seguintes períodos: após 3 horas de incubação ($DO_{600\text{nm}} = 0,4$), considerado como tempo zero hora; após 5 horas de incubação ($DO_{600\text{nm}} = 0,8$), considerado como tempo 2 horas; após 7 horas de incubação, ($DO_{600\text{nm}} = 1,4$), considerado como tempo 4 horas; e após 9 horas de incubação ($DO_{600\text{nm}} = 1,6$), considerado como tempo 6 horas. As amostras foram transferidas para tubos de 1,5 mL e centrifugadas a 14.000 x g por 1 minuto. O *pellet* foi ressuspensão em 500 μL de PBS, contendo 1 mM EDTA e 0,01% Tween 20, e em seguida incubado com 50 μM do reagente 2'-7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFHDA) por 30 min a 37 °C, no escuro. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur equipado com laser de argônio (488 nm). A fluorescência emitida foi registrada em detector FL1-H (530/30 nm) e os dados analisados pelo programa *CellQuest*. A intensidade de fluorescência (GMean) obtida a partir dos histogramas foi utilizada para determinar a quantidade de EROs intracelular.

4.8.2. Determinação de atividade nitrogenase de *H. seropedicae* SmR1 e $\Delta phaC1$

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno a etileno (KLASSEN et al., 1997).

Os frascos com culturas em meio NFbHP-malato semi-sólido suplementado com 0,5 mmol/L de glutamato foram vedados com rolhas de borracha (suba-seal) e então foi injetado acetileno gasoso (10% do volume da fase gasosa do frasco). A cultura foi incubada a 30 °C por 1 hora. Após este período, foi coletada uma amostra de 0,5 mL para análise por cromatografia gasosa do etileno formado. Foi utilizado cromatógrafo Varian Star 3400 CX

equipado com uma coluna de Porapak N e detector de ionização de chama. A temperatura da coluna foi mantida em 120 °C e do detector em 200 °C. O gás de arraste foi o nitrogênio super seco.

Etileno padrão (100 ppm) foi fornecido pela White Martins S.A. A atividade da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína da cultura.

4.8.3. Análise do perfil transcriptômico das estirpes selvagem SmR1 e mutante *ΔphaC1 H. seropedicae*

Células de *H. seropedicae* selvagem SmR1 e mutante *ΔphaC1* foram cultivadas em meio NFb-HPN-malato incubadas em agitador, sob rotação de 120 rpm à 30 °C até atingir a DO_{600nm} de 0,4 ou 1,2. Em seguida, a extração do RNA total de ambas estirpes foi realizado com o kit de isolamento de RNA Ribopure Bacteria (Thermo Fisher Scientific) conforme o protocolo do fabricante. Para eliminar possíveis contaminantes de DNA presentes no RNA total extraído, foi adicionado às amostras de RNA tampão DNase Buffer e 2 µL de DNase I (2U/µL). A mistura foi incubada em estufa 37 °C por no mínimo 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 20% do volume da amostra de solução inativadora (*DNase Inactivation Reagent*, Thermo Fisher Scientific), e mantida a temperatura ambiente por 2 minutos (homogeneizada vigorosamente duas vezes neste período). Após incubação, a mistura foi centrifugada (14.500 x g) por 60 segundos para precipitar a solução inativadora. O sobrenadante, contendo o RNA, foi transferido para um novo tubo. Em seguida, um gel de agarose 1%, livre de RNase, foi feito para analisar o RNA extraído. O RNA extraído foi precipitado com 10% de acetato de sódio (3 mol/L), 2% de glicogênio e 3 volumes de etanol 96%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (14.500 x g) por 15 minutos, o sobrenadante retirado cuidadosamente e o precipitado de RNA lavado com 500 µL de etanol 70% gelado, centrifugado (14.500 x g) por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o precipitado seco em câmara de vácuo por 30 minutos e dissolvido em 15 µL de água estéril livre de RNase. O RNA total dissolvido em 15 µL de água (contendo de 4 – 10 µg de RNA) foi depletado de

RNA ribossomal utilizando o kit MICROBExpress™ (Ambion-Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Para a construção das bibliotecas para sequenciamento, 0,5 µg de RNA depletado de rRNA, em no máximo 8 µL, foi tratado com o kit *Ion Total RNA-Seq v2* seguindo as indicações do fabricante. Os fragmentos de cDNA foram sequenciados em aparelho *Ion Proton™ sequencer* (Thermo Scientific, EUA). As sequências possuem um comprimento médio de 90 pares de bases (pb) e em seguida foram tratadas com filtro de qualidade utilizando o programa “CLC Genomics Workbench”. Este filtro selecionou leituras de sequência com escore de qualidade maior que 0,05 (probabilidade de erro <5%) e descartou leituras com tamanho menor que 50 pb. As sequências selecionadas foram mapeadas com os dados do genoma de *H. seropedicae* SmR1 utilizando o programa CLC Genomics Workbench (CLC Bio). Um gene foi considerado como expresso quando mostrou cobertura de leituras igual ou maior de 3 vezes, e diferencialmente expresso quando o valor de variação de expressão foi 2 vezes maior/menor que na condição comparativa, com valor de *p*-ajustado menor que 0,05 (teste de Baggerley).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Herbaspirillum seropedicae APRESENTA QUATRO GENES POTENCIALMENTE CODIFICANTES DE PROTEÍNAS HOMÓLOGAS ÀS PHA SINTASES

O genoma de *H. seropedicae* estirpe SmR1 foi sequenciado e anotado pelo programa Genopar, revelando informações importantes sobre os vários aspectos do seu metabolismo (PEDROSA *et al.*, 2011). Dentre os 4.804 genes anotados, foram identificados 13 genes potencialmente envolvidos no metabolismo de polihidroxicanoatos (PHAs). A análise *in silico* dos 13 genes de *H. seropedicae* revelou que quatro genes codificam prováveis PHA sintases: *phbC1* (Locus_Tag: Hsero_2999, Ref_seq: YP_003776395.1); *phbC2* (Locus_Tag: Hsero_2405, Ref_Seq: YP_003775812.1); *phaC1* (Locus_Tag: Hsero_0265, Ref_Seq: YP_003773699.1); *phaC2* (Locus_Tag: Hsero_2625, Ref_Seq: YP_003776029.1), *phbF*, codifica o regulador transcricional PhbF (Locus_Tag: Hsero_2997, Ref_Seq: YP_003776393.1) e os demais também estão envolvidos no metabolismo de PHA (ANEXOS 1, 2, 3 e 4). Os genes *phbC1*, *phbC2*, *phaC1*, *phaC2* e *phbF* codificam proteínas com 588, 590, 367, 832 e 188 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Esses genes serão nomeados a partir de agora como *phaC1*, *phaC2*, *phaC3*, *phaC4* e *phaR*, conforme nomenclatura proposta por Rehm e Steinbüchel (1999) e para seguir a nomenclatura corrente para seus homólogos em outras bactérias.

Os níveis de identidade e similaridade das proteínas PhaC1, PhaC2, PhaC3 e PhaC4 de *H. seropedicae* SmR1 estão apresentados na Tabela 1. As proteínas PhaC1 e PhaC2 de *H. seropedicae* SmR1 compartilham 32,3% de identidade e 47,2% de similaridade. PhaC1 e PhaC3 compartilham 14,4% de identidade e 23,8% de similaridade, enquanto PhaC1 e PhaC4 de *H. seropedicae* SmR1 compartilham 26% de identidade e 47% de similaridade. PhaC2 e PhaC3 compartilham 13,6% e 22,9% de identidade e similaridade, enquanto que PhaC2 e PhaC4 compartilham 24% e 44% de identidade e similaridade, respectivamente. PhaC3 compartilha 24% de identidade e 41% de similaridade com PhaC4. As maiores identidades entre as PHA sintases de *H.*

seropedicae foram encontradas para PhaC1 e PhaC2 (32,3%) e PhaC1 e PhaC4 (26,0%). Os menores níveis de identidade foram observados entre PhaC2 e PhaC3 (13,6%) e entre PhaC1 e PhaC3 (14,4).

Estes resultados demonstram que as PHA sintases de *H. seropedicae* apresentam uma baixa identidade entre elas.

TABELA 1. IDENTIDADE E SIMILARIDADE DE PHA SINTASES DE *H. seropedicae* SmR1

PROTEÍNAS	PhaC1 _{Hs}		PhaC2 _{Hs}		PhaC3 _{Hs}		PhaC4 _{Hs}	
	IDENT. (%)	SIMIL. (%)						
PhaC1_{Hs}	100	100	32,3	47,2	14,4	23,8	26,0	47,0
PhaC2_{Hs}	32,3	47,2	100	100	13,6	22,9	24,0	44,0
PhaC3_{Hs}	14,4	23,8	13,6	22,9	100	100	24,0	41,0
PhaC4_{Hs}	26,0	47,0	24,0	44,0	24,0	41,0	100	100

Para obter os valores de identidade e similaridade, as sequências das respectivas proteínas foram submetidas ao alinhamento múltiplo de aminoácidos, usando a ferramenta de bioinformática BlastP.

Dados de comparação de identidade e similaridade das proteínas PhaC1, PhaC2, PhaC3 e PhaC4 de *H. seropedicae* SmR1 com as proteínas PhaC₁ e PhaC₂ de *R. eutropha* H16 estão apresentados na Tabela 2. PhaC1_{Hs} compartilhou maior identidade com PhaC1_{Re} do que com PhaC2_{Re}. PhaC2_{Hs} apresentou maior identidade com PhaC2_{Re} do que com PhaC1_{Re}. PhaC3_{Hs} compartilhou menores índices de identidade e similaridade com PhaC1_{Re} e PhaC2_{Re}. PhaC4_{Hs} apresentou 25 e 24% de identidade com PhaC1_{Re} e PhaC2_{Re}, respectivamente.

TABELA 2. IDENTIDADE E SIMILARIDADE DE PHA SINTASES DE *H. seropedicae* SmR1 e *R. eutropha* H16.

	PhaC1 _{Re}		PhaC2 _{Re}	
	Ident. (%)	Simil. (%)	Ident. (%)	Simil. (%)
PhaC1 _{HS}	51,5	64,4	30,9	48,2
PhaC2 _{HS}	32,6	49,7	46,4	62,3
PhaC3 _{HS}	14,9	23,2	15,1	23,2
PhaC4 _{HS}	25,0	38,0	24,0	44,0

Para obter os valores de identidade e similaridade, as sequências das respectivas proteínas foram submetidas ao alinhamento múltiplo de aminoácidos, usando a ferramenta de bioinformática BlastP.

Estes resultados de análise *in silico* sugerem que a PhaC1_{HS} possa ser a principal PHA sintase de *H. seropedicae*, devido a relativa alta similaridade (64%) com a PhaC1_{Re}, que é a principal PHA sintase no modelo *R. eutropha* H16. Em *R. eutropha* H16, tentativas de complementação do mutante $\Delta phaC1$ expressando o gene *phaC2* sob controle do promotor *lac* mostraram que o mutante foi incapaz de acumular PHA (PEPLINSKI *et al.*, 2010). Isto indica que PhaC2 poderia não ter atividade nas condições testadas. Já quando a mesma construção foi transferida para o mutante PHB⁴⁻ de *R. eutropha*, que possui um fenótipo PHB negativo, devido à uma mutação pontual G320A no gene *phaC1*, houve complementação para a síntese de PHB. A mutação pontual gera um códon de parada abortando a tradução em um produto de 160 resíduos de aminoácidos, sendo que a PhaC1 completa possui 589 resíduos. Assim, Peplinski e colaboradores (2010) concluíram que PhaC2_{Re} pode ser uma PHA sintase, entretanto os mecanismos de regulação transcricional e da sua atividade ainda não estão totalmente esclarecidos. Como a proteína PhaC2_{HS} apresentou maior similaridade (62,3%) contra a PhaC2_{Re}, sugere-se que esta também possa ter um papel secundário na síntese de PHAs em *H. seropedicae* assim como foi observado para *R. eutropha*. PhaC4 compartilhou baixa identidade com as PhaCs de *R. eutropha* e PhaC3_{HS} é a PHA sintase de *H.*

seropedicae que mais difere das sintases de *R. eutropha*, de acordo com a identidade de sequências de aminoácidos.

As sequências de aminoácidos de PHA sintases foram alinhadas (Figura 9). Cada proteína foi submetida à busca por domínios na base de dados do Pfam e cada domínio foi alinhado, separadamente. O domínio PHBC_N (Pfam: PF12551), que está presente em bactérias e eucariotos, foi localizado nas proteínas PhaC2 de *H. seropedicae* e *R. eutropha* (Figura 9A). O domínio PhaC_N (Pfam: PF07167) é um domínio central das PHA sintases bacterianas e está presente nas proteínas PhaC1 e PhaC2 de *H. seropedicae* e *R. eutropha* (Figura 9B). O domínio α/β hidrolase é comum a muitas enzimas hidrolíticas de origem filogenética e função catalítica amplamente distinta (OLLIS *et al.*, 1992) e está presente nas proteínas PhaC de *H. seropedicae* e *R. eutropha* (FIGURA 9C). Além disso, este domínio apresenta um motivo conservado, o lipase box [GX(S/C)XG], que contém os resíduos cisteína, aspartato e histidina, que compõem a tríade catalítica (Figura 9C). Este motivo foi encontrado em todas as PHA sintases até agora descritas (LIEBERGESELL e STEINBÜCHEL, 1992). O resíduo de cisteína é o nucleófilo do sítio catalítico e aquele inicia a catálise atacando o tioéster 3-hidroxi-butiril-CoA (Figura 9C). O resíduo de aspartato é conservado entre as sintases e pode se comportar como base catalítica (Figura 9C). Último resíduo da tríade catalítica é a histidina, conservado entre as PHA sintases (Figura 9C), que é responsável pela ativação da cisteína para o ataque nucleofílico à hidroxila do hidroxibutiril-CoA (FIGURA 8, JIA *et al.*, 2001). O resíduo de triptofano (W) é importante para interação proteína-proteína (REHM *et al.*, 2002). De acordo a estrutura primária de aminoácidos, especificidade pelo substrato e número de subunidades, as sintases foram agrupadas em quatro classes (I, II, III e IV) (ITEM 3.3.3, REHM, 2003). Na árvore filogenética que inclui *H. seropedicae*, PhaC1 está agrupada como sintase da classe I, juntamente com a PhaC1 de *R. eutropha* e PhaC1 e PhaC3 de *B. japonicum* (YUAN *et al.*, 2001; QUELAS *et al.*, 2013) (Figura 10). O gênero *Pseudomonas* agrupa as PHA sintases da classe II. As proteínas desta classe possuem afinidade por substrato de cadeia média (6 a 14 carbonos) (AMARA e REHM, 2003). *H. seropedicae* não apresentou nenhuma enzima pertencente a classe II. As sintases da classe III

apresentam duas subunidades PhaC e PhaE. Esta classe de proteínas agrupa PhaC de *Alochromatium vinosum*, PhaC_{AV}, que é a sintase da classe III mais bem caracterizada (YUAN *et al.*, 2001) (Figura 10). Assim como as enzimas da classe III, as proteínas da classe IV também apresentam duas subunidades (PhaC e PhaR). Note-se que a subunidade PhaR da PHA sintase do gênero *Bacillus* não apresenta homologia com o regulador transcricional PhaR, presente em *R. eutropha* e *H. seropedicae* e que será abordado novamente na discussão dos resultados desta Tese. Além disso, as enzimas da classe IV agrupam as sintases do gênero *Bacillus* (MCoolL e CANNON, 2001), e atualmente a proteína PhaC4 de *B. japonicum* (QUELAS *et al.*, 2013) (Figura 10).

A proteína PhaC2 de *H. seropedicae* foi agrupada com as proteínas PhaC2 de *B. japonicum*, *H. lusitanum* e *R. eutropha* em ramo diferente das sintases da classe I, no entanto elas ainda são classificadas como sintase desta classe (Figura 10). Estas proteínas apresentam uma sequência conservada para o motivo lipase *box* (GYCLG) e possuem três domínios (Figura 11). Quelas e colaboradores (2013) observaram que PhaC2 de *B. japonicum* foi agrupada com outras cinco proteínas (quatro de Betaproteobacteria e uma de Alfabroteobacteria), que também apresentaram esta sequência conservada no motivo lipase *box*. Os pesquisadores definiram este ramo de sintase como Não-classificado. Além disso, PhaC2 de *H. seropedicae* está mais estritamente relacionada com as PHA sintases das classes I e II do que com as proteínas das classes III e IV (Figura 11). PhaC3 de *H. seropedicae* foi agrupada com PhaC5 de *B. japonicum* como PHA sintase da classe III. Ambas se caracterizam por não possuírem a subunidade PhaE. Enzimas desta classe apresentam um único domínio (Figura 11). PHA sintases da classe III apresentam domínio α/β hidrolase 1 (Pfam 00561), no entanto PhaC3 de *H. seropedicae* e PhaC5 de *B. japonicum* apresentam domínio α/β hidrolase 6 (Pfam 12697). A família α/β hidrolase 1 é constituída pelas proteínas carboxilesterase, ORF2 de *Bacillus cereus* e entre outras (LENFANT *et al.*, 2013, OKSTAD *et al.*, 1999). A família α/β hidrolase 6 é constituída pelas proteínas lipase ácida, homoserina transacetilase, PEP hidrolase 1 e 2 haloperoxidase, prolina iminopeptidase, PHA sintases I e II, PHA

depolimerases e proteínas com o domínio DUF3241 e entre outras, exceto epóxido hidrolase (LENFANT *et al.*, 2013). PhaC_{4_{Hs}} não apresentou o motivo lipase box e nem os outros resíduos que compõem a tríade catalítica (aspartato e histidina). PhaC_{4_{Hs}} foi agrupada em um grupo externo junto com as proteínas PhaC3 de *H. lusitanum*, PhbX de *P. extremaustralis* e PhaC de *P. stutzeri*. Estas proteínas não apresentam o motivo lipase box e nem resíduos de triptofano, aspartato e histidina, importantes para a atividade de PHA sintase. Além disso, estas proteínas apresentam o domínio de função desconhecida DUF3141 (Pfam 11339, BATEMAN *et al.*, 2010).

Os dados de análise *in silico* sugerem que *H. seropedicae* apresenta três proteínas homólogas às PHA sintases já descritas na literatura. Estas proteínas apresentam os resíduos de aminoácidos conservados importantes para a atividade catalítica das PHA sintases e também presentes em outros microrganismos, por exemplo, *R. eutropha* e *P. putida*. A proteína PhaC4 (Hsero_2625) não apresenta os resíduos de aminoácidos conservados importantes para atividade catalítica, portanto, mesmo tendo sido anotada como uma PHA sintase, provavelmente esta proteína não pode ser classificada como tal.

A	PHBC_N_PhaC2_Hs	PVAPT V RLDRQIHAALARASGSLSLVSGLLAVTDWAAHLAVSPGK 45
	PHBC_N_PhaC2_Re	AIPAQVWMDKQIRAGLARATGGLSVISASLAGLDWALQLGISPAK 45 .:. . * :*:*:*.****:**:*:*. ** *** :*:**.*
B	PhaC_N_PhaC2_Hs	ADRRFSNPDWQRWPNLWHQSFLLAEQWAAATRDVWGVKHHADLVFAARQCLDFVSP 60
	PhaC_N_PhaC2_Re	SDQRFADAGWQDWPYRCWRDAFMRNEAFWESLTQDIDGLSRHHQHIVAFCARQWLDLLAP 60
	PhaC_N_PhaC1_Hs	TDRRLSAPAWQEHYPYFAFQAAAYQLNSRFLALADAVQSGSEKVRHKLRFVAVQQMIDAMSP 60
	PhaC_N_PhaC1_Re	HDRRFAGDAWRTNLPYRFAAAFYLLNARALTELADEADAKTRQIRIRFAISQWVDAMSP 60 *:*: : * : : : : * . : . : * . * : * : *
	PhaC_N_PhaC2_Hs	SNQLLTNPEVLRITMEQRGANLLMGMQNCMNDMIGLLLEKP----ASTARTFMPGRDVAV 116
	PhaC_N_PhaC2_Re	GNVWwMNP T IARTASSTFGANFLQGAHHLQDASELLSKVPGLPAGRPALEFLPGRDVAV 120
	PhaC_N_PhaC1_Hs	ANFLATNPVAQKILETRGESLTKGIAQLLADLQKGHVSTQ-----DETAFEVGRDVGVA 114
	PhaC_N_PhaC1_Re	ANFLATNPEAQRLLIESGGESLRAGVRNMEDLTRGKISQT-----DESAFEVGRNVAV 114 . * ** : . * . : * : : * . . . * ** : *
	PhaC_N_PhaC2_Hs	SPGKVLRNRIMELIRYAPAT--ETVCPPELLLIPAWIMKYYILDLSANSLIRYL 170
	PhaC_N_PhaC2_Re	TPGKVFRNALIELIEYAPALGANTVWREPVLLVPSWIMRYILDLPEDSLVRYL 176
	PhaC_N_PhaC1_Hs	SEGSVIFENELFQLIQYKPLT--KTVHEVPLLVPPCINKFYILDLPQHNSLVRYT 168
	PhaC_N_PhaC1_Re	TEGAVVFENEYFQLLQYKPLT--DKVHARPLLMVPPCINKYYILDLPESSLVRHV 168 : * * : * * : * : * * . . * * : * : * : * * * * * * * * * * * * * * * *
C	Ab_PhaC1_Hs	TVFLISWRNADA A AVETATWDQYVDDAVVRSIHIVQEISKQPINALGFCVGGTILSCALA 60
	Ab_PhaC1_Re	TVFLVSWRNP D AS M AGSTWDDYIEHAAIRAIEVARDISGQDKINVLGFCVGGTIVSTALA 60
	Ab_PhaC2_Hs	TVFCVSWKNPAPAD R DLSDMDYLD S GFHAALDAVNSACPRK V HGVGYCLGGTLLSIAAA 60
	Ab_PhaC2_Re	TVFMISWKNPDASARD F GLD T YLEAGLLTALNTVHARCDGAHVHAAAGYCLGGTLLATGAA 60
	Ab_PhaC3_Hs	HVLLIDWHSASADM K DLIDNYLADLCVVIDELG-----GRVRLVGLDGGWISAMIAA 54 * : . : * : . . . * * : . . . * * * * : : *
	Ab_PhaC1_Hs	LLAARGED-PVASLTLT T FLDFSD-TGAIDVYIDEMQLALREQMIG-----QRGLMAGR 113
	Ab_PhaC1_Re	VLAARGEH-PAASVTLT T LLDFAD-TGILDVFDVEGHVQLREATLGGGAGAPCALLRGL 118
	Ab_PhaC2_Hs	AMARDGQ-RLASLTL L AAQDFTE-PGELGLFIDESQISLLEAQM-----QAGTLSQS 113
	Ab_PhaC2_Re	MLARDAAGPLASMTL F ASETDFHD-PGELGLFIDKSSLATLDALMW-----SQGYLDGP 114
	Ab_PhaC3_Hs	RFPEKVAR-----LVLGASPIDAGAGEPLKQMVQRLPLRFYEDLVR----SGGGLMRGS 105 : . : * : * * : : : : : : : : . :
	Ab_PhaC1_Hs	DFASAFSSLRPN L LWNYVESNYLKGEK----PSAFD L LYNADSTNLP G PMFCYYLRHM 169
	Ab_PhaC1_Re	ELANTF S FLRPNDLW V NYVVDNYLK G NT----PVPFDLLFWNGDATNLP G PWYCWYLRHT 174
	Ab_PhaC2_Hs	QMAAAFQMLRSYD L LWSRVIRQYLMGVP----AHNSDLMENADAT R MPALMHSQYLRRL 169
	Ab_PhaC2_Re	QMKS A FQMLNAQDLI S RVMS E YLLGQR----LRANDL V SNRDTTRL P YRLHSECLHKL 170
	Ab_PhaC3_Hs	FMLQGK N MHPDEHYFNEHLELLQHIDDPAYLAKRETFAAYETTVDL P GRWYLQAI G HI 165 : : . : . : : . : : * : . : * . : : :
	Ab_PhaC1_Hs	YLENALKEPGR L TVGGEKIDLRKINAPAFIYASRD H IVPWKSAYASLGLINTAKRNSNR 229
	Ab_PhaC1_Re	YLQNELKVP G KLTVCGVPD L ASIDVPTIYIGSREDHIVP W TAAAYASTALLANKLR---- 230
	Ab_PhaC2_Hs	FLDDDLSE-GRYEVD G KPVLLADVNL P VFLVGT V RDHVAP P RSVYK L HSLCPA E IT---- 224
	Ab_PhaC2_Re	FLGNELAT-GKLCVGG P VALSD L DLPLFVVGTEH D HVSP P RSVYK L HLLTKA E LT---- 225
	Ab_PhaC3_Hs	FKDNLLAR-GKYVALG Q QLDRQITCPLYL L LAGERDITTP E QV L NAALVGT P AAQIT- 223 : : * * : . * : * : * : : * : . . * : . . *
	Ab_PhaC1_Hs	FVLGASGH I AGVINPASKNKNRY 252
	Ab_PhaC1_Re	FVLGASGH I AGVINPPAKNKRSH 253
	Ab_PhaC2_Hs	FVLASGGH I AGIVSPPGHPRS-- 245
	Ab_PhaC2_Re	FLLTSGGH I AGIVSEP----- 241
Ab_PhaC3_Hs	QKIVPGGH I GLFMGSRTLAE--- 243 : . * * . . .	

FIGURA 9. ALINHAMENTO ENTRE PHA SINTASES DE *H. seropedicae* E *R. eutropha*. Cada proteína foi submetida à identificação do domínio pfam e cada domínio foi alinhado separadamente. **A**, alinhamento dos domínios PHBC_N (Pfam: PF12551) encontrados nas proteínas PhaC2 de *H. seropedicae* e *R. eutropha*. **B**, alinhamento do domínio PhaC_N (Pfam: PF07167) das proteínas PhaC1 e PhaC2 de *H. seropedicae* e *R. eutropha*. **C**, alinhamento dos domínios α/β hidrolase (Pfam: PF00561 and PF12697) encontrados nas proteínas PhaC de *H. seropedicae* e *R. eutropha*. C, o motivo lipase-box está marcado em um retângulo vermelho. Outros resíduos de aminoácidos da tríade catalítica são exibidos em uma caixa cinza. O resíduo de triptofano importante na interação proteína-proteína é realçado em azul. Outros símbolos indicam aminoácidos idênticos (*), aminoácidos com alta similaridade (:) e baixa similaridade (.).

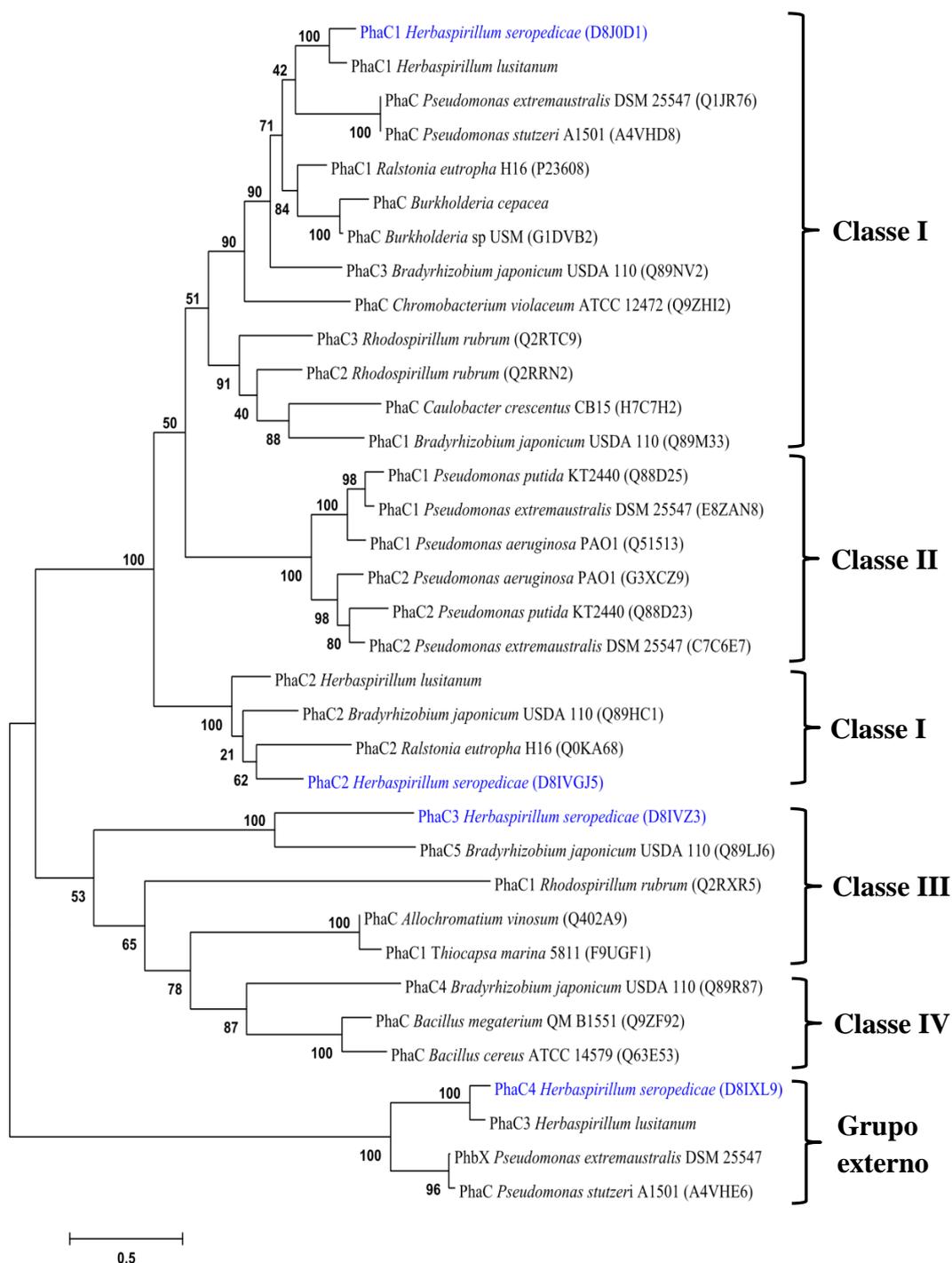


FIGURA 10. ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUÍDA USANDO ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE VÁRIAS PHA SINTASES. As proteínas PhaC1, PhaC2, PhaC3, PhaC4 de *H. seropedicae* estão na cor azul. Classes diferentes de PHA sintases estão representadas em algarismos romanos. A árvore foi obtida com o programa MEGA 6.06, utilizando o método da máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*). Os números em cada ramo indicam o número de vezes (%) que as proteínas de cada espécie foram agrupadas em 1000 repetições de Bootstrap. Os números de acesso das proteínas estão entre parêntesis.

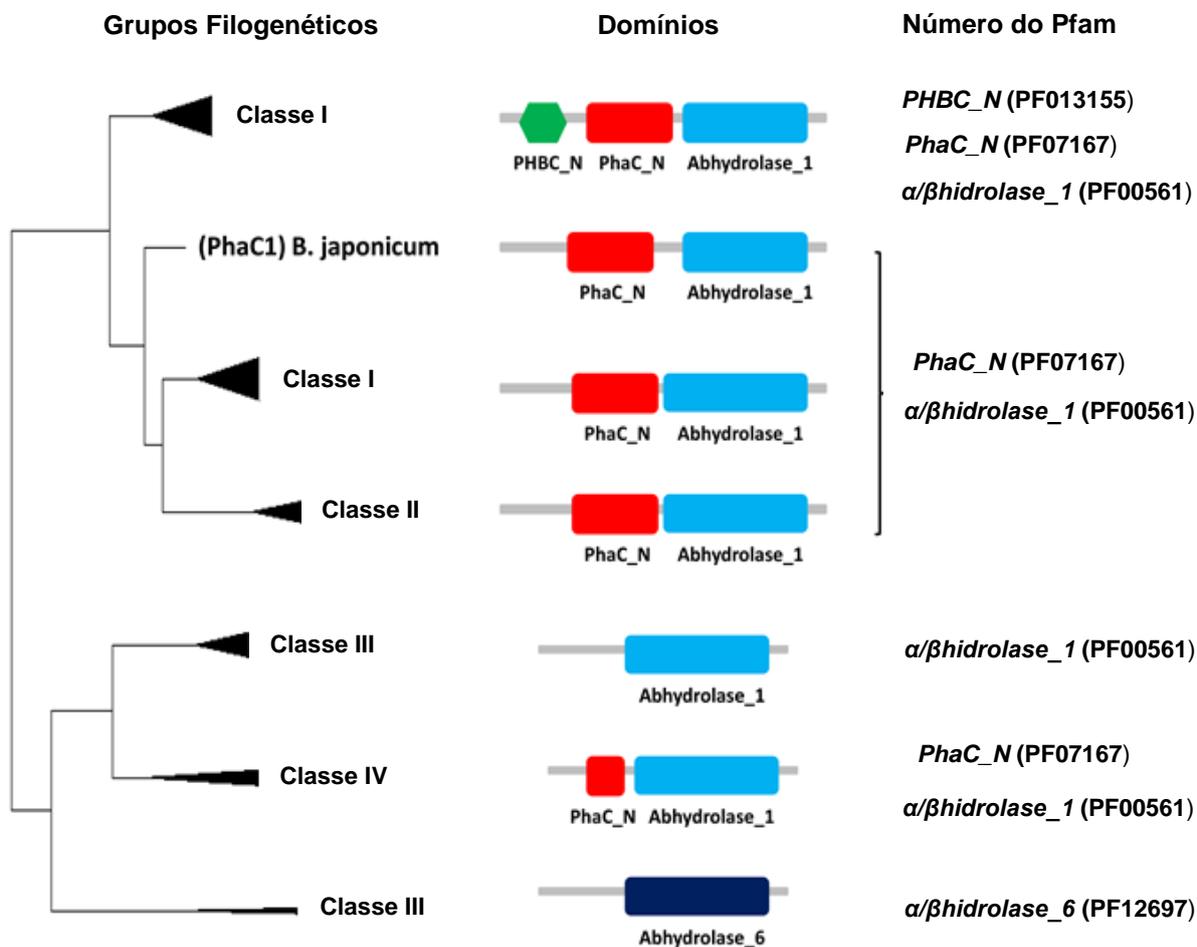


FIGURA 11. CORRELAÇÃO ENTRE OS GRUPOS FILOGENÉTICOS E ORGANIZAÇÃO DOS DOMÍNIOS DAS PHA SINTASES. Proteínas de cada classe foram submetidas à busca por domínio no Pfam e os domínios encontrados foram correlacionados com os grupos taxonômicos revelados pela organização filogenética proposta. O agrupamento em classes considera a presença do domínio α/β Hidrolase e presença ou ausência dos domínios N-terminais PHBC e PhaC. FONTE: BATISTA, M. B., Comunicação Pessoal.

5.1. Produção de PHB nas estirpes selvagem e mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae*

Para caracterizar a estirpe mutante $\Delta phaC1$ quanto à produção de PHB, foi realizada a quantificação desse polímero em ambas as estirpes de *H. seropedicae*, por meio de cromatografia gasosa. Em DO_{600nm} de 1,0, foi observada produção de PHB somente em *H. seropedicae* SmR1 (13 % de PHB/peso seco) (Figura 12). Estes dados estão de acordo com os resultados de quantificação de PHB em *H. seropedicae* obtidos por Tirapelle e colaboradores (2013) que observaram que a deleção do gene *phaC1* impede completamente a produção de PHB. Segundo os dados de genoma de *H. seropedicae* SmR1 (PEDROSA *et al.*, 2011) existem três outros genes codificantes de PHA sintases, *phaC2*, *phaC3* e *phaC4*, no entanto, estes não foram capazes de compensar a ausência de *phaC1*. Logo o gene *phaC1* conclui-se que codifica para a principal PHA sintase envolvida na produção de PHB neste microrganismo, conforme sugerido pela análise *in silico* (4.1.1).

P. putida, *R. eutropha* e *P. extremaustralis* apresentam em seus genomas duas ou mais cópias de genes *phaC* (NELSON *et al.*, 2002; POHLMANN *et al.*, 2006; TRIBELLI *et al.*, 2012). Nestes microrganismos, quando o gene *phaC1* (ortólogo ao *phaC1* de *H. seropedicae*), foi deletado, também não ocorreu a produção de PHB ou PHA e os seus respectivos genes homólogos não foram capazes de restaurar esse fenótipo (De EUGENIO *et al.*, 2010; PFEIFFER e JENDROSSEK, 2012; CATONE *et al.*, 2014).

A deleção do gene *phaC1* aboliu a síntese de PHB em *H. seropedicae*, sugerindo que PhaC1 é a principal PHA sintase, responsável por manter a síntese de PHB nas condições testadas. O fato de *H. seropedicae* possuir ao menos dois genes adicionais codificantes de PHA sintases, ainda deve ser esclarecido.

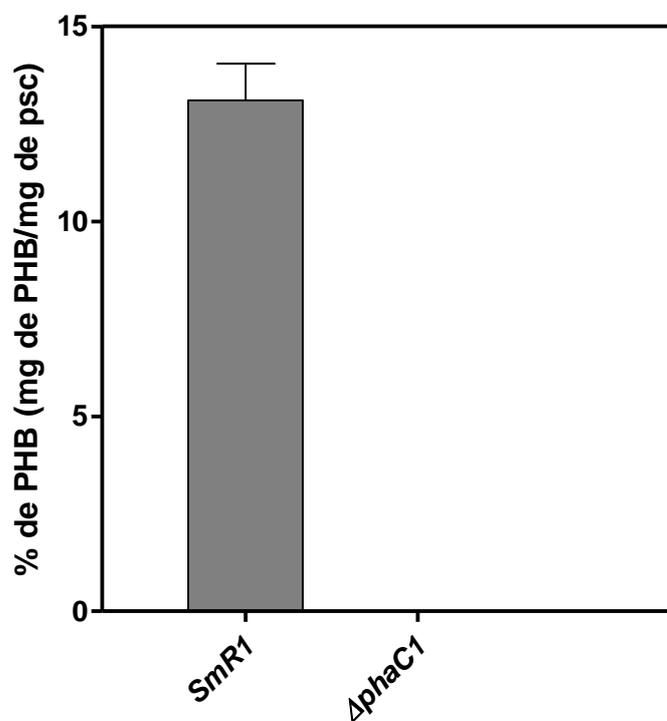


FIGURA 12. ACÚMULO DE PHB NAS ESTIRPES SELVAGEM SmR1 E MUTANTE $\Delta phaC1$ DE *H. seropedicae*. As estirpes foram cultivadas em 10 mL de meio NFbHPN-malato, sob agitação de 120 rpm a 30 °C. Em DO_{600nm} de 1,0, as células foram coletadas por centrifugação, liofilizadas e metanolizadas. Amostras foram analisadas em cromatógrafo gasoso 450 GC Varian. A quantidade de PHB foi normalizada pelo peso seco das bactérias liofilizadas e expressa como % de PHB (mg de PHB/mg do psc). PSC: Peso seco da cultura de células.

5.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS PROMOTORES DOS GENES CODIFICANTES DE PHA SINTASES

A partir dos resultados da Figura 12, postulou-se que os genes *phaC2* e *phaC3* poderiam ser pouco expressos em *H. seropedicae* ou até mesmo no mutante $\Delta phaC1$, o que justificaria em parte a ausência de complementação do mutante $\Delta phaC1$ pelas PHA sintases PhaC2 e PhaC3. De fato, essa hipótese torna-se mais forte comparando com dados da literatura para *R. eutropha*, em que a transcrição do gene *phaC2* é extremamente baixa em comparação a do gene *phaC1*, conforme determinado por análise transcricional de microarranjo (PEPLINSKI *et al.*, 2010).

Para avaliar a expressão dos genes que codificam para as prováveis PHA sintases de *H. seropedicae*, ensaios de atividade de β -galactosidase foram realizados nas estirpes selvagem SmR1 e mutantes $\Delta phaC1$, $\Delta phaP12$, $\Delta phaR$ e Δfnr transformadas com plasmídeos contendo as regiões promotoras dos genes anotados como *phaC1*, *phaC2*, *phaC3* e *phaC4*, fusionadas ao gene repórter *lacZ* sem promotor (Figuras 13, 14, 15 e 16). A estirpe $\Delta phaP12$ é um duplo mutante dos genes que codificam as fasinas PhaP1 e PhaP2, proteínas importantes na biogênese dos grânulos de PHA (PÖTTER *et al.*, 2005). Nesta estirpe não é possível detectar PHB acumulado pela técnica de cromatografia gasosa, citometria de fluxo e microscopia de fluorescência (ALVES, 2014). A estirpe $\Delta phaR$ foi selecionada nesse experimento para avaliar se os genes *phaC* de *H. seropedicae* estariam sujeitos à ação repressora de PhaR, conforme relatado para os genes *phaP* e *phaR* em *H. seropedicae* (KADOWAKI *et al.*, 2011) e também em outras bactérias como *R. eutropha* e *Paracoccus denitrificans* (PÖTTER *et al.*, 2002; MAEHARA *et al.*, 2002).

A expressão do gene *phaC1* (wt/pCST1) na estirpe selvagem SmR1 e mutante $\Delta phaC1$ ($\Delta phaC1$ /pCST1) está mostrada na figura 13A. O gene *phaC1* foi expresso durante todo o período de cultivo tanto na estirpe selvagem SmR1 como na estirpe mutante $\Delta phaC1$. Os controles negativos wt/pCST2 e $\Delta phaC1$ /pCST2 apresentaram pico de expressão de $256,0 \pm 8,0$ e $96,4 \pm 7,0$ unidades Miller, respectivamente (FIGURA 13A). O pico de expressão do gene

phaC1 foi de $2.635,0 \pm 79,0$ e $2.244,1 \pm 50,0$ para SmR1 e $\Delta phaC1$, respectivamente. O gene *phaC1* demonstrou expressão dependente do crescimento, pois à medida que aumentou a densidade bacteriana na cultura ocorreu uma maior expressão deste gene. O gene *phaC2* (wt/pCST3) foi expresso durante todo período de cultivo em SmR1 e houve um aumento considerável de atividade de β -galactosidase a partir de 18 horas, atingindo o pico de expressão de $2.786,4 \pm 322,0$ unidades Miller em 22 horas (FIGURA 13B). Entretanto este gene apresentou uma significativa redução de expressão no mutante $\Delta phaC1$ ou seja, $\Delta phaC1/pCST3$, atingindo um pico de expressão de $768,0 \pm 13,0$ unidades Miller em 20 horas (FIGURA 13B). Comparando as atividades de β -galactosidase máximas atingidas pela estirpe selvagem e pelo mutante $\Delta phaC1$, há uma diminuição de 3,6 vezes na expressão de *phaC2* no mutante. Os controles negativos wt/pCST4 e $\Delta phaC1/pCST4$ apresentaram pico de expressão de $182,0 \pm 7,0$ e $120,0 \pm 9,4$ unidades Miller, respectivamente. Os dados de expressão para o gene *phaC2* sugerem que a ausência de PHB acumulado interfere direta ou indiretamente na sua expressão.

O gene *phaC3* (wt/pCST5 ou $\Delta phaC1/pCST5$) foi expresso durante todo o período de cultivo em ambas as estirpes (FIGURA 13C). O pico de expressão deste gene foi de $727,0 \pm 33,0$ e $913,0 \pm 41,0$ unidades Miller nas estirpes SmR1 e $\Delta phaC1$, respectivamente. Os controles negativos wt/pCST6 e $\Delta phaC1/pCST6$ apresentaram pico de expressão de $123,0 \pm 8,2$ e $164,0 \pm 10,0$ unidades Miller (FIGURA 13C). Este resultado sugere que o gene *phaC3* apresenta expressão dependente do crescimento bacteriano, pois com aumento da densidade bacteriana na cultura também se intensificou a expressão do gene. O gene *phaC4* (wt/pCST7 ou $\Delta phaC1/pCST7$) foi expresso durante todo o período de cultivo em ambas as estirpes (FIGURA 13D). O pico de expressão de *phaC4* foi $1.031,0 \pm 87,5$ e $1.231,0 \pm 18,0$ unidades Miller em SmR1 e $\Delta phaC1$, respectivamente. Os controles negativos wt/pCST8 e $\Delta phaC1/pCST8$ exibiram um pico de expressão de $160,1 \pm 3,0$ e $192,2 \pm 9,3$ unidades Miller, respectivamente. O resultado observado na Figura 13D sugere que o gene *phaC4* apresente expressão dependente do crescimento bacteriano

em ambas as estirpes. A expressão dos genes *phaC3* e *4* independe do gene *phaC1*.

R. eutropha apresenta dois genes, *phaC1* e *phaC2*, que codificam PHA sintases (POHLMANN *et al.*, 2006). Ambos os genes apresentam expressão constitutiva na estirpe selvagem H16 (BRIGHAM *et al.*, 2012). *P. putida* KT2442 também apresenta dois genes, *phaC1* e *phaC2*, que codificam PHA sintases (NELSON *et al.*, 2002). O gene *phaC1* exibiu expressão dependente do crescimento na estirpe selvagem KT2442, baseado em dados de análises de fusões transcricionais (De EUGENIO *et al.*, 2010). Para o gene *phaC2* não foi possível determinar sua expressão na fase exponencial, entretanto ele foi expresso na fase estacionária na estirpe KT2442 (De EUGENIO *et al.*, 2010). Dados de RT-PCR em tempo real indicaram que o gene *phaC1* foi mais expresso na estirpe KT2442 quando comparado com a estirpe mutante KT42C1, deficiente na síntese de PHA, e o gene *phaC2* exibiu expressão diferencial diminuída (43,4 vezes) no mutante KT42C1 (De EUGENIO *et al.*, 2010).

Estes resultados mostram que os genes *phaC* de *H. seropedicae* apresentaram perfis de expressão distintos dos genes *phaC* de *R. eutropha*. O gene *phaC1* de *H. seropedicae* SmR1 e *P. putida* KT2442 apresentou expressão dependente do crescimento bacteriano. O gene *phaC2* exibiu expressão diferencial diminuída nas estirpes Δ *phaC1* de *H. seropedicae* e KT42C1 de *P. putida*, ambas deficientes na síntese de PHA.

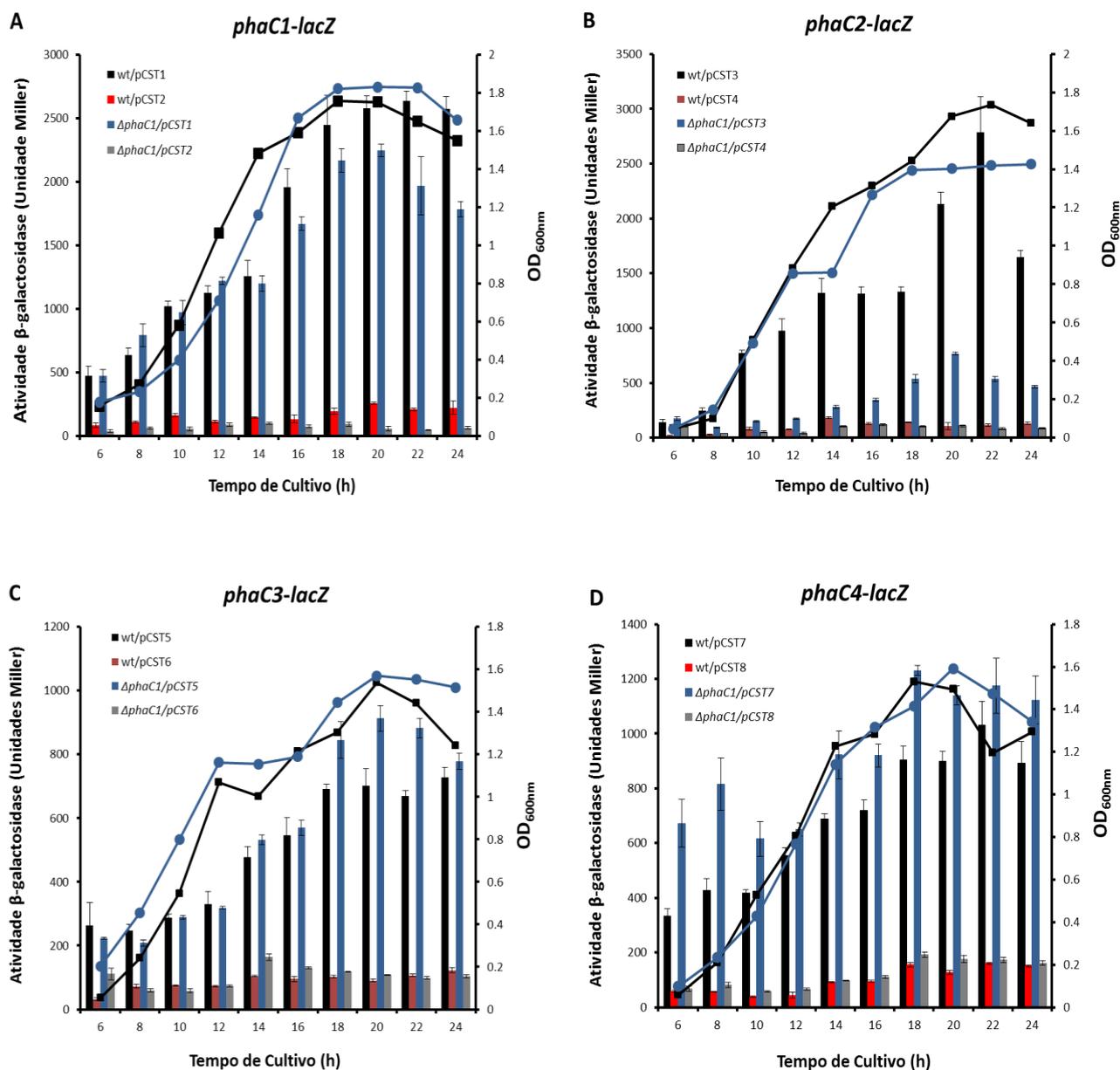


FIGURA 13. ATIVIDADE β -GALACTOSIDASE DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* SmR1 E $\Delta phaC1$ TRANSFORMADAS COM DIFERENTES FUSÕES TRANSCRICIONAIS E CULTIVADA EM MEIO NFBHPN-MALATO. A densidade ótica inicial a 600 nm foi 0,01. Cultivo a 30 °C sob agitação a 120 rpm. A cada duas horas, alíquotas de 100 μ L do meio de cultura foram coletadas para o ensaio de β -galactosidase. (A), (B), (C) e (D) Atividades dos promotores *phaC*1, 2, 3 e 4, respectivamente, nas estirpes *H. seropedicae* SmR1 e $\Delta phaC1$. As regiões promotoras dos genes *phaC* foram clonadas no vetor pMP220, que contém o sítio de clonagem da região promotora na mesma direção do gene *lacZ* (pCST1, pCST3, pCST5, e pCST7). Controle negativo: região promotora dos respectivos genes clonada no vetor pPW452, que tem o sítio de clonagem da região promotora na direção oposta em relação ao gene *lacZ* (pCST2, pCST4, pCST6 e pCST8). As linhas representam o crescimento celular (OD_{600nm}): Quadrado preto, wt/pCST1(A), wt/pCST3 (B), wt/pCST5 (C) e wt/pCST7 (D); Círculo azul, $\Delta phaC1$ /pCST1(A), $\Delta phaC1$ /pCST3 (B), $\Delta phaC1$ /pCST5 (C) e $\Delta phaC1$ /pCST7 (D). Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e técnicas.

Em *H. seropedicae*, Alves (2014) observou que o duplo mutante no gene da fasina, $\Delta phaP12$, não foi capaz de produzir PHB quando cultivado em meio mínimo mineral contendo malato (37 mM) como fonte de carbono e cloreto de amônio (20 mM) como fonte de nitrogênio. Este resultado levantou a questão se a expressão dos genes *phaC* também poderia estar reduzida no mutante $\Delta phaP12$. Os plasmídeos contendo as regiões promotoras dos genes *phaC* fusionadas ao gene *lacZ* sem promotor foram transferidos para a estirpe $\Delta phaP12$ e atividade de β -galactosidase foi medida ao longo do tempo (Figura 14). O gene *phaC1* ($\Delta phaP12/pCST1$) foi expresso durante todo o período de cultivo e o pico de expressão deste gene foi de $2.324,3 \pm 90,0$ unidades Miller (FIGURA 14A). O controle negativo do gene *phaC1* ($\Delta phaP12/pCST2$) apresentou pico de expressão de $185,0 \pm 2,0$ unidades Miller (FIGURA 14A). O gene *phaC2* ($\Delta phaP12/pCST3$) também foi expresso durante todo período de cultivo e exibiu pico de expressão de $2.582,3 \pm 310,3$ unidades Miller (Figura 14A). O controle negativo do gene *phaC2* ($\Delta phaP12/pCST4$) exibiu pico de expressão de $168,1 \pm 3,0$ unidade Miller (Figura 14A). Os genes *phaC3* ($\Delta phaP12/pCST5$) e *phaC4* ($\Delta phaP12/pCST7$) foram expressos durante todo o período de cultivo e exibiram pico de expressão de $953,4 \pm 21,0$ e $1359,0 \pm 14,0$ unidades Miller, respectivamente (FIGURA 14B). Os controles negativos dos genes *phaC3* ($\Delta phaP12/pCST6$) e *phaC4* ($\Delta phaP12/pCST8$) apresentaram pico de expressão de $428,1 \pm 6,0$ e $265,0 \pm 6,1$ unidades Miller, respectivamente (FIGURA 14B).

Conclui-se então que os genes *phaC* apresentam expressão dependente do crescimento bacteriano e independente da presença das fasinas. Ambas as estirpes $\Delta phaC1$ e $\Delta phaP12$ de *H. seropedicae* não acumulam PHB na forma de grânulos, entretanto a expressão do gene *phaC2* somente foi comprometida no mutante $\Delta phaC1$. Acredita-se que no mutante $\Delta phaP12$ haja produção de cadeias de PHB, já que os genes *phaA*, *phaB* e *phaC* estão íntegros. Nesse caso, somente a produção do polímero deve ser suficiente para manter a expressão do gene *phaC2*.

Um possível mecanismo regulatório para o gene *phaC2* seria a repressão via PhaR. No modelo proposto para regulação via PhaR em *R.*

eutropha e *P. denitrificans* sugere-se que a proteína PhaR interage com sítios específicos à montante das regiões promotoras dos genes *phaP1* e *phaR*, funcionando como um repressor transcricional clássico (YORK *et al.*, 2002, MAEHARA *et al.*, 2002; PÖTTER *et al.*, 2004). Este mesmo mecanismo poderia estar ocorrendo em *H. seropedicae*, uma vez que Kadowaki e colaboradores (2011) demonstraram que PhaR de *H. seropedicae* SmR1 se liga à sítios específicos nas regiões promotoras presentes em genes envolvidos no metabolismo de PHB, e regula negativamente a transcrição de *phaP1* e *phaR*. Na ausência de grânulos de PHB, PhaR se liga às regiões promotoras dos genes *phaP1* e *phaR* e reprime a transcrição destes genes. Na presença de grânulos de PHB, PhaR se associa aos grânulos de PHB e ocorre a desrepressão dos genes *phaP1* e *phaR* (YORK *et al.*, 2002, MAEHARA *et al.*, 2002; PÖTTER *et al.*, 2004). Portanto, se PhaR regular negativamente a transcrição do gene *phaC2* no mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae*, isto justifica a baixa transcrição deste gene nesta estirpe. Para testar a esta hipótese foi construído o mutante $\Delta phaR$ e a regulação da expressão dos genes codificantes de sintases nesta estirpe foi avaliada (Figura 15). O gene *phaC1* (wt/pCST1 ou $\Delta phaR$ /pCST1) foi expresso durante todo o período de cultivo em ambas as estirpes (FIGURA 15A). O pico de expressão deste gene foi de $2.739,0 \pm 129,0$ e $2.837,0 \pm 118,0$ unidades Miller na estirpe SmR1 e no mutante $\Delta phaR$, respectivamente (FIGURA 15A). O gene *phaC2* (wt/pCST3 ou $\Delta phaR$ /pCST3) também foi expresso em todo o período do cultivo em ambas as estirpes (FIGURA 15A). O pico de expressão deste gene foi de $2.407,1 \pm 143,5$ e $1.810,0 \pm 143,0$ unidades Miller em SmR1 e $\Delta phaR$, respectivamente (FIGURA 15A). O gene *phaC3* (wt/pCST5 ou $\Delta phaR$ /pCST5) foi expresso durante todo o período do cultivo em ambas as estirpes (FIGURA 15B). O pico de expressão de *phaC3* foi de $727,0 \pm 33,0$ e $823,0 \pm 56,0$ unidades Miller para as estirpes SmR1 e mutante $\Delta phaR$, respectivamente (FIGURA 15B). Em relação à expressão de *phaC4*, este gene (wt/pCST7 ou $\Delta phaR$ /pCST7) foi expresso durante todo o período do cultivo tanto na estirpe SmR1 como no mutante $\Delta phaR$ (FIGURA 15B). O pico de expressão do gene *phaC4* foi de $899,0 \pm 37,0$ e $914,3 \pm 94,0$ unidades Miller na estirpe SmR1 e no mutante $\Delta phaR$, respectivamente (FIGURA 15B).

Todos os genes exibiram expressão dependente do crescimento bacteriano, pois à medida que foi registrado o aumento da população bacteriana foi registrado também um aumento da expressão destes genes. De acordo com estes dados, sugerimos que a proteína PhaR não está envolvida na expressão e nem na repressão dos genes *phaC1*, *phaC2*, *phaC3* e *phaC4* em *H. seropedicae*.

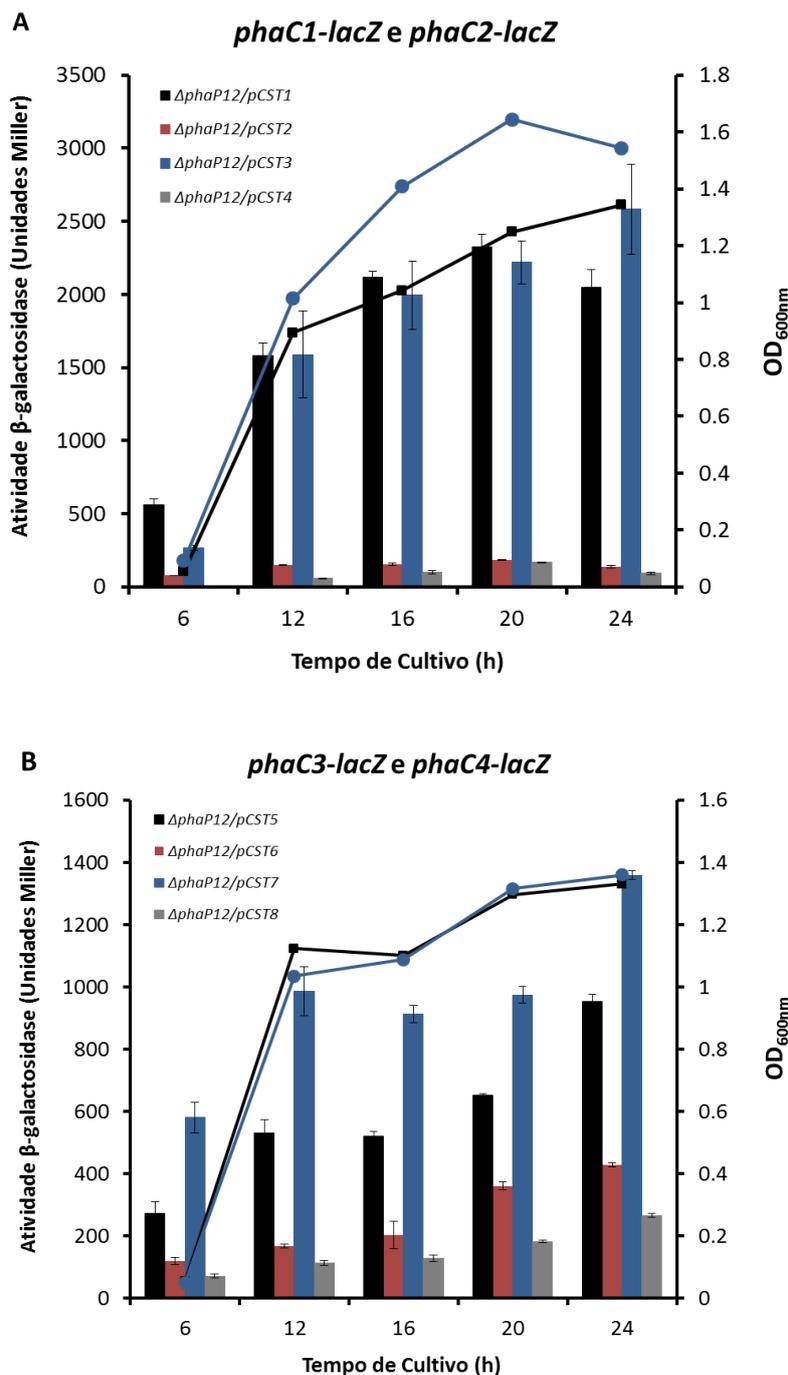


FIGURA 14. ATIVIDADE β -GALACTOSIDASE DA ESTIRPE DE *H. seropedicae* $\Delta phaP12$ TRANSFORMADAS COM DIFERENTES FUSÕES TRANSCRICIONAIS E CULTIVADA EM MEIO NFbHPN-MALATO. A densidade ótica inicial a 600nm foi 0,01. Cultivo a 30 °C sob agitação a 120 rpm. A cada duas horas, alíquotas de 100 μ L do meio de cultura foram coletadas para o ensaio de β -galactosidase. (A) Atividade dos promotores *phaC1* e *phaC2* na estirpe *H. seropedicae* $\Delta phaP12$. (B) Atividade dos promotores *phaC3* e *phaC4* na estirpe *H. seropedicae* $\Delta phaP12$. As regiões promotoras dos genes *phaC* foram clonadas no vetor pMP220, que contém o sítio de clonagem da região promotora na mesma direção do gene *lacZ* (pCST1, pCST3, pCST5, e pCST7). Controle negativo: região promotora dos respectivos genes clonada no vetor pW452, que tem o sítio de clonagem da região promotora na direção oposta em relação ao gene *lacZ* (pCST2, pCST4, pCST6 e pCST8). As linhas representam o crescimento celular (OD_{600nm}): Quadrado preto, $\Delta phaP12/pCST1$ (A) e $\Delta phaP12/pCST5$ (B); Círculo azul, $\Delta phaP12/pCST3$ (A) e $\Delta phaP12/pCST7$ (B). Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e técnicas.

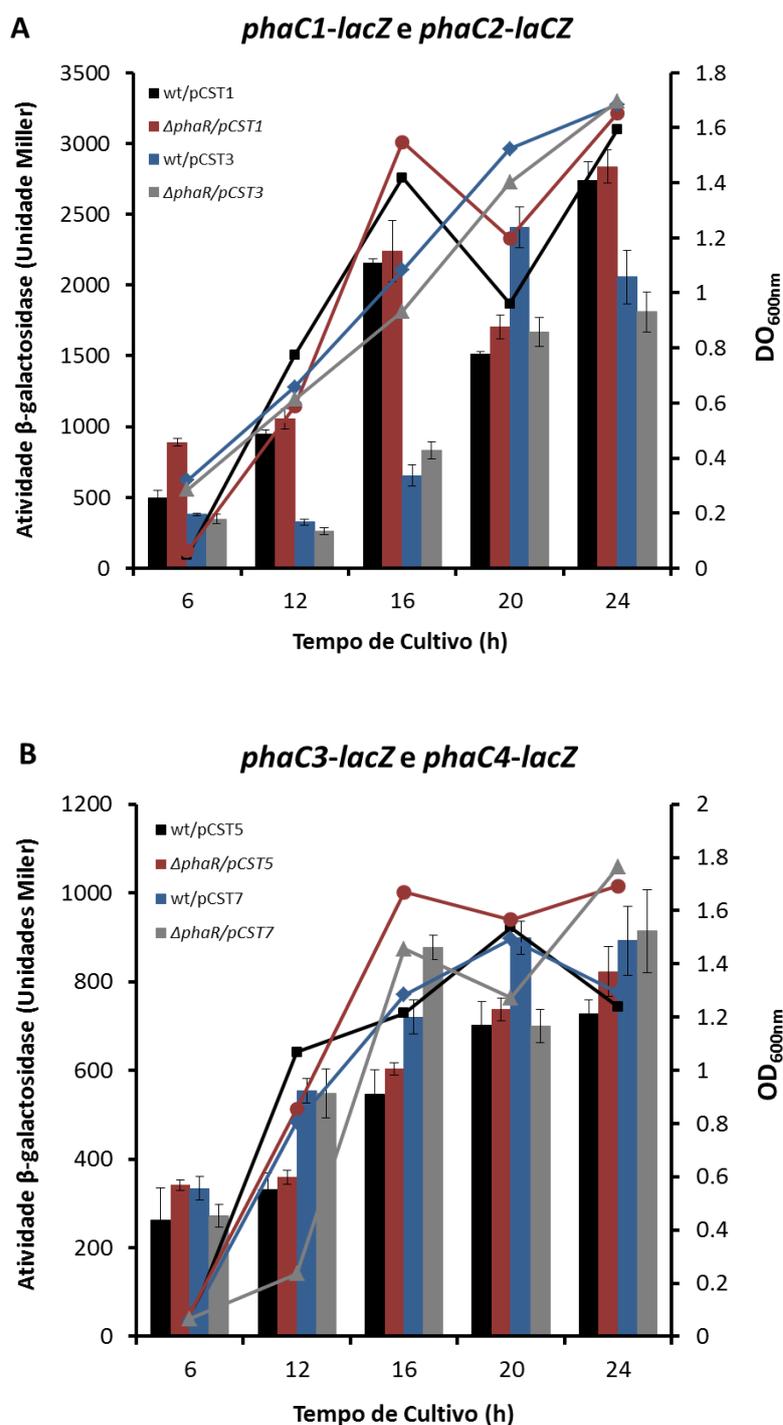


FIGURA 15. ATIVIDADE β -GALACTOSIDASE DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* SmR1 E $\Delta phaR$ TRANSFORMADAS COM DIFERENTES FUSÕES TRANSCRICIONAIS E CULTIVADA EM MEIO NFbHPN-MALATO. A densidade ótica inicial a 600 nm foi 0,01. Cultivo a 30 °C sob agitação a 120 rpm. A cada duas horas, alíquotas de 100 μ L do meio de cultura foram coletadas para o ensaio de β -galactosidase. (A) Atividade dos promotores *phaC1* e *phaC2* nas estirpes *H. seropedicae* SmR1 e $\Delta phaR$. (B) Atividades dos promotores *phaC3* e *phaC4* nas estirpes *H. seropedicae* SmR1 e $\Delta phaR$. As regiões promotoras dos genes *phaC* foram clonadas no vetor pMP220, que contém o sítio de clonagem da região promotora na mesma direção do gene *lacZ* (pCST1, pCST3, pCST5, e pCST7). As linhas representam o crescimento celular (OD_{600nm}): Quadrado preto, wt/pCST1(A) e wt/pCST5 (B); Círculo vermelho, $\Delta phaR/pCST1$ (A), $\Delta phaR/pCST5$ (B); Losango azul, wt/pCST3 (A) e wt/pCST7 (B); Triângulo cinza, $\Delta phaR/pCST3$ (A), $\Delta phaR/pCST7$ (B). Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e técnicas.

Durante a execução dos experimentos desta Tese, tomou-se conhecimento de um resultado, até então inesperado, relacionando às proteínas Fnr de *H. seropedicae* na regulação de genes *phaC*. Na análise da expressão gênica por sequenciamento de RNA (RNA-Seq) realizada com o triplo mutante *fnr* (MB231) de *H. seropedicae* em condições de microaerofilia, foi possível observar um efeito das proteínas Fnr na transcrição dos genes *phaC*, sendo este efeito a redução de 2,5, 70 e 30 vezes na transcrição dos genes *phaC1*, *phaC2* e *phaC3*, respectivamente (BATISTA *et al.*, 2013). O gene *phaC4* não apresentou um valor de expressão estatisticamente significativo nos dados de transcriptoma do triplo mutante *fnr* (MB231) (BATISTA *et al.*, 2013). Batista (2015) verificou a existência de sequências consensos Fnr-box em regiões promotoras dos genes codificantes das PHA sintases, por meio de experimentos de Chip-Seq. O motivo Fnr-box, que neste caso é o sítio de ligação para proteína Fnr1, foi encontrado nos seguintes genes: *phaC1* (GTGATCGACATCAT), *phaC2* (TAGACGTGGATCAA) e *phaC3* (TTGATGCATCGCAA).

Baseados nestes dados, propusemos outra hipótese para a possível regulação da expressão do gene *phaC2* pela proteína Fnr, e o efeito desta proteína na expressão dos promotores de genes *phaC* foi investigado por meio de ensaio de atividade de β -galactosidase com as estirpes simples, duplo e triplo mutantes dos genes *fnr1*, *fnr2*, *fnr3* (MB1, MB2, MB3, MB21, MB23, MB13 e MB231) de *H. seropedicae*. Estas estirpes foram transformadas com plasmídeos contendo os promotores dos genes *phaC1*, *phaC2* ou *phaC3* fusionados ao gene *lacZ* (FIGURA 16).

A expressão dos promotores *phaC1* e *phaC3* não foi reprimida nos diferentes mutantes *fnr*, logo pode-se concluir que a expressão destes genes independe das proteínas Fnr (FIGURAS 16A e 16C). A expressão do gene *phaC2* foi reprimida nos mutantes Δfnr , com exceção do simples mutante *fnr2* (MB2) (Figura 16B). Assim, é possível sugerir que a expressão do gene *phaC2* de *H. seropedicae* é dependente das proteínas Fnr1 e/ou Fnr3 (Figura 16B).

Um resultado semelhante foi observado para o gene ortólogo *phaC2* de *Bradyrhizobium japonicum*, cuja expressão foi diminuída no mutante *fixK₂*, na forma de vida livre em condições de microaerofilia ou na forma de bacterióide.

A proteína FixK₂ é um regulador transcricional tipo Fnr e, sob condições de microaerofilia, ele regula a expressão de vários alvos como, por exemplo, os operons *fixNOQP* e *fixGHIS* (PESSI *et al.*, 2007; MESA *et al.*, 2008).

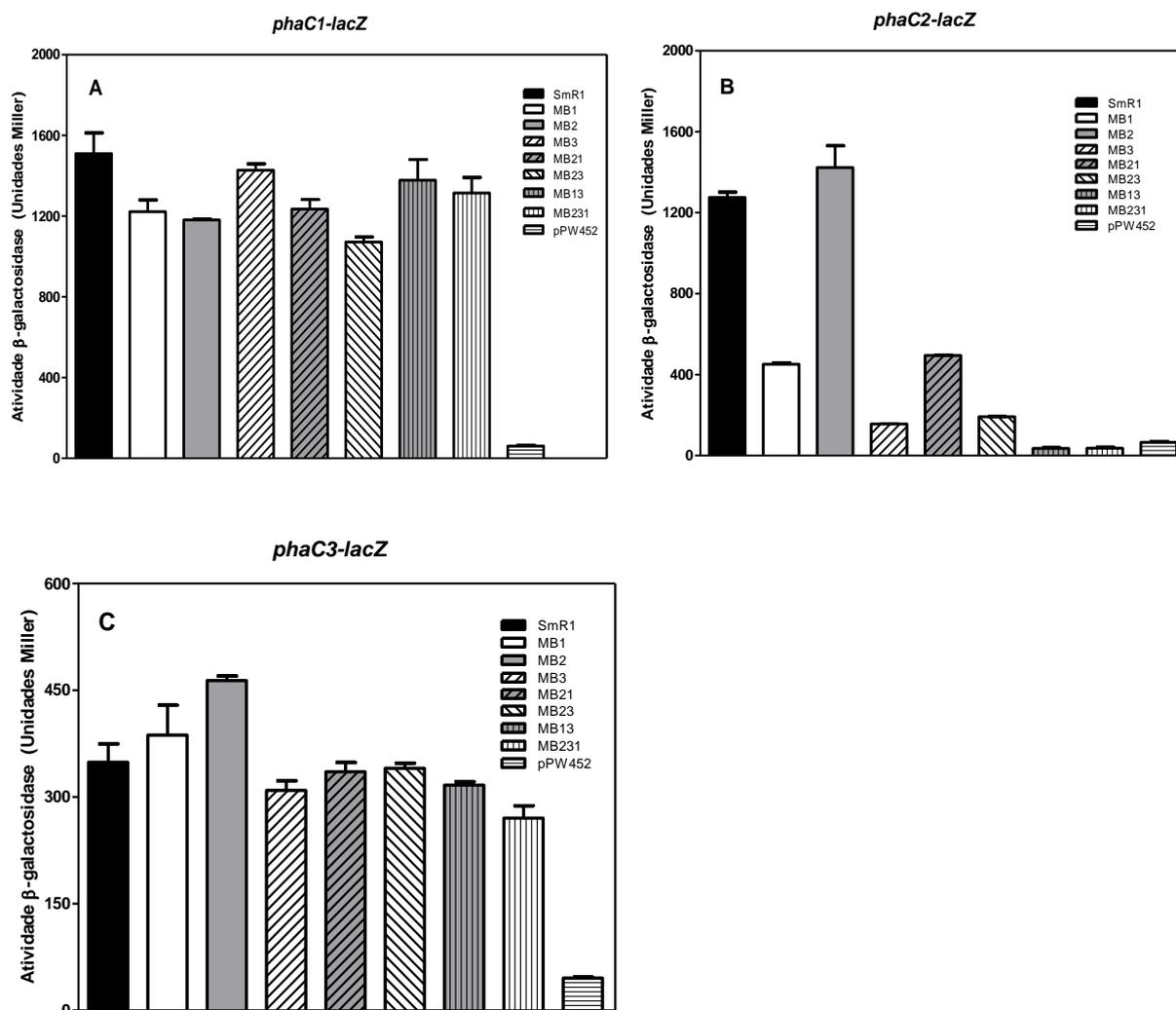


FIGURA 16. ATIVIDADE β -GALACTOSIDASE DAS ESTIRPES SmR1 E DIFERENTES MUTANTES Δfnr (MB1, MB2, MB3, MB21, MB23, MB13 E MB231) DE *H. seropedicae* TRANSFORMADAS COM DIFERENTES FUSÕES TRANSCRICIONAIS E CULTIVADA EM MEIO NFBHPN-MALATO. A densidade óptica inicial a 600 nm foi 0,01. Cultivo a 30 °C sob agitação a 120 rpm. Quando a DO_{600nm} atingiu o valor de 1,0, alíquotas de 100 μ L foram coletadas do meio de cultura para o ensaio de β -galactosidase. (A) Atividade da fusão *phaC1-lacZ* (pCST1) nas estirpes *H. seropedicae* SmR1 e diferentes mutantes *fnr*. (B) Atividade da fusão *phaC2-lacZ* (pCST2) nas estirpes *H. seropedicae* SmR1 e diferentes mutantes *fnr*. (C) Atividade da fusão *phaC3-lacZ* (pCST3) nas estirpes *H. seropedicae* SmR1 e diferentes mutantes *fnr*. As regiões promotoras dos genes *phaC* foram clonadas no vetor pMP220, que contém o sítio de clonagem da região promotora na mesma direção do gene *lacZ* (pCST1, pCST3 e pCST5). Controle negativo: vetor pPW452 sem região promotora dos genes *phaC1* (A), *phaC2* (B) e *phaC3* (C). Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e técnicas.

O resultado da análise transcricional do promotor *phaC3* de *H. seropedicae* mostrado na figura 16C, realizado na presença de oxigênio atmosférico, foi diferente do dado obtido no transcriptoma do triplo mutante *fnr* realizado no mesmo microrganismo e em condições de microaerofilia, que demonstrou que o gene *phaC3* foi reprimido 30 vezes (BATISTA *et al.*, 2013). Esta diferença pode ser reflexo da condições aeração ou ainda, que o sítio de ligação para proteína Fnr1, contido na região promotora analisada, seja de baixa afinidade (TTGATGCATCGCAA, FIGURA 17). Além disso, a análise *in silico* demonstrou que existe outra sequencia Fnr-box (TTGAAGCAGATCAA) inserida na região intergênica dos genes *Hsero_0262* e *pta* (Figura 17).

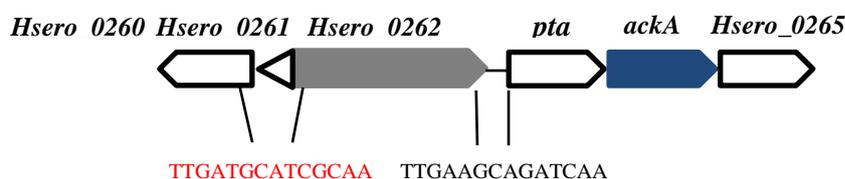


Figura 17. OPERON *Hsero_0262ptaackAphaC3* E A REGIÃO À MONTANTE DESTES OPERON. Este operon é constituído pelos genes: *Hsero_0262* (Diguamilato ciclase), *pta* (*Hsero_0263*, Fosfato acetiltransferase), *ackA* (*Hsero_0264*, Acetato quinase) e ou *Hsero_0265* (*phaC3*, PHA sintase). A região à montante deste operon tem os genes: *Hsero_0261* (Proteína hipotética) e *Hsero_0260* (Diguamilato ciclase). Em vermelho, temos a sequência Fnr-box inserida dentro da região promotora (648 pb, posição no mapa genômico 273871 a 273252) do operon *Hsero_0262ptaackAphaC3*. Esta região promotora foi avaliada quanto a sua capacidade de ativar expressão do gene *lacZ* por meio de ensaios de atividade β -galactosidase, durante esta tese. Em preto, outra sequência Fnr-box está inserida na região intergênica dos genes *Hsero_0262* e *pta* (posição no mapa genômico de 275932 a 276107). Esta região intergênica (175 pb) pode conter a região promotora do operon *ptaackphaC3* e ser regulada pelas proteínas Fnr de *H. seropedicae*.

5.3. PRODUÇÃO DE PHB NOS DIFERENTES MUTANTES Δfnr DE *H. seropedicae*

A expressão reduzida do gene *phaC2* foi observada tanto na estirpe $\Delta phaC1$ como nos mutantes Δfn . Essa observação levou ao questionamento se a baixa expressão deste gene poderia estar relacionada com a ausência de PHB nos mutantes Δfnr , assim como observado na estirpe $\Delta phaC1$. Para avaliar esta hipótese, um ensaio de quantificação de PHB por cromatografia gasosa foi realizado nas estirpes SmR1 e mutantes Δfnr [simples (MB1, 2 e 3), duplo (MB21, MB23 e MB13) e triplo (MB231)] (FIGURA 18). Os simples mutantes MB1, MB2 e MB3 não apresentaram redução no conteúdo de PHB/peso seco da cultura de células (PHB/psc) quando comparado com a estirpe selvagem. Os duplos mutantes MB21 e MB13 apresentaram redução de 18 e 40 % na produção de PHB, respectivamente. O duplo mutante MB23 produziu a mesma quantidade de PHB que a estirpe selvagem. Enquanto que o triplo mutante MB231 apresentou redução de apenas 16% quando comparado com a estirpe selvagem. Estes resultados demonstram que todos os mutantes Δfnr apresentaram a capacidade de acumular PHB. Logo não é a ausência de PHB que promove a redução da expressão de *phaC2* nos mutantes Δfnr , mas sim as deleções nos genes codificantes das proteínas Fnr, como visto na figura 16B.

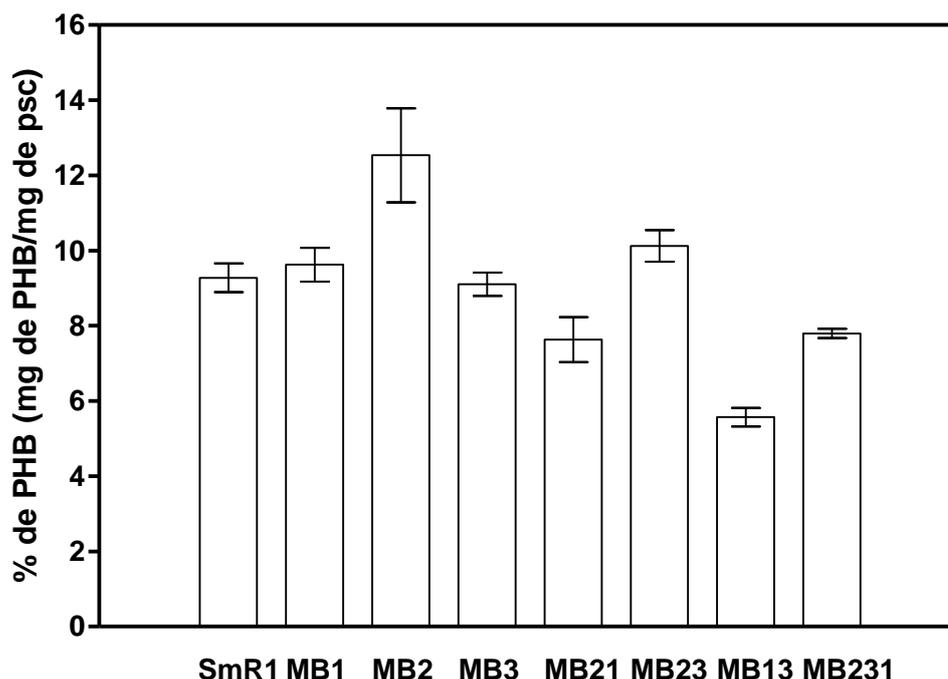


FIGURA 18. PRODUÇÃO DE PHB NAS ESTIRPES SELVAGEM SmR1 E MUTANTES Δfnr (MB1, MB2, MB3, MB21, MB23, MB13 E MB231) DE *H. seropedicae*. As estirpes foram cultivadas em 10 mL de meio NFbHPN-malato, sob agitação de 120 rpm a 30 °C. Em DO_{600nm} de 1,0, as células foram coletadas por centrifugação, liofilizadas e metanolizadas. Amostras foram analisadas em cromatógrafo gasoso 450 GC Varian. A quantidade de PHB foi normalizada pelo peso seco das bactérias liofilizadas e expressa como % de PHB (mg de PHB/mg do peso seco). PSC: peso seco da cultura de células.

5.4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS PROMOTORES DO GENE *fnr1* e OPERON *fixNOP*

Como mostrado na figura 13B, a transcrição do gene *phaC2* foi reduzida na estirpe $\Delta phaC1$, que não sintetiza PHB. Além disso, a deleção dos genes *fnr1* e 3 também reduziu a transcrição de *phaC2*. Essas informações sugerem que ausência de grânulos de PHB poderia desenvolver um ambiente desfavorável para a atividade Fnr. Com objetivo de averiguar essa hipótese, foi avaliado o nível de transcrição dos genes *fnr1* e *fixN* cujas expressões são dependentes da proteína FnR em *H. seropedicae* (BATISTA *et al.*, 2013). Ensaio de atividade β -galactosidase foram realizados com estirpes selvagem SmR1 e mutantes $\Delta phaC1$ e MB231 transformadas com plasmídeos contendo as regiões promotoras do gene *fnr1* e do operon *fixNOP* fusionadas ao gene

lacZ, originando as fusões transcricionais *fnR1-lacZ* e *fixN-lacZ*, respectivamente (Figura 19A). Na estirpe $\Delta phaC1$, os genes *fnR1* e *fixN* apresentaram expressão aproximadamente 6 e 4 vezes menor, respectivamente, em relação à estirpe selvagem SmR1 (Figura 19A). Na estirpe MB231, ambas as fusões transcricionais não foram expressas, pois não ocorreu ativação de Fnr. Estes resultados sugerem que as deleções em *phaC1* e nos genes *fnr1*, 2 e 3 (MB231) afetam negativamente a expressão dos promotores *fnr1* e *fixN*. Devido à baixa transcrição dos promotores dependentes de Fnr, *fnr1* e *fixN*, sugerimos que atividade Fnr é afetada negativamente.

De posse destes resultados e como a proteína Fnr é ativa em baixas concentrações de oxigênio (KÖRNER *et al.*, 2003; BATISTA *et al.*, 2013), levantamos a hipótese de que a baixa transcrição de *fnr1* no mutante $\Delta phaC1$ seja devida à alta concentração de oxigênio nas condições experimentais (FIGURA 19A). Desse modo, um ensaio de atividade β -galactosidase foi realizado durante um período de 12 horas para observar a desrepressão da fusão *fnr1-lacZ* nas estirpes selvagem SmR1 e mutante $\Delta phaC1$ (Figura 19B). Cinco horas após atingir a fase estacionária, em que há um elevado número de células, foi observado o pico de expressão do gene *fnr1* na estirpe selvagem ($951,0 \pm 12,0$ unidades Miller, Figura 19B). Acredita-se que o aumento na transcrição do gene *fnr1* se deve à redução no nível de O_2 disponível, já que a agitação foi mantida a 120 rpm durante todo o cultivo. Apesar da baixa concentração de oxigênio nesta fase do crescimento bacteriano, a expressão de *fnr1* no mutante $\Delta phaC1$ foi cerca de 2,5 vezes menor ($386,5 \pm 32,5$ unidades Miller) quando comparada com a estirpe selvagem (Figura 19B). Estes resultados sugerem que o efeito da deleção tríplice dos genes *fnr1*, 2 e 3 é absoluto sobre a expressão do gene *fnr1*, enquanto que a deleção de *phaC1* é parcial.

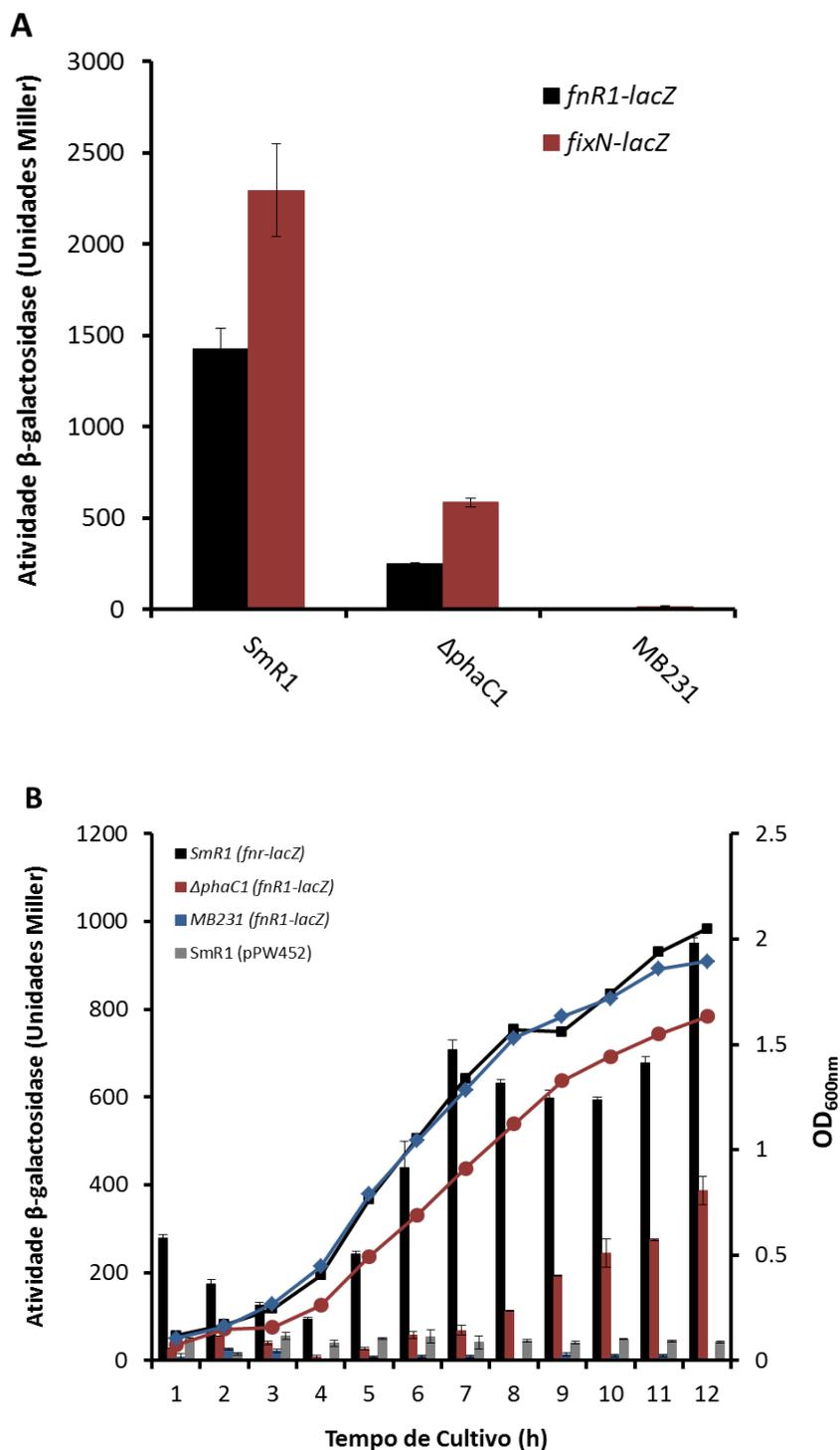


FIGURA 19. ATIVIDADE β -GALACTOSIDASE DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* SmR1, Δ *phaC1* E TRIPLO MUTANTE *fnr* (MB231). **A**) As estirpes foram transformadas com as fusões transcricionais (*fnr1-lacZ* e *fixN-lacZ*) e cultivadas em meio NFbHPN-malato a 30 °C sob agitação de 120 rpm. Quando a OD_{600nm} atingiu o valor de 1,2, alíquotas de 100 μ L foram coletadas do meio de cultura para o ensaio de β -galactosidase. **B**) As estirpes foram transformadas com a fusão transcricional (*fnr1-lacZ*) e cultivadas em meio NFbHPN-malato a 30 °C sob agitação a 120 rpm. As linhas representam o crescimento celular (OD_{600nm}): Quadrado preto, SmR1(*fnr1-lacZ*); Círculo vermelho, Δ *phaC1* (*fnr1-lacZ*); Losango azul, MB231 (*fnr1-lacZ*). A cada hora, alíquotas de 100 μ L foram coletadas do meio de cultura para o ensaio de β -galactosidase. Em ambos os ensaios, a densidade ótica inicial a 600 nm foi 0,01. Controle negativo: vetor pPW452 sem região promotora do gene *fnr1*. Os valores representam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.

5.5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE *fnr1* EM *H. seropedicae* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE AERAÇÃO

Como mostrado na figura 19, a expressão dos genes *fnr1* e *fixN*, que é dependente da ativação por Fnr, foi reduzida no mutante $\Delta phaC1$. Este resultado indica que algum fator causado pela mutação no gene *phaC1* estaria afetando negativamente a atividade de Fnr. Como Fnr é conhecida como uma proteína sensível a O_2 e às espécies reativas de oxigênio (EROs), foram realizados experimentos de análise de expressão do gene *phaC2* em diferentes níveis de aeração e também de medida de EROs. A literatura descreve que proteína Fnr é ativa em baixos níveis de oxigênio (KÖRNER *et al.*, 2003; TRIBELLI *et al.*, 2011; BATISTA *et al.*, 2013). Ensaio de atividade β -galactosidase foi realizado nas estirpes selvagem e mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae* transformadas com a fusão *fnr1-lacZ*, sob as velocidades de agitação de 120 ou 250 rpm, em que se tem diferentes níveis de aeração. Em 250 rpm (período C, controle), há alta aeração e o gene *fnr1* esteve sempre reprimido, em ambas as estirpes, durante todo o período do ensaio (Figura 20). Na agitação de 120 rpm, tempos T2, T4 e T6, observa-se que a transcrição de *fnr1* aumentou 11,6 vezes ($416,7 \pm 11,5$ unidade Miller) na estirpe selvagem (T2) (Figura 20). No período T4, houve um aumento na transcrição de *fnr1* na estirpe selvagem de 22,7 vezes ($815,9 \pm 28,4$ unidades Miller) e em T6 o aumento foi de 31,8 vezes ($1141,9 \pm 146,7$ unidades Miller). Em todos os períodos do ensaio a expressão do gene *fnr1* foi menor na estirpe mutante $\Delta phaC1$. Comparando a transcrição do gene *fnr1* em ambas as estirpes nos mesmos períodos do ensaio (T2, T4 e T6), houve redução de 12,2, 12,5 e 9 vezes, respectivamente, na estirpe mutante (Figura 20). Estes dados confirmam os resultados mostrados na figura 19, demonstrando que a atividade Fnr é reduzida no mutante $\Delta phaC1$. Hauf e colaboradores (2013) observaram que a redução na produção de PHB em *Synechocystis* PCC6803 leva a uma alteração no estado redox e gera um ambiente mais oxidativo. A análise proteômica do mutante PHB4⁻ de *R. eutropha* H16 mostrou um aumento na expressão de proteínas envolvidas na resposta anti-estresse oxidativo, como

glutathione transferase e proteínas envolvidas na síntese de ubiquinona (RABERG *et al.*, 2014).

Estes dados da literatura apontam que no caso de *H. seropedicae* a falta de PHB acumulado poderia desencadear um desbalanço redox e como consequência estresse oxidativo. A produção de EROs podem afetar diretamente a composição de centros metálicos de proteínas como Fnr e, levar a uma redução de suas atividades.

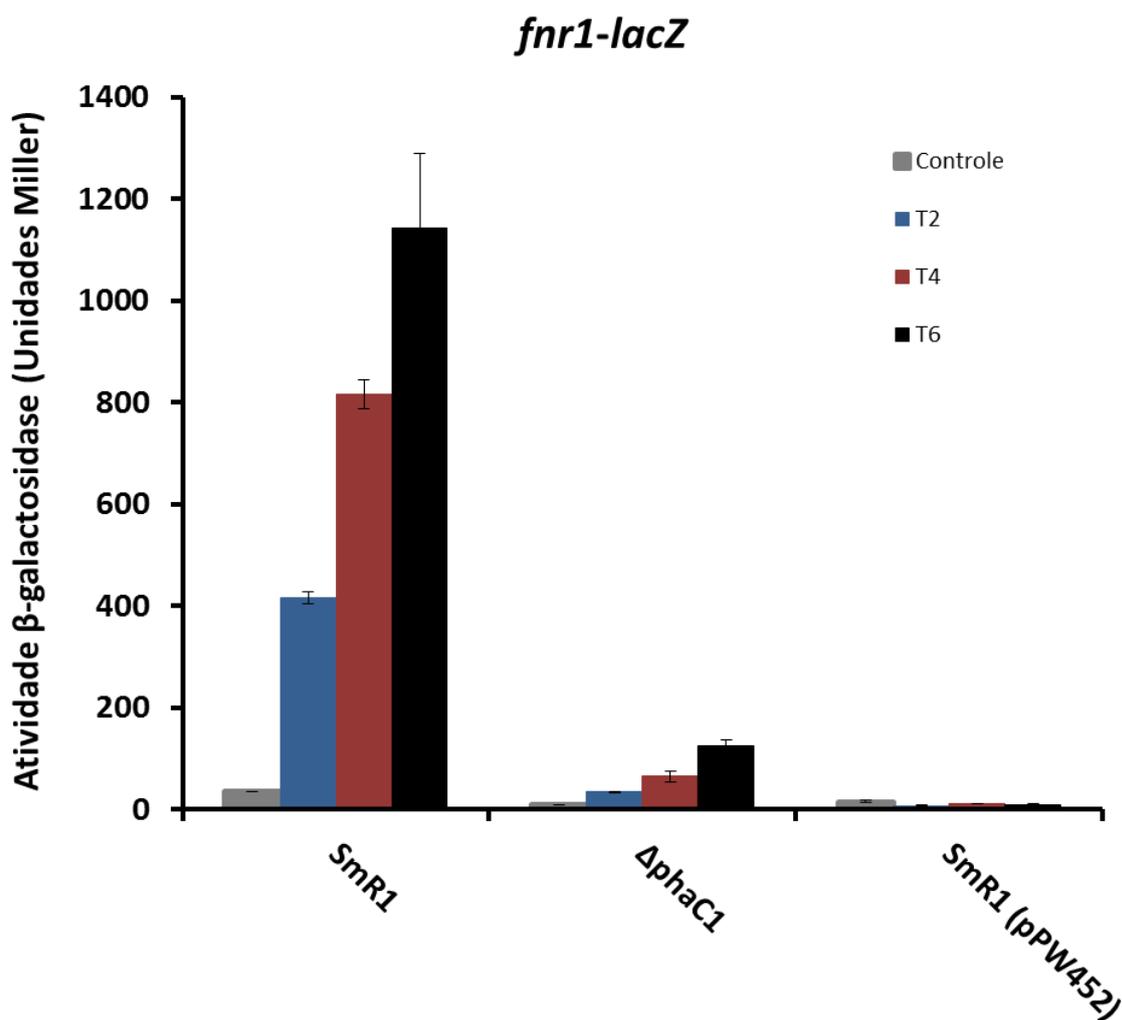


FIGURA 20. ATIVIDADE β -GALACTOSIDASE DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* SmR1 E Δ phaC1 TRANSFORMADAS COM A FUSÃO TRANSCRICIONAL (*fnr1-lacZ*) e CULTIVADAS EM MEIO NFBHPN-MALATO A 30 °C SOB AGITAÇÃO DE 250 E 120 rpm. A densidade ótica inicial foi de 0,090 e todas as culturas foram mantidas a 250 rpm por um período de 3h. Após este período alíquotas de 100 μ L foram coletadas do meio de cultura para o ensaio de atividade β -galactosidase (período antes da troca de agitação). Depois disso, uma parte das culturas foi agitada a 250 rpm e outra parte das culturas foi agitada a 120 rpm, até o máximo de 6 horas. A cada 2 horas, alíquotas de 100 μ L foram coletadas do meio de cultura para o ensaio de atividade β -galactosidase. **C**, controle, ou seja, culturas mantidas sob agitação de 250 rpm. **T2**, **T4** e **T6** representa os tempos (h) que culturas foram mantidas sob agitação de 120 rpm. Crescimento celular (OD_{600nm}): SmR1/*fnr1-lacZ*, 0,4 (C), 0,7 (T2), 1,0 (T4), 1,4 (T6); Δ phaC1/*fnr1-lacZ*, 0,5 (C), 0,7 (T2), 1,1 (T4), 1,3 (T6). O controle negativo: vetor pPW452 sem região promotora do gene *fnr1*. Os valores representam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.

5.6. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE *phaC2* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO

Uma vez que a transcrição do gene *phaC2* é dependente de Fnr1 e/ou Fnr3, seria esperado que em concentrações reduzidas de oxigênio a expressão de *phaC2* aumentasse. Com base nesta hipótese um ensaio de atividade β -galactosidase foi realizado com as estirpes SmR1, os diferentes mutantes *fnr* (MB2, MB13, MB231) e Δ *phaC1*, transformadas com o plasmídeo pCST3 (*phaC2*-pMP220), e cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio por 3 horas e 30 minutos (Figura 21). Nas estirpes SmR1, MB2 e Δ *phaC1*, a expressão de *phaC2* foi inversamente proporcional à concentração de oxigênio (Figura 21). Na estirpe SmR1, *phaC2* foi 12,5 vezes mais expresso na concentração de 2% de oxigênio quando comparado a concentração de 20,8% (1.731,59 e 138,16 unidades Miller respectivamente). Na estirpe MB2, *phaC2* foi 11,5 vezes mais expresso em 2% do que em 20,8% de oxigênio (1.762,86 e 153,41 unidades Miller respectivamente). Na estirpe Δ *phaC1*, *phaC2* foi 4,6 mais expresso em 2% do que em 20,8% de oxigênio (493,87 e 106,93 unidades Miller respectivamente). O nível máximo de expressão de *phaC2* no mutante Δ *phaC1* foi somente 28,5% do pico de expressão do mesmo gene na estirpe selvagem. Quando houve aumento de 2% para 20,8% de oxigênio, a variação da expressão de *phaC2* na estirpe selvagem foi de 1.593,43 e a variação observada para o mutante Δ *phaC1* foi de 386,94, ou seja, o gene *phaC2* foi cerca de 4 vezes mais expresso na estirpe selvagem (Figura 21). As estirpes MB13 e MB231 apresentaram uma baixa transcrição do gene *phaC2* independente da concentração de oxigênio (Figura 21). O gene *phaC2* foi 3,4 vezes mais expresso na concentração de 2% oxigênio do que em 20,8%, na estirpe MB13 (179,08 a 53,27 unidades Miller), enquanto que foi 2,2 vezes mais expresso em 2% do que em 20,8% de oxigênio, na estirpe MB231 (100,67 e 45,42 unidades Miller respectivamente) (Figura 21). Diante destes dados, podemos concluir que o oxigênio é deletério para a expressão do gene *phaC2*, inibindo progressivamente sua expressão. A expressão deste gene independe de Fnr2, mas depende de Fnr1 e 3, e a mutação em *phaC1* afeta a expressão de *phaC2*.

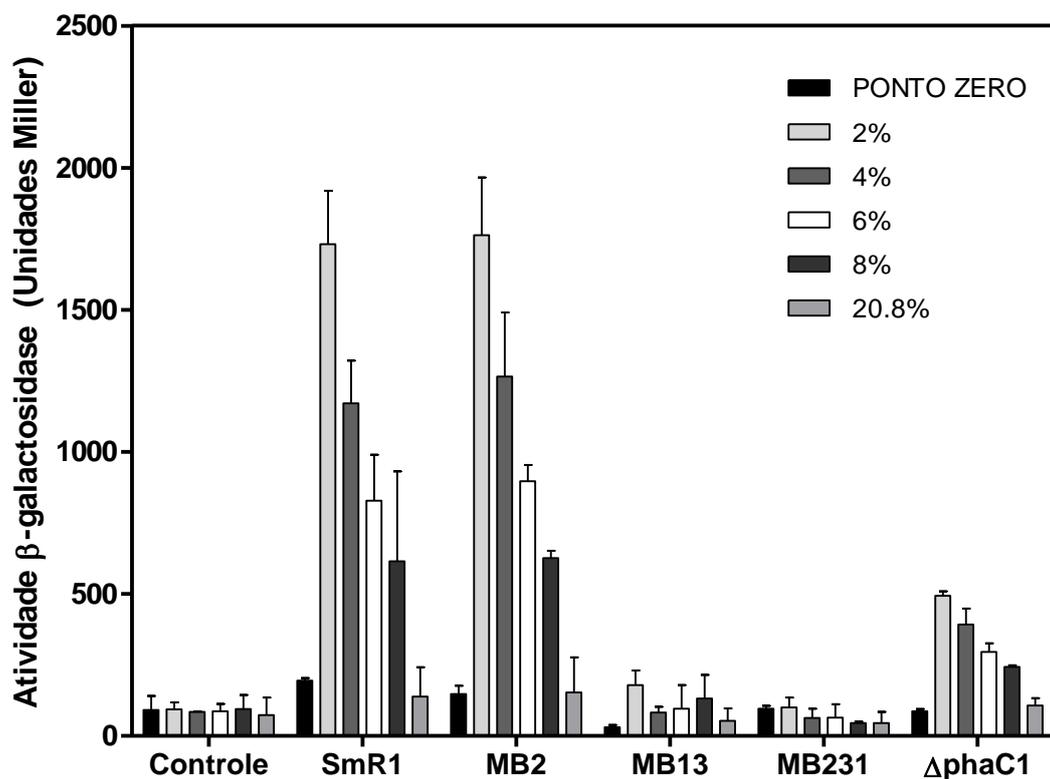


FIGURA 21. ANÁLISE TRANSCRIPCIONAL DA FUSÃO TRANSCRIPCIONAL *phaC2-lacZ* (*pCST3*) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO (2%, 4%, 6%, 8% E 20,8%). Estirpes selvagem SmR1 e mutantes $\Delta phaC1$ e ΔfnR (MB2, MB13, MB231) transformadas com plasmídeo *pCST3* foram cultivadas em meio NFbHPN-malato, sob agitação de 120 rpm a 30 °C. A densidade ótica inicial a 600 nm foi 0,05. Após 3,5 h de incubação ($OD_{600nm} = 0,15$), alíquota foi coletada do meio de cultura para o ensaio de β -galactosidase. Ponto zero: Controle antes da troca gasosa e a $OD_{600nm} = 0,05$. Controle negativo: vetor pPW452 sem região promotora do gene *phaC2*. As trocas gasosas foram realizadas segundo o item 4.6.2. Os valores representam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. FONTE: BATISTA, M. B., Comunicação Pessoal.

5.7. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO MUTANTE ($\Delta phaC1$) DE *H. seropedicae*

5.7.1. Determinação dos níveis de EROs

Análise de transcrição dos promotores *fnr1* e *fixN* cuja expressão é dependente de Fnr (FIGURA 19) mostrou que a atividade Fnr foi reduzida no mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae*, o que levantou a questão se a ausência de PHB poderia gerar um ambiente mais oxidativo, que acarretaria na oxidação e inativação de Fnr. Batista (2015) observou que o gene *fnr1* de *H. seropedicae* foi menos expresso em muito alta aeração (350 rpm) quando comparado com a aeração convencional (120 rpm). Para avaliar o estado oxidativo das estirpes SmR1 e $\Delta phaC1$ foi determinado o nível de EROs intracelular em diferentes condições de aeração (250 e 120 rpm).

A detecção de EROs foi realizada em culturas com densidades óticas $600_{nm} = 0,4; 0,8, 1,4$ e $1,6$, que compreendem as fases exponencial e estacionária em *H. seropedicae*. Em ambas as condições de aeração, o mutante $\Delta phaC1$ produziu mais EROs do que a estirpe selvagem. A produção foi mais acentuada em 120 rpm (FIGURA 22). Em 250 rpm, a geração de EROs foi cerca de 2,0 vezes maior no mutante $\Delta phaC1$ do que no selvagem nos tempos de 0, 2 e 4 horas e 1,4 vezes no tempo de 6 h. Em 120 rpm, a produção de EROs foi 4,0 vezes maior no mutante $\Delta phaC1$ no período inicial (zero hora), 3,0 vezes nos tempos de 2 horas e 4 horas e 2,5 vezes no período de 6 horas (FIGURA 22).

Estes resultados sugerem que a ausência de PHB conduziu a um aumento na produção de EROs e que a alta produção de EROs em ambas as estirpes observada em 250 rpm afeta negativamente a atividade Fnr, que ocasionou a baixa transcrição do gene *fnr1* nesta aeração, como mostrado na figura 20. Em 120 rpm, a geração de EROs foi mais acentuada no mutante $\Delta phaC1$ o que possivelmente resulta em uma menor expressão de genes dependentes de Fnr nesta estirpe (figuras 19 e 20). Isto sugere que a ausência de PHB contribuiu para a produção superior de EROs no mutante $\Delta phaC1$ que, por sua vez, afeta a atividade de várias proteínas, particularmente

metaloproteínas como a Fnr, que são sensíveis a EROs (D'AUTREAUX e TOLEDANO, 2007).

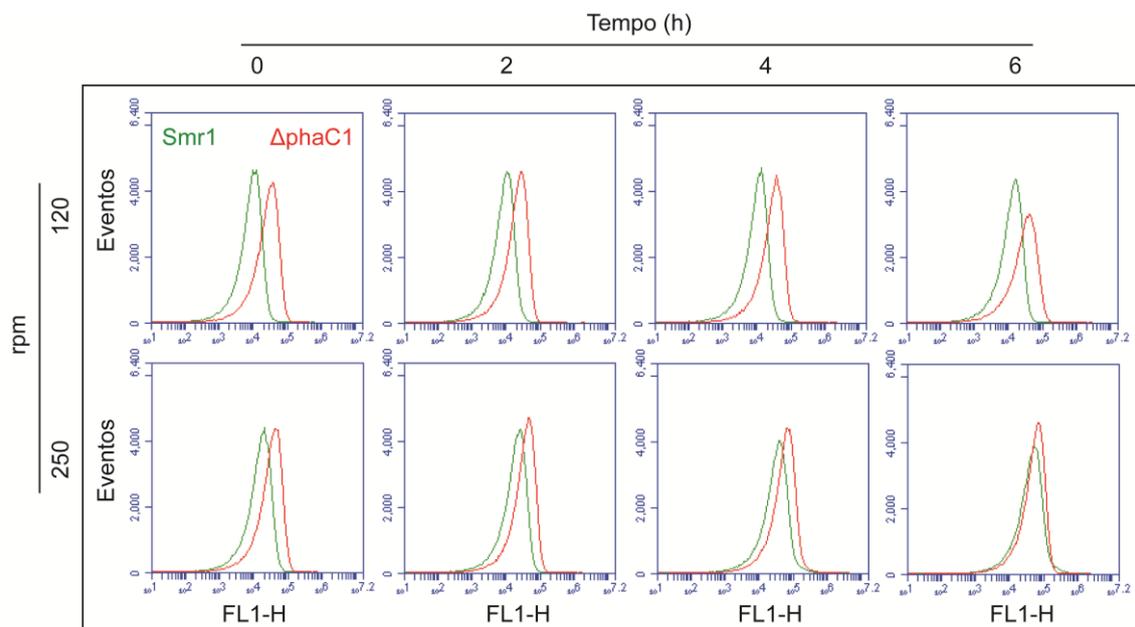


FIGURA 22. O EFEITO DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE AERAÇÃO (250 OU 120 RPM) NA PRODUÇÃO DE EROs EM CÉLULAS DAS ESTIRPES SELVAGEM SmR1 E MUTANTE $\Delta phac1$ DE *H. seropedicae*. Análise dos níveis de EROs utilizando DCFDA por citometria de fluxo foi realizada segundo o item 4.8.1.3 de materiais e métodos. Os histogramas representam a fluorescência da sonda DCF em células de SmR1 e mutante $\Delta phac1$ de *H. seropedicae*. As estirpes SmR1 e $\Delta phac1$ foram cultivadas em meio NFbHPN-malato sob agitação de 250 ou 120 rpm, a densidade ótica inicial a 600 nm foi 0,09. Após 3 h de incubação ($DO_{600nm} = 0,4$, tempo 0 h), uma alíquota de 1 mL da cultura de células foi coletada e ensaiada segundo o item 4.8.1.3. Sucessivamente, um volume de 1 mL do cultivo celular foi coletado nos tempos: 2 h ($DO_{600nm} = 0,8$), 4 h ($DO_{600nm} = 1,4$) e 6 h ($DO_{600nm} = 1,6$). As amostras foram excitadas a 488 nm com laser de argônio e emitiram fluorescência em 530 nm. FL1-H: Canal de detecção de fluorescência (530/30 nm). A figura é representativa de três experimentos independentes realizados em duplicata.

5.7.2. Determinação de atividade nitrogenase em *H. seropedicae* estirpes SmR1 e $\Delta phaC1$ e da expressão do promotor do gene *nifb* sob diferentes concentrações de oxigênio

A partir dos dados apresentados até aqui, o ambiente oxidativo desfavorável produzido no mutante $\Delta phaC1$ foi correlacionado com a atividade reduzida de Fnr. Em decorrência disto, a transcrição de *fnr1*, *fixN* e *phaC2*, genes cuja expressão é dependente de Fnr, foi reduzida. A menor atividade de Fnr pode estar relacionada com a oxidação do seu grupamento Fe-S e este efeito oxidativo poderia atingir outras metaloproteínas da célula. Entre as metaloproteínas possivelmente afetadas estão aquelas que compõem o complexo enzimático da nitrogenase: a dinitrogenase e a dinitrogenase redutase (BULEN e LE-COMTE, 1966; HAGEMAN e BURRIS, 1978). A dinitrogenase, também conhecida como proteína MoFe, possui dois pares de núcleos metálicos, o cluster P e o centro FeMoCo. A dinitrogenase redutase, conhecida também como proteína Fe, possui um único cluster [4Fe-4S] em sua estrutura (DIXON e KAHN, 2004).

Nos diazotrofos, o complexo enzimático da nitrogenase tem sua estrutura formada e montada pelos produtos dos genes *nif* (DIXON e KAHN, 2004). Em *H. seropedicae* a fixação de nitrogênio é fortemente regulada pelos níveis de nitrogênio fixado e oxigênio tanto no nível pós-traducional, por um mecanismo ainda não conhecido, quanto no nível transcricional (CHUBATSU *et al.*, 2011). A transcrição dos genes *nif* é realizada a partir de um promotor dependente do fator σ^{54} e da proteína ativadora de transcrição NifA (DIXON e KAHN, 2004). Na presença de altos níveis de nitrogênio fixado ou de oxigênio, a atividade de NifA é inibida e não ocorre transcrição dos genes *nif*. O mecanismo de inibição da atividade de NifA pelos níveis de oxigênio ainda não foi totalmente esclarecido, mas parece envolver um motivo conservado de cisteínas redox-sensitivo. Uma das possibilidades para este motivo conservado de cisteínas, comparando-o com outras proteínas sensíveis ao estado redox, é que este motivo serviria para a formação de um centro Fe-S (OLIVEIRA *et al.*, 2009). De fato, mutações pontuais substituindo qualquer uma das 4 cisteínas leva à formação de variantes NifA inativas (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Portanto,

além do próprio complexo da nitrogenase, NifA também pode ser alvo do dano oxidativo aumentado em resposta à deleção do gene *phaC1*.

O ensaio de medida de atividade da nitrogenase da estirpe mutante Δ *phaC1*, através de detecção da redução de acetileno (Figura 23), mostra que a mutação causou uma diminuição de cerca de 10 vezes na atividade da nitrogenase. Esses dados sugerem fortemente que o estresse oxidativo causado pela mutação no gene *phaC1* e observado na atividade de Fnr, também afetou sítios redox-sensitivos envolvidos na fixação de nitrogênio. No entanto, a avaliação da atividade, pela redução de acetileno, não permite distinguir se o efeito observado é devido à redução da expressão gênica, o qual é reflexo da atividade de NifA, ou da atividade do complexo da nitrogenase. Para acessar essa questão foi avaliado se expressão da proteína NifA a partir de um promotor *lac* constitutivo, no plasmídeo pRAMM1, era capaz de complementar o fenótipo de fixação de nitrogênio do mutante. O resultado mostrado na figura 23 indica que a expressão de cópias adicionais de NifA restaurou cerca de 40% da atividade de nitrogenase em relação ao selvagem. Esse resultado sugere que o fenótipo do mutante parece estar parcialmente relacionado com a diminuição da expressão de *nifA*, já que houve um aumento da atividade de nitrogenase da célula quando *nifA* foi expresso de forma constitutiva. No entanto, um efeito direto na atividade do complexo da nitrogenase e/ou na atividade de NifA ainda não podem ser descartados. Além disso, a expressão do promotor *nifB* está cerca de 2,3 vezes reduzida no mutante Δ *phaC1*, quando comparado com a estirpe SmR1, em condições de microaerofilia (FIGURA 24), indicando que a atividade da proteína NifA pode estar afetada no mutante. Para o completo entendimento do fenótipo ainda é necessário avaliar a expressão do gene *nifA* e a atividade da proteína NifA na estirpe mutante.

De forma semelhante, o mutante *phbC* de *A. caulinodans* apresentou atividade de nitrogenase reduzida em relação à estirpe selvagem (MANDON *et al.*, 1998) e esta atividade foi parcialmente restaurada com a expressão de *nifA* a partir de um plasmídeo. A expressão reduzida de *nifA* no mutante *phbC* pode estar relacionada com uma alteração no estado redox e na concentração intracelular de ATP (MANDON *et al.*, 1998).

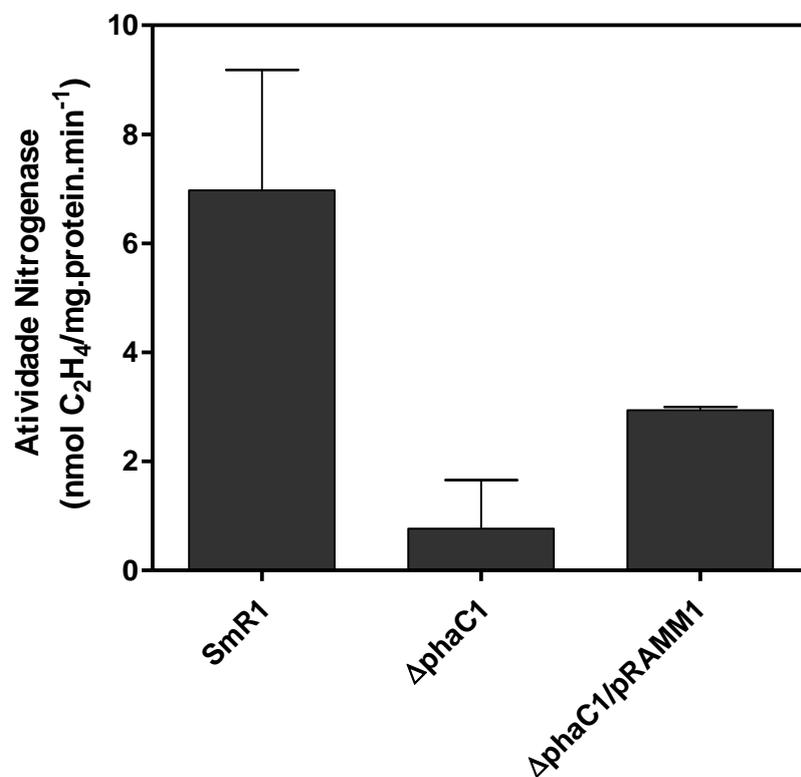


FIGURA 23. ATIVIDADE NITROGENASE NA ESTIRPE SmR1, MUTANTE $\Delta phaC1$ E MUTANTE $\Delta phaC1$ COMPLEMENTADO COM O GENE *nifA* SOB REGULAÇÃO DO PROMOTOR *nifA*. Atividade foi determinada pelo método de redução de acetileno (KLASSEN *et al.*, 1997). As células foram cultivadas por 24 horas em frascos de 10 mL contendo 4 mL de meio NFbHP-malato suplementado 0,5 mmol/L de glutamato de sódio.

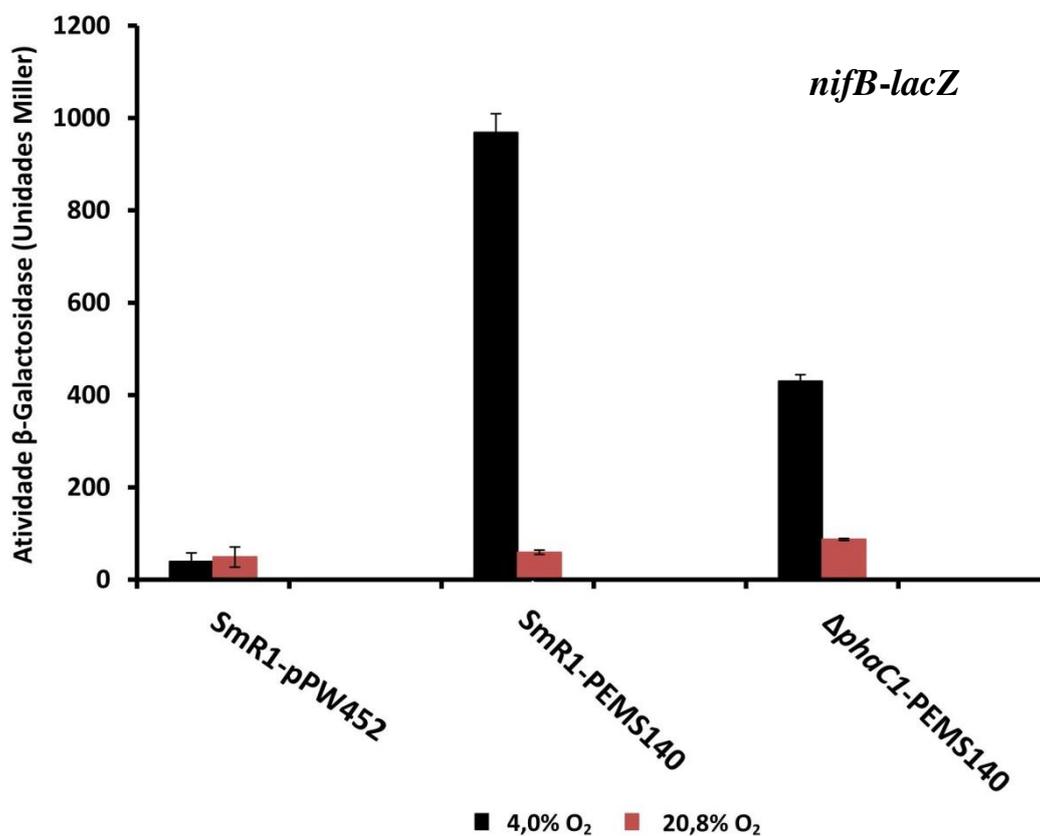


FIGURA 24. ANÁLISE TRANSCRICIONAL DA FUSÃO TRANSCRICIONAL *nifB-lacZ* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO (4% E 20,8%). Estirpes selvagem SmR1 e mutante $\Delta phaC1$ transformadas com plasmídeo PEMS140 (*nifB-lacZ*) foram cultivadas em meio NFbHP-malato com 5 mM de NH_4Cl , sob agitação de 120 rpm a 30 °C por 16 horas. Após este período de cultivo, a densidade ótica a 600 nm das culturas foram ajustadas para 0,2. Em seguida, as culturas foram cultivadas em meio NFbHP-malato sem nitrogênio e nas concentrações iniciais de oxigênio de 4 ou 20,8% por 6 horas. Aliquotas de 100 μL foram coletadas do meio de cultura para o ensaio de β -galactosidase. Controle negativo: vetor pPW452 sem região promotora do gene *nifB*. As trocas gasosas foram realizadas segundo o item 4.6.2. Os valores representam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. FONTE: BATISTA, M. B., Comunicação Pessoal.

5.7.3. Curva de crescimento de *H. seropedicae* exposto a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Microrganismos produtores de PHA utilizam esse biopolímero como fonte de carbono e energia. Além dessa função, o acúmulo de PHA é importante na proteção contra vários tipos de estresse (KADOURI *et al.* 2002; 2003; AYUB *et al.*, 2009). As estirpes SmR1 e $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae* foram expostas a peróxido de hidrogênio (H₂O₂), durante o seu cultivo, com o objetivo de verificar se o acúmulo de PHB protege esta bactéria contra esse agente oxidante. Quando as células foram cultivadas em meio NFbHPN-malato e diferentes concentrações de H₂O₂ (2, 3 e 5 mM) tanto a estirpe SmR1 como $\Delta phaC1$ tiveram seu perfil de crescimento afetado por um período de 3h, contudo, após este período, é provável que tenha ocorrido remoção enzimática e/ou química do H₂O₂ e as células voltaram a se multiplicar (FIGURA 25).

Em *Aeromonas hydrophila*, as estirpes selvagem e mutante *phaC* não foram susceptíveis a H₂O₂, exceto no final da fase estacionária quando o mutante *phaC* foi mais sensível a H₂O₂ do que a estirpe selvagem (ZHAO *et al.*, 2007). Diferente do observado em *H. seropedicae*, Kadouri e colaboradores (2003) observaram que o mutante *phbC* exibiu maior sensibilidade a H₂O₂ do que a estirpe selvagem de *A. brasilense*.

Estes resultados sugerem que H₂O₂ exerça um efeito bacteriostático no crescimento de ambas as estirpes de *H. seropedicae* por um período de 3 horas, sendo que a presença de PHB acumulado não demonstrou nenhuma vantagem na adaptação da bactéria ao H₂O₂.

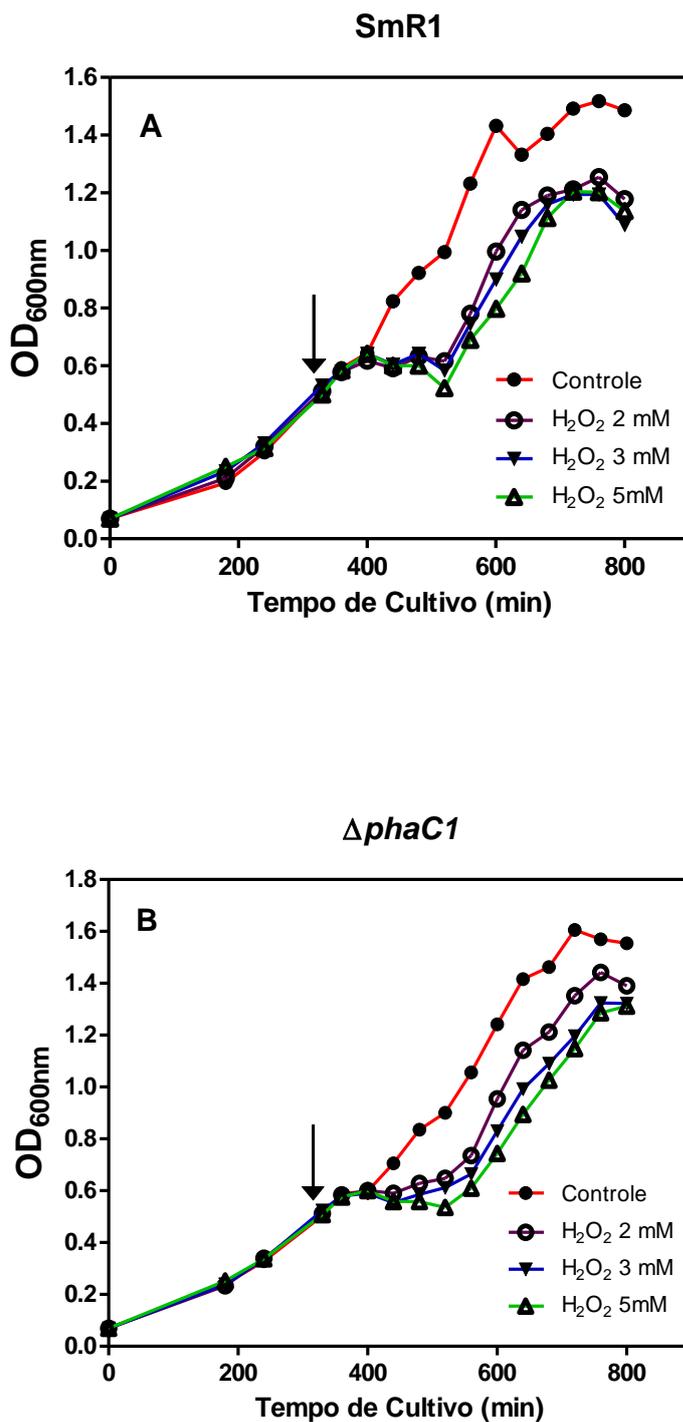


FIGURA 25. CURVA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES SELVAGEM SmR1 E MUTANTE $\Delta phaC1$ NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂). A e B) Estirpes selvagem SmR1 e mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHPN-malato, sob agitação de 120 rpm a 30 °C. Quando a cultura de células atingiu a DO_{600nm} de 0,5 (330 min), diferentes concentrações de H₂O₂ (2,0; 3,0 e 5,0 mM) foram adicionadas ao meio de cultivo. Em seguida à adição de H₂O₂, a cada 30 minutos 200 ul de cultura eram coletados e submetidos à leitura de absorvância da densidade celular (600 nm). A figura é representativa de três experimentos independentes realizados em duplicata.

5.7.4. Curva de crescimento de *H. seropedicae* exposto a diferentes concentrações de um gerador de superóxido

Além do peróxido de hidrogênio, o ânion superóxido exerce um forte estresse oxidativo que se não for devidamente mitigado pode danificar ácidos nucleicos, proteínas, lipídios de membrana entre outros componentes celulares (IMLAY, 2008). Para determinar como a falta de PHB poderia afetar a resistência a superóxido, as estirpes SmR1 e $\Delta phaC1$ foram submetidas a diferentes concentrações de metilviologênio, um gerador de superóxido (ITEM 4.8.1.2). A estirpe $\Delta phaC1$ teve seu perfil de crescimento mais afetado do que a estirpe selvagem após a adição de metilviologênio ao meio de cultivo, principalmente nas concentrações de 2,0; 5,0 e 10 mM (FIGURA 26). Estes resultados sugerem que o superóxido é um agente de estresse oxidativo ao qual *H. seropedicae* tem menor resistência e, que a ausência de PHB acumulado torna a bactéria mais sensível ao superóxido gerado.

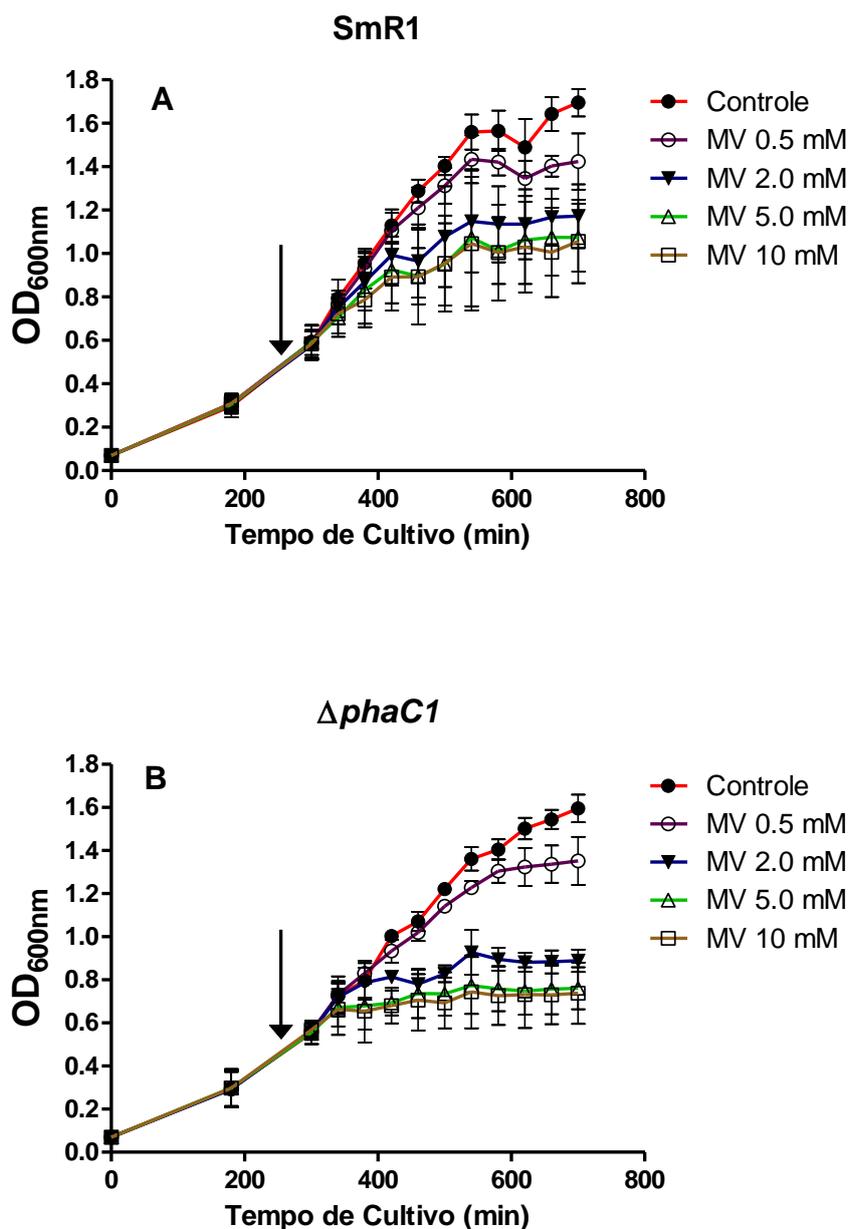


FIGURA 26. CURVA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES SELVAGEM SmR1 E MUTANTE $\Delta phaC1$ NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE METILVIOLOGÊNIO (MV). A e B) Estirpes selvagem SmR1 e mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHPN-malato, sob agitação de 120 rpm a 30 °C. Quando a cultura de células atingiu a DO_{600nm} de 0,5 (270 min), diferentes concentrações de MV (0,5; 2,0; 5,0 e 10 mM) foram adicionadas ao meio de cultivo. Em seguida à adição de metilviologênio, a cada 30 minutos 200 μ l de cultura foram coletados e submetidos à leitura de absorvância da densidade celular (600 nm). Os valores representam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.

5.7.5. Avaliação da expressão do promotor do gene *fnr1* sob diferentes condições de aeração e acompanhada pela determinação dos níveis de EROS em *H. seropedicae*

Anteriormente nesta tese, foi demonstrado que os genes *fnr1* e *fixN* dependente de Fnr são reprimidos no mutante $\Delta phaC1$ (Figuras 19 e 20). Além disso, $\Delta phaC1$ produziu mais EROs do que a estirpe selvagem (Figura 22). Com base nestes dados, foi sugerido que a ausência de PHB em $\Delta phaC1$ gera ambiente oxidativo desfavorável para atividade Fnr. Provavelmente a maior produção de EROs pelo mutante afeta várias proteínas, particularmente metaloproteínas como Fnr, que são susceptíveis a EROs (D'AUTREAUX e TOLEDANO, 2007). Com o objetivo de verificar se o ambiente oxidativo afeta atividade Fnr, foram realizados experimentos simultâneos de dosagem da atividade β -galactosidase e detecção da produção total de EROs nas estirpes SmR1 e $\Delta phaC1$ transformadas com a fusão *fnr1-lacZ*, em diferentes condições de aeração (250 e 120 rpm).

Em 250 rpm (período C, controle) há alta aeração e o gene *fnr1* esteve reprimido em ambas as estirpes, durante todo o período do ensaio (Figura 27A). Em 120 rpm, ocorre a diminuição da tensão de O₂ devido ao aumento da densidade bacteriana no meio de cultura (tempos T2, T4 e T6), e observa-se que a transcrição do gene *fnr1* aumenta 14,2 vezes ($215,4 \pm 1,1$ unidade Miller) na estirpe selvagem SmR1 (T2) (FIGURA 27A). No período T4, observa-se um aumento na transcrição de *fnr1* na estirpe selvagem de 27,3 vezes ($415,2 \pm 2,9$ unidades Miller) e em T6 o aumento é de 54 vezes ($819,6 \pm 17$ unidades Miller, FIGURA 27A). Em relação à produção de EROs na estirpe selvagem, foi observado um aumento de 1,8; 11,4 e 22,6 vezes nos períodos T2, T4 e T6, respectivamente. Em todos os períodos do ensaio a expressão do gene *fnr1* foi reprimida na estirpe $\Delta phaC1$ (FIGURA 27A). Quando comparamos a transcrição do gene *fnr1* em ambas as estirpes nos mesmos períodos do ensaio (T2, T4 e T6), a expressão do gene *fnr1* é reprimida 42, 92 e 132 vezes na estirpe $\Delta phaC1$ (FIGURA 27A). Em relação à produção de EROs no mutante $\Delta phaC1$, foi observado um aumento de 10; 12 e 15,0 vezes nos respectivos períodos T2, T4 e T6 (FIGURA 27B). Comparando a produção de

EROS entre SmR1 e $\Delta phaC1$ tem-se: (1) no período T2, o mutante produziu 5,9 vezes mais EROs do que o selvagem concomitante com a maior transcrição de *fnr1* no selvagem (FIGURA 27A) e (2) nos períodos T4 e T6, foi observada produção similar de EROs em ambas as estirpes e a expressão do gene *fnr1* foi maior no SmR1 (FIGURAS 27A e 27B). Os níveis de EROs aumentaram no selvagem e mutante após a diminuição da aeração atingindo valores semelhantes, no entanto não ocorreu um aumento da expressão do gene *fnr1* na estirpe $\Delta phaC1$. A maior produção de EROs observada em $\Delta phaC1$ no período T2 provavelmente produz um dano irreversível no *cluster* Fe-S de Fnr resultando na redução da atividade de Fnr.

A deleção de *phaC1* direta ou indiretamente afeta a expressão do gene *fnr1*. Dados de transcrição de *fnr1* e detecção de EROs em ambas as estirpes apresentados nesta tese sugerem que a atividade Fnr é afetada na estirpe mutante devido à ausência de PHB, que funciona como um protetor contra o dano oxidativo.

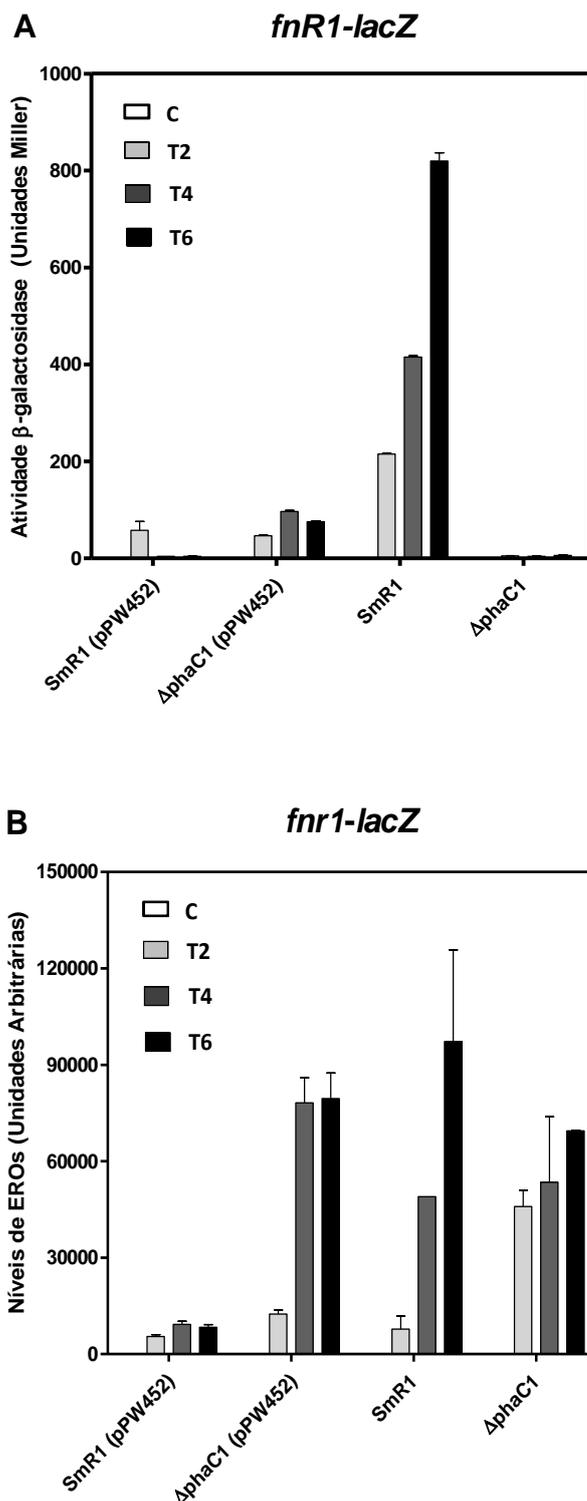


FIGURA 27. ATIVIDADE β -GALACTOSIDASE E PRODUÇÃO TOTAL DE EROs DAS ESTIRPES SmR1 e $\Delta phaC1$ DE *H. seropedicae* TRANSFORMADAS COM A FUSÃO TRANSCRICIONAL (*fnr1-lacZ*) e CULTIVADAS EM MEIO NFbHPN-MALATO A 30 °C SOB AGITAÇÃO DE 250 E 120 RPM. **(A)** Atividade β -galactosidase da fusão *fnr1-lacZ*. A densidade ótica inicial foi de 0,090 e todas as culturas foram mantidas a 250 rpm por um período de 3h, **C**, controle. Após este período alíquotas de 100 μ L foram coletadas do meio de cultura para o ensaio de atividade β -galactosidase. **T2**, **T4** e **T6** representa os tempos (h) que as culturas foram mantidas sob agitação de 120 rpm. Controle negativo: vetor pPW452 sem região promotora. **(B)** Detecção fluorescente da produção total de ROS nas células das estirpes selvagem SmR1 e mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae* transformadas com a fusão transcricional (*fnr1-lacZ*) (ITEM 4.8.1.3).

5.7.6. ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DAS ESTIRPES SELVAGEM e MUTANTE $\Delta phaC1$ DE *H. seropedicae*

Para investigar o padrão de expressão gênica nas estirpes SmR1 e $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae* durante o início da produção de PHB ($DO_{600nm} = 0,4$, transcriptoma 1) e o pico de produção deste polímero ($DO_{600nm} = 1,2$, transcriptoma 2), foi realizada uma análise transcriptômica diferencial através de sequenciamento de mRNA (RNA-seq) de ambas as estirpes, nas mesmas condições experimentais.

No primeiro experimento de análise transcriptômica, obteve-se 59,6 milhões de leituras para a estirpe SmR1 e 28,8 milhões para $\Delta phaC1$. Em seguida, as sequências foram submetidas a um filtro de qualidade que seleciona sequências com escore de qualidade maior que 0,05 e descarta leituras com tamanho menor que 20 pb (item 4.8.3), resultando em 53,7 e 27,7 milhões de sequências para SmR1 e mutante, respectivamente. Estas sequências foram mapeadas contra o genoma de *H. seropedicae* SmR1, sendo obtido um total de 12,9 e 5,9 milhões de leituras únicas para SmR1 e mutante, respectivamente, para as duas replicatas biológicas (TABELA 3).

No segundo experimento de análise transcriptômica, obteve-se 21,9 milhões leituras para SmR1 e 32,5 milhões de leituras para o mutante $\Delta phaC1$. Destas 20,9 e 30 milhões, respectivamente, foram mapeadas contra o genoma de *H. seropedicae*. Obteve-se 3,9 e 4,6 milhões de leituras únicas para SmR1 e mutante, respectivamente, para as duas replicatas biológicas (TABELA 3).

As proteínas codificadas pelos genes diferencialmente expressos em ambos os transcriptomas foram agrupadas em categorias funcionais de acordo com a base de dados COG, que classifica proteínas a partir de genomas sequenciados com base no conceito de ortologia (TATUSOV *et al.*, 1997). A base COG está dividida em quatro classes e 25 categorias funcionais, (ANEXO 7). Os 611 genes diferencialmente expressos no experimento 1 foram agrupados nas diferentes categorias funcionais, com destaque para os processos celulares que apresentaram o maior percentual de genes envolvidos: função desconhecida (Categoria S, 22,72%), metabolismo e transporte de aminoácidos (categoria E, 10,63%), função geral (categoria R,

9,9%), transcrição (categoria K, 7,71%), mecanismos de transdução de sinal (categoria T, 7,57%), metabolismo e transporte de íons inorgânicos (categoria P, 5,53%) (FIGURA 28A). De modo semelhante, os 561 genes diferencialmente expressos no experimento 2 foram agrupados, conforme o COG, com destaque para os processos celulares que apresentaram o maior percentual de genes envolvidos: função desconhecida (Categoria S, 18,99%), metabolismo e transporte de aminoácidos (categoria E, 9,97%), função geral (categoria R, 8,86%), transcrição (categoria K, 7,75%), mecanismos de transdução de sinal (categoria T, 7,59%), produção e conversão de energia (categoria C, 6,80%), parede celular (categoria M, 5,7%) e tradução, estrutura ribossomal e biogênese (categoria J, 5,54%) (FIGURA 28B).

Comparando o experimento 2 em relação ao 1, observou-se uma diminuição no número de genes envolvidos em diferentes classes, dentre elas evidenciamos os genes classificados com função desconhecida (23,1%), genes envolvidos com metabolismo e transporte de íons inorgânicos (53,7%), genes envolvidos com metabolismo e transporte de aminoácidos (13,7%), genes envolvidos com função geral (17,7%) e genes envolvidos com replicação, recombinação e reparo de DNA (28,3%). Além disso, foi observado um aumento no número de genes envolvidos na produção e conversão de energia (34,9%), genes envolvidos com tradução, estrutura ribossomal e biogênese (34,3%), genes envolvidos com a parede celular (30,6%), genes envolvidos com mecanismos de defesa (57,1%) e genes envolvidos com metabolismo e transporte de carboidratos (7,2%).

TABELA 3. RESUMO DO MAPEAMENTO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS COM O GENOMA DE *H. seropedicae*

AMOSTRA	DO _{600nm}	NÚMERO LEITURAS TOTAIS	NÚMERO DE LEITURAS MAPEADAS	NÚMERO DE LEITURAS ÚNICAS
SmR1	0,4	56.932.881	53.698.785	12.992.957 (22,8%)
<i>ΔphaC1</i>	0,4	28.856.458	27.701.828	5.928.594 (20,5%)
SmR1	1,2	21.876.958	20.936.133	3.895.201 (17,8%)
<i>ΔphaC1</i>	1,2	32.466.217	30.186.234	4.643.739 (14,3%)

Dados referentes ao somatório das duas replicatas biológicas

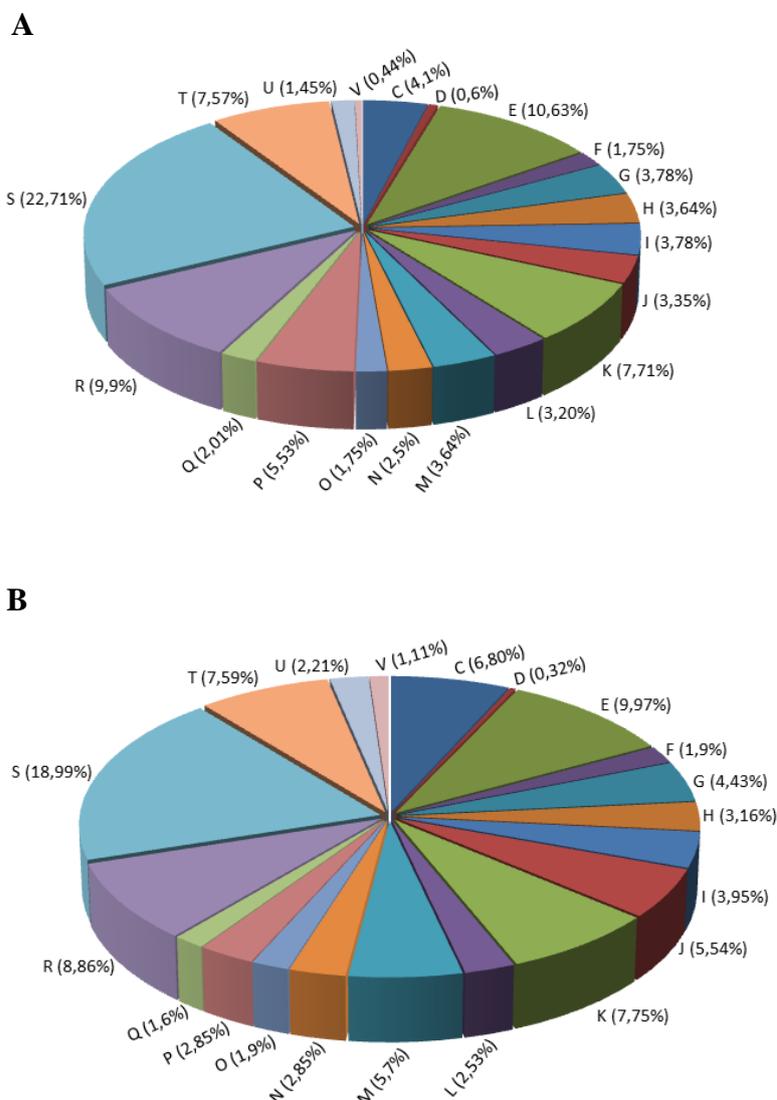


FIGURA 28. CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO O COG DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA COMPARAÇÃO DOS DADOS DO TRANSCRIPTOMA DO MUTANTE $\Delta phaC1$ CONTRA A ESTIRPE SELVAGEM SmR1. Ambas as estirpes foram cultivadas em meio NFbHPN-malato, sob agitação de 120 rpm a 30 °C, até atingir DO_{600nm} de 0,4 (A) ou 1,2 (B). O número de genes foi representado por porcentagem. Classificação segundo COG: (C) Produção e conversão de energia, (D) Controle do ciclo celular, divisão celular e partição cromossomo, (E) Metabolismo e transporte de aminoácidos, (F) Metabolismo e transporte de nucleotídeos, (G) Metabolismo e transporte de carboidratos, (H) Metabolismo e transporte de coenzimas, (I) Metabolismo e transporte de lipídeos, (J) Tradução, biogênese e estrutura ribossomal, (K) Transcrição, (L) Replicação, recombinação e reparo de DNA, (M) Biogênese da membrana e das estruturas membranosas, (N) Motilidade celular, (O) Modificação Pós-transcricional, reposição de proteínas e chaperonas, (P) Metabolismo e transporte de íons inorgânicos, (Q) Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários, (R) Função geral predita, (S) Função desconhecida, (T) Mecanismo de transdução de sinal, (U) Tráfego intracelular, secreção e transporte de vesículas e (V) mecanismos de defesa.

5.7.6.1. Perfil de transcrição de genes envolvidos no metabolismo de PHB em *H. seropedicae*

O perfil de transcrição dos 13 genes envolvidos no metabolismo de PHB em *H. seropedicae*, está representado na tabela 4. Além destes, foram incluídos os dados de transcrição do gene *Hsero_2402*, que codifica para uma proteína hipotética que apresentou 14,3 e 13,3% de identidade com PhaP1 e PhaP2 de *H. seropedicae*, respectivamente (TIRAPELLE *et al.*, 2013). A proteína codificada por *Hsero_2402* foi capaz de se ligar ao grânulo de PHB de *H. seropedicae* e apresenta uma estrutura secundária rica em alfa hélice, que pode estar envolvida nesta função (NEUMANN *et al.*, 2008; TIRAPELLE *et al.*, 2013).

H. seropedicae possui dois genes *phbA* e *phbA2* que codificam para tiolases ou acetil-CoA acetiltransferases (PEDROSA *et al.*, 2011). No transcriptoma 1, *phbA* e *phbA2* exibiram expressão diferencial aumentada e diminuída, respectivamente, na estirpe mutante quando comparado com SmR1 (TABELA 4). Ambos os genes foram reprimidos no transcriptoma 2 (TABELA 4). Os genes *phbB* e *phaB* codificam para acetoacetil-CoA redutases (PEDROSA *et al.*, 2011) e *phaB* não foi diferencialmente expresso no transcriptoma 1 enquanto que *phbB* foi reprimido. Esses genes não apresentaram expressões diferenciais no transcriptoma 2 (TABELA 4).

Pela anotação do genoma *H. seropedicae* possui quatro genes codificadores de PHA sintases, *phaC1*, 2, 3 e 4 (PEDROSA *et al.*, 2011). *phaC1*, 2 e 3 foram reprimidos em ambos os transcriptomas, no entanto *phaC4* não demonstrou expressão diferencial ambos os transcriptomas (TABELA 4). O perfil de transcrição dos genes codificantes das PHA sintases de *H. seropedicae* observado em ambas as condições foi validado a partir da análise de fusões transcricionais das regiões promotora dos genes *phaC2*, 3 e 4, conforme foi observado na figura 12.

Os genes *phaP1* e *phaP2* apresentaram expressões diferenciais diminuídas no transcriptoma 1 (TABELA 4). No transcriptoma 2, o gene *phaP1* foi reprimido, no entanto *phaP2* não mostrou expressão diferencial (TABELA 4). Dados de análise transcricional contendo regiões promotoras dos genes *phaP1* e *phaP2* de *H. seropedicae* demonstraram que a expressão de ambos os

genes no mutante $\Delta phaC1$ foi inferior quando comparada com a estirpe selvagem (ALVES, 2014). Desse modo, validando os dados de expressão dos genes *phaP1* e *phaP2* obtidos no transcriptoma do mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae*.

O gene *Hsero_2402*, possivelmente um homólogo de fasina, apresentou expressão diferencial diminuída em ambos os transcriptomas (TABELA 4).

H. seropedicae apresenta *phaR* que codifica para o regulador transcricional PhaR, responsável por regular negativamente a expressão das fasinas e a sua própria expressão (PEDROSA *et al.*, 2011; KADOWAKI *et al.*, 2011). O gene *phaR* não foi diferencialmente expresso em ambos os transcriptomas (TABELA 4).

Os genes *phaZ1* e *phaZ2* codificam para proteínas depolimerases 1 e 2 envolvidas na mobilização/utilização do grânulo de PHA (PEDROSA *et al.*, 2011). O gene *phaZ1* apresentou expressão diferencial diminuída em ambos os transcriptomas. O gene *phaZ2* apresentou expressão diferencial aumentada no transcriptoma 1, enquanto que este gene não foi diferencialmente expresso no transcriptoma 2 (TABELA 4).

TABELA 4. PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE PHB EM *H. seropedicae* COM BASE NOS DADOS DE RNA-seq COMPARANDO O MUTANTE $\Delta phaC1$ CONTRA A ESTIRPE SELVAGEM SmR1

LOCUS TAG	GENE	PROTEÍNA	COG	VARIÇÃO DA EXPRESSÃO		p-AJUSTADO	
				DO _{600nm} 0,4	DO _{600nm} 1,2	DO _{600nm} 0,4	DO _{600nm} 1,2
Hsero_0239	<i>phbA2</i>	PhbA2 (Acetil-CoA acetiltransferase)	I	- 2,2	- 2,3	0,24	0,09
Hsero_0256	<i>phbA</i>	PhbA (Acetil-CoA acetiltransferase)	I	2,1	- 2,1	0,02	0,3
Hsero_0265	<i>phaC3</i>	PhaC3 (PHA sintase)	I	- 6,5	-3,8	0,5	0,009
Hsero_0639	<i>phaZ2</i>	PhaZ2 (Depolimerase)	I	9,7	-1,5	0,01	1,0
Hsero_1622	<i>phaZ1</i>	PhaZ1 (Depolimerase)	I	- 2,4	- 2,6	0,5	0,07
Hsero_1639	<i>phaP1</i>	PhaP1 (Fasina)	S	- 23,4	-9,7	0,4	0,1
Hsero_2402	<i>Hsero_2402</i>	Proteína hipotética	S	- 2E+308	- 21,9	0,4	3,22E-98
Hsero_2405	<i>phaC2</i>	PhaC2 (PHA sintase)	I	- 3,6	- 13,7	0,5	1,4E-68
Hsero_2625	<i>phaC4</i>	PhaC4 (PHA sintase)	I	1,1	1,7	0,6	0,03
Hsero_2997	<i>phaR</i>	PhaR (Regulador Transcricional)	Q	1,7	- 1,0	0,0004	0,9
Hsero_2998	<i>phbB</i>	PhbB (Acetoacetil-CoA redutase)	Q	- 2,0	- 1,1	0,03	1,0
Hsero_2999	<i>phaC1</i>	PhaC1 (PHA sintase)	I	- 254	- 2E+308	0,5	- 5,1E-138
Hsero_3315	<i>phaB</i>	PhaB (3-cetoacil-ACP redutase)	I;Q;R	1,1	- 1,1	0,5	1,0
Hsero_4759	<i>PhaP2</i>	PhaP2 (Fasina)	S	- 22,4	- 1,4	0,5	0,9

p-ajustado ($\leq 0,05$).

A análise da expressão gênica em *P. putida* cultivada em meio suplementado com octanoato de sódio revelou que os genes *phaC1* e 2 tiveram expressões diferenciais diminuídas no mutante *phaC1* (KT42C1) (ESCAPA *et al.*, 2012). *Haloarcula hispanica* contém uma PHA sintase heterodimérica formada pelas subunidades PhaC e PhaE, codificada pelos genes *phaC* e *phaE* (HAN *et al.*, 2007). O transcriptoma do mutante Δ *phaEC* de *H. hispanica* cultivada em meio contendo glucose mostrou que os genes *phaC* e *phaE* foram reprimidos (LIU *et al.*, 2013). Esses resultados demonstraram que a deleção de *phaC1*, que codifica a principal PHA sintase de *H. seropedicae* SmR1, assim como a deleção de seus homólogos em outros microrganismos induz a repressão da transcrição de suas cópias adicionais.

No mesmo mutante Δ *phaEC* de *H. hispanica* o gene *paaJ* codificante da enzima acetil-CoA acetiltransferase foi reprimido, enquanto que o gene *phaB*, que codifica acetoacetil-CoA redutase, não foi diferencialmente expresso (LIU *et al.*, 2013). Em *R. eutropha*, foi observado que a substituição do resíduo de guanina 320 por adenina no gene *phaC1* gerou uma mutação que interrompe a tradução de *phaC1*, que ocasionou a ausência de PHB, além disso, reduziu a atividade da acetil-CoA acetiltransferase e da acetoacetil-CoA redutase (MIFUNE *et al.*, 2008). A deleção de *phaC1* em *H. seropedicae* e *R. eutropha* bem como de *phaEC* de *H. hispanica* leva a perda da capacidade de produzir PHB e isto afeta negativamente a transcrição dos genes codificantes da acetil-CoA acetiltransferase e acetoacetil-CoA redutase em *H. seropedicae* e *H. hispanica*, bem como a atividade enzimática dessas proteínas em *R. eutropha*.

Dados do transcriptoma do mutante *phaC1* de *P. putida* mostraram que os genes codificantes de fasinas, *phaF* e *phaI*, apresentaram expressões diferenciais diminuídas (ESCAPA *et al.*, 2012) enquanto que Liu e colaboradores (2013) demonstraram que o gene *phaP*, único para fasina, foi reprimido no transcriptoma do mutante Δ *phaEC* de *H. hispanica*. No caso de *R. eutropha*, que apresenta 7 genes codificantes de fasinas (PFEIFFER e JENDROSSEK, 2012), dados de análise de transcriptoma do mutante PHB-4, com deleção em *phaC1*, cultivado em gluconato de sódio, demonstraram que o gene *phaP3* exibiu expressão diferencial diminuída e que os genes *phaP1* e *phaP4* apresentaram expressão aumentada (PEPLINSKI *et al.*, 2010). Uma

provável explicação para a repressão dos genes *phaP* nestes microrganismos não produtores de PHB é que na ausência do polímero, as proteínas PhaR e PhaF se ligam as regiões promotoras de genes codificantes de fasinas e reprimem a transcrição desses genes (PIETRO *et al.*, 1999; YORK *et al.*, 2002; PÖTTER *et al.*, 2002; GALÁN *et al.*, 2011; KADOWAKI *et al.*, 2011).

No transcriptoma do mutante *phaC1* de *P. putida*, o gene *phaZ*, que codifica uma depolimerase, foi reprimido (ESCAPA *et al.*, 2012). Em *R. eutropha*, *phaZ2* apresentou expressão diferencial aumentada no transcriptoma do mutante PHB-4 (PEPLINSKI *et al.*, 2010). Em *H. seropedicae* e *P. putida* a expressão reduzida de *phaZ1* e *phaZ*, respectivamente, sugere que a expressão desse genes está relacionada com a produção de PHB. No entanto o aumento da transcrição observado para *phaZ2* no transcriptoma 1 de *H. seropedicae* e em *R. eutropha* sugere que este gene seja regulado por um mecanismo alternativo ao da regulação de *phaZ1*.

5.7.6.2. Perfil de transcrição de genes codificantes de proteínas associadas ao grânulo de PHB em *H. seropedicae*

Tirapelle e colaboradores (2013) encontraram proteínas associadas aos grânulos de PHB em *H. seropedicae* que não estão diretamente relacionadas ao metabolismo de PHB, como por exemplo, aconitase hidratase, leucil aminopeptidase e porinas (TABELA 5). O resultado da análise de transcrição por RNA-seq dos genes codificantes destas proteínas está mostrado na tabela 5.

Estes genes não apresentaram expressões diferenciais nos transcriptomas 1 ($DO_{600nm} = 0,4$) e 2 ($OD_{600nm} = 1,2$).

TABELA 5. PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DE GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AOS GRÂNULOS DE PHB EM *H. seropedicae* COM BASE NOS DADOS DE RNA-seq COMPARANDO O MUTANTE $\Delta phaC1$ CONTRA A ESTIRPE SELVAGEM SmR1

LOCUS TAG	GENE	PROTEÍNA	COG	VARIAÇÃO DA EXPRESSÃO		p-AJUSTADO	
				OD _{600nm} 0,4	OD _{600nm} 1,2	OD _{600nm} 0,4	OD _{600nm} 1,2
Hsero_2979	<i>acnA</i>	AcnA (Aconitato hidratase)	C	1,9	1,4	0,3	0,6
Hsero_3109	<i>pepA</i>	Leucilaminopeptidase	E	- 1,2	1,1	0,9	0,8
Hsero_3696	<i>Hsero_3696</i>	OmpA (Porina)	M	- 1,4	1,0	0,5	0,8
Hsero_4295	<i>Hsero_4295</i>	Porina	M	-1,8	1,5	0,6	0,5
Hsero_3471	<i>Hsero_3471</i>	Proteína hipotética	S	- 2,1	1,2	0,1	0,5
Hsero_4241	<i>Hsero_4241</i>	Proteína hipotética	S	- 1,1	- 1,1	0,9	0,6
Hsero_0382	<i>Hsero_0382</i>	Proteína tipo histona HC2	S	2,3	- 1,2	0,1	1,0

p-ajustado ($\leq 0,05$).

5.7.6.3 Perfil de transcrição de genes envolvidos no metabolismo de carbono

Durante a análise proteômica do mutante PHB-4 de *R. eutropha*, Raberg e colaboradores (2014) observaram que várias proteínas tiveram expressão aumentada, em relação ao controle, como por exemplo, acil-CoA transferase, quinase ThiJ, e demetilquinina metiltransferase envolvidas no metabolismo de carbono e produção de energia. Baseados nestes resultados analisamos o transcriptoma do mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae* com o objetivo de determinar o perfil de expressão de genes homólogos envolvidos no metabolismo de carbono e produção de energia.

Segundo as vias metabólicas disponíveis na base de dados KEGG, os genes listados na tabela 6 estão envolvidos: no metabolismo de carbono, Hsero_0039 e *caiB*; na degradação de benzoato, *menG*; no metabolismo da tiamina, *thiC*, *thiD*, *thiE* e *thiG*; no ciclo do ácido cítrico, *aceE*, *aceF*, *gltA* e *lpdA*; na glicólise/gluconeogênese, *pckA* e *pgm*; na via das pentoses fosfato, Hsero_4479, *pgm*, *rpe*, *tktA* e *zwf*; no sistema de duplo componente e metabolismo de carboidratos, *dctM*, *dctP*, *dctQ*; na biossíntese de lipídeos, *accD*, *fabD*, *fabI*, *mdcA*, *mdcB*, *mdcC* e *mdcG* e na degradação de lipídeos, Hsero_3634, *fadD* e *phbA2* (TABELA 6).

O gene *Hsero_0039* foi ativado nos transcriptomas 1 e 2, e o gene *caiB* foi ativado somente no transcriptoma 1 (TABELA 6). O gene *menG* foi ativado em ambos os transcriptomas (TABELA 6). A expressão de *thiG* foi ativada em ambos os transcriptomas, enquanto que *thiC* e *thiD* apresentaram expressões diferenciais aumentadas somente no transcriptoma 2 (TABELA 6). Os genes *aceE*, *gltA* e *lpdA* foram ativados em ambos os transcriptomas, enquanto que *aceF* foi ativado somente no transcriptoma 1. *pckA* apresentou expressão diferencial aumentada em ambos os transcriptomas, no entanto *pgm* apresentou expressão diferencial diminuída somente no transcriptoma 2 (TABELA 6).

Os genes *rpE* e *Hsero_4479* foram ativados e reprimidos em ambos os transcriptomas, respectivamente (TABELA 6). *tktA* e *zwf* apresentaram expressões aumentadas somente no transcriptoma 2 (TABELA 6).

Os genes *dctM*, *dctP* e *dctQ* foram reprimidos em ambos os transcriptomas. Os genes *mdcA*, *accD*, *mdcC*, *mdcG*, *mdcB*, *fabD*, *fabI* também apresentaram expressões diferenciais diminuídas em ambos os transcriptomas. Baseados na localização próxima no genoma e no fato de todos os genes terem sido reprimidos, sugerimos que eles constituem o operon *fabDmdcBGCaccDmdcAdctMQP*, com exceção de *fabI* que está localizado distante deste conjunto gênico. Os genes *Hsero_3634* e *phbA2* foram reprimidos em ambos os transcriptomas, enquanto que *fadD* exibiu expressão diferencial diminuída somente no transcriptoma 2 (TABELA 6).

Rasberg e colaboradores (2014) observaram que a proteína ThiJ, quinase envolvida na biossíntese de tiamina pirofosfato (TPP), apresentou expressão aumentada no mutante PHB-4 de *R. eutropha*. TPP é um cofator essencial do componente E1 dos complexos multienzimáticos 2-oxoácido desidrogenases, tais como piruvato e 2-oxoglutarato desidrogenase (de KOK *et al.*, 1998; ARJUNAN *et al.*, 2004; MILNE *et al.*, 2006). Os autores observaram que o fluxo de piruvato, da via Entner-Doudoroff (KDPG: 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato), convertido a acetil-CoA pelo complexo piruvato desidrogenase (PDH) e finalmente a PHB foi afetado no mutante PHB-4. A ausência de PHB no mutante PHB-4 levou a um aumento na concentração de acetil-CoA e piruvato. O aumento na expressão de ThiJ pode indicar uma ativação do complexo PDH pela provisão de grandes quantidades de TPP em resposta ao excesso de piruvato. Da mesma forma, a expressão aumentada de ThiJ pode impulsionar a atividade do complexo 2-oxoglutarato desidrogenase (OGDHC), pois TPP também funciona como cofator deste complexo.

TABELA 6. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE CARBONO EM *H. seropedicae* COM BASE NOS DADOS DE RNA-seq COMPARANDO O MUTANTE Δ *phaC1* CONTRA A ESTIRPE SELVAGEM SmR1

LOCUS TAG	GENE	PROTEÍNA	COG	VARIÇÃO DA EXPRESSÃO		p-AJUSTADO	
				OD _{600nm} 0,4	OD _{600nm} 1,2	OD _{600nm} 0,4	OD _{600nm} 1,2
Hsero_0039	<i>Hsero_0039</i>	Acil-CoA transferase	C	2,3	53,2	0,2	0
Hsero_3677	<i>caiB</i>	Acil-CoA transferases/carnitine desidratase	C	2,2	1,2	0,03	0,7
Hsero_4454	<i>menG</i>	Dimetilmenaquinona metiltransferase	H	2,8	26,3	0,2	0
Hsero_0427	<i>thiC</i>	Proteína envolvida na biossíntese de tiamina	H	1,0	2,1	0,9	0,008
Hsero_0428	<i>thiG</i>	Proteína envolvida na biossíntese de tiazol	H	2,4	3,6	0,03	0
Hsero_0429	<i>thiD</i>	Fosfometilpirimidina quinase	H	1,7	5,5	0,1	4,59E-10
Hsero_0430	<i>thiE</i>	Tiamina monofosfato sintase	H	- 1,2	3,4	0,9	0,08
Hsero_2970	<i>gltA</i>	Citrato sintase	C	2,0	2,5	0,09	0,002
Hsero_1455	<i>lpdA</i>	2-oxoglutarato desidrogenase componente E3	C	2,2	5,6	0	0
Hsero_1453	<i>aceE</i>	Piruvato desidrogenase componente E3	C	1,7	4,6	0	0
Hsero_1454	<i>aceF</i>	Piruvato desidrogenase componente E2	C	2,7	5,0	0,1	0
Hsero_4312	<i>pckA</i>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	C	1,9	3,6	0,002	0,0005
Hsero_2663	<i>pgm</i>	Fosfoglucomutase	G	- 1,0	- 2,6	1,0	0,03
Hsero_4479	<i>Hsero_4479</i>	Gluconato 2-desidrogenase	E	- 2E+308	- 30,2	0,08	9,58E-05
Hsero_1098	<i>zwf</i>	Glucose-6-fosfato desidrogenase	E	- 1,2	2,1	0,8	1,9E-14
Hsero_1415	<i>tktA</i>	Transcetolase	G	1,7	3,6	5,7E-07	0
Hsero_3890	<i>rpe</i>	Ribulose-5-fosfato-3-epimerase	G	2,7	2,2	0,007	0,01
Hsero_2686	<i>dctP</i>	Proteína de Transporte de C4-dicarboxilato	G	- 5,2	- 37,7	0,5	0

Continuação

p-ajustado ($\leq 0,05$).

TABELA 6. PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE CARBONO EM *H. seropedicae* COM BASE NOS DADOS DE RNA-seq COMPARANDO O MUTANTE $\Delta phaC1$ CONTRA A ESTIRPE SELVAGEM SmR1

LOCUS TAG	GENE	PROTEÍNA	COG	Continuação e conclusão			
				VARIÇÃO DA EXPRESSÃO		p-AJUSTADO	
				OD _{600nm} 0,4	OD _{600nm} 1,2	OD _{600nm} 0,4	OD _{600nm} 1,2
Hsero_2685	<i>dctQ</i>	Permease menor de transporte de C4-dicarboxilato	G	- 6,6	-70,3	0,5	5,84E-29
Hsero_2684	<i>dctM</i>	Permease maior de transporte de C4-dicarboxilato	G	-26,5	- 68,1	0,5	0
Hsero_2683	<i>mdcA</i>	Malonato descarboxilase subunidade α	I	- 44,6	- 91,8	0,5	6,38E-23
Hsero_2682	<i>accD</i>	Acetil-CoA carboxilase subunidade β	I	-24,9	- 59,6	0,5	0
Hsero_2681	<i>mdcC</i>	Malonato descarboxilase subunidade γ	I	- 2,3	- 270,1	0,7	0,01
Hsero_2680	<i>mdcG</i>	Fosforibosil difosfato-CoA transferase	I	-10,1	- 101,7	0,5	3,59E-13
Hsero_2679	<i>mdcB</i>	Trifosforibosil difosfato-CoA sintetase	H	- 7,8	- 569,1	0,5	1,4E-196
Hsero_2678	<i>fabD</i>	Malonil CoA-ACP transilase	I	- 118,3	- 136,0	0,4	1,69E-06
Hsero_2406	<i>fabI</i>	Enoil-ACP redutase dependente de NADH	I	- 227,6	- 9,8	0,3	0,04
Hsero_2567	<i>fadD</i>	Acil-CoA sintetase de cadeia longa	I	- 1,5	- 4,2	0,5	0,0001
Hsero_3634	<i>Hsero_3634</i>	Acil-CoA desidrogenase	I	- 2,1	- 2,0	0,2	0,03
Hsero_0239	<i>phbA2</i>	Acetil-CoA acetiltransferase (Tiolase)	I	- 2,2	-2,4	0,2	0,1

p-ajustado ($\leq 0,05$).

No mutante *phaC* de *P. putida*, foi observado que o aumento da taxa de síntese de acetil-CoA estava acompanhado com o aumento da expressão de genes do ciclo do ácido cítrico (ESCAPA *et al.*, 2012).

No transcriptoma do mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae*, os genes envolvidos com a síntese de tiamina pirofosfato (TPP) foram ativados, bem como os genes codificantes da citrato sintase, PDH e OGDHC (TABELA 6). Isto sugere que ocorra um processo semelhante ao de *R. eutropha* e *P. putida*. Aparentemente em *H. seropedicae*, o excesso de piruvato seria direcionado para a síntese de PHB, no entanto no mutante $\Delta phaC1$ devido à ausência de PHB, os carbonos do piruvato são acumulados no ciclo ácido cítrico (TCA). Para utilizar o excesso de piruvato na célula, o ciclo do TCA é acelerado através do aumento da expressão dos genes codificantes dos complexos PDH e OGDHC e da citrato sintase, bem como a expressão de genes envolvidos na síntese de TPP, que é cofator do PDH e OGDHC.

Acil-CoA transferases são responsáveis por transferir CoA de tioésteres-CoA para ácidos orgânicos (HEIDER, 2001). Raberg e colaboradores (2014) observaram um aumento da expressão de acil-CoA transferases no proteoma do mutante PHB-4 de *R. eutropha*, deficiente na síntese PHB. Os autores sugeriram que o aumento da expressão dessas proteínas indica que são necessárias reações transferências entre intermediários de ácidos orgânicos em resposta ausência de PHB. A ativação dos genes *caiB* e *Hsero_0039* (TABELA 6) sugere que estas reações de transferência também ocorram no mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae*.

As dimetilmenaquinonas metiltransferases, MenG2 e 3, catalisam a metilação do carbono durante a biossíntese de ubiquinona (Q) e menaquinona, vitamina K₂ (RASBERG *et al.*, 2014). Ambas as quinonas são componentes importantes da cadeia transportadora de elétrons (LEE *et al.*, 1997). A ativação dessas proteínas melhora a capacidade da cadeia transportadora de elétrons em assimilar equivalentes reduzidos do ciclo do ácido cítrico (RASBERG *et al.*, 2014). Em *H. seropedicae*, ativação de *menG* provavelmente contribui para o aumento da capacidade da cadeia respiratória assimilar equivalentes reduzidos.

O piruvato atua como efetor positivo e o acetil-CoA como efetor negativo do complexo PDH. Além disso, ao modular negativamente a oxidação do piruvato, o excesso de acetil-CoA desfavorece a via glicolítica e favorece a gluconeogênese (HOLNESS e SOGDEN, 2003). Em $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae* o gene *pckA* apresentou expressão diferencial aumentada. Este gene codifica a fosfoenolpiruvato carboxinase que catalisa a descarboxilação reversível do oxaloacetato a fosfoenolpiruvato e CO_2 , usando ATP ou GTP como fonte de fosfato (CHANG e LANE, 1966). Fosfoenolpiruvato pode ser utilizado como substrato na gluconeogênese. O gene *pgm* codifica a fosfoglucomutase que converte glucose-1-fosfato a glucose-6-fosfato, e é também importante na biossíntese da parede celular em bactérias (QUIAN *et al.*, 1994, LIU *et al.*, 1997). A expressão do gene *pgm* foi aumentada na estirpe $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae*, logo esta enzima poderia fornecer substrato para via glicolítica e, desse modo, ativando-a.

Em relação à via das pentoses fosfato (PPP), o gene *zwf* codifica para a enzima glicose-6P-desidrogenase, que catalisa oxidação da glucose-6-fosfato a 6-fosfoglucono- δ -lactona e NADPH (GLASER e BROWN, 1955). Sandoval e colaboradores (2011) observaram que o aumento da expressão de *zwf* resultou em maior produção dos compostos antioxidantes NADPH e GSH. Estes compostos reduzidos aliviaram o estresse causado por telurite (TeO_3^{2-}) em células de *E. coli*. A ativação do gene *zwf* observada no mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae* pode estar relacionada ao combate de EROs. O gene *rpe* codifica a enzima ribulose-5-fosfato-3-epimerase, que catalisa a isomerização da ribulose-5-fosfato a xilulose-5-fosfato (LYNGTADAAS *et al.*, 1995; GRANGER, 1995). Ativação de *rpe* no mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae* sugere que há uma maior provisão de xilulose-5-fosfato, que é substrato para a enzima transcetolase codificada por *tktA*. A transcetolase conecta a via das pentoses fosfato com a glicólise/gluconeogênese. Esta enzima catalisa a conversão da xilulose-5-fosfato e ribose-5-fosfato a gliceraldeído-3-fosfato e sedoheptulose-7-fosfato (NILSSON *et al.*, 1996). O gene *tktA* foi ativado no mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae*, bem como os genes envolvidos na síntese de TPP, que é cofator da transcetolase. Desse modo, ativação do gene *tktA* contribui para uma maior provisão de gliceraldeído-3-fosfato para a glicólise, etapas

consecutivas da via das pentoses fosfato, bem como de outras vias metabólicas. O gene *Hsero_4479* codifica para enzima gluconato 2-desidrogenase, uma proteína de membrana associada com a cadeia de transporte de elétrons, que catalisa a conversão do D-gluconato a 2-cetogluconato com redução do NADP⁺ a NADPH (MATSUSHITA *et al.*, 1982; TOYAMA *et al.*, 2007). A repressão do gene *Hsero_4479* na estirpe Δ *phaC1* pode ocasionar uma menor produção de NADPH para a bactéria.

Os genes envolvidos no transporte de ácidos dicarboxílicos (*dctM*, *dctQ* e *dctP*) estão localizados no operon *fabDmdcBGCaccDmdcAdctMQP*, que tem genes envolvidos com metabolismo de carboidratos e lipídeos. O sistema de transporte tripartido periplasmático independente de ATP (do inglês tripartite ATP-independent periplasmic, TRAP) é um sistema de absorção dependente do receptor de soluto extra-citoplasmático (do inglês extracytoplasmic solute receptor, ESR) não relacionado aos transportadores ABC. No TRAP, a força motora para o acúmulo de solutos é o gradiente eletroquímico de íons e não a hidrólise de ATP (KELLY e THOMAS, 2001). O primeiro transportador TRAP caracterizado foi o sistema de transporte de alta afinidade por C₄ dicarboxilato (Dct) em *Rhodobacter capsulatus* (FORWARD *et al.*, 1997). Os genes *dctPQM* codificam para 3 proteínas: DctP (ESR) e duas integrais de membrana DctQ (subunidade menor) e DctM (subunidade maior). Em *H. hispanica*, gene *HAH_3004*, que codifica o receptor do tipo TRAP, apresentou expressão diferencial aumentada no mutante Δ *phaEC* (LIU *et al.*, 2013). Em *R. eutropha*, o gene *H16_B2143*, que codifica o receptor do tipo TRAP, foi ativado no mutante PHB-4, bem como os genes *dctQ* e *H16_A1508*, que codifica um transportador tipo TRAP, que foram ativados. Esses resultados diferem dos dados de expressão dos genes *dctPQM* obtidos no mutante Δ *phaC1* de *H. seropedicae*. Sugerimos que alta razão C/N usada no cultivo de *R. eutropha* e *H. hispanica* possa ser um dos fatores que geraram essa diferença de expressão quando comparado com *H. seropedicae* que foi cultivado com uma razão intermediária de C/N. Outra hipótese seria que a expressão de *dctPQM* seja independente da síntese de PHB em *R. eutropha* e *H. hispanica*.

O complexo malonato descarboxilase é constituído de quatro proteínas: malonato descarboxilase subunidades α (MdcA), δ (MdcC), β (MdcD) e γ

(MdcE) e este complexo multienzimático catalisa a conversão do malonato mais H^+ a acetato e CO_2 (HOENKE *et al.*, 1997). Um *cluster* gênico de 9 kb que contém genes estruturais para malonato desidrogenase foi isolado de *Klebsiella pneumoniae* e sequenciado. Este *cluster* é constituído de 8 genes *mdcABCDEFGH* e do gene *mdcR* transcrito na direção oposta. MdcB e MdcG podem estar envolvidas na síntese e ligação do grupo prostético, 2'(5''-fosforibosil)-3'-difosfato-CoA. MdcH é similar a várias malonil-CoA:ACP-SH transacilases e provavelmente está envolvida na ativação da enzima por meio da modificação pós-traducional, malonilação. MdcF é uma proteína de membrana que pode funcionar como um carreador de malonato. MdcR que codifica para um regulador transcricional da família LysR (HOENKE *et al.*, 1997).

Em relação à síntese de lipídeos em *H. seropedicae*, temos um operon com 9 genes *fabDmdcBGCaccDmdcAdctMQP* e um gene transcrito na direção oposta ao operon, que codifica para um regulador transcricional da família GntR (PEDROSA *et al.*, 2011). *fabD* codifica a Malonil CoA-ACP transacilase, *mdcB* codifica a trifosforibosil difosfato-CoA sintetase, *mdcG* codifica a fosforibosil difosfato-CoA transferase, *accD* codifica a acetil-CoA carboxilase subunidade β . Todos os genes deste operon foram reprimidos no mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae*, bem como *fabI*, que codifica a enzima enoil-ACP redutase dependente de NADH. Em relação à degradação de lipídeos temos *fadD* que codifica a acil-CoA sintetase de cadeia longa, *Hsero_3634* que codifica acil-CoA desidrogenase e *phbA2* que codifica acetil-CoA acetiltransferase e que pode estar envolvida na biossíntese de PHB e β -oxidação de ácidos graxos (PEDROSA *et al.*, 2011). Estes genes foram reprimidos na estirpe $\Delta phaC1$.

Os resultados obtidos em ambos os transcriptomas do mutante $\Delta phaC1$ mostraram que o maior percentual de genes diferencialmente expressos distribuem-se nas categorias: função desconhecida, metabolismo e transporte de aminoácidos, função geral predita, transcrição e mecanismos de transdução de sinal. Possivelmente o aumento no número de genes diferencialmente expressos envolvidos com a transcrição deve-se que este processo está envolvido na manutenção e proteção do material genético, na síntese de RNA,

ribossomos e proteínas; a maior participação de genes envolvidos nos mecanismos de transdução de sinal é importante porque as bactérias têm de responder a uma diversidade de sinais internos e externos no ambiente aonde se encontram, bem como a natureza dessa resposta e os mecanismos utilizados pelo microrganismo para uma adequada resposta; a maior expressão de genes envolvidos no metabolismo e transporte de aminoácidos em ambos os transcriptomas, provavelmente deve-se à grande importância metabólica desta categoria funcional, à regulação do fluxo de aminoácidos entre as células e o meio extracelular, ao uso de aminoácidos na síntese de novas proteínas, à β -oxidação de aminoácidos com fins energéticos e à transformação em compostos não proteicos de importância fisiológica (glutamina e α -cetoglutarato). Função desconhecida foi a categoria funcional do COG que apresentou o maior número de genes diferencialmente expressos, isto proporciona várias possibilidades para elucidar a função das proteínas codificadas por estes genes.

Em relação ao metabolismo de PHB em *H. seropedicae*, os dados dos transcriptomas 1 e 2 mostraram que genes *phaC1*, 2 e 3 foram reprimidos no mutante Δ *phaC1*. O gene *phaC4* não foi diferencialmente expresso em ambos transcriptomas. Análise *in silico* mostrou que a proteína PhaC4 não apresenta o motivo lipase e nem a tríade catalítica que são características inerentes das PHA sintases citadas na literatura. Além disso, esta proteína apresenta um domínio de função desconhecida (DUF3141) presente em depolimerases. Estas observações indicam que PhaC4 não seja uma PHA sintase.

Foi demonstrado que a deleção de *phaC1* afeta negativamente a transcrição dos genes *phaC2* e *phaC3* e, por conseguinte, impede a síntese PHB. Este resultado sugere que *phaC1* seja a principal PHA sintase de *H. seropedicae*. Os genes *phaP1* e *phaP2*, que codificam proteínas estruturais importantes na formação dos grânulos de PHA, também foram reprimidos no mutante Δ *phaC1* e isto sugere que a organização estrutural dos grânulos de PHB está afetada e é a causa da ausência de grânulos. A ausência das fasinas no duplo mutante Δ *phaP12* impediu a formação de grânulos de PHB em *H. seropedicae* (ALVES, 2014). O gene *phaZ1* apresentou expressão diferencial diminuída no mutante Δ *phaC1* em ambos os transcriptomas. Possivelmente, a

deleção de *phaC1* afeta negativamente a expressão de *phaZ1* ou a expressão deste gene é dependente da síntese de PHB. No transcriptoma 1, o gene *phaZ2* foi ativado em Δ *phaC1*. Este resultado sugere que este gene exerça outra função que não seja mobilização dos grânulos de PHB.

Como mostrado na tabela 5 os genes codificantes de proteínas associadas aos grânulos de PHB em *H. seropedicae* não foram diferencialmente expressos em ambos os transcriptomas.

Em relação à expressão de genes envolvidos no metabolismo de carbono, *caiB* e *Hsero_0039* foram ativados na estirpe Δ *phaC1*, este dado sugere que as reações de transferências de CoA a partir de CoA-tioésteres para ácidos orgânicos são necessárias. Possivelmente o acetoacetil-CoA, precursor de PHB, acumula no mutante Δ *phaC1* de *H. seropedicae*, a transferência do CoA do acetoacetil-CoA para o succinato e reduz a concentração de acetoacetil-CoA neste mutante. Os genes *aceE*, *aceF*, *gltA* e *lpdA* apresentaram expressões diferenciais aumentadas no mutante Δ *phaC1* e estes resultados sugerem que o fluxo do ciclo do ácido cítrico (TCA) está acelerado para reduzir a concentração de piruvato e acetil-CoA que acumula em Δ *phaC1*. Os genes do operon *thiCGDE* envolvidos na síntese de tiamina pirofato (TPP) também estão ativados no mutante. O TPP, que é o cofator dos complexos piruvato e 2-oxoglutarato desidrogenase, reforça a ativação do TCA. Outro gene também ativado no mutante é *menG*, que está envolvido na biossíntese ubiquinona. Possivelmente a ativação de *menG* contribui para o aumento da capacidade da cadeia transportadora de elétrons de assimilar equivalentes reduzidos nesta estirpe.

A via das pentoses fosfato é importante para manter a homeostase do metabolismo de carbono, fornecer precursores para a biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos e moléculas redutoras para as reações de biossíntese, e combater o estresse oxidativo (STICONE *et al.*, 2014). Os genes *zwf*, *rpe*, *tktA* foram ativados, nas fases log e estacionária, no mutante Δ *phaC1* de *H. seropedicae*. O aumento da expressão do gene *zwf* neste contribui para a geração de NADPH, que auxilia no combate ao estresse oxidativo e nas reações biossintéticas. O gene *rpe*, que codifica a ribulose-5-fosfato-3-epimerase, gera xilulose-5-fosfato que é substrato da transcetolase, que é

codificada pelo gene *tktA*. A Ativação do gene *tktA* no mutante $\Delta phaC1$ sugere que ocorre uma aumento na provisão dos produtos gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato gerados pela transcetolase. Estes produtos conectam a via das pentoses fosfato com via glicolítica bem como a gluconeogênese.

A repressão dos genes do operon *dctPQM* envolvido transporte de ácidos dicarboxílicos sugere que o transporte destes ácidos está afetado em $\Delta phaC1$. A baixa transcrição dos genes envolvidos na biossíntese bem como na β -oxidação de ácidos graxos sugere que o mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae* é deficiente no metabolismo de lipídeos.

6. CONCLUSÕES

1 – No genoma de *H. seropedicae* SmR1 foram anotados quatro genes codificadores de PHA sintases. No entanto, dados de análise *in silico* demonstraram que apenas três enzimas estão classificadas de acordo com o proposto na literatura: PhaC1_{Hs} e PhaC2_{Hs} (sintases de classe I) e PhaC3_{Hs} (sintase de classe III).

2 - PhaC4_{Hs} não pode ser classificada como PHA sintase, por não apresentar os requisitos necessários para a classificação, ou seja, os resíduos conservados que compõem a tríade catalítica e nem o motivo conservado lipase box [GXCXG]. Além disso, a análise de transcrição por RNA-seq realizada em condições normais de oxigênio mostrou que o gene *phaC4* não foi diferencialmente expresso.

3 – A expressão do gene *phaC2* está diminuída na estirpe Δ *phaC1*, em relação a estirpe selvagem SmR1. Os genes *phaC1*, *phaC3* e *phaC4* apresentam expressão dependente do crescimento bacteriano, em níveis normais de oxigênio.

5 - Os genes *phaC2*, *phaC3* e *phaC4* não foram capazes de compensar ausência do gene *phaC1*. Além disso, não temos evidência da participação das proteínas PhaC3 e PhaC4 na síntese de PHB. Sugerimos então que a proteína PhaC1 é a principal responsável pela síntese de PHB *H. seropedicae*.

6 - Nas estirpes SmR1 e Δ *phaC1* e em condição de microaerofilia, o nível de expressão do gene *phaC2* foi maior do que em alta concentração de oxigênio atmosférico (20,8%).

7 – A deleção dos genes *phaP12*, codificadores de fasinias, não afeta a expressão dos genes *phaC* em *H. seropedicae* SmR1.

8 - A expressão dos *phaC* em *H. seropedicae* SmR1 não está sujeita à regulação negativa pela proteína PhaR.

9 – Somente a expressão do gene *phaC2* é dependente de Fnr em *H. seropedicae*.

10 - Os genes codificantes de proteínas encontradas associadas aos grânulos de PHB não apresentaram expressão diferencial em *H. seropedicae* estirpes Smr1 e Δ *phaC1*.

11 – A expressão diferencial diminuída dos genes *fnr1* e *fixN* na estirpe Δ *phaC1* decorre, possivelmente, do fato desta estirpe produzir, continuamente, espécies reativas de oxigênio (EROs) que afetam o grupamento Fe-S presente em metaloproteínas. Aparentemente o peróxido de hidrogênio exerce somente efeito bacteriostático no crescimento de ambas as estirpes SmR1 e Δ *phaC1*, uma vez que ambas recuperaram a capacidade de crescimento possivelmente após remoção enzimática ou química desta espécie reativa de oxigênio (ERO). A estirpe Δ *phaC1* foi mais sensível ao metilviologênio, que é um gerador de superóxido, do que SmR1 indicando que outra ERO está envolvida no estresse oxidativo em *H. seropedicae*.

12 – O mutante Δ *phaC1* apresentou maior produção de EROs do que SmR1 e isto afeta a capacidade da fixação biológica de nitrogênio deste mutante, como observado através da baixa atividade da enzima nitrogenase.

13 – PHB em *H. seropedicae* provavelmente funcione como um ciclo que pode estocar carbono e oxidar NADPH na síntese e, liberar carbono e reduzir NAD⁺ na degradação.

14 – Os genes codificantes de proteínas encontradas associadas aos grânulos de PHB em *H. seropedicae* não apresentaram expressão diferencial nas estirpes.

15 – O ciclo do ácido cítrico está bastante ativo no mutante $\Delta phaC1$, pois os genes *aceE*, *aceF*, *gltA* e *lpdA* que codificam enzimas deste ciclo apresentaram expressão diferencial aumentada na fases exponencial e estacionária. Os genes do operon *thiCGDE* foram ativados na fase estacionária em $\Delta phaC1$, que estão envolvidos na biossíntese de tiamina pirofosfato, que é o cofator dos complexos piruvato e 2-oxoglutarato desidrogenase.

16 – Os genes *zwf*, *rpe* e *tktA* foram ativados no mutante $\Delta phaC1$ de *H. seropedicae*, principalmente na fase estacionária. O gene *zwf* codifica a glucose-6P-desidrogenase que catalisa a conversão da glucose-6-fosfato a 6-fosfoglucono- δ -lactona com liberação de NADPH e atua nas reações biossintéticas e no combate ao estresse oxidativo. O gene *rpe* codifica a ribulose-5-fosfato-3-epimerase que fornece substrato para a reação catalisada pela transcetolase, que é codificada pelo gene *tktA*. Os produtos das reações catalisadas pela transcetolase, gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fostato, conectam a via das pentoses fosfato à glicólise.

17 – O operon *fabDmdcBGCaccDmdcAdctMQP* está envolvido no transporte de ácidos carboxílicos e na biossíntese de ácidos graxos em *H. seropedicae*. No mutante $\Delta phaC1$, os genes deste operon foram reprimidos nas fases exponencial e estacionária, bem como os genes envolvidos na β -oxidação de ácidos graxos *fadD*, *Hsero_3634* e *phbA2*. Estes resultados sugerem que o mutante $\Delta phaC1$ seja deficiente no transporte de ácidos dicarboxílicos e metabolismo de ácidos graxos.

7. LITERATURA CITADA

ALVES, L. P. S. **Influência das fasinas PhaP1 e PhaP2 de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 no acúmulo de grânulos de polihidroxi butirato**. 2014. 28 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

AMARA, A. A., REHM, B. A. Replacement of the catalytic nucleophile cysteine-296 by serine in class II polyhydroxyalkanoate synthase from *Pseudomonas aeruginosa*-mediated synthesis of a new polyester: identification of catalytic residues. **Biochemical Journal**. v. 374, p. 413-421, 2003.

AMOR, S. R., RAYMENT, T., SANDERS, J. K. M. Poly (3-hydroxybutyrate) in vivo: NMR and X-ray characterization of the elastomeric state. **Macromolecules**. v. 24, p. 4583–4588, 1991.

ANDERSON, A. J., DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**. v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990.

ANEJA, P., ZACHERTOWSKA, A., CHARLES, T. C. Comparison of the symbiotic and competition phenotypes of *Sinorhizobium meliloti* PHB synthesis and degradation pathway mutants. **Can J Microbiol**. v. 51, n. 7, p. 599-604, 2005.

ARJUNAN, P., NEMERIA, N., BRUNSKILL, A., CHANDRASEKHAR, K., SAX, M., YAN, Y., JORDAN, F., GUEST, J. R., FUREY W. Structure of the Pyruvate Dehydrogenase Multienzyme Complex E1 Component from *Escherichia coli* at 1.85 Å Resolution. **Biochemistry**. v. 41, p. 5213-5221, 2002.

AYUB, N.D., TRIBELLI, P.M., LÓPEZ, N.I. Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. **Extremophiles**. v. 13, p. 59-66, 2009.

BABEL, W. Peculiarities of methylotrophs concerning overflow metabolism, especially the synthesis of polyhydroxyalkanoates. **FEMS Microbiol Lett**. v. 103, p.141–148, 1992.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a new root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.

BALLARD, D. G. H.; HOLMES, P. A.; SENIOR, P. J. In: **Recent advances in mechanistic and synthesis aspects of polymerization**. FONTANILLE, M.; GUYOT, A. Lancaster, U.K.: Reidel (Kluwer), v. 215, p. 293-314, 1987.

BATISTA, M. B. **CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES DE *Herbaspirillum seropedicae* NOS GENES *fnr1*, *fnr2* e *fnr3***. 2011. 40-41 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BATISTA, M. B., SFEIR, M. Z. T., FAORO, H., WASSEM, R., STEFFENS, M. B. R., PEDROSA, F. O., SOUSA, E. M, DIXON, R., MONTEIRO, R. A. The *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 Fnr orthologs controls the cytochrome composition of the electron transport chain. **Sci Rep**. v. 3, p, 2544, 2013.

BEEBY, M.; CHO, M.; STUBBE, J.; JENSEN, G. J. Growth and localization of Polyhydroxybutyrate granules in *Ralstonia eutropha*. **Journal of Bacteriology**. v.194, n. 5, p. 1092-1099, 2012.

BERGER, E.; RAMSAY, B. A.; RAMSAY, J. A.; C. CHAVARIE, C.; BRAUNEGG, G. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. **Biotechnology Techniques**. v. 3, n. 4, p. 227-232, 1989.

BLAUWKAMP, T. A., NINFA, A. J. Antagonism of PII signalling by the AmtB protein of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol**. v. 48, n. 4, p. 1017-1028, 2003.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**. v. 65, p. 127-161, 1998.

BULEN, W. A., LECOMTE, J. R. The Nitrogenase System of *Azotobacter*: twoenzyme requirement for N₂ reduction, ATP-dependent H₂ evolution and ATP hidrolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 56, p. 979-986, 1966.

BYROM, D. (1994). Polyhydroxyalkanoates, In: Mobley DP (ed) **Plastic from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors**. Hanser Munich, pp. 5-33.

CATALÁN, A. I.; FERREIRA, F.; GILL, P. R.; BATISTA, S. Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources na on lactose when engineered to express the *lacZlacY* genes. **Enzyme and Microbial Technology**. v .20, p. 1352-1357, 2007.

CATONE, M. V., RUIZ, J. A., CASTELLANOS, M., SEGURA, D., ESPIN, G., *et al.* High Polyhydroxybutyrate Production in *Pseudomonas extremaustralis* Is Associated with Differential Expression of Horizontally Acquired and Core Genome Polyhydroxyalkanoate Synthase Genes. **PLoS ONE**. v. 9, n.6, p. e98873, 2014.

CEVALLOS, M. A., ENCARNACION, S., LEIJA, A., MORA, Y., MORA, J. Genetic and Physiological Characterization of a *Rhizobium etli* Mutant Strain Unable To Synthesize Poly-b-Hydroxybutyrate. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**. v. 178, n. 6, p. 1646–1654, 1996.

CHANG, H., LANES, M. D. The Enzymatic Carboxylation of Phosphoenolpyruvate II. PURIFICATION AND PROPERTIES OF LIVER MITOCHONDRIAL PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXY KINASE. **J. Biol Chem**. 241, n. 10, p. 2413-2420, 1966.

CHO, M.; BRIGHAM, C. J.; SINSKEY, A. J.; STUBBE, J. Purification of Polyhydroxybutyrate Synthase from Its Native Organism, *Ralstonia eutropha*: Implications for the Initiation and Elongation of Polymer Formation in Vivo. **Biochemistry**. v. 51, n. 11, p. 2276-2288, 2012.

CHUBATSU, L. S., MONTEIRO, R. A., SOUZA, E. M. OLIVEIRA., M. A. S., YATES, M. G., WASSEN, R., BONATTO, A. C., HUERGO., L. F., STEFFENS, M. B. R., RIGO, L. U., PEDROSA, F. O. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**. v. 356, n. 1-2, p. 197-207. 2012.

CHUNG, C.T., NIEMELA, S.L., MILLER, R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 86, p. 2172-5, 1989.

CORRÊA, H. L. R. **METABOLISMO DE POLIHIDROXIBUTIRATO EM *Herbaspirillum Seropedicae***. 2014. 33-71 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014

CRACK, J., GREEN, J., THOMSON, A. Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). **J Biol Chem**. v. 279, p. 9278–9286, 2003.

D'AUTRÉAUX, B., TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 8, n. 10, p 813-824, 2007.

De ALMEIDA, A., CATONE, M. V., RHODIUS V. A., GROSS, C. A., PETTINARI, M. J. Unexpected Stress-Reducing Effect of PhaP, a Poly(3-Hydroxybutyrate) Granule-Associated Protein, in *Escherichia coli*. **A. Environ Microbiol**. v. 77, n. 18, p. 6622–6629, 2011.

De EUGENIO L. I., ESCAPA I. F., MORALES, V., DINJASKI, N., GALÁN, B., GARCÍA, J. L., PRIETO, M. A. The Turnover of medium-chain length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance. **Environ. Microbiol**. v. 12, n. 1, 207-21, 2010.

De EUGENIO L. I., GALÁN B., ESCAPA, I. F., MAESTRO, B., SANZ, J. M., GARCÍA, J. L., PIETRO, M. A. The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the PHA genes Polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442. **Environ. Microbiol**. v. 12, n. 6, p. 1591-603, 2010.

DE KOK, A., HENGEVELD, A. F., MARTIN, A., WESTPHAL, A. H. The pyruvate dehydrogenase multi-enzyme complex from Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1385, p. 353-366,1998.

DE SMET, M. J.; EGGINK, G.; WITHOLT, B.; KINGMA, J.; WYNBERG, H. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. **Journal of Bacteriology**. v. 154, p. 870–878, 1983.

DIXON, R. A., KAHN, D. Genetic regulation of nitrogen fixation. **Nature Rev.** v. 2, p. 621 – 631, 2004.

DOI, Y.; KAWAGUCHI, Y.; KOYAMA, N.; NAKAMURA, S.; HIRAMITSU, M.; YOSHIDA, Y.; KIMURA, U. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 103, p. 103-108, 1992.

ESCAPA, I. F.; GARCÍA, J. L.; BÜHLER, B.; BLANK, L. M.; PRIETO, M. A. The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*. **Environmental Microbiology**. v. 14, n. 1, 2012.

FIEDLER, S.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B. H. A. The role of the fatty acid beta-oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: molecular characterization of the fadBA operon from *P. oleovorans* and of the enoyl-CoA hydratase genes *phaJ* from *P. oleovorans* and *Pseudomonas putida*. **Archives of Microbiology**. v. 178, p. 149-160, 2002.

FISCHER, H., BRUDERER, T., HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the *Bradirhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. **Nucleic Acids Res.** v. 16 p. 2207e2224, 1988.

FISCHER, H., FRITSCH, S., HERZOG, B., HENNEK, H.. Critical spacing between two essential cysteine residues in the interdomain linker of the *Bradirhizobium japonicum* NifA protein. **FEBS Lett.** v. 225, p. 167-171, 1989.

FLEISCHHACKER, A. S., KILEY, P. J. Iron-containing transcription factors and their roles as sensors. **Curr Opin Chem Biol.** v.15, n. 2, p. 335–341, 2011.

FORWARD, J. A., BEHRENDT, M. C., WYBORN, N. R., CROSS, R., KELLY, D. J. TRAP Transporters: a New Family of Periplasmic Solute Transport Systems Encoded by the *dctPQM* Genes of *Rhodobacter capsulatus*

and by Homologs in Diverse Gram-Negative Bacteria. **J. Bacteriol.** v. 179, n. 17, p. 5482–5493, 1997.

FUKUI, T., CHOU, K., HARADA, K., ORITA I., NAKAYAMA, Y., BAMBA, T., NAKAMURA, S., FUKUSAKI, E. Metabolite profiles of polyhydroxyalkanoate-producing *Ralstonia eutropha* H16. **Metabolomics.** v. 10, n. 2, p 190-202, 2014.

FUKUI, T.; DOI, Y. Cloning and analysis of the Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. **Journal of Bacteriology.** v. 179, p. 4821–4830, 1997.

GALÁN, B.; DINJASKI, N.; MAESTRO, B.; De EUGENIO, L. I.; ESCAPA, I. F.; SANZ, J. M.; GARCÍA, J. L.; PRIETO, M. A. Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. **Molecular Microbiology.** v. 79, n. 2, p. 402-418, 2011.

GERNGROSS, T. U., MARTIN, D. P. Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(-)-3-hydroxybutyrate]: Formation of macroscopic granules in vitro (molecular weight control of polymers/substrate specificity of polyhydroxyalkanoate synthase/CoA-requiring enzymes/non-template derived polymerases). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 92, p. 6279-6283, 1995.

GERNGROSS, T. U.; SNELL, K. D.; PEOPLES, O. P.; SINSKEY, A. J.; CSUHAI, E.; MASAMUNE, S.; STUBBE, J. Overexpression and purification of the soluble polyhydroxyalkanoate synthase from *Alcaligenes eutrophus*: evidence for a required posttranslational modification for catalytic activity. **Biochemistry.** v. 33, p. 9311–9320, 1994.

GLASER, L., BROWN, D.H. Purification and properties of *D*-glucose-6-phosphate dehydrogenase. **J. Biol. Chem.** v. 216, n. 1, p. 67–79, 1955.

GREEN, J., CRACK, J. C., THOMSON, A. J., LeBRUN, N. E. Bacterial sensors of oxygen. **Current Opinion in Microbiology.** v.12, p. 145–151, 2009.

GRIEBEL, R., SMITH, Z., MERRICK, J. M. Metabolism of poly (β -hydroxybutyrate). I. Purification, composition, and properties of native poly (β -hydroxybutyrate) granules from *Bacillus megaterium*. **Biochemistry.** v. 7, n. 10, p. 3676-3681, 1968.

GUNSALUS, R.P. Control of electron flow in *Escherichia coli* : coordinated transcription of respiratory pathway genes. **J Bacteriol.** v. 174: 7069–7074, 1992.

HAGEMAN, R. V., BURRIS, R. H. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.** v. 75, p. 2699–2702, 1978.

HAN, J., LU, Q., ZHOU, L., ZHOU, J., XIANG, H. Molecular Characterization of the phaECHm Genes, Required for Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) in the Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula marismortui*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 73, p. 6058-65, 2007.

HAUF, W., SCHLEBUSCH, M., HÜGE J., KOPKA J., HAGEMANN, M., FORCHHAMMER, K. Metabolic Changes in *Synechocystis* PCC6803 upon Nitrogen-Starvation: Excess NADPH Sustains Polyhydroxybutyrate Accumulation. **Metabolites.** V., 3, n. 1, 101-18, 2013.

HAYWWOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; CHU, L.; DAWES, E. A. The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus* **FEMS Microbiol. Lett.** v. 52, n. 3, p. 259-264, 1988.

HECKMAN, K. L., PEASE, L. R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. **Nat Protoc.** n. 2, p. 924-932, 2007.

HEIDER J. A new family of CoA-transferases. **FEBS Lett** . v. 509, p.345–349, 2001.

HISANO, T.; KASUYA, K.; TEZUKA, Y.; ISHII, N.; KOBAYASHI, T.; SHIRAKI, M.; OROUDJEV, E.; HANSMA, H.; IWATA, T.; DOI, Y.; SAITO, T.; MIKI, K. The Crystal Structure of Polyhydroxybutyrate Depolymerase from *Penicillium funiculosum* Provides Insights into the Recognition and Degradation of Biopolyesters. **Journal of Molecular Biology**, 2006; 356: 993–1004.

HOENKE, S., SCHMID, M., DIMROTH, P. Sequence of a gene cluster from *Klebsiella pneumonia* encoding malonate decarboxylase and expression of the enzyme in *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem.** v. 246, p. 530-538, 1997.

HOLNESS, M. J., M.C. SUGDEN. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. **Biochemical Society Transactions.** v. 31, p. 1143-1151, 2003.

HUANG, A. H. C. Oil bodies and oleosins in seeds. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.** v. 43, p. 177–200, 1992..

HUIJBERTS, G. N. M.; WAL, H.; WILKINSON, C.; EGGINK, G. Gas-chromatographic analysis of poly(3-hydroxyalkanoates) in bacteria. **Biotechnology Techniques.** v. 8, n. 3, p.187-192, 1994.

IMLAY, J. A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Ann. Rev. Biochem.** v. 77, p. 755-776, 2008.

JAMES, E. K., GYANESHWAR, P.; MATHAN, P. N.; BARRAQUIO, W. L.; REDDY, P. M.; IANNETTA, P. P.; OLIVARES, F. L.; LADHA, J K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interaction.** v. 15, p. 894–906, 2002.

JAMES, E. K.; OLIVARES F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences.** v. 17, p. 77-119, 1998.

JENDROSSEK, D.; HANDRICK, R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. **Annual Review of Microbiology.** v. 56, p. 403–432, 2002.

JENDROSSEK, D., HERMAWAN, S., SUBEDI, B., PAPAGEORGIOU, A. C. Biochemical analysis and structure determination of *Paucimonas lemoignei* poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZ7 mutants reveal the PHB binding site and details of substrate–enzyme interactions. **Mol Microbiol.** v. 90, n. 3, p. 649–664, 2013.

JENDROSSEK, D. Transfer of [*Pseudomonas*] *lemoignei*, a gram-negative rod with restricted catabolic capacity, to *Paucimonas* gen. nov. with one species,

Paucimonas lemoignei comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p. 905–908, 2001.

JIA, Y.; KAPPOCK, T.J.; FRICK, T.; SINSKEY, A.J.; STUBBE, J. Lipases Provide a new mechanistic model for polyhydroxybutyrate (PHB) synthases: characterization of the functional residues in *Chromatium Vinosum* PHB Synthase. **Biochemistry**. v. 39, p.3927-3936, 2000.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxid. Redox Signal**. v. 8, p. 1865-79, 2006.

JURASEK, L.; MARCHESSAULT, R. H. Polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* cells: a computer simulation. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 64, p. 611–617, 2004.

KADOURI, D., JURKEVITCH, E., OKON, Y. Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 31, p. 55–67, 2005.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the reserve material Poly- β -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 6, p. 3244-325, 2003.

KADOWAKI, M.A.; MÜLLER-SANTOS, M.; REGO, F.G.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; MONTEIRO, R.A.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S.; STEFFENS, M.B. Identification and characterization of PhbF: A DNA binding protein with regulatory role in the PHB metabolism of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **BMC Microbiology**. v. 11, p. 230, 2011.

KADOWAKI, M. A. S. **Análise estrutural das proteínas PhbF, PhbP1 e HFQ de *Herbaspirillum seropedicae***. 2012. 96-103 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

KELLY, D. J., THOMAS, G. H. The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 25, p. 405-424, 2001.

KESSLER, B.; WESTHUIS, R.; WITHOLT, B.; EGGINK, G. Production of microbial polyesters: fermentation and downstream processes. In: W. Babel, A. STEINBÜCHEL, (Eds.), *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology: Biopolyesters*, Vol. 71, Springer, Berlin, 2001, pp. 159-182.

KLASSEN, G; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 43, p. 887–891, 1997.

KÖRNER, H., SOFIA, H. J., ZUMFT, W. G. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 27, p. 559-92, 2003.

LANGENBACH, S., REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Functional expression of the PHA synthase gene PhaC1 from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly (3-hydroxyalkanoate) synthesis. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 150, p. 303–309, 1997.

LEES, H.; POSTGATE, J. R. The behaviour of *Azotobacter chroococcum* in oxygen- and phosphate limited chemostat culture. **Journal of General Microbiology**. v. 75, p. 161-166, 1973.

LEE, P. T., HSU, A. Y., HA, H. T., CLARKE, C. F. A C-Methyltransferase Involved in Both Ubiquinone and Menaquinone Biosynthesis: Isolation and Identification of the *Escherichia coli* *ubiE* Gene. **J. Bacteriol.** v. 179, n. 5, p. 1748–1754, 1997.

LEMOIGNE, M. Produits de deshydratation et de polymerisation de l'acide b-oxobutyrique. **Bulletin de la Société de Chimie Biologique**. v. 8, p. 770-782, 1926.

LENFANT, N., HOTELIER, T., VELLUET, E., BOURNE, Y., MARCHOT, P.CHATONNET, A. ESTHER, the database of the a/b-hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. **Nucleic Acids Research.**, v. 41, p. D423-429, 2013.

LIEBERGESELL, M.; REHALKAR, S.; STEINBÜCHEL, A. Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular

characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Chromatium vinosum* enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 54, p. 186–194, 2000.

LIEBERGESELL, M.; STEINBÜCHEL, A. Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of polyhydroxyalkanoic acid in *Chromatium vinosum* strain D. **European Journal of Biochemistry**. v. 209, p. 135-150, 1992.

LYNGSTADAAS, A., LØBNER-OLESEN, A., BOYE, E. Characterization of three genes in the dam-containing operon of *Escherichia coli*. **Mol Gen Genet**. v. 247, p. 546-554, 1995.

LIU, H., LUO, Y., HAN, J., WU, J., WU, Z., FENG, D., CAI, S., LI, M., LIU, J., ZHOU, J., XIANG, H. Proteome reference map of *Haloarcula hispanica* and comparative proteomic and transcriptomic analysis of polyhydroxyalkanoate biosynthesis under genetic and environmental perturbations. **J. Proteome Res**. v. 12:1300-1315, 2013.

LIU, Y., RAY-JR W.J., BARANIDHARAN, S. Structure of Rabbit Muscle Phosphoglucomutase Refined at 2.4 Å Resolution. **Acta Cryst D**. v. 53, p. 392-405, 1997.

MATSUSAKI, H.; MANJI, S.; TAGUCHI, K.; KATO, M.; FUKUI, T.; DOI, Y. Cloning and molecular analysis of the Poly (3-hydroxybutyrate) and Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61–63. **Journal of Bacteriology**. v. 180, p. 6459–6467, 1998.

McCOOL, G. J.; CANNON, M. C. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. **Journal of Bacteriology**. v. 183, n. 3, p. 4235–4243, 2001.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of Poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbial and Molecular Biology Reviews**. v. 63, n. 1, p. 21-53, 1999.

MAEHARA, A.; TAGUCHI, S.; NISHIYAMA, T.; YAMANE, T.; DOI, Y. A Repressor protein, PhaR, regulates Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA. **Journal of Bacteriology**. v. 184, n. 14, p. 3992-4002, 2002.

MAEHARA, A.; UEDA, S.; NAKANO, H.; YAMANE, T. Analyses of a polyhydroxyalkanoic acid granule-associated 16-kilodalton protein and its putative regulator in the pha locus of *Paracoccus denitrificans*. **Journal of Bacteriology**. v. 181, p. 2914-2921, 1999.

MANCHAK, J.; PAGE, W.J. Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. **Microbiology**. v. 140, p. 953-963, 1994.

MANDON, K.; MICHEL-REYDELLET, N.; ENCARNACIÓN, S.; KAMINSKI, P. A.; LEIJA, A.; CEVALLOS, M.; ELMERICH, C.; MORA, J. Poly- β -Hydroxybutyrate turnover in *Azorhizobium caulinodans* is required for growth and affects *nifA* expression. **Journal of Bacteriology**. v. 180, n. 19, p.1070-1076, 1998.

MATSUSHITA K., SHINAGAWA E., AMEYAMA M. D-Gluconate Dehydrogenase from Bacteria, 2- D-Gluconate Dehydrogenase from Bacteria, 2-Keto-D-gluconate-Yielding, Membrane-Bound. **Methods in enzymology**. v.89, p. 187-193, 1982.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiological Reviews**. v. 66, n. 4, p. 604-622, 1995.

MESA, S., HAUSER, F., FRIBERG, M., MALAGUTI, E., FISCHER, H. M., HENNECKE, H. Comprehensive assessment of the regulons controlled by the FixLJ-FixK2-FixK1 cascade in *Bradyrhizobium japonicum*. **J. Bacteriol.** v. 190, p.6568-6579, 2008.

MEZZINA, M. P., WETZLER, D. E., CATONE, M. V., BUCCI, H., DI PAOLA, M., et al. A Phasin with Many Faces: Structural Insights on PhaP from *Azotobacter* sp. FA8. **PLoS ONE**. v. 9, n. 7, p. e103012, 2014.

MIFUNE, J., NAKAMURA, S., FUKUI, T. (Targeted engineering of *Cupriavidus necator* chromosome for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from vegetable oil. **Can J Chem**. v. 86, p. 621–627, 2008.

MILLER J. H. **Experiments in Molecular Genetics**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1972.

MILNE, J. L. S., WU, X., BORGNIA, M. J., LENGYEL J. S., BROOKS B. R., SHI D., PERHAM R. N., SUBRAMANIAM, S. Molecular Structure of a 9-MDa Icosahedral Pyruvate Dehydrogenase Subcomplex Containing the E2 and E3 Enzymes Using Cryoelectron Microscopy. **J. Biol. Chem.** v. 281, n. 7, p. 4364–4370, February 17, 2006.

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

MÜNCH, R.; HILLER, K.; GROTE, A.; SCHEER, M.; KLEIN, J.; SCHOBERT, M.; JAHN, D. Virtual Footprinting and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. **Bioinformatics.** v. 21, p. 4187-4189, 2005.

NELSON *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. **Environ. Microbiol.** v. 4 n.12:799–808, 2002.

NEUMANN, L., SPINOZZI, F., SINIBALDI, R., RUSTICHELLI F., PÖTTER, M., STEINBÜCHEL, A. Binding of the Major Phasin, PhaP1, from *Ralstonia eutropha* H16 to Poly(3-Hydroxybutyrate) Granules. **J. Bacteriol.** v. 190, n. 8, p. 2911–2919. 2008

NIKEL, P. I., PETTINARI, M. J., GALVAGNO, M. A., MÉNDEZ, B. S. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by recombinant *Escherichia coli arcA* mutants in microaerobiosis. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 72, p. 2614-2620, 2006.

NILSSON, U., MESHALKINA, L., LINDQVIST, Y., SCHNEIDER, G. Examination of Substrate Binding in Thiamin Diphosphate dependent Transketolase by Protein Crystallography and Site-directed Mutagenesis. **J. Biol. Chem.** v. 272, n. 3, p. 1864–1869, 1997.

NINFA, A.J., ATKINSON, M. R. PII signal transduction proteins. **Trends Microbiol.** v. 8, p. 172–179, 2000.

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

OBST, M., STEINBÜCHEL, A. Cyanophycin – an ideal bacterial nitrogen storage material with unique chemical properties. **Microbiology Monographs**. v. 1, p. 167-193, 2006.

OJUMU, T.V., YU, J., SOLOMON, B.O. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. **African Journal of Biotechnology**. v. 3, n. 1, p. 18-24, 2004.

OKSTAD, O. A., HEGNA I., LINDBAECK T., RISHOVD A. L., KOLSTO A. B. Genome organization is not conserved between *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. **Microbiology**. v. 145, p. 621-631, 1999.

OLIVEIRA, M. A. S., BAURA, V. A., AQUINO, B., HUERGO, L. F., KADOWAKI, M. A. S., CHUBATSU, L. S., SOUZA, E. M., DIXON, R., PEDROSA, F. O., WASSEM, R., MONTEIRO, R. A. Role of conserved cysteine residues in *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity. **Res. Microbiol.** v. 160, p. 389-395, 2009.

OLLIS, D. L., CHEAH, E., CYGLER M., DIJKSTRA, B., FROLOW, F., FRANKEN, S. M., HAREL, M., REMINGTON, S. J., SILMAN, I., SCHRAG, J., SUSSMAN, J. L., VERSCHUEREN K. H.G., GOLDMAN A. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Eng.** v. 5, p. 197-211, 1992.

PEDROSA, F. O. *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **Plos Genetics**. v. 7, n. 5, e1002064, 2011.

PEDROSA, F. O., TEIXEIRA, K. R. S., MACHADO, M. P., STEFFENS, M. B. R., KLASSEN, G., BENELLI, E. M., MACHADO, H. B., FUNAYAMA, S., RIGO, L. U., ISHIDA, M. L., YATES, M. G., SOUZA E. M. STRUCTURAL ORGANIZATION AND REGULATION OF THE *nif* GENES OF *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil. Bio. Biochem.** v. 29, n., p.843-846, 1997.

PEOPLES, O. P.; SINSKEY, A. J. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). **J. Biol. Chem.** v. 264, p.15298–15303, 1989.

PESSI, G., AHRENS, C. H., REHRAUER, H., LINDEMANN, A., HAUSER, F., FISCHER, H. M., HENNECKE, H. 2007. Genome-wide transcript analysis of

Bradyrhizobium japonicum bacteroids in soybean root nodules. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 20, p.1353–1363, 2007.

PFEIFER, D.; JENDROSSEK, D. Interaction between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins as revealed by two-hybrid analysis and identification of a new phasin in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology.** v. 187, p. 2795-2807, 2011.

PFEIFFER, D., JENDROSSEK, D. Localization of Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Granule-Associated Proteins during PHB Granule Formation and Identification of Two New Phasins, PhaP6 and PhaP7, in *Ralstonia eutropha* H16. **J. Bacteriol.** v. 194, p. 5909-5921, 2012.

PLOUX, O.; MASAMUNE, S.; WALSH, C. T. The NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductase from *Zoogloea ramigera*. Characterization and mechanistic studies of the cloned enzyme over-produced in *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem.** v. 174, p. 77–182, 1988.

POHLMANN, A., FRICKE, W. F., REINECKE F., KUSIAN B., LIESEGANG H., CRAMM R., EITINGER T., EWERING C., PÖTTER M., SCHWARTZ, E., STRITTMATTER A., VOB I., GOTTSCHALK G, STEINBÜCHEL A., FRIEDRICH B., BOWIEN B. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. **Nature Biotechnology.** v. 24, p. 1257–1262, 2006.

POTTER, M.; MADKOUR, M.H.; MAYER, F.; STEINBÜCHEL, A. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology.** v. 148, p. 2413-2426, 2002.

PÖTTER, M.; MÜLLER, H.; REINECKE, F.; WIECZOREK, R.; FRICKE, F.; BOWIEN, B.; FRIEDRICH, B.; STEINBÜCHEL, A. The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. **Microbiology.** v. 150, p. 2301-2311, 2004.

POTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Poly (3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly (3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation. **Biomacromolecules.** v. 6, p. 552-560, 2005.

PRIETO, M. A., BÜHLER, B., JUNG, K., WITHOLT B., KESSLER B. PhaF, a Polyhydroxyalkanoate-Granule-Associated Protein of *Pseudomonas oleovorans*

GPo1 Involved in the Regulatory Expression System for *pha* Genes. **J. Bacteriol.** v. 181, n. 3, p. 858–868, 1999.

QI, Q.; REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene PhaC2 from *Pseudomonas aeruginosa* : comparison of PhaC1 and PhaC2. **FEMS Microbiology Letters.** v. 157, p. 155-162, 1997.

QIAN, N. Y., STANLEY, G. A., HAHN-HAGERDAL, B., RADSTROM, P. Purification and Characterization of Two Phosphoglucomutases from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and Their Regulation in Maltose- and Glucose-Utilizing Cells. **J. Bacteriol.** v. 176, n. 17, p. 5304-5311, 1994.

QUELAS, J. I., MONGIARDINI, E. J., PÉREZ-GIMÉNEZ, J., PARISI, G., LODEIRO, A. R. Analysis of two polyhydroxyalkanoate synthases in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. **J. Bacteriol.** 195: 3145-3155, 2013.

RABERG, M., VOIGT, B., HECKER, M., STEINBÜCHEL, A. A Closer Look on the Polyhydroxybutyrate- (PHB-) Negative Phenotype of *Ralstonia eutropha* PHB-4. **PLoS ONE.** v. 9, n. 5, p. e95907, 2014.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI, V. C. K. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology.** v. 87, p 137-146, 2003.

REGO, F. G. M., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L. S., YATES, M. G., WASSEM,R., STEFFENS, M. B. R., RIGO, L. U., SOUZA, E. M. The expression of *nifB* from *Herbaspirillum seropedicae* is dependent upon the NifA and RpoN proteins. **Can J Microbiol.** v. 52, n. 12, p. 1199 -1207, 2006.

REHM, B. H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochem. Journal.** v. 376, p. 15-33, 2003.

REHM, B. H. A. Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self assembly: The key role of polyester synthases. **Biotechnology Letters.** v. 28, n. 4, p. 207-213, 2006.

REHM, B. H. A. Biogenesis of Microbial Polyhydroxyalkanoate Granules: a Platform Technology for the Production of Tailor-made Bioparticles. **Current Issues in Molecular Biology.** v. 9, p. 41-62, 2007.

REHM, B. H. A.; ANTONIO, R. V.; SPIEKERMANN, P.; AMARA, A. A.; STEINBÜCHEL, A. Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: in vitro evolution, site-specific mutagenesis and development of a PHB synthase protein model. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1594, 178–190, 2002.

REHM, B. H. A.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The phaG gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme a transferase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 273, p. 24044-24051, 1998.

REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 25, n. 3, p. 3–19, 1999.

REN, Q.; de ROO, G.; RUTH, K.; WITHOLT, B.; ZINN, M.; THÖNY-MEYER, L. Simultaneous accumulation and degradation of polyhydroxyalkanoates: futile cycle or clever regulation? **Biomacromolecules**. v. 10, p. 916-922, 2009.

ROMANOV, V. I.; FEDULOVA, N. G.; TCHERMENSKAYA, I. E.; SHARAMKO, V. I.; MOLCHANOV, M. I.; KRETOVICH, W. L. Metabolism of poly- β -hydroxybutyric acid in bacteroids of *Rhizobium lupini* in connection with nitrogen fixation and photosynthesis. **Plant Soil**. v. 56, n. 3, p. 379-390, 1980.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. **Symbiosis**, v.35, p.261-270, 2003.

ROUWS, L. F. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; HEMERLY, A. S.; BALDANI, J. I. Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. **Archives in Microbiology**. v.189, p. 397-405, 2008.

RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M. A.; BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**. v. 16, p. 944-945, 2000.

SACOMBOIO, E. N. M. **ESTUDO DA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 E MUTANTE *nrC* EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E RELAÇÕES CARBONO/NITROGÊNIO**. 2014. 33-71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SANDOVAL, J. M., ARENAS, F. A., VASQUEZ, C. C. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Protects *Escherichia coli* from Tellurite-Mediated Oxidative Stress. **PLoS ONE**. v. 6, n. 9, p. e25573, 2011.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 74, p. 5463-5467, 1977.

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

SAWERS, R. G. Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** v. 5, p. 1469-81, 1991.

SCHAFFER, A.; TAUCH, A.; JÄGER, W.; KALINOWSKI, J.; THIERBACH, G.; PÜHLER, A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. **Gene**. v. 145, p. 60-73, 1994.

SENIOR, P. J., DAWES, E. A. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Axotobacter beijerinckii*. **Biochemical Journal**. v. 134, p. 225-238, 1973.

SIMON, R.; PRIEFFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. **BioTechnology**, v. 1, p. 784-791, 1983.

SLATER, S.; GALLAHER, T.; DENNIS, D. Production of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 58, p.1089–1094, 1992.

SLATER, S. C., VOIGE, W. H.; DENNIS, D. E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. **Journal of Bacteriology**. v. 170, p. 4431–4436, 1988.

SZNAJDER, A., PFEIFFER, D., JENDROSSEK, D. Comparative Proteome Analysis Reveals Four Novel Polyhydroxybutyrate (PHB) Granule-Associated Proteins in *Ralstonia eutropha* H16. **Applied Environ Microbiol.** v. 81, n.5, p. 1847-1858, 2015.

SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., MACHADO, H. B., DRUMMOND, M., YATES, M.G. The N-terminus of the NifA protein of *H. seropedicae* is probably involved in sensing of ammonia. In: **Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications**. TIKHONOVICH, I.A.; NIKOLAI, A.P.; VASSILY, I.R.; WILLIAM, E.N. (eds.) X International Congress in Nitrogen Fixation. St. Petersburg, p. 260, 1995.

SPAINK, H. P.; OKKER, R. J. H.; WIJFFELMAN, C.A., PEES, E.; LUGTENBERG, B. J. J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRLIJ1. **Plant Molecular Biology**. v. 9, p. 27-39, 1987.

STEINBÜCHEL, A. **Polyhydroxyalkanoic acids**. In: Byrom D. (ed) Biomaterials: novel materials from biological sources. Stockton, New York, p. 124-213, 1991.

STEINBÜCHEL, A.; HEIN, S. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. v. 71, p. 81-123, 2001.

STEINBÜCHEL, A.; LÜTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**. v. 16, p. 81-96, 2003.

STEINBÜCHEL, A.; VALETIM, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Letters**. v. 128, p. 219-228, 1995.

STINCONE, A., PRIGIONE, A., CRAMER, T., WAMELINK, M. M., CAMPBELL, K., CHEUNG, E., OLIN-SANDOVAL V., GRÜNING, N., KRÜGER, A.,

TAUQEER, A. M., KELLER, M. A., BREITENBACH, M., BRINDLE, K. M., RABINOWITZ, J. D., RALSER, M. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. **Biol Rev Camb Philos Soc.** p.000-000, 2014

STUBBE, J.; TIAN, J. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase. **Natural Products Reports.** v. 20, p. 445–457, 2003.

STUBBE, J.; TIAN, J.; HE, A.; SINSKEY, A.J.; LAWRENCE, A.G.; LIU, P. Non template-dependent polymerization processes: Polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. **Annual Review of Biochemistry.** v. 74, p. 433-480, 2005.

SUN, J.; PENG, X.; VAN IMPE, J.; VANDERLEYDEN, J. The *ntxB* and *ntxC* genes are involved in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis by ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Journal of Bacteriology.** v. 66, n. 1, p. 113-117, 2000.

SUN, J., VAN DOMMELEN, A., VAN IMPE, J., VANDERLEYDEN JOS. Involvement of *glnB*, *glnZ*, and *glnD* Genes in the Regulation of Poly-3-Hydroxybutyrate Biosynthesis by Ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. **A. Environ Microbiol.** v. 68, n. 2, p. 985–988, 2002.

TATUSOV, R.L., KOONIN, E.V., LIPMAN, D.J. A genomic perspective on protein families. **Science.** v. 278, p. 631-7, 1997.

TIRAPELLE, E. F. **Caracterização molecular das fasinias e outras proteínas associadas aos grânulos de polihidroxibutirato em *Herbaspirillum seropedicae*.** 2012. 38-58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

TIRAPELLE E. F., MÜLLER-SANTOS M., TADRA-SFEIR M. Z., KADOWAKI M. A., STEFFENS M. B., MONTEIRO R. A., SOUZA E. M., PEDROSA F. O., CHUBATSU L. S. 2013. Identification of proteins associated with polyhydroxybutyrate granules from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 old partners, new players. **PLoS One.** 8:e75066.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research,** v. 11, p. 4673–4680, 1994.

TOYAMA, H., FURUYA N., SAICHANA, I., ANO, Y., ADACHI, O., MATSUSHITA, K. Membrane-Bound, 2-Keto-D-Gluconate-Yielding D-Gluconate Dehydrogenase from "*Gluconobacter dioxyacetonicus*" IFO 3271: Molecular Properties and Gene Disruption. **A Environ Microbiol.** v. 73, n. 2., p. 6551–6556, 2007.

TRIBELLI, P. M. **Influencia del regulador global Anr en la fisiología de *Pseudomonas extremaustralis*, una bacteria productora de polihidroxiбутирато.** 2011. 8-20 f. Tese (Doctorado en Química Biológica) Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 2011.

TRIBELLI, P. M., MÉNDEZ B. S., LÓPEZ, N. I. The oxygen sensitive global regulator, Anr, is involved in the biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate) in *Pseudomonas extremaustralis*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** v. 19, p.180-188, 2010.

UEDA, S.; YABUTANI, T.; MAEHARA, A.; YAMANE, T. Molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoate) synthase gene from a methylotrophic bacterium, *Paracoccus denitrificans*. **Journal of Bacteriology.** v. 178, N. 3, p. 774-779, 1996.

PANKIEVICZ, V. C., DO AMARAL, F. P., SANTOS, K. F., AGTUCA, B., XU, Y., SCHUELLER, M. J., ARISI, A. C., STEFFENS, M. B., DE SOUZA E. M., PEDROSA, F. O, STACEY, G., FERRIERI, R. A. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **Plant J.** 2015 Jan 28.

WANG, C.; SHENG, X.; EQUI, R. C.; TRAINER, M. A.; CHARLES, T. C., SOBRAL, B. W. S.. Influence of the Poly-3-Hydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins(PhaP1 and PhaP2) on PHB accumulation and symbiotic Nitrogen Fixation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. **Journal of Bacteriology.** v. 189, n. 24, p. 9050-9056, 2007.

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

WIECZOREK, R.; PRIES, A.; STEINBÜCHEL, A., MAYER, F. Analysis of a 24-kilodalton protein Associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology**. v. 177, p. 2425–2435, 1995.

YAN, Y., YANG, J., DOU, Y., CHEN, M., PING, S., PENG, J., LU, W., ZHANG, W., YAO, Z., LI, H., LIU, W., HE, S., GENG, L., ZHANG, X., YANG, F., YU, H., ZHAN, Y., LI, D., LIN, Z., WANG, Y., ELMERICH, C., LIN, M., JIN, Q. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A5101. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 105, n. 21, p. 7564-9, 2008.

YORK, G. M.; STUBBE, J.; SINSKEY, A. J. The *Ralstonia eutropha* PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production. **Journal of Bacteriology**. v. 184, n. 1, p. 59–66, 2002.

YUAN, W., JIA, Y., TIAN, J., SNELL, K. D., MUH, U., SINSKEY, A. J., LAMBALOT, R. H., WALSH, C. T., STUBBE, J. Class I and III polyhydroxyalkanoate synthases from *Ralstonia eutropha* and *Allochromatium vinosum*: characterization and substrate specificity studies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 394, 87–98, 2001.

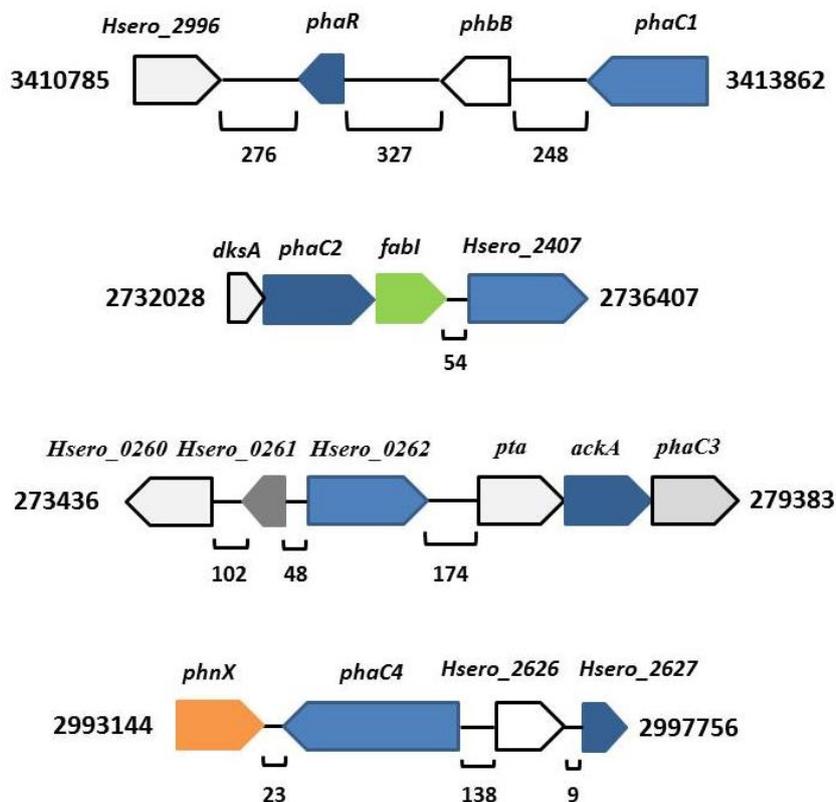
ZHANG, S., YASUO, T., LENS, R. W., GOODWIN, S. Kinetic and mechanistic characterization of the Polyhydroxybutyrate synthase from *Ralstonia eutropha*. **Biomacromolecules**. v. 1, n. 2, p. 244-251, 2000.

ZHANG, S., YASUO, T., LENS, R. W., GOODWIN, S. Mechanism of the polymerization reaction initiated and catalyzed by the Polyhydroxybutyrate synthase of *Ralstonia eutropha*. **Biomacromolecules**. v. 4, n. 3, p. 504-509, 2003.

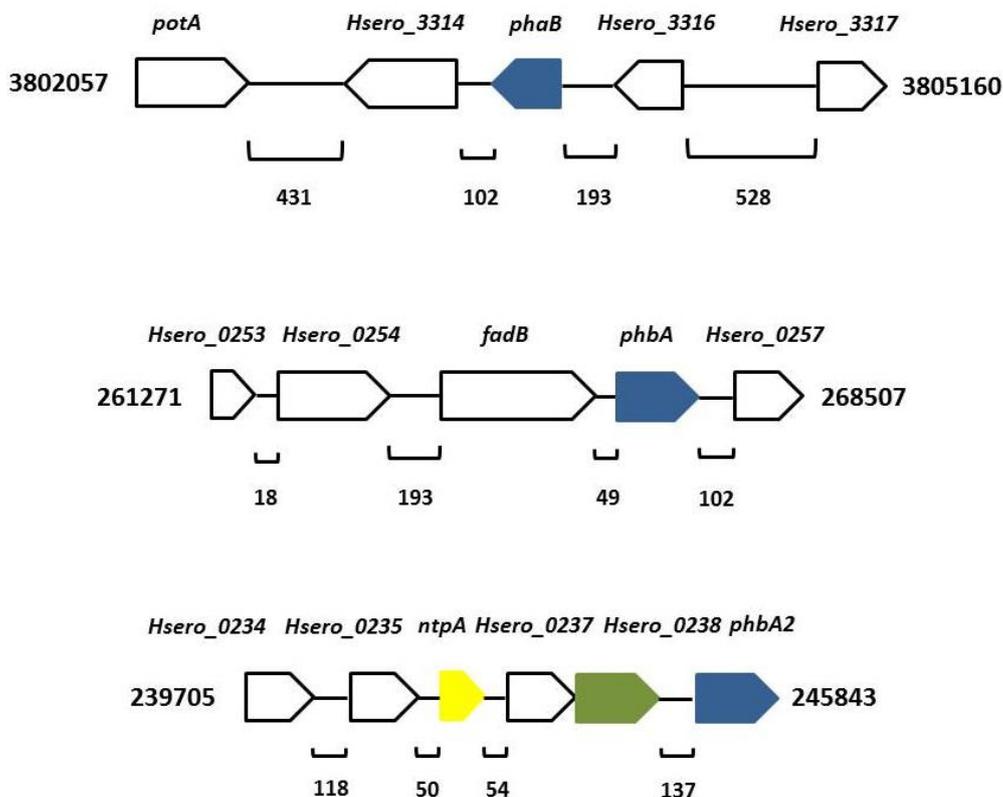
ZHAO, Y. H., LI, H. M., QIN, L. F., WANG, H. H., CHEN G. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. **FEMS Microbiol Lett**. v. 276, p. 34–4, 2007.

ZINN, M; WITHOLT, B., EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical applications of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Advances Drug Delivery Reviews**. v. 53, p. 5-21, 2001.

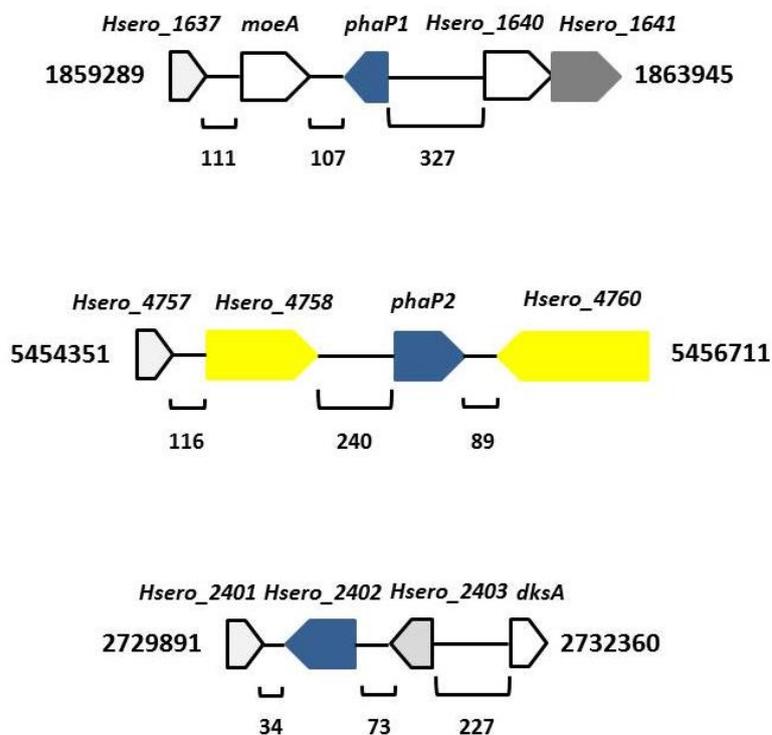
8. ANEXOS



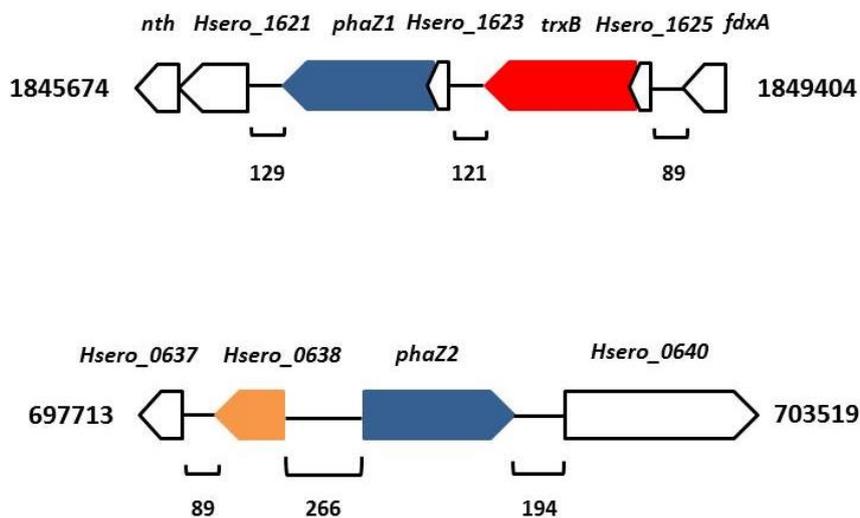
ANEXO 1. ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS GENES CODIFICANTES DAS PHA SINTASES ANOTADAS EM *H. seropedicae* E OUTROS GENES LOCALIZADOS À MONTANTE E À JUSANTE DOS GENES *phaCs*. As flechas coloridas representam os genes. Os colchetes representam as regiões intergênicas. Os números abaixo dos colchetes representam os valores em pares de base das regiões intergênicas. Os números à esquerda e à direita representam a posição dos genes no mapa genômico. Genes envolvidos no metabolismo de PHB em *H. seropedicae*: *phaC1* ou *Hsero_2999* (anteriormente *phbC1*), **PhaC1**; *phaC2* ou *Hsero_2405*, (anteriormente *phbC2*), **PhaC2**; *phaC3* ou *Hsero_0265* (anteriormente *phaC1*), **PhaC3**; *phaC4* ou *Hsero_2625* (anteriormente *phaC2*), **PhaC4**; *phaR* ou *Hsero_2997* (anteriormente *phbF*), Regulador transcricional **PhaR**; e *phbB* ou *Hsero_2998* (**PhbB**, Acetoacetil-CoA redutase).



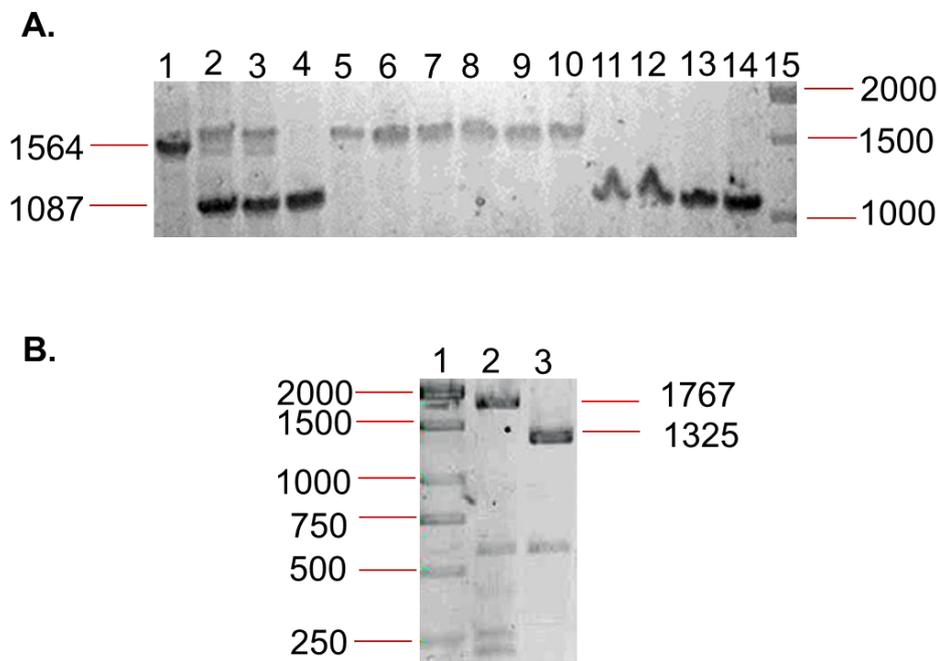
ANEXO 2. ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS GENES CODIFICANTES DAS PROTEÍNAS ACETIL-CoA ACETILTRANSFERASE E ACETOACETIL-CoA REDUTASE DE *H. seropedicae* E OUTROS GENES LOCALIZADOS À MONTANTE E À JUSANTE DOS GENES *phaCs*. As flechas coloridas representam os genes. Os colchetes representam as regiões intergênicas. Os números abaixo dos colchetes representam os valores em pares de base das regiões intergênicas. Os números à esquerda e à direita representam a posição dos genes no mapa genômico. Genes codificantes de fasinas de *H. seropedicae*: *phaB* ou *Hsero_3315* (**PhaB**, 3-cetoacil-ACP redutase), *phbA* ou *Hsero_0256* (**PhbA**, Acetil-CoA acetiltransferase) e *phbA2* ou *Hsero_0239* (**PhbA2**, Acetil-CoA acetiltransferase).



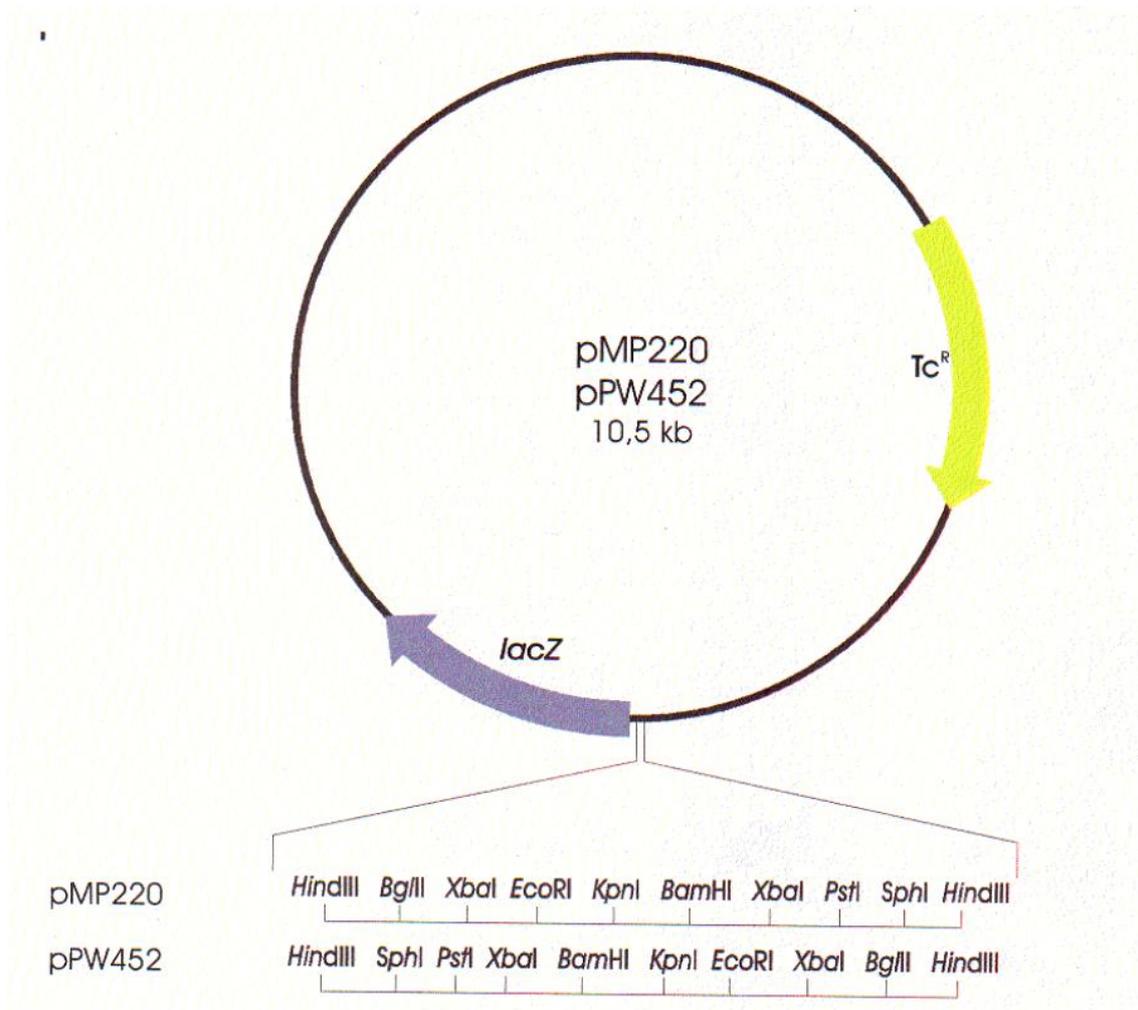
ANEXO 3. ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS GENES CODIFICANTES DAS PROTEÍNAS FASINAS DE *H. seropedicae* E OUTROS GENES LOCALIZADOS À MONTANTE E À JUSANTE DOS GENES *phaCs*. As flechas coloridas representam os genes. Os colchetes representam as regiões intergênicas. Os números abaixo dos colchetes representam os valores em pares de base das regiões intergênicas. Os números à esquerda e à direita representam a posição dos genes no mapa genômico Genes codificantes de fasinas de *H. seropedicae*: *phaP1* ou *Hsero_1639* (**PhaP1**, Fasina 1), *phaP2* ou *Hsero_4759* (**PhaP2**, Fasina 2) e *Hsero_2402* (fasina putativa, **PhaP3**).



ANEXO 4. ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS GENES CODIFICANTES DAS PROTEÍNAS DEPOLIMERASES DE *H. seropedicae* E OUTROS GENES LOCALIZADOS À MONTANTE E À JUSANTE DOS GENES *phaCs*. As flechas coloridas representam os genes. Os colchetes representam as regiões intergênicas. Os números abaixo dos colchetes representam os valores em pares de base das regiões intergênicas. Os números à esquerda e à direita a posição dos genes no mapa genômico. Genes codificantes das proteínas depolimerases (PhaZ) de *H. seropedicae*: *phaZ1* ou *Hsero_1622* (**PhaZ1**, Depolimerase 1), *phaZ2* ou *Hsero_0639* (**PhaZ2**, Depolimerase 2).



ANEXO 5. CONFIRMAÇÃO DA DELEÇÃO CROMOSSOMAL DO GENE *phaR* DE *H. seropedicae*. A) Eletroforese em gel de agarose 1%. Primers utilizados na PCR: Fw_ *phaR*_UP e Rer_ *phaR*_DOWN. Linha 1 – fragmento amplificado a partir de DNA genômico de *H. seropedicae* SmR1, linhas 2 e 3 – transconjugantes contendo as cópias íntegra e deletada do gene *phaR*, linha 4 – transconjugante com a cópia deletada do gene *phaR*, linhas 5 a 10 – transconjugantes com a cópia íntegra do gene *phaR*, linhas 11 a 14 – transconjugante com a cópia deletada do gene *phaR* e linha 15 - marcador 1 kb DNA Ladder (Fermentas). B) Eletroforese em gel de agarose 1%. Confirmação da deleção cromossomal do gene *phaR*. Primers utilizados na PCR: FO_ *phaR* e RO_ *phaR*. Linha 1 – Marcador 1 kb DNA Ladder (Fermentas), linha 2 - fragmento amplificado a partir de DNA genômico de *H. seropedicae* SmR1 e linha 3 – transconjugante com a cópia deletada do gene *phaR* (transconjugante 8 oriundo da confirmação do gel A, linha 11).



ANEXO 6. MAPA DOS VETORES pMP220 E pPW452. Os vetores apresentam o múltiplo sítio de clonagem à montante do gene *lacZ*. Estes plasmídeos conferem resistência à tetraciclina. FONTE: SPAINK *et al.*, 1987; WODLEY, PAUL.

ANEXO 7. CATEGORIAS FUNCIONAIS DO COG

CATEGORIAS DO COG	DESCRIÇÃO
PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DA INFORMAÇÃO	
J	Tradução, estrutura ribossomal e biogênese
A	Modificação e processamento de RNA
K	Transcrição
L	Replicação, recombinação e reparo
SINALIZAÇÃO E PROCESSOS CELULARES	
D	Controle do ciclo, da divisão celular e da partição de cromossomos
Y	Estrutura nuclear
V	Mecanismos de defesa
T	Mecanismos de transdução de sinal
M	Biogênese da membrana e das estruturas membranosas
N	Motilidade celular
Z	Citoesqueleto
W	Estruturas extracelulares
U	Tráfego intracelular, secreção e transporte de vesículas
O	Modificação pós-traducional, reposição de proteínas e chaperonas
METABOLISMO	
C	Produção e conversão de energia
G	Metabolismo e transporte de carboidratos
E	Metabolismo e transporte de aminoácidos
F	Metabolismo e transporte de nucleotídeos
H	Metabolismo e transporte de coenzimas
I	Metabolismo e transporte de lipídeos
P	Metabolismo e transporte de íons inorgânicos
Q	Biossíntese, transporte e Catabolismo de metabólitos secundários
NÃO CARACTERIZADOS	
R	Função geral predita
S	Função desconhecida

QUADRO 14. CATEGORIAS FUNCIONAIS DO COG. FONTE: ADAPTADO DE COG DATABASE (DISPONÍVEL EM: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/grace/fiew.cgi>>)