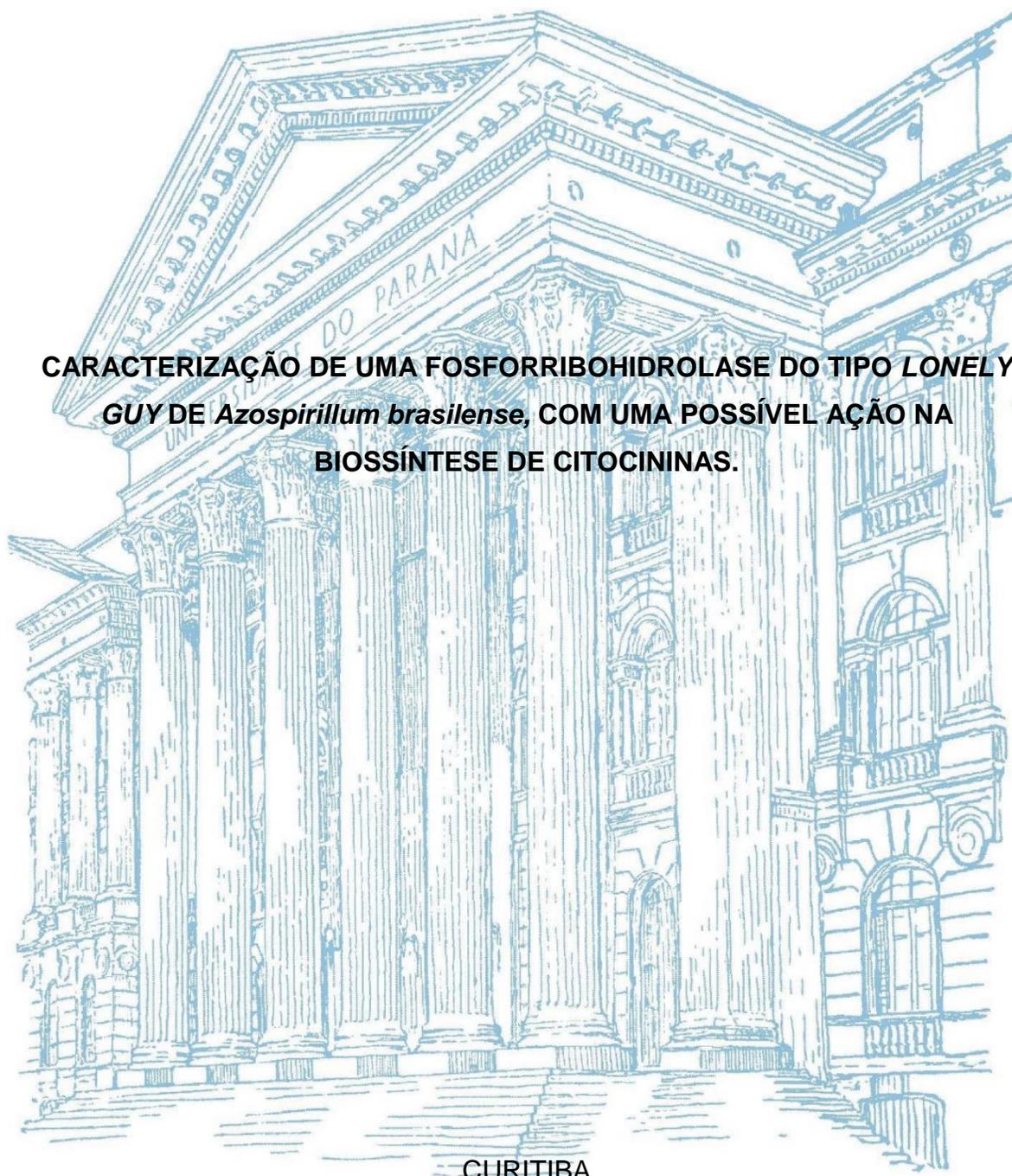


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABELA CAVALCANTE RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA FOSFORIBOHIDROLASE DO TIPO LONELY GUY DE *Azospirillum brasilense*, COM UMA POSSÍVEL AÇÃO NA BIOSÍNTESE DE CITOCININAS.**



CURITIBA

2017

ISABELA CAVALCANTE RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA FOSFORIBOHIDROLASE DO TIPO *LONELY GUY* DE *Azospirillum brasilense*, COM UMA POSSÍVEL AÇÃO NA BIOSÍNTESE DE CITOCININAS.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Bioquímica, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos.

CURITIBA

2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)  
Código CAPES: 40001016003P2

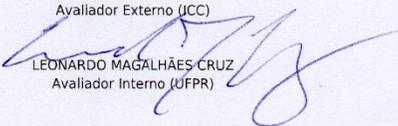
### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ISABELA CAVALCANTE RODRIGUES**, intitulada: "**CARACTERIZAÇÃO DE UMA FOSFORIBOHIDROLASE DO TIPO LONELY GUY DE *Azospirillum brasilense*, COM UMA POSSÍVEL AÇÃO NA BIOSÍNTESE DE CITOCININAS**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo Colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Setembro de 2017.

  
MARCELO MÜLLER DOS SANTOS  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
MELISSON FAORO  
Avaliador Externo (UCC)

  
LEONARDO MAGALHÃES CRUZ  
Avaliador Interno (UFPR)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda saúde e oportunidades que tem colocado no meu caminho;

Aos meus pais, que mesmo com a minha loucura de morar em outro local, sempre me incentivaram e me amaram, e que por mais distante que fosse, sempre que voltei para casa me receberam de braços abertos. Amo vocês e sempre serei grata pelos ensinamentos e principalmente por me criarem de uma forma maravilhosa.

A minha família que sempre me incentivou, em especial os meus sobrinhos maravilhosos, que apesar da distância a titia sempre vai amar vocês.

Ao meu orientador Marcelo Muller dos Santos, por toda colaboração, ajuda e ensinamento, obrigado por sempre estar presente de todas as formas.

A professora Rose Adele Monteiro, por aceitar a me orientar mesmo sem me conhecer e por confiar no meu trabalho.

Ao Dr. Marcelo Bueno Batista, sou muito grata por tudo o que me ensinou e me ajudou.

Aos técnicos do grupo de Fixação de Nitrogênio, Valter Baura, Lucinéia Martins e Rose Prado.

Ao professor Dr. Guilherme Sasaki e ao Dr. Arquimedes pela ajuda com a CCD e orcinol.

Aos Colegas e amigos do laboratório por toda ajuda, companheirismos e sugestões.

Aos amigos de Manaus que sempre me incentivaram em diversas formas, sempre estiveram ao meu lado e principalmente que acompanharam todas as minhas sagas e loucuras durante esses dois anos. Obrigado por me aguentarem sempre.

Ao Adonay e Marcos por toda convivência, histórias e risadas, obrigado por todos os momentos.

Aos criadores dos aplicativos de vídeo chamada, por me proporcionarem momentos de risos ao lado dos meus amigos, pais e sobrinhos <3.

Ao professor e amigo Edson do Carmo Junior por todo ensinamento e por sempre ter paciência comigo, desculpa pelas mensagens de desespero e obrigado por tudo e por todo incentivo.

Ao CNPq pela bolsa concedida para a realização desse trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Ciências (Bioquímica).

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram durante esses dois anos.

Gratidão pela vida, pelo amor que recebo e por toda energia. Gratidão pelas pessoas que conheci, pelos lugares que andei e por toda experiência que consegui viver.

"O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem".

**Guimarães Rosa (Grande Sertão Veredas)**

## RESUMO

O gene “LONELY GUY” (LOG) de *Arabidopsis thaliana* codifica uma das enzimas associadas à biossíntese de citocininas. As citocininas são fito-hormônios reguladores do crescimento e desenvolvimentos de plantas. Por meio de ferramentas de bioinformática foram encontrados dois genes homólogos a LOG de *Arabidopsis thaliana* no genoma de *Azospirillum brasilense* FP2. *A. brasilense* é uma bactéria associativa de plantas, fixadora de nitrogênio e promotora de crescimento vegetal. A produção de fito-hormônios, entre eles as citocininas, está ligada a capacidade de promover o crescimento vegetal através da inoculação com bactérias. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar as proteínas Log1 e Log2 de *A. brasilense*. Os genes *log1* e *log2* foram amplificados através de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os produtos de PCR foram clonados no plasmídeo pBlueScript II KS, sequenciados para confirmar a integridade da sequência de bases e subclonados nos plasmídeos pET28a e pET29a para expressão em *E. coli* BL21(DE3). As enzimas superexpressas com cauda de histidinas N-terminal ou C-terminal foram purificadas por cromatografia de afinidade a Ni<sup>2+</sup>. Os ensaios de atividade enzimática revelaram que ambas as enzimas possuem atividade fosforribosiltransferase, ou seja, clivam a ligação N-glicosídica entre a adenina e a fosforribose quando o AMP foi utilizado como substrato. Outros ensaios revelaram que a presença de fosfato ligado a posição 5' da ribose foi importante para a atividade das enzimas Log1 e Log2, já que não foi detectada atividade contra adenosina. A descoberta de enzimas homólogas as LOGs anteriormente descritas em plantas, tais como *A. thaliana*, contribuirá para o desenvolvimento de linhagens de bactérias que produzam quantidades elevadas de citocininas. Especificamente no caso de *A. brasilense* tal característica poderia ser utilizada para gerar estirpes mais eficientes no processo de promoção do crescimento vegetal.

Palavra-chave: Citocininas, *Azospirillum brasilense*, fosforribosiltransferases.

## ABSTRACT

The LONELY GUY gene (LOG) of *Arabidopsis thaliana* codes one of the enzymes associated with cytokinin biosynthesis. Cytokinins are phytohormones that regulate growth and development of plants. *Azospirillum brasilense* FP2 has two genes homologous to LOG of *A. thaliana* as revealed by genome searching through computational analysis with amino acid sequences of LOGs previously described. *A. brasilense* is a plant associate bacterium, nitrogen-fixing and plant growth promoter. The production of phytohormones, among them cytokinins, is linked to the ability to promote plant growth through inoculation with bacteria. Thus, the objective of this work was to characterise the *A. brasilense* Log1 and Log2 enzymes. The *log1* and *log2* genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were cloned into the plasmid pBlueScript II KS, sequenced to confirm their integrities and subcloned into plasmids pET28a and pET29a for expression in *E. coli* BL21 (DE3). The enzymes were over-expressed with an N-terminal or C-terminal six histidines-tag and were purified by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography. Enzyme activity assays revealed that both enzymes have phosphoribohydrolase activity since they cleave the N-glycosidic bond between adenine and phosphoribose when AMP was used as the substrate. Other assays showed that the presence of a phosphate group bound to the 5'-carbon of ribose was essential for the activity of Log1 and Log2 enzymes since they did not cleave adenosine. The discovery of homologous enzymes to the LOGs previously described in plants, such as *A. thaliana*, will contribute to the development of lineages of bacteria that produce high amounts of cytokinins. Specifically, in the case of *A. brasilense*, this characteristic could be used to generate more efficient strains in the process of promoting plant growth.

Keywords: Cytokinin, *Azospirillum brasilense*, phytohormones

**LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1.</b> VIA DE BIOSÍNTESE DE CITOCININAS.....	20
<b>FIGURA 2.</b> ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA ENZIMA CgLOG.....	24
<b>FIGURA 3.</b> SOBREPOSIÇÃO DE VÁRIAS ESTRUTURAS DE LOGs.....	25
<b>FIGURA 4.</b> ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE ENZIMAS LOG.....	43
<b>FIGURA 5.</b> ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUÍDA A PARTIR DO ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE LOGs DE MICRORGANISMOS E PLANTAS.....	44
<b>FIGURA 6.</b> AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>log1</i> E <i>log2</i> DE <i>A. brasilense</i> FP2.....	45
<b>FIGURA 7.</b> ESQUEMA DO VETOR DE CLONAGEM COM OS GENES DE INTERESSE.....	46
<b>FIGURA 8.</b> ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DOS CLONES DE <i>log1</i> E <i>log2</i> DE <i>A. brasilense</i> EM pBlueScript II KS.....	47
<b>FIGURA 9.</b> ESQUEMA DOS VETORES PARA EXPRESSÃO GÊNICA COM OS GENES DE INTERESSE.....	48
<b>FIGURA 10.</b> EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Log1 E Log2 DE <i>A. brasilense</i> FP2 EM <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	51
<b>FIGURA 11.</b> TESTE DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS Log1N, Log1C E Log2N EXPRESSAS EM <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	52
<b>FIGURA 12.</b> PERFIL DE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA LOG1N.....	54
<b>FIGURA 13.</b> PERFIL DE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA Log1C.....	55
<b>FIGURA 14.</b> PERFIL DE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA Log2N.....	56

<b>FIGURA 15.</b> CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA REAÇÃO DE Log1N CONTRA AMP.....	57
<b>FIGURA 16.</b> ENSAIO CINÉTICO DA ATIVIDADE FOSFORRIBOHIDROLASE Log1N E Log1C FRENTE AO AMP.....	58
<b>FIGURA 17.</b> ENSAIO DO pH NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS Log DE <i>A. brasilense</i> FP2 EXPRESSAS EM <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	59
<b>FIGURA 18.</b> TERMOESTABILIDADE DAS ENZIMAS Log DE <i>A. brasilense</i> FP2 EXPRESSAS EM <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	60
<b>FIGURA 19.</b> EFEITO DO NÚMERO DE FOSFATOS DO SUBSTRATO NA ATIVIDADE Log.....	61
<b>FIGURA 20.</b> ENSAIO ENZIMÁTICO DAS ENZIMAS Log DE <i>A. brasilense</i> FP2 EXPRESSAS EM <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	63
<b>FIGURA 21.</b> EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMP NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS Log DE <i>A. brasilense</i> FP2 EXPRESSAS EM <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	65
<b>FIGURA 22.</b> CCD DOS ENSAIOS DO EFEIO DO pH NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS Log.....	77

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1.</b> BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS DURANTE ESSE TRABALHO.....	28
<b>TABELA 2.</b> COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO UTILIZADO PARA <i>A. brasiliense</i> FP2.....	30
<b>TABELA 3.</b> LISTA DOS PRIMERS UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	32
<b>TABELA 4.</b> COMPOSIÇÃO DO GEL DE SEPARAÇÃO PARA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DESNATURANTE DE PROTEÍNAS.....	39
<b>TABELA 5.</b> COMPOSIÇÃO DO GEL DE EMPILHAMENTO PARA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS. ....	39
<b>TABELA 6.</b> SEQUÊNCIAS OBTIDAS NO NCBI UTILIZADAS NO ALINHAMENTO E NA CONSTRUÇÃO DA ARVORE FILOGENÉTICA.....	74

**LISTA DE ABREVIATURAS**

Abs: Absorvância

Amp: Ampicilina

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

ADP: Adenosina 5'-difosfato

AMP: Adenosina 5'-monofosfato

tZR: Trans zeatina ribosídeo

D.O.: Densidade ótica

CCD: Cromatografia em camada delgada

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

Km: Canamicina

pb: Pares de base

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PDP: Protein Data Bank

RNAse: Ribonuclease A

r.p.m: Rotações por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletrofose em gel desnaturante de poliacrilamida.

Tris: Tris hidroximetil-aminometano

UV: Ultravioleta

APS: persulfato de amônio

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina.

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Revisão Bibliográfica.....	16
2.1. Bactérias promotoras de crescimento vegetal.....	16
2.2. <i>Azospirillum brasilense</i> .....	17
2.3. Fito-Hormônios.....	17
2.4. Citocininas.....	18
2.5. Biossíntese de citocininas.....	19
2.5.1. Enzimas LONELY GUY (LOG).....	22
3. Objetivos.....	27
3.1. Objetivo geral.....	27
3.2. Objetivo específico.....	27
4. Material e Métodos.....	28
4.1. Bactérias e plasmídeos.....	28
4.2. Meios de cultivo utilizados.....	30
4.3. Manipulação de DNA.....	31
4.3.1. Desenho do primer.....	31
4.3.2. Amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR).....	32
4.3.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	32
4.3.4. Preparação de DNA plasmidial.....	33
4.3.5. Clivagem do DNA utilizando enzimas de restrição.....	34
4.3.6. Purificação de DNA a partir de bandas de gel de agarose.....	34
4.3.7. Reação de ligação de DNA.....	34
4.3.8. Preparo de <i>E. coli</i> quimiocompetente.....	35
4.3.9. Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	35
4.3.10. Sequenciamento de DNA.....	36
4.3.11. Subclonagem em vetor para expressão de proteínas.....	36
4.4. MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	36
4.4.1. Indução da expressão de proteínas Log em <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	36
4.4.2. 4.4.2 Lise de <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	37

4.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante (SDS-PAGE) .....	37
4.4.4. Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade a Ni <sup>2+</sup> .....	38
4.4.5. Desalting das proteínas purificadas.....	39
4.4.6. Quantificação da concentração de proteínas pelo método de Bradford.....	40
4.4.7. Ensaio de atividade fosforribosidrolase.....	40
4.4.8. Ensaio cinético de atividade fosforribosidrolase.....	40
4.4.9. Termoestabilidade das enzimas Log.....	41
4.4.10. Efeito do pH e da temperatura na atividade Log.....	41
4.4.11. Especificidade ao substrato.....	41
5. Resultados e Discussão.....	42
5.1. Análise de sequências de LOGs de microrganismos e plantas.....	42
5.2. Clonagem dos genes <i>log1</i> e <i>log2</i> de <i>A. brasilense</i> FP2.....	45
5.3. Superexpressão dos genes <i>log</i> de <i>A. brasilense</i> em <i>E. coli</i> .....	50
5.4. Purificação das proteínas Log de <i>A. brasilense</i> superexpressas em <i>E. coli</i> .....	52
5.5. Ensaio de atividade fosforribosidrolase.....	57
6. Conclusão.....	66
Referências bibliográficas.....	67
Anexo.....	74

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, em todo o mundo há o desejo de se avançar na produção sustentável de energia, combustíveis, materiais e produtos químicos (Almquist et al., 2014; Barton et al., 2015). Além disso, é necessário considerar que para a sustentabilidade ser atingida, a atividade agrícola precisa igualmente se adequar a novas tecnologias menos poluentes. Esta tendência tem resultado no avanço de estudos e na aplicação de bactérias promotoras de crescimento vegetal, que podem em muitos casos reduzir eficientemente a carga de fertilizantes químicos adicionados no solo e promover o crescimento vegetal de forma satisfatória (Palmer and Wingfield, 2004). A produção de alguns fito-hormônios é considerada uma das propriedades chave para o sucesso das bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPRs, do inglês *plant growth promoting rhizobacteria*) (Ahmed and Hasnain, 2014; Hauf et al., 2013). De fato, algumas bactérias produzem citocininas e as utilizam principalmente como um sinal químico de comunicação com a planta ou como uma ferramenta para invadir a planta hospedeira. O primeiro gene biossintético de citocinina, *tmr*, foi identificado na bactéria patogênica indutora de tumor em plantas, *Agrobacterium tumefaciens* (Tribelli et al., 2013). A estrutura molecular de outra proteína IPT (isopentenil transferase) desta bactéria, codificada pelo gene *tzs*, foi recentemente determinada (Tribelli et al., 2012). Apesar de vários exemplos mostrarem que a síntese de citocininas está associada à patogenicidade em bactérias associadas a plantas (Kakimoto, 2003), há também vários exemplos de interações benéficas entre plantas e bactérias produtoras de citocininas (Cassan et al., 2014; Conrad et al., 1992; Cortes-Jimenez et al., 2014; Costacurta and Vanderleyden, 1995; Esquivel-Cote et al., 2010; Hussain and Hasnain, 2011; Liu et al., 2013; Sahoo et al., 2014a; Spaepen et al., 2009; Timmusk et al., 1999). A bactéria *Azospirillum brasilense*, uma bactéria com reconhecida capacidade de promoção de crescimento vegetal (Kamnev et al., 1996), produz citocininas em diversas condições de cultivo (Kansiz et al., 2000). Sugere-se que boa parte do efeito promotor de crescimento desta bactéria seja causada pela produção de fito-hormônios, como a trans-zeatina, já que o efeito promotor ainda é observado em

mutantes *nif* que são incapazes de fixar nitrogênio e de transferi-lo para a planta. A fixação de nitrogênio gasoso em amônio via nitrogenase também é uma das características biofertilizantes de *A. brasilense*. Entretanto, os níveis gerais de produção endógena de citocininas em bactérias oscilam entre concentrações de pg/mL para µg/mL, que não são suficientes para se desenvolver um processo de obtenção e purificação em larga escala.

Uma solução possível para se aumentar a produção de citocininas em *A. brasilense* é caracterizar os genes envolvidos na biossíntese de citocininas e posteriormente modificar a bactéria para superexpressá-los ou ainda os transferir para outros organismos. Nesse contexto, esse trabalho de mestrado tratou da caracterização de duas fosforibohidrolases de *A. brasilense* (Log1 e Log2) homólogas as enzimas LOG (*Lonely guy*) de *Arabidopsis thaliana* já caracterizadas experimentalmente.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) compreendem um grupo de bactérias da rizosfera de plantas que favorecem o crescimento e o desenvolvimento da planta hospedeira (Timmusk et al., 2017). Muitas bactérias PGPR também estimulam o desenvolvimento vegetal através da fixação de nitrogênio e transferência de moléculas para o hospedeiro (Geddes et al., 2015).

Dentre as PGPR descritas, encontram-se espécies dos gêneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*, entre outros (Weller e Tomashow 1994; Glick 1995). O uso de fertilizantes nitrogenados é empregado mundialmente, englobando grandes áreas de plantio (Bhardwaj et al., 2014). Entretanto a fertilização química está associada há um alto custo econômico e risco ambiental, devido a contaminação de recursos aquíferos, elevando o teor de nitrogênio, e a propagação de gases de efeito estufa, por exemplo, pela produção

de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) (Thomson et al., 2012). O emprego de biofertilizantes baseados em PGPR torna-se uma alternativa viável e sustentável frente a fertilização química com vantagens econômicas e ambientais (Mus et al., 2016).

## **2.2. *Azospirillum brasilense***

*Azospirillum brasilense* é uma  $\alpha$ -proteobactéria de vida livre, gram-negativa, encontrada na rizosfera de plantas entre elas gramíneas de interesse comercial, tais como milho e arroz (de Souza et al., 2015). Vem sido relatado diversas melhorias fisiológicas das plantas quando inoculadas com *Azospirillum*, como aumento no tamanho das plantas (Cassan et. al. 2008).

*Azospirillum brasilense* pode estimular o crescimento vegetal através da capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e também pela produção de fito-hormônios (Cassán et al., 2011; Pankievicz et al., 2015). Em culturas de *A. brasilense* foram detectadas a produção de vários fito-hormônios entre eles, citocininas (Tien et al., 1979), giberelinas (Bottini et al., 1989), ácido salicílico (Sahoo et al., 2014b) e auxinas (Spaepen et al., 2007) que são importantes para o desenvolvimento da planta. Diversos estudos revelam o aumento cerca de 30% na produtividade de gramíneas de interesse comercial e também (Dobbelaere et al. 2001). O uso de bactérias como *A. brasilense* pode garantir aumento na produtividade, além de ter um baixo custo e pode diminuir o uso de fertilização química.

## **2.3. FITO-HORMÔNIOS**

Os fito-hormônios são moléculas que controlam o crescimento vegetal. Por isso, também podem ser denominadas de substâncias de crescimento vegetal. Os fito-hormônios são produzidos em baixas concentrações e podem agir localmente ou sistemicamente em um vegetal (Trewavas e Cleland, 1983). Essas moléculas dão forma às plantas, afetam o crescimento das sementes, o tempo de floração, o sexo das flores, a senescência das folhas e o amadurecimento dos frutos. Além disso, direcionam o crescimento dos tecidos no sentido para cima e para baixo, a

formação de folhas, o crescimento do caule, a longevidade das plantas e também sua morte. Em suma, os fito-hormônios são vitais para o crescimento e desenvolvimento adequado das plantas e, sem a produção dessas moléculas, as plantas seriam massas de células indiferenciadas sem a capacidade de cumprir diversos processos biológicos como conhecemos atualmente.

Os principais fito-hormônios são: auxinas, giberelinas, ácido abscísico (ABA), citocininas e etileno. Além dessas classes principais existem outros fito-hormônios tais como, brassinoesteróides, ácido salicílico, jasmonatos, peptídeos, poliaminas, óxido nítrico e estrigolactonas. Na sequência, será dada ênfase as citocininas por serem objeto desse estudo.

## 2.4. CITOCININAS

Citocininas formam uma classe de fitohormônios que estimulam a divisão celular e atuam na regulação de diversos processos da planta como a senescência das folhas, dominância apical, proliferação da raiz, filotaxia, competência reprodutiva, sinalização nutricional, manutenção do meristema, modulação do metabolismo, diferenciação celular, tolerância ao stress e a patógenos e morfogênese em resposta a estímulos do ambiente (Hirose et al., 2008; Kuroha et al., 2009; Zurcher et al., 2016). As citocininas podem ser produzidas por síntese química, por muitas bactérias da rizosfera incluindo *Azospirillum* e por plantas (Barea et. al., 1976; Tien et.al., 1979; Horemans et. al. 1986). Em uma cultura contendo *Azospirillum brasilense* foi encontrado 0,001 µg/mL de citocinina (Tien et. al 1979), as formas de citocininas detectadas foram Zeatina e isopentenil adenina (Strzelczyk et. al 1993).

Citocininas são derivados da adenina modificada na posição N6, cuja cadeia lateral nessa posição pode ser isoprenóide ou aromática, sendo a primeira muito mais abundante do que a segunda. As citocininas isoprenóides mais comuns são isopentenil-adenina (iP), trans-zeatina (tZ), cis-zeatina (cZ) e dihidrozeatina (DZ), e sua ocorrência, distribuição e abundância depende da espécie, tipo de tecido celular e estágio de desenvolvimento da planta (Zurcher et al., 2016). Dentre esses

compostos, iP e tZ são as citocininas mais presentes em diversas espécies de plantas (Ha et al., 2012; Seo et al., 2016; Sugawara et al., 2008).

Citocininas existem na forma de bases livres (nucleobases), nucleosídeos (ribosídeos), nucleotídeos (ribotídeos) e glicosídeos (O- e N-glicosídeos) (Miyawaki et al., 2006; Zurcher et al., 2016). As nucleobases são as formas mais ativas das citocininas, sendo que as formas ribosídeos e ribotídeos são menos ativas ou até mesmo inativas dependendo do receptor de citocininas expresso no tecido (Miyawaki et al., 2006; Seo et al., 2016). Em geral, a conjugação das nucleobases com um ribosídeo ou ribotídeo as confere estabilidade química, o que permite que essas formas sejam estocadas e usadas como sinalizadores parácrinos e de longa-distância (Kuroha et al., 2009; Zurcher et al., 2016). De fato, as formas pouco ativas ou inativas das citocininas são muito mais abundantes do que suas formas ativas. Isso traz uma vantagem para a regulação hormonal via citocininas já que as formas conjugadas podem ser rapidamente ativadas através de reações enzimáticas, contribuindo para a liberação rápida de citocininas ativas quando necessário.

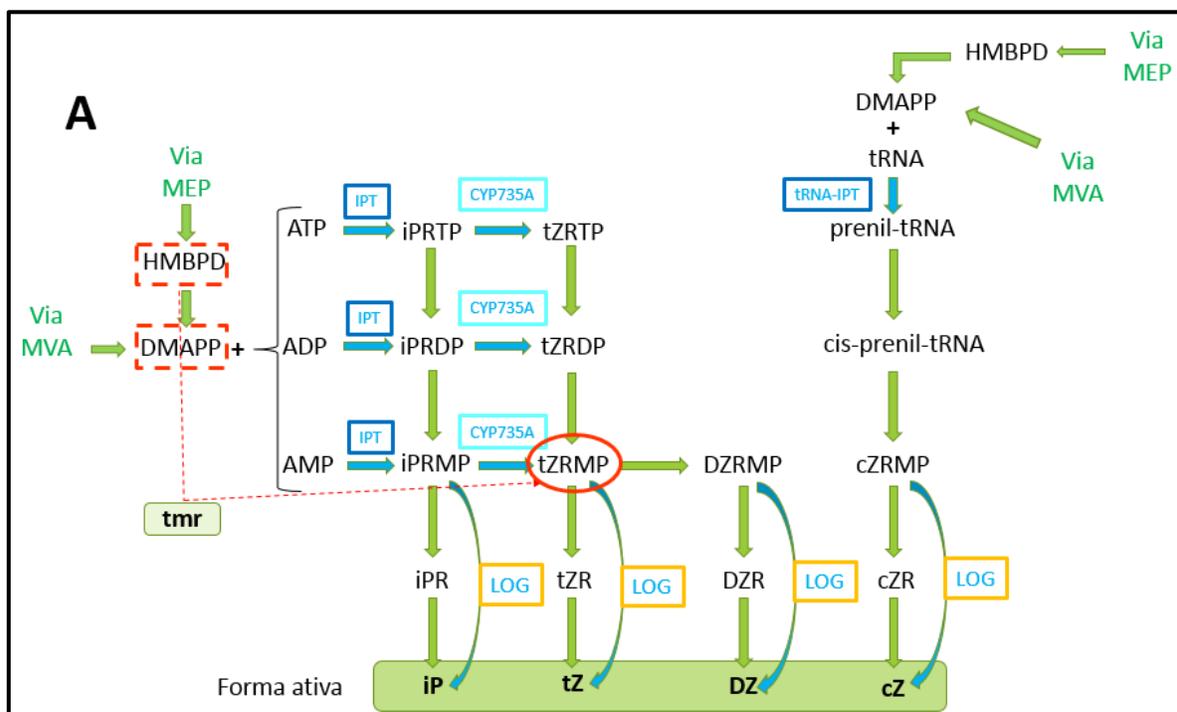
## 2.5. BIOSÍNTESE DE CITOCININAS

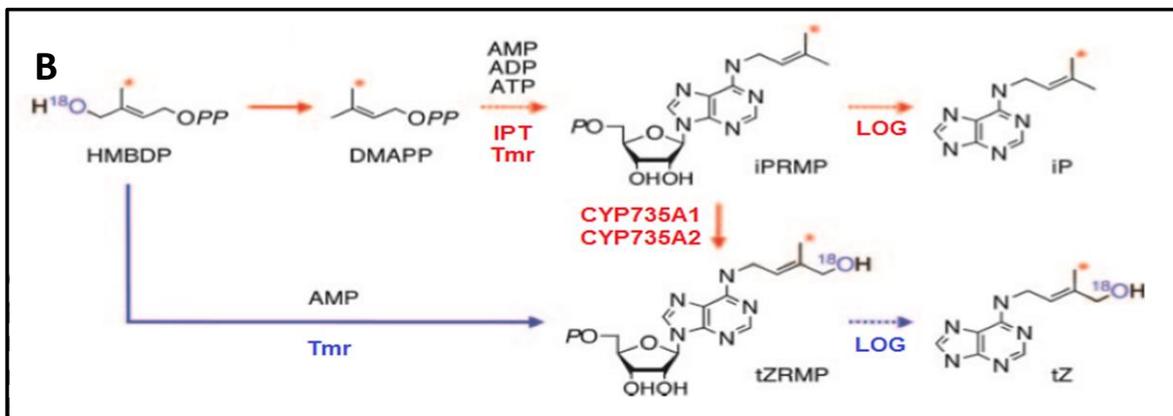
Além de serem produzidas em plantas, citocininas também podem ser produzidas por bactérias associadas a plantas, sejam essas patogênicas ou não. De fato, a biossíntese de citocinina é um aspecto determinante para a virulência de bactérias fitopatogênicas, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodococcus fascians* e *Streptomyces turgidiscabies* (Joshi and Loria, 2007; Pertry et al., 2010; Sakakibara et al., 2005).

A via de biossíntese de citocininas se inicia com a N-prenilação de AMP, ADP ou ATP a partir da transferência de um grupo isoprenil do DMAPP (dimetilalil-pirofosfato), formando os nucleotídeos iPRMP (isopentenil-adenina-ribosídeo-monofosfato), iPRDP (isopentenil-adenina-ribosídeo-difosfato) ou iPRTP (isopentenil-adenina-ribosídeo-trifosfato), respectivamente (FIGURA 1). Essa reação é catalisada pela enzima IPT (isopentenil transferase) (Jiskrová et al., 2015). Esses nucleotídeos podem ser hidroxilados na cadeia isoprenil por uma mono-

oxigenase do tipo citocromo P450 (CYP735A) para formar os derivados da transzeatina (tZ) tZRMP, tZRDP ou tZRTP, respectivamente (Jiskrová et al., 2015). Alternativamente, a enzima isopentenil transferase Tmr, expressa por *A. tumefaciens* a partir do gene *tmr* localizado no plasmídeo Ti, pode produzir tZ através da transferência de um grupo isoprenil oriundo de uma molécula de hidroximetilbutenil-difosfato (HMBDP) à uma molécula de AMP, ADP ou ATP (Sakakibara et al., 2005). Em plantas, a enzima IPT possui preferência por DMAPP, ADP e ATP como substratos, enquanto a enzima Tmr de *A. tumefaciens* reconhece tanto DMAPP quanto HMBDP, e AMP como substratos principais (Ueda et al., 2012).

**FIGURA 1. VIAS DE BIOSÍNTESE DE CITOCININAS.**





Outra forma de produção de citocininas por microorganismos é a partir de um tRNA, formando o nucleotídeo de cZRMP. Adaptado de (Sakakibara et al., 2007). Na figura B a via destacada em laranja e vermelho refere-se a via descrita para *A. thaliana*, enquanto a via em azul é a descrita para *A. tumefaciens*. HMBDP: Hidroximetilbutenil-difosfato; DMAPP: Dimetilalil-pirofosfato; IPT, Tmr e LOG: enzimas responsáveis pela via de síntese de citocininas; CYP735A1 e CYP735A2: mono-oxigenases do tipo citocromo P450 responsáveis pela hidroxilação da cadeia isoprenil. Adaptado de (Sakakibara et al., 2005).

Para se tornarem biologicamente ativos, os nucleotídeos de citocininas gerados pela atividade IPT/Tmr e CYP735 devem ser convertidos para uma forma de base livre. Uma enzima de ativação denominada LONELY GUY (LOG) converte os nucleotídeos de citocininas para nucleobases ativas, formando as citocininas ativas encontradas em plantas: isopentenil adenina (iP) e trans-zeatina (tZ) (Kurakawa et al., 2007). Todos os quatro nucleotídeos, iPRMP, tZRMP, DZRMP e cZRMP, são utilizados como substrato pela enzima LOG (Mortier et al., 2014). As proteínas LOG são expressas em locais e em tempos específicos, especialmente em tecidos vegetais com alta atividade de crescimento durante o desenvolvimento da planta (Kuroha et al., 2009; Werner and Schmulling, 2009).

A produção de citocininas em plantas pode ocorrer a partir de duas possíveis vias para a síntese de isopreno: a via citosólica do mevalonato (MVA) e a via plastidial do fosfato metileritritol (MEP). Ambas as vias geram DMAPP. Em bactérias, a síntese de DMAPP ocorre através da via MEP.

Além da via de biossíntese descrita na Figura 1, citocininas podem ser sintetizadas a partir da N-prenilação de adeninas de tRNA. A enzima MiaA uma tRNA-IPT (isopentenil transferase de tRNA) é a responsável pela N-prenilação de

tRNAs. O tRNA prenilado é hidroxilado e na última etapa a LOG hidrolisa a ligação N-glicosídica entre a base e a ribose liberando a citocinina cis-zeatina. Esse é o mecanismo pelo qual a maioria das bactérias produz citocininas e provavelmente seja o mecanismo presente em *A. brasilense*.

### 2.5.1. ENZIMAS LONELY GUY (LOG)

As enzimas da família LOG foram primeiramente identificadas e caracterizadas em *Oryza sativa* (arroz) (Kurakawa et al., 2007). As LOGs apresentam atividade fosforribohidrolase, hidrolisando a ligação N-glicosídica entre a ribose e a base nitrogenada. As LOGs são expressas em diferentes tecidos e em diferentes fases de desenvolvimento das plantas. Mutantes das enzimas LOG em *O. sativa* e *A. thaliana* tem baixo desenvolvimento em comparação a planta parental, indicando que as LOGs são enzimas importantes para a liberação de citocininas ativas e o desenvolvimento vegetal adequado (Kurakawa et al., 2007; Kuroha et al., 2009).

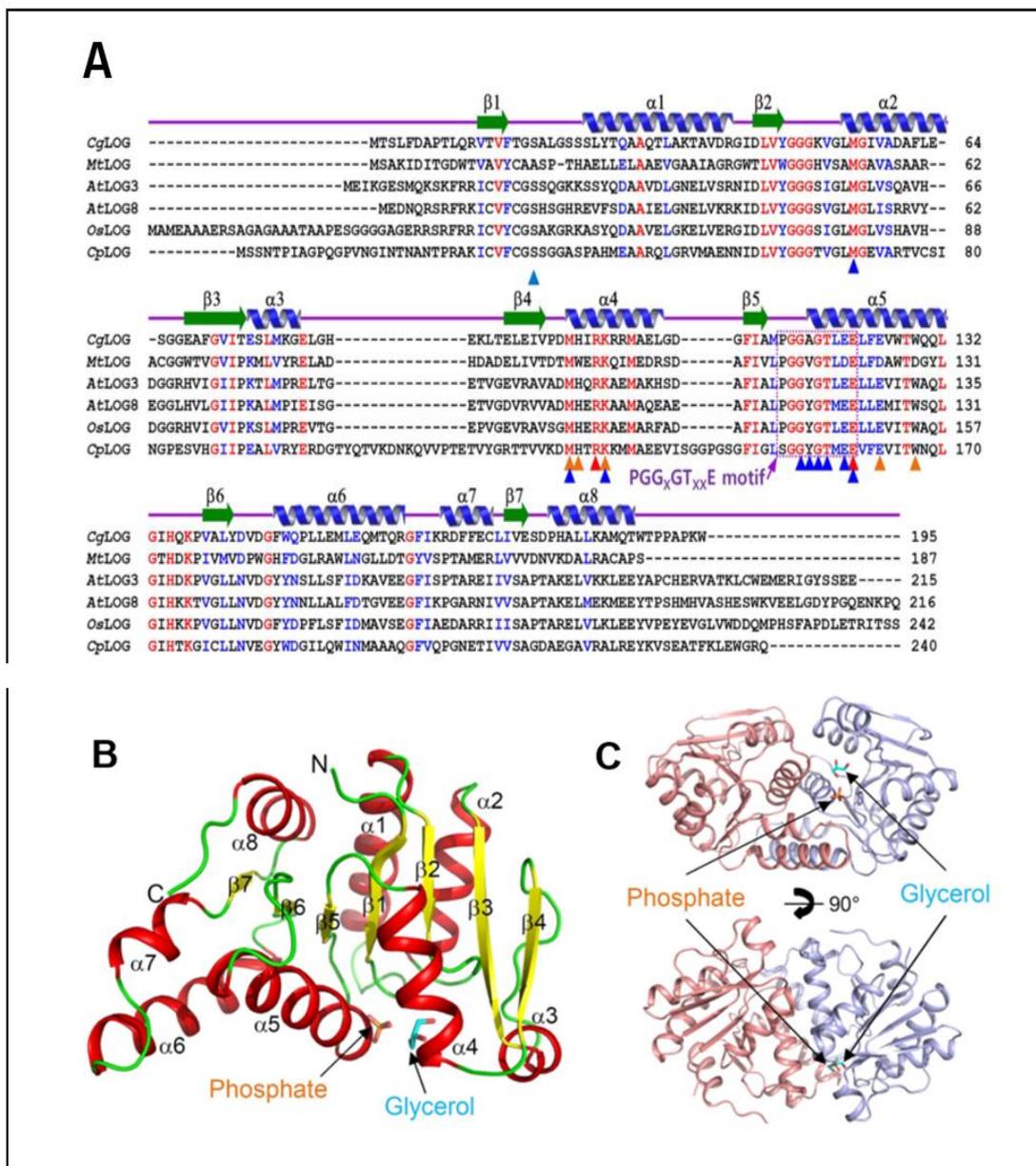
Diversas sequências de genes homólogas as LOG de plantas são encontradas em microrganismos. Recentemente, enzimas de vários organismos, tais como *Claviceps purpurea*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Corynebacterium glutamicum* foram identificados como LOGs por estudos bioquímicos e funcionais (Hinsch et al., 2015; Samanovic et al., 2015; Seo et al., 2016). A caracterização estrutural das enzimas LOG de *C. glutamicum* (CgLOG) revelou detalhes do mecanismo catalítico e de regiões importantes para o reconhecimento do substrato (Seo e Kim, 2017; Seo et al., 2016). Os detalhes da estrutura da CgLOG são apresentados na Figura 2.

A estrutura monomérica de CgLOG possui um dobramento  $\alpha/\beta$  do tipo Rossmann (Figura 2B e C). A folha  $\beta$  central é formada por sete fitas- $\beta$  paralelas e cercada por oito  $\alpha$ -hélices (Fig. 2B). A dimerização da CgLOG exibe um domínio de dobramento compacto. A interface de dimerização da CgLOG é composta principalmente das hélices  $\alpha 5$  e  $\alpha 6$ , sendo que a hélice  $\alpha 4$  ajuda parcialmente na dimerização. A dimerização dos dois polipeptídios constitui um bolso que serve

como sítio ativo. Na superfície desse bolso localiza-se o motivo conservado "PGGXGTXXE".

Para comparar CgLOG com outras LOGs, SEO et al. (2016) sobrepueram as estruturas de CgLOG, AtLOG3, CpLOG e MmLOG (FIGURA 3). Apesar do dobramento das quatro estruturas serem bastante similares entre si, a CpLOG exibiu características estruturais únicas. A CpLOG possui uma hélice extra na região C-terminal e contém voltas de conexão estendidas de  $\alpha 3$  a  $\beta 4$  e  $\alpha 4$  a  $\beta 5$  (FIGURA 3A). A volta de conexão estendida entre  $\alpha 3$  a  $\beta 4$  está localizada perto do sítio de ligação ao AMP (FIGURA 3A). Na AtLOG3 esta região está distorcida, na CgLOG esta região mostrou um alto fator B, ou seja, uma grande mobilidade. Na MmLOG, esta região contém o resíduo Glu80 que forma uma ligação de hidrogênio com uma das hidroxilas do anel da ribose (FIGURA 3B). Tais observações indicam que esta região é bastante diversificada em várias LOGs e a estabilização do anel da ribose parece ser diferente em cada proteína. Os resíduos conservados nos motivos "PGGXGTXXE" juntamente com outros resíduos conservados contribuem para a estabilização do AMP (FIGURA 3B).

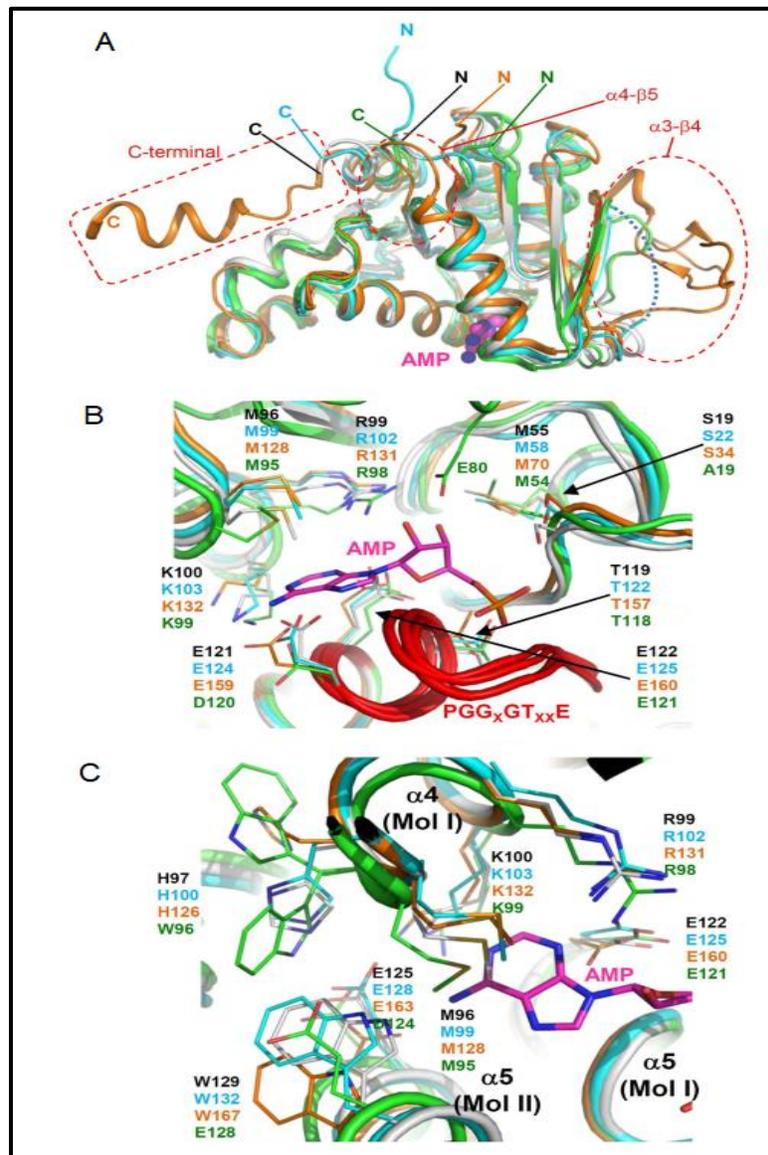
**FIGURA 2. ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA ENZIMA CgLOG**



Na parte A da figura é apresentado um alinhamento da sequência de aminoácidos de LOGs bacterianas e de plantas. Os elementos de estrutura secundária foram desenhados com base na estrutura da CgLOG. Os resíduos envolvidos na catálise, na ligação do AMP e na ligação ao grupo prenil são indicados por triângulos vermelhos, azuis e laranjas, respectivamente. O motivo PGGXGTXXE é indicado com um retângulo pontilhado na cor púrpura. As sequências de aminoácidos CgLOG, MtLOG, AtLOG, OsLOG e CpLOG são abreviaturas de LOGs de *Corynebacterium glutamicum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e *Claviceps purpurea*, respectivamente. Na parte B é apresentada a visão lateral da estrutura monomérica de CgLOG. Moléculas de glicerol e fosfato co-cristalizadas com a proteína são mostrados como modelos de bastão. As  $\alpha$ -

hélices foram rotuladas com a letra grega  $\alpha$  e as fitas- $\beta$  com  $\beta$ . Os números são seqüências e de acordo com o aparecimento da estrutura secundária na proteína, da extremidade N-terminal para C-terminal. Na parte C é apresentada a estrutura dimérica de CgLOG. As moléculas de glicerol e fosfato ligadas a ambas as subunidades são mostradas como em B. A parte inferior é a parte superior girada horizontalmente em  $90^\circ$ . Adaptado de (Seo et al., 2016).

**FIGURA 3. SOBREPOSIÇÃO DE VÁRIAS ESTRUTURAS DE LOGs**



Na parte A, apresenta-se a comparação da estrutura geral monomérica de CgLOG (em preto), AtLOG (em azul), CpLOG (em laranja) e MmLOG (em verde) superpostas. A molécula de AMP ligada na estrutura MmLOG é mostrado em magenta como um modelo de bastão. As extremidades N- e C-terminais estão indicadas. As principais diferenças encontradas em CpLOG estão destacadas com

círculos pontilhados vermelhos. A volta de conexão distorcida entre  $\alpha 3$ - $\beta 4$  na AtLOG3 é mostrada com uma linha pontilhada azul. Na parte B, apresenta-se a comparação estrutural focalizada nos locais de ligação ao AMP. As estruturas monoméricas de CgLOG, AtLOG, CpLOG e MmLOG estão superpostas e apresentadas com no esquema de cores semelhante ao da parte A. Os resíduos envolvidos na ligação ao AMP são mostrados como modelos de linha. Os motivos "PGGXGTXXE" das LOGs foram destacados em vermelho. Na parte C, apresenta-se a comparação estrutural focalizada nos locais de ligação ao grupo prenil do substrato. As estruturas diméricas de CgLOG, AtLOG, CpLOG e MmLOG estão superpostas e apresentam um esquema de cores semelhante ao da parte A. Fonte: SEO et al. (2016).

Na MmLOG os resíduos Ala19 e Asp120 estão envolvidos na estabilização de AMP, enquanto resíduos de serina e glutamato estão localizados nas posições correspondentes em outras LOGs (FIGURA 4B). Além disso, todas as quatro LOGs têm os dois resíduos catalíticos, Arg99 e Glu122 no caso da CgLOG, localizados nas mesmas posições, indicando que essas enzimas catalisam a reação através do mesmo mecanismo catalítico.

A comparação entre os locais de ligação do grupo prenil podem fornecer informações sobre a especificidade da LOG frente a diferentes substratos. As enzimas CgLOG, AtLOG3 e CpLOG contêm os resíduos Met96, His97, Lys100, Glu125 e Trp129 no local de ligação do grupo prenil (FIGURA 3C). A MmLOG apresenta maior diferença em relação ao sítio de ligação ao grupo prenil, pois possui os resíduos Asp124, Glu128 e Trp96 em posições correspondentes aos resíduos de glutamato, triptofano e histidina, respectivamente, nas outras três LOGs (FIGURA 4C). SEO et al. (2016) sugeriram baseados nessa comparação estrutural que a CgLOG possa produzir citocininas semelhantes às produzidas por LOGs de plantas e fungos. Ainda não há na literatura estudos de relação estrutura e função nas LOGs. Avanços nesses estudos poderão demonstrar claramente quais resíduos são de fato importantes para o reconhecimento de substrato e catálise.

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar as enzimas LOG de *Azospirillum brasilense* FP2.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Clonar os genes *log1* e *log2* de *A. brasilense* FP2 em vetores de superexpressão gênica

Superexpressar os genes *log1* e *log2* de *A. brasilense* FP2 em *Escherichia coli*

Purificar as enzimas recombinantes Log1 e Log2

Caracterizar a atividade enzimática das enzimas recombinantes Log1 e Log2

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As bactérias e os plasmídeos utilizados para clonagem e superexpressão estão listados na Tabela 1.

**TABELA 1.** BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS DURANTE ESSE TRABALHO

Bactérias		
Estirpes	Características/Propósito	Referência ou fonte
<i>A. brasilense</i> FP2	Estirpe derivada da estirpe Sp7, porém resistente a ácido nalidíxico e estreptomicina. Utilizada como fonte de DNA genômico para amplificação dos genes <i>log1</i> e <i>log2</i> . <b>Genótipo e/ou fenótipo:</b> Nal <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Estirpe selvagem SP7 Nif <sup>+</sup>	(Pedrosa and Yates, 1984)
<i>E. coli</i> TOP10	Estirpe utilizada para transformação de plasmídeos, preparação plasmidial e transformação de reações de ligação de DNA em etapas de clonagem. <b>Genótipo e/ou fenótipo:</b> F-mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str <sup>R</sup> ) endA1 $\lambda$ - (Sm <sup>R</sup> )	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Estirpe utilizada para a superexpressão de Log1 e Log2 utilizando o sistema pET.	(Studier and Moffatt, 1986)

	<b>Genótipo e/ou fenótipo:</b> F- ompT gal dcm lon hsdSB (rB- mB) $\lambda$ (DE3)	
Continuação da Tabela 1		
<b>Plasmídeos</b>		
pBlueScript II-KS	Vetor para clonagem dos produtos de PCR. Confere resistência a ampicilina, promotor T7 (Amp <sup>R</sup> ).	Stratagene
pBSlog1	pBlueScript II-KS contendo o gene <i>log1</i> de <i>A. brasilense</i> FP2 inserido no sítio EcoRV	Este trabalho
pBSlog2	pBlueScript II-KS contendo o gene <i>log2</i> de <i>A. brasilense</i> FP2 inserido no sítio EcoRV	Este trabalho
pET21a(+)	Expressão controlada pelo promotor T7. Cauda de 6 histidinas na porção C-terminal. Confere resistência à ampicilina.	Novagen
pET28a(+)	Expressão controlada pelo promotor T7. Cauda de 6 histidinas na porção N-terminal. Confere resistência à canamicina.	Novagen
pET29a(+)	Expressão controlada pelo promotor T7. Cauda de 6 histidinas na porção C-terminal. Confere resistência à canamicina.	Novagen
pET28log1	pET28a(+) contendo o gene <i>log1</i> de <i>A. brasilense</i> FP2 a jusante do promotor T7. A proteína expressa a partir desse plasmídeo contém cauda de 6 His N-terminal.	Este trabalho
pET28log2	pET28a(+) contendo o gene <i>log2</i> de <i>A. brasilense</i> FP2 a jusante do promotor T7. A proteína expressa a partir desse plasmídeo contém cauda de 6 His N-terminal.	Este trabalho

pET29log1	pET29a(+) contendo o gene <i>log2</i> de <i>A. brasiliense</i> FP2 a jusante do promotor T7. A proteína expressa a partir desse plasmídeo contém cauda de 6 His C-terminal.	Este trabalho
-----------	---	---------------

#### 4.2. MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Para cultivar *A. brasiliense* FP2 utilizou-se o meio NFb-lactato (Machado et al., 1995), contendo os antibióticos estreptomicina (20 µg/mL) e ácido nalidíxico (5 µg/mL) e adicionando uma mistura de 50 mM de fosfatos e 20 mM de NH<sub>4</sub>Cl. A composição do meio é apresentada na Tabela 2. Os cultivos em placas de agar foram incubados a 30°C em estufa microbiológica. Os cultivos em meio líquido foram realizados em frascos de 60 mL de capacidade contendo 10 mL de meio e incubados a 30°C com agitação orbital de 120 rpm em agitador rotatório.

**TABELA 2.** COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO UTILIZADO PARA *A. brasiliense* FP2

Componente do meio	Composição
Meio NFb-lactato	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O: 0,2 g/L NaCl: 0,1 g/L CaCl <sub>2</sub> : 0,02 g/L Ácido nitrilo-triacético: 0,056 g/L FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O: 0,02 g/L Biotina: 1,0×10 <sup>-4</sup> g/L Solução de Microelementos: 10 mL para 1 L de meio. Lactato de sódio: 5,0 g/L Mistura de fosfatos: 100 mL para 1L de meio.

	Ágar bacteriológico: 15 g/L
Solução de microelementos	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O: 2,0 × 10 <sup>-3</sup> g/L MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O: 2,35 × 10 <sup>-3</sup> g/L H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> : 2,8 × 10 <sup>-3</sup> g/L CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O: 8,0 × 10 <sup>-5</sup> g/L ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O: 2,4 × 10 <sup>-4</sup> g/L
Mistura de fosfatos	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 80 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 120 g/L

Para o cultivo de *E. coli* utilizou-se o meio LB (Sambrook and Russell, 2001), acrescidos dos antibióticos ampicilina a 250 µg/mL ou canamicina a 50 µg/mL. O meio LB teve a seguinte composição: extrato de levedura: 5,0 g/L; NaCl 10,0 g/L e triptona 10,0 g/L. Para triar possíveis clones pelo método de colônias azuis e brancas pela atividade beta-galactosidase adicionou-se X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) para 40 µg/mL concentração final. As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37°C com agitação orbital a 160 rpm. As estirpes foram preservadas em glicerol 50% a -20°C.

### 4.3. MANIPULAÇÃO DNA

#### 4.3.1. Desenho do primer

Os primers foram desenhados utilizando como referência o genoma de *Azospirillum brasilense* Sp7, os sítios de restrição colocadas no primer foi utilizado para facilitar a subclonagem nos vetores de expressão. Em vermelho refere-se a região do primer que anela no gene, sublinhado refere-se ao sítio das enzimas de restrição (*Bam*HI/ *Nde*I/ *Nhe*I).

**TABELA 3. LISTA DOS PRIMERS UTILIZADOS NESTE TRABALHO**

Identificação	Sequência (5' → 3')	Sítio de restrição adicionado
---------------	------------------------	----------------------------------

log1F-N28	GCA <u>CATATG</u> CGGATTTGCGTCTATGCC	NdeI
log1R-N28	TAT <u>GGATCC</u> TCAGGTGCGGGCCTC	BamHI
log1R-C29	TAT <u>GGATCC</u> GGTGC GGCCCTCG	BamHI
log2F-N28	ATA <u>GCTAGC</u> GCGATGAAAGCCCTG	NheI
log2R-N28	TAC <u>GGATCC</u> TCAGAGCTTTTGTGTGGG	BamHI
log2R-C21	TAC <u>GGATCC</u> AAGGAGCTTTTGTGTGGG	BamHI

#### 4.3.2. Amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os genes *log1* e *log2* foram amplificados por PCR usando como DNA molde uma cultura de *A. brasilense* FP2 diluída em água ultra-pura e aquecida a 95°C por 5 minutos. A reação foi realizada com a enzima PfuX7, 10x tampão XF, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de dNTP, 10 µmol de cada primer em um volume final de 20 µL segundo protocolo descrito anteriormente (Norholm, 2010). As condições para a reação foram: 98°C por 1 minuto, 25 ciclos repetidos de (98°C por 20 segundos, 60°C por 10 segundos, 72°C por 20 segundos) e extensão final de 72°C por 10 minutos. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram sintetizados pela empresa Exxtend (Campinas, SP). As sequências dos iniciadores estão na Tabela 3 no item 4.3.1.

#### 4.3.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose

A eletroforese de moléculas de DNA foi realizada em géis de agarose a 1% (m/v) em tampão TAE (40 mM de Tris base; 20 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA a pH 8,0). As amostras foram misturadas com corante FSUDS na proporção de 1 µL de corante para 5 µL de amostra. As corridas de eletroforese foram realizadas entre 60-80 V por 40-90 min usando o tampão TAE. Após a eletroforese

o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (10 µg/mL) e o excesso de corante foi retirado com água destilada. O DNA foi visualizado em transluminador de luz ultravioleta (a 312 nm) EC3 System - UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA USA) acoplado a um sistema de fotodocumentação.

#### **4.3.4. Preparação de DNA plasmidial**

O isolamento e purificação do DNA plasmidial foi feito seguindo o método de minipreparação de plasmídeos por lise alcalina (Sambrook and Russell, 2001). Os cultivos de *E. coli* foram realizados em 3 mL de meio LB com o antibiótico apropriado. Após 16h de crescimento, 1,5 mL do cultivo foi centrifugado durante 1 min a 13.000 rpm e a temperatura ambiente (Centrífuga Minispin, Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 150 µL de tampão GET (50 mM de glucose, 10 mM de EDTA, 25 mM de TrisHCl pH 8,0). A lise foi realizada a partir de 150 µL de uma solução de lise contendo 0,18 M de NaOH e 1% de SDS (m/v) e adicionada de 2 µL de RNase a 1 mg/mL. A mistura foi realizada por lenta inversão manual e a suspensão de células lisadas foi neutralizada com a adição de 150 µL de solução Kcaf (3 M de acetato de potássio e 11,5% ácido acético (v/v)). A mistura neutralizada foi incubada no gelo por 15 minutos. Após centrifugação por 10 minutos a 13.000 rpm (Centrífuga Minispin, Eppendorf), o sobrenadante foi transferido para um Eppendorf limpo e estéril. Ao sobrenadante foram adicionados 100 µL de clorofórmio : álcool isoamílico (24 : 1), a solução foi homogeneizada e centrifugada por 5 minutos a 13.000 rpm. A fase aquosa superior foi coletada, transferida para um tubo Eppendorf limpo e estéril e foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto para precipitação do DNA plasmidial. A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm, o sobrenadante descartado e o pellet lavado com etanol 70 % (v/v). Após centrifugação por 5 minutos o sobrenadante foi descartado e o restante foi seco a temperatura ambiente na bancada. O precipitado de DNA seco foi dissolvido em água ultra-pura.

#### 4.3.5. Clivagem do DNA utilizando enzimas de restrição

As reações para a clivagem do DNA foram realizadas em um volume de 10  $\mu$ L (reação analítica) ou 40  $\mu$ L (reação preparativa). Para clonagem dos produtos de PCR correspondendo aos genes *log1* e *log2*, o pBlueScript II KS foi tratado com a enzima EcoRV (Fermentas), seguindo as instruções do fabricante. Nesse caso, os produtos foram clonados com sítios *blunt* gerados pela amplificação com a enzima PfuX7. As endonucleases utilizadas foram XbaI e HindIII (Fermentas) para confirmação das clonagens dos genes *log1* e *log2* em pBlueScript II KS. Para subclonar os genes *log1* e *log2* nos vetores pET foram utilizadas as enzimas NdeI e BamHI (New England Biolabs e Fermentas, respectivamente) ou NheI e BamHI (New England Biolabs e Fermentas, respectivamente), em concentração de acordo com o fabricante. O tampão Tango (Fermentas) na concentração final de 1X foi adicionado as reações que continham aproximadamente 100 ng de DNA purificado. As reações foram incubadas a 37°C por 16h para a clivagem do DNA.

#### 4.3.6. Purificação de DNA a partir de bandas de gel de agarose

Para extração do DNA a partir de bandas gel de agarose utilizou-se o *kit* de purificação “QIAquick Gel Extraction Kit” (QIAGEN). O protocolo usado foi o recomendado pelo fabricante.

#### 4.3.7. Reação de ligação de DNA

Os plasmídeos e insertos foram previamente digeridos e purificados como descrito no item 4.3.6. As reações de ligação de DNA foram realizadas na proporção de 3:1 (v/v) de inserto para vetor. Na reação de ligação de DNA foram adicionados tampão da enzima T4 DNA ligase para concentração 1X (Fermentas), 1U da enzima T4 DNA ligase (Fermentas) e água ultra-pura para volume final de 10  $\mu$ L. A reação foi incubada por 16h a 16°C.

#### 4.3.8. Preparo de *E. coli* quimiocompetente

Para o preparo de células quimiocompetentes de *E. coli* Top10 ou BL21(DE3) foi primeiramente cultivado um pré-inóculo em 3 mL de meio LB sob agitação por aproximadamente 16 horas. Passado as 16 horas, 100 mL de meio LB em Erlenmeyer de 250 mL de capacidade foram inoculados com 1 mL do pré-inóculo. A bactéria foi cultivada até atingir um valor de densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) entre 0,3 e 0,4. Os 100 mL do cultivo foram divididos em dois tubos de 50 mL e as bactérias foram centrifugadas por 10 min a 4.000 rpm e 4°C em uma centrífuga Eppendorf (modelo 5810R). O sobrenadante foi descartado e o precipitado de bactérias de cada tubo foi ressuscitado em 15 mL de solução  $MgCl_2 \cdot 2H_2O$  100 mM gelada e estéril mantendo as células em banho de gelo durante todo o procedimento. As bactérias ressuscitadas foram novamente centrifugadas (10 min, 4.000 rpm a 4°C) e o sobrenadante descartado. As bactérias foram ressuscitadas em 25 mL de solução 100 mM  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  gelada e estéril. Essa suspensão foi mantida em gelo por 30 minutos antes ser centrifugada novamente (10 min, 4.000 rpm a 4°C). O sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuscitadas em 1 mL de solução 100 mM  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  com 20% (v/v) de glicerol gelada e estéril. As bactérias foram transferidas em alíquotas de 100  $\mu$ L para tubos Eppendorf e estocadas a -80°C.

#### 4.3.9. Transformação de *E. coli* por choque térmico

A transformação bacteriana foi realizada a partir da adição de 7,5  $\mu$ L das reações de ligação a 100  $\mu$ L de bactérias quimiocompetentes preparadas como descrito acima. A mistura foi mantida em banho de gelo por 30 min. Para transformação das bactérias com o DNA, a mistura foi submetida ao choque térmico por 45 segundos a 42°C em banho de água aquecida seguido imediatamente de banho de gelo por 2 minutos. As bactérias submetidas ao choque térmico foram misturadas a 900  $\mu$ L de meio LB e incubadas por 37°C durante 1 hora. Posteriormente, 200  $\mu$ L das bactérias recuperadas foram semeadas em placas de ágar LB contendo os antibióticos adequados.

#### **4.3.10. Sequenciamento de DNA**

O sequenciamento de DNA para confirmação das clonagens de *log1* e *log2* de *A. brasilense* FP2 foi realizado pelo método de terminação de cadeia usando BigDye Terminator (Applied Biosystems) utilizando o protocolo indicado pelo fabricante. O sistema de reação com volume final de 10 µL continha entre 0,2 µg a 0,5 µg de DNA plasmidial purificado, 10 pmol de iniciador para o promotor T7 ou T7 terminator (Novagen), 1 µL de reagente de sequenciamento BigDye e Tampão Save Money na concentração 1X. A reação foi incubada em termociclador seguindo o programa: 1 ciclo de 1 min a 96°C, 30 ciclos de 15 s a 96°C seguidos de 4 s a 60°C e 5 min a 60°C. O produto da reação foi precipitado com 1/10 de acetato de amônio a 7,5 M e 2 volumes de etanol absoluto. A mistura foi mantida em banho de gelo durante 15 min e posteriormente centrifugada por 15 min a 13.000 rpm. O DNA precipitado foi lavado com 500 µL de etanol a 70% (v/v) centrifugado por 5 min a 13.000 rpm e seco a vácuo.

#### **4.3.11. Subclonagem em vetor para expressão de proteínas**

Com os clones recombinantes selecionados foi realizada uma restrição com as enzimas NdeI e BamHI para o *log1* e NheI e BamHI para *log2*. Os vetores de expressão utilizados foram pET28a(+) para ter cauda de 6 histidinas N-terminal e pET29a(+) para ter cauda de 6 histidinas C-terminal. A reação de ligação foi realizada de acordo com o item 4.3.6.

### **4.4. MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS**

#### **4.4.1. Indução da expressão de proteínas Log em *E. coli* BL21(DE3)**

A indução da expressão de proteínas Log foi realizada a partir de um pré-inóculo de *E. coli* BL21(DE3) portando um dos plasmídeos pET-*log1* ou pET-*log2*. O pré-inóculo foi realizado em 10 mL de meio LB contendo canamicina (50 µg/mL) e incubado a 37°C por 16h a 160 rpm. No dia seguinte 800 mL de meio LB em Erlenmeyer de 2 L foram inoculados com 8 mL de pré-inóculo. O cultivo foi incubado

sobre agitação de 160 rpm e 37°C pelo tempo necessário até que a DO<sub>600</sub> atingisse 0,4. Ao atingir esse valor de DO<sub>600</sub> foi adicionado ao cultivo 1 mM de IPTG para indução da expressão da proteína. O cultivo foi incubado por mais 4 horas a 37°C. Imediatamente após as 4 h de incubação, as bactérias foram coletadas por centrifugação (30 minutos, 5.000 rpm, 4°C, centrífuga Hitachi). O sobrenadante foi descartado e as bactérias mantidas a -20°C para lise e obtenção do extrato bruto.

#### **4.4.2. Lise de *E. coli* BL21(DE3)**

As bactérias armazenadas a -20°C foram ressuspensas em um tampão de lise contendo 150 mM de NaCl e 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0. As bactérias foram mantidas no gelo e rompidas por sonicação, seguindo o seguinte programa: 12 ciclos de pulsos de 20 segundos de sonicação e 40 segundos de repouso em banho de gelo. Após a sonicação, 100 µL desta fração foram coletados, denominada de extrato bruto, para posterior análise por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante (SDS-PAGE). O restante do lisado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos em centrífuga Hitachi. O sobrenadante foi coletado e uma fração de 100 µL foi reservada em Eppendorf (fração solúvel) o precipitado (fração insolúvel) foi coletado e ressuspensado em tampão de lise. O restante do sobrenadante foi mantido em banho de gelo até o início do procedimento de purificação.

#### **4.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante (SDS-PAGE)**

As análises das proteínas a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE) foram realizadas em sistema da BioRad. As soluções para o preparo do gel foram misturadas na ordem e nas quantidades indicadas na TABELA 4. Para o gel de empilhamento foram utilizados os componentes nas quantidades indicadas na TABELA 5. As amostras foram preparadas por desnaturação com tampão de amostra (4% SDS (m/v); 20% glicerol (m/v); 0,2% azul de bromofenol (m/v); 0,1 M Tris-HCl pH 6,8 e 2% de β-mercaptoetanol (v/v)) e aquecidas a 100°C por 5 minutos. As eletroforeses foram

realizadas a 140 V em tampão contendo 30 g/L Tris-base; 140 g/L glicina; 1 g/L SDS por cerca de 1h, ou até o azul de bromofenol atingir o limite inferior do gel. O gel foi corado com solução de azul de Coomassie e em seguida descorado com solução descorante.

#### **4.4.4. Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade a Ni<sup>2+</sup>**

A purificação das proteínas foi realizada por cromatografia de afinidade a Ni<sup>2+</sup> empregando uma coluna HiTrap<sup>TM</sup> Chelating HP 5 mL (GE – Healthcare Life Sciences) acoplada ao cromatógrafo líquido ÄKTA (GE – Healthcare Life Sciences). A coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de água ultra-pura, em seguida carregada com 0,5 volume de coluna de 0,1 M de NiCl<sub>2</sub> e lavada com 2 volumes de coluna de água ultrapura para retirar o excesso de NiCl<sub>2</sub>. A coluna foi equilibrada com 5 volumes de coluna de tampão A (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 150mM de NaCl, 10 mM de imidazol) e carregada com 40 mL da fração solúvel da proteína. Após injeção da fração solúvel de proteínas, a coluna contendo proteínas ligadas foi lavada com 5 volumes de coluna de tampão A. Os resíduos de histidinas encontrados na cauda N- ou C-terminal permitem a ligação forte de proteínas recombinantes ao níquel. Um sistema composto de dois tampões de eluição foi utilizado para a purificação: tampão A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; 150 mM de NaCl e 10 mM de imidazol) e tampão B (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; 150 mM de NaCl e 1 M de imidazol). O imidazol é um composto orgânico nitrogenado com alta afinidade pelo níquel. Portanto, quanto maior a concentração de imidazol no tampão de eluição menor será a interação da proteína com a coluna. As proteínas fortemente ligadas a matriz foram eluídas com gradiente crescente de imidazol, iniciando com 10 mM e finalizado com 1 M. Frações de 1,5 mL eluídas durante o gradiente de imidazol foram coletadas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE. As frações que apresentavam maior pureza e maior concentração foram reunidas.

**TABELA 4.** COMPOSIÇÃO DO GEL DE SEPARAÇÃO PARA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DESNATURANTE DE PROTEÍNAS.

<b>Gel Separador</b>	<b>Gel 12%</b>
Água	4,35 mL
Tris HCl pH 8,8 1,5M	2,5 mL
SDS 10%	100 µL
Acrilamida: Bis-acrilamida 32 : 8%	3 mL
APS 10%	50 µL
TEMED	5 µL

**TABELA 5:** COMPOSIÇÃO DO GEL DE EMPILHAMENTO PARA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS

<b>Gel Empilhamento</b>	
Água	3,162 mL
Tris HCl pH 8,8 1,5M	1,3 mL
SDS 10%	50 µL
Acrilamida: Bis-acrilamida 32 : 8%	487,5 µL
APS 10%	25 µL
TEMED	10 µL

#### 4.4.5. Desalting das proteínas purificadas

Para a retirada do imidazol das proteínas eluídas foi utilizada uma coluna HiTrap desalting (GE – Healthcare Life Sciences) acoplada a um sistema de bomba peristáltica. A coluna HiTrap Desalting foi lavada com 10 volumes de coluna de água

ultra-pura e depois equilibrada com Tampão C (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 150 mM de NaCl, 10% de glicerol (v/v)). As frações com maior pureza e concentração de proteínas Log foram aplicadas na coluna. Para 6 mL de frações de proteínas Log foram utilizadas 4 colunas HiTrap-Desalting conectadas em série. As frações eluídas foram coletadas e alíquotadas a -20°C.

#### **4.4.6. Quantificação da concentração de proteínas pelo método de Bradford**

A concentração de proteínas obtida foi determinada utilizando o método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). A quantificação foi realizada por comparação com uma curva padrão da proteína soro albumina bovina (BSA).

#### **4.4.7. Ensaio de atividade fosforribosidrolase**

A atividade foi determinada a partir da detecção da banda da adenina identificada em placas de cromatografia de camada delgada (CCD). O ensaio foi realizado a partir de uma reação contendo 20 mM de AMP (substrato), 36 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 30 µg de enzima purificada. As reações foram incubadas a 37°C overnight e aplicadas em placas de alumínio de CCD impregnadas com sílica e fluoróforo que emite fluorescência quando irradiada a UV 254 nm. A fase móvel utilizada continha n-butanol : acetona : 5% de solução de amônio : água (11 : 3 : 3 : 3).

#### **4.4.8. Ensaio cinético de atividade fosforribosidrolase**

A cinética das enzimas Log foi realizada em um período de 8 horas de incubação em banho maria a 37°C. A reação continha os mesmos componentes nas mesmas concentrações que no ensaio descrito no item 4.4.7. Alíquotas da reação foram retiradas, inativadas a 95°C por 5 min e armazenadas a -20°C. A CCD para determinação da intensidade da banda da adenina foi realizada como descrito no item 4.4.7.

#### **4.4.9. Termoestabilidade das enzimas Log**

A termoestabilidade das enzimas foi determinada incubando as enzimas em três diferentes temperaturas, 40°C, 50°C e 60°C, juntamente com Tris-HCl 36 mM, pH 8,0, durante o período de 1 h. A cada 15 min alíquotas da enzima incubada foram retiradas e incubadas na reação como descrito no item 4.4.7 e incubada por 20 min a 37°C. Após o término da reação as amostras foram analisadas por CCD como descrito no item 4.4.7.

#### **4.4.10. Efeito do pH e da temperatura na atividade Log**

Para verificar o efeito do pH na atividade enzimática, foi realizado ensaios com tampões em diferentes pH Na faixa de pH de 4,0 a 5,5 utilizou-se tampão acetato de sódio, de pH 6,0 a 7,0 utilizou-se o tampão fosfato, de 7,0 a 8,5 o tampão Tris- HCl e de pH 8,5 a 11 tampão glicina-NaOH. A concentração dos tampões utilizados foi de 36 mM e o tempo de incubação foi o mesmo utilizado anteriormente. As temperaturas utilizadas para o ensaio de temperatura ótima foram entre 30°C a 100°C.

#### **4.4.11. Especificidade ao substrato**

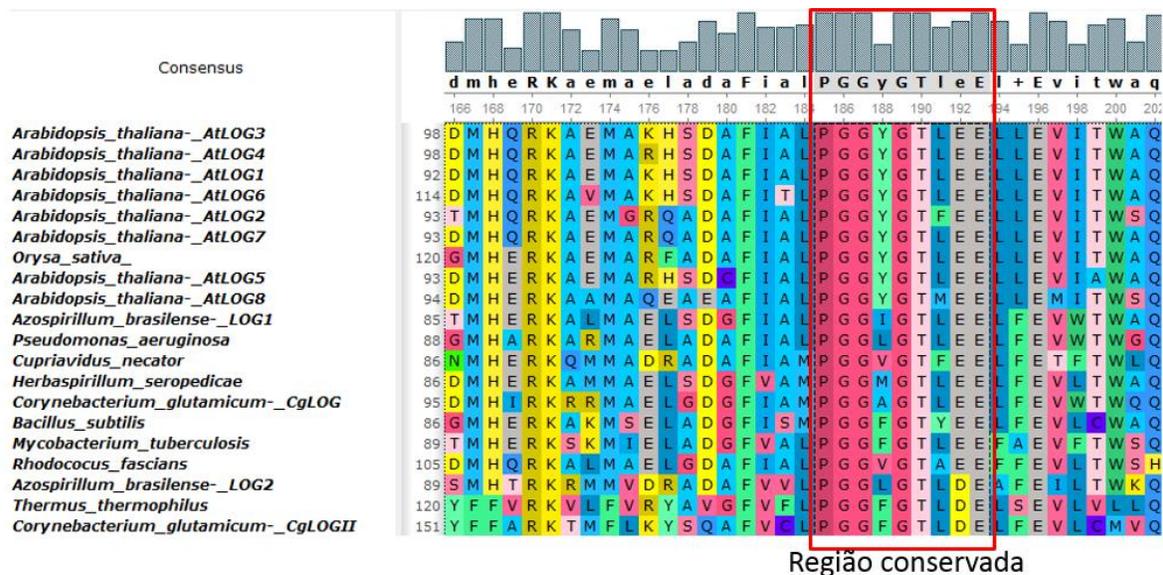
Para determinar a preferência de Log frente a diferentes substratos a atividade foi testada contra adenosina monofosfato (AMP), adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), trans-zeatina ribosídeo (tZR) e adenosina. Todos os substratos foram empregados na concentração final de 20 mM. A condição de reação foi como descrita no item 4.4.7. A fase móvel utilizada nas reações com tZR e adenosina foi acetato de etila: ácido acético: propanol: água (4:2:2:1).

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Análise de sequências de LOGs de microrganismos e plantas.

Sabe-se que *Azospirillum brasilense* é produtor de citocininas, entretanto os genes envolvidos na biossíntese de citocininas nesse microrganismo ainda não foram caracterizados. *A. brasilense* FP2 possui dois genes que codificam enzimas Lonely Guy (LOG) putativas, homólogos as enzimas já descritas em *Arabidopsis thaliana* e em alguns microrganismos como *Corynebacterium glutamicum*, que apresentam atividade de fosforibohidrolase. Para determinar possíveis semelhanças estruturais entre as LOGs de *A. brasilense* e outras depositadas em banco de dados, as sequências de fosforibohidrolase e possíveis fosforibohidrolases foram selecionadas e alinhadas. As sequências foram obtidas a partir do banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e foram alinhadas no programa ClustalX. Todas as sequências analisadas possuíam a assinatura do motivo PGGxGTxxE conservada (FIGURA 4). Esta região está envolvida com a ligação ao substrato e sua estabilização no sítio ativo, como demonstrado anteriormente (Seo et al., 2016). Sendo assim, é possível que todas as sequências analisadas tenham uma forte afinidade pelo nucleobase da adenina. A análise entre as duas Logs de *A. brasilense* FP2 revelou identidade de 49% e no genoma do *A. brasilense* Sp7 foi possível visualizar que os genes estão distantes um do outro, FP2 é uma estirpe derivada do Sp7, o genoma do Sp7 foi utilizado como referência, visto que, a análise no genoma do FP2 não foi possível encontrar *log1* pelo fato do genoma fechado ainda não estar disponível.

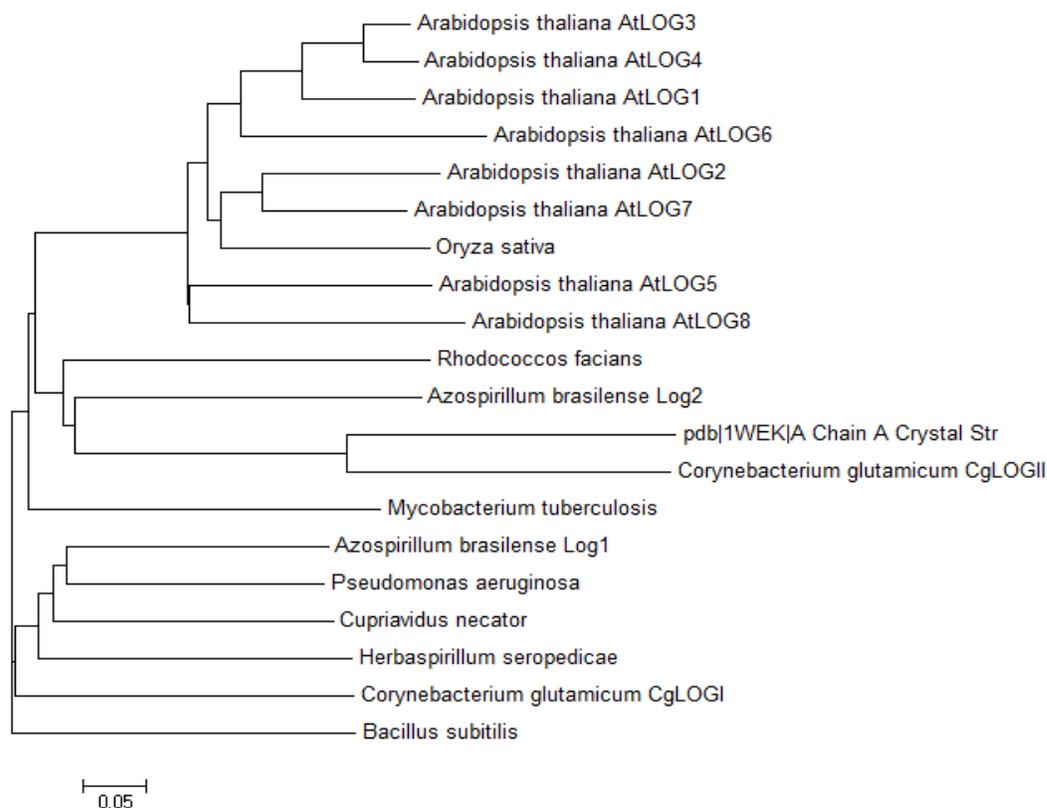
**FIGURA 4.** ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE ENZIMAS LOG.



O alinhamento foi realizado a partir das sequências de Log, plantas e bactérias, o retângulo em vermelho refere-se a região conservada que está presente em todas as sequências alinhadas. Segundo Seo et. al. (2016) esta região conservada é uma região que estabiliza o AMP, a dimerização da enzima forma uma espécie de bolso que estabiliza essa região.

A árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das sequências se encontra na FIGURA 5 e revela que a Log1 de *A. brasiliense* se encontra próxima as LOGs de *Pseudomonas aeruginosa*, *Cupriavidus necator* e *Hesperisillum seropedicae*. Nenhuma dessas LOGs foi caracterizada funcionalmente até o momento. Já a Log2 se encontra próxima as LOGs de *Corynebacterium glutamicum* e *Thermus termophilus*, ambas já foram caracterizada e possuem atividade de fosforribosidrolase.

**FIGURA 5.** ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUÍDA A PARTIR DO ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE LOGs DE MICRORGANISMOS E PLANTAS



Alinhamento entre as sequências Log de diferentes organismos, as sequências utilizadas foram encontradas no banco de dados NCBI e alinhadas, como é relatado anteriormente.

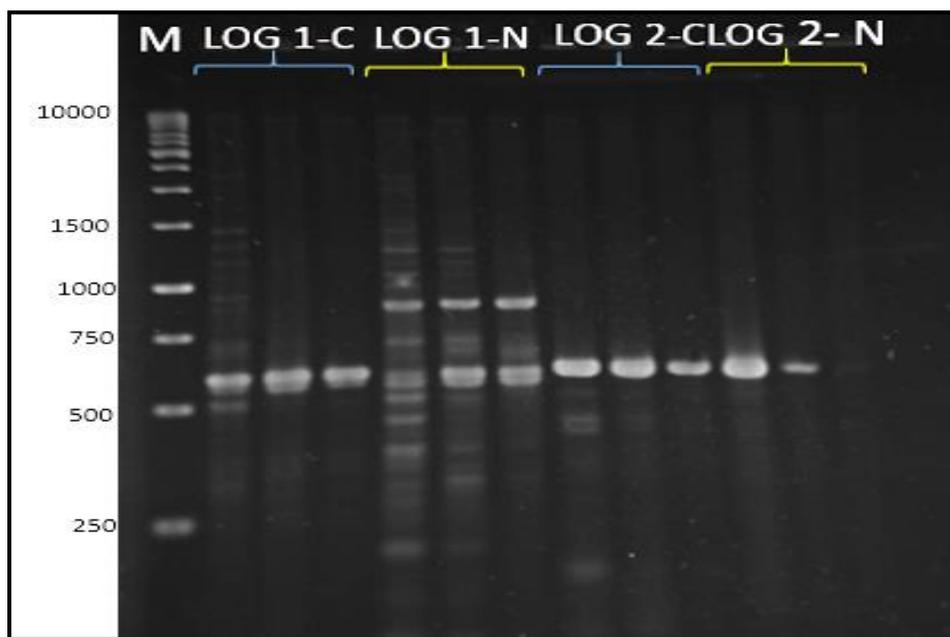
No alinhamento entre as sequências foi possível comparar as demais com as Log caracterizadas nesse trabalho em relação à similaridade e pontuação do alinhamento, em relação à similaridade entre elas a menor encontrada foi em relação a sequência de CgLOGII, recentemente caracterizada e que possui uma cauda N terminal estendida. Outro fato encontrado é que *Herbaspirillum*, uma bactéria também conhecida por promover o crescimento vegetal e uma das bactérias estudada pelo grupo de fixação de nitrogênio, também possui uma possível fosforribosidrolase com uma sequência de 54% similar com a Log1 e

possui um score bom, sendo assim um alvo para futuros estudos de caracterização dessa enzima que ainda não é caracterizada nesse microrganismo. Com essa análise partimos para a biologia molecular.

## 5.2. Clonagem dos genes *log1* e *log2* de *A. brasilense* FP2

Os genes *log1* e *log2* de *A. brasilense* FP2 foram amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os fragmentos amplificados tinham o tamanho esperado, aproximadamente 579 pb para *log1* e 585 pb para o gene *log2* (FIGURA 6). A reação de PCR foi refeita para os genes que apresentaram bandas inespecíficas como no caso do Log1-N mostrado na (FIGURA 4), o DNA molde foi diluído e as reações ocorreram no mesmo ciclo utilizado anteriormente.

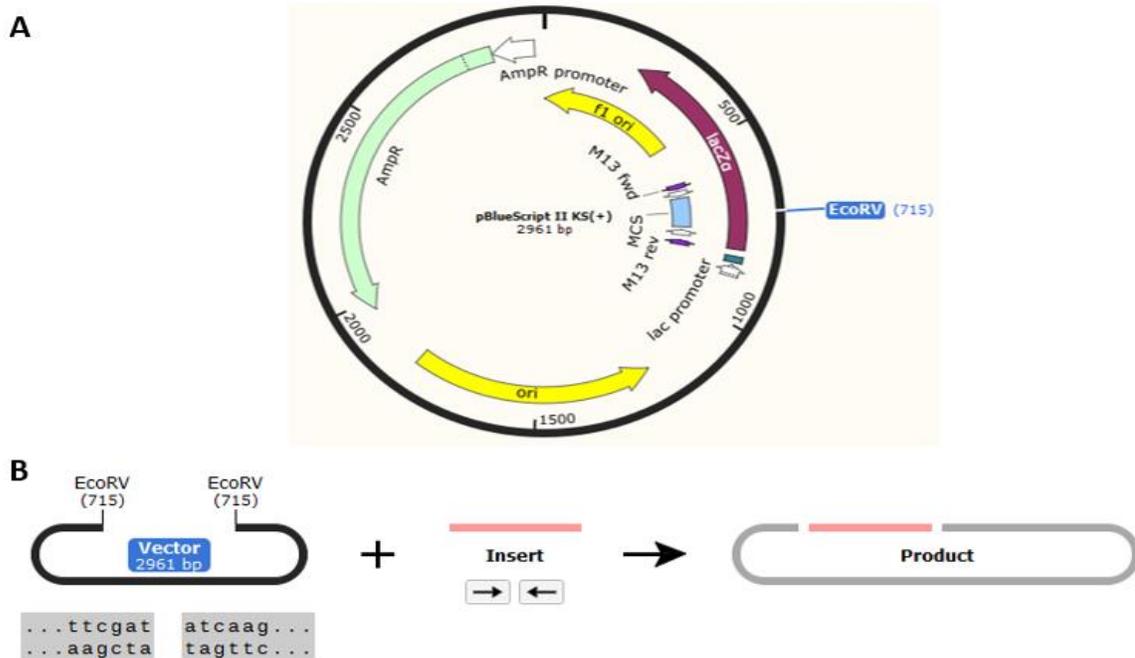
**FIGURA 6.** AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *log1* E *log2* DE *A. brasilense* FP2



M - Marcador molecular de 1kb ladder. Log1-C e Log1-N representam os amplificadas do gene *log1* para conter cauda de 6 histidinas C-terminal e N-terminal, respectivamente. O mesmo padrão de identificação foi aplicado para a amplificação do gene *log2*. As três pistas do gel representam as três temperaturas distintas de anelamento utilizadas, 60, 65 e 72°C. O tamanho do gene *log1* é de 579pb e o *log2* 585pb.

Cada par de iniciadores foi desenhado para gerar as variantes com cauda de 6 histidinas N-terminal (Log1-N e Log2-N) e com cauda de 6 histidinas C-terminal (Log1-C e Log2-C), quando subclonados nos vetores de expressão pET28a e pET29a. Essa variação na posição da cauda de histidinas foi realizada para verificar se ocorreria alguma diferença na atividade enzimática das Log de *A. brasilense*. Os produtos de PCR foram clonados no plasmídeo pBlueScript II KS, linearizado com *EcoRV*. A inserção foi realizada a partir de uma reação contendo a enzima T4 DNA ligase, incubada overnight e transformada em células de *E. coli* TOP10 competentes a receber o plasmídeo recombinante. O uso do vetor de clonagem foi para aumentar o número de cópias do produto amplificado. Na FIGURA 7, é demonstrado um esquema para visualização da clonagem.

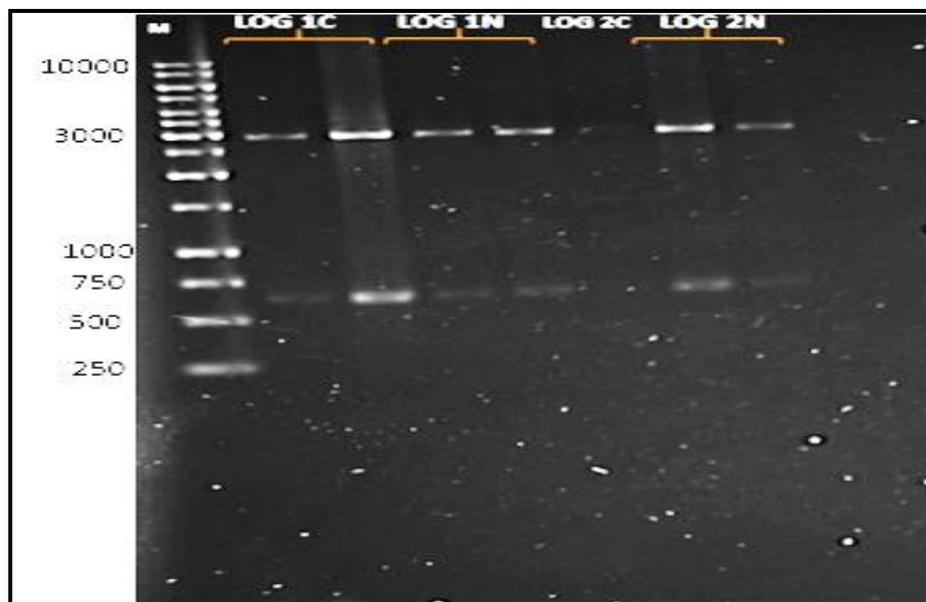
**FIGURA 7.** ESQUEMA DO VETOR DE CLONAGEM COM OS GENES DE INTERESSE.



Na figura A contém o vetor inteiro, pBS II KS (+), a enzima *EcoRV* utilizada para linearização do vetor está em azul. Na figura B é mostrado o vetor linearizado com a enzima *EcoRV*, o inserto e produto.

Os clones recombinantes foram selecionados tiveram os plasmídeos extraídos, após a extração foi realizado uma digestão enzimática com as enzimas *HindIII* e *XbaI* (FIGURA 8). As reações positivas liberaram insertos de acordo com o esperado, 579 pb para *log1* e 585 pb para *log2*, ainda que a diferença de tamanho entre os dois insertos liberados após restrição não seja perceptível pela imagem da FIGURA 5. Os clones confirmados por restrição foram sequenciados e as sequências mostraram 100% de identidade com as sequências do genoma de *A. brasilense* Sp7.

**FIGURA 8.** ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DOS CLONES DE *log1* E *log2* DE *A. brasilense* EM pBlueScript II KS.

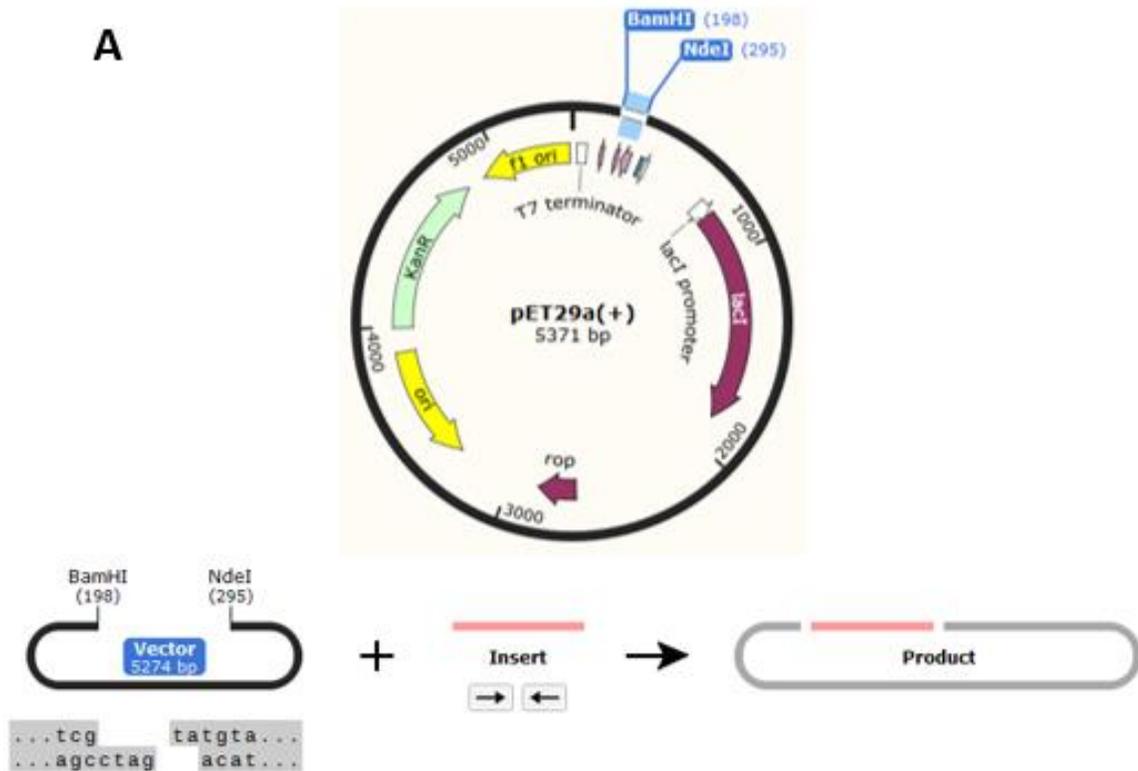


M - Marcador molecular de 1kb ladder. O tamanho do gene *log1* é de 579pb e o *log2* 585pb. Cada pista refere-se a possíveis clones recombinantes, foram extraídos 2 possíveis clones para cada construção.

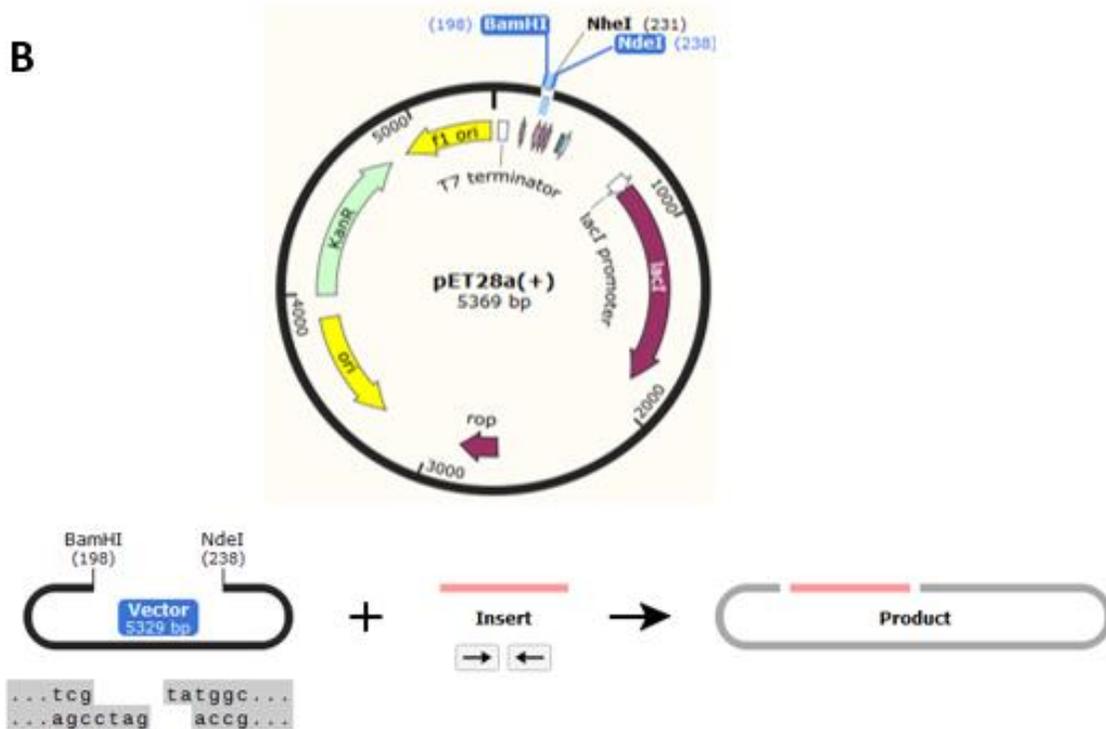
O único clone que não pôde ser obtido foi o *log2* com cauda de histidinas na porção C-terminal (LOG2C). Os plasmídeos pBS-*log1N* e pBS-*log1C* foram tratados com as enzimas *NdeI* e *BamHI*, e os insertos liberados foram ligados nos vetores pET28a e pET29a tratados com as mesmas enzimas, respectivamente (FIGURA 9).

Essa clonagem gerou os plasmídeos pET28-log1N e pET29-log1C. O plasmídeo pBS-log2N foi tratado com as enzimas *NheI* e *BamHI*, e o inserto liberado foi ligado ao vetor pET28a tratado com as mesmas enzimas. Essa clonagem gerou o plasmídeo pET28-log2N. Os plasmídeos derivados de pET28 e pET29 foram confirmados por PCR utilizando o primer T7 presente nos vetores e transformados em *E. coli* BL21(DE3) para ensaio de superexpressão.

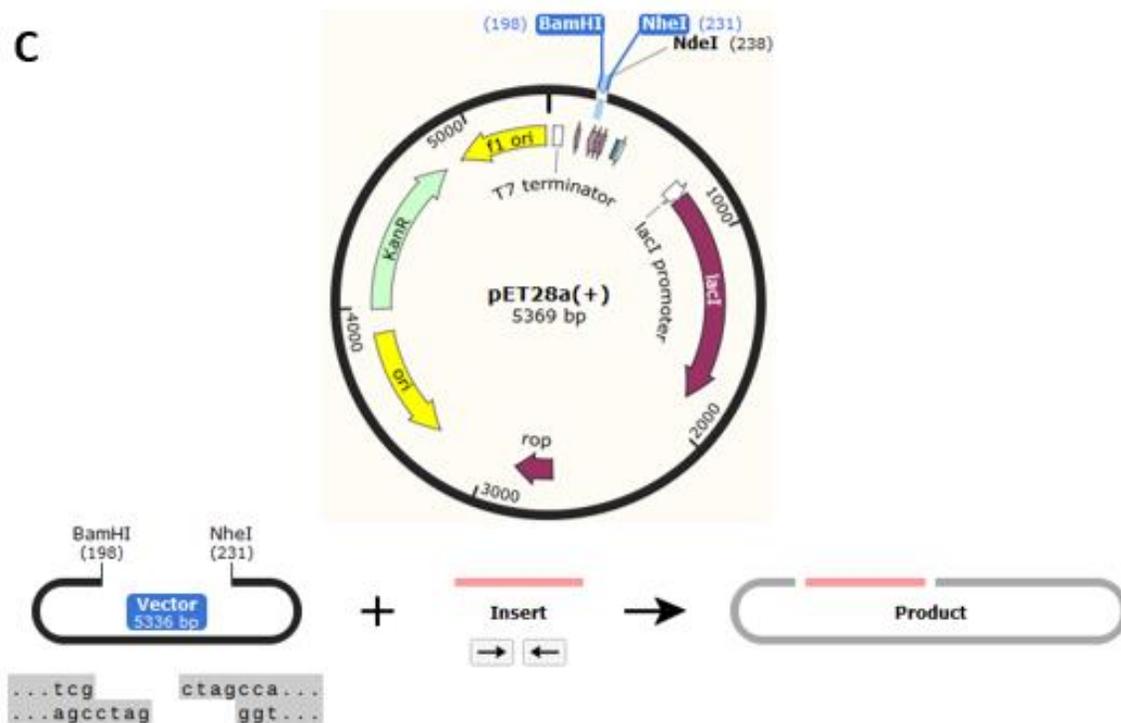
**FIGURA 9.** ESQUEMA DOS VETORES PARA EXPRESSÃO GÊNICA COM OS GENES DE INTERESSE.



B



C



Na figura A é a construção para Log1C, na figura B construção para Log1N e na figura C construção para Log2N. Nem cada vetor as enzimas utilizadas para linearização estão selecionadas em azul.

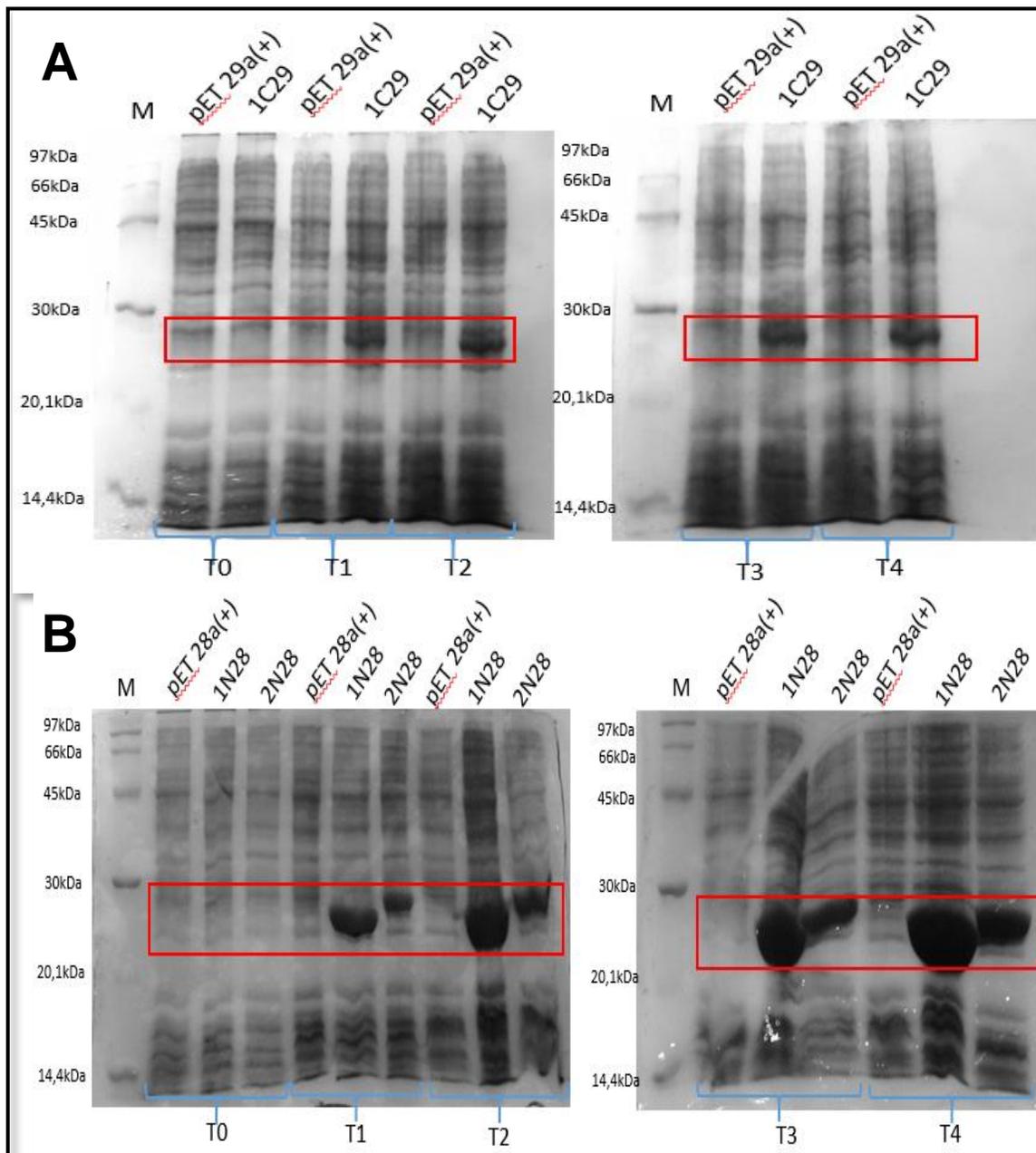
### 5.3. Superexpressão dos genes *log* de *A. brasilense* em *E. coli*

A indução da expressão dos genes *log* foi realizada com a adição de IPTG na concentração final de 1 mM. Inicialmente foi realizado um teste na escala de 10 mL de cultivo apenas para verificar se os genes estavam sendo expressos em *E. coli* (FIGURA 10).

O tamanho aproximado das proteínas foi de 23 kDa para Log1C, 22,4 kDa para a Log1N e 22,6 kDa para a Log2N. Os sufixos C e N após a abreviatura das proteínas determina a posição da cauda de histidinas, sendo N para N-terminal e C para C-terminal.

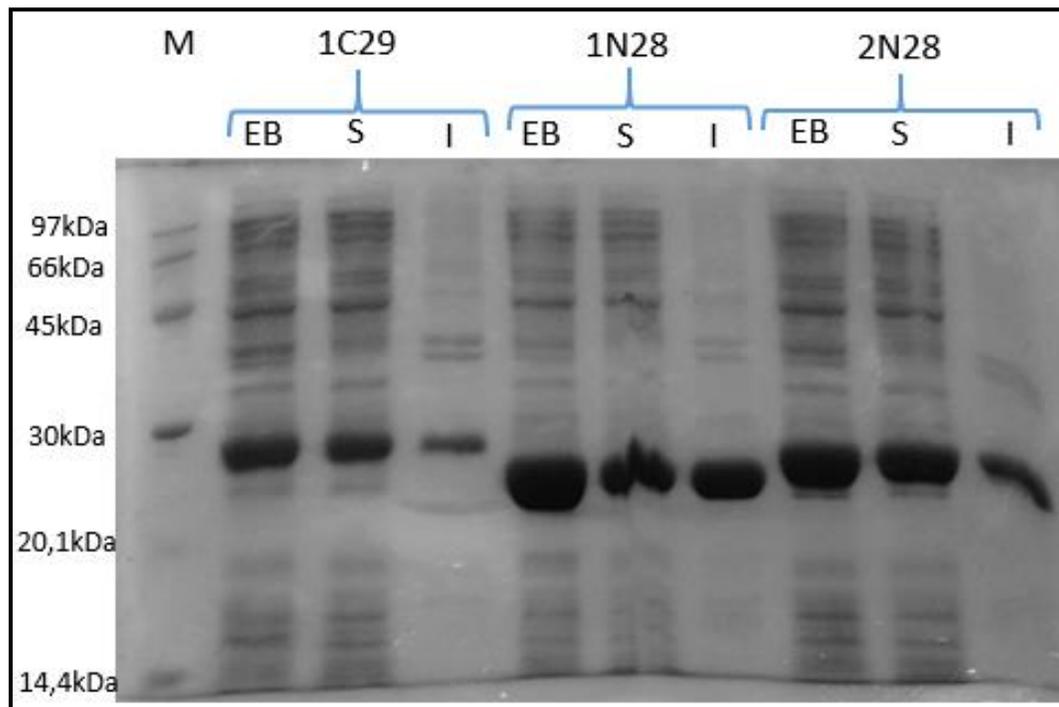
Após determinar que as proteínas Log1 e Log2 de *A. brasilense* puderam ser expressas em *E. coli* passou-se para o teste de solubilidade. Esse teste faz-se necessário para determinar qual a quantidade de proteína expressa permanece na fração solúvel e pode ser purificada. As bactérias de 10 mL de cultivo após indução foram ressuspensas em 1,5 mL de tampão de lise contendo 150 mM de NaCl e 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0. Após sonicação a mistura lisada foi centrifugada e de cada fração solúvel e insolúvel 10 µL foram utilizados para análise eletroforética (FIGURA 11).

**FIGURA 10.** EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Log1 E Log2 DE *A. brasilense* FP2 EM *E. coli* BL21(DE3)



M- marcador de peso molecular de proteínas. As pistas identificadas com pET28a e pET29a representam os controles negativos de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os vetores sem inserto. 1N28 – Log1 com cauda de histidinas N-terminal. 1C29 – Log1 com cauda de histidinas C-terminal. 2N28 – Log2 com cauda de histidinas N-terminal. T0, T1, T2, T3 e T4 representam os tempos em horas após a indução com IPTG. Na figura A indução 1C29 – Log1 e na figura B indução 1N28 – Log1 e 2N28 – Log2. As bandas referentes as proteínas Log estão destacadas nos retângulos vermelhos.

**FIGURA 11.** TESTE DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS Log1N, Log1C E Log2N EXPRESSAS EM *E. coli* BL21(DE3)



M- marcador de peso molecular de proteínas. EB – extrato bruto antes da centrifugação. S – fração solúvel. I – fração insolúvel. 1N28 – Log1 com cauda de histidinas N-terminal. 1C29 – Log1 com cauda de histidinas C-terminal. 2N28 – Log2 com cauda de histidinas N-terminal.

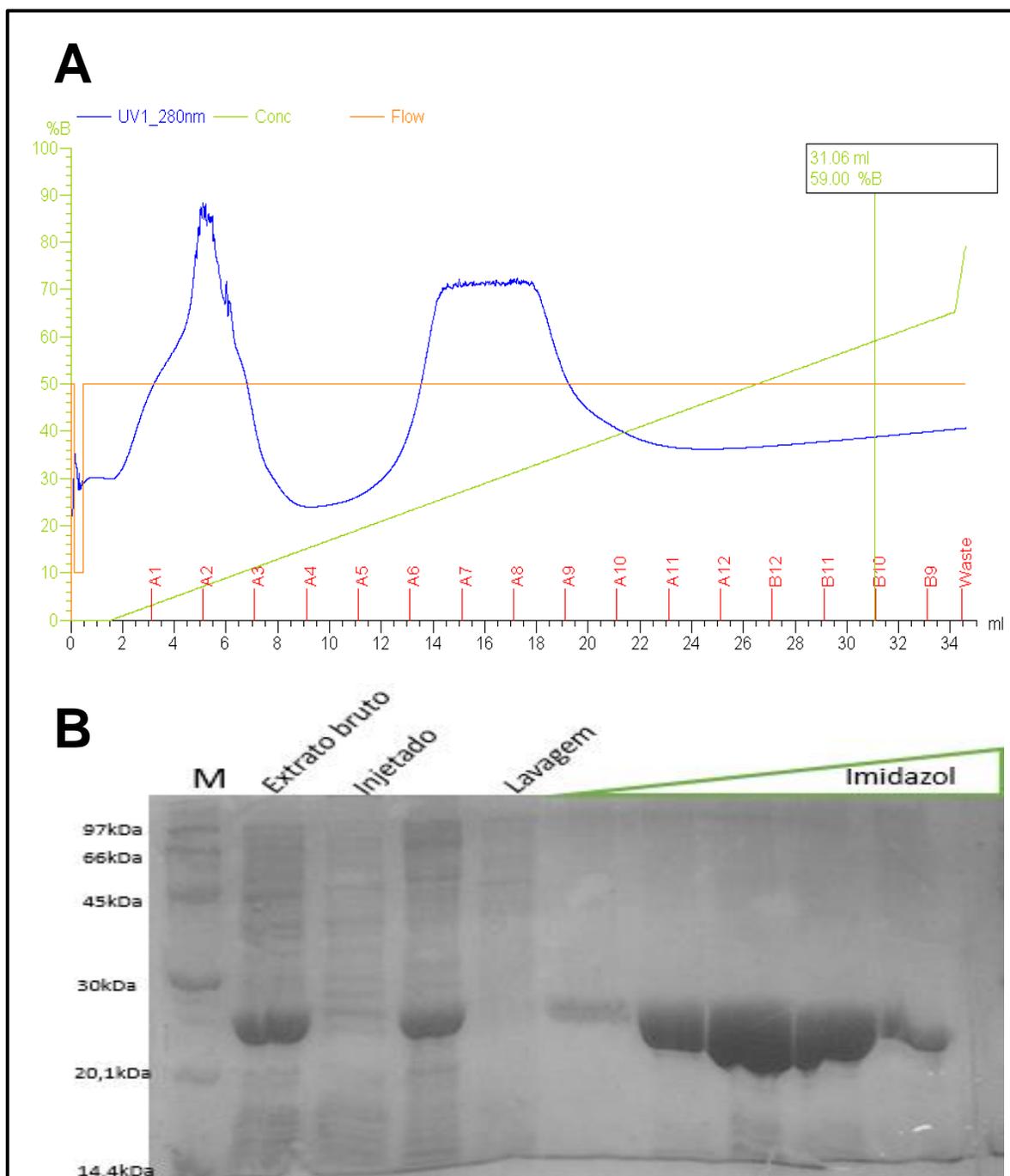
Como pode ser observado na figura 9, as três proteínas Log foram devidamente expressas e solúveis. Embora a proteína log1C foi menos expressa em comparação as proteínas Log1N e Log2N, ainda há quantidade suficiente de Log1C para proceder com um ensaio de purificação e caracterização enzimática.

#### **5.4. Purificação das proteínas Log de *A. brasilense* superexpressas em *E. coli***

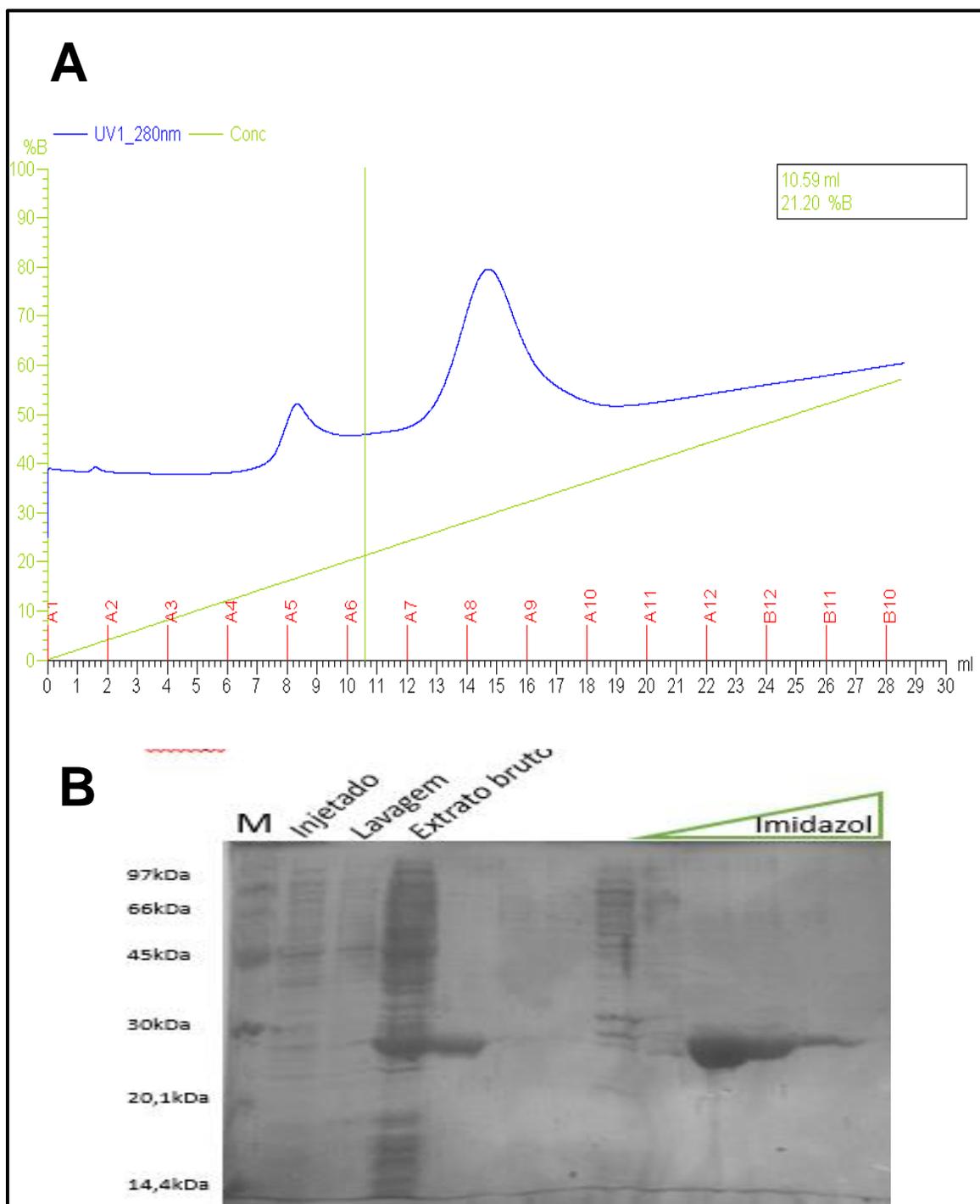
Após confirmação da alta solubilidade das proteínas Log a próxima etapa consistiu na expressão em escala de 800 mL para purificação cromatográfica. A purificação foi realizada através de uma coluna de afinidade carregada com níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ). Nas Figuras 8, 9 e 10, são apresentados os perfis da purificação das proteínas Log1N, Log1C e Log2N, respectivamente. As frações eluídas no pico de

absorção a 280 nm, durante o gradiente crescente de imidazol, foram aplicadas em géis de SDS-PAGE (FIGURAS 12B, 13B e 14B). Observa-se que nas três purificações os picos de absorção a 280 nm corresponderam com as frações de maior concentração das proteínas Log. As frações selecionadas passaram por uma coluna de exclusão molecular para retirada do imidazol. O tampão utilizado continha 10% de glicerol para conservação das enzimas purificadas a -20°C. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford, apontando 3,8 mg/mL para a enzima Log1N, 1,4 mg/mL para a enzima Log2N e 0,3 mg/mL para a enzima Log1C. Após a retirada do imidazol das frações coletas as proteínas foram aplicadas em gel desnaturante SDS-PAGE, confirmando assim o grau de pureza da proteína.

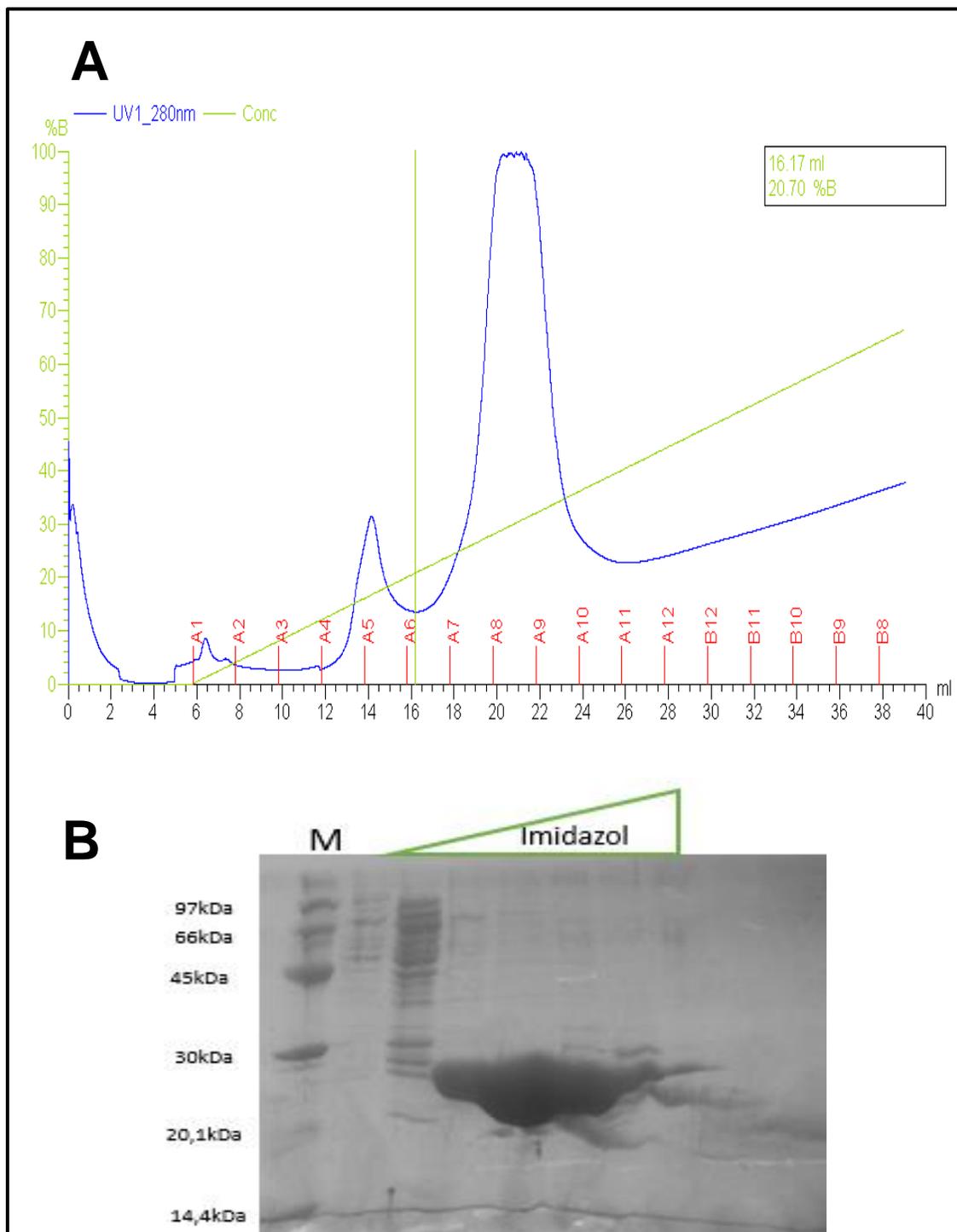
**FIGURA 12. PERFIL DE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA LOG1N**



Na parte A é apresentado o perfil cromatográfico de eluição da proteína Log1N. A linha em azul refere-se a absorvância a 280nm, a linha verde ao gradiente de imidazol. Entre as frações A5 a A10 é possível verificar um pico com alta absorção a 280 nm. Na parte B, essas frações (A5 a A10) foram carregadas em um gel de SDS-PAGE.

**FIGURA 13. PERFIL DE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA Log1C**

Na parte A é apresentado o perfil cromatográfico de eluição da proteína Log1C. A linha em azul refere-se a absorvância a 280nm, a linha verde ao gradiente de imidazol. Entre as frações A7 a A10 é possível verificar um pico com alta absorção a 280 nm. Na parte B, essas frações foram carregadas em um gel de SDS-PAGE.

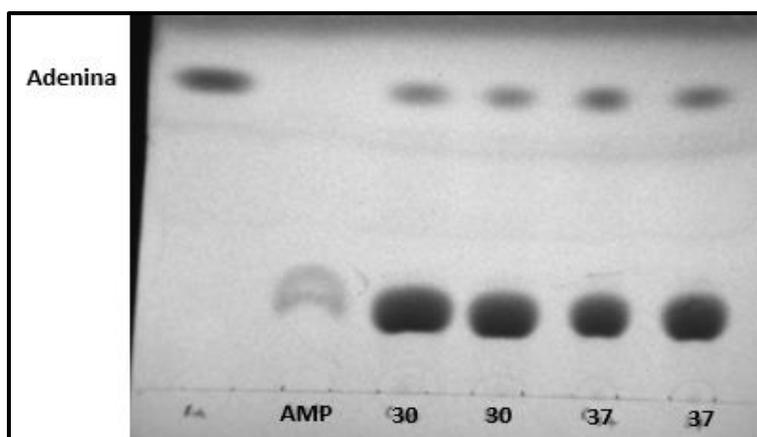
**FIGURA 14. PERFIL DE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA Log2N**

Na parte A é apresentado o perfil cromatográfico de eluição da proteína Logn2N. A linha em azul refere-se a absorvância a 280 nm, a linha verde ao gradiente de imidazol. Entre as frações A7 a A10 é possível verificar um pico com alta absorção a 280 nm. Na parte B, essas frações foram carregadas em um gel de SDS-PAGE.

### 5.5. Ensaio de atividade fosforribosidrolase

Inicialmente, para se determinar se as Logs de *A. brasilense* FP2 apresentavam atividade fosforribosidrolase contra AMP, conforme descrito anteriormente para outras Logs já caracterizadas (Hinsch et al., 2015; Samanovic et al., 2015; Seo et al., 2016), a reação foi incubada a 37°C e 30°C por 16 h. A enzima fosforribosidrolase hidrolisa a ligação N-glicosídica entre a fosforribose e a base nitrogenada. Portanto, se as Logs de *A. brasilense* FP2 apresentassem atividade fosforribosidrolase era esperado o aparecimento de uma banda correspondente a adenina após reação. Na figura 15 é mostrado resultado da cromatografia em camada delgada (CCD) das reações com Log1N a 30°C e 37°C. Também foi realizado uma reação controle, sem a enzima, para verificar a ocorrência de hidrolise espontânea, foi possível ver que a hidrolise só ocorre na presença da enzima.

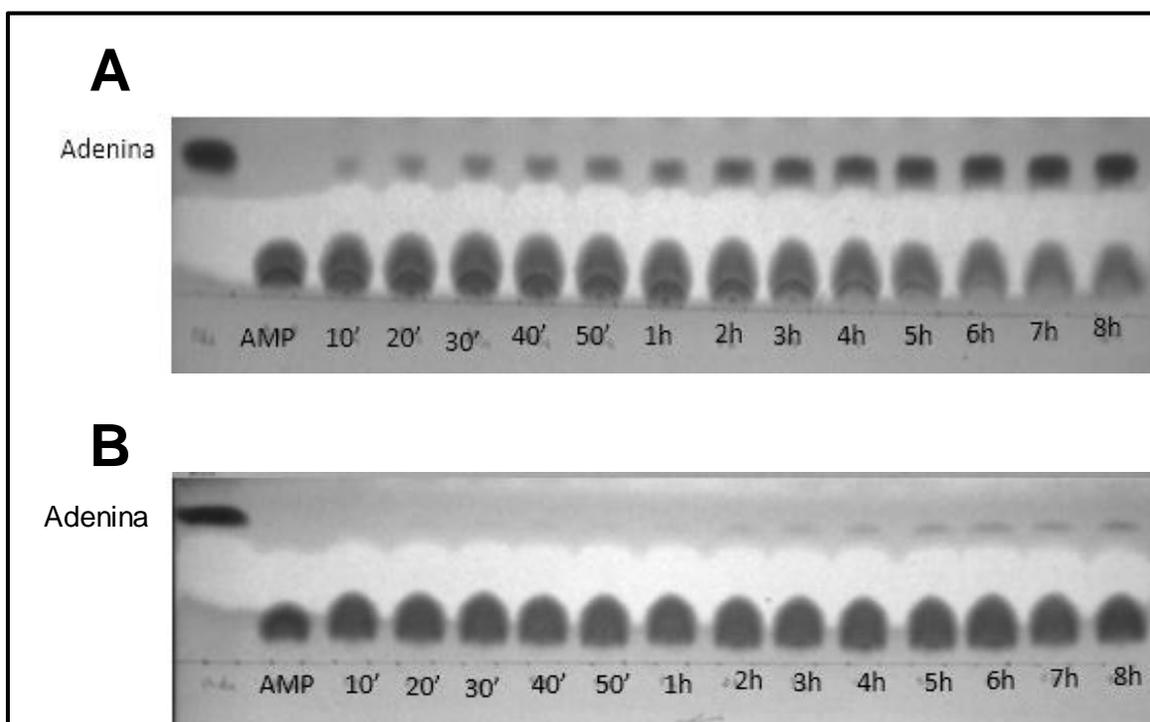
**FIGURA 15.** CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA REAÇÃO DE Log1N CONTRA AMP.



A atividade de fosforribosidrolase foi determinada com 30 µg de Log1N em Tris-HCl 36 mM, pH 8,0 e 20 mM de AMP. As reações foram analisadas por CCD aplicando 5 µL da mistura reacional em placas de sílica impregnadas com indicador de fluorescência ( $F_{254nm}$ ). Os padrões de adenina e AMP estão indicados na primeira e segunda pistas, respectivamente. As temperaturas de incubação das reações estão indicadas abaixo das pistas 3 a 6.

Pode-se observar que após a incubação nas duas temperaturas foi possível observar o aparecimento da banda de adenina, na parte superior da imagem. Quando AMP foi incubado na ausência de Log1N, não houve aparecimento da banda de adenina, indicando que a reação foi dependente de catálise enzimática. Com esta confirmação, foi realizado um ensaio cinético com as enzimas purificadas Log1N e Log1C (FIGURA 16).

**FIGURA 16.** ENSAIO CINÉTICO DA ATIVIDADE FOSFORIBOHIDROLASE Log1N E Log1C FRENTE AO AMP

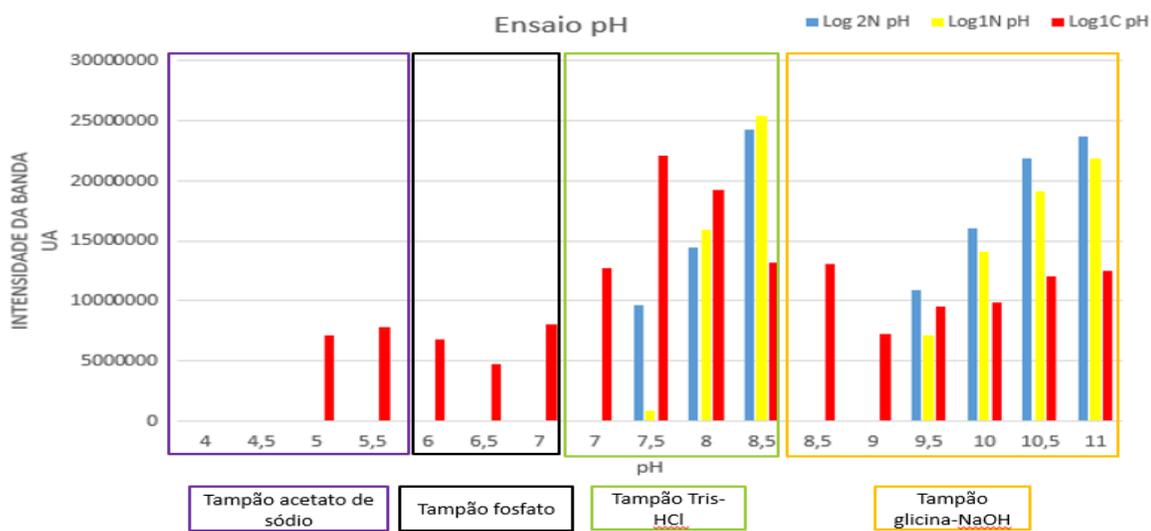


A atividade de fosforribosiltransferase foi determinada com 15  $\mu\text{g}$  de Log1C (parte A da figura) e 15  $\mu\text{g}$  de Log1N (parte B da figura) em Tris-HCl 36 mM, pH 8,0 e 20 mM de AMP. As reações foram analisadas por CCD aplicando 5  $\mu\text{L}$  da mistura reacional em placas de sílica impregnadas com indicador de fluorescência ( $F_{254\text{nm}}$ ). Os padrões de adenina e AMP estão indicados na primeira e segunda pistas, respectivamente. As reações foram incubadas a 37°C. Os tempos de retirada de amostragem estão indicados na parte de baixo de cada pista.

A atividade da Log1C foi superior à da Log1N já que é possível observar que a Log1C conseguiu produzir quantidade detectável de adenina mesmo em apenas 10 min de reação. A Log1N produziu quantidade detectável de adenina apenas com 2 h de reação. Além disso, com 8 h de reação há uma diferença marcante na quantidade de adenina produzida pela Log1C em comparação a Log1N.

Também foram realizados ensaios afim de verificar o comportamento das enzimas em várias faixas de pH. O ensaio foi realizado com as enzimas Log1N e Log2N e não houve diferenças significativas em relação a atividade das enzimas nas faixas de pH testadas, sendo que ambas não têm atividade em tampão glicina-NaOH com pH 8,5 e 9,0. Entretanto, ambas possuem atividade no tampão Tris-HCl em pH 8,5. Possivelmente, o tipo de tampão nessa faixa de pH esteja influenciando a atividade enzimática. Já a Log1C possui atividade do pH 5,0 até o pH 11,0; sendo que a faixa entre o pH 7,0 - 8,5 no tampão Tris-HCl foi a de maior atividade (FIGURA 17). Esses resultados indicam que não somente a atividade, mas também a estabilidade ao pH variou conforme a posição da cauda de histidinas.

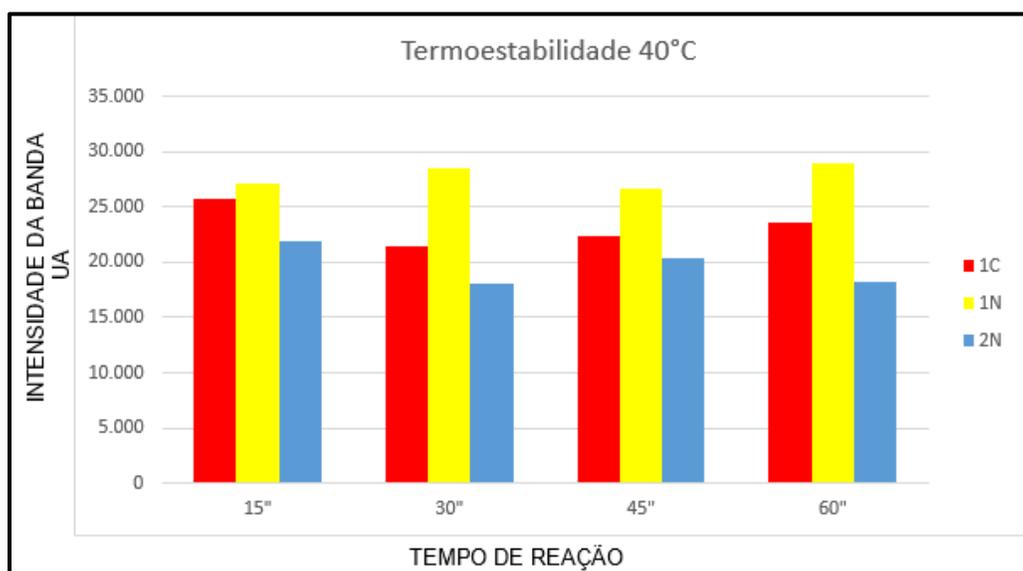
**FIGURA 17.** ENSAIO DO pH NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS Log DE *A. brasilense* FP2 EXPRESSAS EM *E. coli* BL21(DE3).



O ensaio em várias faixas de pH a fim de verificar o comportamento das enzimas. Para o pH 4,0 - 5,5 foi utilizado tampão acetato de sódio, para pH 6,0 - 7,0 foi utilizado tampão fosfato, para o pH de 7,0 - 8,5 foi utilizado tampão Tris-HCl e para o pH de 8,5 - 11,0 foi utilizado tampão glicina-NaOH. A barra em amarelo é referente a enzima Log1N, nas barras azuis referente a enzima Log2N e em vermelho a enzima Log1C. A reação ocorreu em 36 mM no tampão referente ao pH testado e 20 mM de AMP. As reações foram analisadas por CCD aplicando 5  $\mu$ L da mistura reacional em placas de sílica impregnadas com indicador de fluorescência ( $F_{254nm}$ ). As reações foram incubadas a 37°C durante 20 min. Para representação em forma de gráfico foi calculada a intensidade de cada banda pelo programa ImageJ.

Para determinar a faixa de termoestabilidade, as enzimas Log1N, Log1C e Log2N foram incubadas de 40°C, 50°C e a 60°C por 1 h. Após a incubação amostras a atividade foi determinada em um tempo final de reação de 20 min. A figura 18 mostra o perfil de termoestabilidade para as enzimas Log na temperatura de 40°C. Verificou-se que todas as enzimas foram termoestáveis na temperatura de 40°C, durante um período de incubação de até 1h. Nenhuma delas foi termoestável nas temperaturas de 60°C ou 50°C.

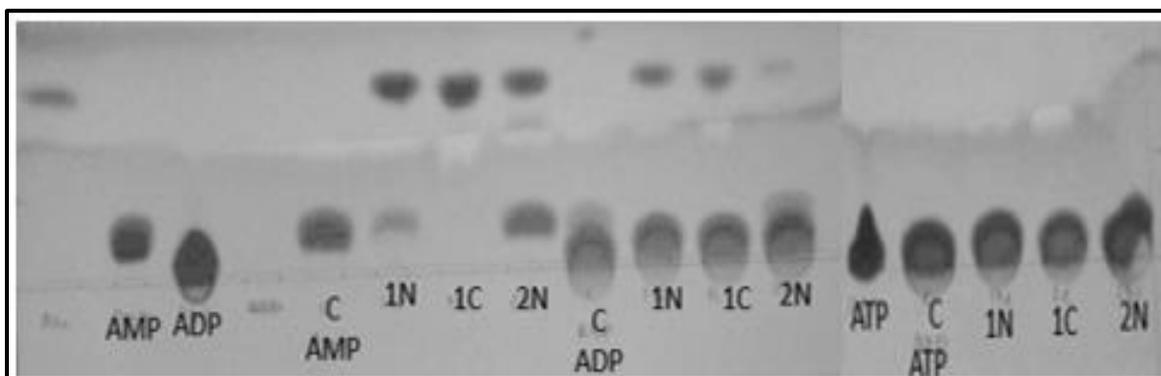
**FIGURA 18.** TERMOESTABILIDADE DAS ENZIMAS Log DE *A. brasilense* FP2 EXPRESSAS EM *E. coli* BL21(DE3)



O ensaio de termoestabilidade das enzimas Log foram pré-incubadas na temperatura de 40°C em tampão Tris-HCl 36 mM, pH 8,0. A reação ocorreu em Tris-HCl 36 mM, pH 8,0 e 20 mM de AMP. As reações foram analisadas por CCD aplicando 5 µL da mistura reacional em placas de sílica impregnadas com indicador de fluorescência (F<sub>254nm</sub>). As reações foram incubadas a 37°C. Os tempos de retirada de amostra estão indicados na parte de baixo de cada pista. Para representação em forma de gráfico foi calculada a intensidade de cada banda de adenina pelo programa ImageJ.

Para determinar se o número de fosfatos ligados a ribose teria algum efeito na catálise foram também testados como substratos os nucleotídeos adenosina difosfato (ADP) e adenosina trifosfato (ATP). Após esse ensaio com ADP e ATP foi possível ver que quanto maior o número de fosfatos no substrato, menor a atividade enzimática (FIGURA 19). Log 1 tem mais atividade sobre ADP que Log 2. No caso do ATP não houve quebra da ligação N-glicosídica por nenhuma das Logs testadas, mesmo incubando as reações por 16 h. Possivelmente, esse seja um mecanismo de preservação dos nucleotídeos energéticos ATP e ADP. Sendo assim, as células que tiverem uma alta atividade Log não terão uma depleção dos seus níveis energéticos (ATP + ADP) durante a síntese de citocininas. Além disso, a via de biossíntese de citocininas também utiliza esses nucleotídeos como intermediários de partida.

**FIGURA 19.** EFEITO DO NÚMERO DE FOSFATOS DO SUBSTRATO NA ATIVIDADE Log

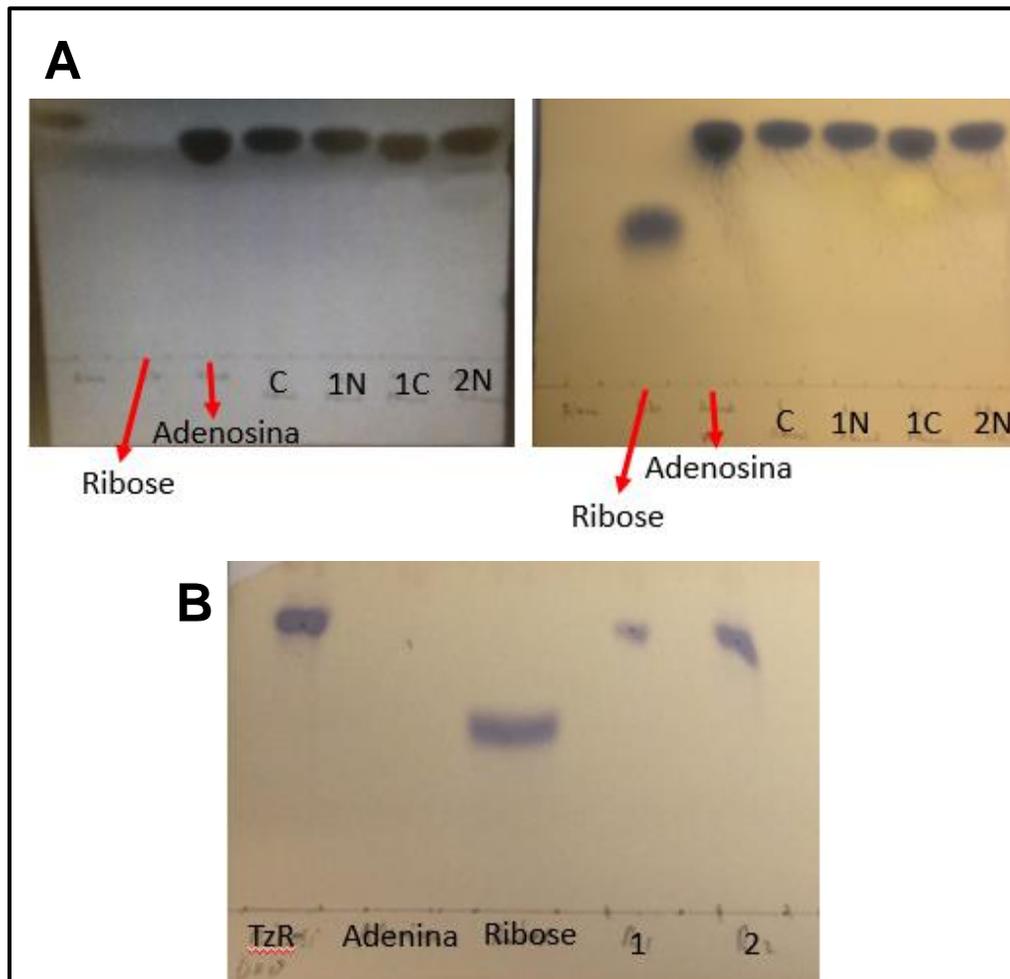


A reação ocorreu em Tris-HCl 36 mM, pH 8,0 e 20 mM de cada substrato (AMP, ADP ou ATP), conforme indicado na parte inferior das placas. As pistas 1N, 1C e 2N referem-se a reações com Log1N, Log1C e Log2N, respectivamente, a pista C AMP é uma reação contendo substrato e tampão, sem a enzima. O padrão de adenina corresponde a primeira pista do lado esquerdo da placa. As reações foram analisadas por CCD aplicando 5  $\mu$ L da mistura reacional em placas de sílica impregnadas com indicador de fluorescência ( $F_{254nm}$ ). As reações foram incubadas a 37°C por 16 h.

A partir dos resultados apresentados na figura 14, levantou-se a hipótese se a presença de fosfatos era indispensável para o reconhecimento do substrato pelas Logs de *A. brasilense* FP2. Portanto, determinou-se a atividade Log contra adenosina, que consiste de uma ribose não-fosforilada ligada à adenina (FIGURA 20A). Como é possível verificar na figura 20A, não ocorreu hidrólise da adenosina por nenhuma das Logs testadas. Tal resultado foi relatado recentemente para a Log de *Claviceps purpurea* (Hinsch et al., 2015). Os autores concluíram nesse trabalho que a presença de ao menos um fosfato ligado a carbono 5' da ribose é fundamental para o reconhecimento e catálise pela Log de *Claviceps purpurea*. Os resultados apresentados aqui indicam que as Logs de *A. brasilense* seguem o mesmo perfil catalítico.

Na figura 20B também é possível verificar que as enzimas Log de *A. brasilense* FP2 também não hidrolisaram o substrato tzR (trans-zeatina ribose). Possivelmente, a ausência do fosfato ligado a ribose impediu o reconhecimento de tzR pelas Logs de *A. brasilense* FP2.

**FIGURA 20.** ENSAIO ENZIMÁTICO DAS ENZIMAS Log DE *A. brasilense* FP2 EXPRESSAS EM *E. coli* BL21(DE3)



A atividade de fosforribosidrolase foi determinada com 15  $\mu$ g das enzimas Log em Tris-HCl 36 mM, pH 8,0 e 20 mM dos substratos adenosina (A) ou trans-zeatina ribose (tzR) (B), conforme indicado na parte inferior das placas. Na parte A, as pistas C, 1N, 1C e 2N referem-se as reações controle, com Log1N, Log1C e Log2N, respectivamente. Na parte A, a placa da esquerda foi revelada por irradiação com luz UV 254 nm, enquanto a placa da direita foi revelada com 1% de orcinol para detecção de açúcares. Os padrões de adenina, ribose e adenosina estão indicados da esquerda para a direita nas pistas 1, 2 e 3, respectivamente. Na parte B, apenas a enzima Log1C foi utilizada em 2 reações com 15 (pista identificada com #1) e 30  $\mu$ g (pista identificada com #2) de enzima. Os padrões de tzR, adenina e ribose estão indicados nas pistas 1, 2, e 3, respectivamente. Na placa B, apenas o orcinol foi utilizado como revelador. As reações foram incubadas a 37°C por 16 h. Fase móvel utilizada: acetato de etila: ácido acético: propanol: água (4:2:2:1).

A concentração de 20 mM de substratos escolhida nesse trabalho para determinar a atividade Log baseou-se no trabalho de SEO et al. (2016). Entretanto,

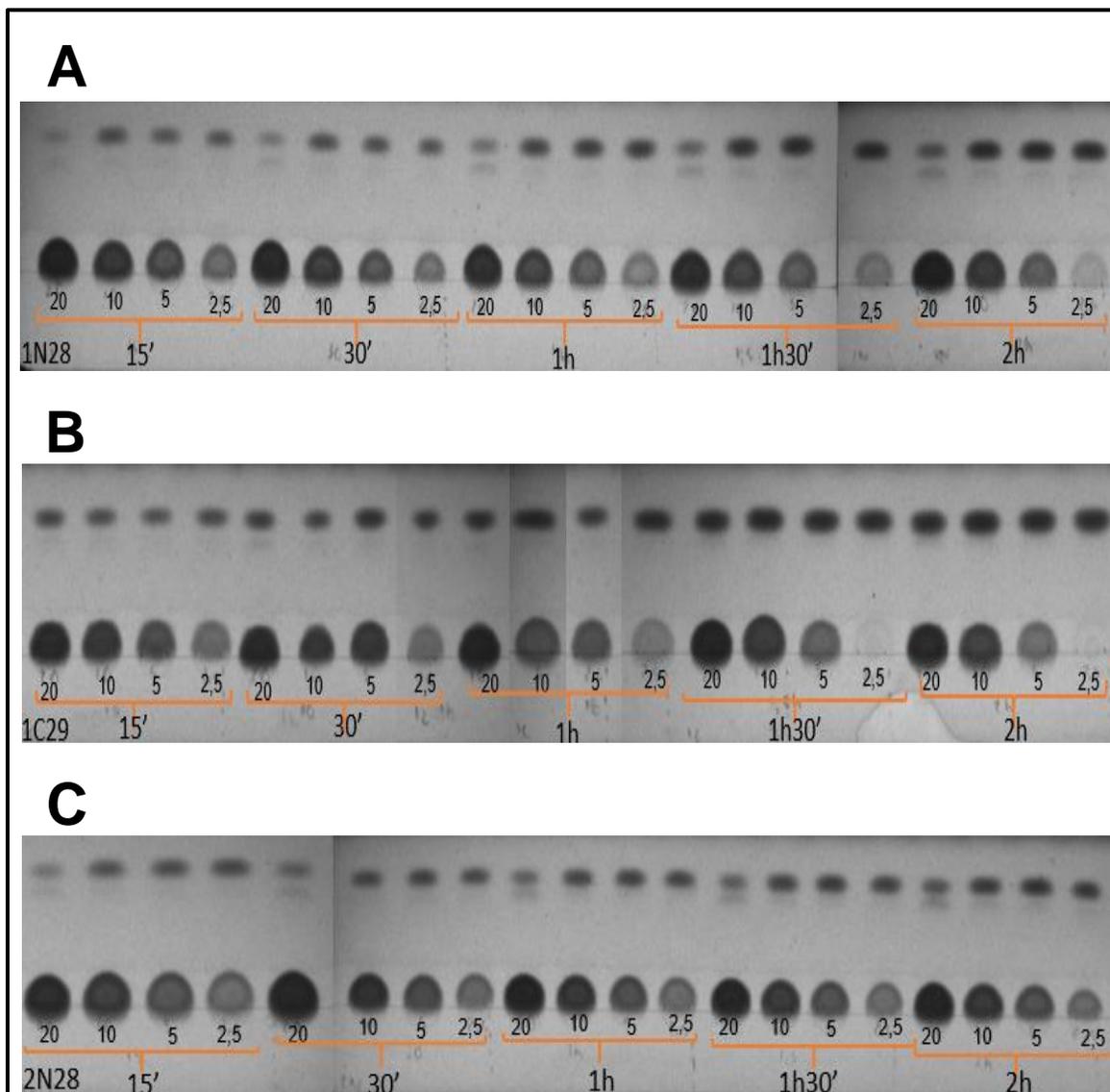
esses autores não apresentaram uma justificativa pela escolha de tal concentração. Aparentemente, 20 mM de AMP poderia ser uma concentração largamente saturante e isso levaria a enzima Log a catalisar sua reação em estado estacionário. Para verificar tal hipótese, um experimento com diferentes concentrações de AMP foi realizado com as enzimas Log1N, Log1C e Log2N de *A. brasilense* FP2 expressas em *E. coli* BL21(DE3) (FIGURA 21).

Os resultados mostram que as enzimas Log1N e Log2N apresentaram uma menor velocidade de reação quando incubadas com 20 mM de AMP (FIGURA 21A e C). Aparentemente a presença da cauda de histidinas na parte N-terminal das enzimas Log1 e Log2 gerou um efeito inibitório do AMP. Isso pode ser justificado por um aumento na afinidade de ligação ao AMP e uma redução na constante catalítica  $k_{cat}$ . Dessa forma as enzimas Log1N e Log2N em alta concentração de AMP (20 mM) terão uma concentração elevada de complexo enzima-substrato ([ES]), mas o tempo para desfazer esse complexo pela liberação do produto é maior. Isso leva a um efeito de inibição pelo substrato.

O mesmo efeito não foi observado para enzima Log1C, pois a intensidade das bandas em 2.5 para 20 mM de AMP foram similares em todos os tempos de reação avaliados. Também é possível verificar uma maior velocidade de reação para a enzima Log1C.

Infelizmente, durante a execução desses experimentos não foi possível encontrar uma maneira consistente de quantificar a intensidade das bandas detectadas na CCD. Acredita-se que para gerar resultados cinéticos mais consistentes será necessário analisar os produtos da reação por técnicas mais precisas de instrumentação, tais como espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear.

**FIGURA 21.** EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMP NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS Log DE *A. brasilense* FP2 EXPRESSAS EM *E. coli* BL21(DE3)



A atividade de fosforribosiltransferase foi determinada com 15  $\mu$ g das enzimas Log1N (A), Log1C (B) e Log2N (C) em Tris-HCl 36 mM, pH 8,0 e concentrações de 20, 10, 5 e 2,5 mM de AMP. As concentrações de substrato estão indicadas na parte inferior de cada pista. A banda inferior refere-se ao AMP e a banda superior ao produto adenina. As reações foram incubadas a 37°C e amostras foram retiradas em diferentes tempos conforme indicado abaixo dos colchetes laranjas.

As enzimas caracterizadas nesse trabalho poderão agora ser superexpressas em *A. brasilense* para observarmos se a bactéria produzirá maior quantidade de citocininas e se tal efeito contribuirá com o desenvolvimento vegetal.

## 6. CONCLUSÃO

A partir deste trabalho foi possível caracterizar funcionalmente as enzimas Log1 e Log2 de *A. brasilense* FP2 após superexpressão em *E. coli* e purificação cromatográfica. A determinação da atividade enzimática revelou que ambas as enzimas são fosforribosidrolases. Entretanto, os dados desse trabalho mostram que a enzima Log1 é mais ativa frente ao substrato AMP do que a enzima Log2. Também se determinou que a cauda de 6 histidinas na porção N-terminal tem um efeito negativo na atividade da enzima Log1 e provavelmente gera um efeito de inibição ao substrato em altas concentrações de AMP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, A., Hasnain, S., 2014. Auxins as one of the factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria. *Pol J Microbiol.* 63, 261-6.
- Almquist, J., Cvijovic, M., Hatzimanikatis, V., Nielsen, J., Jirstrand, M., 2014. Kinetic models in industrial biotechnology - Improving cell factory performance. *Metab Eng.* 24, 38-60.
- Barea, J. M., Navarro, M., and Montoya, E. 1976. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 40, 129–134
- Barton, N. R., Burgard, A. P., Burk, M. J., Crater, J. S., Osterhout, R. E., Pharkya, P., Steer, B. A., Sun, J., Trawick, J. D., Van Dien, S. J., Yang, T. H., Yim, H., 2015. An integrated biotechnology platform for developing sustainable chemical processes. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 42, 349-60.
- Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., Tuteja, N., 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microb Cell Fact.* 13, 66.
- Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D., Pharis, R. P., 1989. Identification of Gibberellins A(1), A(3), and Iso-A(3) in Cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol.* 90, 45-7.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72, 248-254.
- Cassan, F., Perrig, D., Sgroy, V., Luna, V., 2011. Basic and Technological Aspects of Phytohormone Production by Microorganisms: *Azospirillum* sp. as a Model of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: Maheshwari, D. K., (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management.* Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 141-182.
- Cassan, F., Vanderleyden, J., Spaepen, S., 2014. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation.* 33, 440-459.

- Cassan, F.D.; Garcia de Salamone, I. 2008. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, p.49-59.
- Conrad, K., Bettin, D., Neumann, S., 1992. The Cytokinin Production of *Azospirillum* and *Klebsiella* and Its Possible Ecological Effects. *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. 401-405.
- Cortes-Jimenez, D., Gomez-Guzman, A., Iturriaga, G., Suarez, R., Alpirez, G. M., Escalante, F. M. E., 2014. Microorganisms associated to tomato seedlings growing in saline culture act as osmoprotectant. *Braz J Microbiol*. 45, 613-620.
- Costacurta, A., Vanderleyden, J., 1995. Synthesis of Phytohormones by Plant-Associated Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. 21, 1-18.
- de Souza, R., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. P., 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet Mol Biol*. 38, 401-419.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., CaballeroMellado, J., Aguirre, J.F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S., and Okon, Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol*. 28: 871–879
- Esquivel-Cote, R., Ramirez-Gama, R. M., Tsuzuki-Reyes, G., Orozco-Segovia, A., Huante, P., 2010. *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. *Plant Soil*. 337, 65-75.
- Geddes, B. A., Ryu, M. H., Mus, F., Garcia Costas, A., Peters, J. W., Voigt, C. A., Poole, P., 2015. Use of plant colonizing bacteria as chassis for transfer of N(2)-fixation to cereals. *Curr Opin Biotechnol*. 32, 216-22.
- Glick, B. R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109–117.
- Ha, S., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L. S., 2012. Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends Plant Sci*. 17, 172-9.
- Hauf, W., Schlebusch, M., Hüge, J., Kopka, J., Hagemann, M., Forchhammer, K., 2013. Metabolic Changes in *Synechocystis* PCC6803 upon Nitrogen-

Starvation: Excess NADPH Sustains Polyhydroxybutyrate Accumulation. *Metabolites*. 3, 101-18.

Hinsch, J., Vrabka, J., Oeser, B., Novak, O., Galuszka, P., Tudzynski, P., 2015. De novo biosynthesis of cytokinins in the biotrophic fungus *Claviceps purpurea*. *Environ Microbiol*. 17, 2935-51.

Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H., Sakakibara, H., 2008. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot*. 59, 75-83.

Horemans, S., De Koninck, K., Neuray, J., Hermans, R., and Vlassak, K. 1986. Production of plant growth substances by *Azospirillum* sp. and other rhizosphere bacteria. *Symbiosis* 2, 341–346.

Hussain, A., Hasnain, S., 2011. Phytostimulation and biofertilization in wheat by cyanobacteria. *J Ind Microbiol Biot*. 38, 85-92.

Jiskrová, E., Kubalová, I., Ikeda, Y., 2015. 2 - What turns on and off the cytokinin metabolisms and beyond. *Applied Plant Genomics and Biotechnology*. Woodhead Publishing, Oxford, pp. 17-34.

Joshi, M. V., Loria, R., 2007. *Streptomyces turgidiscabies* possesses a functional cytokinin biosynthetic pathway and produces leafy galls. *Mol Plant Microbe Interact*. 20, 751-8.

Kakimoto, T., 2003. Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research*. 116, 233-239.

Kamnev, A. A., Antonyuk, L. P., Chernyshev, A. V., Ignatov, V. V., De Vargas, M. C., 1996. Spectroscopic characterization of mineral crystals produced by the bacterium *Azospirillum brasilense*. *Anal Bioanal Chem*. 355, 739-41.

Kansiz, M., Billman-Jacobe, H., McNaughton, D., 2000. Quantitative determination of the biodegradable polymer Poly(beta-hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics. *Appl Environ Microbiol*. 66, 3415-20.

Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H., Kyojuka, J., 2007. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*. 445, 652-5.

Kuroha, T., Tokunaga, H., Kojima, M., Ueda, N., Ishida, T., Nagawa, S., Fukuda, H., Sugimoto, K., Sakakibara, H., 2009. Functional analyses of LONELY GUY

cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 21, 3152-69.

Liu, F. C., Xing, S. J., Ma, H. L., Du, Z. Y., Ma, B. Y., 2013. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Appl Microbiol Biot*. 97, 9155-9164.

Machado, H. B., Yates, M. G., Funayama, S., Rigo, L. U., Steffens, M. B., Souza, E. M., Pedrosa, F. O., 1995. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3*-like-*ntrB*-*ntrC* operon and are negatively regulated. *Can J Microbiol*. 41, 674-84.

Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G., Kakimoto, T., 2006. Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 16598-603.

Mortier, V., Wasson, A., Jaworek, P., De Keyser, A., Decroos, M., Holsters, M., Tarkowski, P., Mathesius, U., Goormachtig, S., 2014. Role of LONELY GUY genes in indeterminate nodulation on *Medicago truncatula*. *New Phytol*. 202, 582-93.

Mus, F., Crook, M. B., Garcia, K., Garcia Costas, A., Geddes, B. A., Kouri, E. D., Paramasivan, P., Ryu, M. H., Oldroyd, G. E., Poole, P. S., Udvardi, M. K., Voigt, C. A., Ane, J. M., Peters, J. W., 2016. Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. *Appl Environ Microbiol*. 82, 3698-710.

Norholm, M. H., 2010. A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. *BMC Biotechnol*. 10, 21.

Palmer, I., Wingfield, P. T., 2004. Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci*. Chapter 6, Unit 6 3.

Pankiewicz, 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., 2015. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. *Plant J*. 81, 907-19.

Pedrosa, F. O., Yates, M. G., 1984. Regulation of Nitrogen-Fixation (*Nif*) Genes of *Azospirillum-Brasilense* by *NifA* and *Ntr* (Gln) Type Gene-Products. *FEMS Microbiology Letters*. 23, 95-101.

- Pertry, I., Vaclavikova, K., Gemrotova, M., Spichal, L., Galuszka, P., Depuydt, S., Temmerman, W., Stes, E., De Keyser, A., Riefler, M., Biondi, S., Novak, O., Schmulling, T., Strnad, M., Tarkowski, P., Holsters, M., Vereecke, D., 2010. *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic fas-mediated production of a cytokinin mix. *Mol Plant Microbe Interact.* 23, 1164-74.
- Sahoo, R. K., Ansari, M. W., Dangar, T. K., Mohanty, S., Tuteja, N., 2014a. Phenotypic and molecular characterisation of efficient nitrogen-fixing *Azotobacter* strains from rice fields for crop improvement. *Protoplasma.* 251, 511-523.
- Sahoo, R. K., Ansari, M. W., Pradhan, M., Dangar, T. K., Mohanty, S., Tuteja, N., 2014b. Phenotypic and molecular characterization of native *Azospirillum* strains from rice fields to improve crop productivity. *Protoplasma.* 251, 943-53.
- Sakakibara, H., Kasahara, H., Ueda, N., Kojima, M., Takei, K., Hishiyama, S., Asami, T., Okada, K., Kamiya, Y., Yamaya, T., Yamaguchi, S., 2005. *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 9972-7.
- Samanovic, M. I., Tu, S., Novak, O., Iyer, L. M., McAllister, F. E., Aravind, L., Gygi, S. P., Hubbard, S. R., Strnad, M., Darwin, K. H., 2015. Proteasomal control of cytokinin synthesis protects *Mycobacterium tuberculosis* against nitric oxide. *Mol Cell.* 57, 984-94.
- Sambrook, J., Russell, D. W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Seo, H., Kim, K.-J., 2017. Structural basis for a novel type of cytokinin-activating protein. *Sci Rep-Uk.* 7, 45985.
- Seo, H., Kim, S., Sagong, H. Y., Son, H. F., Jin, K. S., Kim, I. K., Kim, K. J., 2016. Structural basis for cytokinin production by LOG from *Corynebacterium glutamicum*. *Sci Rep.* 6, 31390.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Okon, Y., 2009. Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. *Adv Bot Res.* 51, 283-320.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev.* 31, 425-48.

- Strzelczyk E., Kampert M., Li C. Y. 1994. Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149, 55–60.
- Studier, F. W., Moffatt, B. A., 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 189, 113-30.
- Sugawara, H., Ueda, N., Kojima, M., Makita, N., Yamaya, T., Sakakibara, H., 2008. Structural insight into the reaction mechanism and evolution of cytokinin biosynthesis. *P Natl Acad Sci USA.* 105, 2734-2739.
- Thomson, A. J., Giannopoulos, G., Pretty, J., Baggs, E. M., Richardson, D. J., 2012. Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 367, 1157-1168.
- Tien, T. M., Gaskins, M. H., and Hubell, D. H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L). *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 1016–1024.
- Tien, T. M., Gaskins, M. H., Hubbell, D. H., 1979. Plant-Growth Substances Produced by *Azospirillum-Brasilense* and Their Effect on the Growth of Pearl-Millet (*Pennisetum-Americanum* L). *Appl Environ Microb.* 37, 1016-1024.
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., Aronsson, A. C., 2017. Perspectives and Challenges of Microbial Application for Crop Improvement. *Front Plant Sci.* 8, 49.
- Timmusk, S., Nicander, B., Granhall, U., Tillberg, E., 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem.* 31, 1847-1852.
- TREWAVAS, A. J. AND CLELAND, R. E. 1983. Is plant development regulated by changes in the concentration of growth substances or by changes in the sensitivity to growth substances? *Trends in Biochemmical Sciences*, 8, 354-357.
- Tribelli, P. M., Nikel, P. I., Oppezzo, O. J., Lopez, N. I., 2013. Anr, the anaerobic global regulator, modulates the redox state and oxidative stress resistance in *Pseudomonas extremaustralis*. *Microbiology.* 159, 259-68.
- Tribelli, P. M., Raiger Iustman, L. J., Catone, M. V., Di Martino, C., Revale, S., Mendez, B. S., Lopez, N. I., 2012. Genome sequence of the polyhydroxybutyrate producer *Pseudomonas extremaustralis*, a highly stress-resistant Antarctic bacterium. *J Bacteriol.* 194, 2381-2.

- Ueda, N., Kojima, M., Suzuki, K., Sakakibara, H., 2012. *Agrobacterium tumefaciens* tumor morphology root plastid localization and preferential usage of hydroxylated prenyl donor is important for efficient gall formation. *Plant Physiol.* 159, 1064-72.
- Weller D.M., Tomashow L.S., 1994. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. In: O’Gara F, Dowling DN, Boesten B (eds) *Molecular ecology of rhizosphere microorganisms. Biotechnology and release of GMOs.* VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, pp 1–18.
- Werner, T., Schmulling, T., 2009. Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biol.* 12, 527-38.
- Zurcher, E., Liu, J., di Donato, M., Geisler, M., Muller, B., 2016. Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science.* 353, 1027-1030.

## ANEXO

### Sequências utilizadas no alinhamento da FIGURA 19 e 20.

#### Log 1 de *Azospirillum brasilense* SP7

>gi|737707008|ref|WP\_035675854.1| LOG family protein [Azospirillum brasilense]  
 MRICVYAGSNPGTNPAYGEAAEQLGRHMAERGIGLVYGGGRTGLMGRIADVLAA  
 GGTVTGIIPQFLMDKEVGHQGLQELRIVATMHERKALMAELSDGFIALPGGIGTLE  
 ELFEVWTWAQLGRHDKPCGLLNAAGFYDGLAGFLDHVAGERFMQPKHRDMLIV  
 RDTAPGILDAAFAAYEPPAVRKWLDEART

#### Log 2 de *Azospirillum brasilense* SP7

>gi|737706087|ref|WP\_035674933.1| lysine decarboxylase [Azospirillum  
 brasilense]

MKALNSVCVYCGSSSRVAAVHKEAAHMLGDGLARRGIQLVYGGGRVGLMGIAA  
 DAALAAGGQVVGIIPEHIQSAEIEHTGLTELHVVDMSMTRKRMMVDRADAFVVLV  
 GGLGTLDEAFEILTWKQLGLHDKPVVIADVDGYWRPLLGLIEHTVAQGFTQPAHR  
 ALYTVVDDVDVFAALAYEPEPTLKIPTQKL

### Sequências utilizadas para o alinhamento e construção da árvore.

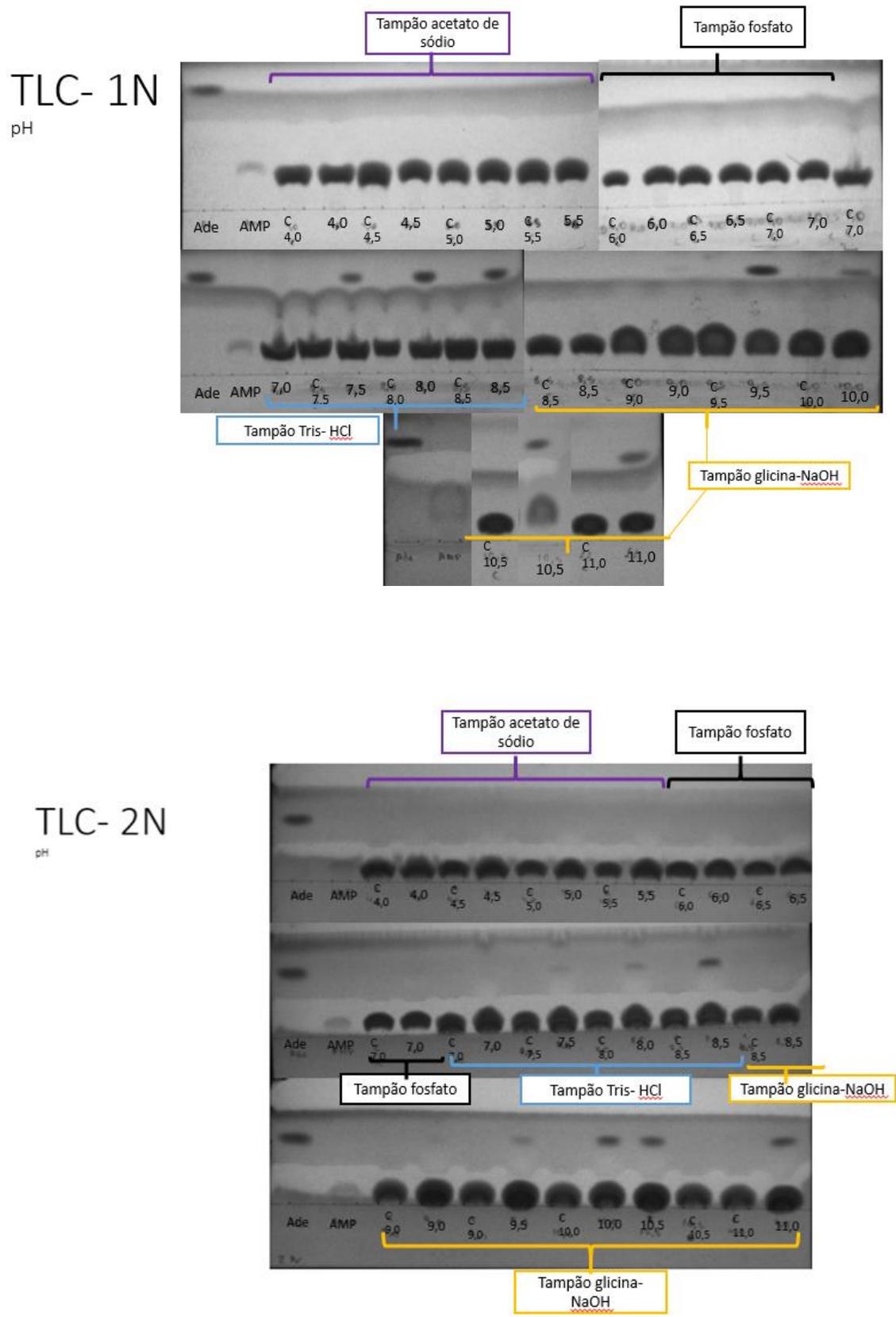
TABELA 06: SEQUÊNCIAS OBTIDAS NO NCBI UTILIZADAS NO ALINHAMENTO E NA CONSTRUÇÃO DA ARVORE FILOGENÉTICA.

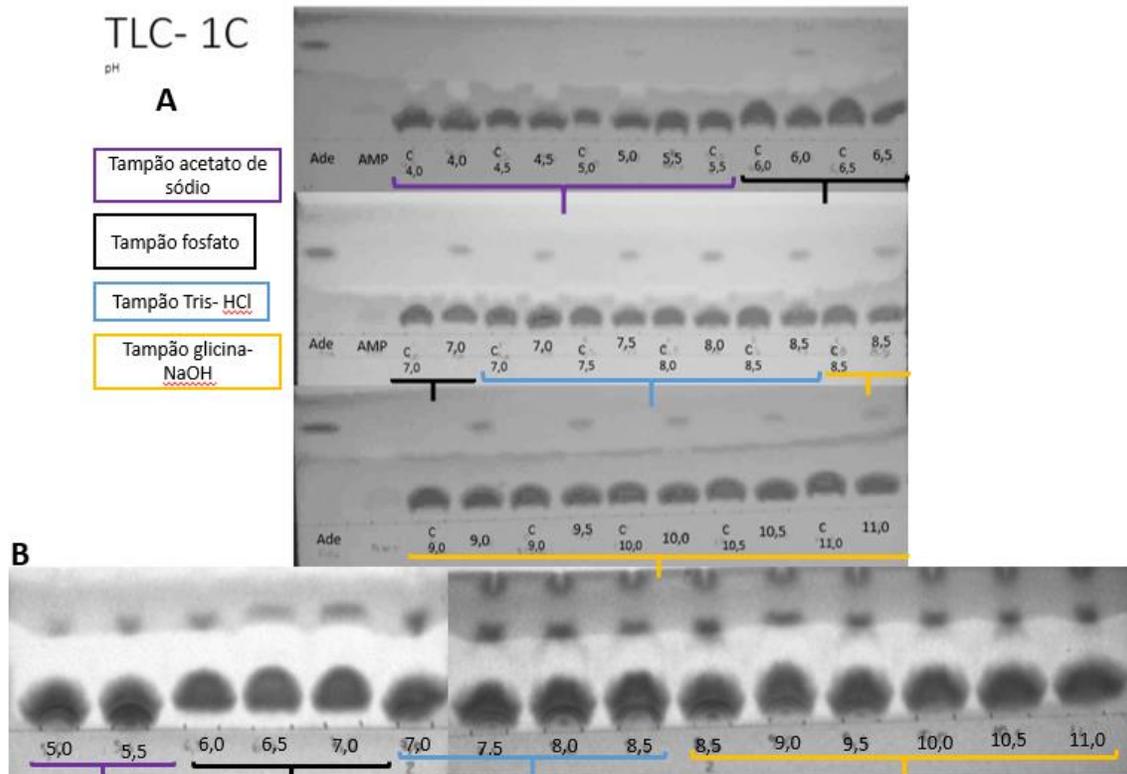
	Referência da sequência	Organismo	Descrição	aa	ID Log1	ID Log2
1	75158446	<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtLOG1)	Citocinina 5' monofosfato fosforribohidrolase	213	49%	44%
2	60547739	<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtLOG2)	Proteína hipotética	213	48%	45%

3	61742647	<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtLOG3)	Proteína hipotética	215	50%	44%
4	75174117	<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtLOG4)	Citocinina 5' monofosfato fosforribohidrolase	215	49%	44%
5	75154955	<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtLOG5)	Citocinina 5' monofosfato fosforribohidrolase	228	49%	43%
6	332003196	<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtLOG6)	Lisina descarboxilase	229	41%	38%
7	298351838	<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtLOG7)	Citocinina 5' monofosfato fosforribohidrolase	217	50%	44%
8	30102598	<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtLOG8)	Proteína família LOG	216	45%	44%
9	737707008	<i>Azospirillum brasilense</i> (LOG1)	Proteína família LOG	192	100%	48%
10	737706087	<i>Azospirillum brasilense</i> (LOG2)	Lisina descarboxilase	194	48%	100%
11	1002234376	<i>Oryza sativa</i>	Citocinina 5' monofosfato fosforribohidrolase	242	51%	42%

12	WP_01323522 9	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	-	198	54%	46%
13	WP_01395599 2	<i>Cupriavidus necator</i>	-	194	59%	52%
14	WP_01769526 6	<i>Bacillus subtilis</i>	-	190	48%	39%
15	WP_01558613 6	<i>Rhodococcus fascians</i>		198	49%	49%
16	WP_00345742 1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	195	61%	54%
17	SGD11176	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	191	48%	43%
18	1WEK	<i>Thermus thermophilus</i>	Proteína hipotética	217	29%	35%
19	5ITS	<i>Corynebacteriu m 48glutamicum (CgLOG)</i>	LOG	203	48%	44%
20	5WQ3	<i>Corynebacteriu m glutamicum (CgLOGII)</i>	Lisina descarboxinase	264	28%	30%

**FIGURA 22.** CCD DOS ENSAIOS DO EFEIO DO pH NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS Log.





As imagens TLC- 1N, TLC- 2N e TLC- 1C foram coletadas após reações enzimáticas contendo tampão em diferentes pH e os controles negativos que revelam que não ocorreu hidrólise espontânea do substrato.