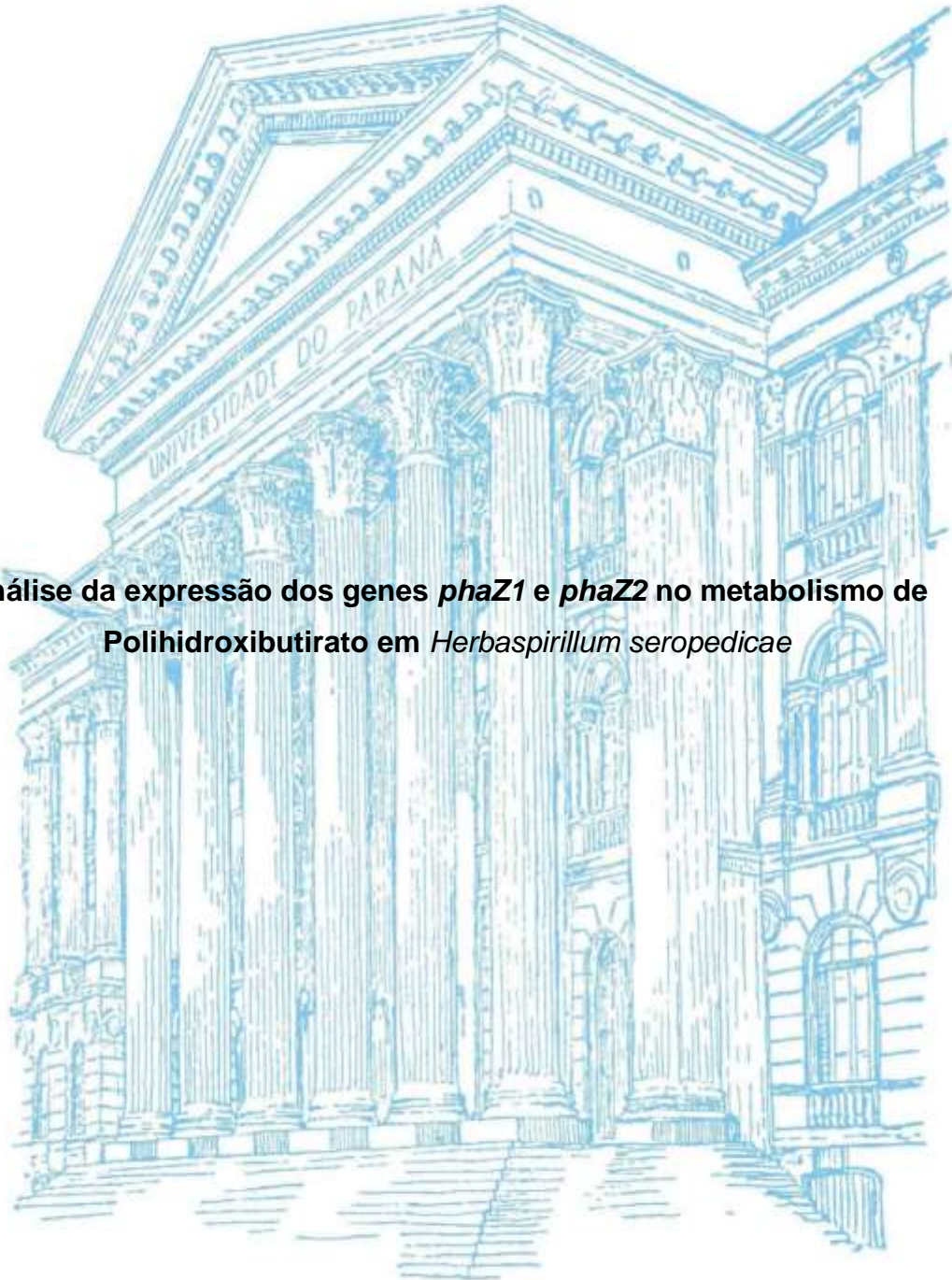


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCISCO JOSÉ TELES MOTA

Análise da expressão dos genes *phaZ1* e *phaZ2* no metabolismo de Polihidroxibutirato em *Herbaspirillum seropedicae*



CURITIBA

2017

FRANCISCO JOSÉ TELES MOTA

Análise da expressão dos genes *phaZ1* e *phaZ2* no metabolismo de Polihidroxi-butirato em *Herbaspirillum seropedicae*

Monografia apresentada à disciplina Monografia I e II como requisito parcial à conclusão do curso de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leda Satie Chubatsu

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Müller-Santos

CURITIBA

2017

Ao meu pai,
Francisco Romão Mota (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Gratidão aos meus pais pelo amor e apoio incondicional ao longo da vida, e as minhas irmãs pelo carinho que sempre tiveram comigo.

A ciência da vida me encanta desde o ensino médio, gratidão aos meus professores pelo conhecimento compartilhado, em especial ao Prof. Junior Ferreira.

Meus sinceros agradecimentos a Silvia e Fabiola Corbucci, por terem me incentivado a estudar. Fabiola, você foi minha inspiração num momento da vida, em que eu não acreditava mais nessa possibilidade, sou imensamente grato por tudo o que você fez por mim.

A Renata Scuzziatto e Tatiana Abdalla por todos os momentos vividos ao longo dos últimos cinco anos, foi maravilhoso ter vocês comigo nessa fase tão significativa da minha vida. Os momentos de estudo foram sem dúvida mais alegres na companhia de vocês.

Agradeço ao Prof. Victor Pauliv, pelo incentivo e companheirismo.

Ao Sr. Eli Souza Moura por todos os ensinamentos que recebi e por me orientar nesse despertar para a grandiosidade da vida, você é e será sempre um segundo Pai para mim, gratidão.

Agradeço imensamente a todos os colegas do laboratório de quem recebi orientação e apoio para a execução desse trabalho, principalmente, Prof. Marco Aurélio Oliveira, Marcelo Bueno Batista, Anelis Marin, Edson Kim, Luis Paulo, Valter Baura e Roseli Prado. Agradeço a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Leda Satie Chubatsu, pela oportunidade recebida no início da graduação, e por toda a orientação dedicada possibilitando a conclusão desse projeto. Agradeço também ao meu Coorientador Prof. Dr. Marcelo Muller-Santos por todo o apoio recebido no desenvolvimento desse projeto.

“Eu tinha a certeza de tua vida eterna, embora só a tivesse visto em enigma e como num espelho. Todavia, dissipou-se da minha mente toda a dúvida sobre a existência de uma substância incorruptível e sobre o fato de que dela provém todas as outras substâncias”

confissões VIII, 1.

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria gram negativa, diazotrófica, que se associa com plantas de interesse comercial. É capaz de produzir grandes quantidades de polihidroxibutirato (PHB), um poliéster alifático do tipo polihidroxialcanoato, sintetizado a partir da polimerização do ácido 3-hidroxibutirato e armazenado na forma de grânulos insolúveis no espaço intracelular. A biossíntese de PHB ocorre a partir de acetil-CoA em três passos: 2 moléculas de acetil-CoA são condensadas a acetoacetil-CoA, catalisada pela enzima β -cetoacil-CoA tiolase, acetoacetil-CoA é reduzido a 3-hidroxibutiril-CoA com consumo de NADPH pela enzima Acetoacetil-CoA redutase e em sequência a PHB sintase polimeriza 3-hidroxibutiril-CoA formando PHB. A análise do genoma de *H. seropedicae* identificou genes envolvidos na síntese de PHB e dois genes que codificam possíveis PHB depolimerases (PhaZ1 e PhaZ2), enzimas envolvidas na degradação de PHB. As análises de expressão gênica usando fusões plasmidiais da região promotora dos genes *phaZ1* e *phaZ2* com o gene repórter *lacZ* indicaram que *phaZ1* apresenta expressão constitutiva, sendo elevada na maioria das estirpes avaliadas, exceto no mutante Δ PhaC1, uma estirpe incapaz de sintetizar PHB. A região promotora de *phaZ1* apresenta um provável sítio de ligação para sigma 70, em sobreposição ao potencial sítio de ligação do repressor transcricional PhaR. O gene *phaZ2* encontra-se reprimido em todas as estirpes analisadas. No entanto, aumento na expressão de *phaZ2* foi observado sob cultivo em baixas concentrações de NH_4Cl , sugerindo que a expressão desse gene é dependente de RpoN. Um potencial sítio de ligação para NtrC e um promotor do tipo -24/-12 foram identificados na região promotora do gene *phaZ2*, confirmando os resultados obtidos.

Palavras-chave: Polihidroxibutirato, PHB depolimerases, *Herbaspirillum seropedicae*

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is a diazotrophic, gram negative bacterium, found in association with important agricultural crops. It is able to synthesize polyhydroxybutyrate (PHB) upon polymerization of 3-hydroxybutyrate. This polyhydroxyalkanoate-type polymer is stored as intracellular insoluble granules in the bacterial cytoplasm. The PHB biosynthesis is catalyzed by three enzymes involving (i) the condensation of two acetyl-CoA into acetoacetyl-CoA by β -ketothiolase (*phaA*), (ii) the reduction of acetoacetyl-CoA to 3-hydroxybutyryl-CoA by a NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase (*phaB*) and (iii) the polymerization of 3-hydroxybutyryl-CoA by PHB synthase (*phbC*). The *H. seropedicae* genome has genes involved on PHB synthesis and two genes encoding PHB depolymerases, enzymes that degrade PHB, named PhaZ1 and PhaZ2. Expression analyses of *phaZ1* and *phaZ2* promoters fused to the *lacZ* gene indicated that *phaZ1* is constitutively expressed showing high expression rates in all analyzed strains, except the Δ PhaC1 mutant which is unable to synthesize PHB. The *phaZ1* promoter region contains a potential sigma 70-dependent promoter, which overlaps with the putative DNA-binding site of transcriptional repressor PhaR. On the other hand, *phaZ2* expression is repressed in all analyzed strains under usual growth conditions. However, an increase in *phaZ2* expression was observed under low concentrations of NH₄Cl. A potential DNA-binding site for NtrC, as well as a typical -12/-24 promoter were observed upstream to *phaZ2*, supporting the results showing gene expression dependent on ammonium levels.

Keyword: Polyhydroxybutyrate, PHB depolymerases, *Herbaspirillum seropedicae*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Fórmula geral dos PHAs	13
FIGURA 2 - Estrutura geral do polihidroxitirato.....	14
FIGURA 3 - Grânulos de PHB na estirpe SmR1 de <i>H. seropedicae</i>	16
FIGURA 4 - Organização genômica dos genes supostamente envolvidos com o metabolismo de polihidroxitirato em <i>H. seropedicae</i>	18
FIGURA 5 - Alinhamento local das sequências proteicas dos genes <i>phaZ1</i> e <i>phaZ2</i> de <i>H. seropedicae</i>	28
FIGURA 6 - Representação estrutural dos domínios conservados presentes nas enzimas PhaZ1 e PhaZ2 de <i>H. seropedicae</i>	28
FIGURA 7 - Análise de similaridade entre sequências proteicas de PHB depolimerases.....	30
FIGURA 8 - Alinhamento múltiplo de sequências dos aminoácidos das enzimas PHB depolimerases, de <i>H. seropedicae</i> e <i>R. eutropha</i>	31
FIGURA 9 – Análise das regiões promotoras dos genes <i>phaZ1</i> e <i>phaZ2</i> de <i>H. seropedicae</i>	32
FIGURA 10 - Estratégia de clonagem utilizada para a construção das ligações dos promotores <i>phaZ1</i> e <i>phaZ2</i> ao gene repórter <i>lacZ</i>	35
FIGURA 11 - Eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 1X dos produtos de PCR utilizando colônias transformadas com ligações dos promotores depolimerases, ao vetor pPW452.....	36
FIGURA 12 - Atividade específica de β -galactosidase na estirpe SmR1 de <i>H. seropedicae</i>	37
FIGURA 13 - Atividade específica de β -galactosidase nas estirpes mutantes dos genes $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1phaZ2$	38
FIGURA 14 - Atividade específica de β -galactosidase nas estirpes mutantes dos genes $\Delta phaR$ e $\Delta phaC1$	39
FIGURA 15 - Atividade específica de β -galactosidase na estirpe SmR1 utilizando a fusão <i>phaZ2::lacZ</i>	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – LISTA DE ESTIRPES BACTERIANAS.....	21
TABELA 2 – LISTA DE PLASMÍDEOS.....	21
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO NFB-MALATO.....	22
TABELA 4 – MEIO LB.....	22
TABELA 5 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	MOBILIZAÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO EM BACTÉRIAS.....	14
1.2	METABOLISMO DE PHB EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	15
2	OBJETIVOS	19
1.1	OBJETIVO GERAL.....	19
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	19
3.2	ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS.....	20
3.3	MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	21
3.4	ANTIBIÓTICOS.....	22
3.5	PREPARAÇÃO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	23
3.6	TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA.....	23
3.6.1	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO, MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS, EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSE E QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	23
3.6.2	CLONAGEM DOS PROMOTORES <i>phaZ1</i> E <i>phaZ2</i> DE <i>H. seropedicae</i>	23
3.6.3	CONSTRUÇÃO DAS FUSÕES <i>phaZ1::lacZ</i> E <i>phaZ2::lacZ</i>	24
3.6.4	PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)	25
3.6.5	DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	25
3.6.6	ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE.....	26
3.7	CONJUGAÇÃO BACTERIANA.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27

4.1	ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	27
4.1.1	PHB DEPOLIMERASES.....	27
4.1.2	ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES <i>phaZ1</i> E <i>phaZ2</i>	32
4.2	CONSTRUÇÃO DAS FUSÕES <i>phaZ1::lacZ</i> e <i>phaZ2::lacZ</i>	33
4.3	ENSAIO DE EXPRESSÃO DAS FUSÕES <i>phaZ1::lacZ</i> e <i>phaZ2::lacZ</i>	36
5	CONCLUSÕES	41
6	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

O uso de materiais plásticos biodegradáveis é uma necessidade crescente diante dos problemas ambientais, como o acúmulo de detritos plásticos provenientes da indústria petroquímica. Nos últimos anos tem sido relatado riscos de toxicidade em humanos devido a exposição aos poluentes derivados da decomposição dos plásticos convencionais (NORTH *et al.*, 2013; BARNES *et al.*, 2009; CÓZAR *et al.*, 2014; CÓZAR *et al.*, 2015). Uma das alternativas ao uso desses materiais são os biopolímeros de polihidroxicanoatos (PHAs). Os PHAs são sintetizados por uma ampla variedade de microrganismos e apresentam similaridades físico-químicas com elementos de origem petroquímica empregados na produção do plástico convencional, tornando-os atrativos para a exploração industrial. Assim, considerando a síntese a partir de fontes renováveis e potencial para serem rapidamente degradados por microrganismos quando descartados no ambiente, os PHAs apresentam-se como uma alternativa importante na produção de bioplásticos (JENDROSSEK *et al.*, 2007).

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres alifáticos de hidroxicanoatos (Fig. 1) produzidos por diferentes bactérias sob condições de disponibilidade de carbono e ausência de outro nutriente como nitrogênio ou oxigênio (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). São quimicamente estereoespecíficos, com os carbonos assimétricos na configuração D. São utilizados na produção de inseticidas, herbicidas, materiais biomédicos, fertilizantes, material de partida para compostos quirais, produtos de higiene e produção de plástico biodegradável (STEINBUCHER *et al.*, 1992). Foram caracterizados mais de 150 tipos diferentes de hidroxicanoatos constituintes de poliésteres microbianos. Essa ampla variedade é resultado da diversidade de microrganismos e das diferentes fontes de carbono usadas pelo metabolismo (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002).

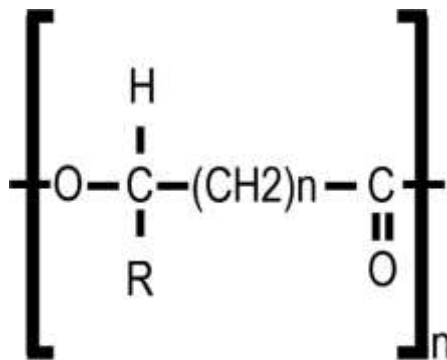


FIGURA 1 - Fórmula geral dos PHAs (LEE, 1995).

Os PHAs são armazenados no espaço intracelular na forma de grânulos hidrofóbicos amorfos, com massa molecular variando entre 50.000 a 1.000.000 Daltons (MADISON; HUISMAN, 1999). São divididos em dois grupos conforme o número de carbonos dos monômeros: PHAs de cadeia curta (SCL PHA, do inglês *short-chain-length*) que apresentam de 3 a 5 átomos de carbono e PHAs de cadeia média (MCL PHA, do inglês *medium chain-length*) com 6 a 14 átomos de carbono (LEE, 1996). O tamanho dos monômeros varia conforme a fonte de carbono e a especificidade das PHA sintases, enzimas envolvidas na síntese do polímero.

O polihidroxibutirato (PHB), um dos principais PHAs estudados, foi descoberto por Lemoigne em 1926 em *Bacillus megaterium* (LENZ, *et al.*, 2005). O polímero é estocado como grânulos amorfos no citoplasma e corresponde a uma reserva de carbono para os microrganismos, sendo mobilizado quando há diminuição nas fontes energéticas do meio (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002).

O PHB é sintetizado a partir de monômeros de 3-hidroxibutirato (Fig. 2) por muitos microrganismos. É armazenado no espaço intracelular, na forma de grânulos hidrofóbicos associados a proteínas (PGAPS, do inglês *PHB granule-associated proteins*). Como resultado é formada uma estrutura complexa denominada carbonossomo (JENDROSSEK *et al.*, 2014). O PHB tem sido relacionado à adaptação bacteriana em condições de stress como choque térmico, exposição a luz ultravioleta e frio extremo provocado por condições ambientais adversas (RATCLIFF *et al.*, 2008; OBRUCA *et al.*, 2016). Em bactérias promotoras de crescimento vegetal a presença de PHB é importante para a manutenção da atividade do complexo da nitrogenase na ausência de

carbono (TAL *et al.*, 1985). Estudos recentes indicam que a presença de PHB favorece o processo de interação planta-bactéria (BALSANELLI *et al.*, 2016; PANKIEVICZ *et al.*, 2016).

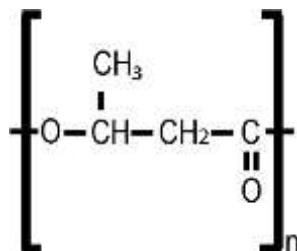


FIGURA 2 – Estrutura geral do polihidroxibutirato (TOKIWA; CALABIA, 2004).

1.1 MOBILIZAÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO EM BACTÉRIAS

O PHB funciona como estoque de carbono e energia (JENDROSSEK & HANDRICK, 2002). Experimentos usando células com nível elevado de PHB intracelular, ao serem transferidas para condições sem disponibilidade de carbono, mobilizam o polímero acumulado e apresentam taxas de sobrevivência superiores quando comparadas a células sem PHB ou com conteúdo baixo do polímero (YORK *et al.*, 2003). Em condições de cultivo, a quantidade de PHB diminui a partir do início da fase estacionária de crescimento (JENDROSSEK & HANDRICK, 2002). Contudo, os mecanismos que regulam a degradação são pouco compreendidos.

A mobilização de polihidroxibutirato é realizada por dois tipos de PHBs depolimerases: PhaZs intracelulares que degradam o PHB nativo (nPHB) e PhaZs extracelulares que degradam o PHB desnaturado (dPHB), resultante da exposição ao ambiente após *lise* celular de outros microrganismos (JENDROSSEK & HANDRICK, 2002).

As PHB depolimerases são carboxiesterases pertencentes a família das α/β -hidrolases. PHB depolimerases extracelulares compartilham entre si a tríade catalítica serina–histidina–ácido aspártico. Esses resíduos estão inseridos numa sequência conservada denominada “*lipase box*” (JENDROSSEK & HANDRICK, 2002; KNOLL *et al.*, 2009). PHB depolimerases intracelulares apresentam ampla variação em relação a depolimerases extracelulares, não possuem a região *lipase box* e a tríade catalítica encontra-se modificada nos resíduos de aminoácidos (KNOLL *et al.*, 2009). Variações

estruturais foram encontradas em *Rodospirillum rubrum*, no qual uma das enzimas é periplasmática (HANDRICK *et al.*, 2004) e contém resíduos catalíticos similares a depolimerases extracelulares (KNOLL *et al.*, 2009).

Apesar das PHB depolimerases atuarem degradando PHB supostamente em condições onde há indisponibilidade de fontes de energia, algumas depolimerases são expressas na ausência de PHB (PEPLINSKI *et al.*, 2010), sugerindo funções metabólicas adicionais. Experimentos usando carbono marcado indicam a existência de um ciclo contínuo de síntese e degradação do polímero, quando as taxas de síntese excedem as taxas de degradação há acúmulo intracelular na forma de grânulos, quando a síntese é inferior a degradação há redução na quantidade de PHB (JENDROSSEK & HANDRICK, 2002).

A existência de múltiplos genes codificando PHA depolimerases num mesmo organismo, como os nove em *Ralstonia eutropha*, sugere mecanismos dinâmicos e complexos no processo de mobilização de polihidroxibutirato. Em *R. eutropha*, experimentos usando diferentes mutantes *phaZs* indicam que *phaZ1* é um dos principais genes que degradam PHB (UCHINO *et al.*, 2007). No mesmo organismo, o produto do gene *phaZ2* atua mobilizando PHB quando há ausência de carbono e, na ausência de *phaZ1* e *phaZ2*, o produto de *phaZ3* foi incapaz de mobilizar PHB (YORK *et al.*, 2003).

1.2 METABOLISMO DE PHB EM *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é uma β -proteobactéria, diazotrófica, gram negativa, endofítica, encontrada em associação com gramíneas de interesse econômico como cana-de-açúcar, milho e arroz (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 2005). A capacidade de fixar nitrogênio e associação com gramíneas sugere o potencial como biofertilizante. Esta bactéria tem sido estudada no Núcleo de Fixação de Nitrogênio desde a década de 1980 e foi o primeiro genoma sequenciado no Estado do Paraná (GenBank: CP002039, PEDROSA *et al.*, 2011). *H. seropedicae* é capaz de acumular PHB (Fig. 3) e a anotação do genoma indicou a existência de 13 genes potencialmente envolvidos no metabolismo de polihidroxialcanoatos (Fig. 4), (PEDROSA *et al.*, 2011; BATISTA *et al.*, 2016).

Entre os genes identificados, dois codificam β -cetoacil-CoA tiolases (*phaA1*, locus tag HSERO_RS01265 e *phaA2*, locus tag HSERO_RS01180), dois genes codificam acetoacetil-CoA redutases (*phaB1*, locus tag HSERO_RS16605 e *phaB2*, locus tag HSERO_RS15035). A síntese do polímero é realizada por PHB sintases e há três genes presentes no genoma de *H. seropedicae*. Contudo, apenas o produto de *phaC1* (locus tag HSERO_RS15040) realiza polimerização de PHB. Em relação a PHB sintase 2 (*phaC2*, locus tag HSERO_RS12020) e PHB sintase 3 (*phaC3*, locus tag HSERO_RS01310), ainda não foi identificada a função destes genes no metabolismo de PHB em *H. seropedicae*. As fasinas, proteínas envolvidas com a cobertura dos grânulos são codificadas pelos genes *phaP1* (locus tag HSERO_RS08150) e *phaP2* (locus tag HSERO_RS23810). O PHB nativo é mobilizado por PHB depolimerases intracelulares, codificada pelos genes *phaZs*. O genoma de *H. seropedicae* possui dois genes que codificam para prováveis depolimerases, *phaZ1* (locus tag HSERO_RS08080) e *phaZ2* (locus tag HSERO_RS03195). Além disso, foi identificado o repressor transcricional PhaR (locus tag HSERO_RS15030), (KADOWAKI *et al.*, 2011, BATISTA *et al.*, 2016).

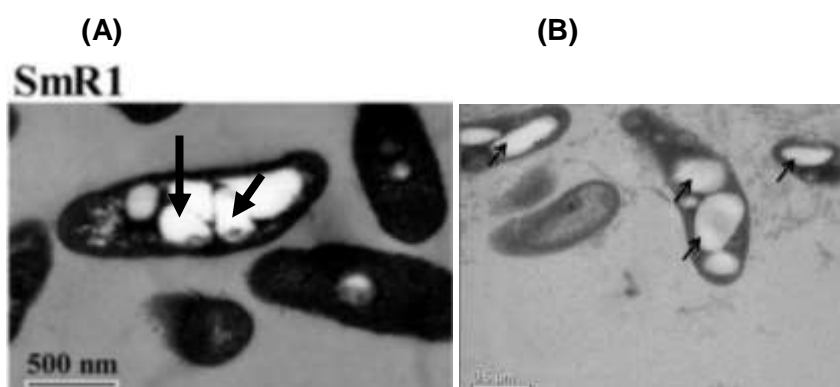


FIGURA 3 - Grânulos de PHB (setas) na estirpe SmR1 de *H. seropedicae* detectados em microscopia de transmissão, em diferentes condições de crescimento. (A) na presença de meio Nfb-malato (37 mM) e NH_4Cl (20 mM) em DO_{600} de 1.0 (ALVES, *et al.*, 2016) e (B) aderido a plantas de trigo após três dias de cultivo (PANKIEVICZ *et al.*, 2016).

Estudos posteriores caracterizaram aspectos funcionais de alguns destes genes. Kadowaki *et al.*, (2011) demonstrou que a maioria possui sequência consenso para a ligação da proteína PhaR. PhaR supostamente liga-se a sequência TG[N]TGC[N]₃GCAA presente na região promotora desses

genes, atuando como um possível repressor. PhaR também é encontrada associada aos grânulo de PHB, sugerindo que quando há síntese do polímero, o repressor desliga-se da região promotora, permitindo a expressão dos genes envolvidos com o metabolismo de PHB (STUBBE & TIAN, 2003). Com relação a síntese do polímero, PhaC1 é essencialmente envolvida com a polimerização de PHB, uma vez que mutantes com deleção desse gene não sintetizam polihidroxibutirato (TIRAPELLE *et al.*, 2013).

Não há estudos sobre a mobilização de PHB nas estirpes de *H. seropedicae*, contudo, os dados de proteoma indicaram que PhaZ1 encontra-se associada aos grânulos de PHB (TIRAPELLE *et al.*, 2013). Em função de sua associação com o grânulo de PHB, PhaZ1 foi sugerida como a enzima possivelmente envolvida na mobilização de polihidroxibutirato em *H. seropedicae*.

Em relação a PhaZ2, estudos realizados após inoculação em plantas evidenciaram elevada expressão de *phaZ2* em relação a *phaZ1*, sugerindo um papel importante no processo de colonização (BALSANELLI *et al.*, 2016; PANKIEVICZ *et al.*, 2016). Contudo, não há estudos que indiquem relação entre expressão e mobilização de PHB mediado por esse gene.

Considerando a importância da mobilização de PHB como um mecanismo essencial no processo de acúmulo e mobilização do polímero, esse projeto teve como objetivo principal, analisar o perfil de expressão dos genes codificantes para as PHB depolimerases em diferentes estirpes mutantes de *H. seropedicae*.

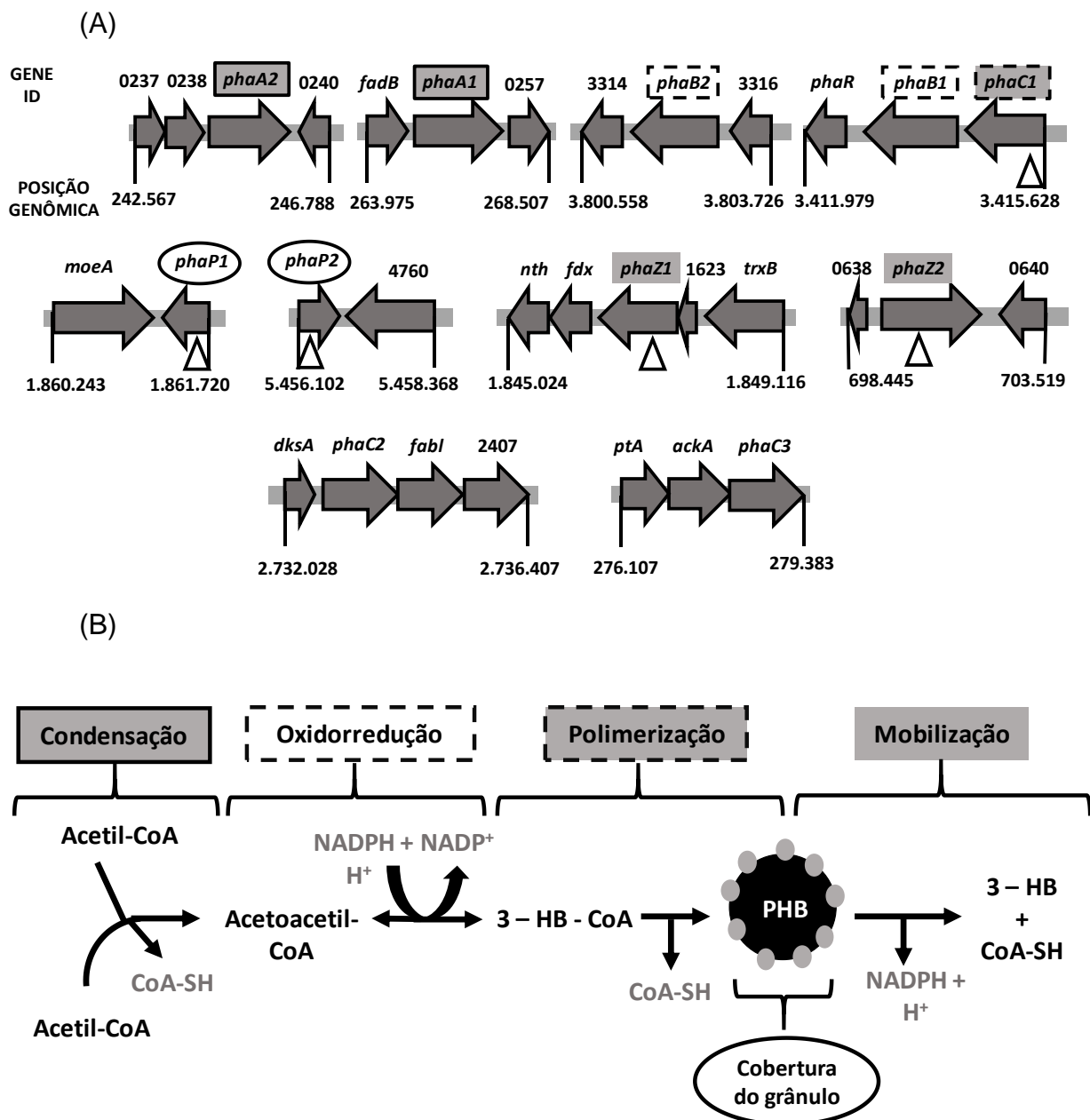


FIGURA 4 – Organização genômica dos prováveis genes envolvidos com o metabolismo de polihidroxibutirato em *H. seropedicae*. Em (A) os genes estão representados por setas, com os nomes dos genes ou a *locus tag*, indicados acima das setas; a posição do gene no genoma, primeiro e último nucleotídeo do gene estão indicados abaixo das setas. O símbolo (Δ) indica genes deletados, com estirpes mutantes construídas. Os genes foram destacados usando retângulos ou elipses e correlacionados com sua possível função fisiológica, conforme representado em (B), demonstrando a suposta via metabólica relacionada a síntese e degradação de polihidroxibutirato. Iniciando a esquerda com a condensação de 2 moléculas de acetil-CoA, resultando em acetoacetyl-CoA e coenzima A livre (CoA-SH), em seguida acetoacetyl-CoA sofre redução com consumo de NADPH, formando 3 – hidroxibutiril-CoA (3-HB-CoA), no passo seguinte 3-HB-CoA é polimerizado em PHB liberando coenzima A livre. A

última reação da via é a mobilização de PHB por PHB depolimerases liberando 3-hidroxibutirato (3-HB) e coenzima A livre. Adaptado de BATISTA *et al.*, 2016.

2 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Esse projeto tem como objetivo analisar a expressão dos genes codificantes para enzimas PHB depolimerases em diferentes estirpes mutantes de *H. seropedicae*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar *in silico* os genes *phaZ1* e *phaZ2* de *Herbaspirillum seropedicae* avaliando a similaridade entre seus produtos.
- Analisar as regiões promotoras dos dois genes para localização *in silico* de promotores e sequências reguladoras
- Construir fusões plasmidiais dos promotores dos genes *phaZ1* e *phaZ2* com o gene repórter *lacZ*.
- Investigar o padrão de expressão dos promotores dos genes *phaZ1* e *phaZ2* em diferentes estirpes de *Herbaspirillum seropedicae*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANÁLISES *IN SILICO*

A sequência primária das proteínas PhaZ1 e PhaZ2 de *H. seropedicae* foram obtidas a partir do banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) sob número de acesso ADJ63135.1 e ADJ62158.1, respectivamente.

A sequência dos genes *phaZ1* e *phaZ2* de *H. seropedicae* foram obtidas a partir do banco de dados NCBI usando as *locus tag* HSERO_RS08080 e HSERO_RS03195, respectivamente.

Para alinhamento das sequências foram utilizados os programas EMBOSS (RICE *et al.*, 2000) e MUSCLE (EDGAR *et al.*, 2004). A análise comparativa entre pares de sequências foi realizada via alinhamento local (algoritmo Smith-Waterman). A comparação entre 3 ou mais sequências foi realizada via alinhamento múltiplo com o pacote MUSCLE, desenvolvido para o software R (R CORE TEAM, 2016).

A análise de similaridade filogenética foi realizada com o software MEGA7 (KUMAR *et al.*, 2016), usando o método de máxima verossimilhança. Foi adotado o modelo *JTT-matrix-based method* para estimar a taxa de evolução dos aminoácidos (JONES *et al.*, 1992). Além disso, as análises empregaram o método de *bootstrap*, um modelo que faz simulações de agrupamento dos dados originais obtendo intervalos de confiança para as estimativas dos parâmetros, desse modo é possível inferir a porcentagem de vezes que duas sequências foram agrupadas, quanto maior a porcentagem, maior a credibilidade da estimativa.

Os domínios conservados presentes nas proteínas foram identificados via BlastP (NCBI) e PFAM (Protein Family Database) (FINN *et al.*, 2014).

A sequência consenso para a ligação de sigma 70, na região promotora de *phaZ1*, foi predita usando o software BPROM (SOLOVYEV *et al.*, 2011), disponível online, na plataforma "softberry" (<http://www.softberry.com>). Os sítios para ligação das proteínas RpoN e NtrC presentes na região promotora de *phaZ2* foram identificados através de análise visual usando as sequências consenso descritas (SOUZA *et al.*, 2000).

3.2 ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS

Foram utilizadas estirpes de *Escherichia coli* e estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* conforme descrito na tabela 1. A tabela 2 descreve os vetores empregados nesse projeto.

TABELA 1 – LISTA DE ESTIRPES BACTERIANAS

Estirpes	Características	Referências
<i>Escherichia coli</i>		
Top 10	Estirpe de clonagem	Invitrogen
S17 - 1	Estirpe conjugante/SmR Tra+	SIMON <i>et al.</i> , 1983
<i>H. seropedicae</i>		
SmR1	Estirpe parental, Sm ^R , Nif+	SOUZA <i>et al.</i> , 2000.
ΔPhaZ1	Deleção cromossômica do gene <i>phaZ1</i>	HOLTHMAM, 2014.
ΔPhaZ2	Deleção cromossômica do gene <i>phaZ2</i>	HOLTHMAM, 2014.
ΔPhaZ1.2	Deleção cromossômica dos genes <i>phaZ1</i> e <i>phaZ2</i>	HOLTHMAM, 2014.
ΔPhaC1	Deleção cromossômica do gene <i>phaC1</i>	TIRAPELLE <i>et al.</i> , 2013.
ΔPhaR	Deleção cromossômica do gene <i>phbF</i>	KADOWAKI <i>et al.</i> , 2011

TABELA 2 – LISTA DE PLASMÍDEOS

Plasmídeos	Características	Referências
pTZ57RT	Amp ^R , Vetor de clonagem com sistema α-complementação	(THERMO FISHER SCIENTIFIC)
pTZ57RT-P.phaZ1	Região promotora do gene <i>phaZ1</i> (520 pb) clonado no vetor pTZ57RT	Esse projeto
pTZ57RT-P.phaZ2	Região promotora do gene <i>phaZ2</i> (409 pb) clonado no vetor pTZ57RT	Esse projeto
pPW452	Tc ^R , vetor contendo a fusão transcricional <i>lacZ</i> sem promotor.	WOODLEY; BUCK; KENNEDY, 1996
pTEL - 1	pPW452 contendo a sequência promotora do gene <i>phaZ1</i>	Esse projeto
pTEL - 2	pPW452 contendo a sequência promotora do gene <i>phaZ2</i>	Esse projeto

3.3 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas a 30 °C sob agitação orbital constante de 120 rpm em meio NFbHP malato (KLASSEN *et al.*, 1999) (HP refere-se a alta concentração de fosfato) utilizando malato (37 mmol/L) como fonte de carbono, NH₄Cl 20 mmol/L como fonte de nitrogênio, 50 mL/L de solução de fosfatos (159,5 g/L de KH₂PO₄ e 17,8 g/L de K₂HPO₄) e antibiótico

adequado. As estirpes cultivadas em meio sólido foram mantidas em estufa a 30 °C. O meio NFb-malato (TABELA 3) sólido continha ágar (15 g/L).

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37 °C sob agitação orbital constante de 170 rpm em meio Luria-Broth (LB), (SAMBROOK *et al.*, 1989) e em estufa a 37 °C em meio sólido LA (LB com 15 g/L de ágar). As células de *E. coli* foram estocadas a -20 °C em glicerol 50%. A tabela 4 contém a composição do meio LB.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO NFB-MALATO

Composição	Concentração
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻¹ g/L
NaCl	1,0 x 10 ⁻¹ g/L
CaCl ₂	2,0 x 10 ⁻² g/L
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 ⁻² g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻² g/L
Ácido málico	5,0 g/L
Biotina	1,0 x 10 ⁻⁴ g/L
NaMoO ₄ .2H ₂ O	2,0 x 10 ⁻³ g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	2,35 x 10 ⁻³ g/L
H ₃ BO ₃	2,8 x 10 ⁻³ g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	8,0 x 10 ⁻⁵ g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,4 x 10 ⁻⁴ g/L
pH	6,5

TABELA 4 – MEIO LB

Composição	Concentração
Extrato de levedura	5 g/L
Triptona	10 g/L
Cloreto de Sódio	10 g/L
pH	7,0

3.4 ANTIBIÓTICOS

Foram utilizados os antibióticos estreptomicina (80 µg/mL) para *H. seropedicae*, ampicilina (10 µg/mL) para *E. coli* (vetor pTZ57RT) e tetraciclina para estirpes de *E. coli* contendo o vetor (pPW452). As estirpes de *H.*

seropedicae contendo as fusões *phaZ1::lacZ* e *phaZ2::lacZ* foram cultivadas na presença dos antibióticos tetraciclina e estreptomicina (10 µg/mL e 80 µg/mL, respectivamente).

3.5 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

As células de *E. coli* quimiocompetentes foram preparadas segundo Chan (CHAN *et al.*, 2013) e estocadas em alíquotas de 100 µL em tubos tipo Eppendorf estéreis a -80 °C. Para transformação bacteriana, o DNA (10 µL de reação de ligação, proporção molar 3:1 inserto:vetor) foi misturado com a suspensão de células quimiocompetentes e incubado por 30 minutos em gelo, seguido de incubação por 90 segundos a 42°C e resfriamento por 2 minutos em gelo. Em seguida, 900 µL de meio LB foram adicionados e a suspensão incubada por 60 minutos em estufa a 37 °C para recuperação. Após recuperação, as células foram plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos necessários para a seleção das bactérias transformantes e incubadas em estufa 37 °C por 12 horas.

3.6 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA

3.6.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO, MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS, EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSE E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A extração de DNA genômico foi realizada com o kit da Axygen Biosciences (AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit). Os plasmídeos bacterianos foram extraídos pelo método de *lise alcalina* (SAMBROOK *et al.*, 1989) e analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (SAMBROOK *et al.*, 1989). A extração de DNA de gel de agarose foi efetuada com o kit ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES). O DNA foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (THERMO SCIENTIFIC).

3.6.2 CLONAGEM DOS PROMOTORES *phaZ1* E *phaZ2* DE *H. seropedicae*

A sequência amplificada por PCR, utilizada na análise de expressão do gene *phaZ1* (520 pb), contém 466 pb *upstream* ao códon de início de tradução e 54 pb *downstream* ao início de tradução. Para a região promotora do gene *phaZ2*, foi amplificado um fragmento de 409 pb, correspondente a 372 pb *upstream* ao códon de início de tradução e 37 pb *downstream* ao início de tradução. Na reação de PCR foi utilizado DNA genômico de *H. seropedicae* (SmR1) como molde e oligonucleotídeos iniciadores P.phaZ1 (promotor *phaZ1*) e P.phaZ2 (promotor *phaZ2*), descrito na tabela 5.

Os produtos amplificados foram posteriormente clonados no vetor pTZ57/RT linearizado com terminais cegos segundo Zhou e cols. (2000). As reações de ligação com 10 µL de volume total continham, 1U/µL de T4 DNA ligase (FERMENTAS Inc.), 2 µL de tampão T4 DNA ligase (concentração 5X) e proporção molar 3:1 inserto:vetor. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 12 horas.

A mistura de ligação foi utilizada para transformar células de *E. coli* Top 10 quimiocompetentes. A seleção de transformantes foi realizada por resistência a antibióticos e seleção de colônias azuis/brancas utilizando meio LA contendo 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo (X-gal) (SAMBROOK *et al.*, 1989).

A confirmação dos clones contendo a sequência de interesse foi realizado via PCR de colônias, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que anelam nas regiões promotoras.

Os plasmídeos dos clones selecionados foram sequenciados utilizando os *primers* P.phaZ1 e P.phaZ2, segundo a metodologia Sanger (SANGER & COULSON, 1977), usando o kit de sequenciamento BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (THERMO SCIENTIFIC).

3.6.3 CONSTRUÇÃO DAS FUSÕES *phaZ1::lacZ* E *phaZ2::lacZ*

As regiões promotoras dos genes *phaZ1* e *phaZ2* clonadas no vetor pTZ57/RT foram digeridas com as enzimas EcoRI e PaeI (SphI) (FERMENTAS). As reações de restrição foram submetidas a corrida

eletroforética em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris-borato 40 mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,3) e as bandas no gel correspondentes as regiões promotoras foram isoladas utilizando o kit ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). O DNA obtido foi quantificado no NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (THERMO SCIENTIFIC). O vetor pPW452 (SPAINK *et al.*, 1987) foi digerido com as mesmas enzimas. As reações de ligação (10 µL) continham 1 U/µL de T4 DNA ligase (FERMENTAS Inc.), 2 µL de tampão T4 DNA ligase (concentração 5X) e proporção molar 3:1 inserto-vetor e foram incubadas por 12 horas a temperatura ambiente. Cada reação foi utilizada para transformar células de *E. coli* Top 10 quimiocompetente que foram então plaqueadas em meio LA contendo Tetraciclina (10 ug/mL). As colônias resistentes a tetraciclina foram analisadas através da amplificação dos fragmentos de interesse por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que anelam nas regiões promotoras.

3.6.4 PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)

Reações de amplificação de DNA (PCR) foram realizadas utilizando DNA genômico ou DNA plasmidial purificado e a partir de colônias bacterianas. O sistema de reação com volume final de 20 µL composto de 1-4 ng/mL de DNA plasmidial, 0,5 pmol/µL de cada *primer*, 0,2 mmol/L de dNTPs, tampão de reação X7 (NØRHOLM, 2010), 2,5 mmol/L de cloreto de magnésio e 0,2 µL de PfuX7 DNA Polimerase (NØRHOLM, 2010). A amplificação foi realizada em 25 ciclos: 20 segundos a 96 °C, 20-15 segundos para anelamento dos *primers* na temperatura adequada para cada par e 30 segundos a 72 °C para extensão. Os *primers* utilizados nas reações de PCR estão descritos na tabela 5.

TABELA 5 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Primers	Sequências (5'->3')	Sítios de restrição	Referências
P. phaZ1_For	GCGACATCAAC ACCT TATCCG	SetI	Esse projeto
P. phaZ1_Rev	CTGCAG TCGGGTTTCAGAAACG	PstI	Esse projeto
P. phaZ2_For	CGATGTCTTCCT CGA AGGAG	TaqI	Esse projeto
P. phaZ2_Rev	CTGCAG TAGTTCTGGTAGAGC	PstI	Esse projeto
PMPFOR	GCTCACCCCAAAAATGGCA	Não possui	BATISTA <i>et al.</i> , 2013
LACZREV	GCAAGGCGATTAAGTTGGGT	Não possui	BATISTA <i>et al.</i> , 2013

3.6.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A quantificação de proteínas foi realizada segundo a metodologia de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão.

3.6.6 ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE

A expressão dos genes *phaZ1* e *phaZ2* foi analisada através de fusões das regiões promotora com o gene *lacZ* e determinação da atividade de β -galactosidase (MILLER, 1992). Células de *H. seropedicae* transformadas com as construções *phaZ1::lacZ* ou *phaZ2::lacZ* foram cultivadas em meio NFbHP-malato, contendo tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), estreptomicina (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 20 mM de amônia por 15 horas a 30 °C e 120 rpm. Para cada estirpe, o pré inóculo apresentava $D.O_{600} = 1,2$ e foram analisadas 10 condições em que o volume de inóculo foi de 5; 12,5; 25; 50; 100; 200; 300; 400; 500 e 750 μL . O sistema de reação continha 900 μL de tampão Z, 100 μL de clorofórmio, 50 μL de SDS 0,1%, 100 μL de cultura. O sistema de reação foi mantido por 5 minutos a 30°C, a reação foi iniciada com adição de 200 μL de 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) (SIGMA) 800 mg/mL e foi interrompida com 500 μL de Na_2CO_3 (1 mol/L). Os tubos contendo o sistema de reação foram centrifugados durante 10 minutos a 10 °C e então 200 μL do sobrenadante foram coletados para determinação da absorbância do o-nitrofenol (ONP) formado, a 420 nm e 550 nm. A atividade específica de β -galactosidase obtida após dosagem de proteínas foi expressa em nmol de ONP formado por mg de proteína por tempo em minutos, usando curva de calibração com o-nitrofenol.

3.7 CONJUGAÇÃO BACTERIANA

Os plasmídeos pPW452 contendo as fusões *phaZ1::lacZ* e *phaZ2::lacZ* foram transferidos para as estirpes de *H. seropedicae*, através de conjugação bacteriana. A estirpe conjugante de *E. coli* S17-1 (SIMON *et al.*, 1983) quimiocompetente foi previamente transformada com as fusões.

As estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas na noite anterior a conjugação (aproximadamente 16 horas) em meio NFbHPN-

malato (NFbHP-malato contendo 20 Mm de NH₄Cl) e LB, respectivamente, suplementados com os antibióticos necessários à seleção. No dia da conjugação, as culturas saturadas foram novamente inoculadas nos meios de cultura adequados, sem antibióticos. Um volume de 75 µL das estirpes de *H. seropedicae* (receptora) foram inoculadas em 2,5 mL de NFbHPN-malato, 3 horas antes do inóculo da estirpe S17.1 de *E. coli*. Para S17.1 (doadora) foi inoculado 25 µL da cultura crescida durante a noite em 2 mL de meio LB. Os tempos de cultivo, no dia da conjugação, das estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram de, respectivamente, 6 e 3 horas nas condições ideais de crescimento. Posteriormente foram realizadas misturas da cultura de *H. seropedicae* com a cultura de *E. coli* em duas proporções distintas. Em um microtubo, tipo eppendorf foram misturados 50 µL da cultura de *H. seropedicae* com 5 µL da cultura de *E. coli* e em outro 100 µL da cultura de *H. seropedicae* com 2 µL da cultura de *E. coli*. As suspensões de células foram colocadas em polos distintos na placa (sem plaquear), contendo meio LA/NFbHPN-malato (proporção de 1:3) e incubadas a 30°C por 24 horas. Após incubação, a massa celular foi raspada e ressuspensa em 1 mL de Nfb-malato e a suspensão plaqueada (250µL/placa) em meio NFbLP-malato (LP – refere-se a solução de fosfatos, 10 µL/mL) sólido contendo 20 mmol/L de NH₄Cl e os antibióticos adequados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES *IN SILICO*

4.1.1 PHB DEPOLIMERASES

As PHB depolimerases *PhaZ1* e *PhaZ2* de *H. seropedicae* possuem 411 e 408 aminoácidos, respectivamente. A análise de similaridade das sequências, realizado via alinhamento local (algoritmo Smith-Waterman), implementado no software EMBOSS (RICE *et al.*, 2000), revelaram 62,7% de similaridade e 45,9% de identidade (Fig 5).

a escala indicando aminoácidos na sequência das proteínas. Abaixo, bloco verde está indicado o domínio PHB depolimerase C-terminal, envolvido com a atividade de degradação de polihidroxibutirato. Os resultados foram obtidos com o software BlastP na plataforma NCBI.

Dado a diversidade existente entre as enzimas que mobilizam PHB nativo e com o objetivo de inferir com quais destas enzimas as depolimerases de *H. seropedicae* apresentam maior proximidade foi construída uma árvore de genes usando análise filogenética (Fig. 7). Foram selecionadas para a análise apenas PHB depolimerases caracterizadas. Entre as sequências, as PHB depolimerases de *R. rubrum*, PhaZ1, PhaZ2 e PhaZ3 apresentam variações entre si, sendo que PhaZ1 é periplasmática e possui o domínio catalítico similar as enzimas extracelulares (HANDRICK *et al.*, 2004). PhaZ2 possui similaridade com a depolimerase PhaZ1 de *R. eutropha* (SZNADJER *et al.*, 2010; UCHINO *et al.*, 2007). PhaZ3 do mesmo organismo foi confirmada como sendo intracelular através de experimentos usando fusão com proteína fluorescente, demonstrando que a enzima liga-se aos grânulos de PHB nativos. Além disso, mobiliza somente PHB de cadeia curta (SZNADJER *et al.*, 2010).

A sequência da depolimerase PhaZ de *Pseudomonas oleovorans* também foi selecionada para a análise filogenética, a sequência da proteína possui regiões similares a enzimas lipases, como triacilglicerol lipases e lipoproteínas lipases, comum às depolimerases. Mutantes com deleção do gene *phaZ* são deficientes em degradar PHB (HUISMAN *et al.*, 1991).

A proteína PhaZ de *Bacillus thuringiensis* também é capaz de mobilizar PHB, mas apresenta baixa similaridade com depolimerases, contudo, mutantes do gene *phaZ* acumulam polihidroxibutirato e análises *in vitro* evidenciaram que a enzima catalisa a hidrólise de PHB em hidroxibutirato (TSENG *et al.*, 2006). Por último foi selecionada a enzima polihidroxioctanoato depolimerase (PhaZ) de *Pseudomonas putida*, como grupo externo da análise (EUGENIO *et al.*, 2006).

Previamente as sequências foram alinhadas através de alinhamento múltiplo de sequências (MSA) com o pacote MUSCLE (EDGAR *et al.*, 2004), desenvolvido para o software R (R CORE TEAM, 2016).

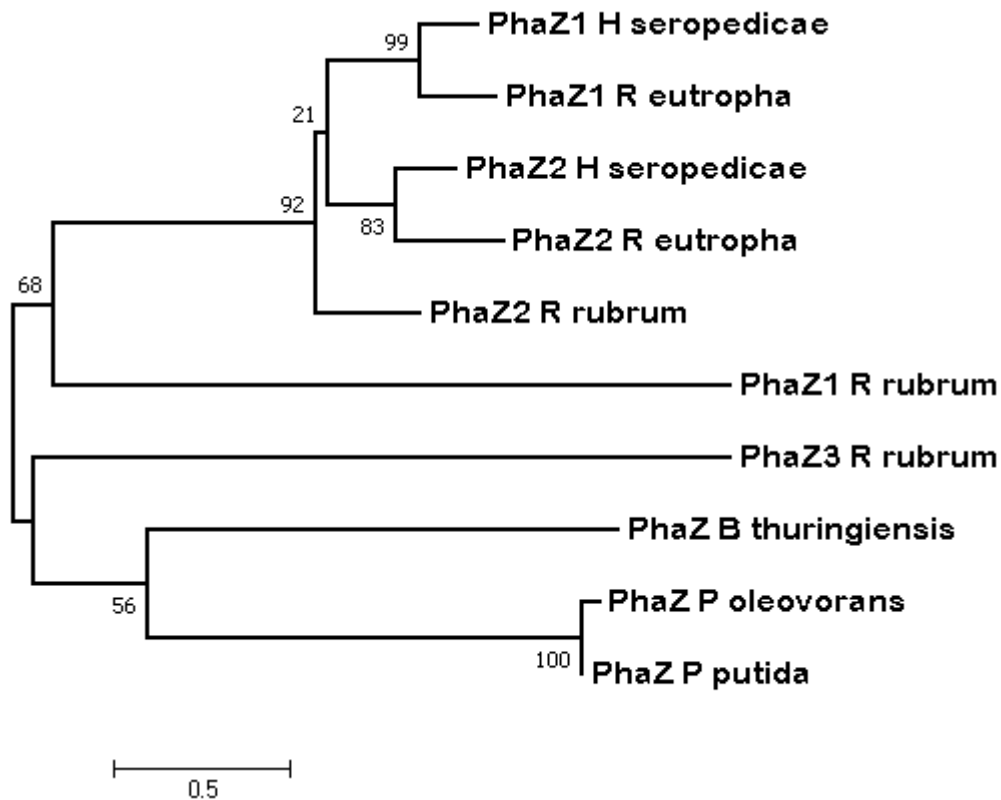


FIGURA 7 – Análise de similaridade entre seqüências primárias de PHB depolimerases com função comprovada no metabolismo de PHB, com exceção de PhaZ1 e PhaZ2 de *H. seropedicae*. A inferência usou o método de máxima verossimilhança baseado no modelo de substituição de aminoácidos JTT, do inglês *matrix-based model*. A árvore inicial para a pesquisa heurística foi obtida automaticamente aplicando os algoritmos NJ (*Neighbor-Joining*) e BioNJ a matriz de distância, estimada usando o modelo JTT e em seguida foi selecionado a topologia com maior valor de verossimilhança. A árvore está em escala, com o comprimento dos ramos medindo o número de substituições por sítio. Os números indicados na base de cada nó interno referem-se aos valores de *bootstrap* (1000 replicatas), indicando a porcentagem de vezes que cada seqüência foi agrupada. A análise envolveu 10 seqüências de aminoácidos: PhaZ1 de *H. seropedicae* SmR1 (ADJ63135.1), PhaZ2 de *H. seropedicae* SmR1 (ADJ62158.1), PhaZ1 de *Rodospirillum rubrum* (WP_011389460.1), PhaZ2 de *Rodospirillum rubrum* (WP_011391103.1), PhaZ3 de *Rodospirillum rubrum* (WP_011389722.1), PhaZ de *Pseudomonas oleovorans* (P26495.1), PhaZ de *Pseudomonas putida* (AAM63408.1), PhaZ de *Bacillus thuringiensis* (EEM82961.1), PhaZ1 de *Ralstonia eutropha* (WP_011614907.1) e PhaZ2 de *Ralstonia eutropha* (AAP74580.1).

A análise de similaridade usando filogenia agrupou as depolimerases de *H. seropedicae* e *R. eutropha* num mesmo *cluster*, tendo como seqüência basal a proteína PhaZ2 de *R. rubrum*. O segundo *cluster* formado, possui na base a

sequência PhaZ3 de *R. rubrum*, seguido por PhaZ de *B. thuringiensis*, e as depolimerases de *Pseudomonas* formando um grupo irmão.

O padrão de homologia revelado na análise filogenética, entre as depolimerases de *R. eutropha* e *H. seropedicae* foi confirmado via alinhamento local (Fig. 8). Adicionalmente as sequências foram analisadas quanto ao padrão de similaridade existente entre os resíduos de aminoácidos. As proteínas PhaZ1 de *H. seropedicae* e *Ralstonia eutropha* compartilham 79,9% de similaridade e 65,9% de identidade. Para as depolimerases PhaZ2 foi encontrado 70,0% de similaridade e 58,9% de identidade.

(PhaZ1)

PhaZ1_H_seroped..	1	HLVOLHELNRAFLVPMQNAETSAKLESDPVSPLAHTEFSSQRTAAGYELLYRSKEYEKP	60
PhaZ1_R_eutropha	1	HLVOLHEFORSTILPLTANAQATARTETIIPLSPLSLVPGAPRLAAGYELLYRLKEYEKP	60
PhaZ1_H_seroped..	61	QFIDAVPVQGRKSVGIVEEVVEEKPFQRLIHERKDL SARQAT--ALKQRTVLV VAPLSGH	118
PhaZ1_R_eutropha	61	AFQIKSVRSYGRQIPVEEQVLEKPFCKEVRRKRYADDPETIKLLKDEPVLVLAAPLSGH	120
PhaZ1_H_seroped..	119	HSTLLRETVRALQEHQVYITDNTDARMVPEOGAFHLHDVYVYVDEIETLGP-DVHVI	177
PhaZ1_R_eutropha	121	HATLLRDVVRTLLQCHVYVYTDNIDARMVPEEGAFRLSDYVYVYIQEFIRHIGAEHLHVI	180
PhaZ1_H_seroped..	178	SVCQPTVPVLAATSLSMASADPMLKSNTHGGPIDARKSPTAVINDLATEKPYSHFEHTV	237
PhaZ1_R_eutropha	181	SVCQPTVPVLAATSLSMASAGE-KTPRITHMGGPIDARKSPTAVNSLATKSEFNFENIV	239
PhaZ1_H_seroped..	238	IVSVPANYPGGRKVVYPGLQHAGFVAMNPRHACSHADFYHHRQDQASAEERKRYD	297
PhaZ1_R_eutropha	240	IYIVPANIYPGGRVVYPGLQHAGFVAMNPRHLSHSHYDFYLSLVEGQADDAEAVKRYD	299
PhaZ1_H_seroped..	298	EYNAVLDPHAEFYLLTIXVVFQDFLARGTHEELGLVVRPODKSYALFTIEGELDDISG	357
PhaZ1_R_eutropha	300	EYNAVLDPHAAEYLLDTIEVDFEFLAETHAIDGVPVRPODKSTALMTVEGELDDISG	359
PhaZ1_H_seroped..	358	SGOTQAQELCSSLARKQHFVPRAGHYGIFSGRRWREIVCPKIGEFIRANA-----	411
PhaZ1_R_eutropha	360	AGOTAAHDLCACTPKIRKQHLNAAICGHYGIISGRRWREIYPLQRFDFIRKYHQSATR	419

(PhaZ2)

PhaZ2_H_seroped..	1	MIPTYOLYQNYADATDLRACRHNMQALCATMGIPVWPYRKMASACEVFARTOLTHA	60
PhaZ2_R_eutropha	1	--MLYHAYQIYADMLRACLTAEAAATLAA-NRSGGFDVAPRLRAACEELIALVRLTHH	57
PhaZ2_H_seroped..	61	RPPFGATVEEEGCTTISWHEEEIHAIFPCGLLHERKDSATVQPKVLVWAPMSGHFATLLR	120
PhaZ2_R_eutropha	58	RPAFGIDHATVGGQVPVWTEEVVARTPFCSLHFRRHGIVGQPRVLLVAPMSGHFATLLR	117
PhaZ2_H_seroped..	121	ETVPTLIRQHDVYITDNRHARDVATAHRRFGDEFYSHITDGLVLPRAHLAVCOPTV	180
PhaZ2_R_eutropha	118	ETVPTLADHDVYITDNRHPRDIPLLAERFGDEFYSHLIGELQEGGGHLLVALCQPAV	177
PhaZ2_H_seroped..	181	AALTAARVAADGPAQPRSTLMAGPIDTRVNPVAVNALAKSKPTAWFEKMYSTVPAK	240
PhaZ2_R_eutropha	178	AALTAALHAEDGPAQPPSLTEHAGPIDARVNPVAVNALANSQPLENFERITLGNWPLR	237
PhaZ2_H_seroped..	241	FAGAVRRVYPGVQLAAFNHNLNRHVEAFGKLYHHLVDGEHARADQIKDFEYEEFAMAD	300
PhaZ2_R_eutropha	238	FAGAVRRVYPGVQLLAFHSHNPERHECALRELYALRERGEHOKADAIRDFEYIEFATMD	297
PhaZ2_H_seroped..	301	LPAFFYLETVRTVQCHALPLEKSYAGSPVEPRATRRTALFTIEGKDDICAVGOTAA	360
PhaZ2_R_eutropha	298	LTAEFYLETMSLVQRFLLAQGLDVSGRVRRTRATRRTALLTVEGERDDICAVGOTVAA	357
PhaZ2_H_seroped..	361	QFLCSLRPYHHLHMQVAVGHYGVENGRMNQETYPRLRFQINMHR	408
PhaZ2_R_eutropha	358	QFLCSLRPYHRHMQVAVGHYGVENGRMNTQVYFLVHITVYSS-	404

FIGURA 8 – Alinhamento das sequências dos aminoácidos das enzimas PHB depolimerases, de *H. seropedicae* e *R. eutropha*. Os resultados indicam elevada similaridade. Aminoácidos idênticos estão destacados em cinza escuro, aminoácido similares em cinza claro.

Apesar das dificuldades em inferir homologia funcional a partir de homologia de sequências, é possível que as proteínas de *H. seropedicae* e *R. eutropha* desempenhem funções similares em ambos os organismos, e estejam envolvidas na mobilização de PHB, em diferentes condições. Conforme já relatado, em *R. eutropha* PhaZ2 degrada PHB em condições de ausência de carbono no meio, sendo PhaZ1 a principal depolimerase (YORK *et al.*, 2003, UCHINO *et al.*, 2007). Análises da composição proteica dos grânulos de PHB nativos, em *H. seropedicae*, demonstraram que PhaZ1 encontra-se aderida aos grânulos (inferior a 1% do total de proteínas aderidas ao grânulo) e não foi detectada a presença de PhaZ2 nas mesmas condições (TIRAPELLE *et al.*, 2013).

4.1.2 ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES *phaZ1* E *phaZ2*

As regiões promotoras (Fig 9) contém a sequência consenso para a ligação de um suposto repressor transcricional de genes do metabolismo de PHB, PhaR, conforme descrito por Kadowaki *et al.*, 2011.

(A) Região promotora de *phaZ1*

```

TTCGAGACCAATGTCCTCCCGGCATCTTCGCCGTGGGCGACATCAACACCTATCCGGGCAAGAAGAAGCTGATCCTGTGGGCTTCCACGAGGC
CGCCCTGGCTGCCTTCGGCGCGGCGCCCTACATCTCCCGGAAAAGAAGATCCACATGCAGTACACCACCACCTCGCCCAAGCTGCACAAGA
TCCTGGGCGTGAAAGCCCGGTCTTCGACTGAGCTGGGCGGTCGACCCACTGGGTCGCGTCTACAGAAGAGCCCCTGCCCTGTGCAGGG
                                     Sítio de ligação PhaR TAACGCAGCGTTGTT
GCTTTTTTTTGGCGGGCTTGAGAGTGGTATTACCAGCAAGCAGGACCGCAGCCAAAGCGTGCTATGCTATTGCGTCGCAACAAGGATAGTAT
                                     -35                                     -10
CGACAGAATGAAAACGAAACAATTCTGTCAGCCAACGATCATCGCCAAACGTTTTGTGGCAGCATGCTTGCTGCGCACCTGGCCCGGCGTGTCCG
                                     rbs          => phaZ1
TCCGGGAGGGAAAGCCAGCCGGTGCTTGATAAAGGTCAGCTATGCTTTATCAACTGCATGAA

```

(B) Região promotora de *phaZ2*

```

Suposto sítio de ligação NtrC
GGCTGGGCACAGGATGGAAGAAGACAGCAGCAGGATCTCTGCCCGCGCCGACGGATCGTCCGGCGGCA Sítio de ligação PhaR
CGATGCTTCTCAGAGGAGAGTCCGGCGAACCTGGCCATGAGCCAGCCGCGCAGGGACCAAGAGTAGTTCTTGTGGTGATGCGCAA
AGTCGTCTTAGGCATGTCAGTCTTTATCTGTTTTGTGCGAGTTGACTTTGGGCGCGCTACCGCTTGGCGGGCGGTGTCACGTTGCCCGCCCC
GTCTGCGCATCGGTGCGGGCCAGGCCACGTTGCGGGCCTCTGTCTGCTTGTGCAAAGCTTGTGCCAGCTCGCGGGAAGTGCAGGCTGCGC
GCCGAGGCGGCAAGGCGGCCGCTTCCGTGGCAGCAACAATGCACTCTCGACAGGACGATCGACAGGCGAAAAGACCATCCAGAGGCGGGC
=> phaZ2          -24          -12          rbs
GTTCCCATGATCCCTACCTATCAG

```

FIGURA 9 –Regiões promotoras dos genes *phaZ1* (A) e *phaZ2* (B) de *H. seropedicae*. Estão em destaque os sítios de ligação para o repressor PhaR, sítios de ligação ao ribossomo (RBS), sítios de ligação para os prováveis fatores sigma, sigma 70 na região promotora de *phaZ1*,

sigma 54 na região promotora de *phaZ2*, suposto sítio de ligação para NtrC (promotor *phaZ2*) e os nucleotídeos iniciais correspondentes a sequência proteica dos genes (em verde e indicado pela seta).

Além do sítio PhaR, a análise da região promotora de *phaZ1* (Fig. 9A) indica a existência de um promotor do tipo sigma 70 (σ^{70}). Notavelmente, o sítio de ligação para PhaR, encontra-se sobreposto ao sítio σ^{70} , sugerindo um mecanismo de regulação transcricional via PhaR.

A região promotora do gene *phaZ2* também possui um provável sítio de ligação do repressor PhaR. Além disso, apresenta sequência conservada para ligação do fator de transcrição sigma 54 (RpoN) envolvido com a transcrição de genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio. A transcrição de genes através de RpoN é dependente de ativadores transcricionais (DIXON & KAHN, 2004). Em *H. seropedicae* o produto do gene *ntrC* (HSERO_RS15680) é um dos ativadores transcricionais de genes dependentes de RpoN (TWERDOCHLIB *et al.*, 2003; CHUBATSU *et al.*, 2012) e resultados de RNA-seq do mutante $\Delta ntrC$ de *H. seropedicae* evidenciam uma diminuição na expressão de *phaZ2* (Paloma Bonato, comunicação pessoal). A proteína NtrC liga-se especificamente a sequência consenso GCAC-N5-TGGTGCA (SOUZA *et al.*, 2000). Uma suposta região conservada foi identificada na sequência promotora de *phaZ2*, diferindo apenas em dois nucleotídeos (Fig. 9B).

4.2 CONSTRUÇÃO DAS FUSÕES *phaZ1::lacZ* e *phaZ2::lacZ*

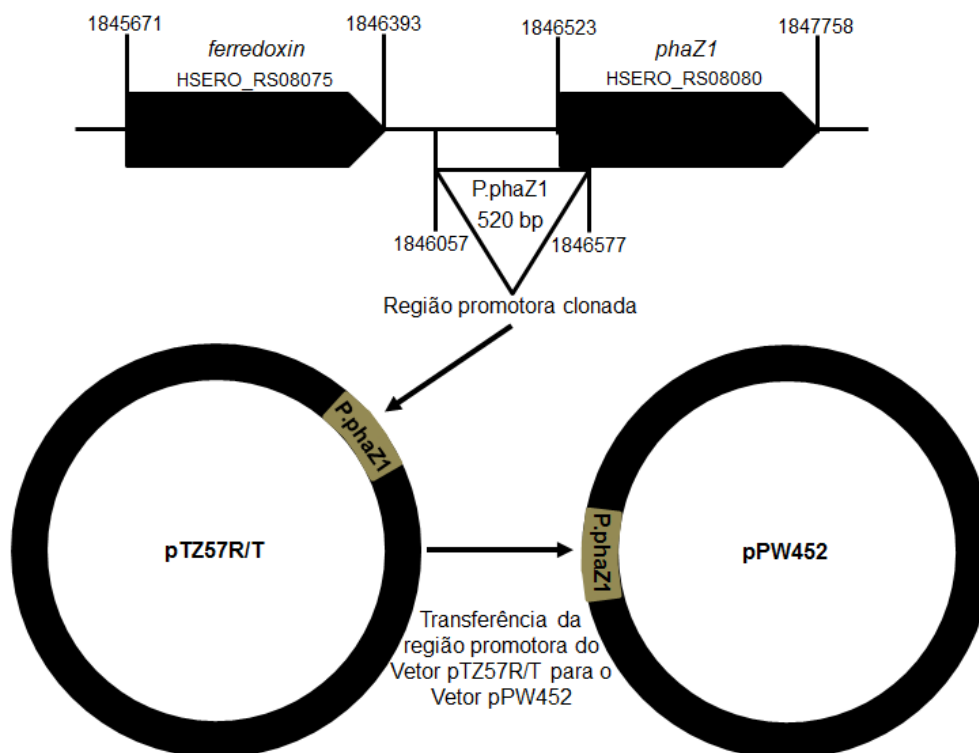
A fim de analisar a expressão dos genes *phaZ1* e *phaZ2* em *H. seropedicae*, as regiões promotoras foram utilizadas para a construção de fusões com o gene *lacZ*.

As regiões promotoras foram amplificadas por PCR, usando oligonucleotídeos específicos (Tabela 5, materiais e métodos). Os produtos de PCR originados foram subclonados no vetor pTZ57RT e transformados em estirpe Top 10 de *E. coli*. Posteriormente os insertos foram transferidos para o vetor pPW452 (SPAINK *et al.*, 1987), conforme estratégia descrita na figura 10, originando as fusões *phaZ1::lacZ* e *phaZ2::lacZ*. As clonagens foram confirmadas por reação de PCR usando colônias crescidas em meio LA com

tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As colônias contendo o promotor do gene *phaZ1*, após reação de PCR originaram banda de DNA no gel de 520 pares de bases (pb), correspondente a sequência promotora, confirmando a fusão *phaZ1::lacZ*. As colônias portando o fragmento do promotor do gene *phaZ2* deram origem a banda no gel de 409 pb, indicando a presença da sequência promotora (Fig. 11).

(A)

Clonagem da região promotora do gene *phaZ1* nos vetores pTZ57R/T e pPW452



(B)

Clonagem da região promotora do gene *phaZ2* nos vetores pTZ57R/T e pPW452

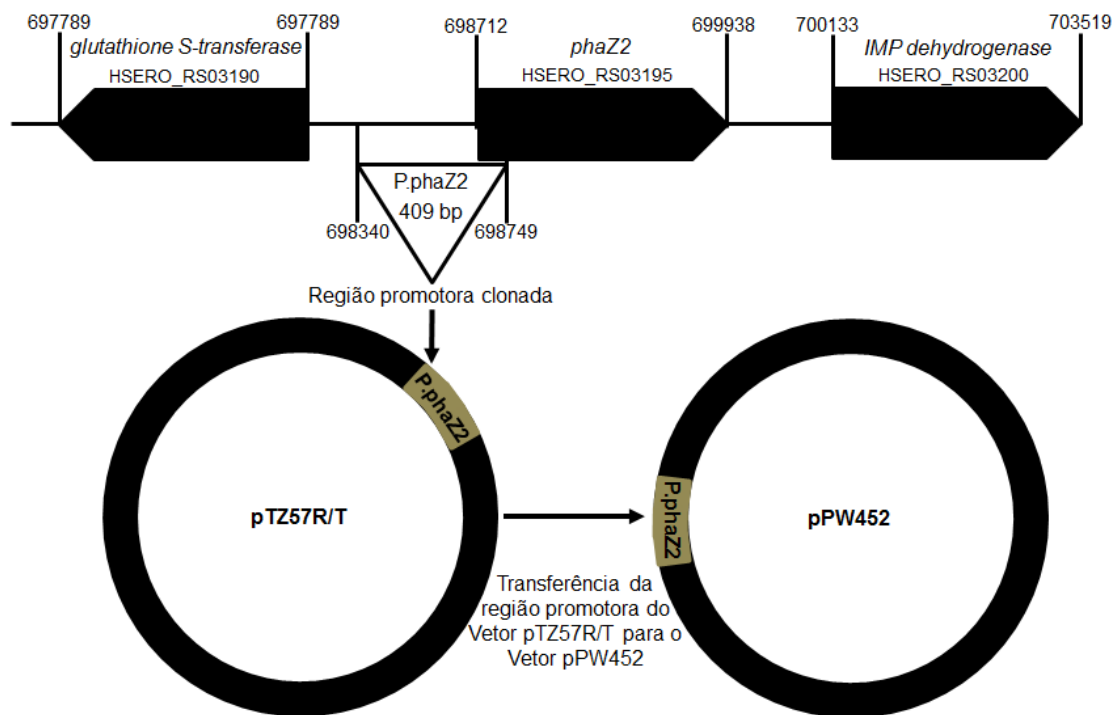


FIGURA 10 - (A) Estratégia de clonagem utilizada para a construção da ligação do promotor *phaZ1* ao gene repórter *lacZ*. A sequência promotora do gene *phaZ1* (520 pb) foi amplificada por PCR e clonada no vetor pTZ-57R/T (Invitrogen). A região promotora do gene *phaZ1*, presente no plasmídeo pTZ-57R/T, foi isolada após digestão com as enzimas EcoRI e PaeI (Fermentas) e clonada no vetor pPW452 também digerido com EcoRI e Pae I, originando a fusão *phaZ1::lacZ*. (B) Estratégia de clonagem utilizada para a construção da ligação do promotor *phaZ2* ao gene repórter *lacZ* com o objetivo de construir a fusão *phaZ2::lacZ*. Foi adotado a estratégia descrita para a construção da fusão *phaZ1::lacZ*. As reações de ligação foram feitas com T4 DNA ligase (Fermentas) e transformadas em *E. coli* TOP10.

(A)

(B)

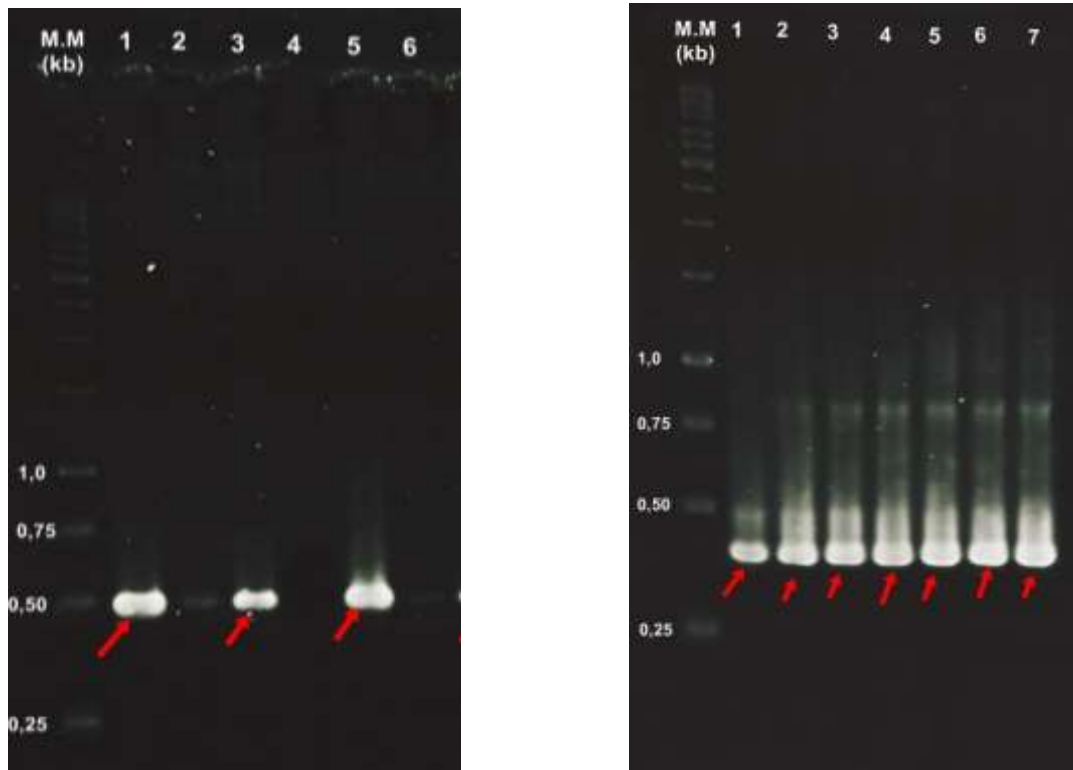


FIGURA 11 - Eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 1X dos produtos de PCR utilizando colônias transformadas com ligações dos promotores dos genes *phaZ1* e *phaZ2* clonados no vetor pPW452. As setas vermelhas indicam os produtos obtidos a partir de colônias isoladas contendo as fusões *p.phaZ1::lacZ* (A) e *p.phaZ2::lacZ* (B). M.M refere-se ao marcador de massa molecular de 1Kb (FERMENTAS), os tamanhos das bandas estão indicados (em kb). O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem registrada utilizando transiluminador de luz ultravioleta com sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

4.3 ENSAIO DE EXPRESSÃO DAS FUSÕES *phaZ1::lacZ* e *phaZ2::lacZ*

As análises de expressão gênica usando as fusões *phaZ1::lacZ* e *phaZ2::lacZ* na estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1 (Fig. 12), indicam que *phaZ1* possui expressão superior a *phaZ2*. A expressão de *phaZ2* é idêntico ao vetor sem promotor (*lacZ*).

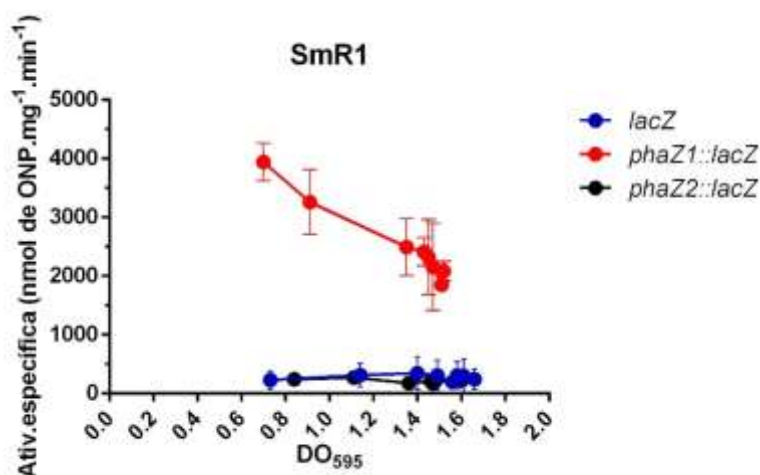


FIGURA 12 - Atividade específica de β -galactosidase na estirpe SmR1 de *H. seropedicae* conjugada com as fusões *phaZ1::lacZ*, *phaZ2::lacZ* e gene *lacZ* (vetor pPW452 sem promotor) cultivadas por 15 horas a 30 °C sob agitação a 120 rpm em NFbHP-malato, contendo 20 mmol/L de NH_4Cl e os antibiótico tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e estreptomicina (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cada ponto no gráfico corresponde a média de triplicatas independentes analisadas em duplicatas. As barras de erro correspondem ao desvio padrão entre as análises das culturas independentes.

Considerando os resultados observados e as análises *in silico*, no qual o promotor contém um suposto sítio conservado para a ligação do fator de transcrição sigma 70, é possível sugerir expressão constitutiva do gene *phaZ1*. A ausência de expressão da fusão *phaZ2::lacZ* nessas condições, indicam que *phaZ1* é a principal PHB depolimerase de *H. seropedicae*. Em *R. eutropha* (YORK *et al.*, 2003), PhaZ1 é a principal depolimerase, uma vez que na ausência desse gene há acúmulo de PHB. Contudo quando a estirpe mutante PhaZ1 é transferida para uma condição de cultivo sem carbono, PhaZ2 atua mobilizando PHB. No duplo mutante da estirpe não há degradação de PHB (YORK *et al.*, 2003). Dados as similaridades filogenéticas entre os genes de *R. eutropha* e *H. seropedicae* é possível que os mecanismos de mobilização sejam semelhantes.

Com o objetivo de analisar se as depolimerases atuam na regulação de seus produtos gênicos foi realizado ensaios de mobilização de PHB nos mutantes ΔphaZ1 , ΔphaZ2 e duplo mutante $\Delta\text{phaZ1phaZ2}$ (Fig. 13).

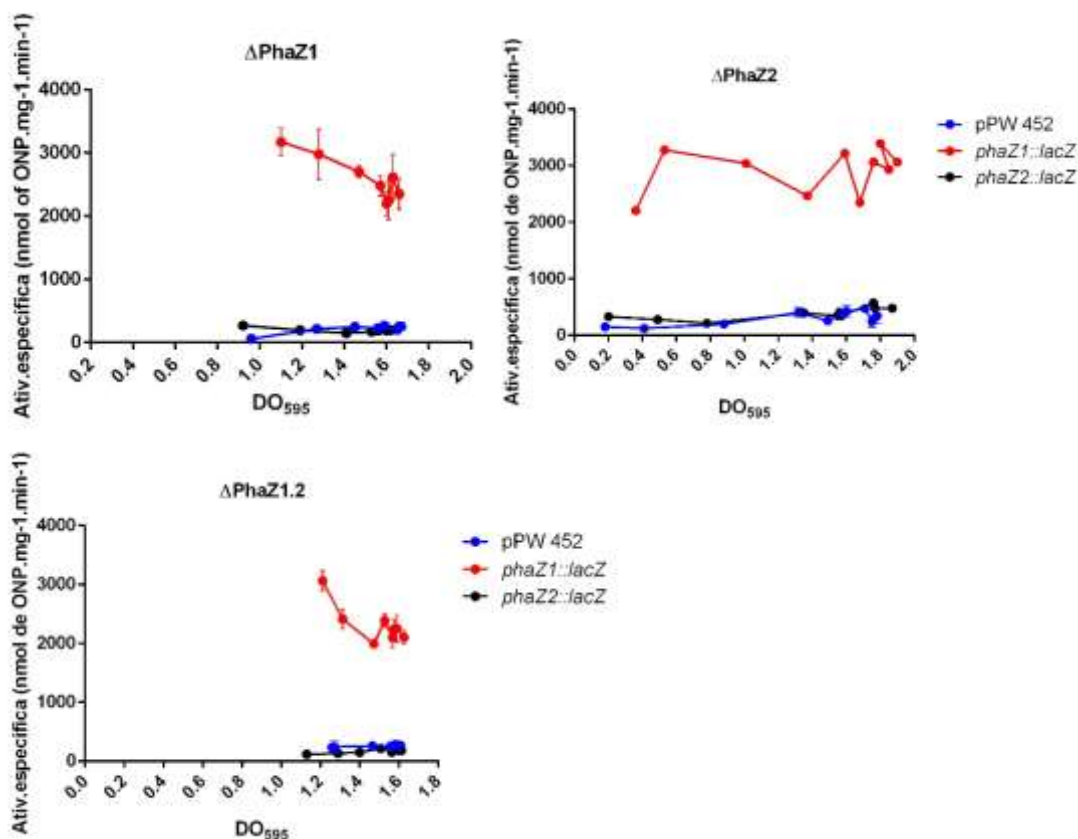


FIGURA 13 - Atividade específica de β-galactosidase nas estirpes mutantes $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$ e $\Delta phaZ1phaZ2$, conjugadas com as fusões $phaZ1::lacZ$, $phaZ2::lacZ$ e gene $lacZ$ (vetor pPW452 sem promotor) cultivadas por 15 horas a 30 °C sob agitação a 120 rpm em NFbHP-malato, contendo 20 mmol/L de NH_4Cl e os antibiótico tetraciclina (10μg/mL) e estreptomicina (80 μg/mL). Cada ponto no gráfico corresponde a média de triplicatas independentes (com exceção da estirpe $\Delta PhaZ2$ - uma única replicata) analisadas em duplicatas. As barras de erro correspondem ao desvio padrão entre as análises das culturas independentes.

Os resultados de expressão gênica usando os mutantes *phaZ* indicam que a ausência desses genes não afeta o padrão de expressão das depolimerases, observado na estirpe SmR1. Desse modo, é possível sugerir acúmulo de PHB na ausência de PhaZ1, dado a ausência de expressão de *phaZ2*, conforme observado em *R. eutropha* (YORK *et al.*, 2003). Contudo, são necessários experimentos de mobilização de polihidroxibutirato com *H. seropedicae* para confirmar essa hipótese.

Segundo Kadowaki *et al.* (2011), *H. seropedicae* possui uma proteína regulatória (PhaR), que supostamente atua como repressor de genes do metabolismo de PHB. Os autores localizaram uma sequência conservada

comum aos promotores envolvidos com o metabolismo de PHB, inclusive entre os promotores das depolimerases (Fig. 9). De acordo com o modelo de regulação proposto (STUBBE & TIAN, 2003), PhaR liga-se preferencialmente aos grânulos de PHB, porém numa condição em que o polímero encontra-se em baixa concentração na célula ou está ausente, a proteína liga-se ao promotor dos genes inibindo a expressão. Com o objetivo de verificar o efeito de PhaR e da ausência de PHB na expressão das depolimerases, as fusões *phaZ1::lacZ* e *phaZ2::lacZ* foram conjugadas com as estirpes $\Delta phaR$ e $\Delta phaC1$. $\Delta PhaC1$ é incapaz de sintetizar PHB, portanto espera-se que nesse mutante PhaR reprima a expressão de depolimerase.

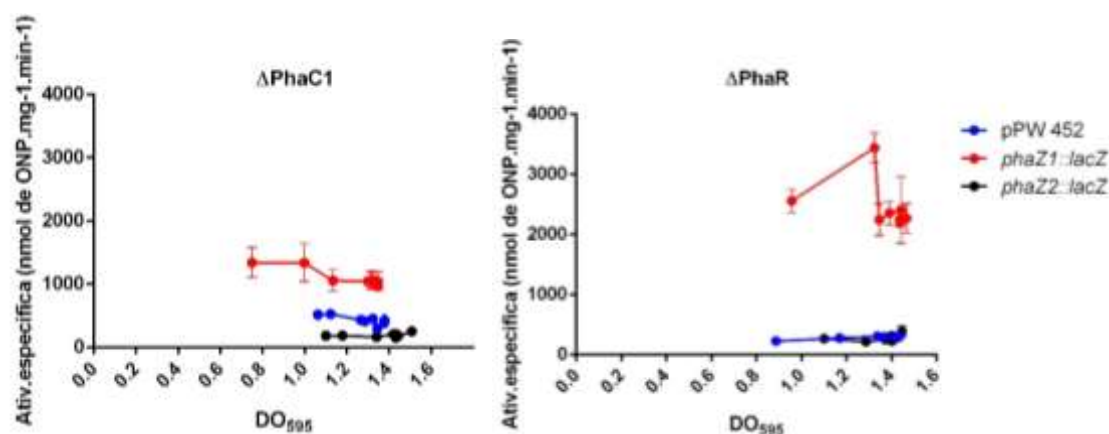


FIGURA 14 - Atividade específica de β -galactosidase nas estirpes mutantes dos genes $\Delta phaR$ e $\Delta phaC1$, conjugadas com as fusões *phaZ1::lacZ*, *phaZ2::lacZ* e gene *lacZ* (vetor pPW452 sem promotor) cultivadas por 15 horas a 30 °C sob agitação a 120 rpm em NFbHP-malato, contendo 20 mmol/L de NH_4Cl e os antibiótico tetraciclina (10 μ g/mL) e estreptomicina (80 μ g/mL). Cada ponto no gráfico corresponde a média de triplicatas independentes analisadas em duplicatas. As barras de erro correspondem ao desvio padrão entre as análises das culturas independentes.

Os resultados obtidos com a estirpe $\Delta PhaC1$, deficiente em síntese de PHB, foram inferiores ao observado para as demais estirpes, indicando que há redução na expressão do gene *phaZ1* na ausência do polímero. Contudo, não é possível afirmar que a redução na expressão de *phaZ1* nesse mutante é devida à regulação pelo repressor PhaR. Isso se justifica em função da ausência de variação na expressão das depolimerases no mutante $\Delta PhaR$, quando comparado a estirpe SmR1. Desse modo, é possível que outros

mecanismos regulatórios estejam envolvidos com a regulação na expressão de depolimerases.

A expressão do promotor *phaZ2* não foi observada nas condições ensaiadas e a atividade de β -galactosidase apresentou valores semelhantes àqueles observados com o vetor pPW452 (plasmídeo sem a região promotora). No entanto, foi observado aumento na expressão do gene *phaZ2* na estirpe SmR1 aderida a raiz de trigo (*Triticum aestivum*) em relação a planctônica (PANKIEVICZ *et al.*, 2016), isso nos permitiu inferir a existência de um mecanismo de regulação transcricional envolvido, possivelmente uma resposta à concentração de amônio (NH_4Cl), característico dessas condições de cultivo. Esses resultados em conjunto com as análises da região promotora, sugerem um mecanismo regulatório dependente de variações nas concentrações de nitrogênio no meio.

A estirpe SmR1 contendo a fusão *phaZ2::lacZ* foi submetida a condições de cultivo em diferentes concentrações de NH_4Cl (2, 5 e 10 mM) e a atividade de β -galactosidase foi determinada (Fig. 15). Resultando em aumento na expressão de *phaZ2* em baixa concentração de amônio.

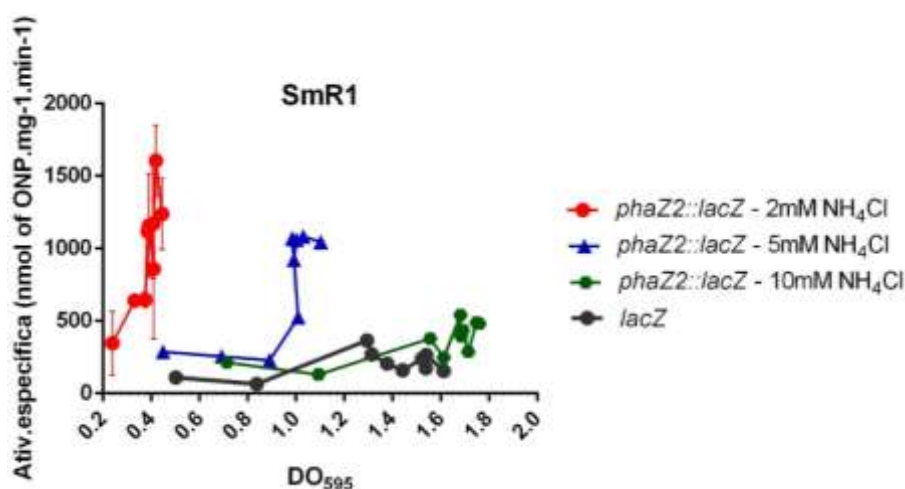


FIGURA 15 - Atividade específica de β -galactosidase na estirpe SmR1 utilizando a fusão *phaZ2::lacZ*. Cultivo realizado em diferentes concentrações de NH_4Cl (2, 5 e 10 mM) em meio NFbHP-malato. *lacZ*, corresponde ao plasmídeo pPW452 sem a região promotora. Cultivo realizado a 30°C por 15 horas. Os dados foram obtidos a partir de um único experimento utilizando replicatas técnicas.

Os resultados observados, em conjunto com as análises da região promotora de *phaZ2*, no qual está presente o consenso para a ligação de RpoN, indicam que esse gene é expresso em resposta a redução de NH₄Cl no meio. Contudo, a expressão de genes mediada por RpoN é dependente de ativadores transcricionais e as análises da região promotora sugerem a existência de um sítio consenso para a ligação de NtrC, um ativador transcricional de genes dependentes de RpoN em *H. seropedicae* (SOUZA *et al.*, 2000). Adicionalmente, resultados de transcriptoma do mutante Δ ntrC de *H. seropedicae* demonstrou diminuição na expressão de *phaZ2* (Paloma Bonato, comunicação pessoal). Conclui-se então que outros experimentos são necessários para demonstrar a regulação da expressão de *phaZ2* em resposta a NtrC.

5 CONCLUSÕES

O gene *phaZ1* é expresso constitutivamente, sugerindo que o PhaZ1 é a principal enzima envolvida na mobilização de polihidroxibutirato em *H. seropedicae*. A expressão desse gene diminui na ausência de PHB, conforme observado no mutante Δ PhaC1. Contudo, não foi possível inferir os mecanismos que levam a redução na expressão desse gene.

A expressão de *phaZ2* foi extremamente baixa nas estirpes cultivadas em meio NFbHPN-malato. O aumento na expressão de *phaZ2* foi observado em cultivo realizado sob baixas concentrações de amônio (NH₄Cl). A região promotora desse gene contém sequência conservada para a ligação de RpoN, e um possível sítio de ligação para NtrC, envolvido com a ativação transcricional de RpoN. Não foi observado diferenças na expressão do gene na ausência de PhaR, considerada um regulador transcricional de genes do metabolismo de PHB.

6 REFERÊNCIAS

ALVES, L. P. S.; TEIXEIRA, C. S.; TIRAPELLE, E. F.; et al. Backup expression of the PhaP2 phasin compensates for *phaP1* deletion in *Herbaspirillum seropedicae*, maintaining fitness and PHB accumulation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAY, p. 1–13, 2016.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549–579, 2005.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, A. N. D. J. a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, p. 86–93, 1986.

BALSANELLI, E.; TADRA-SFEIR, M. Z.; FAORO, H.; et al. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2343–2356, 2016.

BARNES, D. K. A; GALGANI, F.; THOMPSON, R. C.; BARLAZ, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**. Series B, Biological sciences, v. 364, n. 1526, p. 1985–1998, 2009.

BATISTA, M. B.; MÜLLER-SANTOS, M. Potentiality of *Herbaspirillum seropedicae* as a Platform for Bioplastic Production. In: Castro-Sowinski S. (eds) **Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability**. Microorganisms for Sustainability, vol 1. Springer, Singapore . 2016.

BUGNICOURT, E.; CINELLI, P.; LAZZERI, A.; ALVAREZ, V. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. **Express Polymer Letters**, v. 8, n. 11, p. 791–808, 2014.

CATALAN, A. I.; FERREIRA, F.; GILL, P. R.; BATISTA, S. Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole

carbon sources and on lactose when engineered to express the lacZlacY genes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1352–1357, 2007.

CHAN, W.-T.; VERMA, C. S.; LANE, D. P.; GAN, S. K.-E. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. **Bioscience reports**, v. 33, n. 6, p. 931–937, 2013. Disponível em: <<http://www.bioscirep.org/bsr/033/e086/bsr033e086.htm>>.

CHEN, G.-Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chemical Society reviews**, v. 38, n. 8, p. 2434–2446, 2009.

CHUBATSU, L. S.; MONTEIRO, R. A.; DE SOUZA, E. M.; et al. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 197–207, 2012.

COZAR, A.; ECHEVARRIA, F.; GONZALEZ-GORDILLO, J. I.; et al. Plastic debris in the open ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 28, p. 10239–10244, 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1314705111>>. .

CÓZAR, A.; SANZ-MARTÍN, M.; MARTÍ, E.; et al. Plastic Accumulation in the Mediterranean. **PLOS ONE**, p. 1–12, 2015.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, p. 621–631, 2004.

EDGAR, R. C.; DRIVE, R. M.; VALLEY, M. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

FINN, R. D.; BATEMAN, A.; CLEMENTS, J.; et al. Pfam: the protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. November 2013, p. 222–230, 2014.

FOSTER, L. J.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. Quantitative determination of intracellular depolymerase activity in *Pseudomonas oleovorans* inclusions containing poly-3-hydroxyalkanoates with long alkyl substituents. **FEMS microbiology letters**, v. 118, n. 3, p. 279–82, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7794414>>

HANDRICK, R.; REINHARDT, S.; KIMMIG, P.; JENDROSSEK, D. The “intracellular” poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7243–7253, 2004.

HUISMAN, G. W.; WONINK, E.; MEIMA, R.; et al. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*: Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 4, p. 2191–2198, 1991.

JENDROSSEK, D.; HANDRICK, R. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates*. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 403–432, 2002. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.56.012302.160838>>.

JENDROSSEK, D.; PFEIFFER, D. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 2357–2373, 2014.

KADOWAKI, M. A. S.; MÜLLER-SANTOS, M.; REGO, F. G. M.; et al. Identification and characterization of PhbF: a DNA binding protein with regulatory role in the PHB metabolism of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **BMC microbiology**, v. 11, n. 1, p. 230, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/230>>.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. Sequencing and functional analysis of the nifENXorf1orf2 gene cluster of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 181, n. 1, p. 165–170, 1999.

KNOLL, M.; HAMM, T. M.; WAGNER, F.; MARTINEZ, V.; PLEISS, J. The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse

family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 1–8, 2009.

Kumar S., Stecher G., and Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p.1870-1874, 2016.

Jones D.T., Taylor W.R., and Thornton J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Computer Applications in the Biosciences**, v. 8, p. 275-282, 1992.

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 1, p. 1–14, 1996.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 63, n. 1, p. 21–53, 1999.

TSENG, C.; CHEN, H.; SHAW, G. Identification and Characterization of the *Bacillus thuringiensis phaZ* Gene, Encoding New Intracellular Poly-3-Hydroxybutyrate Depolymerase. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 21, p. 7592–7599, 2006.

NORTH, E. J.; HALDEN, R. U. Plastics and environmental health: The road ahead. **Reviews on Environmental Health**, v. 28, n. 1, p. 1–8, 2013.

OBRUCA, S.; SEDLACEK, P.; KRZYZANEK, V.; MRAVEC, F. Accumulation of Poly (3-hydroxybutyrate) Helps Bacterial Cells to Survive Freezing. **PLOS ONE**, p. 1–16, 2016.

PANKIEVICZ, V. C. S.; CAMILIOS-NETO, D.; BONATO, P.; et al. RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 589–603, 2016.

TAL, S.; OKON, Y. Production of the reserve material poly-P-hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 608-613, 1985.

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

PEPLINSKI, K.; EHRENREICH, A.; DÖRRING, C.; et al. Genome-wide transcriptome analyses of the “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism. **Microbiology**, v. 156, n. 7, p. 2136–2152, 2010.

PERSUHN, D. C.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; et al. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 192, n. 2, p. 217–221, 2000.

PLASTICS, B. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2005.

R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RICE, P. The European Molecular Biology Open Software Suite EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends in genetics**, v. 16, n. 6, p. 2–3, 2000.

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

SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, a R, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors., **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–7, 1977.

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

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: Role of the NtrC

and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v. 146, n. 6, p. 1407–1418, 2000.

SPAINK, H. P.; OKKER, R. J. H.; WIJFFELMAN, C. A.; PEES, E.; LUGTENBERG, B. J. J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. **Plant Molecular Biology**, v. 9, n. 1, p. 27–39, 1987.

STEINBIICHEL, A.; STEINBIICHEL, A. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 219–228, 1995.

STEINBÜCHEL, A; HUSTEDE, E.; LIEBERGESELL, M.; et al. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 9, n. 2–4, p. 217–230, 1992.

STUBBE, J.; TIAN, J. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis : the role of the PHA synthase. **The Royal Society of Chemistry**, p. 445–457, 2003.

STIRLING, D. DNA extraction from fungi, yeast, and bacteria. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 226, p. 53–4, 2003.

TIRAPELLE, E. F.; MÜLLER-SANTOS, M.; TADRA-SFEIR, M. Z.; et al. Identification of Proteins Associated with Polyhydroxybutyrate Granules from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 - Old Partners, New Players. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

TWERDOCHLIB, A. L.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; et al. Expression, purification, and DNA-binding activity of the solubilized NtrC protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**, v. 30, n. 1, p. 117–123, 2003.

UCHINO, K.; SAITO, T.; GEBAUER, B.; JENDROSSEK, D. Isolated Poly (3-Hydroxybutyrate) (PHB) Granules Are Complex Bacterial Organelles Catalyzing Formation of PHB from Acetyl Coenzyme A (CoA) and Degradation of PHB. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 8250–8256, 2007.

WOODLEY, P.; BUCK, M.; KENNEDY, C. Identification of sequences important for recognition of vnf genes by the VnfA transcriptional activator in *Azotobacter vinelandii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 135, n. 2–3, p. 213–221, 1996.

YORK, G. M.; LUPBERGER, J.; TIAN, J.; LAWRENCE, A. G. L.; STUBBE, J.; SINSKEY, A. J. 2003. *Ralstonia eutropha* H16 encodes two and possibly three intracellular poly [D-3-hydroxybutyrate] depolymerase genes. **J. Bacteriology**, v.185, n. 13, p.3788–3794, 2003.

ZHOU, M.; GOMEZ-SANCHEZ, C. E. Universal TA Cloning. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2000.