

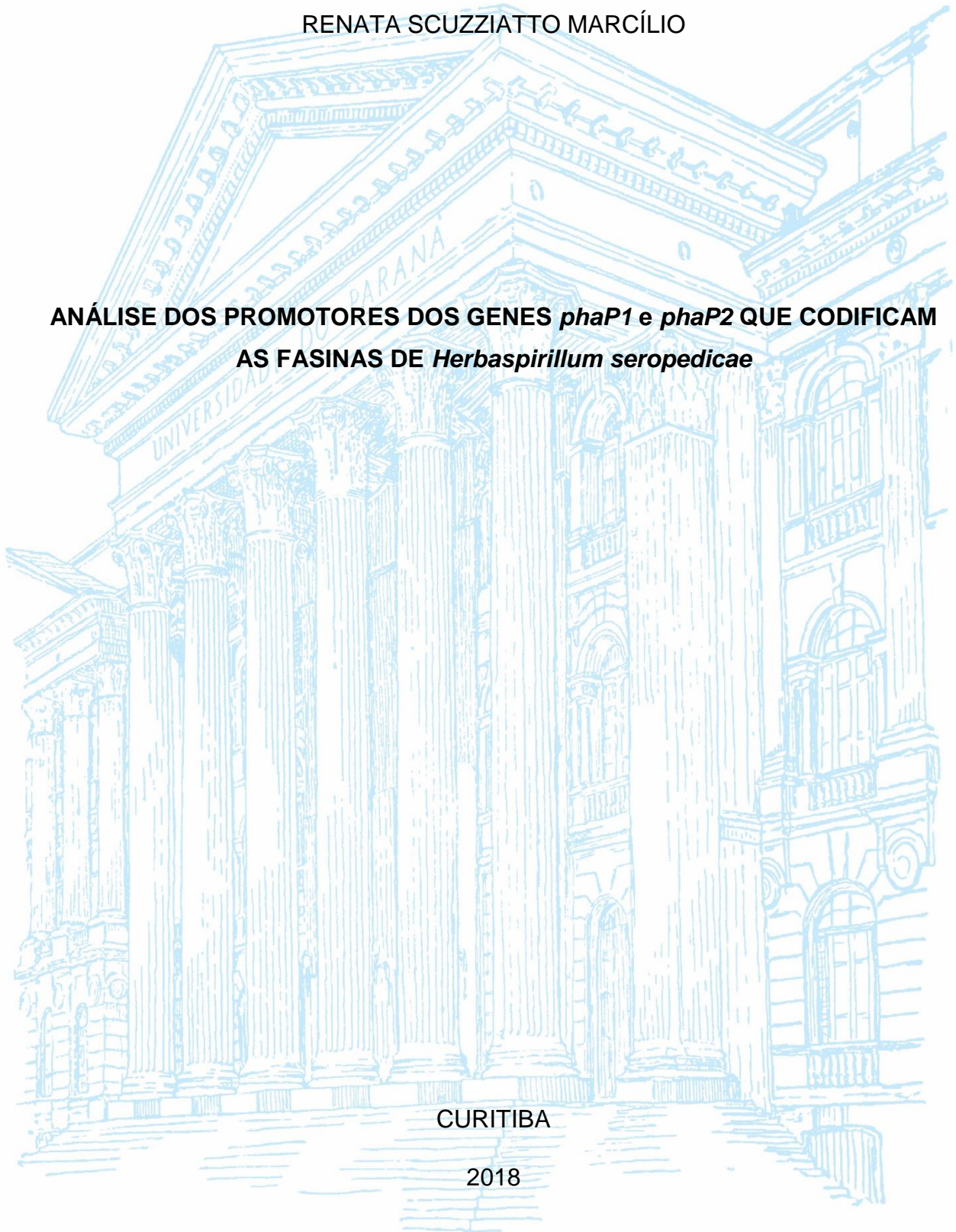
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATA SCUZZIATTO MARCÍLIO

**ANÁLISE DOS PROMOTORES DOS GENES *phaP1* e *phaP2* QUE CODIFICAM
AS FASINAS DE *Herbaspirillum seropedicae***

CURITIBA

2018



RENATA SCUZZIATTO MARCÍLIO

**ANÁLISE DOS PROMOTORES DOS GENES *phaP1* e *phaP2* QUE CODIFICAM
AS FASINAS DE *Herbaspirillum seropedicae***

Monografia apresentada como requisito para a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, sob a orientação da Prof^a Dr^a Leda Satie Chubatsu.

CURITIBA

2018

RESUMO

O consumo de produtos com embalagens plásticas é crescente e o acúmulo deste material causa grande impacto ambiental agravado por sua baixa taxa de degradação. Com isso, a demanda por soluções para substituir o plástico de origem fóssil, por materiais biodegradáveis é necessária. Polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres alifáticos biológicos sintetizados por diversas bactérias e que tem potencial para substituir polímeros petroquímicos com a vantagem de serem biodegradáveis e poderem ser sintetizados a partir de fontes renováveis de energia. Polihidroxibutirato (PHB), um tipo de PHA, é estocado intracelularmente formando grânulos insolúveis recobertos por proteínas, sendo a fasina a principal proteína que recobre a superfície dos grânulos. *Herbaspirillum seropedicae*, uma bactéria diazotrófica Gram-negativa, tem a capacidade de produzir PHB. Este micro-organismo apresenta treze genes potencialmente envolvidos no metabolismo de PHB, dentre eles, estão os genes *phaP1* (locus tag Hsero_RS0808150) e *phaP2* (locus tag Hsero_RS23810) que codificam as fasinas PhaP1 e PhaP2, respectivamente. Neste projeto analisamos as regiões promotoras dos genes *phaP1* e *phaP2* de *H. seropedicae* utilizando fusões com o gene repórter *lacZ*. A expressão dos promotores foi avaliada nas estipes selvagem (SMR1) e nos mutantes Δ phaP1, Δ phaP2, Δ phaP1.2, Δ phaR, Δ phaC1 e Δ ntrC de *H. seropedicae*. Os resultados indicam que a expressão de *phaP1* é constitutiva enquanto a expressão de *phaP2* é maior quando a célula é cultivada em limitação de amônio. Foi também observado que a expressão de *phaP2* é maior no mutante Δ phaP1 e duplo mutante Δ phaP1.2, sugerindo que a ausência de PhaP1 sinaliza necessidade de PhaP2. Neste trabalho também são apresentados resultados iniciais para a mutação dos sítios de ligação para a proteína regulatória PhaR e para o sítio de ligação para o fator sigma 70 na região promotora dos genes *phaP1* e *phaP2*.

Palavras-chave: PHB; bioplástico; fasinas; *Herbaspirillum seropedicae*

Financiamento: CNPq e CAPES

ABSTRACT

The usage of products with plastic packaging is increasing and the accumulation of this material causes great environmental impact aggravated by its low degradation rate. Therefore, solutions for replacing the use of plastic of fossil origin by biodegradable materials are required. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biological aliphatic polyesters synthesized by various bacteria and with the potential to replace petrochemical polymers with the advantage of being biodegradable and they can be synthesized from renewable sources of energy. Polyhydroxybutyrate (PHB), a type of PHA, is stored intracellularly as insoluble granules covered by proteins, with fasin being the main protein covering the surface of the granules. *Herbaspirillum seropedicae*, a gram-negative diazotrophic bacterium, produces PHB, and its genome has thirteen genes potentially involved in PHB metabolism, among which are the genes *phaP1* (locus tag Hsero_RS0808150) and *phaP2* (locus tag Hsero_RS23810) that encode for PhaP1 and PhaP2, respectively. In this project we analyzed the promoter regions of the *H. seropedicae phaP1* and *phaP2* genes using fusions with the *lacZ* reporter gene. Promoter expression was evaluated using *H. seropedicae* wild-type strain (SMR1) and mutants Δ phaP1, Δ phaP2, Δ phaP1.2, Δ phaR, Δ phaC1, and Δ ntrC. The results indicate that the expression of *phaP1* is constitutive while the expression of *phaP2* is increased when cells are cultured under ammonium limiting conditions. It was also observed that the expression of *phaP2* is higher in the Δ phaP1 mutant and the Δ phaP1.2 double mutant, suggesting that the absence of PhaP1 signals the need for PhaP2. Initial results for mutation of the DNA binding sites for the regulatory protein PhaR and for the sigma factor 70 within the promoter region of the *phaP1* and *phaP2* genes are also presented.

Keywords: PHB; bioplastic; fasin; *Herbaspirillum seropedicae*

Financial support: CNPq and CAPES

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO	6
1.2	OBJETIVOS	9
1.3	JUSTIFICATIVA	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	11
2.2	POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)	11
2.3	FASINAS.....	12
2.4	PROTEÍNA REGULATÓRIA PhaR (PhbF).....	13
2.5	FATORES SIGMA.....	13
3	METODOLOGIA	15
3.1	ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS.....	15
3.2	CULTIVO DAS CÉLULAS E MEIOS DE CULTURA	16
3.3	PREPARAÇÃO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES DE <i>E. coli</i> .	17
3.4	EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	17
3.5	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	18
3.6	CONJUGAÇÃO BACTERIANA	18
3.7	DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA VIA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE	19
3.8	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	21
3.9	DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA MUTAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA	21
3.10	MUTAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA (<i>Overlapping PCR</i>).....	22

3.11 PURIFICAÇÃO DE DNA POR ADSORÇÃO EM SÍLICA	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AS MUTAÇÕES SÍTIO-DIRIGIDAS.....	24
4.2 GRADIENTE DE TEMPERATURA PARA AMPLIFICAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	26
4.3 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS PROMOTORES <i>phaP</i> UTILIZANDO O GENE REPORTE <i>lacZ</i>	30
4.3.1 ESTIRPE PARENTAL E MUTANTES PARA AS FASINAS.....	30
4.3.2 MUTANTE PARA PROTEÍNA REGULATÓRIA PhaR.....	34
4.3.3 MUTANTE PARA A SÍNTESE DE PHB (Δ phaC)	35
4.3.4 MUTANTE PARA O METABOLISMO DE NITROGÊNIO (Δ ntrC).....	36
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Os plásticos possuem grande variedade de aplicações devido a suas propriedades: a versatilidade no uso e seu preço reduzido (HUANG *et al.*, 1995). Essas características fizeram com que a demanda mundial por este material aumentasse exponencialmente. Segundo Reddy (2003) mais de 100 milhões de toneladas de plástico são produzidos a cada ano. Sendo que aproximadamente 14 milhões de toneladas de resíduos plásticos são descartados em aterros sanitários e mais de 100 mil toneladas são jogados no mar (HUANG *et al.*, 1995). Assim, o volume de material plástico descartado no meio ambiente é 20% do volume total (HUANG *et al.*, 1995; AGNELLI, 1996; LEÃO, TAN, 1998).

Sabe-se que a alta massa molar média e a estrutura química dos plásticos sintéticos, provenientes de fontes fósseis como o petróleo, dificultam o processo de degradação por micro-organismos. Por isso, muitos plásticos precisam de mais de 100 anos para serem totalmente degradados (KIRBAS, 1999; TORIKAI, HASEGAWA, 1999; LEE, CHOI, 1998; ROSA *et al.*, 2004).

É importante ressaltar que assim como o acúmulo do plástico, os processos de extração e refino, decorrentes da produção dos polímeros de petróleo, também causam grande impacto ao meio ambiente (BRITO *et al.*, 2001).

Esses fatores envolvidos com o uso do plástico sintético tornam a busca por alternativas que minimizem o dano ambiental, ainda mais importante. Além da conscientização da população em relação a um descarte correto dos rejeitos plásticos, a reciclagem e, mais recentemente, o uso de bioplástico são alternativas vitais na busca da sustentabilidade.

O bioplástico é constituído por biopolímeros e pode ser sintetizado a partir de fontes renováveis e posteriormente degradado por micro-organismos como fungos, bactérias e algas, quando em condições ambientais ideais. (MOHANTY *et al.*, 2005; BELGACEM, GANDINI, 2008; RAY, BOUSMINA, 2005).

Dentre os biopolímeros estão os polihidroxicanoatos (PHAs) que são poliésteres alifáticos sintetizados por bactérias a partir de vários tipos de substratos de carbono (HUNEULT, 2007; BORDES, POLLET, AVÉROUS, 2009) sob condições onde há disponibilidade de carbono e ausência de outros nutrientes como oxigênio e nitrogênio (LEE, 1996; JENDROSSEK, HANDRICK, 2002). Os PHAs são

acumulados como inclusões insolúveis no citoplasma celular de micro-organismos (BASTIOLI, 2005). Suas propriedades físico-químicas oferecem potencial para substituírem polímeros convencionais como o polietileno e o polipropileno (CHEN, 2005).

O principal e mais estudado polímero da família dos PHAs é o polihidroxibutirato (PHB) (JENDROSSEK, PFEIFFER, 2014; KADOURI *et al.*, 2005; MONTAGNA, TORRES, 2008; CHODAK; 2008). É sintetizado por uma grande gama de micro-organismos a partir de monômeros de 3-hidroxibutirato, sendo armazenado no citoplasma na forma de grânulos hidrofóbicos recobertos por proteínas (JENDROSSEK, PFEIFFER, 2014; KADOURI *et al.*, 2005; MONTAGNA; TORRES, 2008).

Quando células bacterianas estão sob condições ambientais limitantes, PHB pode constituir aproximadamente 80% do peso seco. Na ausência dessas limitações, a produção de PHB diminui (DAWES; SENIOR, 1973). Isso deve-se ao fato de PHB ser um polímero de reserva energética semelhante ao glicogênio e ao amido (GRIEBEL; SMITH; MERRICK, 1968). Quando há disponibilidade de carbono e deficiência de outro nutriente, ocorre a síntese de PHB e o polímero é armazenado na forma de grânulos de PHB. Quando a disponibilidade de carbono diminui, a produção do polímero é suspensa e o polímero estocado passa a ser degradado (DOUDOROFF; STAINER, 1959).

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica, gram-negativa (BALDANI *et al.*, 1984) que tem a capacidade de associar-se a muitas plantas de interesse econômico incluindo arroz e milho (PIMENTEL *et al.*, 1991; OLIVARES *et al.*, 1996; OLIVARES *et al.*, 1997; JAMES *et al.*, 1997; JAMES *et al.*, 2002). É uma bactéria endofítica que fixa nitrogênio, convertendo o nitrogênio gasoso em amônia, a qual é utilizada pelas plantas (LADHA *et al.*, 1997). *H. seropedicae* é promotora do crescimento vegetal, tendo potencial biofertilizante (BALDANI *et al.*, 2005), surgindo como uma fonte viável para a substituição de fertilizantes estritamente químicos (LADHA *et al.*, 1997).

A partir da análise do genoma de *H. seropedicae* foram identificados genes potencialmente envolvidos no metabolismo de PHB (Pedrosa *et al.*, 2011; TIRAPELLE *et al.*, 2013; KADOWAKI *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2016). Entre eles foram identificados dois genes, *phaP1* e *phaP2*, que codificam para proteínas estruturais denominadas fasinias e um gene que codifica para o regulador negativo

PhaR (anteriormente denominado PhbF em *H. seropedicae*) (KADOWAKI *et al.*, 2011).

As fasinas são as principais proteínas associadas aos grânulos de PHB (NEUMANN *et al.*, 2008). São proteínas anfipáticas responsáveis por recobri-los e apresentam como principal função impedir que os mesmos sofram o fenômeno de coalescência, quando todos os grânulos se unem em um único (STEINBÜCHEL *et al.*, 1995), sendo portanto, importantes no controle do número e tamanho dos grânulos existentes no interior bacteriano (PÖTTER *et al.*, 2004; STEINBÜCHEL *et al.*, 1995; WIECZOREK *et al.*, 1995;).

1.2 OBJETIVOS

- Objetivo Geral

Avaliar a expressão dos genes *phaP1* e *phaP2* que codificam as proteínas fasinias de *Herbaspirillum seropedicae*.

- Objetivos Específicos

— Avaliar a expressão gênica dos promotores *phaP1* e *phaP2* fusionados ao gene repórter *lacZ*, através de atividade de beta-galactosidase e dosagem de proteínas nas estirpes selvagem (SMR1) de *H. seropedicae* e nos mutantes para as fasinias (Δ *phaP1*, Δ *phaP2* e duplo *mutante* Δ *phaP1.2*), no mutante para síntese de PHB (Δ *phaC*), no mutante para a proteína regulatória (Δ *PhaR*) e no mutante para o gene Δ *ntrC*, um ativador transcricional relacionado com o metabolismo de nitrogênio.;

— Construir oligonucleotídeos iniciadores para realizar mutações sítio-dirigidas na sequência promotora dos genes *phaP1* e *phaP2*;

— Obter sequências contendo mutações nos sítios de ligação para o fator σ^{70} e para a proteína regulatória *PhaR*.

1.3 JUSTIFICATIVA

PHB é armazenado intracelularmente na forma de grânulos insolúveis recobertos por diferentes proteínas, principalmente fasinias. Há indicação de que as fasinias estão envolvidas no tamanho e quantidade de grânulos de PHB sintetizados na bactéria, uma vez que impedem a coalescência dos grânulos.

A bactéria *H. seropedicae* apresenta dois genes que codificam para fasinias, *phaP1* e *phaP2*. Apesar de apresentarem similaridade estrutural, a expressão dos genes é diferente. O gene *phaP1* apresenta maior expressão e seu produto é encontrado em maior quantidade no grânulo de PHB. Neste trabalho, avaliamos a expressão dos genes *phaP1* e *phaP2* utilizando diferentes estirpes mutantes de *H. seropedicae* e também iniciamos o processo de mutação do provável sítio de ligação da proteína reguladora PhaR e do fator σ^{70} .

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae, uma bactéria gram-negativa, capaz de fixar nitrogênio (BALDANI *et al.*, 1984) e que apresenta a capacidade de associar-se com muitas plantas de interesse agrícola (PIMENTEL *et al.*, 1991; OLIVARES *et al.*, 1996; OLIVARES *et al.*, 1997; JAMES *et al.*, 1997; JAMES *et al.*, 2002) atuando como promotora de crescimento vegetal. Desta forma, apresenta-se como um potencial biofertilizante sendo uma alternativa economicamente viável e segura para o meio ambiente (LADHA *et al.*, 1997). Esta bactéria é capaz de produzir o polímero PHB a partir da metabolização de diferentes fontes de carbono (CATALÁN *et al.*, 2007) Genes potencialmente envolvidos no metabolismo de PHB foram identificados durante o sequenciamento genômico (PEDROSA *et al.*, 2011) e diferentes aspectos desse metabolismo em *H. seropedicae* tem sido estudados (KADOWAKI *et al.*, 2011; TIRAPELLE *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2016).

2.2 POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)

PHB é um polímero sintetizado por diversas bactérias a partir de acetil-CoA. Usualmente três enzimas participam do processo, sendo que a enzima PHB sintase ou PhbC é a responsável pela catálise da última etapa que leva a síntese do polímero. Após sua síntese, o PHB é armazenado no interior celular na forma de grânulos recobertos por uma monocamada fosfolipídica e por proteínas estruturais, dentre as quais a fasina é a principal (JENDROSSEK, 2009).

A produção de PHB é favorecida quando há disponibilidade de fontes de carbono, disponibilidade de equivalentes redutores, como o NADPH, ou quando parte do acetil-CoA gerado pelo catabolismo celular, que seria usado no ciclo ácido cítrico, não é aproveitado. Quanto a mobilização dos grânulos de PHB, existem enzimas que atuam a fim de catabolizar o polímero armazenado, gerando como produto acetil-CoA e NADPH. Estudos sugerem que esta mobilização ocorre em situações em que há ausência de carbono e baixas concentrações de nitrogênio no meio (JENDROSSEK e HANDRICK, 2002).

Além de sua produção estar relacionada com a reserva energética da célula, o metabolismo de PHB tem regulação de acordo com o balanço NAD(P)H/NAD(P)⁺, de acordo com as alterações de atividade das enzimas envolvidas no catabolismo

da glucose (ANDERSON, DAWES, 1990; BYROM, 1987; SENIOR, DAWES, 1971; SENIOR, DAWES, 1973; STEINBÜCHEL; SCHLEGEL, 1989).

PHB também tem sido associado com a adaptação bacteriana em condições de estresse ou de competição. Em bactérias promotoras de crescimento vegetal, por exemplo, a capacidade de mobilizar os grânulos de PHB utilizando-o como fonte de energia, na ausência de certos nutrientes, é importante para a manutenção da atividade metabólica (TAL *et al.*, 1985).

2.3 FASINAS

A fasina tem como principal função formar uma interface entre os grânulos hidrofóbicos de PHA e o citoplasma hidrofílico (STEINBÜCHEL *et al.*, 1995). Esse isolamento feito pelas fasinas é importante para evitar o fenômeno de coalescência dos grânulos no interior celular (PÖTTER *et al.*, 2004).

Esta proteína pode afetar positivamente a biossíntese do polímero, afetando o número e o tamanho dos grânulos (PÖTTER *et al.*, 2004; STEINBÜCHEL *et al.*, 1995; WIECZOREK *et al.*, 1995;). Han e colaboradores (2001) propuseram que as fasinas podem ainda reduzir o estresse intracelular causado pela presença de cadeias de PHAs. Essa hipótese pode ser sustentada ao levar-se em consideração que em *Escherichia coli*, uma bactéria que não produz nem estoca grânulos de PHAs, ao serem transferidos genes para a biossíntese do polímero de PHB na ausência das fasinas, ocorre superexpressão de genes que estão relacionados com a resposta anti-estresse (HAN *et al.*, 2001). Assim, na ausência das fasinas são necessárias outras proteínas para aliviar o estresse causado pelo acúmulo do polímero (STEINBÜCHEL *et al.*, 1995; LIEBERGESELL *et al.*, 1992; HOROWITZ, SANDERS, 1995; TESSMER *et al.*, 2007).

Estudos realizados em *Ralstonia eutropha* (YORK *et al.*, 2002) e em outras bactérias que produzem PHA (REHM, STEINBÜCHEL, 1999) demonstraram que quando bactérias são cultivadas em condições que não permitem a produção de PHB, a fasina não é expressa. Assim, a quantidade de fasina está relacionada à quantidade do polímero produzido (WIECZOREK *et al.*, 1995; YORK *et al.*, 2001b). Esse acoplamento pôde ser explicado após a descoberta da proteína regulatória PhaR (PÖTTER *et al.*, 2005), um regulador negativo dos genes envolvidos com o metabolismo de PHB (MAEHARA *et al.*, 1999; PÖTTER *et al.*, 2002; PIETRO *et al.*, 1999; MAEHARA *et al.*, 2001; PÖTTER *et al.*, 2002; CHOU, YANG, 2010).

2.4 PROTEÍNA REGULATÓRIA PhaR (PhbF)

A proteína PhaR (anteriormente indicado como PhbF em *Herbaspirillum seropedicae*) parece ter a função de regular negativamente a biossíntese das fasinas e, conseqüentemente, dos grânulos de PHB (MAEHARA *et al.*, 1999, 2001). Além disso, essa proteína é capaz de reprimir sua própria expressão (YORK *et al.*, 2001; PÖTTER *et al.*, 2002; MAEHARA *et al.*, 2001; KADOWAKI *et al.*, 2011). Quando se inicia a produção de PHB no interior celular, PhaR se desliga da molécula de DNA e liga-se ao polímero, liberando assim a expressão dos genes alvos, incluindo os genes *phaP* que codificam para as fasinas. Sugere-se que PhaR funciona como um dispositivo capaz de reconhecer a formação de cadeias de PHB, e esse reconhecimento faz com que a proteína libere a expressão dos genes *phaP* para que as fasinas sejam codificadas e sejam passíveis de se ligar às cadeias de PHB em formação e moldem a estrutura dos grânulos do polímero (YORK *et al.*, 2001; PÖTTER *et al.*, 2002; MAEHARA *et al.*, 2001; KADOWAKI *et al.*, 2011).

2.5 FATORES SIGMA

Os fatores sigma são subunidades da holoenzima RNA-polimerase capazes de reconhecer determinadas regiões da sequência de DNA, a qual é denominada região promotora. Apenas quando a RNA-polimerase está com todas as suas subunidades é que ela é capaz ligar-se com a molécula de DNA e causar as mudanças conformacionais necessárias para iniciar o processo de transcrição (ISHIHAMA, 1990).

Existem diferentes tipos de fatores sigma, permitindo à célula a responder apropriadamente às mudanças ocorridas no meio no qual essas estão inseridas. Além disso, auxilia a responder à sinais que orquestram o desenvolvimento celular por meio do uso de diferentes conjuntos de genes transcritos (MOONEY, 2005). Cada tipo de fator sigma, reconhece sequências nucleotídicas específicas para sua ligação com a molécula de DNA (BARRIOS *et al.*, 1999). O fator sigma 70 (σ^{70}) está envolvido na expressão constitutiva de genes responsáveis pela manutenção e sobrevivência da célula (MOONEY, 2005). O fator σ^{54} está envolvido com o metabolismo de nitrogênio, permitindo à célula utilizar fontes alternativas, incluindo a fixação de nitrogênio.

3. METODOLOGIA

3.1 ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS

As estirpes de bactérias e plasmídeos que foram utilizados neste trabalho estão relacionados na tabela 1.

TABELA 1 – LISTA COM ESTIRPES E PLASMÍDEOS UTILIZADOS.

<i>E. coli</i>		
TOP10	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-crBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 ara Δ 139 Δ (araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG.	Invitrogen Inc.
S17	Estirpe conjugante/SmR Tra+	SIMON et al., 1983
<i>H. seropedicae</i>		
SmR1	Estirpe parental, SmR, Nif+	SOUZA et al., 1995.
Δ phaP1	Deleção cromossômica do gene <i>phaP1</i>	TIRAPELLE et al., 2014
Δ phaP2	Deleção cromossômica do gene <i>phaP2</i>	TIRAPELLE., 2012 2014
Δ phaC	Deleção cromossômica do gene <i>phaC</i>	TIRAPELLE et al., 2014
Δ phaP1.2	Deleção cromossômica dos genes <i>phaP1</i> e <i>phaP2</i>	TIRAPELLE., 2012 2014
Δ phaR	Deleção cromossômica do gene <i>phbF</i>	Alves, 2014
Δ ntrC	Deleção cromossômica do gene <i>ntrC</i>	Mota, Dados não publicados
Plasmídeos	Características Relevantes	Referência/Fonte
pMP220	Tc ^R , vetor fusão transcricional com gene <i>lacZ</i> , com sítio policlonagem do pPW452 invertido	SPAINK et al., 1987

3.2 CULTIVO DAS CÉLULAS E MEIOS DE CULTURA

As estirpes de *Escherichia coli* S17.1 foram cultivadas a 37°C, sob agitação orbital constante de 170 rpm em meio LB ou em estufa a 37°C quando em meio sólido LA. As células foram estocadas a -20°C em glicerol 50%.

As estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* foram cultivadas a 30°C em agitação orbital de 120 rpm em meio NFbHPN-malato (HP – *high phosphate* – alta concentração de fosfato) (KLASSEN et al., 1999), utilizando malato (37mmol/L) como fonte de carbono, solução de fosfatos 50 mmol/L (K₂HPO₄ (17,8 g/L) e KH₂PO₄ (159,5 g/L)) e NH₄Cl 20 mmol/L. As células de *H. seropedicae* foram estocadas em

meio NFb-malato semi-sólido (meio NFbHPN adicionado com 0,175 g/L de ágar, NH₄Cl 20 mmol/L, solução de fosfatos 50 mmol/L e antibiótico adequado).

Quanto aos antibióticos foram utilizados estreptomicina (80 µg/mL) para as estirpes de *H. seropedicae*, tetraciclina (10 µg/mL) para as estirpes de *E. coli* contendo o plasmídeo pMP220, e ambos para os transconjugantes de *H. seropedicae* contendo os plasmídeo pMP220.

Meio LA é composto por (SAMBROOK *et al.*, 1989):

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO FINAL
Triptona	10g/L
Extrato de levedura	5g/L
NaCl	10g/L
pH	7,0
Ágar	15g/L

O meio Nfb-Malato é composto por (KLASSEN *et al.*, 1997):

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO FINAL
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 x 10 ⁻¹ g/L
NaCl	1 x 10 ⁻¹ g/L
CaCl ₂	2 x 10 ⁻² g/L
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 ⁻² g/L
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2 x 10 ⁻² g/L
Malato de sódio	5 g/L
Biotina	1 x 10 ⁻⁴ g/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2 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 x 10 ⁻⁵ g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,4 x 10 ⁻⁴ g/L
pH	6,8

3.3 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES DE *E. coli*

Previamente, soluções de 100mM de cloreto de cálcio em 15% de glicerol foram esterilizadas e geladas. Foi feito pré-inóculo de células em 5mL de meio LB a partir de estoque de *E.coli* ou de colônias isoladas em placa. Foi cultivado em agitador orbital (*shaker*) 37°C durante a noite. Foram então coletados 500µL de inóculo da suspensão, sendo adicionado em 50mL de LB (1:100) em frascos de cultivo e deixado crescer em *shaker* 30°C até atingir DO₆₀₀ (densidade óptica) em torno de 3 a 4 horas. As células foram recuperadas por centrifugação utilizando equipamento Hitachi, rotor 46, por 10 minutos a 3220xg e 4°C. O sedimento de células foi ressuspenso em solução de cloreto de cálcio (10 mM CaCl₂), levando de 3 a 5 minutos para o procedimento, mantendo sempre no gelo. O volume de

CaCl₂ foi aumentado continuamente até atingir aproximadamente 40mL. A suspensão foi então mantida no gelo por 1 hora e posteriormente novamente centrifugado por 10 minutos a 4°C e 3220xg. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspensionado em 2mL de CaCl₂ (10 mM em glicerol 15%). A suspensão foi dividida em alíquotas de 100µL em tubos tipo eppendorf que foram armazenadas a -80°C (CHAN *et al.*, 2013).

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Estirpe de *Escherichia coli* foi cultivada durante a noite em estufa à temperatura de 37°C sob agitação orbital constante 170 rpm em meio LB contendo 10 µg/mL do antibiótico Tetraciclina (Tc), marca de resistência do plasmídeo. Após cultivo, os plasmídeos foram extraídos pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989) e analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1x (40 mM Tris base, 20 mM Ácido Acético, 1 mM EDTA, segundo procedimento descrito (SAMBROOK *et al.*, 1989). O DNA corado em brometo de etídio (0,5 µg/mL) e então visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador EC3 System - UVP Biolmaging Systems.

3.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Plasmídeos foram transformados utilizando células de *Escherichia coli* quimiocompetentes. Para este processo, foram utilizados tubos plásticos do tipo Eppendorf, onde 5µL da reação de ligação de DNA foram adicionados a 50µL da suspensão das células quimiocompetentes e agitando-se suavemente a suspensão. A mistura foi então incubada por 30 minutos em gelo, seguido de choque térmico de 45 segundos a 42°C em banho-maria e posterior resfriamento por 2 minutos em gelo. Em seguida foram adicionados 900µL de meio LB. A suspensão foi incubada por 60 minutos a 37°C para a recuperação das células. Por fim, 500µL da suspensão foram plaqueados em placas de petri contendo 20mL de meio LA contendo o antibiótico adequado. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por um período de 14 horas a fim de permitir o crescimento das colônias bacterianas.

3.6 CONJUGAÇÃO BACTERIANA

Previamente foram riscadas estirpes selvagem e mutantes de *H. seropedicae* a partir de meio semi-sólido em placas de petri com meio Nfb-Malato sólido

suplementado com 20mM de cloreto de amônio (NH₄Cl) e 50mL/L de solução de fosfatos e estreptomicina 80µg/mL. Foram incubadas em estufa 30°C por 2 a 3 dias. Foram feitos também os inóculos de estirpe S17 de *E. coli* a partir do estoque para realizar a conjugação com *H. seropedicae*.

A partir dos inóculos previamente preparados foram re-inoculados 75µL, da cultura crescida de *H. seropedicae*, em 2,5mL de Nfb-Malato HP (*high phosphates*) sem adição de quaisquer antibióticos. Foram cultivados a 120rpm em estufa 30°C por aproximadamente 3 horas. Foi também preparado o re-inóculo de 25µL de *E. coli* S17 em 2mL de meio LB, sem adição de antibióticos, cultivado por 2 horas aproximadamente, em estufa 37°C sob agitação orbital constante de 170 rpm.

Após o período de incubação as culturas bacterianas foram misturadas para conjugação em duas proporções:

- Tubo 1: 100µL de *H. seropedicae* + 2µL de *E. coli* S17 contendo o plasmídeo;
- Tubo 2: 50µL de *H. seropedicae* + 15µL de *E. coli* S17 contendo o plasmídeo;

As misturas foram plaqueadas em placas de petri contendo meio LA e Nfb-Malato sólido suplementado com 20mM de cloreto de amônio (NH₄Cl) e 50mL/L de solução de fosfatos, sem adição de antibiótico. Foi pingado uma gota de cultura do tubo 1 e uma gota do tubo 2, cada gota em um polo distinto da placa. Após secagem as placas foram incubadas a 30°C por 16 a 20 horas.

As massas de células foram então raspadas e ressuspensas em 1mL de Nfb-Malato até homogeneizar completamente. Foram feitas diluições seriadas até 10⁻² a partir da ressuspensão de células. Foram plaqueados 150µL das diluições (10e⁻⁰, 10e⁻¹, 10e⁻²) contendo os transconjugantes em Nfb-Malato HP (*High Phosphates*) contendo tetraciclina (10µg/mL), estreptomicina (80µg/mL) e ácido nalidíxico (5µg/mL), e incubadas a 30°C por 2 a 3 dias.

As prováveis colônias transconjugantes isoladas foram coletadas a partir de colônias isoladas em placa, foram cultivados os transconjugantes a 30°C, sob agitação de 120rpm em meio Nfb-Malato líquido HPN (KLASSEN *et al.*, 1997) suplementado com: solução de fosfatos (50mL/L) para *H. seropedicae*, NH₄Cl (20mM), e adicionado os antibióticos estreptomicina (80µg/mL), tetraciclina (10µg/mL) e ácido nalidíxico (5µg/mL), para posterior estoque em meio Nfb-malato semi-sólido HPN.

3.7 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA VIA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE

A expressão dos genes *phaP1* e *phaP2* foi analisada através de fusões da região promotora com o gene reporter *lacZ* e determinação de atividade de β -galactosidase (MILLER, 1972). A estipe selvagem SmR1 e os mutantes Δ phaP1, Δ phaP2, duplo mutante Δ phaP1.2, Δ phaC, Δ PhaR e Δ ntrC, contendo o plasmídeo de interesse foram cultivadas em meio Nfb-Malato líquido suplementado com solução de fosfatos (50mL/L) para *H. seropedicae*, NH₄Cl (20mM), e adicionados os antibióticos estreptomicina (80 μ g/mL), tetraciclina (10 μ /mL), durante a noite. No dia seguinte, 50 μ L das culturas cultivadas foram re-inoculadas em 5mL de meio líquido, novamente cultivados durante a noite. No dia do ensaio de atividade de β -galactosidase, foram feitas leituras de absorvâncias no comprimento de onda 620nm, no equipamento TriStar LB941 – DLReady (Berthold Technologies), para determinar a densidade ótica (D.O.) dos inóculos. Os re-inóculos foram feitos de modo que os novos inóculos iniciassem seu crescimento em D.O₆₂₀ 0,005.

Todas as culturas em Nfb-Malato continham tetraciclina (10 μ g/mL), estreptomicina (80 μ g/mL), solução de fosfatos (50mL/L) e 20 mM de NH₄Cl. O cultivo foi feito em estufa 30 °C a 120 rpm.

As culturas foram então cultivadas por 6 horas a 30°C em rotação orbital de 120 rpm. Após esse período foram iniciadas as coletas para determinação da atividade da enzima. Para cada coleta, 200 μ L da cultura foram colocados em placa de Elisa para determinar a D.O₆₂₀, em seguida, 100 μ L da amostra contida na placa foram colocados no sistema de reação. Os 100 μ L restantes foram congelados para posterior dosagem de proteínas. As coletas foram realizadas a cada duas horas.

O sistema de reação era constituído por 900 μ L de tampão Z (tabela abaixo) 30 μ L de clorofórmio e 100 μ L de cultura bacteriana. Esse sistema de reação foi previamente mantido por 5 minutos a 30°C em banho-maria, sendo iniciada com a adição de 200 μ L de 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG [800 mg/mL] - SIGMA) e então interrompida com 500 μ L de solução de parada (Na₂CO₃ [1 mol/L]) para cada tubo de reação. Todos os ensaios foram feitos em duplicatas.

Os tubos contendo o sistema de reação foram centrifugados durante 10 minutos a 10°C e 859xg para retirada das células e debris. Em seguida foram coletados 200 μ L do sobrenadante de cada amostra para leitura de absorvância nos

comprimentos de onda a 405nm no equipamento TriStar LB941 – DLReady (Berthold Technologies).

A atividade específica de β -galactosidase foi obtida após a dosagem de proteínas, expressa em nmol de o-nitrofenol (ONP) formado por mg de proteína por tempo (minutos).

O tampão Z incompleto é composto por:

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO FINAL
Na₂HPO₄	60mM
NaH₂PO₄.2H₂O	40mM
KCl	10mM
MgSO₄.7H₂O	1mM

O tampão Z incompleto foi armazenado em garrafa âmbar na geladeira.

Para obter tampão Z completo foi acrescentado ao tampão Z incompleto SDS e 2-mercaptoetanol.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO FINAL
2-mercaptoetanol	50mM
SDS 10%	0,00027%

3.8 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As dosagens de proteínas foram realizadas conforme método descrito por Bradford (1976). A curva padrão, assim como a quantificação de proteínas a serem avaliadas, foram feitas utilizando o reagente comercial Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent (BIO-RAD).

3.9 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA MUTAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA

Utilizando o programa online BioCyc Data base collection (<https://biocyc.org/>), inserindo as locus tag (Hsero_RS0808150) para *phaP1* e a locus tag (Hsero_RS23810) para *phaP2*, obteve-se as sequências nucleotídicas correspondentes aos genes das fasinas. Essas sequências foram inseridas no programa SnapGen para a análise dos possíveis locais de anelamento para os oligonucleotídeos a serem desenhados. Este programa possibilita visualizar o anelamento dos oligonucleotídeos na sequência nucleotídica do gene em questão.

Após isso, foi utilizado o sitio web OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) para fazer um estudo detalhado de cada um

dos oligonucleotídeos, obtendo informações como: tamanho da sequência, conteúdo GC, temperatura de anelamento, peso molecular, estruturas secundárias, entre outros.

Estas informações foram levadas em conta para desenhar oligonucleotídeos mais adequados para a realização de PCRs. Quanto ao conteúdo GC, os oligonucleotídeos tiveram a menor % possível de nucleotídeos G ou C a fim de não apresentar uma temperatura de anelamento muito elevada. A temperatura de anelamento ficou entre 57°C e 64°C.

3.10 MUTAÇÃO SÍTIO DIRIGIDA (*Overlapping PCR*)

As mutações dos sítios de ligação para o fator σ^{70} (regiões -10 e -35) e o sítio de ligação para a proteína PhaR (PhbF) foram feitas pelo método de mutação sítio dirigida, que consiste em criar mutações direcionadas ao local desejado empregando a técnica de PCR (SAIKI *et al.*, 1985; MULLIS, FALOONA, 1987). Foram utilizados dois oligonucleotídeos iniciadores para amplificar a região 5' da sequência e dois para amplificar a sequência 3'. O programa no termociclador para a amplificação foi o seguinte: 1 ciclo de 1:30 minutos a 95°C para abertura das fitas de DNA; seguido de 25 ciclos de 20 segundos a 95°C, 20 segundos na temperatura escolhida de anelamento para cada par de oligonucleotídeo (de acordo com os resultados obtidos nos gradientes de temperatura) e 1 minuto a 72°C; e finalmente 1 ciclo para extensão por 5 minutos a 72°C.

As reações de amplificação das regiões 5' e 3' foram feitas separadamente. Após isso, os produtos destas PCRs foram colocados em um único tubo, sendo feitos 2 a 5 ciclos de desnaturação, anelamento das fitas e extensão das cadeias. Nesta etapa, foi usada a temperatura de 50°C para anelamento das fitas. Em seguida, foram adicionados os oligonucleotídeos iniciadores referentes à amplificação da região promotora inteira de cada gene (FW_PHAP1_PROM x P1_REV e FWPHAP2_PROM x P2_REV) e a reação de PCR foi repetida. O DNA amplificado foi posteriormente separado por eletroforese. A banda de interesse visualizada no gel foi então cortada do mesmo e purificada pelo método de adsorção em sílica.

3.11 PURIFICAÇÃO DE DNA POR ADSORÇÃO EM SÍLICA

Esse método baseia-se na capacidade de ligação do DNA à sílica quando na presença de altas concentrações de sal. Este procedimento possui alta eficiência de recuperação da amostra, além de ser aplicável para moléculas de DNA de quaisquer tamanhos.

O DNA de interesse foi aplicado em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x (40 mM Tris base, 20 mM Ácido Acético, 1 mM EDTA), segundo procedimento descrito (SAMBROOK *et al.*, 1989). Após a separação eletroforética, o DNA foi visualizado após coloração com brometo de etídio (0,5 µg/mL) sob luz ultravioleta em transiluminador EC3 System - UVP BioImaging Systems. As bandas de interesse foram cortadas do gel e depositadas em tubos de 1,5mL. Foi usado o kit UltraClean® 15 DNA Purification Kit da MO BIO, para purificação dos fragmentos de gel que continham o DNA coletado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AS MUTAÇÕES SÍTIO-DIRIGIDAS

O método de mutação sítio dirigida foi usado para fazer alterações específicas na sequência de DNA dos promotores *phaP*. A estratégia consistiu em desenhar um par de *primers* para cada sítio de ligação de interesse. Sendo que um *primer* anelaria no sentido 5' (*primer* UP) e outro no sentido 3' (*primer* DOWN).

Assim, para a amplificação da porção 5' da região promotora de *phaP*, foi usado o *primer* externo Fw e o *primer* DOWN, enquanto que para a amplificação da porção 3' foi usado o *primer* UP e o *primer* externo Rev. Cada porção amplificada foi chamada de sistema.

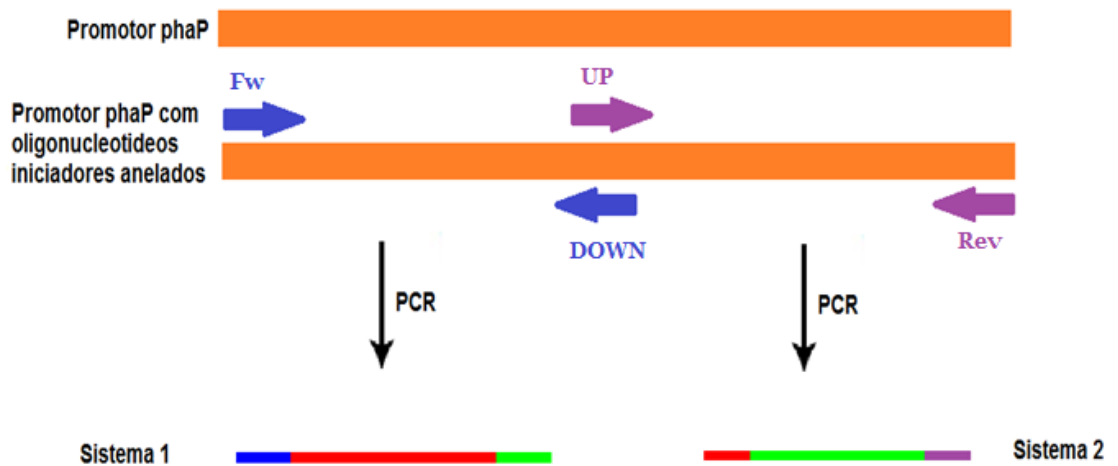


Figura 1- Esquema demonstrando a estratégia para mutação sítio dirigida.

Esses sistemas possuíam uma região de sobreposição, a qual seria a responsável por permitir que as regiões amplificadas separadamente pudessem ser unidas novamente. Após a união, a região promotora apresentaria a sequência de DNA alterada no sítio de interesse, impedindo assim que o ligante daquele sítio se acoplasse à fita de DNA.

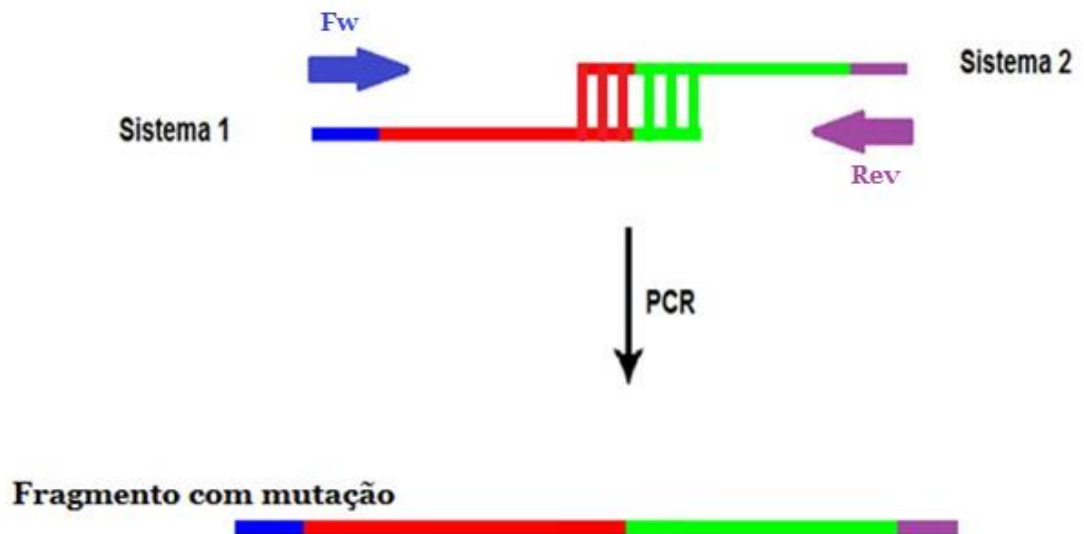


Figura 2- Esquema mostrando a região de sobreposição das porções amplificadas.

Os oligonucleotídeos iniciadores na tabela abaixo foram desenhados a fim de ser possível a realização de mutações sítio dirigidas.

TABELA 2 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA MUTAÇÕES SÍTIO-DIRIGIDAS EM SÍTIOS REGULATÓRIOS DOS PROMOTORES *phaP*.

<i>phaP1</i>	
Primer_PhaR_phaP1_UP	Primer_PhaR_phaP1_DOWN
CGTCGACAATATGTCATATTTCAACAAGAAATGACATCG	GACATATTGTCGACGCGAATTCTAGTTTAATCGTG
Primer_Sigma70_-10_phaP1_UP	Primer_Sigma70_-10_phaP1_DOWN
GTCGACTCGCTTGTGCAATGCATC	CGAGTCGACGTTTAATCGTGCATAAAGTCAAAG
Primer_Sigma70_-35_phaP1_UP	Primer_Sigma70_-35_phaP1_DOWN
GTCGACCTTTATGCACGATTAAGTAACTAGAATTC	AGGTCGACCTTTCATCACATGGGAATGG
<i>phaP2</i>	
Primer_PhaR_phaP2_UP	Primer_PhaR_phaP2_DOWN
TTGGGAGTCGACTCAAATCACTTGCAGGCTG	AGTCGACTCCCAATTCCTATTTTATGCACTTCT
Primer_Sigma70_-10_phaP2_UP	Primer_Sigma70_-10_phaP2_DOWN
GTCGACAGGAATTGTTGCGGC	GTCGACTGCACTTCTTTGGTGAAATCAAG
Primer_Sigma70_-35_phaP2_UP	Primer_Sigma70_-35_phaP2_DOWN
GTCGACCACCAAAGAAGTGCATAAAATAGG	GTCGACAGAGGTATTTTGTGCGC

4.2 GRADIENTE DE TEMPERATURA PARA AMPLIFICAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

A fim de melhorar a eficiência de amplificação dos fragmentos de interesse, foram feitos gradientes de temperatura para os pares de oligonucleotídeos iniciadores que amplificariam cada fragmento.

phaP1 - Sítio *phaR*

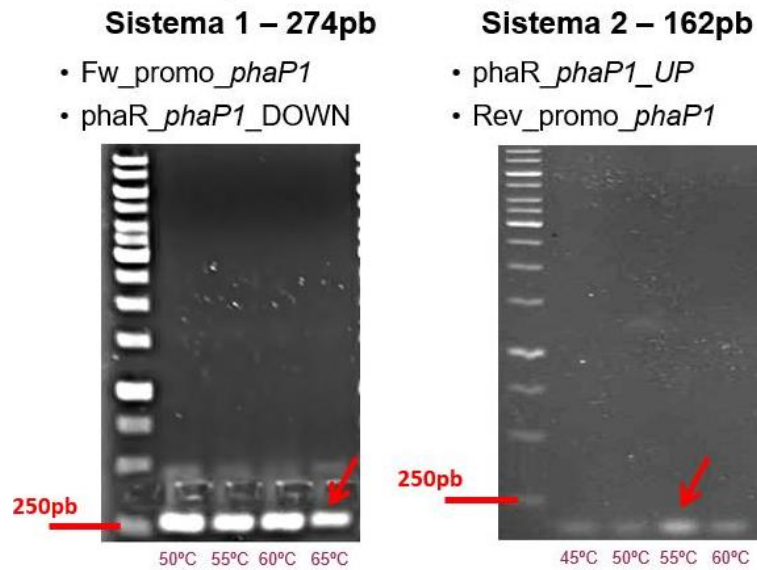


Figura 3- Eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE 1X apresentando a amplificação por PCR dos fragmentos de interesse. O sistema 1 se refere à amplificação da extremidade 5', enquanto o sistema 2 se refere à amplificação da extremidade 3', ambos atribuídos à mutação no sítio de ligação para a proteína regulatória PhaR no promotor *phaP1*. A linha a esquerda de cada gel corresponde aos marcadores de massa molecular (1 kb ladder) e a banda correspondente a 250bp está indicada. As demais linhas correspondem aos produtos de amplificação utilizando as temperaturas de anelamento indicadas. A seta indica a temperatura escolhida para a amplificação, 65°C para o sistema 1 e 55°C para o sistema 2. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e a imagem registrada utilizando sistema de luz ultravioleta em transiluminador (UVP).

phaP1 - Sítio σ^{70} (-10)

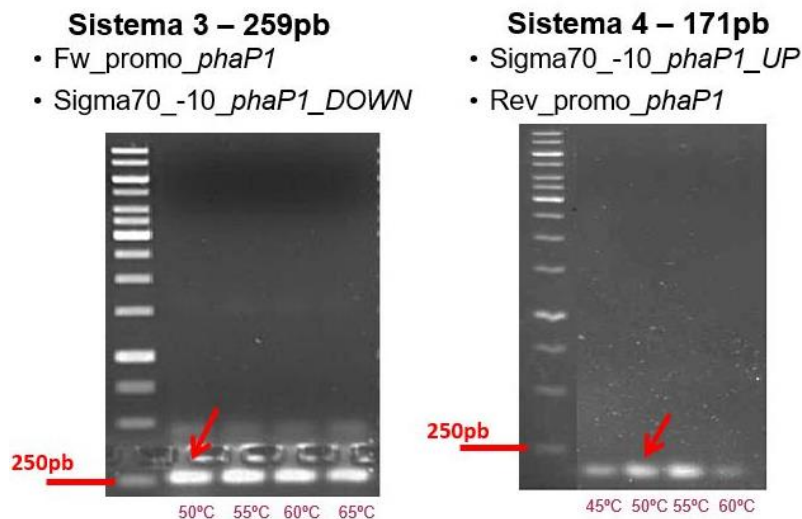


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE 1X apresentando a amplificação por PCR dos fragmentos de interesse. O sistema 3 se refere à amplificação da extremidade 5', enquanto o sistema 4 se refere à amplificação da extremidade 3', ambos atribuídos à mutação no sítio de ligação o fator σ^{70} região -10 no promotor *phaP1*. A linha a esquerda de cada gel corresponde aos marcadores de massa molecular (1 kb ladder) e a banda correspondente a 250bp está indicada. As demais linhas correspondem aos produtos de amplificação utilizando as temperaturas de anelamento indicadas. A seta indica a temperatura escolhida para a amplificação, 50°C para ambos os sistemas deste sítio. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e a imagem registrada utilizando sistema de luz ultravioleta em transiluminador (UVP).

phaP1 - Sítio σ^{70} (-35)

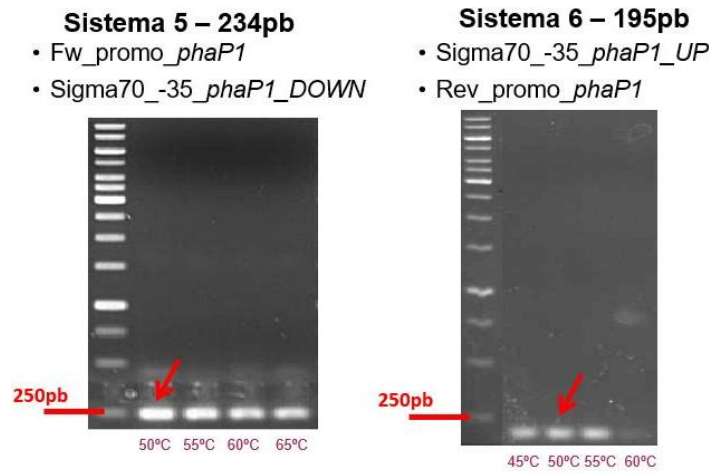


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE 1X apresentando a amplificação por PCR dos fragmentos de interesse. O sistema 5 se refere à amplificação da extremidade 5', enquanto o sistema 6 se refere à amplificação da extremidade 3', ambos atribuídos à mutação no sítio de ligação o fator σ^{70} região -35 no promotor *phaP1*. As demais linhas correspondem aos produtos de amplificação utilizando as temperaturas de anelamento indicadas. A seta indica a temperatura escolhida para a amplificação, 50°C para ambos os sistemas deste sítio. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a imagem registrada utilizando sistema de luz ultravioleta em transiluminador (UVP).

phaP2 - Sítio *phaR*

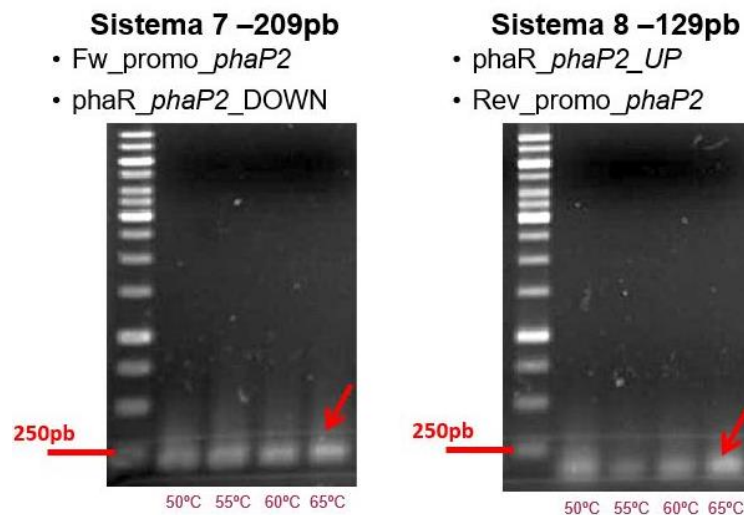


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE 1X apresentando a amplificação por PCR dos fragmentos de interesse. O sistema 7 se refere à amplificação da extremidade 5', enquanto o sistema 8 se refere à amplificação da extremidade 3', ambos atribuídos à mutação no sítio de ligação para a proteína regulatória PhaR no promotor *phaP2*. As demais linhas correspondem aos produtos de amplificação utilizando as temperaturas de anelamento indicadas. A seta indica a temperatura escolhida para a amplificação, 65°C para ambos os sistemas deste sítio. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a imagem registrada utilizando sistema de luz ultravioleta em transiluminador (UVP).

phaP2 - Sítio σ^{70} (-10)

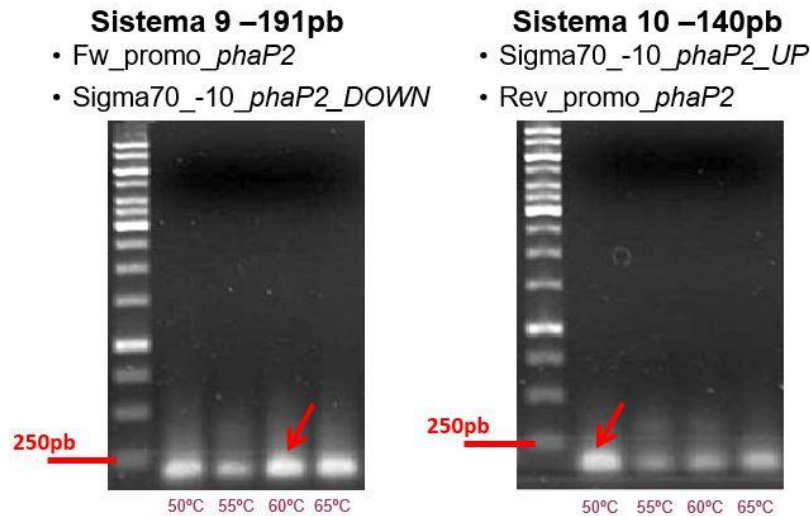


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE 1X apresentando a amplificação por PCR dos fragmentos de interesse. O sistema 9 se refere à amplificação da extremidade 5', enquanto o sistema 10 se refere à amplificação da extremidade 3', ambos atribuídos à mutação no sítio de ligação o fator σ^{70} região -10 no promotor *phaP2*. A linha a esquerda de cada gel corresponde aos marcadores de massa molecular (1 kb ladder) e a banda correspondente a 250bp está indicada. As demais linhas correspondem aos produtos de amplificação utilizando as temperaturas de anelamento indicadas. A seta indica a temperatura escolhida para a amplificação, 60°C para o sistema 9 e 50°C para o sistema 10. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a imagem registrada utilizando sistema de luz ultravioleta em transiluminador (UVP).

phaP2 - Sítio sigma σ^{70} (-35)

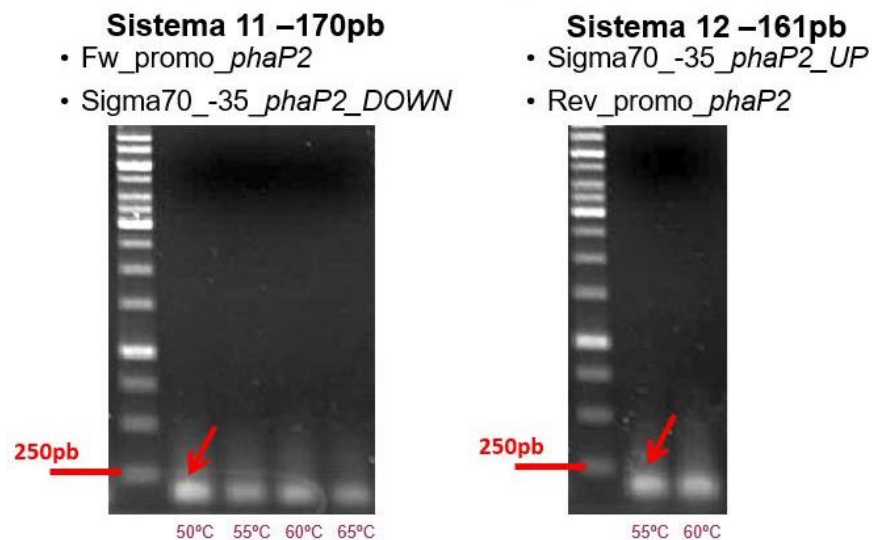


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE 1X apresentando a amplificação por PCR dos fragmentos de interesse. O sistema11 se refere à amplificação da extremidade 5', enquanto o sistema 12 se refere à amplificação da extremidade 3', ambos atribuídos à mutação no sítio de ligação o fator σ^{70} região -35 no promotor *phaP2*. As demais linhas correspondem aos produtos de amplificação utilizando as temperaturas de anelamento indicadas. A seta indica a temperatura escolhida para a amplificação, 50°C para o sistema 11 e 55°C para o sistema 12. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a imagem registrada utilizando sistema de luz ultravioleta em transiluminador (UVP).

Em seguida, os dois produtos amplificados (correspondentes a porção 5' e 3' da região promotora) foram utilizados para a obtenção da região promotora com as mutações conforme descrito em Material e Métodos. Os *primers* externos utilizados foram desenhados por Tirapelle *et al* (2013) e estão apresentados na tabela 3.

TABELA 3 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA INTEIRA DOS GENES *phaP*. OS SUBLINHADOS NAS SEQUÊNCIAS MOSTRAM A LOCALIZAÇÃO PARA OS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO PARA BglII (AGATCT) e para PstI (CTGCAG).

<i>phaP1</i>	
Fw_prom_phaP1	Rev_prom_phaP1
AGATCTC <u>ACACCACACTCTCG</u>	<u>CTGCAGCGGAAAATTGCTC</u>
<i>phaP2</i>	
Fw_prom_phaP2	Rev_prom_phaP2
GTTAGATCTTCGTGGTCCATGACCTGCCC	ATCCTGCAGTCTTGGTACGAGAACATGGTC

Apesar de diferentes condições testadas para a segunda etapa de amplificação, nenhum produto foi obtido.

4.3 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS PROMOTORES *phaP* UTILIZANDO O GENE REPORTE *lacZ*

4.3.1 ESTIRPE PARENTAL E MUTANTES PARA AS FASINAS

Para determinar o nível de expressão dos genes que codificam para as fasinas, foram feitas fusões dos promotores *phaP* contendo gene repórter *lacZ* que foram introduzidas na estirpe parental (SMR1) e mutantes de *Herbaspirillum seropedicae*. O perfil de expressão foi avaliado por meio de ensaios de atividade de beta-galactosidase, medindo a concentração do produto de reação (o-nitrofenol) no comprimento de onda de 405nm.

Análise de proteínas associadas aos grânulos de PHB mostrou que PhaP1 é a principal fasina de revestimento dos grânulos de PHB em *Herbaspirillum seropedicae* (TIRAPELLE *et al.*, 2013). A análise de expressão utilizando as fusões *phaP1::lacZ* e *phaP2::lacZ* (Figura 9) indica que o gene *phaP1* apresenta nível superior de expressão quando comparada a expressão de *phaP2*, confirmando resultados apresentados por Tirapelle *et al* (2013). Os resultados também indicam que a expressão de *phaP2* é maior em culturas cultivadas por maior período.

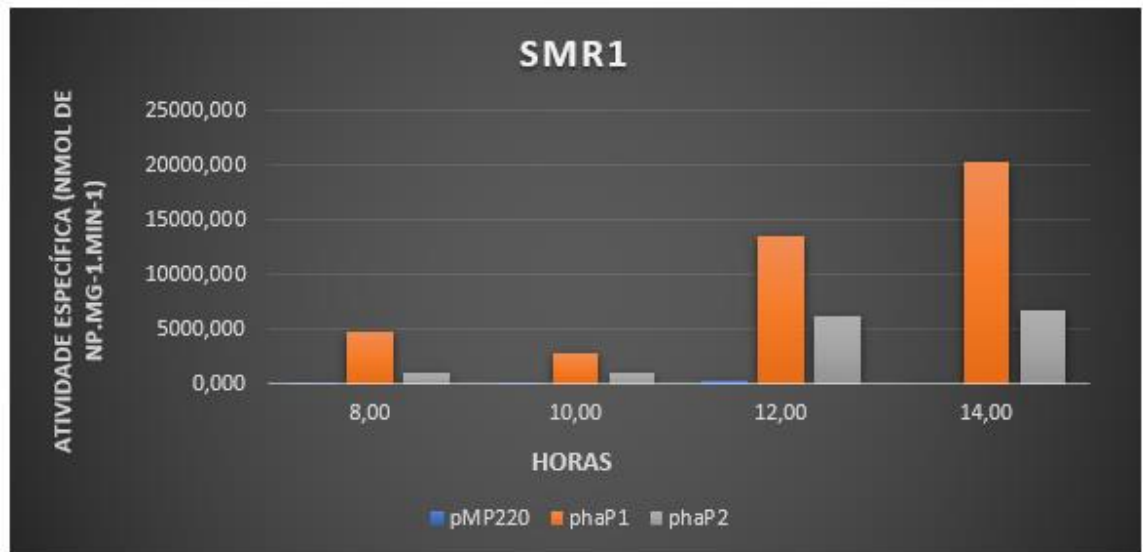


Figura 9 – Atividade específica de beta-galactosidase em ensaios utilizando fusões β *phaP::lacZ* na estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1. A atividade foi determinada em culturas cultivadas pelo período indicado. O plasmídeo sem promotor (pMP220) foi utilizado como controle (em azul). Em laranja, a fusão com o promotor *phaP1* e em cinza, a fusão com o promotor *phaP2*. Os dados correspondem a um ensaio representativo.

As fusões também foram testadas nas estirpes mutantes de *H. seropedicae*. A estirpe Δ *phaP1* apresenta o gene *phaP1* deletado. O mutante Δ *phaP1* continuou produzindo PHB, mas com uma redução de 50% no acúmulo do polímero (ALVES, 2014). Além disso, quando analisado por proteômica de proteínas dos grânulos de PHB foi revelado uma maior abundância de PhaP2 neste mutante, o que indica que, quando PhaP1 está ausente, a segunda fasina é expressa associando-se aos grânulos do polímero (TIRAPELLE *et al.*, 2013). Esse resultado indica que a deleção de *phaP1* não prejudica por completo a produção do polímero. Entretanto, resultados também sugerem que a fasina PhaP1 é importante para controlar a síntese e a estabilidade dos grânulos de PHB (ALVES, 2014).

Na figura 10 pode-se observar que na estirpe mutante Δ *phaP1* o promotor *phaP1* continua ativo, contudo, há aumento da expressão de *phaP2*. Este resultado corrobora a maior quantidade da proteína PhaP2 no mutante Δ *phaP1* (TIRAPELLE *et al.*, 2013)

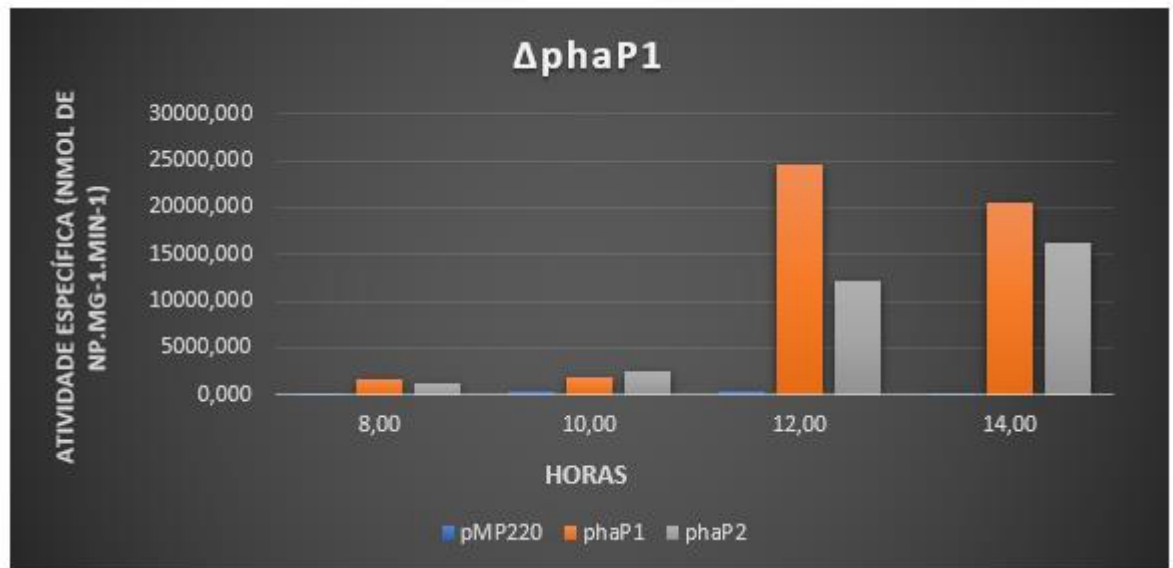


Figura 10 - Atividade específica de beta-galactosidase na estirpe mutante $\Delta phaP1$, com as fusões *phaP1::lacZ* e *phaP2::lacZ*. O plasmídeo sem promotor (pMP220) foi utilizado como controle (em azul). Em laranja, a fusão com o promotor *phaP1* e em cinza, a fusão com o promotor *phaP2*. Os dados correspondem a um ensaio representativo.

Na estirpe mutante $\Delta phaP2$, com o gene *phaP2* deletado, o promotor *phaP2* voltou a apresentar baixos níveis de expressão, se equiparando à estirpe selvagem, reforçando a ideia de que quando há proteína PhaP1 a formação e acúmulo de grânulos de PHB é adequada (ALVES, 2014).

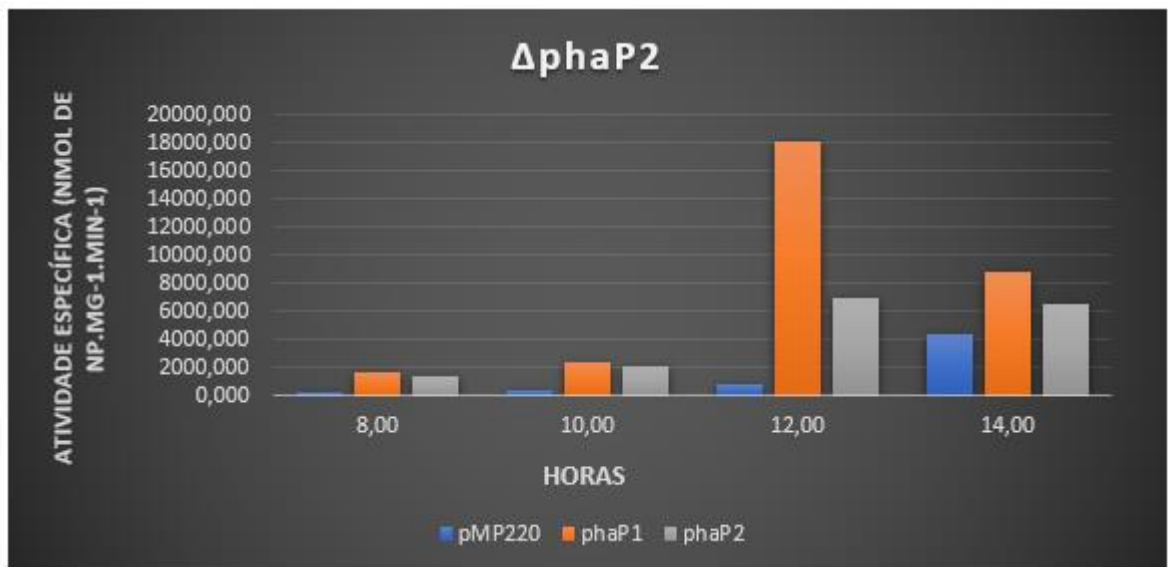


Figura 11 - Atividade específica de beta-galactosidase na estirpe mutante $\Delta phaP2$, com as fusões *phaP1::lacZ* e *phaP2::lacZ*. O plasmídeo sem promotor (pMP220) foi utilizado como controle (em azul). Em laranja, a fusão com o promotor *phaP1* e em cinza, a fusão com o promotor *phaP2*. Os dados correspondem a um ensaio representativo.

No duplo mutante $\Delta phaP1.2$, onde os genes que codificam para ambas fasinas foram deletados, há expressão de ambos promotores. Demonstrando que a ausência de PhaP1 promove a expressão da segunda fasina.

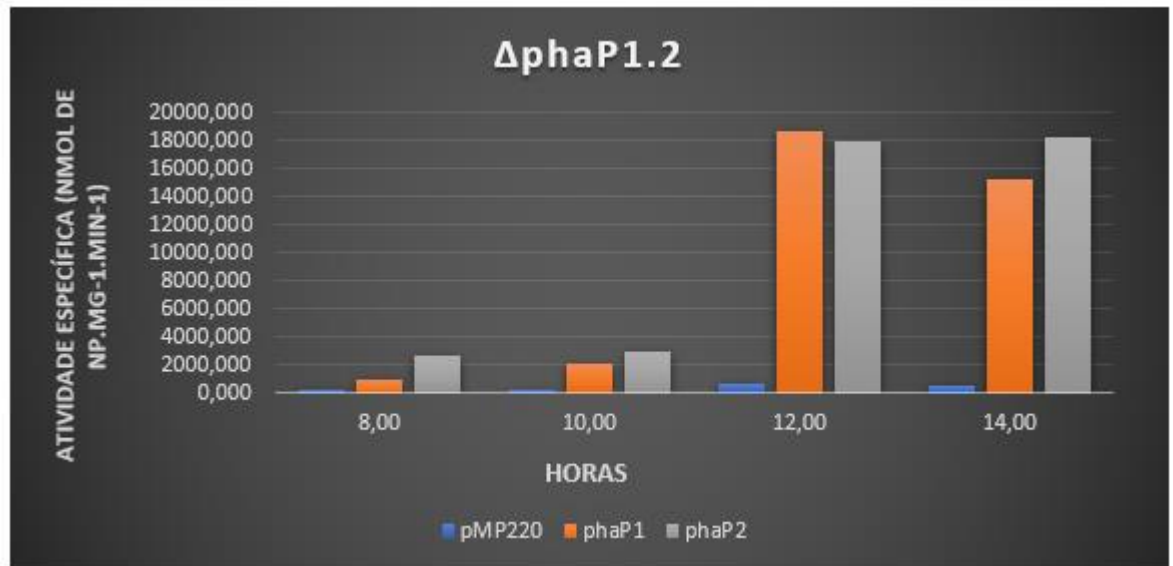


Figura 12 - Atividade específica de beta-galactosidase na estirpe mutante $\Delta phaP1.2$, com as fusões *phaP1::lacZ* e *phaP2::lacZ*. O plasmídeo sem promotor (pMP220) foi utilizado como controle (em azul). Em laranja, a fusão com o promotor *phaP1* e em cinza, a fusão com o promotor *phaP2*. Os dados correspondem a um ensaio representativo.

Segundo dados de Alves (2014), a expressão do gene *phaP1* é capaz de restaurar a acumulação de PHB nos mutantes $\Delta phaP1$, $\Delta phaP2$ e $\Delta phaP1.2$ à níveis nativos. Enquanto a complementação com *phaP2* reduz significativamente o acúmulo de PHB independentemente da estirpe *phaP* mutante testada.

4.3.2 MUTANTE PARA A PROTEÍNA REGULATÓRIA PhaR

Em *Ralstonia eutropha*, e em outras bactérias que produzem PHA (REHM, STEINBUCHER, 1999), há indicação que a proteína regulatória PhaR seja um regulador negativo da expressão tanto das fasinas como de outros genes relacionados ao metabolismo de PHB. Esta proteína é encontrada ligada à região promotora de seus genes alvo, impedindo assim, a expressão destes (MAEHARA *et al.*, 2002; CHOW, YANG, 2010). As fusões *phaP::lacZ* foram ensaiadas na estirpe $\Delta phaR$ (Figura 13) e os resultados sugerem que a expressão dos genes é menor nesta estirpe quando comparada com a estirpe selvagem (Figura 9). Esse resultado não suporta a hipótese de que PhaR atue como um repressor para a expressão de genes envolvidos no metabolismo de PHB e deverá ser confirmado.

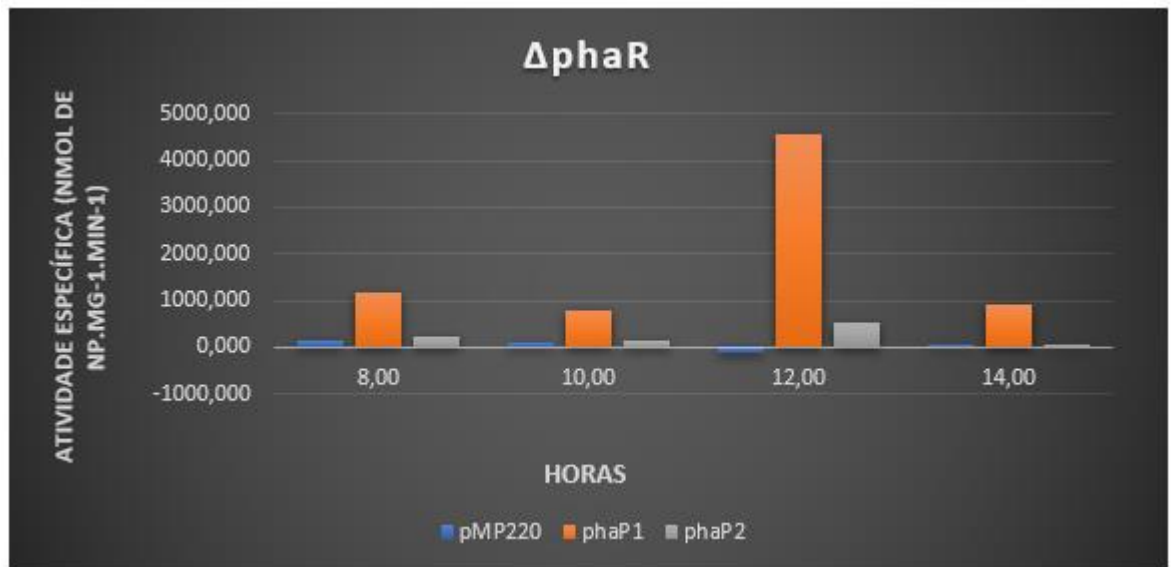


Figura 13 - Atividade específica de beta-galactosidase na estirpe mutante Δ phaR, com as fusões *phaP1::lacZ* e *phaP2::lacZ*. O plasmídeo sem promotor (pMP220) foi utilizado como controle (em azul). Em laranja, a fusão com o promotor *phaP1* e em cinza, a fusão com o promotor *phaP2*. Os dados correspondem a um ensaio representativo.

4.3.3 MUTANTE PARA A SÍNTESE DE PHB (Δ phaC)

A biossíntese de polihidroxi butirato ocorre em três passos, sendo a etapa final a mais relevante por se tratar da etapa de polimerização e formação do PHB. Esta etapa é dependente da presença da enzima PhaC, a qual está encarregada de polimerizar o 3 hidroxibutiril-CoA para formar o PHB (OEDING *et al.*, 1973; HAYWOOD *et al.*, 1988; REHM *et al.*, 2002).

No modelo proposto, quando a produção de PHB é iniciada, a proteína regulatória PhaR se desliga da molécula de DNA e se liga ao polímero de PHB, permitindo a expressão dos genes do metabolismo de PHB, incluindo aqueles que codificam para as fasinas. Assim, o reconhecimento de que há formação de cadeias de PHB no interior celular, libera a expressão de *phaP* para que as fasinas sintetizadas se liguem ao grânulo de PHB em formação (YORK *et al.*, 2001; PÖTTER *et al.*, 2002; MAEHARA *et al.*, 2001; KADOWAKI *et al.*, 2011). Assim, a expressão das fasinas está intimamente ligada à produção de PHB, por isso, como observado na figura 14, o mutante Δ phaC, o qual possui o gene para as fasinas, porém é incapaz de produzir PHB, possui uma expressão baixa de ambos os promotores *phaP*.

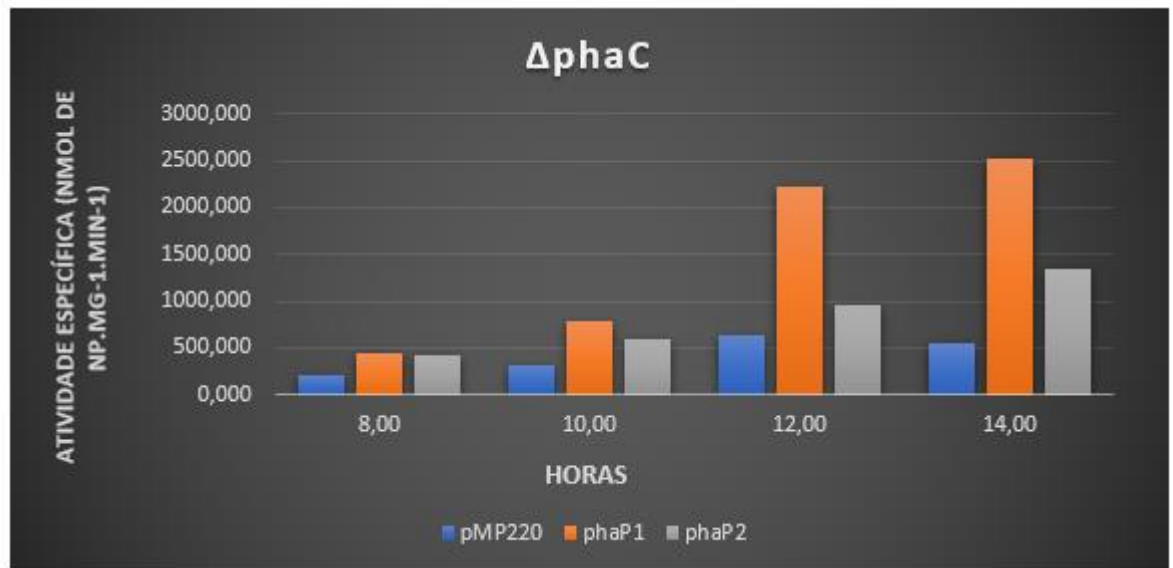


Figura 14 - Atividade específica de beta-galactosidase na estirpe mutante $\Delta phaC$, com as fusões $phaP1::lacZ$ e $phaP2::lacZ$. O plasmídeo sem promotor (pMP220) foi utilizado como controle (em azul). Em laranja, a fusão com o promotor $phaP1$ e em cinza, a fusão com o promotor $phaP2$. Os dados correspondem a um ensaio representativo.

4.3.4 MUTANTE PARA O METABOLISMO DE NITROGÊNIO ($\Delta ntrC$)

Amônio é a fonte de nitrogênio de preferência para bactérias. Entretanto, em situações de ausência de amônio, a bactéria pode utilizar fontes alternativas de nitrogênio. Para isso, tanto a síntese como a atividade de proteínas envolvidas no metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio são fortemente reguladas pelo sistema Ntr, envolvendo a proteína ativadora de transcrição NtrC (MERRICK *et al.*, 1995).

Considerando que a expressão de PHB é aumentada em condições de disponibilidade de carbono e carência de outros nutrientes, como nitrogênio, por exemplo, as fusões $phaP::lacZ$ foram testadas na estirpe mutante $\Delta ntrC$ (figura 15). É possível observar a expressão de $phaP1$, entretanto a expressão de $phaP2$ parece não ocorrer, mesmo após maior período de crescimento onde a expressão de $phaP2$ é observada na estirpe selvagem (Figura 9). Esse resultado parece sugerir que a expressão de $phaP1$ não sofre influência de NtrC. Considerando que esse ensaio foi realizado em condições de alta concentração de amônio, verificamos a expressão da fusão $phaP2::lacZ$ na estirpe selvagem em condições de variação da concentração de amônio. Foram testadas duas concentrações de amônio (20 mM e 2 mM), além de 5 mM de glutamato (condição que indica baixa disponibilidade de amônio) (Figura 16).

A expressão de *phaP2::lacZ* é maior quando as células são cultivadas em condições de baixa concentração de amônio (2 mM ou glutamato) quando comparada com o cultivo em 20 mM de amônio. Em condições de alta concentração de amônio, a expressão de *phaP2* é baixa, como também apresentado na figura 9. Esses resultados sugerem que a expressão de *phaP2* seja regulada pela disponibilidade de amônio e a participação de NtrC no controle da expressão. O papel de NtrC na regulação de *phaP2* deverá ser mais profundamente investigada.

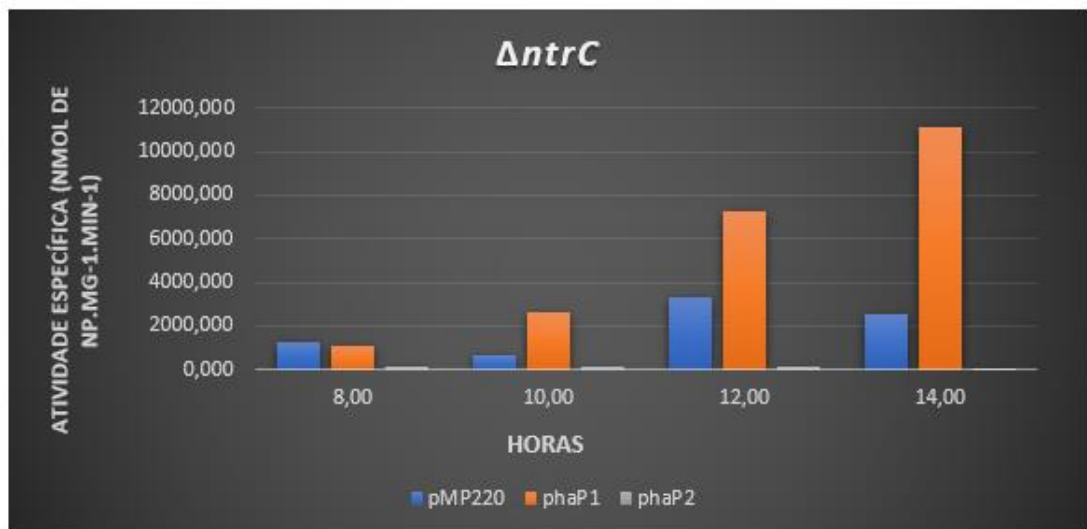


Figura 15 - Atividade específica de beta-galactosidase na estirpe mutante $\Delta ntrC$, com as fusões *phaP1::lacZ* e *phaP2::lacZ*. O plasmídeo sem promotor (pMP220) foi utilizado como controle (em azul). Em laranja, a fusão com o promotor *phaP1* e em cinza, a fusão com o promotor *phaP2*. Os dados correspondem a um ensaio representativo.

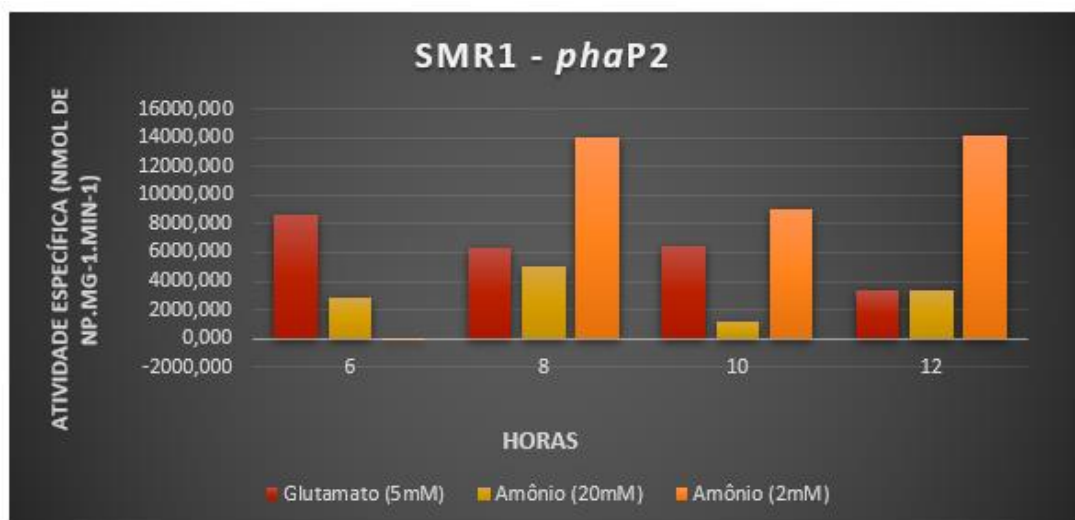


Figura 16 - Atividade específica de beta-galactosidase na estirpe selvagem contendo a fusão *phaP2::lacZ*. As fusões foram cultivadas em meios de cultura contendo glutamato e amônio como fontes de nitrogênio. Em vermelho, meio de cultura contendo 5 mM de glutamato. Em amarelo, 20mM de amônio e em laranja, 2mM de amônio. Os dados correspondem a um ensaio representativo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As fasinas possuem um papel importante recobrando os grânulos de PHB evitando o fenômeno de coalescência destes grânulos em um único. A formação de grânulos menores facilita a mobilização e degradação do polímero quando a bactéria se encontra em situações limitantes de nutrientes.

Em *Herbaspirillum seropedicae*, a fasina *phaP1* parece ser a principal fasina de revestimento dos grânulos, por isso, como observado na estirpe selvagem, quando a primeira fasina é expressa, a segunda fasina se mantém com baixa expressão. No mutante com o gene para *phaP1* deletado, observa-se uma proeminente expressão da segunda fasina (*phaP2*). Nossos resultados também sugerem que a expressão de *phaP2* é regulada pela disponibilidade de amônio e a possível participação de NtrC nesta regulação.

REFERÊNCIAS

AGNELLI, J. A. M.; *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **1996**, 4, 9.

ALVES, L.P.S. *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, p.00-00, 20 maio 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00739>.

ALVES, L.P.S.; TEIXEIRA, C.S.; TIRAPELLE, E.F.; DONATTI, L.; TADRA-SFEIR, M.Z.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S.; MÜLLER-SANTOS, M.; 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.

ALVES, Luis Paulo Silveira. **Influência das fasinas PhaP1 e PhaP2 de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 no acúmulo de grânulos de polihidroxibutirato**. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências (bioquímica), Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic rate, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 450–472, 1990.

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

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DOBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**. v. 56, p.365, 1984.

BARRIOS, H.; VALDERRAMA, B. e MORETT, E. Compilation and analysis of s54-dependent promoter sequences. **Nucleic Acids Res.** v.27, p. 4305-4313, 1999.

BASTIOLI, C. **Handbook of Biodegradable Polymers**. Shawbury: Rapra Technology Limited, 2005.

BELGACEM, M.N.; GANDINI, A.; The State of the Art. In: Belgacem, M. N.; Gandini, A. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. Oxford: Elsevier, 2008.

BORDES, P.; POLLET, E.; AVÉROUS, L.; Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**. V. 34, n. 2, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization: the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, G.F. *et al.* Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande – Pb, v. 62, p.127-139, 31 set. 2001.

BYROM, D.; Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends in Biotechnology** v. 5, p. 246–250, 1987.

CATALAN, A. I., FERREIRA, F., GILL, P. R., BATISTA, S. (2007). Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the *lacZlacY* genes. **Enzyme Microbial Technol.** 40, 1352–1357.

CHAN, W.-T. *et al.* A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. **Bioscience reports**, v. 33, n. 6, p. 931–937, 2013.

CHEN, G.G.Q.; Polyhydroxyalkanoates. In: Smith, R. **Biodegradable Polymers for Industrial Application**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2005.

CHODAK, I.; Polyhydroxyalkanoates: origin, properties and applications. In: Belgacem, M. N.; Gandini, A. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. Oxford: Elsevier, 2008.

CHOU, M.E.; YANG, M.K.; Analyses of binding sequences of the PhaR protein of *Rhodobacter sphaeroides* FJ1. **FEMS Microbiology Letters**. v. 302, p.138-143, 2010.

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

DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**. v. 14, p.135-266, 1973.

DOUDOROFF, M.; STAINER, R.Y. Role of poly- β -hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria. **Nature**. v. 183, p. 1440-1442, 1959.

GRIEBEL, R.; SMITH, Z.; MERRICK, M.; Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. Purification, composition, and properties of native poly-beta-hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. **Biochemistry**, v. 7, p. 3676–3681, 1968.

HAN, M.J.; YOON, S.S.; LEE, S.Y. Proteome analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* producing poly(3-hydroxybutyrate). **Journal of Bacteriology**. v. 183, p. 301–308, 2001

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

HOROWITZ, D. M.; SANDERS, J. K. M.; Biomimetic, amorphous granules of polyhydroxybutyrate: composition, mobility, and stabilization in vitro by proteins. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 41, p. 115–123, 1995.

HUANG, S.J.; EDELMAN, P.G.; **Degradable Polymers: Principles and Applications**, Scott, G.; Gilead, D., eds.; Chapman & Hall: London, 1995.

HUNEAULT, M.A.; Li, H. Morphology and properties of compatibilized polylactide/thermoplastic starch blends. **Polymer**. V. 48, n. 1, 2007.

ISHIHAMA, A.; Molecular Assembly and functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. **Adv. Biophys.** V.26, p. 19-31, 1990.

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

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J.; (1997). *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor*. **L. Moench. J Exp Bot** 48: 785–797.

JENDROSSEK, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). **J Bacteriol** 191:3195-3202.

JENDROSSEK, D.; HANDRICK, R.; Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates*. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 403–432, 2002.

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.

KADOURI, D. *et al.*; **Polyhydroxyalkanoates**. p. 55–67, 2005.

KADOWAKI, M.A.S. *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.

KIRBAS, Z.; *Environ. Contamin. Toxicol.* **1999, 63, 335.**

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; RIGO, L.U. Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *H. seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 181, p. 165-170, 1999.

KLASSEN, G; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. **Can. J. Microbiol.** n. 43, p. 841–846, 1997.

KUCHTA, K.; CHI, L.; FUCHS, H.; PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Studies on the Influence of Phasins on Accumulation and Degradation of PHB and Nanostructure of PHB Granules in *Ralstonia eutropha* H16. **Biomacromolecules**. v. 8, p. 657-662. 2007.

LADHA, J.K.; DE BRUIJN, F.J.; MALIK, K.A.; Assessing opportunities for nitrogen fixation in rice: A frontier project. **Plant Soil** 194:1-10, 1997.

LEÃO, A.I.; TAN, Ing Hwie. Potential of municipal solid waste (MSW) as a source of energy in São Paulo: its impact on CO₂ balance. **Biomass And Bioenergy**, Botucatu, Sp, Brazil, v. 14, n. 1, p.83-89, mar. 1998. Elsevier BV.

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

LEE, Sang Yup; CHOI, Jong-il. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. **Polymer Degradation And Stability**, Kusong-dong, Yusong-gu, Taejon, Korea, v. 59, n. 1-3, p.387-393, jan. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-3910\(97\)00176-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-3910(97)00176-6).

LIEBERGESELL, M.; STEINBÜCHEL, A. Isolation and identification of ranuleassociated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D. **FEMS Microbiological Letters**. v. 99, p. 227–232, 1992.

MAEHARA A.; TAGUCHI, S.; NISHIYAMA, T.; YAMANE, T.; DOI, Y.; (2002). A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA. **J Bacteriol** 184:3992-4002.

MAEHARA, A.; DOI, Y.; NISHIYAMA, T.; TAKAGI, Y.; UEDA, S.; NAKANO, H.; YAMANE, T. PhaR, a protein of unknown function conserved among shortchain-length polyhydroxyalkanoic acids producing bacteria, is a DNA-binding protein and represses *Paracoccus denitrificans phaP* expression in vitro. **FEMS Microbiology Letters**. v. 200, p. 9-15, 2001.

MAEHARA, A.; UEDA, S.; NAKANO, H.; YAMANE, T. Analyses of a Polyhydroxyalkanoic Acid Granule-Associated 16-Kilodalton Protein and Its Putative Regulator in the *pha* Locus of *Paracoccus denitrificans*. **Journal of Bacteriology**. v. 181, p. 2914- 2921, 1999.

Miller, J.H.; (1972). **Experiments in Molecular Genetics**. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T.; SELKE, S. E.; HARTE, B. R.; HINRICHSSEN, G. Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites: An Introduction. In: Mohanty, A. K.; Misra, M.; Drzal, L. T. **Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005.

MONTAGNA, E.; TORRES, B. B. Expanding ecological possibilities: Biological nitrogen fixation updated. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 36, n. 2, p. 99–105, 2008.

MOONEY, R.A; DARST, S.A.; LANDICK R.; Sigma and RNA Polymerase: An On-Again, Off-Again Relationship. **Molec. Cell** v. 20, p. 335-345, 2005.

MOTA, F. J. T. **Análise das proteínas PhaZ1 e PhaZ2 no metabolismo de polihidroxitirato em *Herbaspirillum seropedicae***. In: SIEPE - SEMANA INTEGRADA DE ENSINO PESQUISA E EXTENSÃO - ,8º, 2016, Curitiba.

MULLIS, K.B.; FELOONA, F.A.; Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** 155 (1987) 335-350.

NEUMAN, LIV.; SPINOZZI, F.; SINIBALDI, R.; RUSTICHELLI, F.; PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Binding of the Major Phasin, PhaP1, from *Ralstonia eutropha* H16 to Poly(3-Hydroxybutyrate) Granules. **Journal of Bacteriology.** v. 190, p. 2911-2919, 2008.

OEDING, V.; SCHLEGEL, H. G. 3-Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate metabolism. **Biochemical Journal.** v. 134, p. 239-248, 1973.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J.; (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biol Fertil Soils** 21:197–200.

OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled strip disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytol.**, Cambridge, v. 135, p. 723-737, 1997.

PEDROSA, F. O; MONTEIRO, R. A; WASSEM, R; CRUZ, L; AYUB, R. A; COLAUTO, N. B; FERNANDEZ, M. A; FUNGARO, M. H; GRISARD, E. C; HUNGRIA, M; *et al*: Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics.** v. 7, p. 1-10, 2011.

PEDROSA, F.O.; TEIXEIRA, K.R.S.; MACHADO, I.M.P.; STEFFENS, M.B.R.; KLASSEN, G.; BENELLI, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; ISHIDA, M.L.; YATES, M.G.; SOUZA, E.M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, p. 843-846, 1997.

PIETRO, M. A.; BÜHLER, B.; JUNG, K.; WITHOLT, B.; KESSLER, B. PhaF, a Polyhydroxyalkanoate-Granule-Associated Protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 Involved in the Regulatory Expression System for *pha* Genes. **Journal of Bacteriology.** v. 181, p. 858-868, 1999.

PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J.; Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisulalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 137, p. 61-65, 1991.

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

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

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

RAY, S.S.; BOUSMINA, M.; Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. **Progress in Materials Science**. V. 50, n. 8, 2005.

REDDY, C.s.k *et al.* Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, Mall Road, Delhi, India, v. 87, n. 2, p.137-146, abr. 2003. Elsevier BV.

REHM, B. H.; ANTONIO R. V., P.; SPIEKERMANN, A.; AMARA, A.; STEINBUCHSEL, A., **Biochim. Biophys. Acta.**, 1594, 178, 2002.

REHM, B. H.; STEINBÜCHEL, A.; Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **International Journal Of Biological Macromolecules**, Münster, Germany, v. 25, n. 1-3, p.3-19, jun. 1999. Elsevier BV.

ROSA, D.S *et al.*; 2004. The use of roughness for evaluating the biodegradation of poly- β -(hydroxybutyrate) and poly- β -(hydroxybutyrate-co- β -valerate). **Polymer Testing**, Itatiba, Sp, Brazil, v. 23, n. 1, p.3-8, fev. 2004. Elsevier BV.

SAIKI, R.K., SCHARF, S., FELOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. and ARNHEIM, N.: Enzymatic amplification of β globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 230 (1985) 1X0-1354.

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.

SENIOR, P.J; DAWES, E.A.; Poly-b-hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochemical Journal**. v. 125, p. 55–66, 1971.

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

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Nature 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, p. 1407-1418, 2000.

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

SPAINK, H. P.; OKKER, R. J. H.; WIJFFELMAN, C. A.; PEES, E.; LUGTENBERGER, B. J. J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1Jl. **Plant Molecular Biology**. v. 9, p. 27-39, 1987.

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

STEINBÜCHEL. A; SCHLEGEL, H. G. Excretion of pyruvate by mutants of *Alcaligenes eutrophus*, which are impaired in the accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) (PHB), under conditions permitting synthesis of PHB. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 31, p. 168–175, 1989. Synthases and other proteins required for PHA synthesis.

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

TESSMER, N; KONIG, S; MALKUS, U; REICHELT, R; PÖTTER, M; STEINBÜCHEL, S. Heat-shock protein HspA mimics the function of phasins sensu stricto in recombinant strains of *Escherichia coli* accumulating polythioesters or polyhydroxyalkanoates. **Microbiology**. v. 153, p. 366-374, 2007.

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

TIRAPELLE, E.F.; **Caracterização molecular das fasinas e outras proteínas associadas aos grânulos de Polihidroxibutirato em *Herbaspirillum seropedicae***. (2012). Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências (bioquímica), Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná., Curitiba, 2012

TORIKAI, A.; HASEGAWA, H.; Accelerated photodegradation of poly(vinyl chloride). **Polymer Degradation And Stability**, Chikusa-ku, Nagoya, Japan, v. 63, n. 3, p.441-445, mar. 1999. Elsevier BV.

WIECZOREK, R.; PRIES, A.; STEINBÜCHEL, A.; MAYER, F. Analysis of a 24-Kilodalton Protein Associated with the Polyhydroxyalkanoic Acid Granules in *Alcaligenes eutrophus*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 2425–2435, 1995.

YORK, G. M.; JUNKER, B. H.; STUBBE, J. A.; SINSKEY, A. J. Accumulation of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* is dependent on production of polyhydroxybutyrate in cells. **Journal of Bacteriology**. v. 183, p. 4217-4226, 2001b.

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