

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO AFONSO RAMOS CASSILHA

**CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE *Herbaspirillum*
seropedicae NOS GENES *Hsero_3507* E *Hsero_3508* QUE CODIFICAM
PARA PROTEÍNAS DE SISTEMA DE DOIS-COMPONENTES**

CURITIBA

2018

BRUNO AFONSO RAMOS CASSILHA

**CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE *Herbaspirillum*
seropedicae NOS GENES *Hsero_3507* E *Hsero_3508* QUE CODIFICAM
PARA PROTEÍNAS DE SISTEMA DE DOIS-COMPONENTES**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Bioquímica, no Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof(a). Dr(a). Rose Adele Monteiro
Co-Orientador: Prof. Dr. Emanuel M. de Souza

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Cassilha, Bruno Afonso Ramos

Caracterização das estirpes mutantes de *Herbaspirillum seropedicae* nos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* que codificam para proteínas de sistema de dois-componentes. / Bruno Afonso Ramos Cassilha. – Curitiba, 2018.

91 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Rose Adele Monteiro

Co-orientadora: Emanuel M. de Souza

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Herbaspirillum 2. Nitrogênio - Fixação I. Título II. Monteiro, Rose Adele III. Souza, Emanuel Maltempi de, 1964 IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 589.95



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **BRUNO AFONSO RAMOS CASSILHA**, intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE NOS GENES HSERO_3507 E HSERO_3508 QUE CODIFICAM PARA PROTEÍNAS DE SISTEMA DE DOIS-COMPONENTES**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 20 de Março de 2018.

ROSE ADELE MONTEIRO(UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)

LEDA SATIE CHUBATSU(UFPR)

FABIANE GOMES DE MORAES REGO(UFPR)

AGRADECIMENTOS

À Prof. Rose Adele Monteiro pela orientação ao longo dos anos, ao professor Emanuel Maltempi de Souza pela co-orientação.

Aos demais professores, técnicos e alunos do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio por toda a ajuda, dicas e ensinamento.

À minha família, pelo apoio incondicional e incalculável que contribui imensamente para a finalização deste trabalho.

Aos amigos, por sempre estarem prontos a me ajudar com qualquer coisa, em especial a Mariana cuja presença melhorou em muito a minha vida.

Ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR pela oportunidade de realizar este mestrado e ao CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma betaproteobacteria, endofítica, capaz de fixar nitrogênio atmosférico, comumente encontrada associada a diversas plantas de interesse comercial como: arroz, milho, sorgo, cana-de-açúcar e trigo. Os genes *nif* de *H. seropedicae* são os responsáveis pela maquinaria do complexo da nitrogenase que catalisa a conversão de N_2 em NH_4^+ . Os genes *nif* têm a sua transcrição ativada pela proteína NifA cuja transcrição e ativação está sob controle do sistema Ntr capaz de sensoriar os níveis de íons amônio. Transcriptomas de *H. seropedicae* em várias condições de crescimento mostraram a expressão de diversas proteínas que parecem pertencer a sistemas de dois-componentes. Neste trabalho estudamos dois genes do sistema de dois-componentes, os genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* que codificam, respectivamente, para uma proteína de resposta regulatória do sistema de dois-componentes e para uma histidina quinase do sistema de dois-componentes. As estirpes mutantes nos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* foram obtidas por recombinação homóloga, ocorrendo a inserção dos genes interrompidos por transposon, contendo cassete de resistência a canamicina, dentro do genoma. A estirpe mutante 3508Tn apresentou uma deficiência de crescimento em microaerobiose quando comparada a estirpe selvagem SMR1 e também uma alta motilidade tanto em baixo nitrogênio quanto em alto, sugerindo não sensoriar adequadamente os íons de amônio do meio, podendo ter um maior gasto energético. A estirpe mutante 3507Tn apresentou uma deficiência em motilidade, não formando halo de crescimento e nem película em meio semi sólido, o que sugere que o gene *Hsero_3507* possa estar relacionado com a regulação das proteínas motoras do flagelo da célula. As proteínas codificadas por esses dois genes foram expressas e purificadas por cromatografia de afinidade. As proteínas tiveram a conformação quaternária determinada, porém não foi possível detectar interação *in vitro* entre elas nas condições testadas.

Palavras chave: *Herbaspirillum seropedicae*, sistema dois-componentes, fixação biológica de nitrogênio.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is a nitrogen fixing endophytic betaproteobacteria found associated with many commercially important plants like: rice, corn, sorghum, sugarcane, wheat. Its *nif* genes are responsible for the machinery of the nitrogenase complex that transforms N_2 to NH_4^+ . The *nif* genes have their transcription activated by NifA protein whose transcription and activation is under control of the Ntr system, able to sensor the ammonium ions levels. Transcriptomes of *H. seropedicae* under several growth conditions showed the expression of many proteins that could be associated with the two-component system. In this work, we studied two genes of the two-component system, *Hsero_3507* and *Hsero_3508* that code, respectively, for a two-component response regulator protein and a two-component histidine kinase. The mutant strains for the *Hsero_3507* and *Hsero_3508* genes were obtained by homologous recombination, occurring, in the genome, the insertion of interrupted genes with a transposon containing a cassette for kanamycin resistance. The mutant strain 3508Tn had a deficiency in microaerobic growth when compared with the wild strain SMR1 and also had enhanced motility in both low and high nitrogen condition, suggesting that it is not being able to properly sensor the ammonium ions in the environment, which could contribute to a greater energetic expenditure. The mutant strain 3507Tn showed a motility deficiency, not being able to produce a motility halo, nor forming pellicle in semi-solid media, which suggest regulation of the cellular flagella motor as function for the *Hsero_3507* gene. The proteins coded by these two genes were expressed and purified with affinity chromatography. Both proteins had their quaternary structure determined, but we were not able to detect in vitro interaction between them in the tested conditions.

Keyword: *Herbaspirillum seropedicae*, two-component system, biological nitrogen fixation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - DESENHO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA NifA DE <i>H. seropedicae</i> COM OS DOMÍNIOS MODULARES, N-TERMINAL, CENTRAL E C-TERMINAL ALÉM DAS DUAS REGIÕES INTERDOMÍNIOS. | 14 |
| FIGURA 2 - MODELO DE REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES <i>nif</i> EM <i>H. seropedicae</i> ATRAVÉS DE NifA E O SISTEMA Ntr. | 16 |
| FIGURA 3 - DESENHO DEMONSTRANDO A NATUREZA MODULAR DOS SISTEMAS DE DOIS-COMPONENTES E O NÚCLEO CATALÍTICO DA HISTIDINA QUINASE. | 20 |
| FIGURA 4 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA VIA DE FOSFORETRANSMISSÃO DE <i>Bacillus subtilis</i> | 22 |
| FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS DIVERSOS DOMÍNIOS EFETORES DAS RR ... | 23 |
| FIGURA 6 - ESQUEMA MOSTRANDO A ORGANIZAÇÃO DOS PLASMÍDEOS pGEMT3507 E pGEMT3508. | 46 |
| FIGURA 7 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DOS CLONES DE pGEMT1278, pGEMT1677 E pGEMT1898 GERADOS PELA REAÇÃO DE TRANSPOSON. | 48 |
| FIGURA 8 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE RESTRIÇÃO COM ECORI DOS CLONES DE pGEMT3508 e pGEMT3507 GERADOS PELA REAÇÃO DE TRANSPOSON. | 49 |
| FIGURA 9 - ESQUEMA DA ESTRATÉGIA DE MUTAGÊNESE DOS PLASMÍDEOS pGEMT3507 e pGEMT3508. | 50 |
| FIGURA 10 - ESQUEMA DEMONSTRANDO A ESTRATÉGIA DE TRANSFERÊNCIA DO GENE INTERROMPIDO POR TRANSPOSON PARA O VETOR CONJUGÁVEL pSUP202. | 52 |
| FIGURA 11 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE RESTRIÇÃO COM ECORI DOS SUBCLONES PROVENIENTES DE TRANSFERÊNCIA AO pSUP202 DOS GENES MUTAGENIZADOS DE pGEMT1278Tn, E pGEMT1677Tn. | 53 |
| FIGURA 12 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE RESTRIÇÃO COM ECORI DOS SUBCLONES PROVENIENTES DE TRANSFERÊNCIA AO pSUP202 DOS GENES MUTAGENIZADOS DE pGEMT3508Tn E pGEMT3507Tn. | 53 |
| FIGURA 13 - ESQUEMA ILUSTRANDO OS RESULTADOS QUE PODEM SER OBTIDOS PELA CONJUGAÇÃO. | 54 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO AMPLIFICADO DO GENE <i>Hsero_3508</i> DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> SMR1 E TRANSCONJUGANTES. | 55 |
| FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO GENE <i>Hsero_3507</i> DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> SMR1 E TRANSCONJUGANTES. | 56 |
| FIGURA 16 - ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DOS GENES <i>Hsero_3507</i> , <i>Hsero_3508</i> E VIZINHANÇA. | 58 |
| FIGURA 17 - DOMÍNIOS DA PROTEÍNA <i>Hsero_3508</i> OBTIDOS POR ANÁLISE NO PFAM. | 60 |
| FIGURA 18 - DOMÍNIO DA PROTEÍNA <i>Hsero_3507</i> OBTIDO POR ANÁLISE NO PFAM. | 61 |
| FIGURA 19 - PERFIL DE CRESCIMENTO EM AEROBIOSE DAS ESTIRPES MUTANTES 3507Tn E 3508Tn EM COMPARAÇÃO COM A ESTIRPE SELVAGEM SMR1 VARIANDO A CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO. –N..... | 63 |
| FIGURA 20 - PERFIL DE CRESCIMENTO EM MICROAEROBIOSE DAS ESTIRPES MUTANTES 3507Tn E 3508Tn EM COMPARAÇÃO COM A ESTIRPE SELVAGEM SMR1 VARIANDO A CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO. | 64 |
| FIGURA 21 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO TEMPO DE GERAÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES E SELVAGEM, DETERMINADO DURANTE A FASE DE CRESCIMENTO EXPONENCIAL ENTRE 1 A 12 H..... | 65 |
| FIGURA 22 – MOTILIDADE DAS ESTIRPES SELVAGEM SMR1 E MUTANTE 3507Tn EM FRASCO DE 10mL CONTENDO MEIO NfbHP-MALATO COM 0,25% ÁGAR EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIO. | 67 |
| FIGURA 23 – HALO DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES SELVAGEM SMR1 E MUTANTES 3507Tn E 3508TN EM PLACAS CONTENDO MEIO Nfb-MALATO COM 0,16% DE ÁGAR EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIO..... | 69 |
| FIGURA 24 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO TAMANHO DOS HALOS DE CRESCIMENTO PARA AS ESTIRPES SELVAGEM SMR1 E MUTANTES 3507Tn E 3508Tn APÓS 24 H DE INCUBAÇÃO EM MEIO Nfb MALATO COM 0,16% DE ÁGAR. | 70 |
| FIGURA 25 - ATIVIDADE DE NITROGENASE DA ESTIRPE SELVAGEM SMR1 E DA MUTANTE 3508TN EM 21 E 24H DE INCUBAÇÃO. | 72 |
| FIGURA 26 - ATIVIDADE DE NITROGENASE DA ESTIRPE SELVAGEM SMR1 E DA MUTANTE 3508TN EM ALTO E BAIXO NITROGÊNIO..... | 73 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 27 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE RESTRIÇÃO COM XBAI/HINDIII DOS SUBCLONES PROVENIENTES DE LIGAÇÃO DO INSERTO Hsero_3507 COM O VETOR pET28A..... | 74 |
| FIGURA 28 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE RESTRIÇÃO COM XBAI/HINDIII DOS CLONES PROVENIENTES DE LIGAÇÃO DO AMPLIFICADO Hsero_3508 COM O VETOR pET28A..... | 75 |
| FIGURA 29 - ELETROFORESE DE EXTRATO BRUTO, FRAÇÃO SOLÚVEL E INSOLÚVEL DE <i>E. coli</i> BL21 (λ DE3) EXPRESSANDO PLASMÍDEOS pET28A OU pET3507P OU pET3508P EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 15% DESNATURANTE. | 77 |
| FIGURA 30 - ELETROFORESE DAS AMOSTRAS OBTIDAS DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hsero_3507 EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 15%..... | 78 |
| FIGURA 31 - ELETROFORESE DAS AMOSTRAS OBTIDAS DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hsero_3508 EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 15%..... | 79 |
| FIGURA 32 - ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE LIGAÇÃO CRUZADA ENTRE Hsero_3507 E Hsero_3508 EM GEIS DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 15% E 10%..... | 80 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – ESTIRPES BACTERIANAS | 27 |
| TABELA 2 - PLASMÍDEOS | 27 |
| TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO NFb-MALATO..... | 29 |
| TABELA 4 – ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS | 30 |
| TABELA 5- SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS | 34 |
| TABELA 6 – GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÃO DESNATURANTE – QUANTIDADE PARA DOIS GÉIS | 42 |
| TABELA 7 – GENES SELECIONADOS DE <i>H. seropedicae</i> PARA ESTUDO E AS PROTEÍNAS QUE CODIFICAM..... | 45 |
| TABELA 8 – PARCEIROS FUNCIONAIS PREDITOS PARA A PROTEÍNA Hsero_3508..... | 59 |
| TABELA 9 – PARCEIROS FUNCIONAIS PREDITOS PARA A PROTEÍNA Hsero_3507..... | 59 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ap^R – resistência a ampicilina
- Asp – Aspartato
- ATP – Adenosina trifosfato
- BSA – do inglês “*bovine serum albumin*”, albumina do soro bovino
- Ca – cálcio
- Cm^R – Resistência a cloranfenicol
- D.O – densidade ótica
- dNTPs – 5’ trifosfato de 2’ desoxinucleotídeo
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético
- FBN – Fixação biológica de nitrogênio
- His - Histidina
- HEPES - ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfônico
- HK – histidina quinase
- IPTG - spropiltiogalactopiranosídeo
- Km^R – resistência a canamicina
- MCS – do inglês “*multiple clone sequence*”
- Orf- do inglês “*open reading frame*”
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- Rpm – rotação por minuto
- RR – proteína de resposta regulatória
- SAP – Fosfatase alcalina de camarão
- SDS – Dodecilsulfato de sódio
- Tc^R – resistência a tetraciclina
- TEMED - N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
- Tris - 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
- TSS – do inglês “*transformation and storage solution*”
- X-Gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO | 12 |
| 1.1.1 Regulação da fixação biológica de nitrogênio | 13 |
| 1.2 SISTEMA DE DOIS-COMPONENTES | 16 |
| 1.2.1 Histidina quinase | 18 |
| 1.2.2 Proteína de resposta regulatória | 21 |
| 1.3 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> | 24 |
| 1.4 JUSTIFICATIVA | 24 |
| 2. OBJETIVOS | 26 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 27 |
| 3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS | 27 |
| 3.2 MEIOS DE CULTIVO | 29 |
| 3.3 ANTIBIÓTICOS | 30 |
| 3.4 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E ESTOQUE DOS MICROORGANISMOS | 30 |
| 3.5 MANIPULAÇÃO DE DNA | 31 |
| 3.5.1 Purificação de DNA plasmidial | 31 |
| 3.5.2 Eletroforese de DNA | 31 |
| 3.5.3 Digestão de DNA por enzimas de restrição | 32 |
| 3.5.4 Preparo de vetores para ligação | 32 |
| 3.5.5 Amplificação de fragmentos de DNA por PCR | 32 |
| 3.5.6 Ligação de fragmentos de DNA a vetores | 34 |
| 3.5.7 Sequenciamento de DNA | 35 |
| 3.5.8 Reação de transposição <i>in vitro</i> | 35 |
| 3.6 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA | 35 |
| 3.6.1 Transformação por choque térmico | 35 |
| 3.6.2 Transformação por eletroporação | 36 |
| 3.7 CONJUGAÇÃO BACTERIANA | 37 |
| 3.8 CRESCIMENTO E DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE GERAÇÃO E DA TAXA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> | 37 |
| 3.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE NITROGENASE | 38 |
| 3.10 ENSAIO DE MOTILIDADE EM MEIO SEMI-SÓLIDO | 38 |
| 3.11 ESTUDO <i>in silico</i> DOS GENES SELECIONADOS DE <i>H. seropedicae</i> | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 3.12 ESTRATÉGIA DE MUTAGÊNESE PARA OS GENES ESCOLHIDOS DE <i>H. seropedicae</i> | 40 |
| 3.13 MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS..... | 40 |
| 3.13.1 Superexpressão e purificação de proteínas..... | 40 |
| 3.13.2 Eletroforese de proteína sob condições desnaturantes SDS-PAGE..... | 41 |
| 3.13.3 Dosagem de proteína..... | 42 |
| 3.13.4 Ensaio de ligação cruzada <i>in vitro</i> | 42 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 44 |
| 4.1 OBTENÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i> PARA OS GENES ALVO..... | 44 |
| 4.1.1 Construção dos plasmídeos contendo os genes <i>Hsero_1278</i> , <i>Hsero_1677</i> , <i>Hsero_1898</i> , <i>Hsero_3507</i> e <i>Hsero_3508</i> interrompidos com um transposon que confere resistência a canamicina..... | 45 |
| 4.1.2 Obtenção de estirpes mutantes para os genes <i>Hsero_3507</i> e <i>Hsero_3508</i> | 54 |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO <i>IN SILICO</i> DOS GENES <i>Hsero_3507</i> E <i>Hsero_3508</i> | 57 |
| 4.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESTIRPES MUTANTES 3507Tn E 3508Tn..... | 61 |
| 4.3.1 Perfil crescimento das estirpes mutantes 3507Tn e 3508Tn..... | 61 |
| 4.3.2 Ensaio de motilidade das estirpes mutantes 3507Tn e 3508Tn..... | 66 |
| 4.3.3 Ensaio de nitrogenase da estirpe mutante 3508Tn..... | 71 |
| 4.4 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pET3507P E pET3508P..... | 73 |
| 4.5 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS <i>Hsero_3507</i> e <i>Hsero_3508</i> | 76 |
| 4.5.1 Purificação da <i>Hsero_3507</i> | 77 |
| 4.5.2 Purificação da <i>Hsero_3508</i> | 78 |
| 4.6 DETECÇÃO DE INTERAÇÃO ENTRE <i>Hsero_3507</i> E <i>Hsero_3508</i> ATRAVÉS DE LIGAÇÃO CRUZADA..... | 79 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 82 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 83 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Nitrogênio é essencial para os seres vivos, estando presente nas proteínas, ácidos nucleicos e na maioria das outras biomoléculas, assim, a obtenção de formas de nitrogênio que podem ser utilizadas metabolicamente é essencial para a sobrevivência de todos os organismos. N₂ compõem a maior parte da atmosfera terrestre, porém nessa forma encontra-se inerte, somente alguns procaríotos denominados diazotrofos conseguem transformar o nitrogênio atmosférico em íon amônio (produto de mais fácil assimilação metabólica) (KIM e REESE, 1994). Essa reação é denominada de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase, apresentando a seguinte estequiometria: (BURRIS, 1991)



A FBN é responsável por 60% de todo nitrogênio fixado anualmente, sendo uma importante parte do ciclo de nitrogênio da Terra, por repor o nitrogênio total da biosfera, compensando as perdas por desnitrificação. É também de grande valia para a agricultura, pois a quantidade de nitrogênio fixado disponível é, na maioria dos casos, o fator limitante para a produtividade das safras (KIM e REESE, 1994; DIXON e KAHN, 2004). A capacidade de transformar nitrogênio atmosférico em amônio é uma generalidade entre o domínio Bacteria, estando presente na maioria dos grupos filogenéticos de bactérias, como cianobactérias, firmibacteria, actinomicetes e todas subdivisões de proteobacterias. Em relação aos habitats, os diazotrofos apresentam uma grande variação, sendo encontradas espécies livres no solo ou água e em associações simbióticas com diversos organismos (DIXON e KAHN, 2004).

O complexo enzimático da nitrogenase é composto por duas metaloenzimas: a proteína ferro ou dinitrogenase redutase e a proteína molibdênio-ferro ou dinitrogenase. A proteína ferro é um pequeno homodímero cujas subunidades possuem massa molecular de 57 a 72 kDa, é codificado pelo gene *nifH* e funciona como um doador de elétrons dependente de ATP para a proteína molibdênio-ferro. A proteína MoFe é tetramérica $\alpha_2\beta_2$, apresenta massa molecular em torno de 200 a 250 kDa, a subunidade α é codificada pelo gene *nifD* e a β , pelo gene *nifK*, o sítio

ativo para redução do nitrogênio atmosférico situa-se na subunidade α , é caracterizado por um cluster de metal contendo molibdênio, o cofator denominado FeMoco, muito sensível a oxigênio (ROBERTS *et al.*, 1978; KIM e REES, 1994; DIXON, 2004). O processo de redução do substrato pelo complexo da nitrogenase envolve três etapas: redução da proteína ferro por um doador de elétrons como uma ferredoxina ou uma flavodoxina; transferência de um elétron da proteína ferro para a proteína molibdênio-ferro através de um processo dependente de MgATP; e a transferência do elétron para o substrato no sítio ativo da proteína molibdênio-ferro (SIMPSON e BURRIS, 1984). Em cada etapa é necessário um ciclo de associação e dissociação entre as proteínas, que torna a nitrogenase uma enzima lenta, com um tempo de “*turnover*” cerca de 5 segundos (DIXON e KAHN, 2004). A nitrogenase além de ter o N_2 como substrato, também reduz outros compostos, como o acetileno, ácido cianídrico, óxido nitroso, cianetos e isocianetos (BURRIS, 1991).

Além dos genes responsáveis pela produção da nitrogenase (*nifHDK*), a formação e atividade desse complexo enzimático também depende de outras proteínas, codificadas por outros genes *nif* que podem estar associados ao transporte de elétrons, regulação da transcrição e maturação dos componentes da nitrogenase (MERRICK, 1992). Os genes *nif* de *H.seropedicae* estão em uma única região de aproximadamente 40 kb, que contém 46 orfs, dividido em pelo menos sete operons (PEDROSA *et al.*, 2011; CHUBATSU *et al.*, 2012). Os genes que codificam a estrutura do complexo da nitrogenase se encontram no operon *nifHDKENXHsero_2847Hsero_2846fdxA* (MACHADO *et al.*, 1996; KLASSEN *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2010). Os genes *nif* têm a expressão controlada pelo fator sigma σ^{54} da RNA polimerase e pelo ativador de transcrição NifA, garantindo que a produção da nitrogenase só ocorrerá em condições favoráveis à fixação de nitrogênio (SOUZA *et al.*, 1991; CHUBATSU *et al.*, 2012).

1.1.1 Regulação da fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico é um processo de grande demanda energética, normalmente utiliza-se aproximadamente 16 MgATP para transformar uma molécula de N_2 a duas de NH_4^+ (BURRIS, 1991). Portanto, para conservar energia, a FBN é altamente regulada no nível transcricional, sendo a proteína NifA a principal responsável por esse controle. Também há uma regulação

pós-transcricional que envolve a inibição da atividade da nitrogenase quando aumenta o nível intracelular de amônio (CHUBATSU *et al.*, 2012).

NifA é uma proteína ativadora de transcrição da família das “*enhancer binding protein*” (EBP), que ativa a transcrição dos genes *nif* nas proteobactérias diazotróficas, incluindo *Herbaspirillum seropedicea*, e está relacionada ao fator σ^{54} da RNA polimerase (MERRICK e EDWARDS, 1995; SHINGLER, 1996). NifA ativa a transcrição ao interagir com a holoenzima RNA polimerase- σ^{54} favorecendo a formação do complexo aberto necessário ao processo transcricional (CHUBATSU *et al.*, 2012). Essa proteína apresenta três domínios em sua estrutura (SOUZA *et al.* 1991)(FIGURA 1).

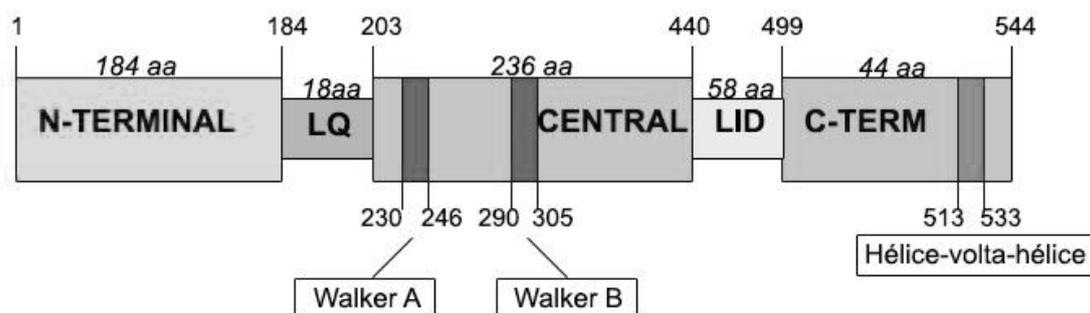


FIGURA 1 - DESENHO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA NifA DE *H. seropedicea* COM OS DOMÍNIOS MODULARES, N-TERMINAL, CENTRAL E C-TERMINAL ALÉM DAS DUAS REGIÕES INTERDOMÍNIOS. Os motivos Walker A, Walker B e hélice-volta-hélice (HTH) estão representados no desenho. Os números indicam a posição dos aminoácidos na sequência da proteína. Os números em itálico indicam o tamanho do domínio ou interdomínio. Adaptado de Monteiro, 2003.

O domínio N-terminal não é essencial para a atividade da proteína NifA, a deleção deste domínio não ocasionou perda da atividade da proteína NifA de *H. seropedicea*, porém ocasionou a perda da inibição da NifA por íons amônio, evidenciando o papel regulatório que esse domínio apresenta na proteína (MONTEIRO *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 1999). O motivo GAF está presente no domínio N-terminal, sua função relaciona-se com transdução de sinal, estando presente em proteínas sensoras e reguladoras tanto de procarionotos quanto de eucariotos (ARAVIND e PONTING, 1997; HO *et al.*, 2000). Entre os domínios N-terminal e central está presente uma região interdomínios chamada de Q-linker que também aparece em outras proteínas regulatórias, como NtrB e NtrC (WOOTON e DRUMMOND, 1989). O domínio central é catalítico, sendo da família AAA+ das

ATPases, e apresenta por volta de 240 aminoácidos (FISCHER *et al.*, 1988). O domínio central da NifA interage com a holoenzima RNA polimerase- σ^{54} para formar o complexo aberto da transcrição ao hidrolisar ATP, sendo os motivos Walker A e Walker B os responsáveis pela ligação e quebra do nucleotídeo trifosfato (FISCHER, 1994; HANSON e WHITEHEART, 2005). O domínio C-terminal possui um motivo hélice-volta-hélice responsável pela ligação da proteína ao DNA (MONTEIRO *et al.*, 2003). Dos três domínios, o central e o C-terminal são bastante conservados entre as espécies, mas o N-terminal apresenta uma grande variação, o que evidencia as diversas formas diferentes de regulação que esta proteína pode apresentar nos organismos (FISCHER, 1994).

NifA está subordinada ao sistema Ntr, que controla o metabolismo global de nitrogênio da bactéria, e é regulada em resposta ao nível de nitrogênio fixado e ao de oxigênio cujo aumento causa inativação da proteína (SOUZA *et al.*, 1999). Existem duas formas de regulação da NifA, nas gammaproteobactérias e *Azoarcus sp.* *nifA* é transcrita em um operon com *nifL*, que codifica para uma proteína anti-ativadora capaz de interagir com a NifA, formando um complexo inibitório, bloqueando a transcrição dos genes *nif* (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004). NifL é capaz de sensoriar os níveis de nitrogênio e oxigênio do ambiente e em condições inadequadas para a fixação de nitrogênio inibe a atividade de ATPase do domínio AAA+ da NifA (BARRET *et al.*, 2001). Em betaproteobactérias, como *H. seropedicae*, e em alfavproteobactérias não há a presença da NifL, com a regulação da NifA ocorrendo diretamente por sinais ambientais.

Em *H. seropedicae* o sistema Ntr é composto por: uridiltransferase (GlnD), proteínas transdutoras de sinal da família PII (GlnB e GlnK), canal de amônio AmtB, glutamina sintetase (GS), adenililtransferase (GlnE) e um sistema regulatório de dois componentes (NtrB-NtrC) (CHUBATSU *et al.*, 2012). Sob condição de excesso de nitrogênio, a GlnB não encontra-se uridilada, permitindo que NtrB desfosforile NtrC mantendo-o inativo, o que reprime a expressão de *nifA*. Sob condição de nitrogênio limitante, NtrB fosforila NtrC, que ativa a transcrição de *nifA* e também promove a síntese de GlnK, que é rapidamente uridilada por GlnD, nessa forma GlnK interage com o domínio N-terminal GAF da NifA, promovendo a ativação dessa proteína e a expressão dos outros genes *nif*, a figura 2 ilustra esse processo (CHUBATSU *et al.*, 2012).

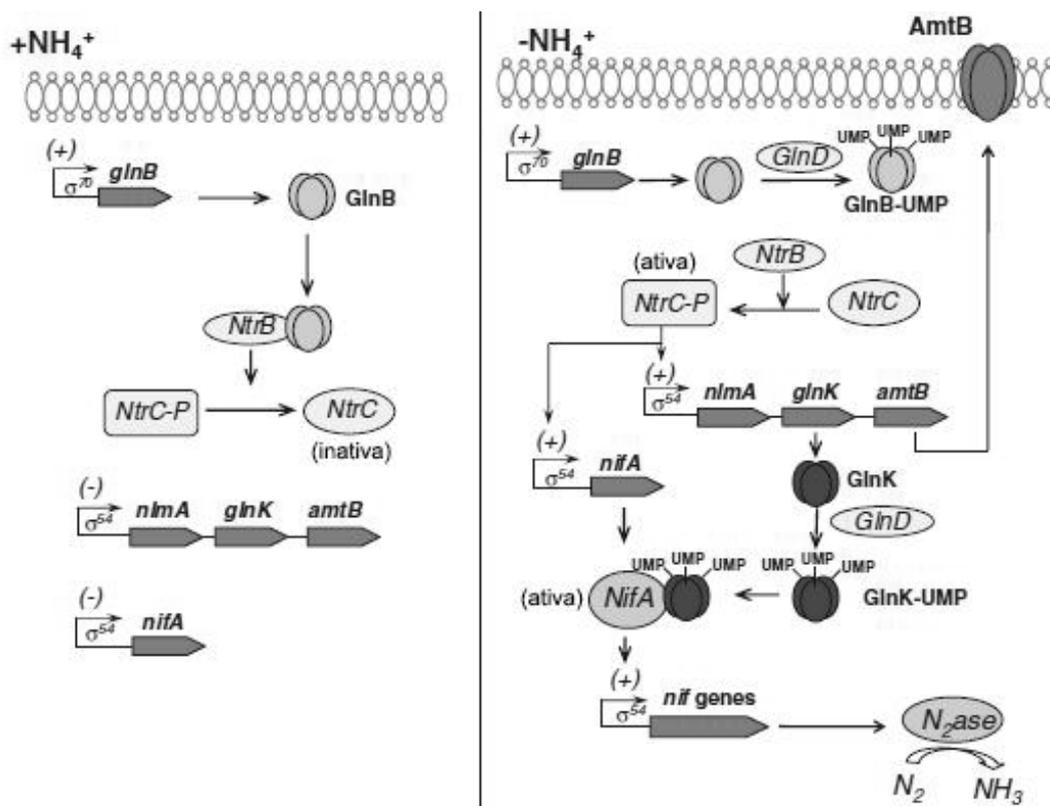


FIGURA 2 - MODELO DE REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES *nif* EM *H. seropedicae* ATRAVÉS DE NifA E O SISTEMA Ntr. Com altos níveis de nitrogênio fixado, GlnB fica desuridilada por GlnD, permitindo que NtrB desfosforile NtrC, inativando-a (desenho da esquerda). Com nitrogênio baixo, favorecendo a fixação de nitrogênio, NtrB fosforila NtrC tornando-a ativa para favorecer as transcrições dos genes alvos como *nifA*. Nessas condições GlnB e GlnK encontram-se uridiladas por GlnD, e ativam a NifA, que então irá ativar a transcrição dos genes *nif* para se obter uma nitrogenase ativa. Fonte: CHUBATSU *et al.*, 2012.

1.2 SISTEMA DE DOIS-COMPONENTES

O sistema de dois-componentes é o principal mecanismo que permite as bactérias sentir e responder a mudanças nas condições do ambiente em que vivem. Consiste em um aprimorado sistema de sinalização caracterizado por uma organização modular que foi adaptada e integrada em uma grande variedade de processos de sinalização celular.

Em bactérias o mecanismo da sinalização celular envolve um sistema no qual ocorre fosforilação de resíduos de histidina e aspartato (ALEX e SIMON, 1994). Esse sistema contém dois componentes: uma proteína histidina quinase (HK) e uma proteína de resposta regulatória (RR). Estímulos externos são captados pela HK e servem para modulá-la, a HK se autofosforila em um resíduo conservado de

histidina utilizando ATP (trifosfato de adenosina) como doador do grupo fosfato, que é então transferido ao resíduo de aspartato do regulador de resposta, em uma reação catalisada pela própria RR. Isso gera uma alteração na atividade do domínio efetor presente na RR e resultará em uma resposta celular adequada. Por fim, o grupo fosforil é hidrolizado, restaurando a proteína RR (STOCK *et al.*, 2000).

O mecanismo dessa via de sinalização de dois-componentes de transdução de sinal envolve três reações de fosfotransferência e duas fosfoproteínas intermediárias (HK-His~P e RR-Asp~P). Todas as reações precisam de íons metálicos divalentes, preferencialmente Mg^{+2} , podendo ser resumidas assim (STOCK *et al.*, 2000):

1. Autofosforilação: $HK-His + ATP \leftrightarrow HK-His\sim P + ADP$
2. Fosfotransferência: $HK-His\sim P + RR-Asp \leftrightarrow HK-His + RR-Asp\sim P$
3. Desfosforilação: $RR-Asp\sim P + H_2O \leftrightarrow RR-Asp + P_i$

O sistema de dois-componentes pode não ser composto somente das duas proteínas, a histina quinase e a reguladora de resposta, podendo estar também aliadas a elas proteínas auxiliares, que regulam a atividade da HK ou influenciam a estabilidade da fosforilação da RR, aumentando e melhorando o sistema (GAO e STOCK, 2009). A via de fosfotransferência pode ser ainda expandida em uma via de fosforetransmissão, que é uma versão mais complexa, envolvendo mais reações e proteínas com domínios contendo histidina e aspartato para fosfotransferência. Essas proteínas podem ser domínios isolados ou quinases híbridas que também apresentam domínios de proteínas de resposta regulatória (APPLEBY *et al.*, 1996; PERRAUD *et al.*, 1999). O controle de esporulação do *Bacillus subtilis* é o exemplo mais bem estudado de uma via de fosforetransmissão (BURBULYS *et al.*, 1991).

Sistemas de dois-componentes não estão presentes somente no domínio Eubacteria, sendo encontrado também em Archae e Eukarya, porém a abundância em cada domínio muda bastante. O sistema de fosfotransferência His→Asp é responsável pela maior parte das vias de sinalização em Eubacteria, com as proteínas desse sistema constituindo 1% das proteínas totais codificadas destes organismos (WEST e STOCK, 2001). *Escherichia coli* apresenta sessenta e duas proteínas que fazem parte de sistemas de dois-componentes, que estão envolvidas na regulação de diversos processos, como quimiotaxia, osmoregulação, transporte e metabolismo (MIZUNO, 1997). Sistemas de dois-componentes também podem

controlar a patogenicidade tanto em bactérias patogênicas Gram positivas como em Gram negativas, ao regular a expressão de toxinas e outras proteínas importantes para este processo (PARKINSON e KOFOID, 1992). Em Eukarya esses sistemas são bem raros, em fungos as vias de dois-componentes modulam a resposta a estresse ambiental, em leveduras patogênicas estão envolvidas no desenvolvimento hifal, no tomate medeiam a maturação do fruto por etileno (HUA *et al.*, 1995; WURGLER-MURPHY e SAITO, 1997; LI *et al.*, 1998; CALERA *et al.*; 2000).

Na regulação da fixação biológica de nitrogênio três sistemas dois-componentes podem estar envolvidos. O NtrB-NtrC cujo mecanismo já foi descrito aqui, que participa no sensoriamento dos níveis de nitrogênio e controla o metabolismo global desse nutriente. O FixJ-FixL controla a expressão dos genes *nif* e *fix* pelos níveis de oxigênio extracelular, a histidina quinase desse sistema, a FixJ, apresenta um domínio extracitoplasmático com um grupo prostético heme capaz de se ligar a oxigênio (GILES-GONZALES *et al.*, 1991). Em um ambiente aeróbico o grupo prostético dessa HK se liga ao oxigênio e a autofosforilação dessa proteína é impedida, em um ambiente anaeróbico o grupo heme não tem oxigênio para se ligar e a HK se autofosforila, passando o sinal à proteína de resposta regulatória, FixL, que irá ativar a transcrição dos genes da FBN (LOIS *et al.*, 1993). O sistema RegB-RegA controla a transcrição de genes *nif* em alguns diazotrofos de alfa-proteobactérias, a histidina quinase RegB contém domínios membranares capazes de sensoriar o potencial redox da célula e a RR RegA é capaz de ativar a transcrição de *nifA2* em bactérias que possuem duas cópias do gene *nif* (*nifA1* e *nifA2*), necessitando também do sistema NtrC-NtrB para fazer essa ativação (ELSEN *et al.*, 2004).

1.2.1 Histidina quinase

Histidina quinases são proteínas homodiméricas e passam por reação de trans-autofosforilação dependente de ATP na qual um monômero da HK catalisa a fosforilação do resíduo de histidina específico no segundo monômero, resultando em um fosfoimidazol quimicamente ideal para doar um grupo fosforil para um aspartato no regulador de resposta (PAN *et al.*; 1993; SURETTE *et al.*, 1996). O controle nessa via de dois-componentes é realizado pela capacidade da histidina quinase de regular a fosforilação do regulador de resposta, e também pela atividade de

fosfatase que algumas HK possuem, o que as deixa desfosforilar suas respectivas RR (LOIS *et al.*, 1993).

Histidinas quinases prototípicas, assim como a maioria das proteínas sinalizadoras, possuem um caráter modular, sendo divididas em um domínio sensor diverso e em um núcleo catalítico conservado, responsável pela ligação ao ATP e direcionamento da fosforilação (STOCK *et al.*, 2000). O núcleo catalítico consiste de mais ou menos 350 aminoácidos e possui dois domínios distintos: um C-terminal, catalítico e ligante de ATP conhecido como HATPase C, e um domínio de dimerização e histina fosfotransferência conhecido como His quinase A (HisKA). O domínio HisKA contém o resíduo conservado de histidina e o HATPase possui a atividade catalítica para transferir o grupo fosforil do ATP pro resíduo His. Além disso, 25% das HK apresentam a incorporação de um domínio receptor (REC) de proteína reguladora de resposta, formando uma quinase híbrida. Acredita-se que essas proteínas funcionam interagindo com domínios individuais de fosfotransferência em histidina (“Histidine phosphotransfer domain”, Hpt) ou ligadas covalentemente a eles no sistema mais sofisticado de fosforetransmissão. (GAO e STOCK, 2009).

O núcleo catalítico das histidina quinases apresenta motivos característicos bastante conservados em todas elas, denominados “boxes” H, N, G1, F e G2. No “H box” encontra-se o resíduo conservado de histidina, o qual será fosforilado, e está presente no domínio de dimerização, os outros blocos adicionais de aminoácidos conservados (N, G1, F e G2) definem o domínio de ligação ao ATP e encontram-se no domínio catalítico da proteína (FIGURA 3a e 3b) (WEST e STOCK, 2001). O corpo principal do domínio catalítico consiste de cinco fitas β antiparalelas e três α hélices (FIGURA 3c), em uma estrutura homóloga ao domínio de ATPase de DNA girase B, MutL e Hsp90 (BILWES *et al.*, 1999). Nas HK já estudadas essa conformação é uma região altamente flexível da proteína, que pode refletir as mudanças de conformações relacionadas com a ligação ao ATP (STOCK, 2000).

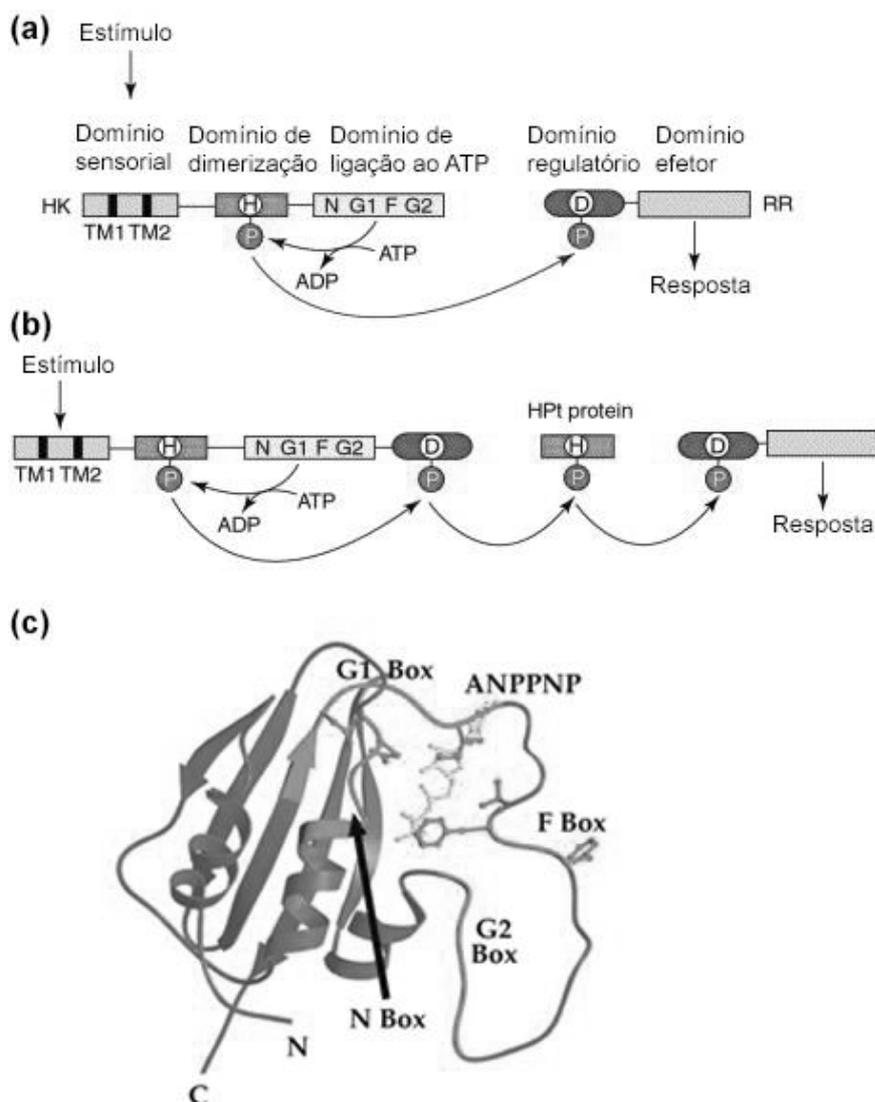


FIGURA 3 - DESENHO DEMONSTRANDO A NATUREZA MODULAR DOS SISTEMAS DE DOIS-COMPONENTES E O NÚCLEO CATALÍTICO DA HISTIDINA QUINASE. (A) o sistema de dois-componentes típico é constituído por uma HK dimérica e uma RR. Na HK estão presentes regiões transmembrânicas (TM1 e TM2) e motivos de ligação de ATP (N, G1, F e G2) além da histina conservada no “box H” do domínio de dimerização. Sinais ambientais são os responsáveis pela modulação das HK. O resíduo de Asp (D) localizado em um domínio conservado da RR recebe o grupo fosfato (P) da HK fosforilada. A fosforilação da RR ativa o domínio efetor desencadeando uma resposta específica na célula. (B) Via de fosforetransmissão de um sistema multi-componente híbrido na qual a HK apresenta um domínio regulatório de RR (em azul) na região C-terminal. A fosfotransferência ocorre em mais de um módulo HK/RR envolvendo também um domínio Hpt. (C) Estrutura por ressonância magnética do núcleo catalítico de uma HK modelo de *E. coli*, a EnvZ, responsável por osmorregulação. Os altamente conservados motivos de ligação ao ATP estão representados em magenta formando um sítio de ligação com um análogo não hidrolizável de ATP em verde. Adaptado de STOCK *et al.*, 2000; WEST e STOCK, 2001.

O domínio sensor das histidinas quinases é incrivelmente diverso, o que as permite sensoriar uma grande variedade de estímulos, incluindo pequenas moléculas, luz, estresse da parede celular, potencial de redox, gradientes eletroquímicos. Este domínio encontra-se geralmente na parte N-terminal da proteína (GAO e STOCK, 2009). O sensoriamento dos estímulos pode ser feito

diretamente ou indiretamente através de proteínas auxiliares de transdução de sinal. Pelo domínio sensor é possível classificar as HK em três grandes grupos (MASCHER *et al.*, 2006). O maior, representado pelas HK clássicas, que apresentam um domínio sensório extracitoplasmático, capaz de perceber o estímulo extracelular e transduzir o sinal para dentro da célula. O segundo grupo apresenta domínio com múltiplas hélices (2 a 20) presentes na membrana celular mas sem parte extracelular, acredita-se que esse grupo esteja relacionado com estímulos de membrana e gradiente de íons. O terceiro grupo é caracterizado por domínios sensores citoplasmáticos, que ficam no interior da célula e são responsáveis por sentir estímulos internos e difundidos. (GAO e STOCK, 2009).

1.2.2 Proteína de resposta regulatória

Proteínas de resposta regulatória (RR) são, na maioria dos sistemas procarióticos, a última peça na via de sinalização de dois-componentes, elas agem como um interruptor ativado por fosforilação, provocando uma resposta adaptativa. As RR catalisam a transferência do grupo fosforil de um resíduo de histidina fosforilado da HK para um resíduo de Asp conservado em seu próprio domínio regulatório. Pequenas moléculas como fosfatos de acetil, carbamoil fosfato, imidazol fosfato e fosforamida podem servir como fosfo-doadores para as RR, demonstrando que essa proteína catalisa a transferência do fosforil sem a ajuda da HK (LUKAT *et al.*, 1992). A maioria das RR também catalisa reações de autodesfosforilação, limitando o tempo de vida do seu estado ativado. Essa autodesfosforilação tem uma grande variação entre reguladoras de resposta, podendo elas ter meia-vida de segundos a horas, correlacionando se com as funções fisiológicas e outras estratégias de regulação do sistema que estão inseridas (WEST e STOCK, 2001).

As RR, assim como as HK, apresentam uma estrutura modular, sendo constituídas, na maioria dos casos, por um domínio regulatório (REC) conservado N-terminal ligado a um domínio efetor bastante variável, entretanto, diferentes estruturas modulares que fogem a regra já foram observadas (GAO e STOCK, 2009). O domínio REC é responsável pela transferência do grupo fosforil da HK para ela mesma e por regular a atividade do domínio efetor em uma maneira dependente de fosforilação. O domínio efetor, por sua vez, é responsável por causar uma resposta de saída, a grande diversidade que esse domínio possui permite a grande

variedade de respostas que são reguladas pelo sistema dois-componentes (SAITO, 2001).

O domínio REC tem aproximadamente 120 aminoácidos, adotando uma conformação α/β duplamente enrolada, com cinco fitas β envoltas por cinco α hélices (VOLZ e MATSUMURA, 1991). Cinco aminoácidos são altamente conservados no sítio ativo do domínio REC, um resíduo de aspartato presente no sítio de fosforilação, adjacente a ele outros dois aspartatos responsáveis pela coordenação com íon Mg^{+2} , e terminando esse grupo um resíduo de treonina e um de lisina relacionados com a mudança conformacional induzida pela fosforilação (LUKAT *et al.*, 1991; NEEDHAM *et al.*, 1993; APPLEBY e BOURRET, 1998).

Por volta de 17% das reguladoras de respostas são apenas domínios REC solitários, a maioria dessas corresponde a proteínas CheY envolvidas na regulação de proteína motoras do flagelo da célula (GAO e STOCK, 2009). Outros domínios REC solitários funcionam como intermediários fosforilados em vias de fosforetransmissão, não regulando diretamente as respostas de saída. Assim é o caso da esporulação de *Bacillus subtilis*, na qual a RR com REC solitário (Spo0F) age como um “trampolim” para o grupo fosfato entre a HK (KinA) e o domínio Hpt (Spo0B), a figura 4 exemplifica esse sistema (VARUGHESE, 2005; HOCH, 2017).

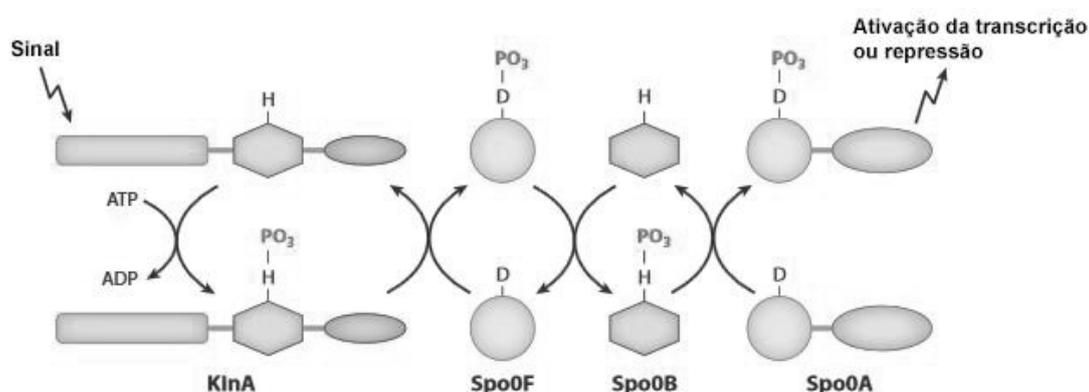


FIGURA 4 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA VIA DE FOSFORETRANSMISSÃO DE *Bacillus subtilis*. A via começa com a captação do sinal e ativação da histidina quinase KinA, ocorrendo transferência de grupo fosforil entre resíduos histina ou aspartato até chegar na RR Spo0A. Spo0F é um domínio REC solitário e Spo0B um domínio Hpt. Domínios estruturais similares apresentam a mesma cor, amarelo para domínio REC e verde para domínio HisKA. Fonte HOCH, 2017.

Domínios efetores das RR são diversos tanto em estrutura quanto em função, tendo sua atividade regulada por diferentes mecanismos. Com já notado, 17% das reguladoras de respostas não apresentam domínio efetor, o resto dessas proteínas podem ser categorizadas em domínios ligante de ácidos nucleicos, enzimáticos e ligante de proteínas e (FIGURA 5)(GAO e STOCK, 2009).

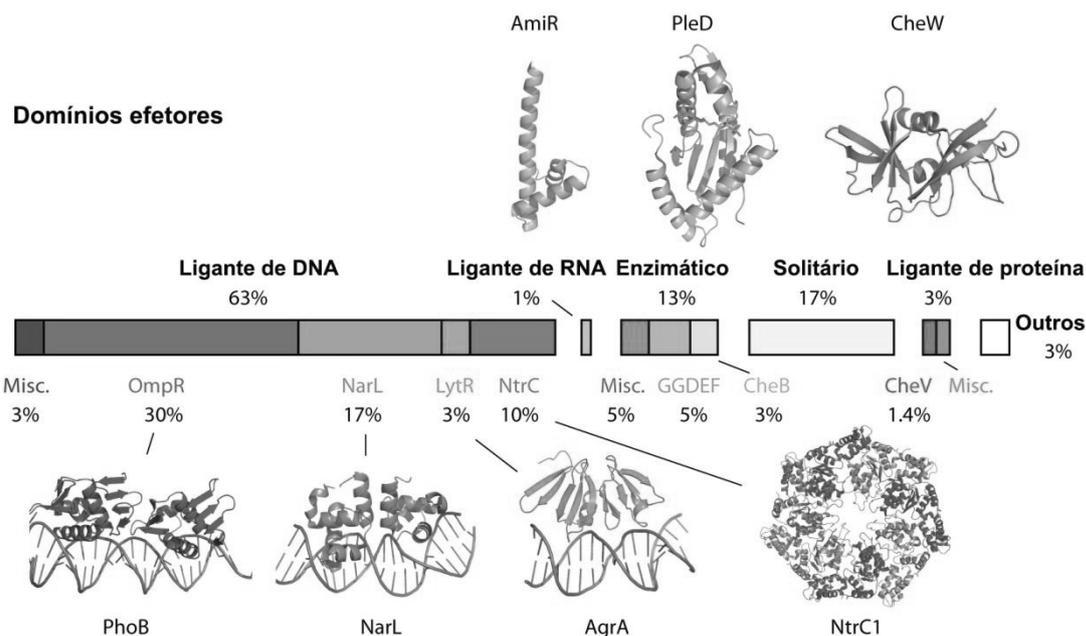


FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS DIVERSOS DOMÍNIOS EFETORES DAS RR. As diferentes famílias estão agrupadas pela sua função (ligante de DNA, de RNA, de proteína, enzimático ou sem domínio efector). A porcentagem de distribuição de cada família está acima das barras coloridas, e a de cada subfamília, embaixo. Um representante de cada subfamília do domínio efector está representado em diagrama de fitas. Fonte GAO e STOCK, 2009.

A maioria das RR, 63%, contém domínios efetores ligantes de DNA, sendo dividida em basicamente quatro subfamílias: OmpR/PhoB de domínios “hélice-alada” (30% das RR), NarL/FixJ com domínios hélice-volta-hélice (17% das RR), NtrC/DctD com domínios AAA+ ATPase fusionados a domínios do tipo Fis hélice-volta-hélice (10%) e LytTR com domínios predominantemente com dobras β (3%) (MARTINEZ-HACKERT e STOCK, 1997; MILANI et al., 2005; BATCHELOR *et al.*, 2008; SIDOTE *et al.*, 2008). Domínios ligantes de RNA são encontrados em apenas 1% das RR, sendo praticamente todas da família ANTAR, fatores de antiterminação (O’HARA *et al.*, 1999). Domínios enzimáticos caracterizam 13% das reguladoras de respostas, estando a maioria (6%) envolvidos na regulação do diguanilato cíclico (c-di-GMP), na subfamília enzimática estão também os domínios de metilesterases de quimiotaxia CheB. Outros domínios enzimáticos também ocorrem nas RR, mas bem raramente. 3% das RR são ligantes de proteína, é um pequeno mas diverso grupo, com metade correspondendo a proteínas parecidas a CheV, de quimiotaxia, outras subfamílias adicionais estão relacionadas com reguladores do fator sigma de stress RpoS (GAO e STOCK, 2009).

1.3 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é uma betaproteobactéria diazotrófica endofítica gram negativa, geralmente vibrióide, podendo ser helicoidal. O diâmetro da célula é de 0,6 a 0,7 μm , com o comprimento variando de 1,5 a 5 μm , apresenta de um a três flagelos em um ou ambos pólos, é uma bactéria capaz de fixar nitrogênio em condições microaeróbicas, em uma ampla faixa de pH (5,3 a 8,0) (BALDANI *et al.*, 1986). Pode ser encontrada nos espaços intercelulares (apoblasto) e nos vasos de xilema dos vegetais, o que por ser um ambiente uniforme e seguro pode explicar sua alta contribuição para a fixação biológica de nitrogênio (OLIVARES *et al.*, 1996; REIS *et al.*, 2000). Já foi encontrada em associação com diversas plantas de interesse comercial como: arroz, milho, sorgo, cana-de-açúcar, trigo, palmeiras, bananeiras e abacaxizeiros (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992; CRUZ *et al.*, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2012).

Herbaspirillum seropedicae possui um grande potencial para aplicação como biofertilizante, pois além de transformar nitrogênio atmosférico em amônio para as plantas, também produz substâncias promotoras do crescimento vegetal, como ácido indolacético, giberilinas e citocininas (REIS *et al.*, 2000). Vários estudos comprovam essa aplicação: arroz inoculados com *H.seropedicae* apresentaram um aumento de peso seco e úmido (BALDANI *et al.*, 1996), um aumento da biomassa radicular foi reportado depois da inoculação e colonização da estirpe LR15 de *H.seropedicae* em arroz (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003), variedades de arroz tolerantes a alumínio apresentaram um aumento significativo no crescimento vegetal e acúmulo de nitrogênio após colonização por *H.seropedicae* (GYANESHWAR *et al.*, 2002). Outros estudos com milho ou trigo também demonstraram aumento da biomassa de culturas inoculadas com *H.seropedicae* (el-KOMY *et al.*, 2003; DOTTO *et al.*, 2010; RIGGS *et al.*, 2001).

1.4 JUSTIFICATIVA

O *H. seropedicae* tem um grande potencial como biofertilizante, pois é capaz de interagir com a planta, fixar nitrogênio e transferi-lo para a planta, e também sintetizar fitormônios que promovem o crescimento vegetal. No controle desses processos devem estar envolvidas proteínas pertencentes a sistemas de dois

componentes, devido a isso, nesse trabalho selecionamos genes que codificam para proteínas que podem pertencer a sistemas de dois componentes e estão expressas em várias condições de crescimento das bactérias. O objetivo deste trabalho é determinar se esses genes influenciam na fixação biológica de nitrogênio e em outros processos desempenhados pela bactéria.

2. OBJETIVOS

Determinar se os genes *Hsero_1278* (locus tag: *HSERO_RS17510*), *Hsero_1677* (*HSERO_RS08340*), *Hsero_1898* (*HSERO_RS09475*), *Hsero_3507* (*HSERO_RS17510*) e *Hsero_3508* (*HSERO_RS17515*) apresentam algum papel na fixação biológica de nitrogênio e em outros processos realizados pela bactéria. Os objetivos específicos encontram-se abaixo:

- Construir estirpes mutantes de *H. seropedicae* para os genes *Hsero_1278*, *Hsero_1677*, *Hsero_1898*, *Hsero_3507* e *Hsero_3508* através de inativação dos genes por inserção de cassete de resistência a canamicina e posterior recombinação homóloga;
- Determinar o fenótipo destes mutantes;
- Purificar as proteínas codificadas pelo *Hsero_3507* e pelo *Hsero_3508*;
- Verificar a interação *in vitro* entre essas proteínas;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho estão listadas na tabela 1.

TABELA 1 – ESTIRPES BACTERIANAS

| Estirpe | Características | Referência |
|---|--|-----------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> TOP10 | hsdR, mcrA, lacZΔM15, recA | INVITROGEN |
| <i>E. coli</i> S17.1 | Sm ^R , Tra ⁺ | SIMON, PRIEFFER E PUHLER, 1983 |
| <i>E. coli</i> BL21 (λDE3) | hsdS _B , gal(λclts 857 ind 1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1) | SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989 |
| <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SMR1 | Estirpe parental, Sm ^R , Nif ⁺ | SOUZA <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>H. seropedicae</i> 3508Tn | SMR1 <i>Hsero_3508</i> , Sm ^R , Km ^R | Este trabalho |
| <i>H. seropedicae</i> 3507Tn | SMR1 contendo a inserção do plasmídeo pSUP3507Tn inteiro na região do genoma ligado ao <i>Hsero_3507</i> , Sm ^R , Km ^R , Tc ^R | Este trabalho |

Os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 2.

TABELA 2 - PLASMÍDEOS

| Plasmídeo | Característica | Referência |
|-------------------------|--|-----------------------------------|
| p-GEM®-T Easy vector | Amp ^R , <i>lacZ</i> , vetor linearizado para clonagem direta de produtos de PCR | PROMEGA |
| pSUP202 | Ap ^R , Tc ^R , Cm ^R , mob site | SIMON, PRIEFFER E PUHLER, 1983 |
| pET28a | Km ^R , vetor de expressão (promoter T7) | NOVAGEN |
| pGEMT1278 | Amp ^R , contém o gene <i>Hsero_1278</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 em pGEM®T Easy vector | Este trabalho |
| pGEMT1677 | Amp ^R , contém o gene <i>Hsero_1677</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 em pGEM®T Easy vector | Este trabalho |
| pGEMT1898 | Amp ^R , contém o gene <i>Hsero_1898</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 em pGEM®T Easy vector | Este trabalho |
| pGEMT3508 | Amp ^R , contém o gene <i>Hsero_3508</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 em pGEM®T Easy vector | Este trabalho |

| | | |
|-----------------|--|---------------|
| pGEMT3507 | Amp ^R , contém o gene <i>Hsero_3507</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 em pGEM®T Easy vector | Este trabalho |
| pGEMT1278Tn | Amp ^R , Km ^R , contém o gene <i>Hsero_1278</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 interrompido pelo transposon EZ-Tn5™ <KAN-2> em pGEM®T Easy vector | Este trabalho |
| pGEMT1677Tn | Amp ^R , Km ^R , contém o gene <i>Hsero_1677</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 interrompido pelo transposon EZ-Tn5™ <KAN-2> em pGEM®T Easy vector | Este trabalho |
| pGEMT1898Tn | Amp ^R , Km ^R , contém o gene <i>Hsero_1898</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 interrompido pelo transposon EZ-Tn5™ <KAN-2> em pGEM®T Easy vector | Este trabalho |
| pGEMT3508Tn | Amp ^R , Km ^R , contém o gene <i>Hsero_3508</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 interrompido pelo transposon EZ-Tn5™ <KAN-2> em pGEM®T Easy vector | Este trabalho |
| pGEMT3507Tn | Amp ^R , Km ^R , contém o gene <i>Hsero_3507</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 interrompido pelo transposon EZ-Tn5™ <KAN-2> em pGEM®T Easy vector | Este trabalho |
| pSUP1278Tn | Amp ^R , Km ^R , Tc ^R , contém o gene <i>Hsero_1278</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 interrompido pelo transposon EZ-Tn5™ <KAN-2> em pSUP202 | Este trabalho |
| pSUP1677Tn | Amp ^R , Km ^R , Tc ^R , contém o gene <i>Hsero_1677</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 interrompido pelo transposon EZ-Tn5™ <KAN-2> em pSUP202 | Este trabalho |
| pSUP3508Tn | Amp ^R , Km ^R , Tc ^R , contém o gene <i>Hsero_3508</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 interrompido pelo transposon EZ-Tn5™ <KAN-2> em pSUP202 | Este trabalho |
| pSUP3507Tn | Amp ^R , Km ^R , Tc ^R , contém o gene <i>Hsero_3507</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 interrompido pelo transposon EZ-Tn5™ <KAN-2> em pSUP202 | Este trabalho |
| pGEMT3507NdeBam | Amp ^R , contém o gene <i>Hsero_3507</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 em pGEM®T Easy vector | |
| pET3508P | Km ^R , contém a sequência codificadora da proteína <i>Hsero_3508</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada em pET28a | Este trabalho |
| pET3507P | Km ^R , contém a sequência codificadora da | Este trabalho |

proteína Hsero_3507 de *H. seropedicae* clonada em pET28a

3.2 MEIOS DE CULTIVO

Os meios de cultivo empregados para o crescimento das estirpes de *E. coli*, estão descritos abaixo. Os meios de cultura foram preparados segundo SAMBROOK *et al.* (1989) e esterilizados por autoclavação.

Meio Luria Bertani (LB): Triptona 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L. Pela adição de 15 g/L de ágar ao meio LB, foi produzido o meio LA.

Meio SOB: Triptona 20 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,584 g/L; KCl 0,186 g/L

Meio SOC: Triptona 20 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,6 g/L; KCl 0,19 g/L; MgCl₂ 0,94 g/L; MgSO₄ 1,2 g/L ; Glucose 3,6 g/L.

NFb-Malato (KLASEEN *et al.*, 1997) foi o meio de cultivo empregado para o crescimento das estirpes de *H. seropedicae*, sua composição está descrita na tabela 3.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO NFb-MALATO

| Elemento | g/L |
|---|------------------------|
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 2 x 10 ⁻¹ |
| NaCl | 1 x 10 ⁻¹ |
| CaCl ₂ | 2 x 10 ⁻² |
| Ácido nitrilo-triacético (NTA) | 5,6 x 10 ⁻² |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 2 x 10 ⁻² |
| Biotina | 1 x 10 ⁻⁴ |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 1 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 1,175 |
| H ₃ BO ₃ | 1,4 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 4 x 10 ⁻² |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 1,2 x 10 ⁻¹ |
| Malato de sódio | 5 |

No momento do inóculo foram adicionados ao meio NFb-Malato 50 mL/L de solução de fosfatos (159,4 g/L de KH₂PO₄ e 17,8 g/L de K₂HPO₄) formando o meio NFbHP-Malato. Para fonte de nitrogênio utilizou-se NH₄Cl 20, 4 ou 1 mmol/L ou glutamato de sódio 0,5 mmol/L. Tanto a solução de fosfato quanto a de cloreto de

amônio foram esterilizadas por autoclavação e adicionadas ao meio somente no momento do inóculo. Para obtenção dos meios sólidos e semi-sólidos foi adicionado ágar nas concentrações de 15 g/L e 1,75 g/L, respectivamente.

3.3 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados estão na tabela 4. Foram pesados e dissolvidos para soluções-estoque no solvente adequado, algumas soluções de antibióticos (ampicilina, ácido nalidíxico, canamicina e estreptomicina) foram filtradas com filtro de 0,22 μm (Millipore) a fim de esterilizá-las. Os antibióticos foram adicionados ao meio de cultivo no momento do uso, nas concentrações especificadas na tabela.

TABELA 4 – ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS

| Antibiótico | Solvente | Concentração final para cultura de <i>E.coli</i> | Concentração final para cultura de <i>H. seropedicae</i> |
|------------------|------------------|--|--|
| Ampicilina | Água | 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | - |
| Ácido nalidíxico | NaOH 0,1 M | - | 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| Canamicina | Água | 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 500 ou 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ |
| Cloranfenicol | Etanol 95% (v/v) | 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | - |
| Estreptomicina | Água | 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| Tetraciclina | Etanol 50% v/v) | 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |

3.4 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E ESTOQUE DOS MICROORGANISMOS

Para culturas de *E. coli* a incubação foi a 37°C em meio LB com os antibióticos de seleção. Meio SOB foi utilizado no cultivo de células quimiocompetentes e eletrocompetentes e o meio SOC para recuperação das células transformadas por esses métodos. Culturas de meio líquido foram incubadas em agitador rotatório a 120 rpm. Culturas de estoque foram preservadas em solução de glicerol 50% e a -20°C.

Para as culturas de *H. seropedicae* a incubação foi a 30°C utilizando meio NFbHP-Malato com diferentes concentrações de cloreto de amônio ou glutamato de sódio 0,5 mmol/L e com os devidos antibióticos. Culturas de meio líquido foram incubadas em agitador rotatório a 120 rpm, em frascos de 25, 40, 60 ou 125 ml, com

uma proporção de volume do meio de cultura – volume total do frasco de 1/3 ou 1/6. Culturas de meio semi-sólido foram incubadas sem agitação, a 30°C, contendo 4 ml de meio de cultura em frasco de 10 ml. As culturas estoque foram feitas nesses semi-sólidos com os antibióticos adequados e mantidas a temperatura ambiente.

3.5 MANIPULAÇÃO DE DNA

3.5.1 Purificação de DNA plasmidial

A extração do DNA foi realizada pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). As células foram coletadas através de centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células ressuspenso em 150 µL de tampão GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tris-HCl pH 8,0 25 mmol/L) e 1 µL de RNAase. A lise das células foi realizada adicionando-se 150 µL de uma solução contendo NaOH 0,2 mol/L e 1% de SDS, essa mistura foi homogeneizada delicadamente por inversão. O DNA cromossomal, proteínas e o SDS foram precipitados por adição de 150 µL de KCAf (acetato de potássio 3mol/L pH 4,8 e ácido fórmico 1,8 mol/L). A mistura obtida foi homogeneizada por inversão e mantida por 5 minutos em banho de gelo. A essa solução adicionou-se 100 µL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), a mistura foi homogenizada e centrifugada por 5 minutos a 13400 rpm em centrífuga Minispin da Eppendorf. A fase aquosa foi coletada e misturada com 3 volumes de etanol absoluto, com a finalidade de precipitar o DNA plasmidial. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 13400 rpm em centrífuga Minispin da Eppendorf e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, seco em estufa 37°C e dissolvido em 30 µL de água ultrapura.

3.5.2 Eletroforese de DNA

A eletroforese de DNA foi feita em um sistema horizontal de gel de agarose 1%, utilizando o tampão TAE 1x (Tris base 40 mmol/L, ácido acético 40 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, pH8,0). As amostras foram diluídas em tampão de amostra Fsduds (azul de bromofenol 0.8%, ficol 10%, xileno cianol 0.4%, SDS 1%, EDTA 1,8mmol/L, pH 8,0) e então aplicadas no gel. A corrida teve voltagem entre 60-80V e o tempo

entre 1 a 2 horas. Após a eletroforese o gel foi tratado com solução de brometo de etídio 0.5 µg/mL por cerca de 20 minutos e a visualização do DNA foi feita sob luz ultravioleta 320 nm em transiluminador EC3 System – UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA-USA).

3.5.3 Digestão de DNA por enzimas de restrição

A digestão de DNA por enzimas de restrição foi feita seguindo recomendações dos fabricantes das enzimas de restrição (FERMENTAS ou INVITROGEN). Nas digestões de DNA para clonagem gênica foram feitos sistemas de 20 µl ou 50 µl, contendo de 5 a 10 unidades de enzima com incubação a 37°C por 4 h ou 24 h. Após a incubação os sistemas foram aquecidos a 70°C por 30 minutos para inativar as enzimas termossensíveis. Para as digestões de DNA feitas somente para analisar os padrões de restrição, os sistemas foram de 10 µL, contendo 1 unidade de cada enzima.

3.5.4 Preparo de vetores para ligação

O vetor pGEM®-T Easy vector utilizado neste trabalho veio do kit comercial “pGEM®-T Easy vector systems” da PROMEGA, já estando pronto para ligação, não precisando de nenhum preparo. Os vetores pET28a e pSUP202 foram preparados digerindo-os com as devidas enzimas de restrição segundo o item 3.5.3 e então desfosfatizados com 1 unidade da enzima alcalina de camarão (SAP – “Shrimp Alkaline Phosphatase”) por 2 horas a 37°C. O vetor linearizado foi então precipitado com etanol absoluto, centrifugado por 30 mins a 13400 rpm, lavado com 1 mL de etanol 70%, seco em estufa a 37°C e ressuspendido em 20 µl de água ultrapura.

3.5.5 Amplificação de fragmentos de DNA por PCR

A amplificação dos fragmentos dos genes estudados neste trabalho (*Hsero_1278*, *Hsero_1677*, *Hsero_1898*, *Hsero_3507* e *Hsero_3508*) foi feita pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR – “Polimerase Chain Reaction”) (MULLIS e FALOONA, 1987). Para a amplificação dos genes de interesse foi utilizado 10 pmol dos respectivos *primers*, aproximadamente 20 ng de DNA molde,

0,2 mM dNTPs, 1 mM MgCl₂, 1 unidade de GoTaq® Flexi DNA polimerase (PROMEGA) e tampão próprio da GoTaq® FLEXI em uma reação de volume final de 20 µL. Os parâmetros da PCR foram os seguintes: 1 ciclo de 95°C por 2 min, 25 ciclos com uma etapa de 95°C por 30 segundos, outra de 43-50°C por 30 segundos e outra de 72°C por 2 minutos e, por fim, um ciclo de extensão de 72°C por 5 minutos.

Para a amplificação do gene *Hsero_3508*, que seria utilizado para a expressão da proteína, foi utilizado 10 pmol dos respectivos *primers*, aproximadamente 20 ng de DNA molde, 0,2 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 1% v/v de Pfu X7 DNA polimerase (NØRHOLM, 2010) e tampão 1x (20 mM Tris/HCl pH 8.8, 10 mM KCl), em uma reação de volume final de 50 µL com os seguintes parâmetros: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos com uma etapa de 94°C por 15 segundos, outra de 43°C por 15 segundos e outra de 72°C por 1 minuto e, por fim, um ciclo de extensão de 72°C por 5 minutos.

O DNA molde para as reações de PCR foi obtido através de culturas de *H. seropedicae* SMR1 fervidas para causar rompimento celular e causar a exposição do DNA genômico. Os *primers* utilizados neste trabalho estão listados na tabela 5.

TABELA 5- SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* UTILIZADOS

| Primer | Sequência | Anelamento (°C) |
|---------------------|---------------------------------|------------------------|
| Y1 | TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC | 50 |
| Y3 | CTGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT | 50 |
| M13 Universal | TGTAACACGACGGCCAGT | 50 |
| M13 Reverso | CAGGAAACAGCTATGACC | 50 |
| T7 Promotor | TAATACGACTCACTATAGGG | 50 |
| T7 Terminador | TAATACGACTCACTA TAGGG | 50 |
| Hsero_1278 Foward | TTTTTCAGGAATTCCATGAGC | 60 |
| Hsero_1278 Reverse | CGAAGGCGAATTCGCGGCGA | 60 |
| Hsero_1677 Foward | CCGCTATGATATCGCGCTGC | 60 |
| Hsero_1677 Reverse | ACGAAATGATATCGCCTCGG | 60 |
| Hsero_1898 Foward | GCCCAGCGATATCGCATTGC | 60 |
| Hsero_1898 Reverse | GGCGCCGGATATCGGTATTG | 60 |
| Hsero_3508 Foward | ACGATTGGTCGACTTCATTC | 50 |
| Hsero_3508 Reverse | GACGGACAAGCTTTGATGCC | 50 |
| Hsero_3507 Foward | CGTACTGGTTGTTGAAGA | 45 |
| Hsero_3507 Reverse | AGCAGCAGATTCAATGGA | 45 |
| Hsero_3508P-NdeI | GAAAAAC CATATG TCTGGAAGA | 43 |
| Hsero_3508P-HindIII | CGAAAG AAGCTT AAAGGGTGG | 43 |
| Hsero_3507P-NdeI | TCG CATATG CATGGAGCGTCC | 43 |
| Hsero_3507P-BamHI | CAGATC GGATCCC CCTGACAT | 43 |

3.5.6 Ligação de fragmentos de DNA a vetores

Para ligação dos produtos de PCR ao vetor pGEM®-T Easy vector a reação foi realizada no mesmo dia do ensaio de PCR, em um sistema de 10 µL, utilizando 50 ng de vetor, aproximadamente 300 ng de produto de PCR, tampão 1x T4 DNA ligase (PROMEGA) e 3 U de T4 DNA Ligase (PROMEGA). O período de incubação foi de 20h a aproximadamente 18°C.

Para ligação utilizando outros vetores que não o pGEM®-T Easy vector, o inserto e o vetor foram preparados conforme o item 3.5.3 e 3.5.4, respectivamente, e ligados em uma razão molar de aproximadamente 3:1 (inserto:vetor). O volume do sistema de ligação foi de 10 µL, com 0,5 U da enzima T4 DNA ligase (FERMENTAS ou BIOLABS), o período de incubação foi de 20h a aproximadamente 18°C.

3.5.7 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia (SANGER *et al.*, 1977), em sequenciador automático ABI3500 (sequenciamento em tubo de amostra individual). Foram utilizados tubos individuais de 200 μ L contendo aproximadamente 500 ng de DNA fita dupla, 3,25 pmol do *primer* apropriado, 4 μ L de reativo DYEnamic™ ET Terminator mix (GE Health Care) e água ultrapura suficiente para 10 μ L. A reação de sequenciamento foi feita em termociclador Eppendorf Master Cycler Gradient com as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 1 minuto seguidos de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 43-50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos. O produto das reações foi purificado adicionando-se a cada reação 10 μ L de água ultrapura, 2 μ L de acetato de amônio 7,5 mol/L e 3 volumes de etanol absoluto. O DNA foi coletado por centrifugação a 13.400 rpm por 15 minutos, lavado com 0,5 mL de etanol 70% e seco durante a noite. O DNA seco e purificado foi dissolvido em tampão de corrida e aplicado no sequenciador automático. Para o processo de mutagênese, as sequências obtidas no formato FASTA foram submetidas a análise no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para o processo de purificação de proteína as sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com o gene íntegro de interesse através do programa MEGA7 (KUMAR *et al.*, 2016) para confirmar a ausência de mutações na sequência obtida.

3.5.8 Reação de transposição *in vitro*

A mutagênese por inserção aleatória do transposon EZ-Tn5™ <KAN-2>, que confere resistência a canamicina, foi feita seguindo o protocolo do fabricante do kit “EZ-Tn5™ <KAN-2> Insertion Kit” (EPICENTER).

3.6 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

3.6.1 Transformação por choque térmico

Para fazer a transformação bacteriana por choque térmico, na conjugação, primeiro foi feito um pré-inóculo de 5 mL da estirpe S17.1 de *E.coli* sob agitação por

aproximadamente 24 h em meio líquido LB, com o antibiótico adequado. O inóculo foi, então, feito na proporção 1:100 em 5 mL de LB e crescido até uma $D.O_{600nm}$ entre 0,2 e 0,5. A cultura foi mantida no gelo por 10 minutos, dividindo-a subsequentemente em alíquotas de 1 mL, que foram centrifugadas a 13400 rpm durante 60 segundos. As células foram ressuspensas em 100 μ L de solução TSS (CHUNG *et al.*, 1989). Para transformar, 1 μ L de DNA (de ligação, ou controle; aproximadamente 30 ng) foram adicionados a 100 μ L de células termocompetentes e incubadas em gelo por 30 minutos. As células foram submetidas a choque térmico de 30 segundos a 42°C, seguido de incubação em gelo por 2 minutos. As células foram recuperadas em meio SOC a 37°C, durante 1 hora. Em seguida, estas células foram plaqueadas em LA contendo os devidos antibióticos.

3.6.2 Transformação por eletroporação

Para a eletrotransformação, usada em todas as transformações exceto das da conjugação, a estirpe TOP10 ou BL21 (λ D3) de *E. coli* foi cultivada em 200 ml de meio SOB até atingir uma $D.O_{600nm}$ entre 0,6 e 0,8. Em seguida, a suspensão de células foi incubada em banho de gelo por 30 minutos. As células foram coletadas por centrifugação em tubos tipo Falcon de fundo redondo de 50 ml a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C em centrífuga Hitachi Himac CR21 empregando o rotor nº 46. O precipitado de células foi lavado 3 vezes com glicerol 10% gelado e então ressuspensado em 1 mL da mesma solução.

A eletrotransformação foi realizada com alíquotas de 100 μ L de células eletrocompetentes utilizando-se 1 μ L de DNA, de reação de ligação ou do plasmídeo controle. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm (BioRad) já resfriada e colocada na câmara de eletroporação. As células sofreram um choque elétrico de 1,8 ou 2,5 kV utilizando o eletroporador GenePulser II (BioRad). Às células transformadas de *E. coli* foram adicionados 900 μ L de meio SOC. A solução foi transferida para um frasco de 10 mL estéril e incubou-se por 40 minutos em agitação a 120 rpm a 37°C. Após o tempo de recuperação, as amostras foram plaqueadas em meio sólido LA contendo os antibióticos adequados. Para transformação utilizando o vetor pGEM®-T Easy vector também foi adicionado às placas 30 μ g/ml de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo) como

substrato para a enzima β -galactosidase e possibilitando se diferenciar clones com inserto e sem no vetor. As placas foram incubadas na estufa à 37°C.

3.7 CONJUGAÇÃO BACTERIANA

Os plasmídeos recombinantes de interesse foram antes transformados em *E. coli* S17.1 conforme item 3.6.1. Foi feito um pré-inóculo com as estirpes receptora (*H. seropedicae*) e doadora (*E. coli*) no dia anterior à conjugação, com os meios próprios. No dia da conjugação, as culturas saturadas dos pré-inóculos foram utilizadas para fazer o inóculo das estirpes de interesse nos meios próprios, sem a adição de antibióticos. 75 μ L de *H. seropedicae* foram inoculados em 2,5 mL de NFbHPN-Malato e três horas depois foram inoculados 25 μ L da estirpe de interesse de *E. coli* S17.1 em 2 mL de meio LB. Os tempos de incubação totais na estirpe receptora (*H. seropedicae*) e doadora (*E. coli*) foram, respectivamente, 6 e 3 horas.

Após essa incubação foram feitas duas misturas com as duas culturas em proporções diferentes, em um microtubo foram misturados 50 μ L da cultura de *H. seropedicae* com 5 μ L da cultura de *E. coli*, no segundo microtubo, 100 μ L de *H. seropedicae* com 2 μ L de *E. coli*. Colocou-se ambas as misturas, na forma de gotas, em pólos distintos de placa contendo meio NFb-Malato/LA 3:1, que foi incubada a 30°C por 24 horas. A massa de células que cresceu nessa placa foi raspada, ressuspensa em 1 ml de NFb-Malato e então plaqueada em meio NFbHP-Malato sólido contendo 20mmol/L de NH_4Cl e os antibióticos adequados.

3.8 CRESCIMENTO E DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE GERAÇÃO E DA TAXA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

As estirpes mutantes e a selvagem de *H. seropedicae* foram cultivadas como descrito no item 3.4, em frascos de 60 mL tubulares ou 125 mL cônicos contendo meio NFbHP-Malato, diferentes concentrações de NH_4Cl foram usadas (4 e 20 mM) para analisar o crescimento em condição de fixação e de não-fixação de nitrogênio. Para se obter diferentes concentrações de O_2 , aerobiose e microaerobiose, na cultura bacteriana em crescimento foi utilizado frascos diferentes (60 ou 125 mL) com a mesma quantidade de meio de cultura (20 mL).

A densidade ótica (620 nm) das culturas para o começo do ensaio foi ajustada para 0,05 e o crescimento foi acompanhado por até 30 horas. Alíquotas de 200 μ L eram retiradas das culturas em crescimento a cada hora e transferidas para placas do tipo ELISA (Greiner Bio One) para leitura de sua turbidez em comprimento de onda de 620 nm em leitor de microplacas Berthold TriStar LB 941 .

A taxa de crescimento e tempo de geração foram calculados pelas equações abaixo:

-Taxa de crescimento (μ) = 2,303. a ; onde a é o coeficiente angular do gráfico plotado usando-se \log_{10} da densidade ótica versus tempo de cultivo, nos pontos que o crescimento bacteriano é exponencial.

- Tempo de geração (g) = $\ln 2 \div \mu$

3.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE NITROGENASE

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método da redução do acetileno a etileno (DILWORTH, 1966; SCHOLLHORN E BURRIS, 1967). As estirpes de *H. seropedicae* foram crescidas em frasco de 10 mL contendo 4 ml de meio semi-sólido NFbHP-Malato suplementado com 0,5 mmol/L de glutamato ou 20 mmol de NH_4Cl . Após formação de película próxima a superfície do meio, os frascos foram vedados com rolha de borracha e injetou-se acetileno gasoso (10% do volume da fase gasosa). As culturas foram incubadas a 30°C por 1 hora e então, uma amostra de 0,5 ml da fase gasosa foi retirada dos frascos para analisar no cromatógrafo Varian STAR 3400 CX equipado com uma coluna de Porapak N e detector de ionização de chama. A temperatura da coluna foi mantida a 120°C e do detector a 200°C, o gás de arraste utilizado foi nitrogênio super seco. Como padrão utilizou-se etileno 100 ppm (White Martins).

Após coletar se a fase gasosa dos frascos para leitura no cromatógrafo, os meios semi-sólidos foram vigorosamente homogeneizados em vortex para então serem utilizados para ensaio de determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford, descrito no item 3.11.3. A atividade da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína total na cultura.

3.10 ENSAIO DE MOTILIDADE EM MEIO SEMI-SÓLIDO

Para ensaio de motilidade em placa, as estirpes bacterianas foram crescidas durante a noite, a partir de um pré-inóculo, em meio NFbHP-Malato com 20 mmol/L de NH₄Cl a 30°C em 120 rpm e então centrifugadas, lavadas para retirar o nitrogênio do meio e ressuspensas em NFb-Malato sem nitrogênio fixado. Cerca de 10⁸ células foram inoculados no meio de placas de NFbHP-Malato semi-sólido, com 0,16% de ágar, contendo 20 mmol/L ou 4 mmol/L ou 1 mmol/L de NH₄Cl. Os halos de motilidade foram medidos após 24 horas.

Para ensaio de motilidade em frasco de 10mL, as estirpes bacterianas foram crescidas *overnight* em meio NFbHP-Malato com 20 mmol/L de NH₄Cl a 30°C em 120 rpm, as células foram centrifugadas a 5000 rpm em centrífuga Minispin da Eppendorf, lavadas para retirar o nitrogênio do meio e ressuspensas em NFb-Malato sem nitrogênio fixado, com a D.O_{595nm} sendo ajustada para 0,6. Foi inoculado 100 µL dessa suspensão de células no fundo de meio NFbHP-Malato semi-sólido, com 0,25% de ágar, contido em frascos de 10 mL e suplementado com 20 ou 4 ou 1 mmol/L de NH₄Cl para analisar a formação de película por até 48 horas.

3.11 ESTUDO *in silico* DOS GENES SELECIONADOS DE *H. seropedicae*

A partir de dados de transcriptomas de *H. seropedicae* selecionamos genes que codificam para proteínas de sistemas de dois componentes que são expressos em várias condições de crescimento. Uma busca desses genes foi feita no genoma de *H. seropedicae* SMR1 (CP002039) utilizando o programa ARTEMIS (RUTHERFORD *et al.*, 2000) para identificar a sequência e possível produto codificado por eles. A partir da sequência genômica foram desenhados *primers* para amplificar esses genes de interesse (TABELA 4) a fim de mutagenizá-los ou purificar a proteína que produzem. Os genes mutagenizados, do qual foi possível obter estirpes mutantes, foram caracterizados *in silico* por comparação da organização genômica, estrutura proteica e similaridade com outros microorganismos. Foram utilizados os programas, em modo default, STRING 10.0 (SZKLARCZYK *et al.*, 2015), pFAM (FINN *et al.*, 2010) e para tentar identificar os promotores, BPROM (<http://www.softberry.com>).

3.12 ESTRATÉGIA DE MUTAGÊNESE PARA OS GENES ESCOLHIDOS DE *H. seropedicae*

Os genes de interesse neste trabalho de *H. seropedicae* foram amplificados a partir do DNA genômico da estirpe selvagem SMR1 e diretamente clonados no vetor pGEM®-T Easy vector seguindo recomendações do fabricante (PROMEGA). Para inativar os genes em questão foi escolhida a estratégia de inserção de cassete de resistência a canamicina dentro deles. Para isso foi utilizado um kit de inserção de transposon EZ-Tn5™ <KAN-2> da Epicentre, que através de uma enzima transposase consegue inserir aleatoriamente um transposon contendo um cassete de resistência a canamicina dentro do plasmídeo contendo o gene que será mutagenizado. Por restrição foi possível identificar os plasmídeos que tiveram a inserção do transposon de Km dentro do inserto do gene de interesse, esses genes interrompidos foram transferidos para o vetor pSUP202 e essas construções foram então transformadas em *E. coli* S17.1. Foi feita a conjugação dos transformantes S17.1 com a estirpe selvagem *H. seropedicae* SMR1 e através de seleção negativa tentou se obter mutantes que sofreram recombinação homóloga dupla, quando isso não foi possível selecionou se mutantes com recombinação homóloga simples. A espécie dos mutantes foi confirmada por amplificação e sequenciamento do gene 16S RNA, a inserção do cassete no genoma dos mutantes também foi confirmada por PCR.

3.13 MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS

3.13.1 Superexpressão e purificação de proteínas

A purificação das proteínas Hsero_3507 e Hsero_3508 foi realizada com células de *E. coli* BL21 (λ DE3) contendo os plasmídeos pET3507P e pET3508P, respectivamente. As colônias transformantes de BL21 (λ DE3) contendo os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 10 mL de LB com Km100 e incubadas durante a noite a 37°C. A partir desse pré-inóculo foi feito um inóculo 1:100 em erlenmeyer de 2L contendo 400 mL de LB e Km100, sendo incubado em um agitador rotatório a 120 rpm e 37°C até atingir absorbância a 600 nm entre 0,5 a 0,7. Atingida a absorbância certa, foram adicionados 200 μ L de IPTG 1M, e incubou se

por 3 horas a 37°C. As culturas foram centrifugadas, após a incubação, a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido foi ressuspensão em 10 mL de tampão de sonicação (100 mM de HEPES pH 8,0, 100 mM KCl), a lise das células aconteceu em um sonicador por 15 ciclos de 15 segundos com 15 segundos de intervalo, com o tubo sempre mantido em gelo. O extrato bruto obtido foi centrifugado por 30 minutos, a 30.000g e 4°C. Coletou-se o sobrenadante que foi então injetado em coluna HiTrap Chelating-Ni⁺² (GE Healthcare) de 1 ml conectada a uma bomba peristáltica, já carregada com NiCl₂, por instrução do fabricante. Depois do carregamento da coluna com a proteína de interesse, a eluição foi feita com gradiente descontínuo de imidazol, sendo o tampão composto por 100 mM tampão HEPES, 100 mM de KCl e concentrações crescentes de imidazol (10, 50, 100, 300 e 500mM). 5 mL de cada tampão foram injetados na coluna para a eluição das amostras. Frações de 1,5 mL foram coletadas durante todo o processo e então analisadas em eletroforese SDS-PAGE, com um volume aplicado de 10 µL. As frações que apresentavam a proteína de interesse com maior grau de pureza foram unidas, submetidas à diálise (tampão de diálise: 100 mM tampão HEPES; 100 mM de KCl e 10% v/v de glicerol), alíquotadas e armazenadas em -20°C.

3.13.2 Eletroforese de proteína sob condições desnaturantes SDS-PAGE

A eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes, contendo SDS foi realizada em gel de poliácridamida 10 ou 15% como descrito por LAEMMLI (1970). As amostras a serem analisadas foram diluídas em tampão de amostra desnaturante (60 mM TrisHCl, 10% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 0,02% azul de bromofenol, pH 6,8), fervidas por 5 minutos e então aplicadas no gel. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo as recomendações do fabricante das cubas de eletroforese (sistema MiniProtean, Biorad). As corridas foram submetidas a 170V, em tampão de corrida 1X (3 g/L Tris, 14,4 g/L glicina, 0,1% SDS) por 1 hora. O gel foi corado com solução de Comassie Blue (50% metanol, 40% água, 10% ácido acético, 0,55 g/L Brilliant Blue R) por trinta minutos, o excesso de corante foi retirado com solução descorante (50% metanol, 40% água, 10% ácido acético) até conseguir visualizar as bandas protéicas. Na tabela 6 consta a composição dos géis.

TABELA 6 – GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÃO DESNATURANTE – QUANTIDADE PARA DOIS GÉIS

| Gel separador | 15% | 10% | Gel de empilhamento 4% | |
|-----------------------|---------|--------|------------------------|---------|
| H ₂ O | 3,65 mL | 4,9 mL | H ₂ O | 3,16 mL |
| Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 | 2,5 mL | 2,5 mL | Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 | 1,3 mL |
| SDS 10% | 100 µL | 100 µL | SDS 10% | 50 µL |
| Acrilamida 40% | 3,75 mL | 2,5 mL | Acrilamida 40% | 487 µL |
| APS 10% | 100 µL | 100 µL | APS 10% | 50 µL |
| TEMED | 5 µL | 5 µL | TEMED | 5 µL |

3.13.3 Dosagem de proteína

O método de Bradford foi utilizado para a dosagem de proteínas (BRADFORD, 1976), usando o Reagente de Bradford da Sigma. Para quantificar a proteína resultante de superexpressão a reação foi feita em placa do tipo ELISA (Greiner Bio One) sendo utilizada 1 µL de amostra, 19 µL de água ultrapura e 180 µL de reagente. Para obtenção da curva padrão se usou albumina de soro bovino (BSA). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas Bio-rad iMark, em 595 nm.

Para quantificar proteína do ensaio de nitrogenase, 50 µL de cultura bacteriana foram lisadas com 50 µL de NaOH 0,2 mol/L em placas do tipo ELISA, essa reação foi incubada a temperatura ambiente por 2 horas. 30 µL do produto resultante foram transferidos para uma nova placa de ELISA na qual foram adicionados 170 µL do reativo de Bradford e então a absorbância foi lida a 595 nm em leitor de microplacas Bio-rad iMark. Cada ensaio de quantificação de proteína de nitrogenase foi realizado em duplicata e a curva padrão também foi feita com BSA.

3.13.4 Ensaio de ligação cruzada (*crosslinking*) *in vitro*

Para ensaio de ligação cruzada utilizou-se um sistema de 20 µL com 100 mM HEPES em pH 8,0 com 100 mM KCl, 5-10mM MgCl₂ e 20 µM de cada proteína. Formaldeído ou glutaraldeído foi utilizado como agente de ligação cruzada, em uma concentração final de 0,5%. Como fonte de grupo fosforil para as reações de fosforilação foi utilizado ATP na concentração final de 5-10 mM. Para parar a reação

foi adicionado um volume de Tris-HCl 1M (pH 7,5). A análise das amostras foi feita por eletroforese de proteína sob condições desnaturantes SDS-PAGE, sem β -mercaptoetanol no tampão de amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae* PARA OS GENES ALVO

O sistema de dois-componentes é um aprimorado sistema de sinalização, que permite os organismos sentir e responder a mudanças nas condições do ambiente em que vivem. Selecionamos cinco genes (*Hsero_1278*, *Hsero_1677*, *Hsero_1898*, *Hsero_3507* e *Hsero_3508* (TABELA 7)) que codificam para proteínas que podem fazer parte de sistemas de dois-componentes, e que são expressos em diferentes condições de crescimento. Dois genes parecem estar relacionados entre si: *Hsero_3507* e *Hsero_3508*. O gene *Hsero_3508* possui 1206 pares de bases e codifica para uma histidina quinase do sistema de dois-componentes. O *Hsero_3507* possui 378 pares de bases e codifica uma proteína de resposta regulatória do sistema de dois-componentes, está localizado logo antes do *Hsero_3508* a uma distância de 150 pb. Por estarem juntos no genoma de *H. seropedicae* há a possibilidade de que façam parte do mesmo sistema de dois-componentes, sendo a proteína do *Hsero_3508* a histidina quinase sensora e a proteína do *Hsero_3507* a sua reguladora de resposta cognata.

O gene *Hsero_1278* possui um tamanho de 932 pares de bases e codifica para um regulador de transcrição da família AraC, proteínas dessa família se relacionam com ligação ao DNA, apresentam domínio hélice-volta-hélice, regulam principalmente três funções: metabolismo de carbono, resposta ao estresse e patogenicidade (FROTA *et al.*, 2004).

O *Hsero_1677* é um gene de 519 pares de bases que codifica para um regulador de transcrição da família AsnC/Lrp. Proteínas dessa família também apresentam domínio hélice-volta-hélice, estão bem distribuídas entre procariotos e a maioria participa da regulação de genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos (BRINKMAN *et al.*, 2003). O *Hsero_1898* possui 2028 pares de bases e a proteína que codifica é uma ativadora de transcrição dependente de σ_{54} , o fator sigma relacionado com a limitação de nitrogênio, segundo anotação no genoma de *H. seropedicae* SMR1, essa proteína está envolvida no metabolismo de glicerol e acetoína.

TABELA 7 – GENES SELECIONADOS DE *H. seropedicae* PARA ESTUDO E AS PROTEÍNAS QUE CODIFICAM.

| Gene | Proteína codificada |
|-------------------|--|
| <i>Hsero_1278</i> | Regulador de transcrição da família AraC |
| <i>Hsero_1677</i> | Regulador de transcrição da família AsnC/Lrp |
| <i>Hsero_1898</i> | Ativador de transcrição dependente de σ_{54} |
| <i>Hsero_3507</i> | Regulador de resposta do sistema de dois-componentes |
| <i>Hsero_3508</i> | Histidina quinase do sistema de dois-componentes |

4.1.1 Construção dos plasmídeos contendo os genes *Hsero_1278*, *Hsero_1677*, *Hsero_1898*, *Hsero_3507* e *Hsero_3508* interrompidos com um transposon que confere resistência a canamicina.

Os genes *Hsero_1278*, *Hsero_1677*, *Hsero_1898*, *Hsero_3507* e *Hsero_3508* foram amplificados a partir de DNA genômico da estirpe selvagem *H. seropedicae* SMR1, utilizando os respectivos *primers forward* e *reverse* da tabela 5 (item 3.5.5), ligados ao vetor pGEM®-T Easy vector (PROMEGA), transformados em *E. coli* TOP10 e plaqueados em meio LA contendo ampicilina e Xgal, conforme item 3.6.2. Os clones brancos resultantes foram inoculados em meio LB para purificação plasmidial (item 3.5.1). A confirmação da clonagem dos insertos nos plasmídeos foi feita por restrição usando a endonuclease EcoRI que permite a remoção do fragmento amplificado do vetor. Os clones dos genes *Hsero_1278* e *Hsero_1677* foram digeridos com EcoRI para liberar o inserto do vetor, em todas as restrições foi verificado uma banda de 3000 pb do pGEM®-T Easy vector, para o *Hsero_1278* uma banda de cerca de 800 pb, e para o *Hsero_1677*, uma de aproximadamente 400pb. Para os clones do *Hsero_1898*, devido a existência de um sítio de restrição para EcoRI no meio desse gene, o que impossibilita a clonagem do gene íntegro através dessa enzima de restrição, foi usado a endonuclease NotI para retirar o inserto do vetor, que como a EcoRI, ela também flanqueia onde acontece a ligação no pGEM®-T Easy vector. O gene *Hsero_1898* apresenta 2028 pb, para facilitar as PCRs, os *primers* para esse gene foram desenhados para anelar dentro dele, amplificando um fragmento de 1288 pb, portanto na restrição dos clones de *Hsero_1898* foi obtida uma banda de 1288 pb e outra de 3000 pb. Os clones com o padrão de banda esperado foram sequenciados para confirmação de identidade do inserto, e denominados pGEMT1278, pGEMT1677 e pGEMT1898.

Após a digestão dos clones de *Hsero_3507* com EcoRI foram observadas duas bandas, uma de 3000 pb do vetor pGEM®-T Easy vector e uma de aproximadamente 400 pb, correspondente ao fragmento do gene amplificado. Para os clones de *Hsero_3508* foi observado uma de 3000 pb do vetor e outra de aproximadamente 1200 pb correspondente ao fragmento do gene amplificado. Após a confirmação por restrição de clones com o padrão de banda esperado, foi realizado o sequenciamento dos fragmentos nos plasmídeos para determinar com certeza a identidade do amplificado inserido, gerando os plasmídeos pGEMT3507 e pGEMT3508 (FIGURA 6).

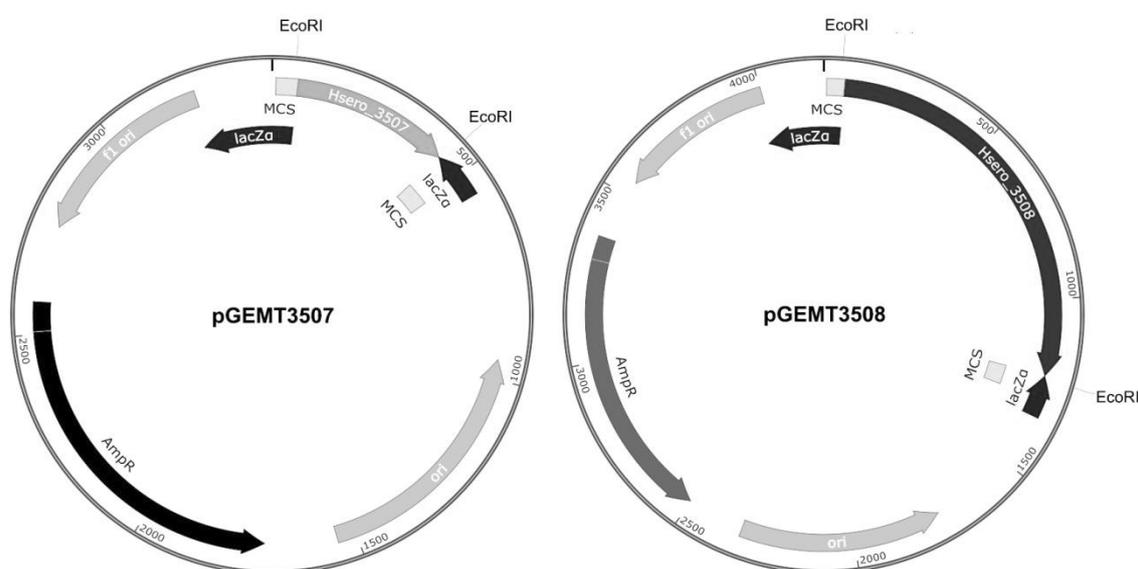


FIGURA 6 - ESQUEMA MOSTRANDO A ORGANIZAÇÃO DOS PLASMÍDEOS pGEMT3507 E pGEMT3508. A inserção do fragmento amplificado é feita no sítio de policlonagem (MCS) do vetor, interrompendo o gene *lacZα*, permitindo uma fácil seleção dos clones com inserto e sem através da coloração da colônia transformante. Sítios de restrição para enzima EcoRI flanqueiam o lugar de inserção do fragmento no vetor.

A mutagênese dos plasmídeos pGEMT1278, pGEMT1677, pGEMT1898, pGEMT3507 e pGEMT3508 foi feita por inserção aleatória do transposon EZ-Tn5™ <Kan2> (INVITROGEN), que possui gene para resistência a canamicina, conforme item 3.58. A reação de transposição foi transformada em *E. coli* TOP10 e plaqueada em LA contendo ampicilina e canamicina. Os clones resultantes foram inoculados em LB para purificação plasmidial. A confirmação da inserção do transposon dentro do gene foi feita por restrição com EcoRI dos plasmídeos obtidos, a exceção do pGEMT1898 que foi usado NotI. A inserção correta do transposon no gene, para todos os plasmídeos, geraria uma banda esperada de 3000 pb do vetor, a banda do gene selvagem desapareceria, estando presente uma outra banda, a do gene

mutagenizado. No gel que contém os clones obtidos após a reação de transposon do plasmídeo pGEMT1278, pudemos observar 3 clones (3, 5 e 9) contendo uma banda de 2000 pb que corresponde ao fragmento amplificado com a inserção do transposon (FIGURA 7A). No gel que contém os clones obtidos após a reação de transposon do plasmídeo pGEMT1677, pudemos observar um clone (10) contendo uma banda de 1600 pb que corresponde ao fragmento amplificado com a inserção do transposon (FIGURA 7B). A figura 7C mostra os clones obtidos após a reação de transposon do plasmídeo pGEMT1898, encontramos dois clones (4 e 10) contendo uma banda de 2500 pb que corresponde ao fragmento amplificado com a inserção do transposon. A figura 8 mostra os clones da reação de transposon do pGEMT3508 (A) e do pGEMT3507 (B). Na linha 10 da figura 8A podemos observar uma banda de 2400 pb que corresponde ao fragmento amplificado com a inserção do transposon, e na linha 9 da figura 8B observamos uma banda de 1600 pb que corresponde ao fragmento amplificado com a inserção do transposon. Os plasmídeos apresentando o padrão de bandas correto, com a inserção do transposon dentro do gene amplificado, foram denominados pGEMT1278Tn, pGEMT1677Tn, pGEMT1898Tn, pGEMT3507Tn e pGEMT3508Tn. A figura 9 ilustra essa estratégia de mutagênese.

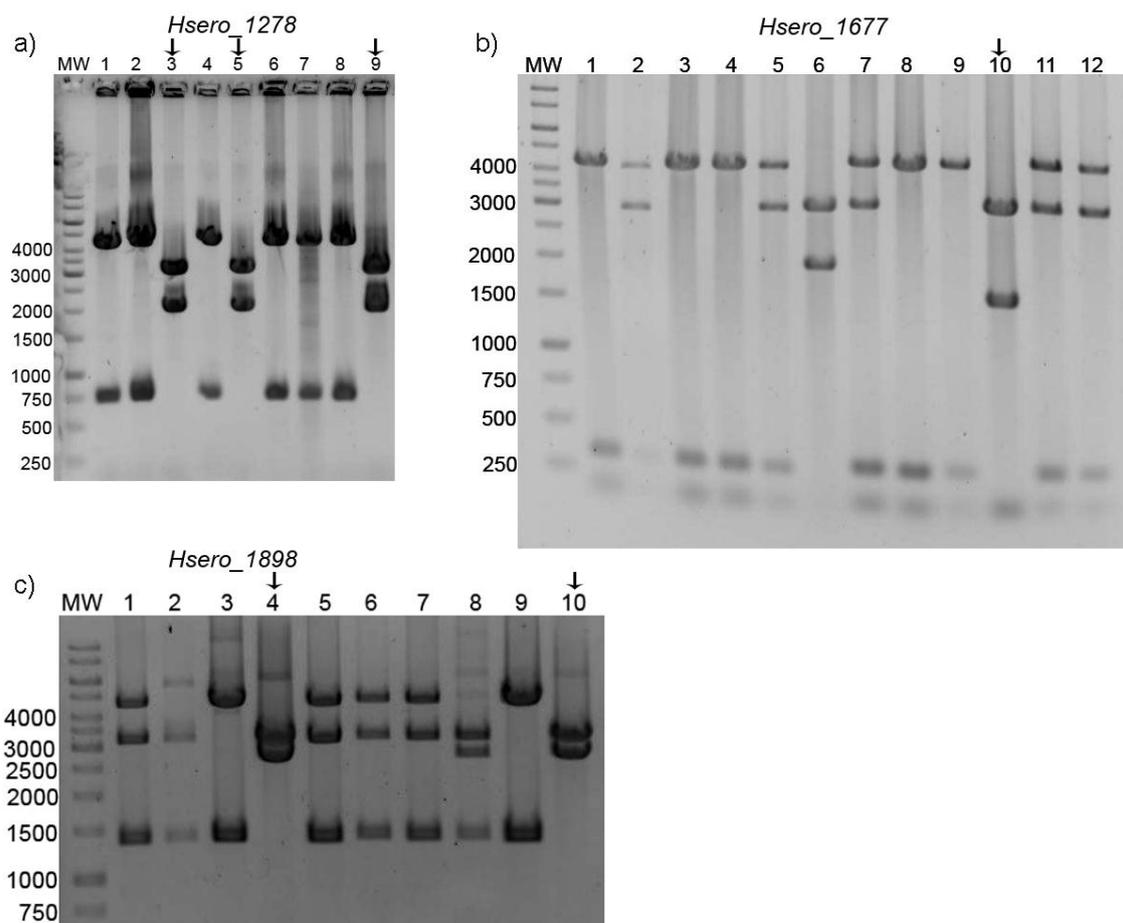


FIGURA 7 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DOS CLONES DE pGEMT1278, pGEMT1677 E pGEMT1898 GERADOS PELA REAÇÃO DE TRANSPOSON. Eletroforese realizada em gel de agarose 1% em TAE 1X. MW: padrão de massa molecular (pb). Setas pretas: clones com a inserção do transposon dentro do gene de interesse. a) eletroforese da restrição com EcoRI dos clones obtidos da reação de transposon com o plasmídeo pGEMT1278, linhas 1 a 9 são os clones obtidos, os clones das linhas 3, 5 e 9 apresentaram o padrão de bandas esperado para inserção do transposon dentro do gene, o clone 9 foi selecionado e denominado pGEMT1278Tn. b) eletroforese da restrição com EcoRI dos clones obtidos da reação de transposon com o plasmídeo pGEMT1677, linhas 1 a 12 são os clones obtidos, o clone da linha 10 apresentou o padrão de bandas esperado, foi selecionado e denominado pGEMT1677Tn. c) eletroforese da restrição com NotI dos clones obtidos da reação de transposon com o plasmídeo pGEMT1898, linhas 1 a 10 são os clones obtidos, os clones das linhas 4 e 10 apresentaram o padrão de bandas esperado, o clone 10 foi selecionado e denominado pGEMT1898Tn.

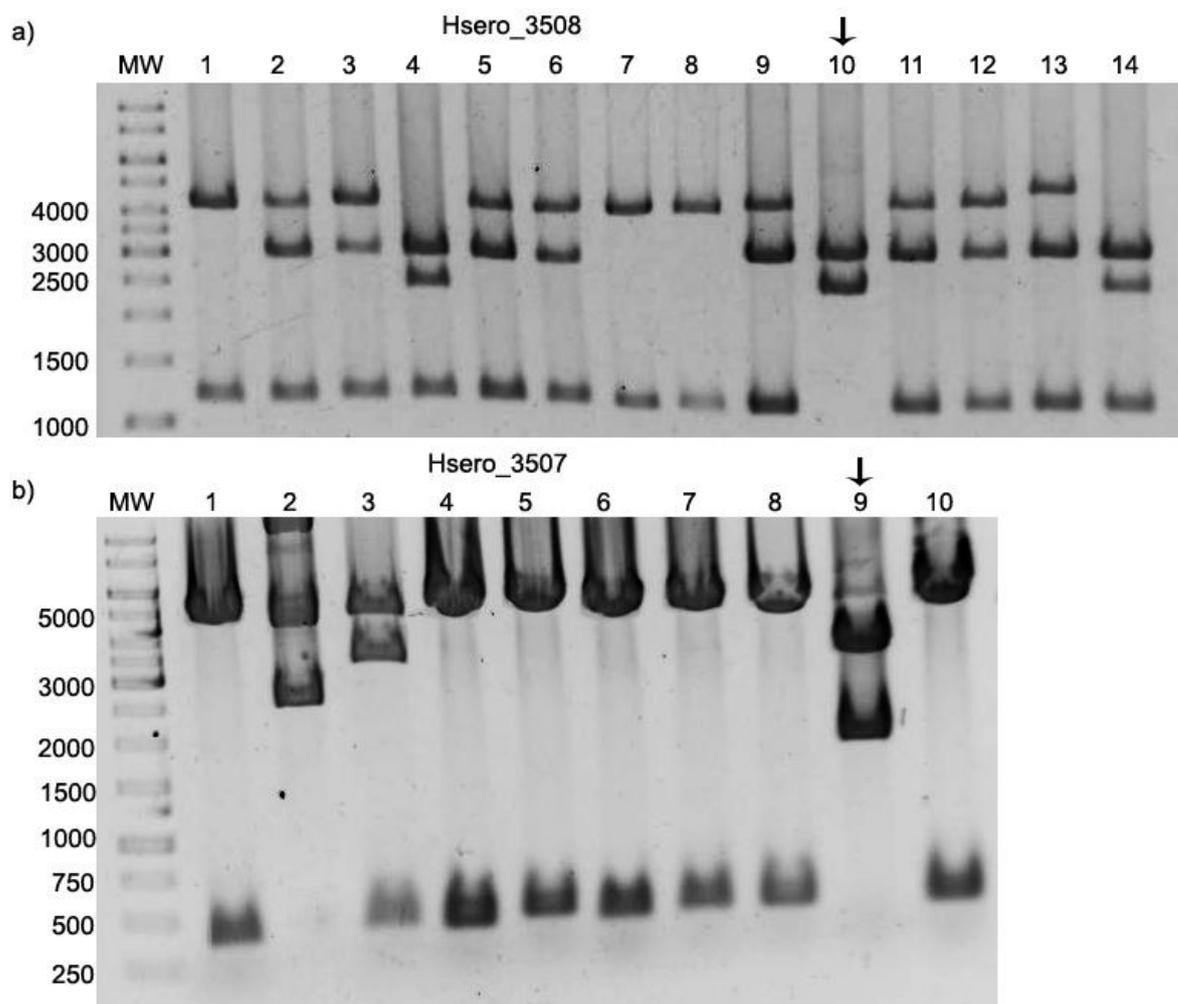


FIGURA 8 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE RESTRIÇÃO COM ECORI DOS CLONES DE pGEMT3508 e pGEMT3507 GERADOS PELA REAÇÃO DE TRANSPOSON. Eletroforese realizada em gel de agarose 1% em TAE 1X. MW: padrão de massa molecular (pb). Setas pretas: clones com a inserção do transposon dentro do gene de interesse. a) eletroforese da restrição dos clones obtidos da reação de transposon com o plasmídeo pGEMT3508, linhas 1 a 14 são os clones obtidos, o clone da linha 10 apresentou o padrão de banda esperado para inserção do transposon dentro do gene, foi selecionado e denominado pGEMT3508Tn. b) eletroforese da restrição dos clones obtidos da reação de transposon com o plasmídeo pGEMT3507, linhas 1 a 10 são os clones obtidos, clone da linha 9 apresentou o padrão esperado para mutagênese, foi selecionado e denominado pGEMT3507Tn.

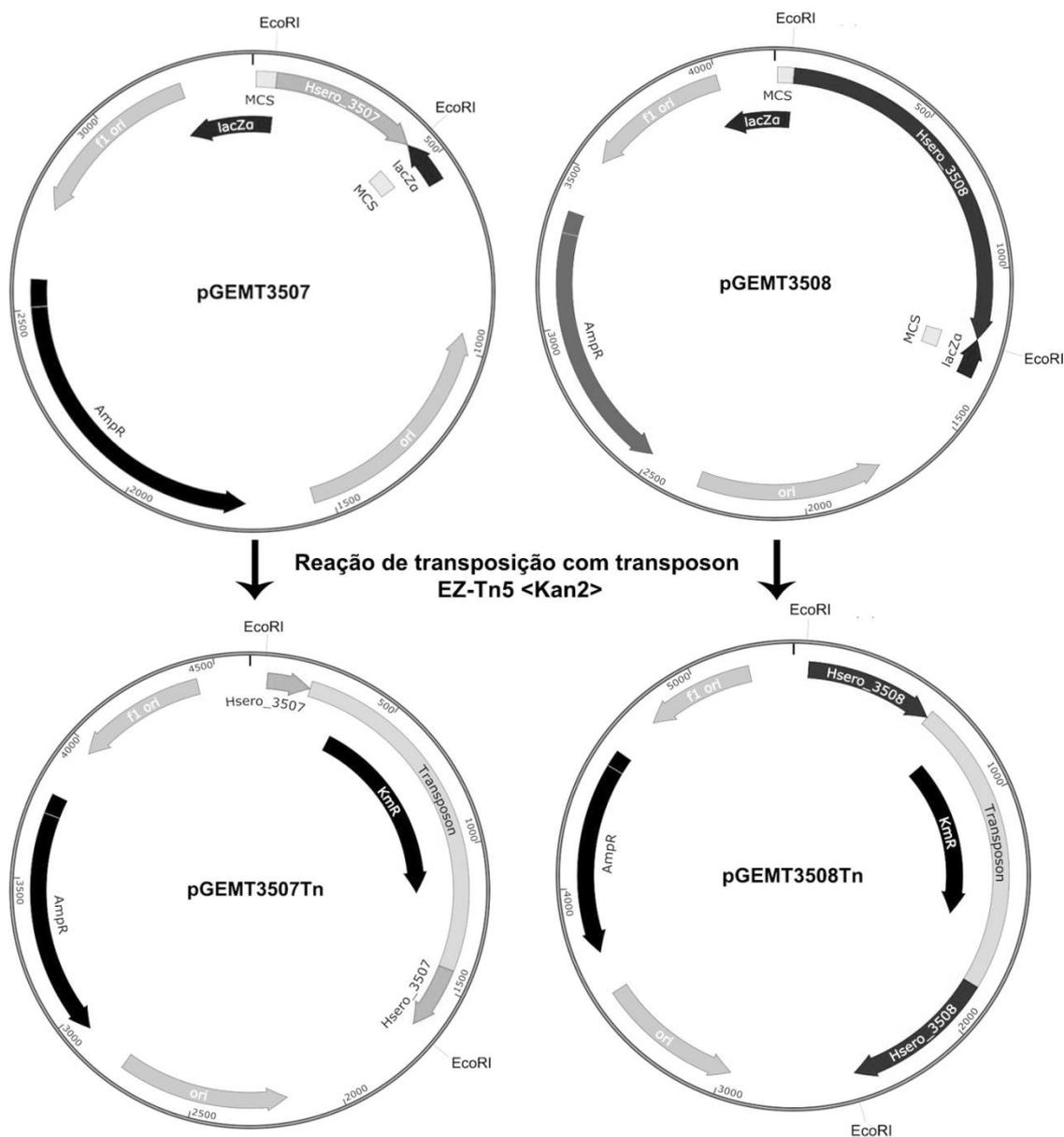


FIGURA 9 - ESQUEMA DA ESTRATÉGIA DE MUTAGÊNESE DOS PLASMÍDEOS pGEMT3507 e pGEMT3508. Os sítios de restrição de EcoRI estão representados nos plasmídeos.

Os fragmentos dos genes de interesse interrompidos com o transposon foram retirados do pGEMT1278Tn, pGEMT1677Tn pGEMT3507Tn e pGEMT3508Tn com a EcoRI e então ligados ao vetor conjugável pSUP202 linearizado com a mesma enzima (FIGURA 10). Para o pGEMT1898Tn essa estratégia não foi possível, portanto, o fragmento foi digerido com NotI, as pontas do fragmento foram reparadas para deixá-lo com as pontas cegas, e o fragmento foi ligado ao vetor pSUP202 linearizado com SmaI. Os produtos das ligações foram transformados em *E. coli* TOP10 e plaqueados em LA contendo canamicina e tetraciclina, no caso do pGEMT1898Tn foi usado cloranfenicol ao invés de Tc. A ligação com o pGEMT1898

e pSUP202 não gerou subclones, todos os passos dessa reação foram repetidos duas vezes, com o mesmo resultado em todas as vezes. Os subclones obtidos, contendo os outros fragmentos, tiveram o DNA plasmidial purificado. Os plasmídeos resultantes foram analisados por restrição com EcoRI para determinar a presença do gene mutagenizado dentro do vetor pSUP202. Na figura 11 podemos ver a banda do vetor de 8000 pb e na linha 3 da figura 11A um fragmento de 2000 pb correspondente ao *Hsero_1278Tn*, e nas linhas de 1 a 4 da figura 11B, um fragmento de 1600pb correspondente ao *Hsero_1677Tn*. A figura 11 também mostra que, em algumas reações, aconteceu a ligação do vetor pGEM-T junto com o pSUP202 e o gene mutagenizado, esses subclones foram descartados. Na Figura 12A e 12B podemos notar que todos os clones observados contém a banda referente ao vetor pSUP202, de 8000pb e as bandas correspondentes ao *Hsero_3508Tn* de 2400 pb, e do *Hsero_3507Tn* de 1600 pb.

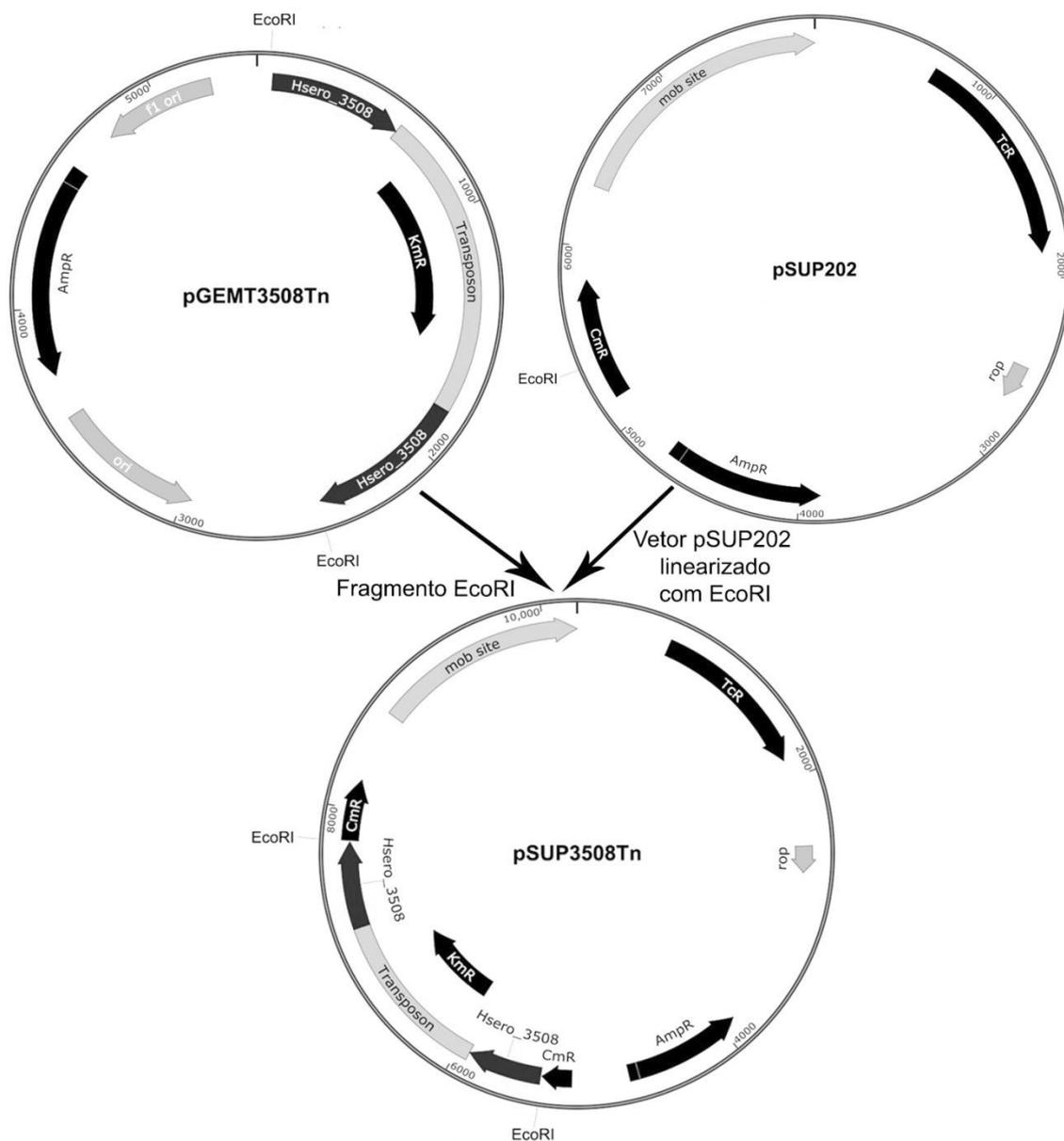


FIGURA 10 - ESQUEMA DEMONSTRANDO A ESTRATÉGIA DE TRANSFERÊNCIA DO GENE INTERROMPIDO POR TRANSPONON PARA O VETOR CONJUGÁVEL pSUP202. Os sítios de restrição de *EcoRI* estão representados nos plasmídeos.

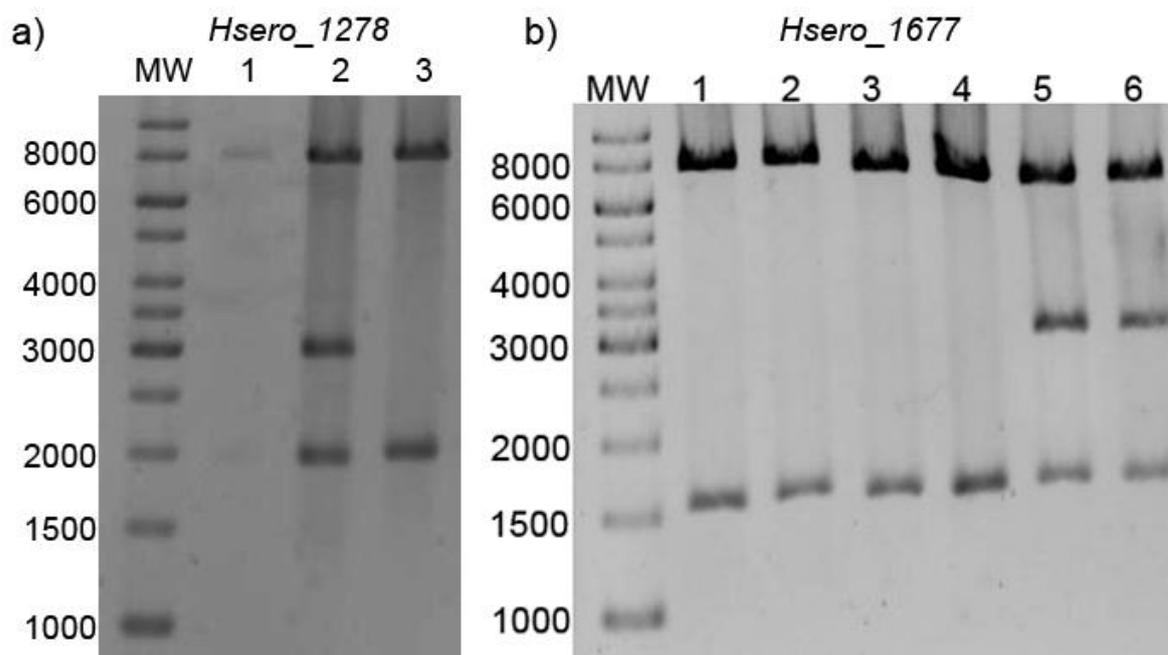


FIGURA 11 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE RESTRIÇÃO COM *ECORI* DOS SUBCLONES PROVENIENTES DE TRANSFERÊNCIA AO pSUP202 DOS GENES MUTAGENIZADOS DE pGEMT1278Tn, E pGEMT1677Tn. Eletroforese realizada em gel de agarose 1% em TAE 1X. MW: padrão de massa molecular (pb). a) Restrição dos subclones provenientes da transferência do fragmento *EcoRI* do pGEMT1278Tn ao vetor pSUP202, linha 1 a 3 são os subclones obtidos, foi selecionado o subclone da linha 3 e denominado pSUP1278Tn. b) Restrição dos subclones provenientes da transferência do fragmento *EcoRI* do pGEMT1677Tn ao vetor pSUP202, linha 1 a 6 são os subclones, foi selecionado o subclone da linha 1 e denominado pSUP1677Tn.

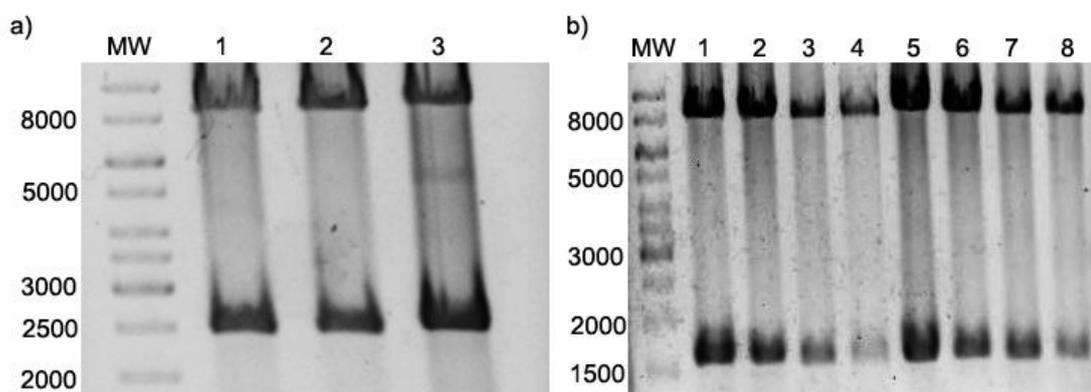


FIGURA 12 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE RESTRIÇÃO COM *ECORI* DOS SUBCLONES PROVENIENTES DE TRANSFERÊNCIA AO pSUP202 DOS GENES MUTAGENIZADOS DE pGEMT3508Tn E pGEMT3507Tn. Eletroforese realizada em gel de agarose 1% em TAE 1X. MW: padrão de massa molecular (pb). a) Restrição dos subclones provenientes da transferência do fragmento *EcoRI* do pGEMT3508Tn ao vetor pSUP202, linha 1 a 3 são os subclones, todos apresentaram as bandas esperadas, foi selecionado o subclone da linha 1 e denominado pSUP3508Tn. b) Restrição dos subclones provenientes da transferência do fragmento *EcoRI* do pGEMT3507Tn ao vetor pSUP202, linha 1 a 8 são os subclones obtidos, o subclone da linha 1 foi selecionado e denominado pSUP3507Tn.

4.1.2 Obtenção de estirpes mutantes para os genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508*

A transferência dos genes interrompidos para *H. seropedicae* foi através de conjugação, com o objetivo de construir estirpes mutantes cujos genes escolhidos estariam mutagenizados devido a inserção de um transposon que confere resistência ao antibiótico canamicina. Para isso os plasmídeos mutagênicos pSUP1278Tn, pSUP1677Tn, pSUP3507Tn e pSUP3508Tn foram transformados na estirpe S17.1 de *E. coli*, conforme descrito no item 3.6.1, e uma colônia foi coletada de cada transformação, sendo usada para a conjugação com a estirpe SMR1 de *H. seropedicae*, conforme descrito no item 3.7. Com a conjugação é possível acontecer dois eventos de recombinação, o primeiro é a recombinação homóloga simples que leva a inserção do vetor inteiro na região homóloga do gene alvo, o segundo é a recombinação homóloga dupla na qual acontecem dois eventos de quebra e ligação de DNA, ocorrendo a inversão geral do transposon, com o gene selvagem sendo “eliminado”, permanecendo somente o gene interrompido, a figura 13 esquematiza esse fenômeno.

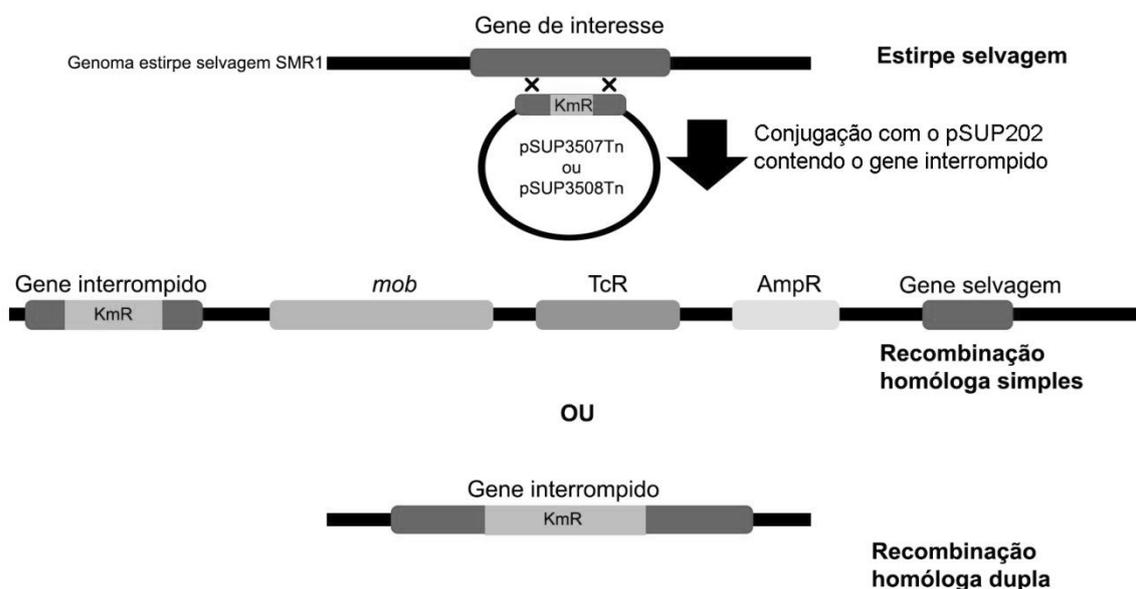


FIGURA 13 - ESQUEMA ILUSTRANDO OS RESULTADOS QUE PODEM SER OBTIDOS PELA CONJUGAÇÃO. A transferência do gene interrompido para o genoma de *H. seropedicae* ocorre em duas etapas, na primeira o vetor inteiro entra na região homóloga alvo durante a recombinação homóloga simples, na segunda o vetor é eliminado, permanecendo apenas o gene mutagenizado gerando a recombinação homóloga dupla. É possível haver somente o primeiro evento de recombinação.

A seleção dos transconjugantes que sofreram recombinação homóloga dupla foi feita por seleção negativa: estirpes que eram resistentes a canamicina, mas sensíveis a tetraciclina. Para o *Hsero_3508* obtivemos um transconjugante que apresentou esse padrão de resistência, a inserção do gene mutagenizado e deleção do gene selvagem no genoma foi confirmado por PCR (FIGURA 14). A banda amplificada a partir do DNA genômico da estirpe selvagem possui 1200 pb, correspondendo ao gene selvagem (linha 4), A banda amplificada a partir do DNA genômico do transconjugante de *Hsero_3508* apresenta somente uma banda, de 2400 pb correspondente ao gene interrompido com o transposon de canamicina (linha 5), indicando que ocorreu a recombinação homóloga dupla. Essa estirpe *Hsero_3508^r* foi denominada 3508Tn e teve o gene do 16S do rRNA sequenciado para confirmação que é *H. seropedicae*.

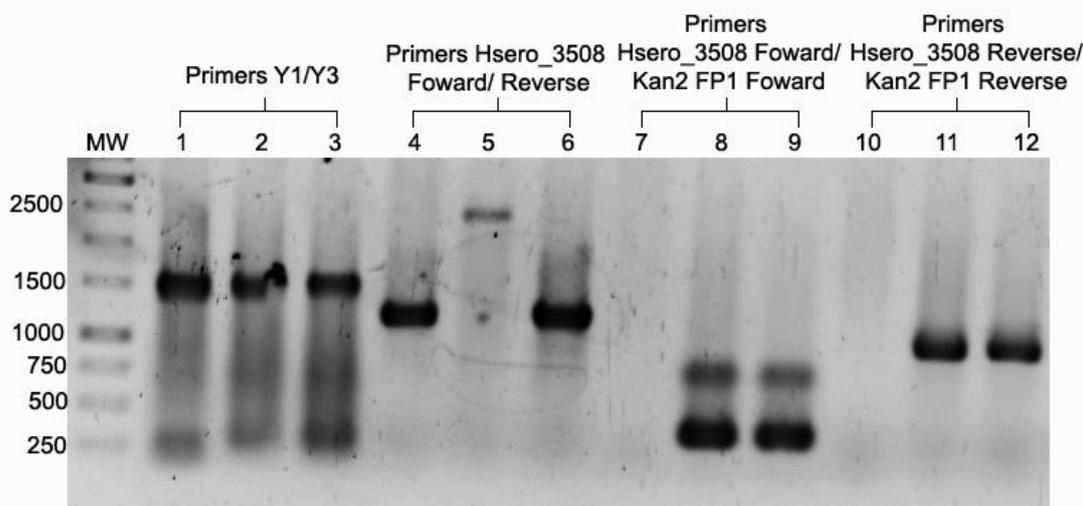


FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO AMPLIFICADO DO GENE *Hsero_3508* DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* SMR1 E TRANSCONJUGANTES. Eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1X. Linhas 1, 4, 7 e 10 correspondem a PCR usando DNA da estirpe SMR1, linhas 2, 5, 8 e 11 correspondem a PCR usando DNA do transconjugante resistente a Km1000 e sensível a Tc10, linhas 3, 6, 9 e 12 correspondem a PCR usando DNA de transconjugante resistente a Km1000 e Tc10. Amplificação do gene 16S pelos primers Y1 e Y3 (linhas 1 a 3) serviu como controle. Linhas 7 a 12 correspondem a PCR usando combinação de *primers* do gene alvo com *primers* do transposon para confirmar a presença do transposon no genoma. Linha 5, PCR do transconjugante resistente a Km1000 e sensível a Tc10 com primers do gene alvo mostrando a presença no genoma apenas do gene mutagenizado, provando que nessa estirpe ocorreu o evento de recombinação dupla sendo ela *Hsero_3508^r*. MW: marcador de massa molecular (pb).

No caso do *Hsero_3507* não se obteve transconjugantes sensíveis a tetraciclina, foi selecionado alguns transconjugantes e realizado PCR para confirmação da presença do gene mutagenizado no genoma (FIGURA 15). O gene

selvagem *Hsero_3507* apresenta 373 pb enquanto que o mutagenizado 1600 pb. Dois transconjugantes apresentaram tanto o gene mutagenizado quanto o gene selvagem. O transconjugante 2, obtido por recombinação homóloga simples foi escolhido para a caracterização fenotípica. Essa estirpe foi denominada 3507Tn e teve o gene 16S rRNA sequenciado, confirmando que era *H. seropedicae*.

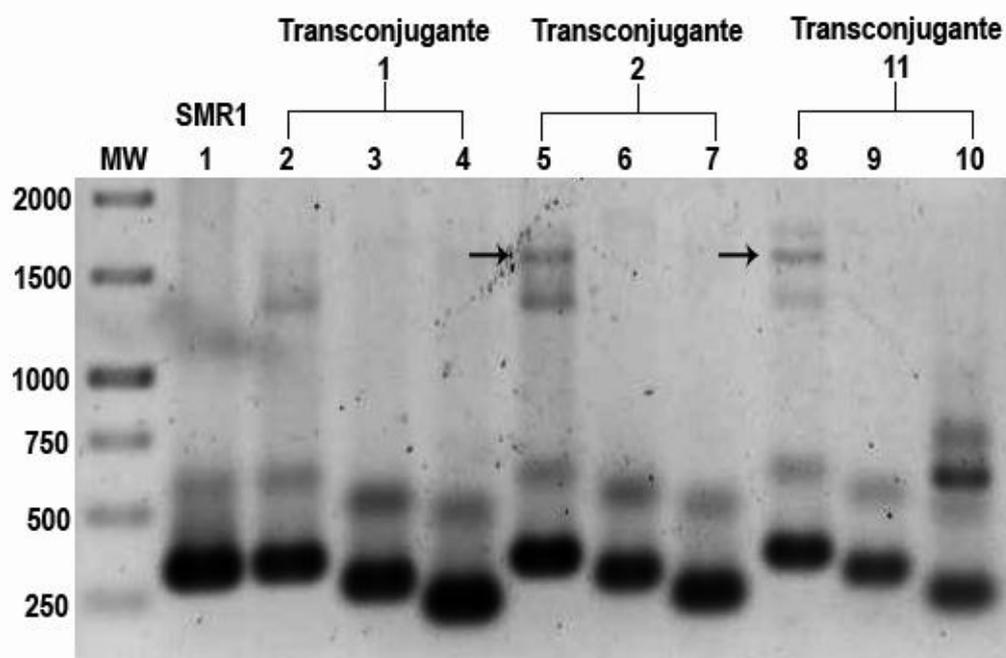


FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO GENE *Hsero_3507* DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* SMR1 E TRANSCONJUGANTES. Eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1X. Linha 1 corresponde a PCR com DNA da estirpe selvagem e primers do gene *Hsero_3507*. Linha 2, 5 e 8 corresponde a PCR utilizando os primers do gene *Hsero_3507*. Linhas 3, 6 e 9 PCR usando a combinação de *primer Hsero_3507 Forward* com *primer Kan2 FP1* do transposon. Linhas 4, 7 e 10 PCR usando a combinação de *primer Hsero_3507 Reverse* com *primer Kan2 RP1* do transposon. Em outra eletroforese não mostrada foi confirmada o padrão de banda do 16S dos transconjugantes igual ao do SMR1, como também foi confirmada a não amplificação do SMR1 pelos primers do transposon. O transconjugante 2 apresentou banda para o gene interrompido (1600 pb, seta preta) e banda para o gene selvagem (378 pb) (linha 5), foi o selecionado para a caracterização fenotípica. MW: marcador de massa molecular (pb).

Para os genes *Hsero_1278* e *Hsero_1677* não foram obtidos transconjugantes sensíveis a tetraciclina, e dos obtidos resistentes a canamicina e tetraciclina, não conseguimos amplificar os genes mutagenizados do genoma dos transconjugantes, amplificando somente os genes selvagens, impossibilitando a confirmação da obtenção de mutantes. Portanto, decidiu-se seguir para a caracterização com os mutantes obtidos para os genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508*.

4.2 CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DOS GENES *Hsero_3507* E *Hsero_3508*

A organização dos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* no genoma e quais os genes presentes na vizinhança está representada na figura 16. A jusante do *Hsero_3507* a uma distância de 247 pares de bases está o gene *yca0* que codifica uma proteína com domínio YcaO, um fator acessório de metiltiotransferases, relacionadas com modificação de tRNA, a montante do *Hsero_3508* a 52 pares de bases está o gene *Hsero_3509* que codifica para uma proteína hipotética, logo em seguida, continuamente, encontra-se o gene *Hsero_3510* que codifica um regulador transcricional. Nenhum dos genes na vizinhança parece ter alguma relação com o sistema de dois-componentes. Apesar de terem a mesma classe de função fisiológica, uma característica comum de genes em operon, a distância entre *Hsero_3507* e *Hsero_3508*, 150 pb, é o triplo do limite máximo de distância usado para predizer operons, não sendo assim possível afirmar que os genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* fazem parte de um operon (SALGADO *et al.*, 2000; JANGA e MORENO-HAGELSIEB, 2013). Além disso, não foi possível identificar sequências promotoras anterior aos genes *yca0*, *Hsero_3507* e *Hsero_3508* utilizando o programa BPPROM, que procura por promotores do fator $\sigma 70$, pois não foram obtidos resultados com *scores* confiáveis, também não foi possível identificar promotores através de procura visual por elementos da sequência consenso do fator sigma 54 (NNNNMRNRYTGCGACGNNNNTTGCWNNWNNNNN), do fator sigma 28 (TAAAGWWY__(11/12)__RYCGAWRN), do sigma 32 (NTCNCCCTTGAA__(17)__CCCCATTTA) e do sigma 38 (TTGACA__(17)__TATAAT). Uma procura por sequências terminadoras rho-independentes foi feita através do programa ARNold (NAVILLE *et al.*, 2011) mas não foi possível identificar tais sequências ao final dos genes *yca0* e *Hsero_3508*, portanto não conseguimos determinar onde começa e onde termina a transcrição do *Hsero_3507* e *Hsero_3508*.

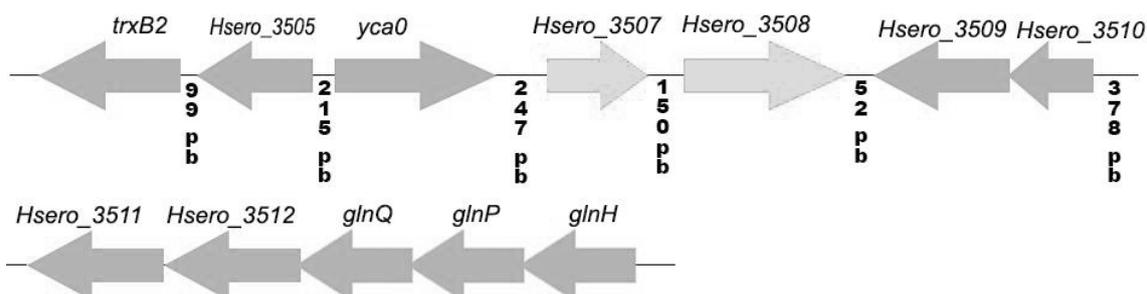


FIGURA 16 - ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DOS GENES *Hsero_3507*, *Hsero_3508* E VIZINHANÇA. *trxB2* codifica para uma tioredoxina redutase; *Hsero_3505* para um regulador de transcrição; *ycaO* para uma proteína contendo domínio YcaO (fator acessório de metiltiotransferases); *Hsero_3509* para uma proteína hipotética; *Hsero_3510* para um regulador transcricional; *Hsero_3511* para um regulador transcricional; *Hsero_3512* para uma peptidase C45; *glnQ* para uma ATPase do transportador ABC; *glnP* para uma permease do transportador ABC; *glnH* para uma proteína ligadora de substrato do transportador ABC. Os números na vertical indicam a distância, em pares de bases, entre cada gene.

Com o objetivo de identificar um possível papel para os genes estudados, foi feita uma análise pelo STRING da sequência de aminoácidos codificados, para determinar redes de possíveis interações das proteínas alvos. Na tabela 8 e 9 consta os resultados para *Hsero_3508* e *Hsero_3507*, respectivamente. Para a proteína *Hsero_3508* não se obteve interações com grande grau de confiança (acima de 0.7) devido à baixa quantidade de informações no banco de dados da proteína alvo e das quais ela possui similaridades, oito das dez interações preditas pelo programa são de proteínas de sistema de dois-componentes, histidina quinases, reguladoras de resposta ou transcrição, uma interação é com uma enzima da superfamília das cupinas, essa superfamília é caracterizada por possuir estrutura em barril beta e apresentar uma grande diversidade de função, sendo constituída de mais de 18 subclasses funcionais (DUNWELL *et al.*, 2004). A última interação predita para a proteína *Hsero_3508* foi com um regulador de transcrição da família AraC, relacionando-se então ao metabolismo de carbono ou a resposta a estresse. A proteína *Hsero_3507* apresentou 8 interações com alta confiança (*score* acima de 0.7), sendo duas delas com proteínas reguladoras de resposta envolvidas com a quimiotaxia e uma com um regulador de transcrição da família MarR, as proteínas dessa família apresentam domínios hélice-volta-hélice alados e regulam a resistência múltipla a antibióticos (GROVE, 2013).

TABELA 8 – PARCEIROS FUNCIONAIS PREDITOS PARA A PROTEÍNA Hsero_3508.

| Gene | Proteína codificada | Score |
|-------------------|--|-------|
| <i>Hsero_1134</i> | Enzima da superfamília das proteínas cupinas | 0.645 |
| <i>Hsero_3728</i> | Histidina quinase do sistema de dois-componentes | 0.621 |
| <i>Hsero_3507</i> | Reguladora de resposta do sistema de dois-componentes | 0.590 |
| <i>Hsero_1366</i> | Regulador de transcrição da família AraC | 0.552 |
| <i>Hsero_4731</i> | Reguladora de resposta do sistema de dois-componentes | 0.549 |
| <i>Hsero_3130</i> | Histidina quinase sensora | 0.493 |
| <i>Hsero_4396</i> | Histidina quinase sensora | 0.486 |
| <i>Hsero_3750</i> | Reguladora de resposta do sistema de dois-componentes | 0.479 |
| <i>Hsero_3735</i> | Histidina quinase híbrida do sistema de dois-componentes | 0.475 |
| <i>Hsero_4381</i> | Reguladora de transcrição do sistema de dois-componentes | 0.455 |

Score é um indicador de confiança, sendo a probabilidade que a ligação predita entre as proteínas exista em um mesmo mapa metabólico do banco de dados KEGG. Scores acima de 0,9 indicam a mais alta confiança, acima de 0.7 alta confiança e acima de 0.4 média confiança. Score é calculado integrando as probabilidades de interação entre as proteínas obtidas através de diferentes tipos de evidências, como cocorrência, co-expressão, experimental, etc.

TABELA 9 – PARCEIROS FUNCIONAIS PREDITOS PARA A PROTEÍNA Hsero_3507

| Gene | Proteína codificada | Score |
|-------------------|---|-------|
| <i>Hsero_2571</i> | Histidina quinase transdutora de sinal multi sensora | 0.856 |
| <i>Hsero_3729</i> | Proteína hipotética | 0.784 |
| <i>Hsero_3728</i> | Histidina quinase do sistema de dois-componentes | 0.763 |
| <i>Hsero_1234</i> | Histidina quinase híbrida Hpt sensora | 0.748 |
| <i>Hsero_1697</i> | Proteína com domínio regulador de resposta para quimiotaxia | 0.748 |
| <i>Hsero_1703</i> | Proteína CheY de quimiotaxia | 0.739 |
| <i>Hsero_2493</i> | Histidina quinase do sistema de dois-componentes | 0.728 |
| <i>Hsero_4017</i> | Regulador de transcrição da família MarR | 0.701 |
| <i>Hsero_1365</i> | Histidina quinase híbrida do sistema de dois-componentes | 0.699 |
| <i>vsrB</i> | Regulador de transcrição composto do sistema dois-componentes | 0.689 |

A sequência de aminoácidos das proteínas Hsero_3508 e Hsero_3507 foi analisada pelo site pFAM para determinar os domínios presentes nessas proteínas e estabelecer relações com os dados obtidos pelo STRING. A figura 17 mostra os domínios presentes na histidina quinase Hsero_3508. Os domínios HisKA e HATPase_c foram encontrados, e são bastante conservados em todas as histidinas quinases, responsáveis pela atividade de autofosforilação dessa proteína. A His166, presente no domínio HisKA parece ser o sítio de fosforilação nessa proteína. O domínio N-terminal das histidinas quinases é altamente variável e é o responsável

pela diversidade de estímulos que essa família de proteínas consegue sensoriar (GAO e STOCK, 2009). A Hsero_3508 apresenta como domínio sensor o RsbRD_N, que é um domínio presente na proteína RsbRD uma co-antagonista da proteína RsbT, essas proteínas estão envolvidas com o sensoriamento das condições ambientais para a ativação do fator sigma B que regula a resposta geral a estresse em bactérias gram-positivas (PRICE, 2000). *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, não apresentando o fator sigma B, fazendo com que Hsero_3508 não possa fazer parte do mecanismo de controle do sigma B, mas por apresentar esse domínio sensor pode estar relacionado com estímulos de estresse ambiental, condizendo com a possível interação com um regulador de transcrição da família AraC.



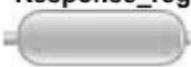
| Família | Envelope | Alinhamento | HMM | Bit score | Valor E da pesquisa |
|-----------|----------|-------------|--------------|-----------|---------------------|
| RsbRD_N | 9..117 | 9..114 | 1..101 (104) | 27.8 | 2.9e-06 |
| HisKA | 156..222 | 156..218 | 1..60 (64) | 38.6 | 7.5e-10 |
| HATPase_c | 266..381 | 267..379 | 2..109 (111) | 76.6 | 1.9e-21 |

FIGURA 17 - DOMÍNIOS DA PROTEÍNA Hsero_3508 OBTIDOS POR ANÁLISE NO PFAM.

A Hsero_3507 é uma proteína pequena com apenas 125 aminoácidos, apresenta apenas um domínio, o Response_reg, também conhecido por domínio REC (FIGURA 18). O sítio de fosforilação nela parece ser a Asp60, há também a presença de uma interface de dimerização, formada pelos aminoácidos Lys100, Pro101 e Cys102, sendo provável que se apresente na forma homodimérica. Reguladoras de respostas com domínio REC solitário são a segunda classe mais abundante de RR, podendo estar envolvidas em vias de fosforetransmissão na qual funcionam como um “trampolim” do grupo fosforil, passando sinal de uma proteína a outra, como é o caso da Spo0F na esporulação do *Bacillus subtilis*, mas, na maioria dos casos, as RR com REC solitário são proteínas semelhantes a CheY que regulam a motilidade celular (VARUGHESE, 2005; GAO e STOCK, 2009; HOCH,

2017). A reguladora de resposta CheY de *E. coli* é a RR de REC solitário melhor caracterizada, ela faz parte da maquinaria de quimiotaxia da célula, na qual a presença de quimioefetores são detectados por proteínas quimiorreceptoras que junto com a proteína acopladora CheW e a histidina quinase CheA formam um cluster de transdução de sinal no pólo da célula. A CheA medeia a fosforilação da CheY que irá agir na proteína FliM, componente do motor flagelar, alterando a rotação flagelar de anti-horário para horário, mudando a direção de deslocamento da célula (SOURJIK e BERG, 2002; PARK *et al.*, 2006). Diversas bactérias desenvolveram mecanismos mais sofisticados e complexos para quimiotaxia, envolvendo uma maior quantidade de proteínas semelhantes a CheY que desempenham funções diferentes no controle da atividade motora (JENAL e GALPERIN, 2009). A análise no STRING não apresentou nenhuma possível interação com proteínas de vias de fosforetransmissão, mas apresentou duas possíveis interações com proteínas de quimiotaxia, sendo possível acreditar que a Hsero_3507 esteja envolvida na motilidade celular por quimiosensoriamento.

Response_reg



| Família | Envelope | Alinhamento | HMM | Bit score | Valor E da pesquisa |
|--------------|----------|-------------|--------------|-----------|---------------------|
| Response_reg | 10..122 | 10..121 | 1..111 (112) | 64.9 | 6.2e-18 |

FIGURA 18 - DOMÍNIO DA PROTEÍNA Hsero_3507 OBTIDO POR ANÁLISE NO PFAM.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESTIRPES MUTANTES 3507Tn E 3508Tn

4.3.1 Perfil crescimento das estirpes mutantes 3507Tn e 3508Tn

A fim de caracterizar fenotipicamente as estirpes mutantes obtidas, o perfil de crescimento das estirpes 3507Tn e 3508Tn foi determinado em diferentes condições e comparado com a estirpe selvagem SMR1, conforme descrito no item 3.8. O crescimento bacteriano foi determinado em condições de alto nitrogênio (20 mmol de NH₄Cl) e de condições limitantes de nitrogênio (4 mmol NH₄Cl), como também em

diferentes condições de aeração, aerobiose e microaerobiose. Na figura 19 são mostrados os perfis de crescimento em aerobiose das estirpes mutantes 3507Tn e 3508Tn e selvagem SMR1 em 4 mmol de NH_4Cl e em 20 mmol NH_4Cl . Na figura 20 estão mostrados os perfis de crescimento em microaerobiose das estirpes em alto e baixo nitrogênio. A partir dos dados dos perfis de crescimento foram determinados os parâmetros cinéticos de crescimento, segundo item 3.8, levando em conta os pontos das primeiras 8 horas na curva em aerobiose e 12 horas na curva em microaerobiose, na qual o crescimento foi exponencial com o tempo de geração para as estirpes nas diferentes condições testadas estando demonstrado na figura 21. Na condição de aerobiose, nas mesmas concentrações de nitrogênio, não teve alteração no crescimento das estirpes, a análise estatística dos tempos de geração através de teste T pelo método de Holm (HOLM, 1979) apontou não haver nenhuma diferença significativa entre as estirpes mutantes quando comparadas a selvagem. Os tempos de geração das estirpes ficaram em aproximadamente 2h, sendo o menor o da estirpe SMR1 a 20 mmol (1,91h) e a maior o da estirpe 3508Tn a 4mmol (2,50h), em condição de aerobiose a presença de genes mutantes para *Hsero_3507* e *Hsero_3508* não parecem prejudicar ou melhorar o crescimento da bactéria. No crescimento em microaerobiose há uma diferença na estirpe mutante 3508Tn para a selvagem SMR1, o mutante tem uma maior dificuldade para crescer nessa condição, mesmo na concentração de 20 mmol de NH_4Cl . Análise por teste T mostrou haver diferença significativa no tempo de geração do mutante 3508Tn para o selvagem SMR1, em alto nitrogênio e em baixo, sendo o valor p de +N de 0,0065 e para -N de 0,0081. O tempo de geração para a estirpe selvagem SMR1 ficou em 5,4 h para 20 mmol de NH_4Cl e 5,3 h para 4 mmol enquanto que para 3508Tn é de 7,8 h para 20 mmol e 7,4 para 4mmol.

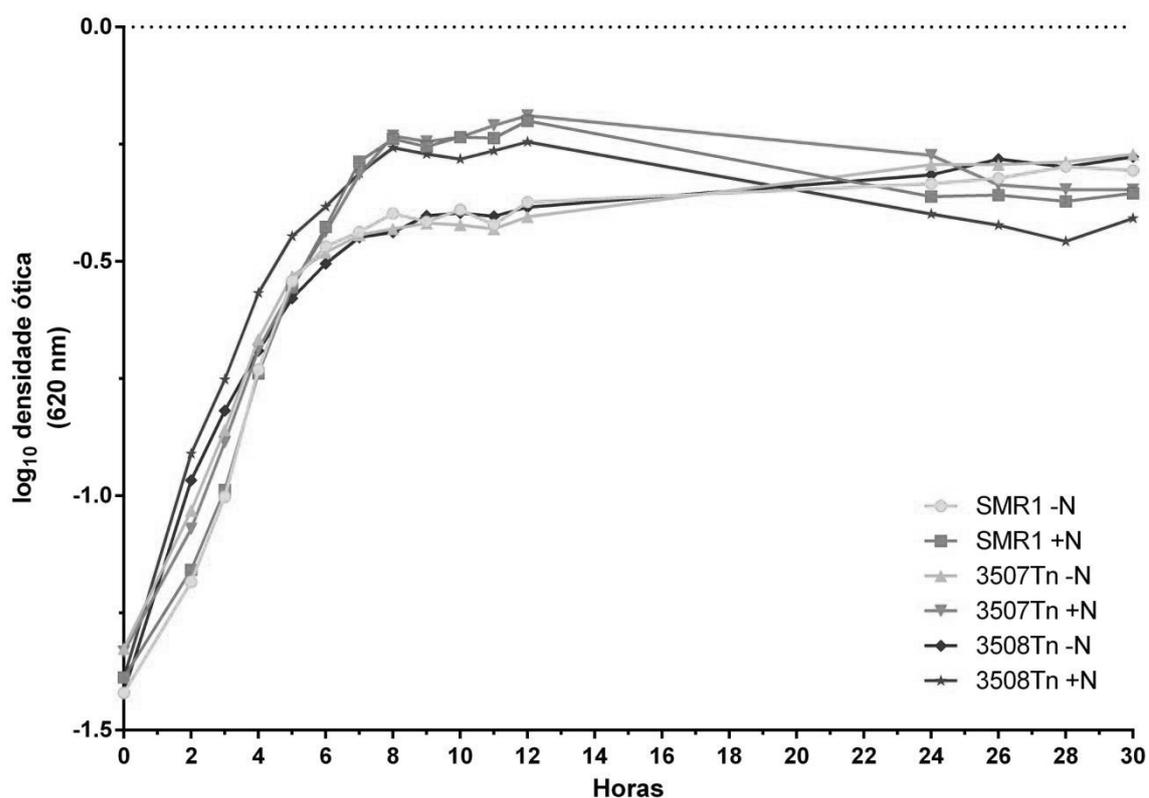


FIGURA 19 - PERFIL DE CRESCIMENTO EM AEROBIOSE DAS ESTIRPES MUTANTES 3507Tn E 3508Tn EM COMPARAÇÃO COM A ESTIRPE SELVAGEM SMR1 VARIANDO A CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO. -N corresponde a condição de baixo nitrogênio (4 mmol de NH₄Cl), +N corresponde a condição de alto nitrogênio no meio (20 mmol NH₄Cl). O crescimento bacteriano foi acompanhado por leitura da densidade ótica em um comprimento de onda de 620 nm, com a D.O₆₂₀ inicial das culturas sendo de aproximadamente 0,05. O gráfico mostra o perfil de crescimento representativo de dois experimentos independentes feitos em duplicata.

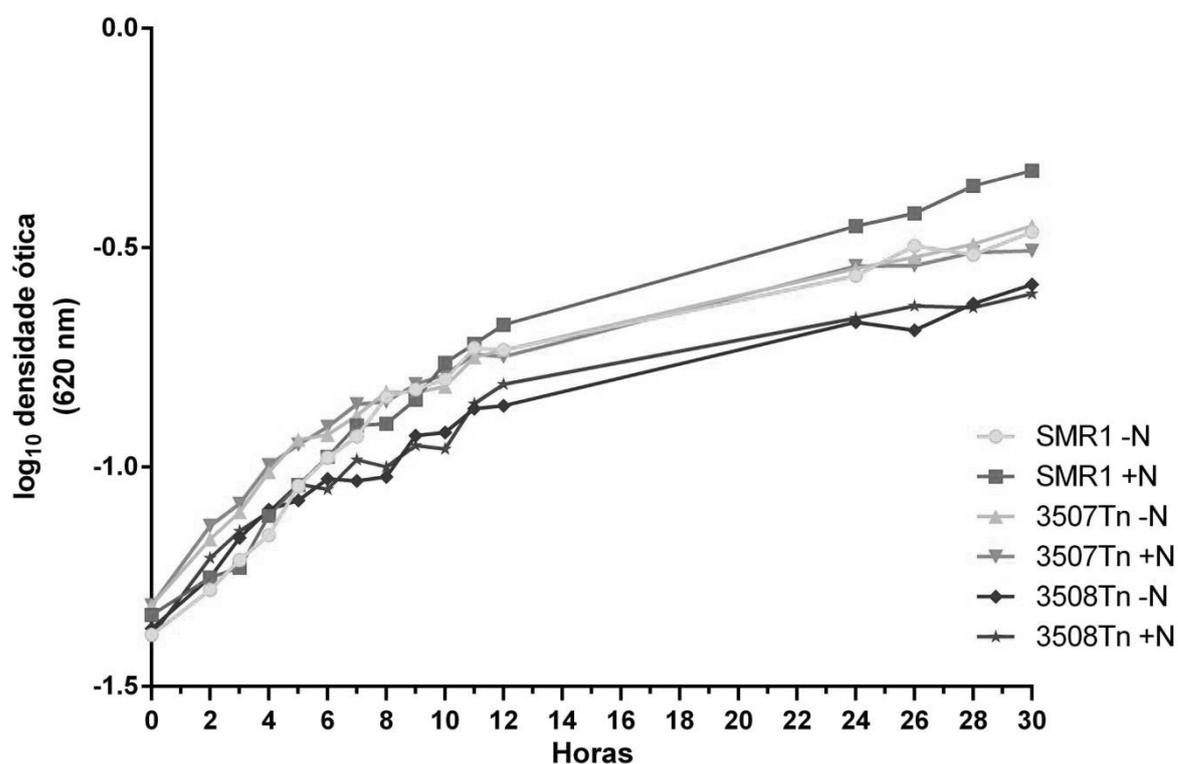


FIGURA 20 - PERFIL DE CRESCIMENTO EM MICROAEROBIOSE DAS ESTIRPES MUTANTES 3507Tn E 3508Tn EM COMPARAÇÃO COM A ESTIRPE SELVAGEM SMR1 VARIANDO A CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO. -N corresponde a condição de baixo nitrogênio (4 mmol de NH₄Cl), +N corresponde a condição de alto nitrogênio no meio (20 mmol NH₄Cl). O crescimento bacteriano foi acompanhado por leitura da densidade ótica em um comprimento de onda de 620nm, com a D.O₆₂₀ inicial das culturas sendo de aproximadamente 0,05. O gráfico mostra o perfil de crescimento representativo de dois experimentos independentes feitos em duplicata.

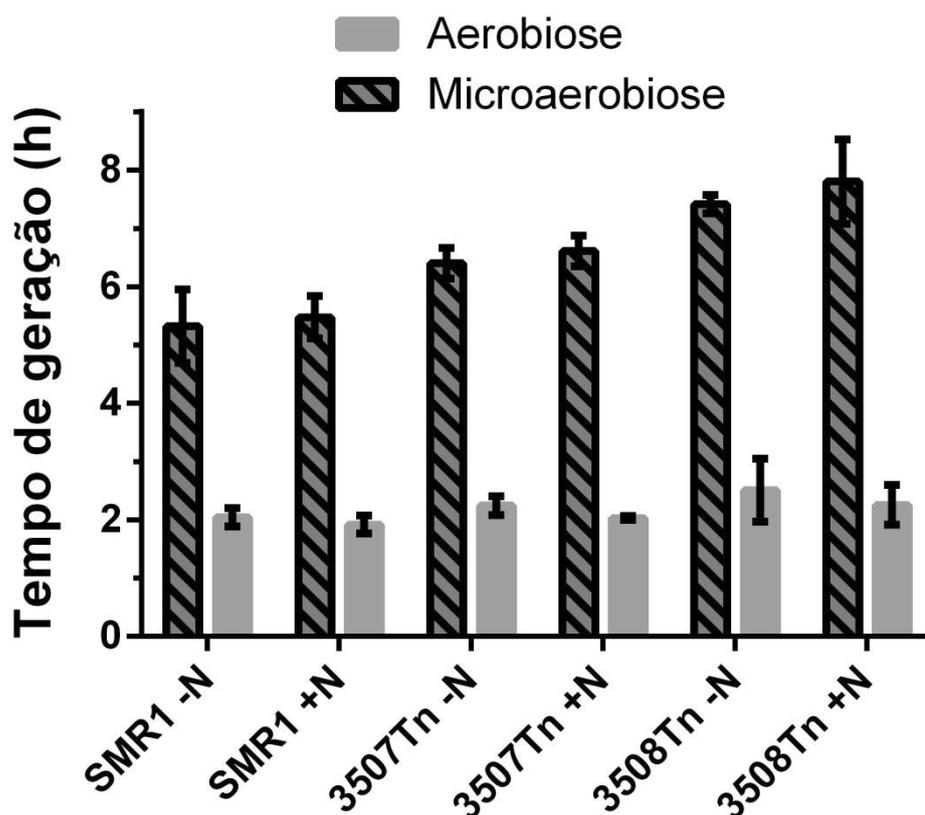


FIGURA 21 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO TEMPO DE GERAÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES E SELVAGEM, DETERMINADO DURANTE A FASE DE CRESCIMENTO EXPONENCIAL ENTRE 1 A 12 H. -N corresponde a condição de baixo nitrogênio (4 mmol de NH_4Cl), +N corresponde a condição de alto nitrogênio no meio (20 mmol NH_4Cl). A partir dos dados tomados na realização da curva de crescimento o tempo de geração foi calculado, conforme consta no item 3.8. Parâmetro calculado a partir de dois ensaios realizados em duplicata, os desvios padrão estão indicados.

No crescimento em aerobiose as estirpes bacterianas atingiram a fase estacionária por volta das 8, 9 horas de crescimento, na microaerobiose, como esperado, o crescimento foi muito mais lento, estando as estirpes ainda na fase log após 12 horas de crescimento. Em uma condição com bastante energia disponibilizada como a em aerobiose, a estirpe mutante 3508Tn apresentou um crescimento semelhante a estirpe selvagem, porém quando se diminuiu a energia acessível à bactéria, na condição de microaerobiose, o crescimento da estirpe mutante 3508Tn foi afetada, tanto com alto nitrogênio quanto em condição limitante de nitrogênio. Sendo assim, é possível hipotetizar que a mutação no gene *Hsero_3508* pode afetar o crescimento da bactéria na condição de microaerobiose.

4.3.2 Ensaio de motilidade das estirpes mutantes 3507Tn e 3508Tn

Para avaliar se o gene *Hsero_3507* faz parte das reguladoras de respostas similares a CheY que participam do movimento celular foram feitos ensaios de motilidade na qual as estirpes selvagem SMR1 e mutante 3507Tn foram inoculadas no fundo de frascos de 10 mL contendo meio NFbHP-Malato semi-sólido, conforme descrito no item 3.10, para determinar a capacidade de formar película na superfície. Foram testadas três condições, alto nível de nitrogênio (20 mmol NH₄Cl), baixo nível de nitrogênio (4 mmol NH₄Cl) e um nível menor ainda de nitrogênio (1 mmol NH₄Cl) para determinar se haveria alguma mudança na estirpe mutante 3507Tn. O comportamento esperado para uma estirpe de *H.seropedicae* com motilidade normal é, após ser inoculada no fundo do frasco, crescer, se espalhar e migrar até a superfície, devido ao aerotropismo característico dessa espécie, através do movimento dos flagelos, sendo a procura por nutrientes a razão desse comportamento. A figura 22 mostra o que foi observado, a estirpe selvagem SMR1 apresentou o comportamento esperado, formando película na superfície em menos de 24 horas, a estirpe mutante 3507Tn não formou película, mesmo após 48 horas de incubação, demonstrando que ela possui a motilidade afetada. Em 24 horas de incubação as células do 3507Tn cresceram apenas ao redor do ponto de inoculação, após 48 horas a porção onde se encontram as bactérias aumentou na condição de 4 e 20 mmol de cloreto de amônio, isso está relacionado com o crescimento bacteriano e não necessariamente com a motilidade e movimento flagelar.

Em *E.coli* após haver um estímulo quimiotático captado por proteínas quimiorreceptoras, a histidina quinase CheA fosforila a reguladora de resposta CheY, a CheY~P apresenta uma grande afinidade pela proteína do motor flagelar FliM e se liga a porção N-terminal dessa proteína, ocasionando uma mudança na conformação protéica do complexo do motor flagelar fazendo com que o movimento flagelar mude de anti-horário para horário, mudando a direção de movimento da célula (BREN E EISENBACH, 1998; SOURJIK e BERG, 2002; PARK *et al.*, 2006). Diversas outras bactérias desenvolveram sistemas mais sofisticados de controle do movimento flagelar, com múltiplos sistemas de quimiosensoriamento apresentando várias proteínas similares a CheY com funções novas (JENAL E GALPERIN, 2009). Um exemplo é a bactéria *Rhodobacter sphaeroides* cujo motor flagelar é controlado por um mecanismo de início-parada que apresenta dois clusters quimiosensores, um

no pólo da célula, outro citoplasmático. Cada cluster apresenta diferentes homólogos de CheA que fosforilam diferentes moléculas de CheY, no cluster citoplasmático CheA3 e CheA4 ativam CheY6, no cluster polar, CheA2 fosforila CheY3 e CheY4, as três CheY são capazes de se ligar a FliM porém nenhuma consegue mediar o movimento flagelar sozinha. CheY6 age parando o motor flagelar, baseado nesse sistema, acredita-se que algumas CheY competem por sítios de ligação na FliM com CheY que conseguem parar a rotação dos flagelos (PORTER *et al.* 2006; PORTER *et al.*, 2008). No genoma de *H. seropedicae* SMR1 há 22 reguladoras de respostas similares a CheY (PEDROSA *et al.*, 2011). Nem todas essas CheYs devem estar relacionadas a quimiotaxia e motilidade, mas é provável que *H. seropedicae* apresente um sistema de controle do motor flagelar tão complexo quanto o de *Rhodobacter sphaeroides*, com o gene *Hsero_3507* apresentando um papel importante nele.

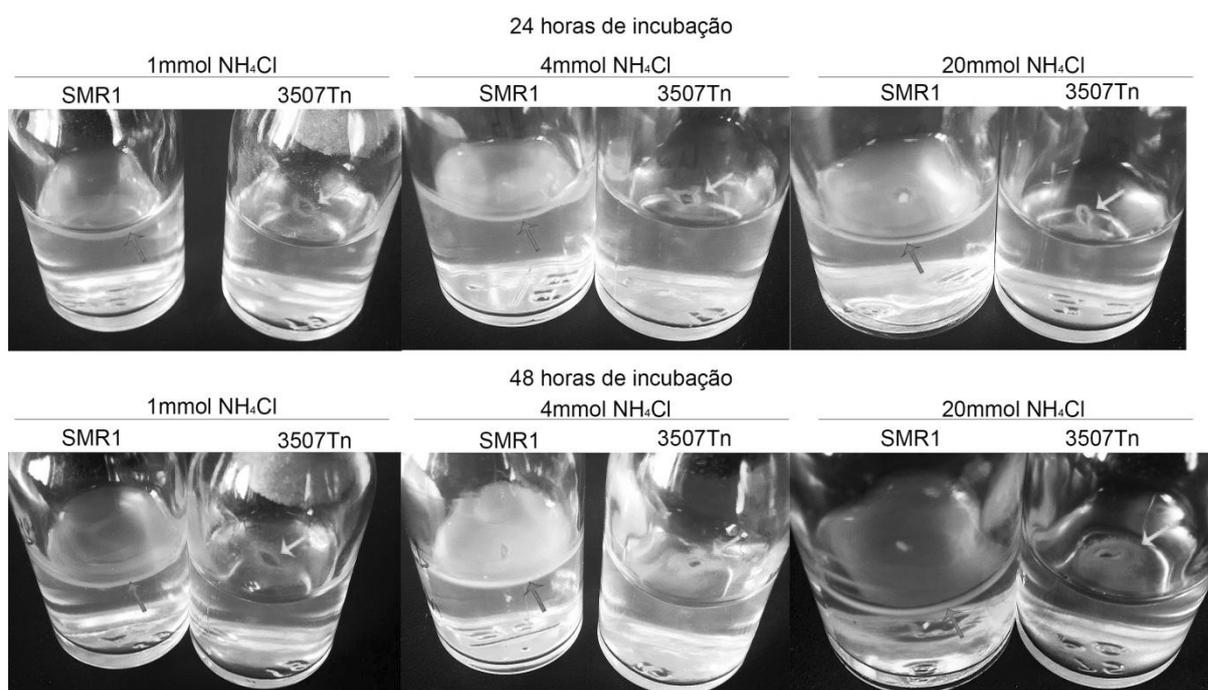


FIGURA 22 – MOTILIDADE DAS ESTIRPES SELVAGEM SMR1 E MUTANTE 3507Tn EM FRASCO DE 10mL CONTENDO MEIO NFbHP-MALATO COM 0,25% ÁGAR EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIO. 100 μ L das estirpes de *H.seropedicae* em D.O_{600nm} 0,6 foram inoculados no fundo do frasco. A cultura foi incubada a 30°C e a formação de película na superfície do meio foi monitorada por 48 horas. Setas vermelhas indicam a película formada pela estirpe selvagem SMR1, setas verdes indicam onde a estirpe mutante 3507Tn ficou na superfície do meio. Foto representativa de três experimentos realizados em duplicata, não houve variação de comportamento entre amostras da mesma estirpe.

A dificuldade na motilidade do mutante 3507Tn em condição +N indica que o *Hsero_3507* é necessário nessa condição.

A estirpe mutante 3508Tn formou película do mesmo modo que a estirpe selvagem SMR1, para avaliar melhor a motilidade das estirpes mutantes realizou-se um ensaio de motilidade em placa, descrito no item 3.10, para ter uma melhor caracterização e analisar se a estirpe mutante 3507Tn continuaria a ser imóvel e se a estirpe mutante 3508Tn apresentaria o mesmo fenótipo observado no perfil de crescimento no qual possui o mesmo comportamento para -N e +N . Foram testadas três condições, alto nível de nitrogênio (20 mmol NH₄Cl), baixo nível de nitrogênio (4 mmol NH₄Cl) e um nível menor ainda de nitrogênio (1 mmol NH₄Cl) para analisar quais diferenças as bactérias apresentariam. Em uma placa de semi-sólido as bactérias inoculadas no meio dela tendem a crescer, consumir os nutrientes ali presentes e então se movimentar para fora do ponto de inoculação à procura de mais nutrientes, formando um halo de motilidade bem evidente, esse movimento é devido a capacidade da bactéria de sensoriar o nutriente no meio, a quimiotaxia (CROZE *et al.*, 2011). O movimento flagelar é um processo de grande custo energético, sendo só utilizado quando a bactéria necessita, assim, o comportamento normal, esperado da estirpe selvagem SMR1, é em placa com 20 mmol NH₄Cl o halo de motilidade ser menor, por haver mais nutriente disponível onde a bactéria se encontra, não precisando gastar energia movimentando se a procura de mais nutriente. Em placa com 1 mmol de NH₄Cl o halo de motilidade é maior devido a necessidade da bactéria de nadar a procura de mais nutrientes, que estão em menor quantidade. Após 24 h de inoculação das placas a 30°C elas foram retiradas da estufa e os halos de crescimento foram medidos. A figura 23 exemplifica os resultados que foram obtidos, a figura 24 mostra a representação gráfica de todos os dados, com as barras representando a tamanho médio dos halos de crescimento para cada estirpe em determinada condição, com o desvio padrão sendo indicado.

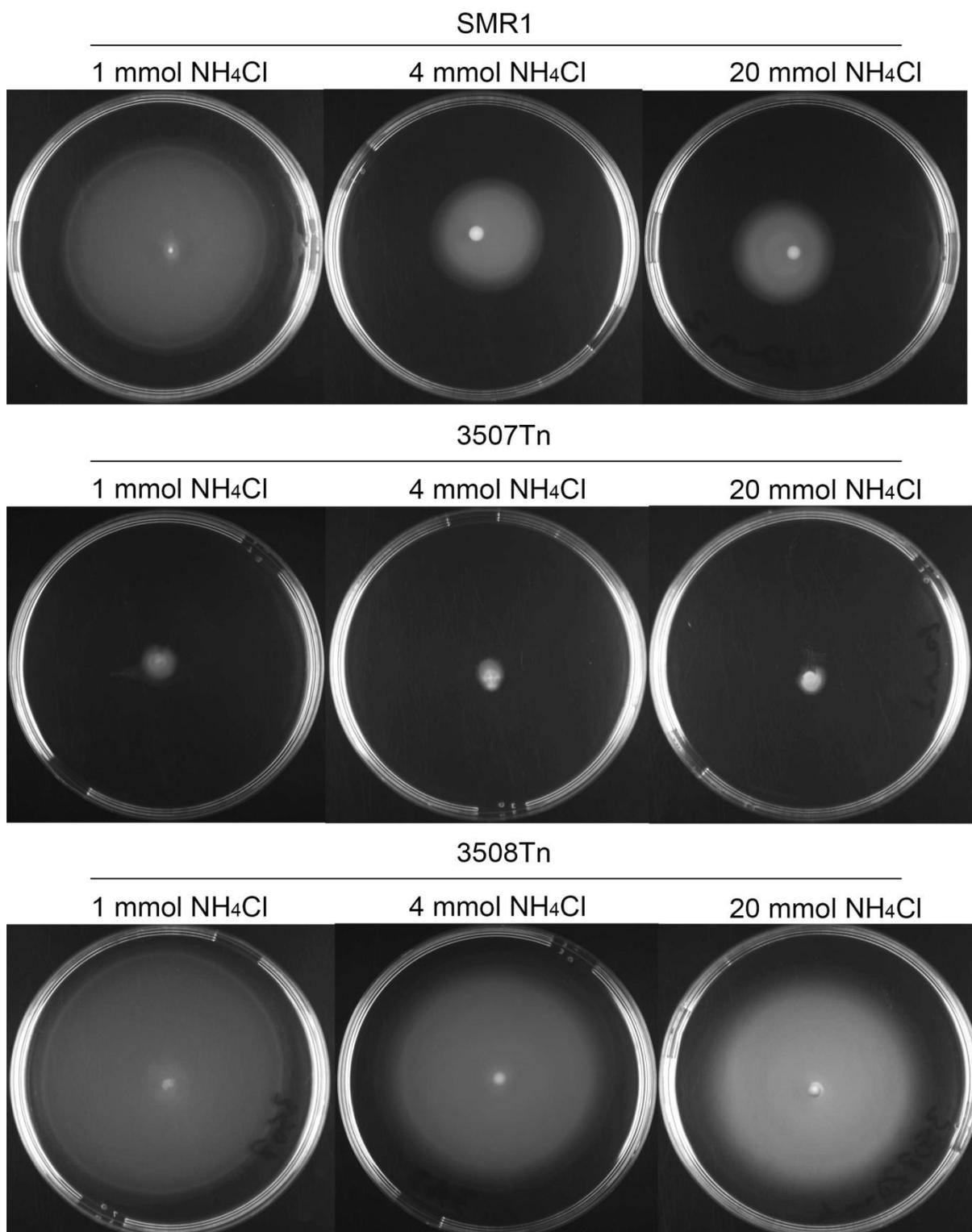


FIGURA 23 – HALO DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES SELVAGEM SMR1 E MUTANTES 3507Tn E 3508Tn EM PLACAS CONTENDO MEIO NFb-MALATO COM 0,16% DE ÁGAR EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIO. Cerca de 10^8 células foram inoculadas no meio da placa que foi incubada por 24 h a 30°C e então medidos os halos de crescimentos para as estirpes. Foto representativa de três experimentos independentes realizados em duplicata.

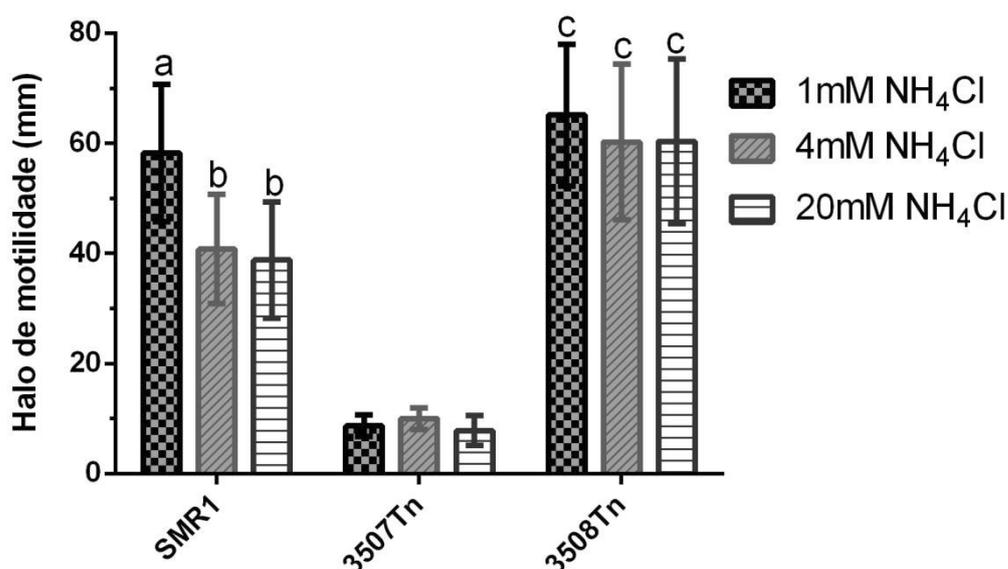


FIGURA 24 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO TAMANHO DOS HALOS DE CRESCIMENTO PARA AS ESTIRPES SELVAGEM SMR1 E MUTANTES 3507Tn E 3508Tn APÓS 24 H DE INCUBAÇÃO EM MEIO NFb MALATO COM 0,16% DE ÁGAR. Letras diferentes indicam diferenças significativas com $p < 0,05$ (teste T não pareado com correção de Welsh) na comparação entre diferentes condições de uma mesma estirpe. Dados obtidos de três experimentos independentes realizados em duplicata, os desvios padrão estão indicados.

A estirpe mutante 3507Tn apresentou o mesmo fenótipo obtido pelo ensaio de motilidade em frascos, mostrando que apresenta mesmo uma motilidade diminuída. A estirpe mutante 3508Tn apresentou um fenótipo diferente do que a estirpe selvagem SMR1, não tendo diferença significativa no tamanho do halo de crescimento de 1, 4 e 20 mmol de NH₄Cl. Entre halos da mesma estirpe em diferentes concentrações foi realizado um teste T não pareado com correção de Welsh, que leva em conta desvio padrão diferente entre amostras, para determinar se há diferença estatística significativa entre as concentrações de amônio. Para a estirpe selvagem SMR1 houve diferença significativa entre a concentração de 1 e 20 mmol de NH₄Cl (valor p : 0,016) e entre 1 e 4 mmol de NH₄Cl (valor p : 0,022), não houve diferença significativa entre 4 e 20 mmol de NH₄Cl (valor p : 0,765), comprovando que em 1 mmol de NH₄Cl a estirpe selvagem tende a ter uma motilidade maior e que em 4 e 20 mmol NH₄Cl a motilidade é menor, por ter nutriente o suficiente no meio e ela não precisar gastar energia a procura, o sensoriamento dos íons amônios nessa estirpe está funcionando corretamente, como esperado. Para a estirpe mutante 3508Tn não houve diferença significativa

entre as concentrações de amônio, valor p para comparação entre 1 e 4, 1 e 20 e 4 e 20 mmol de NH_4Cl sendo, respectivamente, de 0,496; 0,518 e 0,9865.

Para uma melhor análise também se comparou a estirpe selvagem SMR1 com a mutante 3508Tn em uma mesma condição (1, 4 ou 20 mmol de NH_4Cl), através do mesmo teste T não pareado com correção de Welsh. Na condição de 1 mmol de NH_4Cl não foi observada diferença significativa entre a estirpe selvagem SMR1 e a mutante 3508Tn, com o valor p ficando em 0,3313, mas para a condição de 4 e 20 mmol de NH_4Cl houve diferenças significativas, com o valor p sendo, respectivamente, de 0,014 e 0,0115. Isso indica que a estirpe mutante 3508Tn apresenta uma alta motilidade, mesmo em um meio com grande concentração de amônio, o que leva a crer que a falta da histidina quinase Hsero_3508 leva a uma deficiência no sensoriamento dos íons amônio. O que nos permite levantar a hipótese de que devido a essa deficiência, a bactéria se encontra com um movimento aumentado, gastando mais energia mesmo quando não precisaria, no caso de alto nitrogênio no meio. Isso poderia servir como explicação para o resultado obtido no perfil de crescimento, por não conseguir sensoriar direito o amônio do meio, a estirpe mutante 3508Tn gastaria mais energia do que o normal se movimentando, o que resultaria em menos energia disponível para o crescimento.

O mutante 3507Tn e 3508Tn apresentaram fenótipos contrastantes quanto a motilidade mas isso não permite dizer que não formem um par do sistema de dois-componentes e que não interajam, podendo existir outra histidina quinase ou reguladora de resposta que também faça parte desse sistema. Já foi reportada a existência de relacionamento de várias HK com uma RR, ou uma HK com várias RR ou várias HK com várias RR. Como exemplo temos as CheA e CheY de *Rhodobacter sphaeroides* já mencionadas, como também o sistema de dois-componentes relacionado ao nitrato/nitrito na qual duas HK NarQ e NarX regulam a fosforilação tanto da RR NarL e a NarP (GAO E STOCK, 2009).

4.3.3 Ensaio de nitrogenase da estirpe mutante 3508Tn

Ensaio de nitrogenase foram realizados, conforme item 3.9, para analisar se o gene *Hsero_3508* afeta de alguma forma a fixação biológica de nitrogênio. A atividade da estirpe 3508Tn foi determinada e comparada com a da estirpe selvagem SMR1, ela é indicada em nmol de etileno/min.mg de proteína. Realizou-se

dois ensaios, no primeiro foi medida a atividade em dois tempos, 21 e 24 horas após a incubação (FIGURA 25), no segundo comparou a atividade de nitrogenase em uma condição de ativação (0,5 mmol de glutamato) e uma de repressão (20 mmol de NH_4Cl) (FIGURA 26). Os resultados obtidos mostram que a ausência do gene *Hsero_3508* não acarreta em diminuição na fixação do nitrogênio pela bactéria quando comparada com a estirpe selvagem SMR1 como também não afeta a repressão do complexo da nitrogenase em uma condição de alto nitrogênio.

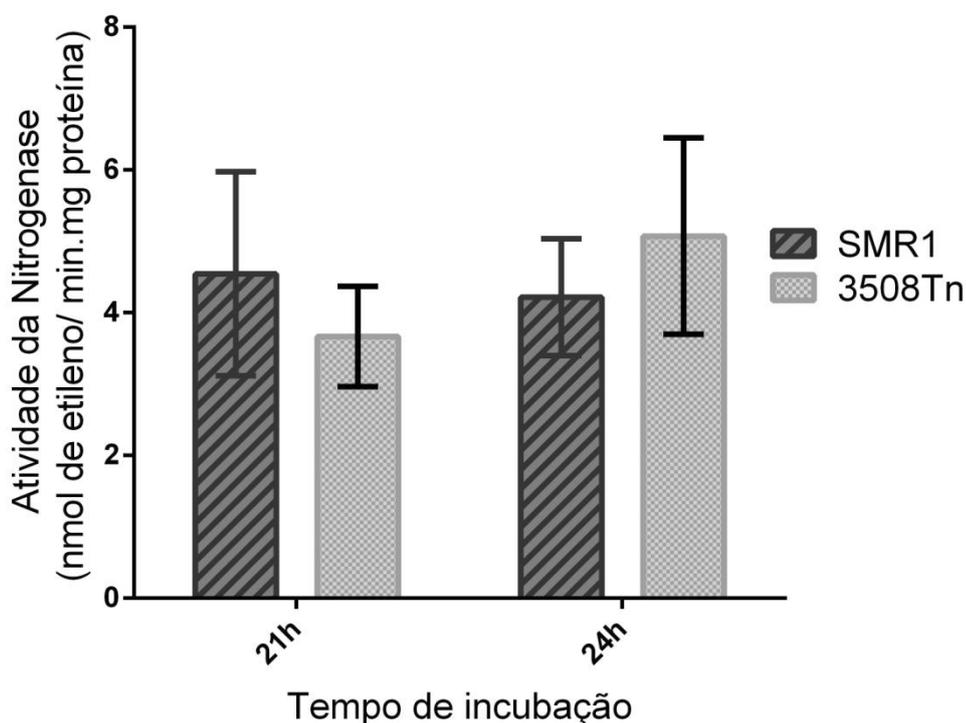


FIGURA 25 - ATIVIDADE DE NITROGENASE DA ESTIRPE SELVAGEM SMR1 E DA MUTANTE 3508TN EM 21 E 24H DE INCUBAÇÃO. Ensaio realizados em meio semi-sólido NFbHP-Malato suplementado com 0,5 mmol de glutamato, a atividade foi determinada após 21 ou 24 h de incubação, estando a película já formada. As barras indicam o desvio padrão de 2 experimentos independentes realizados em triplicata.

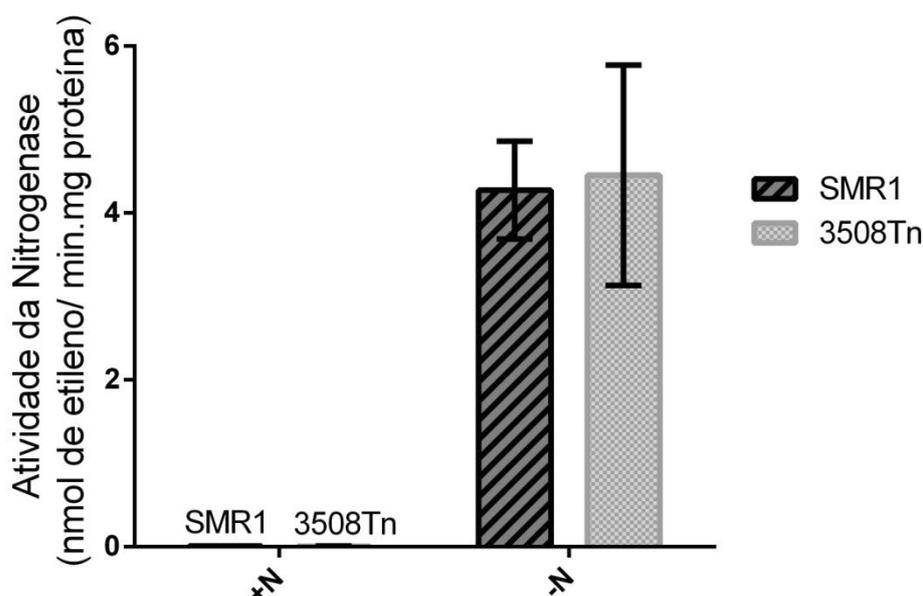


FIGURA 26 - ATIVIDADE DE NITROGENASE DA ESTIRPE SELVAGEM SMR1 E DA MUTANTE 3508TN EM ALTO E BAIXO NITROGÊNIO. Ensaio realizados em meio semi-sólido NFbHP-Malato suplementado com 0,5 mmol de glutamato (-N) ou 20 mmol de NH_4Cl (+N), a atividade foi determinada após 24 h de incubação, estando a película já formada. As barras indicam o desvio padrão de 2 experimentos independentes realizados em triplicata.

O gene *Hsero_3508* parece não estar envolvido na fixação de nitrogênio, através dos ensaios de motilidade pode-se concluir que ele está envolvido no sensoriamento de íons amônio porém não relacionado ao sistema Ntr que irá controlar a ativação e repressão da atividade da nitrogenase na presença desses íons.

Não foi possível determinar a atividade da nitrogenase em meio semi-sólido para a estirpe 3507Tn, por essa ter a mobilidade afetada, sendo incapaz de formar película, o que é indispensável para ter a fixação de nitrogênio em meio semi-sólido.

4.4 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pET3507P E pET3508P

Os genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* foram amplificados utilizando os primers *Hsero_3507P-NdeI/Hsero_3507P-BamHI* e *Hsero_3508P-NdeI/Hsero_3508P-HindIII*, respectivamente. Como DNA molde utilizou DNA genômico da estirpe SMR1 de *H. seropedicae*. Para o gene *Hsero_3507* a PCR foi feita utilizando a GoTaq® Flexi DNA polimerase (PROMEGA), o amplificado foi ligado diretamente no vetor

pGEMT®-T Easy vector, transformado em *E. coli* TOP10 e plaqueado em meio LA com ampicilina e Xgal. Os clones brancos foram inoculados em LB para purificação plasmidial. Os plasmídeos resultantes foram digeridos com EcoRI para liberar o inserto do vetor e confirmar os clones com o gene *Hsero_3507*, o plasmídeo resultante foi denominado pGEMT3507NdeBam, ele difere do pGEMT3507 por ter a sequência completa do *Hsero_3507*, flanqueada por sítios de restrição para NdeI e BamHI. Foi feito o sequenciamento do pGEMT3507NdeBam e alinhamento da sequência com o gene selvagem *Hsero_3507* através do programa MEGA 7.0 para confirmar a ausência de mutação no gene clonado que poderia ser causada por um erro na amplificação. O inserto então foi retirado do vetor pGEM®-T Easy vector com as enzimas de restrição NdeI e BamHI e ligado ao vetor pET28a linearizado com as mesmas enzimas. O produto da ligação foi transformado em *E. coli* TOP10 e plaqueado em LA contendo canamicina. Os subclones resultantes foram inoculados em LB para extração dos plasmídeos. Os plasmídeos obtidos foram digeridos com XbaI e HindIII para seleção dos clones contendo o inserto, o padrão de bandas obtido foi: cerca de 5100 pb do pet28a e cerca de 500 pb do *Hsero_3507* (clones 3, 8 e 11) (FIGURA 27). O clone obtido com o padrão esperado foi denominado pET3507P.

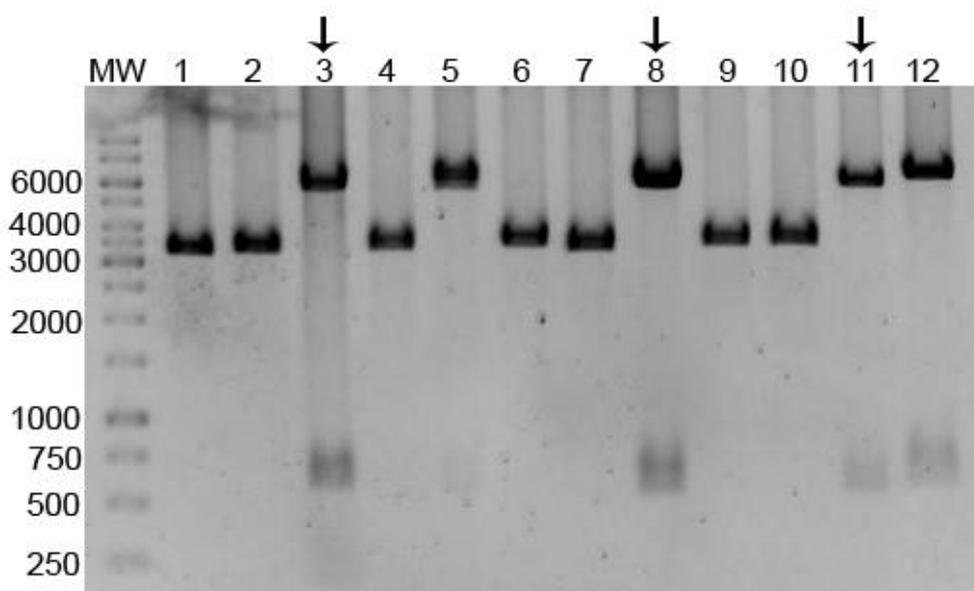


FIGURA 27 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE RESTRIÇÃO COM XBAI/HINDIII DOS SUBCLONES PROVENIENTES DE LIGAÇÃO DO INSERTO *Hsero_3507* COM O VETOR pET28A. Eletroforese realizada em gel de agarose 1% em TAE 1X. MW: padrão de massa molecular (pb). Os subclones das linhas 3, 8 e 11 (setas pretas) apresentaram as bandas esperadas, foi selecionado o subclone 3 e denominado pET3507P.

Para amplificação do gene *Hsero_3508* foi utilizada a Pfu X7 DNA polimerase (NØRHOLM, 2010), essa enzima tem uma taxa de erro muito menor do que a GoTaq® Flexi DNA polimerase, diminuindo as chances de que a amplificação do gene longo do *Hsero_3508* (1206 pb) tenha alguma mutação. O produto da PCR foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e HindIII, ligado ao vetor pET28a linearizado com as mesmas enzimas, transformado em *E. coli* TOP10 e plaqueado em meio LA contendo canamicina. Os clones resultantes foram inoculados em LB para purificação plasmidial. Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas XbaI e HindIII a fim de selecionar os clones com o gene *Hsero_3508*, que apresentariam duas bandas, uma de cerca de 5100 pb do pET28a e outra de cerca de 1300 pb do gene de interesse (FIGURA 28). O clone com o padrão esperado foi selecionado e após a confirmação de que não apresentava mutações na sequência, por sequenciamento e alinhamento no MEGA, foi denominado pET3508P.

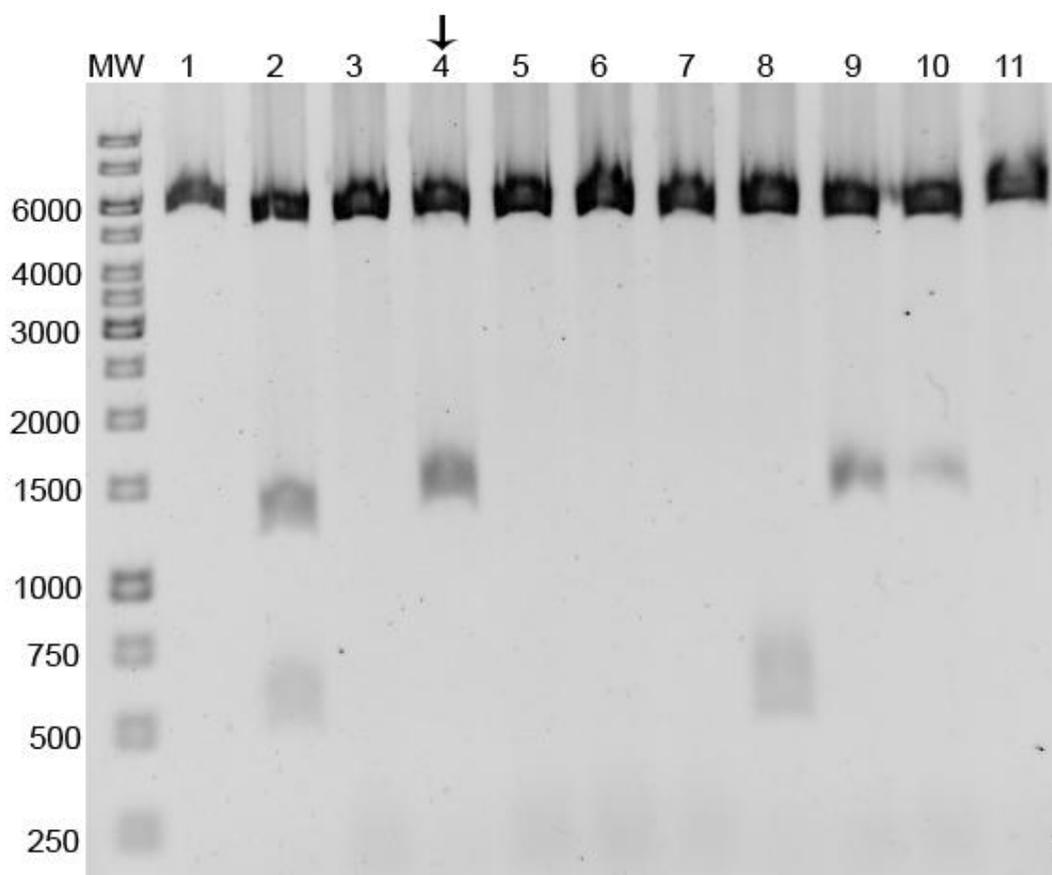


FIGURA 28 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE RESTRIÇÃO COM XBAI/HINDIII DOS CLONES PROVENIENTES DE LIGAÇÃO DO AMPLIFICADO *Hsero_3508* COM O VETOR pET28A. Eletroforese realizada em gel de agarose 1% em TAE 1X. MW: padrão de massa molecular (pb). O clone da linha 4 (seta preta) apresentou as bandas esperadas, foi selecionado e denominado pET3508P.

4.5 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS Hsero_3507 e Hsero_3508

Antes de realizar a purificação das duas proteínas de interesse foi feito um ensaio de expressão para determinar se as proteínas estavam sendo expressas e se eram solúveis para a purificação. Para isso, os plasmídeos pET3507P e pET3508P foram transformados em *E. coli* BL21 (λ DE3) e plaqueados em LA contendo canamicina. Um clone foi coletado, inoculado em LB e crescido *overnight* em *shaker* a 37°C, 120 rpm, no dia seguinte foi feito um inóculo a partir desse inicial. O inóculo final foi crescido até chegar na D.O_{600nm} de 0,6, e então se adicionou IPTG em uma concentração final de 0,5 mM, para induzir as células por 3 horas a 37°C em rotação de 120 rpm. 1 mililitro de cada cultura foi coletado, centrifugado e os pellets ressuspensos em tampão de sonicação (HEPES 100 mM pH 8,0, 100 mM de KCl) e sonicados. Após sonicação houve mais uma etapa de centrifugação para separar a fração solúvel da insolúvel. Amostras do extrato bruto, da fração solúvel e da fração insolúvel foram coletadas para cada cultura e 5 μ L de cada foram analisados por SDS-PAGE (FIGURA 29). Com a cauda de histidina a proteína Hsero_3507 apresenta 14,4 kDa e a Hsero_3508 apresenta 45 kDa, como se pode ver na figura 29, ambas as proteínas foram expressas e encontram-se tanto na fração solúvel quanto na insolúvel, apesar de que boa parte da Hsero_3507 encontra-se insolúvel. A purificação das duas proteínas pode ser feita.

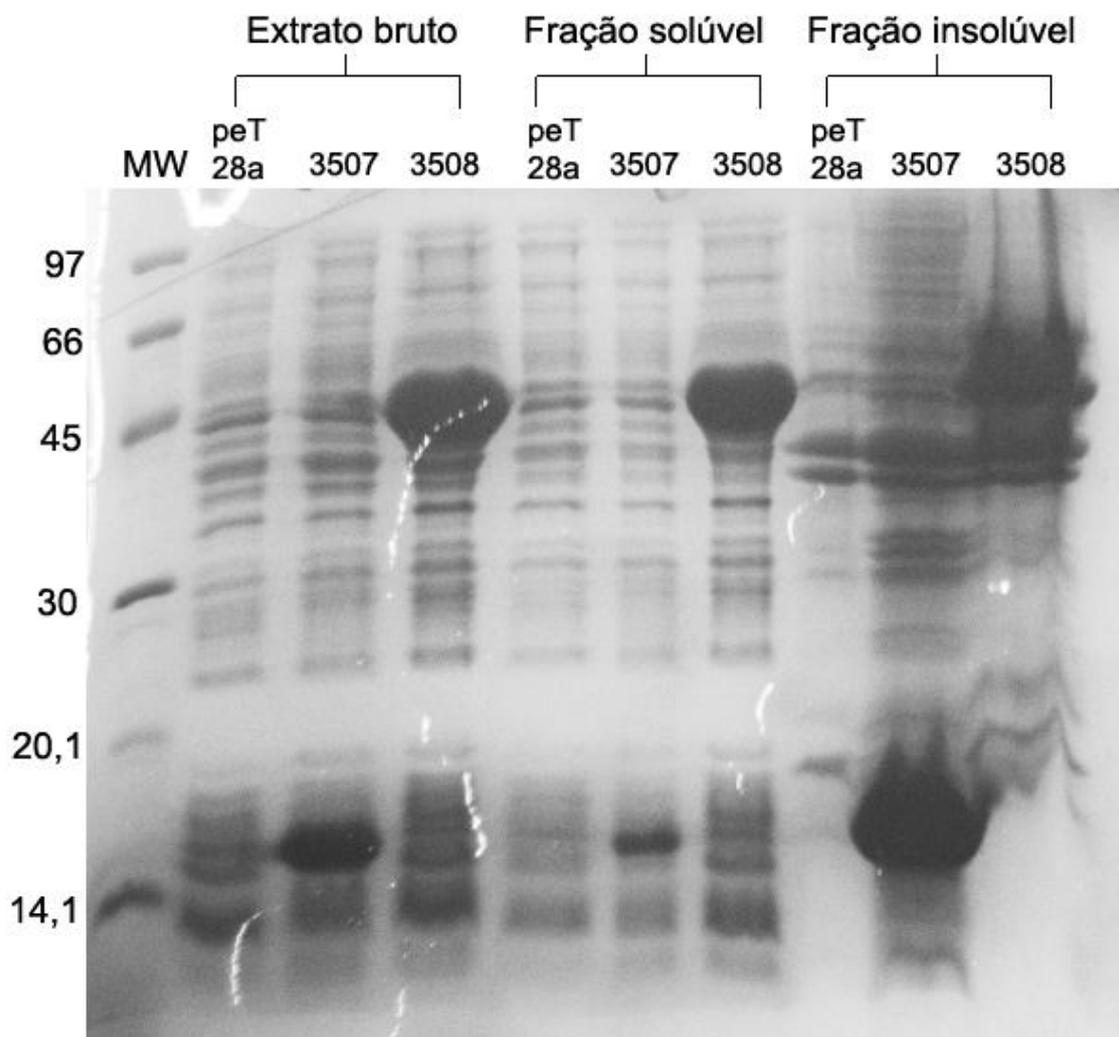


FIGURA 29 - ELETROFORESE DE EXTRATO BRUTO, FRAÇÃO SOLÚVEL E INSOLÚVEL DE *E. coli* BL21 (λ DE3) EXPRESSANDO PLASMÍDEOS pET28A OU pET3507P OU pET3508P EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 15% DESNATURANTE. MW: marcador de massa molecular (kDa). A coloração das proteínas foi feita com Coomassie blue.

4.5.1 Purificação da Hsero_3507

A purificação da Hsero_3507 foi feita conforme item 3.13.1. Foi utilizada coluna Hitrap Chelating de 1 mL carregada com íons Ni^{+2} para interagir com a cauda de histidina presente na proteína. A figura 30 mostra o gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE das amostras obtidas pela purificação.

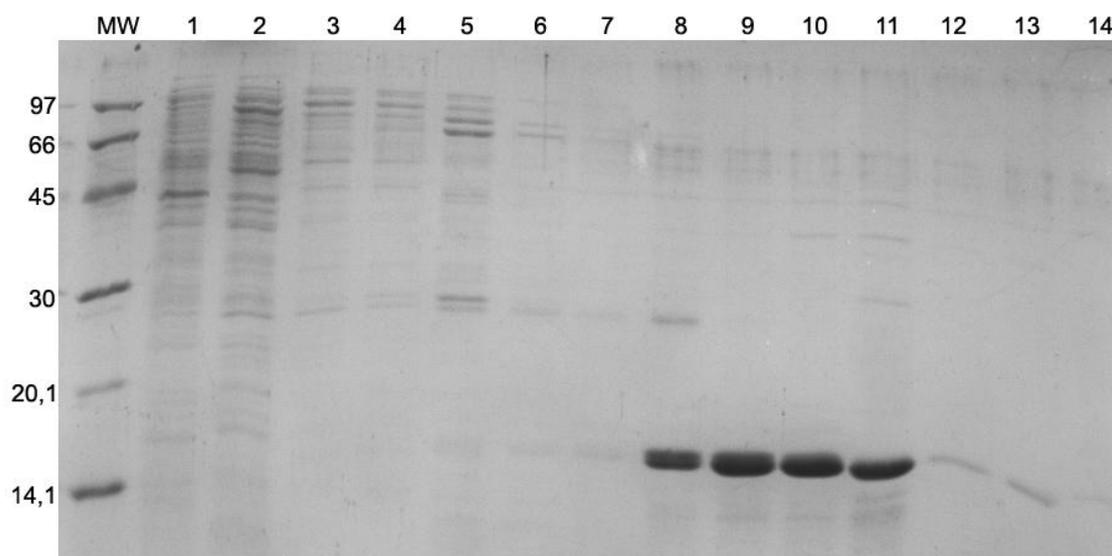


FIGURA 30 - ELETROFORESE DAS AMOSTRAS OBTIDAS DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hsero_3507 EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 15%. MW: marcador de massa molecular (kDa). De 1 a 14 são as amostras coletadas na purificação, correspondente ao gradiente descontínuo de imidazol que foi utilizado. A Hsero_3507 começou a ser eluída em 100 mM de imidazol, saindo em grande parte na concentração de 300 mM. A coloração das proteínas foi feita com Coomassie blue.

As amostras 9, 10 e 11 foram unidas e dialisadas com tampão de diálise (HEPES 100 mM pH 8,0, 100 mM KCl e glicerol 10%). Após diálise, a amostra foi centrifugada para retirar as proteínas que precipitaram, dividida em alíquotas de 500 μ L e armazenadas em -20°C . A concentração final foi quantificada por método de Bradford, sendo de 0,81 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (por volta de 57 μM de monômero de Hsero_3507).

4.5.2 Purificação da Hsero_3508

A purificação da Hsero_3508 foi feita conforme item 3.13.1. Foi utilizada coluna Hitrap Chelating de 1 mL carregada com íons Ni^{+2} . A figura 31 mostra o gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE das amostras obtidas por essa purificação.

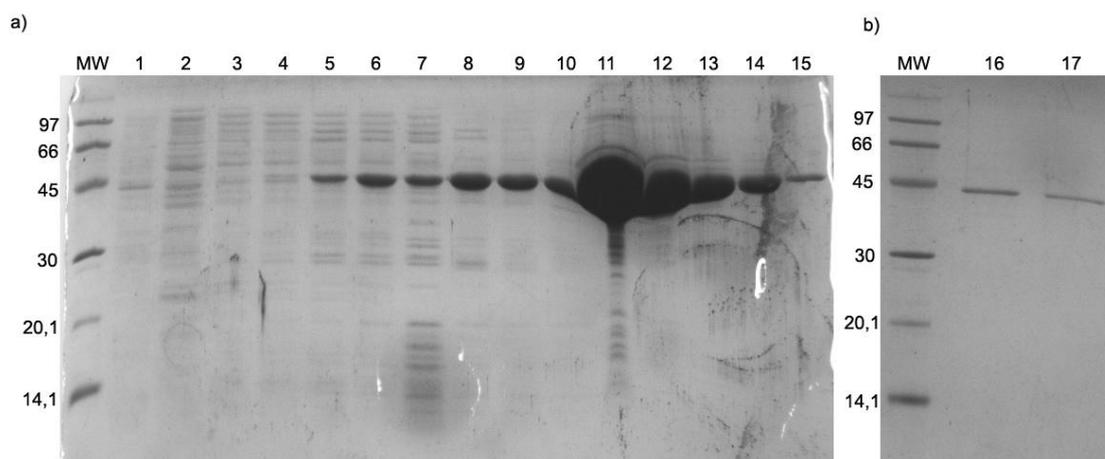


FIGURA 31 - ELETROFORESE DAS AMOSTRAS OBTIDAS DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hsero_3508 EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 15%. MW: marcador de massa molecular (kDa). Foi necessário dois géis para analisar todas as amostras, os dois (a e b) são de 15%. De 1 a 17 são as amostras coletadas na purificação, correspondente ao gradiente descontínuo de imidazol que foi utilizado. A Hsero_3508 começou a ser eluída em 50 mM de imidazol, com o pico de eluição ocorrendo a 300 mM de imidazol. A coloração das proteínas foi feita com Coomassie blue.

Escolheu-se as amostras 12, 13 e 14 da purificação devido ao tamanho das bandas e a menor quantidade de contaminantes, elas foram juntadas e dialisadas em tampão contendo HEPES 100 mM pH 8,0, 100 mM KCl e glicerol 10%. Após diálise, a amostra foi centrifugada para retirar as proteínas precipitadas, dividida em alíquotas de 500 μ L e armazenada a -20°C . A concentração final foi de 2,96 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (por volta de 66 μM de monômero de Hsero_3508).

4.6 DETECÇÃO DE INTERAÇÃO ENTRE Hsero_3507 E Hsero_3508 ATRAVÉS DE LIGAÇÃO CRUZADA

Para tentar descobrir se a Hsero_3507 é a proteína de resposta reguladora cognata da histidina quinase Hsero_3508 foi feito um ensaio de ligação cruzada utilizando formaldeído, conforme descrito no item 3.13.4. A figura 32 mostra os resultados na qual se foram analisados diferentes tempos de incubação.

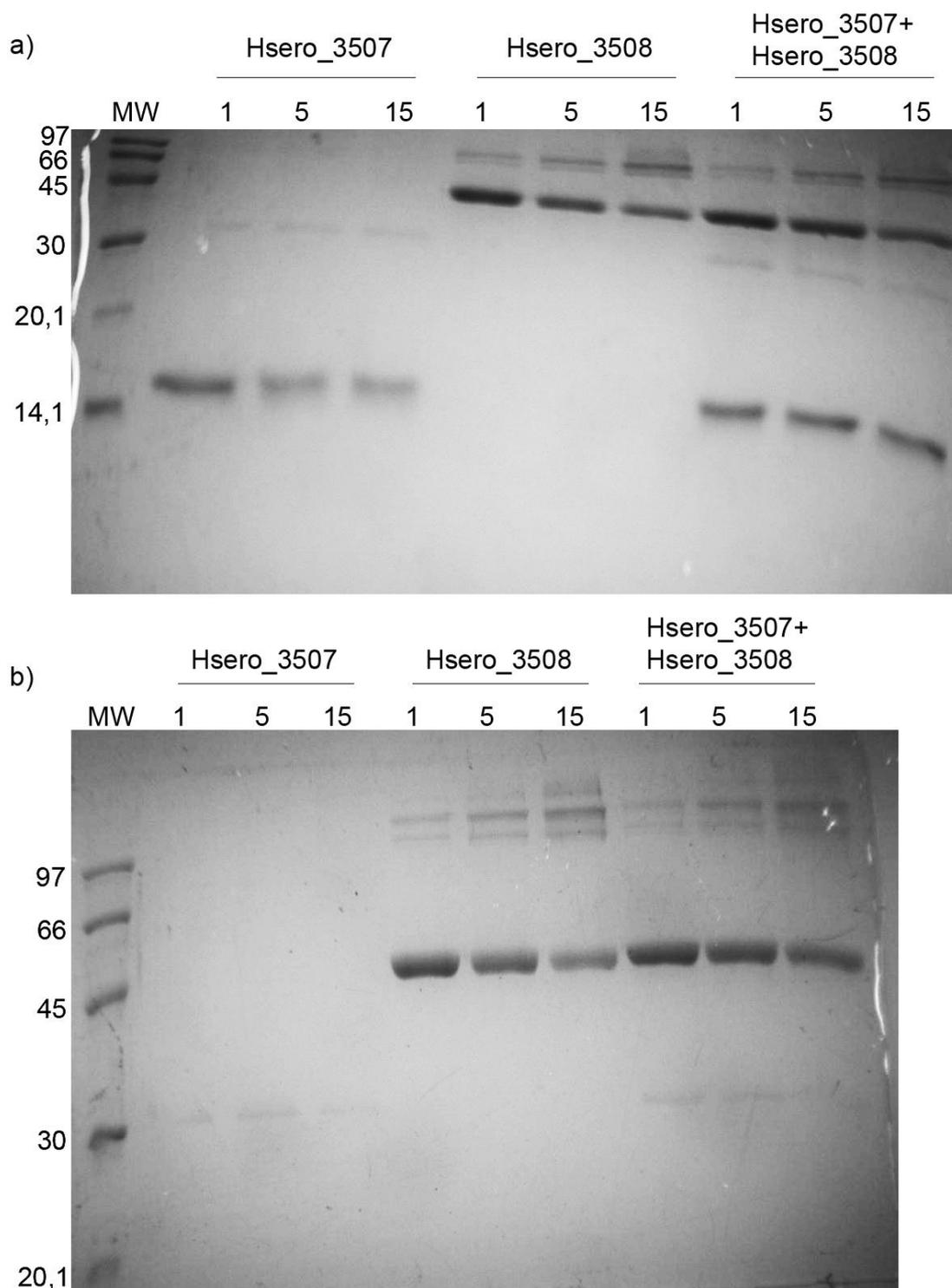


FIGURA 32 - ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE LIGAÇÃO CRUZADA ENTRE Hsero_3507 E Hsero_3508 EM GEIS DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 15% E 10%. MW: marcador de massa molecular (kDa). Correram-se dois géis simultaneamente em diferentes concentrações de poliácridamida com amostras provenientes da mesma reação para se analisar melhor as bandas com maior massa molecular, a) Gel com 15% de poliácridamida, b) Gel com 10% de poliácridamida. Utilizou-se 20 μ M de cada monômero das proteínas, a reação foi incubada a 30°C por 1, 5 ou 15 minutos. A coloração das proteínas foi feita com Coomassie blue.

Nos sistemas contendo apenas a proteína Hsero_3507 notam-se duas bandas, uma um pouco acima de 14 kDa que corresponde ao monômero da proteína e outra de cerca de 30 kDa que parece ser o dímero da proteína, o que era esperado por a Hsero_3507 apresentar uma interface de dimerização em sua sequência. Nos sistemas com apenas a proteína Hsero_3508 há a presença da banda do monômero da proteína, 45 kDa, e também a presença de bandas de alto peso molecular >97 kDa, correspondente provavelmente a oligômeros da proteína, nenhuma banda de 90 kDa foi observada, que seria o dímero da Hsero_3508, o contrário do que era esperado, pelas histidina quinases serem proteínas homodímeras (STOCK, 2001). Os sistemas contendo ambas as proteínas não apresentaram nenhuma banda exclusiva, não permitindo comprovar a interação entre a Hsero_3507 e Hsero_3508. Histidinas quinases bacterianas precisam de um cátion divalente para atividade enzimática, em bactérias Mg^{+2} é o cátion mais comum, porém Ca^{+2} e Mn^{+2} podem ser a preferência de algumas histidinas quinases (HESS *et al.*, 1991). Por isso os três cátions foram testados na reação de ligação cruzada, porém em nenhum foi possível notar interação (figura não mostrada). Também foi testado glutaraldeído como agente de ligação cruzada (figura não mostrada) porém os resultados foram os mesmos do que os obtidos com o formaldeído. É possível que não houve interação entre as proteínas pela histidina quinase não estar fosforilada nas condições da reação, sendo então provável que somente a presença de ATP não seja suficiente para a fosforilação da Hsero_3508, necessitando também um estímulo sensorial para ocasionar a autofosforilação.

5. CONCLUSÕES

1. Neste trabalho foram obtidas estirpes mutantes de *H. seropedicae* nos genes *Hsero_3507*, que codifica para uma proteína de resposta regulatória com apenas um domínio REC, e *Hsero_3508*, que codifica para uma histidina quinase com um domínio sensor relacionado a estresse ambiental.
2. A estirpe mutante 3508Tn tem uma maior motilidade do que a estirpe selvagem SMR1, principalmente em condição de alto nitrogênio. É possível que o gene *Hsero_3508* participe do sensoriamento de íons amônio, porém sem se relacionar com o complexo da nitrogenase. A estirpe mutante 3508Tn também aparenta ter um crescimento menor do que a estirpe selvagem SMR1 em microaerobiose, talvez isso seja devido a um maior gasto de energia que essa bactéria pode apresentar, devido a alta motilidade que possui.
3. A estirpe mutante 3507Tn tem a motilidade comprometida, não formando película e também não apresentando halo de motilidade levando a crer que o gene *Hsero_3507* está relacionado com ativação de proteínas motoras da célula.
4. A proteína *Hsero_3507* apresenta conformação quaternária na forma de dímero enquanto que a *Hsero_3508*, na forma de oligômeros, mas não foi possível detectar interação entre as proteínas *Hsero_3507* e *Hsero_3508* nas condições testadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAVIND, L.; PONTING, C. P. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 12, p. 458-459, 1997.

APPLEBY, J.L.; PARKINSON, J.S; BOURRET, R.B. Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. **Cell**, v. 86, p.845-848, 1996.

APPLEBY, J.L.; BOURRET, R.B. Proposed signal transduction role for conserved CheY residue Thr87, a member of the response regulator active-site quintet. **J. Bacteriol.**, v.180, p.3563-3569, 1998.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Sys. Bact.**, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. AND DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**. v. 13, p. 65-73, 1992.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. **International journal of systematic bacteriology**, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.

BALSANELLI, E.; TADRA-SFEIR, M. Z.; FAORO, H.; PANKIEVICZ, V. C. S.; DE BAURA, V. A.; PEDROSA, F. O.; DE SOUZA, E. M.; DIXON, R.; MONTEIRO, R. A. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environ Microbiol.**, v.18, p. 2343-2356, 2016.

BARRET, J.; RAY, P.; SOBCZYK, A.; LITTLE, R.; DIXON, R. Concerted inhibition of the transcriptional activation functions of the enhancer-binding protein NifA by the antiactivator NifL. **Mol. Microbiol**, v.39, p.480–494, 2001.

BATCHELOR, J.D.; DOUCLEFF, M.; LEE, C.J.; MATSUBARA, K.; DE CARLO, S.; HEIDEKER, J.; LAMER, M.H.; PELTON, J.G.; WEMMER, D.E. Structure and regulatory mechanism of *Aquifex aeolicus* NtrC4: variability and evolution in bacterial transcriptional regulation. **J. Mol. Biol.** v.384, p.1058–1075, 2008.

BERKUM, P.V.; BOHLOOL, B.B. Evaluation of nitrogen fixation bacteria in association with roots of tropical grasses. **Microbiological reviews**, v. 44, n. 3, p. 491-517, 1980.

BILWES, A. M.; ALEX, L. A.; CRANE, B. R.; SIMON, M. I. Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. **Cell**, v.96, p.131-141, 1999.

BREN, A.; EISENBACH, M. The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY. **J Mol Biol.**, v.278, p. 507-514, 1998.

BRINKMAN, A. B.; ETTERNA, T. J.; DE VOS, W. M.; VAN DER OOST, J. The Lrp family of transcriptional regulators. **Mol Microbiol.**, v.48, p. 287-294, 2003.

BURBULYS, D.; TRACH, K.A.; HOCH, J.A. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. **Cell**, v. 64, e.3, p.545-552, 1991.

BURRIS, R.H. Minireview: Nitrogenases. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 9339-9342, 1991.
BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization: the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-254, 1976.

CALERA, J.A.; ZHAO, X. J.; CALDERONE, R. Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans*. **Infect. Immun.** v.68, p.518–525, 2000.

CHUBATSU, L.S; MONTEIRO, R.A; SOUZA, E.M, OLIVEIRA M.A.S; YATES, M.G; WASSEN, R. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil.** v. 356, p.197–207, 2012.

CHUNG, C.T.; NIEMELA, S.L.; MILLER, R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.2172-2175, 1989.

CROZE, O. A.; GAIL, P. F.; CATES, M. E.; POON, W. C. K. Migration of chemotactic bacteria in soft Agar: role of gel concentration. **Biophysical J.**, v.101, p. 525-534, 2011.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; et al. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2375-2379, 2001.

DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Bioch. Biophys. Acta.**, v.127, p.285-294, 1966.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621-631, 2004.

DUNWELL, J. M.; PURVIS, A.; KHURI, S. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? **Phytochemistry**, v.65, p.7-17, 2004.

DOTTO, A. P.; LANA, M. C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 3, p. 376-382, 2010.

el-KOMY, H. M. A.; SAAD, O. A. O.; HETTA, A. M. A. Significance of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation and/or straw amendment on growth and dinitrogen fixation of wheat using 15N-dilution method. **Folia Microbiologica**, v. 48, n. 6, p. 787-793, 2003.

ELSEN, S.; SWEM, L. R.; SWEM, D. L.; BAUER, C. E. RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system. **Microbiol. Mol Biol Rev.**, v.68, p.263-279, 2004.

FINN, R.D; MISTRY, J.; TATE, J.; COGGILL, P.; HEGER, A.; POLLINGTON, J. E.; GAVIN, O. L.; GUNESEKARAN, P.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; HOLM, L.; SONNHAMMER, E. L.; EDDY, S.R.; BATEMAN, A. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res**, v.38, p.211-222, 2010.

FISCHER, H.; BRUDERER, T.; HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the Bradirhizobium japonicum NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 2207-2224, 1988.

FISCHER, H.M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiol Rev.** v. 58, p. 352–386, 1994.

FROTA, C. C.; PAPA VINASASUNDARAM, K. G.; DAVIS, E. O.; COLSTON M. J. The AraC family transcriptional regulator Rv1931c plays a role in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 72, p.5483-5486.

FU, H.; BURRIS, R H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 6, p. 3168-3175, 1989.

GAO, R.; STOCK, A.M. Biological insights from structures of two-component proteins. **Annu. Rev. Microbiol.** v.63, p.133-154, 2009.

GILLES-GONZALEZ, M. A.; DITTA, G. S; HELINSK, D. R. A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. **Nature**, v.350, p.170–172, 1991.

GOVINDARAJAN, M.; VADIVELU, M. e REVATHI, G. N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. **Microbiological Research**. v. 161, p. 238-245, 2006.

GROVE, A. MarR family transcription factors. **Cell**, v. 23, p.R142-R143, 2013.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; REDDY, P. M.; LADHA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v. 154, n. 1, p. 131-145, 2002.

HANSON, P. I.; WHITEHEART, S. W. AAA+ proteins: have engine, will work. **Nature reviews: molecular cell biology**, v.6, p.519-529, 2005.

HESS, J.; BOURRET, R. B.; SIMON, M. I. Phosphorylation assays for proteins of the two-component regulatory system controlling chemotaxis in *Escherichia coli*. **Methods Enzymol.**, v.200, p.10-21, 1991.

HO, Y. S.; BURDEN, L. M.; HURLEY, J. H. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 20, p. 5288-99, 2000.

HOCH, J.A. A Life in *Bacillus subtilis* Signal Transduction. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.71, p.1-19, 2017.

HOLM, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. **Scandinavian Journal of Statistics**, v.6, p.65-70, 1979.

HUA, J.; CHANG, C.; SUN, Q.; MEYEROWITZ, E.M. Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene. **Science**, v.269(5231), p.1712-1714, 1995.

JANGA, S. C.; MORENO-HAGELSIEB, G. Operons and prokaryotic genome organization, In: BABU, M. M. **Bacterial Gene Regulation and Transcriptional Networks**. Caister Academic Press, 2013. p.67-83.

JENAL, U.; GALPERIN, M. Y. Single domain response regulators: molecular switches with emerging roles in cell organization and dynamics. **Curr Opin Microbiol.**, v.12, p. 152-160, 2009.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**. v. 33, p. 389-397, 1994.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.** v. 43, p. 887-891, 1997.

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 Microbiol. Lett.** v. 181, p. 165-170, 1999.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. **Mol Biol Evol.**, v.33, p.1870-1874, 2016.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LI, S.; AULT, A.; MALONE, C. L.; RAITT, D. DEAN, S.; JOHNSTON, L. H.; DESCHENES, R. J.; FASSLER, J. S. The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. **EMBO J.** v.17, p. 6952-6962, 1998.

LOIS, A. F.; DITTA, G. S.; HELINSKI, D. R. The Oxygen Sensor FixL of *Rhizobium meliloti* is a membrane protein containing four possible transmembrane segments. **J. Bacteriol.**, v.175, p.1103-1109, 1993.

LOIS, A. F.; WEINSTEIN, M.; DITTA, G. S.; HELINSKI, D.R. Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen-sensing protein FixL of *Rhizobium meliloti* are coordinately regulated by oxygen. **J. Biol. Chem.**, v.268, p.4370-4375, 1993.

LUKAT, G.S.; LEE, B.H.; MOTTONEN, J.M.; STOCK, A.M.; STOCK, J.B. Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis. **J. Biol. Chem.** v.266, p.8348-8354, 1991.

LUKAT, G.S.; McCLEARY, W.R.; STOCK, A.M.; STOCK, J.B. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.89, p.718–22, 1992.

NAVILLE, M.; GUILLOT-GAUDEFFROY, A.; MARCHAIS, A.; GAUTHERET, D. ARNold: a web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators. **RNA Biol.**, v.8, p. 11-13, 2001.

MACHADO, I. M. P.; YATES, M. G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Res.** v. 29, p. 1599-1602, 1996.

MARTINEZ-HACKERT, E.; STOCK, A.M. Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. **J. Mol. Biol.**, v.269, p.301–312, 1997.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; SHEARER, N.; JOHNSON, P.; DIXON, R. The NifL–NifA system: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. **J. Bacteriol**, v. 186, p.601–610, 2004.

MASCHER, T.; HELMANN, J. D.; UNDEN, G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, v.70, p.910–938, 2006.

MERRICK, M. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman & Hall, 1992.

MILANI, M.; LEONI, L.; RAMPIONI, G.; ZENNARO, E.; ASCENZI, P.; BOLOGNESI, M. An active-like structure in the unphosphorylated StyR response regulator suggests a phosphorylation-dependent allosteric activation mechanism. **Structure**, v.13, p.1289–1297, 2005.

MONTEIRO, R.A; SOUZA, E.M; YATES, M.G; STEFFENS, M.B.R; PEDROSA, F.O; CHUBATSU, L.S. Expression, purification, and functional analysis of the C-terminal domain of *Herbaspirillum seropedicae* NifA protein. **Protein Expr Purif.** 27:313–318, 2003.

MONTEIRO, R.A; BALSANELLI, E; WASSEM, R; MARIN, A.M; BRUSAMRELLO-SANTOS, L.C.C; SCHIMDT, M.A; TADRA-SFEIR, M.Z; PANKIEVICZ, V.C.S; CRUZ, L.M; CHUBATSU, L.S; PEDROSA, F.O; SOUZA, E.M. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**. v.356, n. 1-2, p.175-196, 2012.

MIZUNO, T. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. **DNARes**, v.4, p.161–168, 1997.

MULLIS, K., FALOONA, F. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. **Methods Enzymol**, v. 155, p. 335-350, 1987.

NEEDHAM, J.V.; CHEN, T.Y.; FALKE, J.J. Novel ion specificity of a carboxylate cluster Mg(II) binding site: strong charge selectivity and weak size selectivity. **Biochemistry**, v.32, p.3363-3367, 1993.

NØRHOLM, M. H. H. A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. **BMC Biotechnology**, v.10, 2010.

O'HARA, B.P.; NORMAN, R.A.; WAN, P.T.; ROE, S.M.; BARRET, T.E.; DREW, R.E.; PEARL, L.H. Crystal structure and induction mechanism of AmiC-AmiR: a ligand-regulated transcription antitermination complex. **EMBO J.**, v.18, p.5175–5186, 1999.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 3, p. 197-200, 1996.

PAN, S.Q.; CHARLES, T.; JIN, S.; WU, Z.L.; NESTER, E.W. Preformed dimeric state of the sensor protein VirA is involved in plant–*Agrobacterium* signal transduction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90(21), p. 9939–9943, 1993.

PARK, S.Y.; LOWDER, B.; BILWES, A. M.; BLAIR, D. F.; CRANE, B. R. Structure of FliM provides insight into assembly of the switch complex in the bacterial flagella motor. **Proc Nat Acad Sci U S A**, v. 103, p.11886-11891, 2006.

PARKINSON, J.S.; KOFOID, E.C. Communication modules in bacterial signaling proteins. **Annu. Rev. Genet**, v.26, p. 71–112, 1992.

PARKINSON, J.S. Signal transduction schemes of bacteria. **Cell**, v 73, e.5, p.857-871, 1993.

PEREZ, R. **Efeito da adição de fenol em culturas de *Herbaspirillum seropedicae* SMR1**. Curitiba, 2014. Tese de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica. Universidade Federal do Paraná

PERRAUD, A. L.; WEISS, V.; GROSS, R. Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. **Trend Microbiol.**, v. 7, e.3, p.115-120, 1999.

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

PRICE, C. W. Protective function and regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis* and related Gram-positive bacteria. **Bacterial Stress Responses**. Washington, DC: ASM Press, p.179-197, 2000.

POSTGATE, J.R. Biological nitrogen fixation: Fundamental. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 296, p. 375-85, 1982.

PORTER, S.L.; WADHAMS, G. H.; ARMITAGE, J. P. Rhodobacter sphaeroides: complexity in chemotactic signaling. **Trends Microbiol.**, v.16, p.251-260, 2008.

PORTER, S. L.; WADHAMS, G. H.; MARTIN, A. C.; BYLES, E. D.; LANCASTER, D. E.; ARMITAGE, J. P. The CheYs of Rhodobacter sphaeroides. **J Biol Chem.**, v.281, p. 32694-32704, 2006.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Revs. Plant Sci.**, v. 19, p. 227-247, 2000.

RIGGS, P. J.; CHELIUS, M. K.; INIGUEZ, A. L.; KAEPLER, S. M.; TRIPLETT, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 829-836, 2001.

ROBERTS, G. P., MACNEIL, T., MACNEIL, D., BRILL, W. J. Regulation and characterization of protein products coded by the nif (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 136, p. 267–279, 1978.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, FABIO O; et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS microbiology ecology**, v. 45, n. 1, p. 39-47, 2003.

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

SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., ERLICH, H. A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SAITO, H. Histidine phosphorylation and two-component signaling in eukaryotic cells. **Chem. Rev.** v.101, p.2497–2509, 2001.

SALGADO, H.; MORENO-HAGELSIEB, G.; SMITH, T. F.; COLLADO-VIDES, J. Operons in *Escherichia coli*: Genomic analyses and predictions. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.97, p.6652-6657, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. **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. 5463-5467, 1977.

SCHOLLHORN, R.; BURRIS, R.H. Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.58, p.213-16, 1967.

SIDOTE, D.J.; BARBIERI, C.M.; WU, T. Structure of the *Staphylococcus aureus* AgrA LytTR domain bound to DNA reveals a beta fold with an unusual mode of binding. **Structure**, v.16, p.727-735, 2008.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Nat.Biotechnol.** v.1, p.784-791, 1983.

SIMPSON, F. B.; BURRIS, R. H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, v. 224, p. 1095-1097, 1984.

SHINGLER, V. Signal sensing by 54 -dependent regulators : derepression as a control mechanism. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 409-416, 1996.

SOURJIK, V.; BERG, H. C. Binding of the *Escherichia coli* response regulator CheY to its target measured in vivo by fluorescence resonance energy transfer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, p.12669-12674, 2002.

SOUSA, S.A.; MOREIRA, L.M.; WOPPERER, J.; EBERL, L.; SÁ-CORREIA, I.; LEITÃO, J.H. The *Burkholderia cepacia* bceA gene encodes a protein with phosphomannose isomerase and GDP-D-mannose pyrophosphorylase activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, p. 200-206, 2007.

SOUZA, E. .M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F.O. Cloning and characterization of the nifA gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.** v. 37, p. 425 – 429, 1991.

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.

STOCK, A.M., ROBINSON, V.L., GOUDREAU, P.N. Two-component signal transduction. **Annu Rev Biochem.** v.69, p.183-215, 2000.

SURRETE, M. G.; LEVIT, M.; LIU, Y.; LUKAT, G.; NINFA, E. G.; NINFA, A.; STOCK, J.B. Dimerization Is Required for the Activity of the Protein Histidine Kinase CheA That Mediates Signal Transduction in Bacterial Chemotaxis. **J. Biol. Chem.**, v.271, p.939-945, 1996.

SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; WYDER, S.; FORSLUND, K.; HELLER, D.; HUERTA-CEPAS, J.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; SANTOS, A.; TSAFOU, K. P.; KUHN, M.; BORK, P.; JENSEN, L. J.; VON MERING, C. STRING v10: protein-

protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Res.**, v.43, p.D447-D452, 2015.

THORNALLEY, P. J. Glyoxalase I – structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. **Biochem Soc Trans.**, v.31, p. 1343-1348, 2003.

VARUGHESE, K.I. Conformational changes of Spo0F along the phosphotransfer pathway. **J. Bacteriol.**, v.187, p.8221–8227.

VOLZ, K.; MATSUMURA, P. Crystal Structure of *Escherichia coli* CheY Refined at 1.7-Å Resolution. **J. Biol. Chem.**, v.266, p.15511-15519, 1991.

WEST, A.H., STOCK, A.M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. **Trends Biochem Sci.** v.26, p.369-376, 2001.

WOOTTON, J.C.; DRUMMOND, M. The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. **Protein Eng.**, v. 2, p. 535-543, 1989.

WURGLER-MURPHY, S.M; SAITO, H. Two-component signal transducers and MAPK cascades. **Trends Biochem. Sci.**, v.22, p.172–176, 1997.