

**ELISA ELEONORA GRECO NOVELLO**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE UMA  
GLOBINA PUTATIVA CODIFICADA PELO GENE  
HSERO\_2872 DE *Herbaspirillum seropedicae* SMR1**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica), pelo Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens

Coorientadora: Profa. Dra. Rose Adele Monteiro

**CURITIBA**

**2012**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de, em primeiro lugar, agradecer a Deus por colocar tantas pessoas fantásticas a minha volta a fim de que eu conseguisse realizar este trabalho.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens pela valentia em aceitar ser minha orientadora, além de toda amizade, ensinamento, idéias e apoio incansável que me dispensou.

Agradeço a minha coorientadora Profa. Dra. Rose Adele Monteiro pelas sugestões, idéias, ensinamentos e todo apoio dispensado.

À Coordenação de Pós-Graduação em Bioquímica pela oportunidade de participar do programa de mestrado e pela ótima recepção recebida quando aqui cheguei.

Às agências financiadoras da Pós-Graduação.

A todos os professores do departamento pelos seus ensinamentos e pela boa vontade em sempre esclarecer dúvidas e responder às solicitações.

A Roseli Prado, Valter e dona Julieta pela ajuda incansável e pelo ótimo trabalho que realizam.

À prestativa Irene pelas várias declarações e papéis para que eu conseguisse licença de meu trabalho.

Um agradecimento especial ao colega Marco Antonio Seiki Kadowaki que foi, além de um grande amigo, um excelente professor, paciente em me ajudar a compreender e realizar técnicas de laboratório aparentemente simples.

A todos os colegas da turma de mestrado pelos bons momentos que passamos juntos e pelo incentivo para continuar.

Aos colegas de laboratório do Núcleo de Fixação de Nitrogênio, a todos, sem exceção, pelo bom humor sempre presente e pelos muitos ensinamentos dispensados a mim.

Às colegas do Laboratório de Imunofenotipagem do Hospital de Clínicas da UFPR, onde trabalho, Ana Paula, Edna, Eliana, Iara, Julie, Mari, Mirian e Noely pelo apoio e incentivo. Também às estagiárias Suély e Juliana que me deram bastante força para continuar.

A Dra Mariester Malvezzi pelo apoio e confiança que depositou em mim.

Agradeço a Mariza Ramos pelo seu carinho e cuidados com meu filho Mateus, durante a maior parte destes anos, a fim de que eu pudesse ter tempo para realizar este trabalho.

Agradeço muito a meus pais que me ensinaram valores e a importância do trabalho e estudo constantes. Muito obrigada.

A minha irmã, cunhado e sobrinhos que não me deixaram desistir.

E, por fim, um agradecimento mais que especial a minha família: meu marido Marco Antonio e meus filhos Davi, Danilo e Mateus, pela paciência, apoio, incentivo, tempo, conselhos, ensinamentos, consolo nas horas de estresse e desânimo, auxílio em todos os momentos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	1
1.2 Fixação biológica de nitrogênio.....	2
1.2.1 Regulação da fixação biológica de nitrogênio em <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	5
1.3 Globinas .....	12
1.3.1 Hemoglobinas truncadas (2/2 Hbs) .....	16
1.3.2 Funções das globinas .....	23
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	25
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	26
3.1 Objetivo geral .....	26
3.2 Objetivos específicos .....	26
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
4.1 Bactérias e plasmídeos .....	27
4.2 Reagentes .....	30
4.3 Meios de Cultura e Condições de Cultivo .....	30
4.3.1 Meios de cultivo .....	31
4.3.2 Antibióticos .....	33
4.4 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para clonagens em diferentes vetores .....	33
4.5 Manipulação de DNA .....	34
4.5.1 Amplificação do gene Hsero_2872 por PCR .....	34
4.5.2 Purificação de DNA plasmidial em pequena escala .....	35
4.5.3 Clivagem de DNA com enzimas de restrição .....	36
4.5.4 Ligação dos fragmentos de DNA aos respectivos vetores .....	36
4.5.5 Preparo dos vetores .....	36

4.5.6 Eletroforese de DNA em gel de agarose .....	37
4.5.7 Reação de sequenciamento .....	37
4.6 Transformação Bacteriana .....	38
4.6.1 Preparo de células competentes de <i>E. coli</i> .....	38
4.6.1.1 Preparo de células eletrocompetentes .....	38
4.6.1.2 Preparo de células competentes (protocolo TSS) .....	38
4.6.2 Eletroporação .....	39
4.6.3 Transformação por choque térmico .....	39
4.6.4 Transferência de plasmídeos por conjugação .....	39
4.7 Expressão do gene Hsero_2872 .....	40
4.8 Mutagênese do gene Hsero_2872 .....	40
4.9 Determinação de Atividade de $\beta$ -galactosidase .....	42
4.10 Determinação de Atividade de Nitrogenase .....	42
4.11 Dosagem de proteínas .....	43
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
5.1 Análise <i>in silico</i> da sequência nucleotídica do gene Hsero_2872 .....	44
5.2 Análise <i>in silico</i> da proteína codificada pelo gene Hsero_2872 .....	47
5.3 Clonagem da região codificante do gene Hsero_2872 visando expressão da proteína .....	62
5.4 Clonagem e caracterização funcional do gene Hsero_2872 .....	70
5.4.1 Construção da fusão transcricional da região promotora do gene Hsero_2872 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e análise de sua expressão .....	70
5.4.2 Construção do mutante cromossomal Hsero_2872 e sua caracterização fisiológica .....	79
5.4.2.1 Caracterização funcional do mutante cromossomal Hsero_2872 ..	89
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	95
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	96
<b>ANEXO</b> .....	111

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Modelo de regulação transcricional da fixação de nitrogênio em <i>H. seropedicae</i> .....	9
FIGURA 2 – Organização estrutural do cluster <i>nif</i> no genoma de <i>H. seropedicae</i> .....	11
FIGURA 3 – Esquema de estrutura terciária da Mioglobina.....	14
FIGURA 4 – Representação das três famílias de Globinas.....	15
FIGURA 5 – Exemplo de estrutura terciária das trHbs.....	19
FIGURA 6 – Alinhamento de Hemoglobinas Truncadas do grupo I.....	20
FIGURA 7 – Alinhamento de Hemoglobinas Truncadas do grupo II.....	21
FIGURA 8 – Alinhamento de Hemoglobinas Truncadas do grupo III.....	22
FIGURA 9 – Esquema da estratégia de mutagênese do gene Hsero_2872.....	41
FIGURA 10 – Sequência do gene Hsero_2872 e regiões a montante e a jusante.....	45
FIGURA 11 – Região intergênica <i>nifA</i> /Hsero_2872.....	46
FIGURA 12 – Predição da função geral da proteína.....	47
FIGURA 13 – Alinhamento em pares das globinas de <i>H. seropedicae</i> .....	52
FIGURA 14 – Alinhamento conjunto das globinas de <i>H. seropedicae</i> .....	53
FIGURA 15 – Alinhamento de Hsero_2872 com Hemoglobinas Truncadas do grupo I.....	54
FIGURA 16 – Alinhamento de Hsero_2872 com Hemoglobinas Truncadas do grupo II.....	55
FIGURA 17 – Alinhamento de Hsero_2872 com Hemoglobinas Truncadas do grupo III.....	56
FIGURA 18 – Árvore Filogenética (Minimum Evolution Tree).....	58
FIGURA 19 – Previsão de estrutura secundária da globina Hsero_2872.....	60
FIGURA 20 – Previsão de estrutura terciária da globina Hsero_2872.....	61
FIGURA 21 – Região Codificante amplificada e clonada para expressão da proteína.....	62
FIGURA 22 – Esquema da clonagem da região codificante do gene Hsero_2872 no vetor pTZ57R/T .....	63

FIGURA 23 – Confirmação da clonagem da região codificante do gene Hsero_2872 no vetor pTZ57R/T .....	64
FIGURA 24 – Esquema da clonagem da região codificante do gene Hsero_2872 no vetor pET28a .....	65
FIGURA 25 – Confirmação da clonagem da região codificante do gene Hsero_2872 no vetor pET28a .....	66
FIGURA 26 – Eletroforese do extrato bruto da proteína Hsero_2872 .....	67
FIGURA 27 – Eletroforese das frações do teste de solubilização da proteína Hsero_2872 com 8mol/L de uréia .....	68
FIGURA 28 – Eletroforese das frações eluídas na estratégia de purificação da proteína Hsero_2872 .....	69
FIGURA 29 – Região Promotora amplificada .....	70
FIGURA 30 – Esquema da clonagem da região promotora do gene Hsero_2872 no vetor pTZ57R/T .....	71
FIGURA 31 – Confirmação da clonagem da região promotora do gene Hsero_2872 no vetor pTZ57R/T .....	72
FIGURA 32 – Esquema da clonagem da região promotora do gene Hsero_2872 no vetor pMP220 .....	73
FIGURA 33 – Confirmação da clonagem da região promotora do gene Hsero_2872 no vetor pMP220 .....	74
FIGURA 34 – Determinação da expressão do promotor do gene Hsero_2872 na estirpe SmR1 de <i>H.seropedicae</i> .....	75
FIGURA 35 – Determinação da expressão do promotor do gene Hsero_2872 em estirpes mutantes de <i>H.seropedicae</i> .....	77
FIGURA 36 – Determinação da expressão do promotor do gene Hsero_2872 em <i>E.coli</i> ET8000 .....	78
FIGURA 37 – Regiões amplificadas visando construção do mutante .....	79
FIGURA 38 – Esquema da clonagem das regiões para construção do mutante do gene Hsero_2872 no vetor pTZ57R/T.....	80
FIGURA 39 – Confirmação da clonagem das regiões para construção do mutante do gene Hsero_2872 no vetor pTZ57R/T.....	81
FIGURA 40 – Esquema da construção do plasmídeo mutagênico pEN2872.....	83

FIGURA 41 – Confirmação da clonagem dos segmentos DEL1 e DEL2 no vetor pSUP202 .....	84
FIGURA 42 – Esquema da construção do plasmídeo mutagênico pEN2872sac..	85
FIGURA 43 – Confirmação da construção do plasmídeo pEN2872sac.....	86
FIGURA 44 – Confirmação do primeiro evento de recombinação .....	87
FIGURA 45 – Confirmação do segundo evento de recombinação .....	88
FIGURA 46 – Perfil de crescimento em diferentes concentrações de cloreto de amônio .....	89
FIGURA 47 – Perfil de crescimento em 1mmol/L de nitrito de potássio .....	90
FIGURA 48 – Perfil de crescimento em atmosfera limitante de oxigênio .....	91
FIGURA 49 – Atividade de Nitrogenase das estirpes mutante EN2872 e selvagem SmR1 .....	92
FIGURA 50 – Atividade de $\beta$ -galactosidase das estirpes mutante EN2872 e selvagem SmR1 contendo plasmídeo pRW1 .....	93
FIGURA 51 – Atividade de $\beta$ -galactosidase das estirpes mutante EN2872 e selvagem SmR1 contendo plasmídeo pEMS140 .....	94

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Estirpes de <i>Escherichia coli</i> .....	27
TABELA 2 - Estirpes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	28
TABELA 3 - Plasmídeos .....	29
TABELA 4 – Composição do meio LB (Luria Bertani) .....	31
TABELA 5 – Composição do meio SOB .....	31
TABELA 6 – Composição do meio NFDM .....	32
TABELA 7 – Composição do meio NFb-malato .....	32
TABELA 8 – Antibióticos utilizados .....	33
TABELA 9 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação das regiões clonadas .....	34
TABELA 10 – Porcentagem de identidade da proteína Hsero_2872 com outras proteínas disponíveis no banco de dados .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

Amp – ampicilina  
ATP – adenosina trifosfato  
Cm – cloranfenicol  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
dNTPs – 5'-trifosfato de 2'desoxinucleotídeos  
DO<sub>595</sub> – densidade ótica a 595 nanômetros  
EDTA – ácido etilenodiamino-tetra-acético  
EBP – proteína que se liga a um sítio ativador (*Enhancer Binding Protein*)  
FAD – flavina adenina dinucleotideo  
IHF – fator de integração do hospedeiro (*Integration Host Factor*)  
IPTG - β-D-isopropil-tiogalactopiranosídeo  
kDa – quilo Daltons  
Km – canamicina  
kV – quilo Volts  
Nal – ácido nalidíxico  
ONPG – o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo  
ORF – sequência potencialmente codificadora de proteína  
pb – pares de base  
PCR – reação em cadeia da polimerase  
RBS – sítio de ligação para ribossomo  
RNA – ácido ribonucléico  
rpm – rotações por minuto  
SDS – dodecilsulfato de sódio  
Sm – estreptomomicina  
Tc - tetraciclina  
TRIS – Tris(hidroximetil)-aminometano  
UAS – sequência regulatória a montante (*Upstream Activating Sequence*)  
UV – radiação ultravioleta  
X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

## RESUMO

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria fixadora de nitrogênio, Gram negativa, da classe  $\beta$  das proteobactérias que pode ser encontrada colonizando endofiticamente milho, sorgo, cana de açúcar e arroz. No cluster *nif* de seu genoma foram encontrados os genes Hsero\_2872 e Hsero\_2855, cujos produtos foram anotados como proteínas da superfamília das globinas. O gene Hsero\_2872 possui 642 pb e codifica para uma proteína de 213 aminoácidos. Ele se encontra a montante do gene *nifA* e é transcrito em sentido contrário a este. Na análise *in silico* de sua região promotora foram encontrados prováveis sítios de ligação para as proteínas NifA, FNR e um provável promotor dependente de sigma 54. A análise *in silico* da proteína codificada pelo gene Hsero\_2872 mostrou homologia com uma globina, provavelmente, da família das hemoglobinas truncadas, porém análises estruturais e funcionais mais aprofundadas são necessárias para confirmar esta classificação. Ensaios realizados com a fusão da região promotora do gene Hsero\_2872 com o gene repórter *lacZ* confirmaram sua funcionalidade que é dependente dos níveis de amônio no meio. A atividade do promotor em estirpes mutantes de *H. seropedicae* NifA<sup>-</sup>, FNR<sup>-</sup> e NtrC<sup>-</sup> foi menor do que na estirpe selvagem sugerindo a importância destas proteínas na expressão do gene Hsero\_2872. Um mutante Hsero\_2872 cromossomal foi obtido pela deleção de aproximadamente 230 pb da região central. Este mutante quando crescido em meios com diferentes concentrações de cloreto de amônio ou em presença de nitrito de potássio 1mM não apresentou diferenças no perfil de crescimento em relação ao observado para a estirpe selvagem. A atividade de nitrogenase do mutante foi aproximadamente metade da atividade da estirpe selvagem, o que pode sugerir um efeito da proteína Hsero\_2872 no metabolismo do nitrogênio. Testes realizados com promotores dos genes *nifA* e *nifB* apresentaram menor atividade na estirpe mutante, sugerindo um papel importante da proteína para a atividade da proteína NifA.

Palavras chave: *H. seropedicae*, globina, fixação biológica de nitrogênio.

## ABSTRACT

*Herbaspirillum seropedicae* is a nitrogen-fixing bacterium, Gram-negative,  $\beta$ -proteobacterium class, which can be found endophytically colonizing corn, sorghum, sugar cane and rice. Two genes were found on its *nif* cluster whose products were classified as proteins from the superfamily of globins, Hsero\_2872 and Hsero\_2855. The gene Hsero\_2872 has 642 bp and encodes a 213 amino-acids protein. It is located upstream of the *nifA* gene and transcribed in the opposite direction to this. On the analysis *in silico* of the promoting region were found probable binding sites for the proteins NifA, FNR and a sigma 54 dependent promoter. *In silico* analysis of the protein encoded by the Hsero\_2872 gene showed to be a globin, probably from the family of truncated hemoglobin, but deeper structural and functional analysis are required to confirm this classification. Analysis performed with the lacZ fusion of the promoter region of Hsero\_2872 gene confirmed its functionality and dependence on ammonium levels on the media. The promoter activity on mutant strains of *H. seropedicae* NifA<sup>-</sup>, FNR<sup>-</sup> e NtrC<sup>-</sup> was lower than on wild type strain suggesting the importance of those proteins in the expression of the Hsero\_2872 gene. A mutant Hsero\_2872 chromosomal was built with deletion of approximately 200 bp of the central region. This mutant when grown in media with different concentrations of ammonium chloride or in the presence of 1mM potassium nitrite showed no differences in growth profile relative to that observed for a wild type strain. The nitrogenase activity of the mutant Hsero\_2872 was approximately half the activity of the wild type strain, which may suggest an effect of Hsero\_2872 protein on nitrogen metabolism. Tests with promoters and genes *nifA* and *nifB* showed less activity in the mutant strain Hsero\_2872, suggesting an important role of the protein for the best activity of NifA protein.

Keywords: *H. seropedicae*, globin, biological nitrogen fixation

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Herbaspirillum seropedicae*

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foi isolada na cidade de Seropédica, Rio de Janeiro, por Baldani e colaboradores (1984). Inicialmente denominada *Azospirillum seropedicae* por apresentar várias características morfológicas e fisiológicas semelhantes ao gênero *Azospirillum* (BALDANI *et al.*, 1984), foi, posteriormente, descrita como um novo gênero da classe  $\beta$  das Proteobactérias. Esta classificação baseou-se na análise de sequências de RNA ribossomal 16S (BALDANI *et al.*, 1986 ; YOUNG, 1992). Na divergência, o gênero *Herbaspirillum* recebeu essa denominação porque as bactérias são pequenas, tem forma de espiral e são encontradas em associação com plantas herbáceas. Outras espécies dentro do gênero *Herbaspirillum* já foram descritas: *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1996), *Herbaspirillum frisingense* (KIRCHHOF *et al.*, 2001); *Herbaspirillum lusitanum* (VALVERDE *et al.*, 2003), *Herbaspirillum chlorophenolicum* (IM *et al.*, 2004), *Herbaspirillum autotrophicum* (DING e YOKOTA, 2004), *Herbaspirillum huttiensis* (DING e YOKOTA, 2004), *Herbaspirillum hiltneri* (ROTHBALLER *et al.*, 2006), *Herbaspirillum rhizosphaerae* (JUNG *et al.*, 2007), *H. putei* reclassificada recentemente como *Herbaspirillum huttiense ssp. putei* (DOBRITSA *et al.*, 2010) e *Herbaspirillum aquaticum* (DOBRITSA *et al.*, 2010).

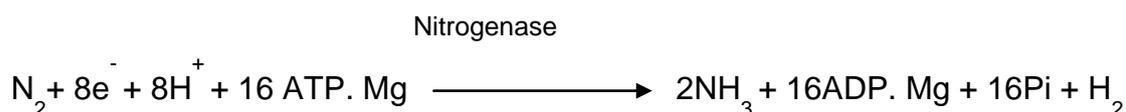
*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria fixadora de nitrogênio, Gram negativa, geralmente vibrióide, tem de 0,6 a 0,7  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 1,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  de comprimento e apresenta de um a três flagelos em um ou ambos os polos (BALDANI *et al.*, 1996). Pode colonizar endofiticamente milho, sorgo, cana de açúcar e arroz (BALDANI *et al.*, 1986; OLIVARES *et al.* 1996). É capaz de fixar nitrogênio sob condições microaeróbicas, promovendo a redução do  $\text{N}_2$  em amônio, através de uma reação catalisada pelo complexo enzimático nitrogenase. As condições ideais de crescimento abrangem a faixa de temperatura de 30° a 40°C e a faixa de pH de 5,3 a 8,0 (BALDANI *et al.*, 1986). Possui metabolismo típico respiratório e não fermenta açúcares. Utiliza ácidos orgânicos como malato, fumarato, succinato, piruvato, citrato e trans-aconitato

como fontes preferenciais de carbono (BALDANI *et al.*, 1986). Estudos realizados por Olivares e colaboradores (1997) indicaram que *H. seropedicae* é capaz de produzir fitohormônios que estimulam o crescimento vegetal.

Por sua capacidade de converter o nitrogênio gasoso em amônio que pode ser disponibilizado para as plantas como uma das fontes de nitrogênio, *H. seropedicae* é considerada um potencial biofertilizante a ser empregado na agroindústria. Por estas razões, o Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, sediado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, se dedica, desde a década de 80, ao estudo da bioquímica, fisiologia e biologia molecular deste microrganismo, com ênfase em seu metabolismo nitrogenado. Os processos envolvidos na interação de *Herbaspirillum* com as plantas associadas também são foco de pesquisa.

## 1.2 Fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio consiste na transformação do N<sub>2</sub> a amônio, um processo catalisado pela enzima nitrogenase (POSTGATE, 1982) e a capacidade de fixar o dinitrogênio (N<sub>2</sub>) está distribuída entre diversos gêneros de bactérias e arqueias, mas os eucariotos não possuem esta habilidade (POSTGATE, 1982).



Este processo ocorre em condições especiais de baixa concentração de nitrogênio fixado, baixa tensão de oxigênio, presença de metais e temperatura adequada (POSTGATE, 1998).

O complexo nitrogenase é uma metaloenzima constituída por duas proteínas distintas, a dinitrogenase redutase ou proteína ferro (proteína-Fe), que funciona como um doador de elétron para a segunda proteína, a dinitrogenase ou proteína ferro-molibdênio (proteína-FeMo), que contém o sítio catalítico da enzima. Estas unidades reunidas na presença de ATP e de uma

fonte de baixo potencial de redução catalisam a redução de  $N_2$  a amônio (POSTGATE, 1998).

O amônio formado no processo de redução do  $N_2$  atmosférico ou captado do meio externo é utilizado para a síntese de glutamina e glutamato. Na maioria das células, esses compostos servem como doadores de nitrogênio para reações biossintéticas. Em procariotos, a assimilação de amônio pode ocorrer por duas vias. A mais importante é a via glutamina sintetase / glutamato sintase (GS / GOGAT), onde a GS (produto do gene *glnA*) catalisa a conversão de glutamato e amônio em glutamina, e a GOGAT catalisa a transferência do grupo amida da glutamina para o 2-oxoglutarato produzindo 2 moléculas de glutamato, uma reação dependente de NADPH. Na outra via de assimilação de amônio, a glutamato desidrogenase (GDH) catalisa a conversão de amônio e 2-oxoglutarato em glutamato, uma reação também dependente de NADPH (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Devido ao alto custo energético da reação catalisada pela nitrogenase a fixação biológica de nitrogênio é um processo finamente regulado, tanto em nível de atividade das enzimas como da transcrição dos genes *nif* (genes de fixação de nitrogênio) em resposta a condições de nitrogênio e oxigênio do meio (DIXON e KAHN, 2004).

Sendo *H. seropedicae* uma bactéria fixadora de nitrogênio, a caracterização estrutural e funcional de genes envolvidos neste processo tem importância fundamental para o entendimento do seu metabolismo nitrogenado e também para a futura obtenção de estirpes modificadas mais eficientes para aplicação como biofertilizante. Os principais genes estudados pertencem ao cluster *nif* (*nitrogen fixation*) que agrupa os genes responsáveis pela síntese e regulação da atividade da enzima nitrogenase. Na década de 90, Souza e colaboradores (1991) reportaram o sequenciamento e caracterização funcional dos genes *nifA* e *nifB* e concluíram que a proteína NifA atua como um ativador da transcrição de genes *nif* em *H. seropedicae* e tem sua atividade controlada pelo oxigênio. WASSEM e colaboradores (2000) estudaram a expressão do promotor de *nifA* que mostrou ser dependente da proteína ativadora de transcrição NtrC e do fator  $\sigma^N$  da RNA polimerase. A atividade da proteína NifA é controlada por oxigênio e íons amônio (SOUZA *et al.*, 1999) e pela proteína

GlnK (BENELLI *et al.*, 1997 ; PEDROSA *et al.*, 1997; NOINDORF *et al.*, 2006). O gene *nifB* localizado a jusante do gene *nifA* é transcrito na mesma direção e codifica para a proteína NifB, possivelmente envolvida no processamento do cofator ferro-molibdênio da nitrogenase (REGO, 1997).

A organização dos genes estruturais da nitrogenase de *H. seropedicae*, genes *nifHDK*, foi estudada por Machado e colaboradores (1996), que confirmaram ser sua expressão depende da proteína NifA. Foi descrita a presença de um promotor  $\sigma^N$  funcional a montante do gene *nifH* e ausência de atividade promotora entre os genes *nifH*, *nifD*, *nifK*. Klassen e colaboradores (1999) estudaram os genes *nifENXorf1orf2orf3* que fazem parte do operon *nifHDKENXorf1orf2fdxA* (SOUZA *et al.*, 2010). Este operon é transcrito a partir de um único promotor dependente de  $\sigma^N$  e localizado a montante do gene *nifH*. Análises de mutagênese mostraram que o gene *nifN* é essencial à atividade de nitrogenase e que os mutantes *nifX* ou *orf2* são capazes de desreprimir a nitrogenase em condições de limitação de ferro (KLASSEN *et al.*, 1999).

A jusante do operon *nifHDKENXorf1orf2fdxA* foi encontrado um operon contendo os genes *nifQ* e *modABC*. Mutantes *modA* e *nifQ* foram incapazes de mostrar atividade de nitrogenase em condições de limitação de molibdênio. As proteínas ModA, ModB e ModC formam um sistema de transporte de molibdênio de alta afinidade (KLASSEN, 2000). Além dos genes *modABC*, um gene do tipo *modE* (VOIGHT, 2000) foi identificado a montante do gene *nifA*. O produto deste gene atua provavelmente como um regulador transcricional dependente de molibdato dos genes *modABC*.

O operon *fixXC* está disposto a jusante do operon *nifQmodABC* e é transcrito na direção oposta. Codifica para as proteínas FixX e FixC, as quais provavelmente atuam na transferência de elétrons para a nitrogenase (KLASSEN, 2000).

Além dos genes *nif* e *fix*, outros genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio foram caracterizados em *H. seropedicae*. Um gene tipo *glnB* foi identificado por Benelli e colaboradores (1997) como uma unidade transcricional independente que codifica para a proteína PII, relacionada com a regulação do metabolismo de nitrogênio conforme a disponibilidade de amônio no ambiente. Também foi identificado um gene *amtB* que codifica para a

proteína AmtB, um provável transportador de íons amônio (NOINDORF, 2002). Uma ORF homóloga a *glnK* foi encontrada a montante de *amtB* e constitui com este um único operon (NOINDORF *et al.*, 2006). O operon *glnAntrBC* codifica para enzima glutamina sintetase (GS) e as proteínas NtrB e NtrC respectivamente (STEFFENS *et al.*, 1997). A glutamina sintetase catalisa a síntese de glutamina a partir de amônio e glutamato. As proteínas NtrB e NtrC constituem um sistema regulatório de dois componentes envolvido com a fixação e metabolismo de nitrogênio. O estudo dos genes *ntrXY* (ALVES, 2006) indicou que o gene *ntrY* está envolvido na regulação da expressão dos genes relacionados ao metabolismo de nitrato, mas não da fixação de nitrogênio e assimilação de amônio. Os genes *fnr1 fnr2 e fnr3* (BATISTA, 2011), que codificam para as proteínas FNR, sensíveis ao oxigênio, mostraram não ser essenciais à fixação biológica de nitrogênio. No entanto, experimentos de determinação da expressão gênica mostraram que FNR reprime a expressão dos genes *nifA* e *nifB* de *H. seropedicae*. Os genes *fnr* podem estar envolvidos em um fino mecanismo de regulação de genes requeridos para a fixação de nitrogênio, em concentrações ótimas de oxigênio.

### **1.2.1 Regulação da fixação biológica de nitrogênio em *Herbaspirillum seropedicae***

A enzima nitrogenase de *H. seropedicae* sofre inibição rápida e reversível de sua atividade quando íons amônio e outras fontes de nitrogênio como L-glutamato, L-serina, L-cisteína, metilamina são adicionados às culturas que inicialmente estavam fixando nitrogênio (KLASSEN, 1997). Este evento de regulação da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* envolve o sistema Ntr e a proteína NifA (CHUBATSU *et al.*, 2011).

Os genes que codificam os componentes do sistema Ntr em *H. seropedicae* já foram identificados: *glnA*, *ntrB*, *ntrC*, *glnK*, *glnB*, *glnD* e *amtB* (CHUBATSU *et al.*, 2011). As proteínas NtrB e NtrC são transcritas a partir do operon *glnAntrBC*, que contém na sua região promotora, dois sítios para ligação de NtrC e a transcrição é iniciada a partir de duas regiões promotoras, uma dependente de  $\sigma^{54}$  e outra de  $\sigma^{70}$  (PERSUHN *et al.*, 2000; PEDROSA *et*

*al.*, 2001). Em condições limitantes de nitrogênio, a expressão de *glnA* é dependente de NtrC, porém é parcialmente reprimida em altas concentrações de amônio, sugerindo funcionalidade do promotor  $\sigma^{70}$  nestas condições (PERSUHN *et al.*, 2000). Os resultados obtidos por Persuhn e colaboradores (2000), demonstraram ainda, o envolvimento do sistema Ntr na expressão do gene *glnA*, controle da atividade de GS e regulação da fixação de nitrogênio.

As proteínas NtrB e NtrC pertencem a uma família de reguladores de dois-componentes. A proteína NtrB possui duas atividades: histidina quinase (fosforila NtrC) e fosfatase (desfosforila NtrC). A interconversão das duas atividades depende dos níveis de nitrogênio e carbono celular (ATKINSON *et al.*, 1994; JIANG e NINFA, 1999). Sob condições limitantes de amônio NtrB liga ATP e catalisa sua autofosforilação em um resíduo de histidina conservado. O grupamento fosforil é então transferido para um resíduo de aspartato da proteína NtrC (NINFA *et al.*, 1993). A proteína NtrC quando fosforilada age como um ativador transcricional de genes envolvidos na fixação e assimilação de nitrogênio. Em concentrações elevadas de amônio a proteína NtrB apresenta atividade de fosfatase, desfosforilando a proteína NtrC e inativando-a.

Duas proteínas do tipo PII foram identificadas em *H. seropedice*, GlnB e GlnK (BENEILLI *et al.*, 1997; NOINDORF *et al.*, 2006). A proteína GlnB tem expressão constitutiva (BENEILLI *et al.*, 1997), enquanto que a expressão da proteína GlnK é aumentada sob condições limitantes de nitrogênio e é dependente de NtrC (NOINDORF, 2002). As proteínas GlnK e GlnB de *H. seropedicae* apresentam 78% de identidade entre si e ambas podem ser uridililadas (BENEILLI *et al.*, 2001 e BONATTO *et al.*, 2007). A uridililização no resíduo Tyr-51 é conservada tanto em GlnB quanto em GlnK e é dependente de ATP e 2-oxoglutarato e inibida na presença de glutamina (BENEILLI *et al.*, 2001 e BONATTO *et al.*, 2007). Noindorf e colaboradores (2006) isolaram e sequenciaram o gene *amtB* de *H. seropedicae*. Este gene é co-transcrito com *glnK* e *nlnA* formando o operon *nlnA-glnKamtB*. A expressão deste operon é aumentada em condições de fixação de nitrogênio e é dependente de NtrC.

A proteína NifA, uma proteína da família das EBP (Enhancer Binding Protein), é ativadora de transcrição dos genes *nif* e atua em conjunto com a

RNA polimerase -  $\sigma^{54}$ . Esse mecanismo de ativação foi encontrado em todas as proteobactérias diazotróficas (DIXON e KAHN, 2004). Em *H. seropedicae* o gene *nifA* consiste de uma unidade transcricional independente que codifica para a proteína NifA (SOUZA *et al.*, 1991). A expressão ocorre a partir de uma região promotora complexa, onde foram encontradas três prováveis sequências promotoras do tipo  $\sigma^{54}$  (-24/-12) (SOUZA *et al.*, 1991 e 2000). À montante da sequência promotora existem sítios para a ligação dos seguintes elementos regulatórios: 2 sítios para a ligação de NtrC, três sítios para a ligação de NifA e um sítio para a ligação do fator de integração do hospedeiro IHF (SOUZA *et al.*, 1991; WASSEM *et al.*, 2000).

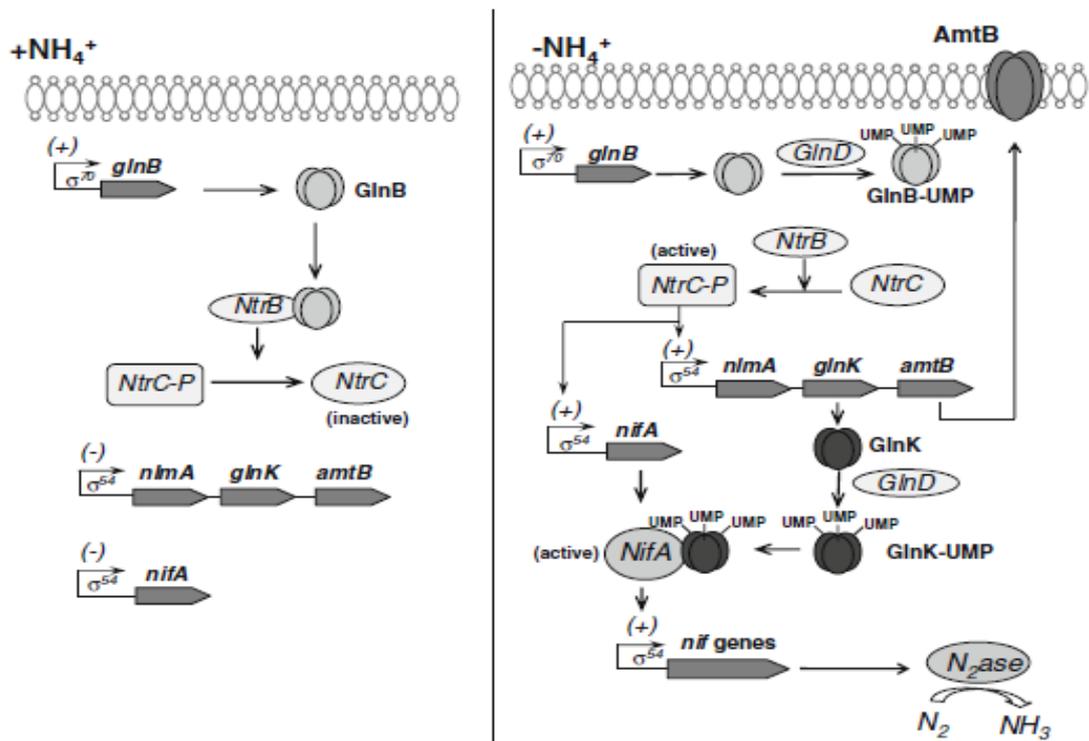
A sequência de aminoácidos da proteína NifA de *H. seropedicae* apresenta 542 resíduos (SOUZA *et al.*, 1991). Estudos comparativos mostraram que esta também possui os três domínios estruturais (N-terminal, Central e C-terminal) e as duas regiões interdomínios LID e “Q-linker”, comuns a maioria das proteínas NifA (FISHER, 1994).

A proteína NifA ativa a transcrição dos genes *nif*, que são expressos a partir de promotores dependentes do fator  $\sigma^{54}$  da RNA-polimerase. O fator  $\sigma^{54}$  associa-se reversivelmente ao núcleo da RNA-polimerase para reconhecer promotores com sequências consenso TGGCAC-N5-TTGCA/T, que possui nas posições a -25/-24 e -13/-12 pb os nucleotídeos GG e GC quase que invariavelmente conservados (DIXON & KAHN, 2004). NifA liga-se a um sítio específico e interage com a RNA-polimerase holoenzima ligada ao promotor para induzir a formação do complexo aberto de transcrição. A proteína NifA se liga a uma sequência conservada, localizada a montante do promotor -24/-12 (5'TGT-N10-ACA-3') e denominada UAS (do inglês “upstream activator sequence”- sequência do ativador a montante). Essa sequência está presente na maioria dos promotores dependentes de NifA e localiza-se a uma distância de 80 a 150 nucleotídeos do sítio de início da transcrição (MORET & BUCK, 1998). Entretanto, nem todos os promotores dependentes da proteína NifA possuem uma sequência UAS óbvia.

Wassem e colaboradores (2000) mostraram que a ativação do promotor *nifA* pela proteína NtrC *in vitro* é estimulada por IHF, uma proteína que promove o dobramento do DNA. Em contraste, a ativação do promotor pela

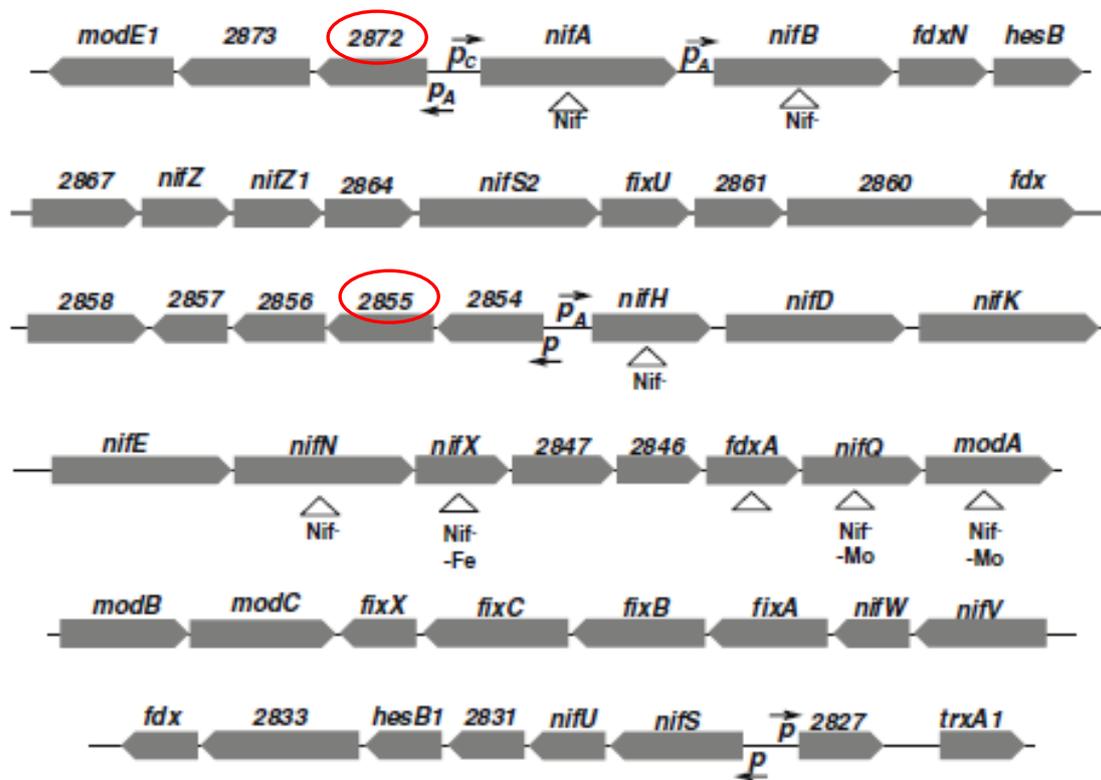
NifA é prejudicada por IHF, que previne a auto-ativação continuada do promotor *nifA* pela proteína NifA. Assim, IHF atua positivamente na ativação dependente de NtrC, e negativamente na ativação dependente de NifA do promotor *nifA* de *H. seropedicae* (WASSEM *et al.*, 2000).

A atividade de NifA pode ser regulada em resposta aos níveis de nitrogênio e oxigênio intracelular e o mecanismo dessa regulação varia de acordo com o organismo (MERRICK & EDWARDS, 1995). O controle da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* tem sido investigado tanto em sistemas “*in vivo*” quanto “*in vitro*” (SOUZA *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 1999a; MONTEIRO *et al.*, 1999b; MONTEIRO *et al.*, 2001, MONTEIRO *et al.*, 2003). NifA é controlada negativamente pelos níveis de oxigênio e íons amônio e é dependente de ferro (SOUZA *et al.*, 1999). A sensibilidade ao oxigênio e ao ferro parece estar relacionada ao domínio Central+C-terminal desta proteína (SOUZA *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 1999a) e a regulação por nitrogênio envolve o domínio N-terminal de NifA, que aparentemente, responde aos níveis de amônio ou glutamina através da interação com a proteína GlnK (NOINDORF *et al.*, 2011). Monteiro e colaboradores (2003) relataram que a proteína NifA é inativa e mais suscetível à degradação em estirpe de *E. coli* mutante para o gene *fnr*, sugerindo que a sensibilidade ao oxigênio para a atividade da proteína NifA envolve, de alguma forma, a proteína FNR. O modelo proposto para a regulação dos genes *nif* em *H. seropedicae* está mostrado na figura 1.



**FIGURA 1 – MODELO DE REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM *H. seropedicae*.** GlnB é expressa constitutivamente dependente de um promotor  $\sigma^{70}$ . Na presença de altos níveis de nitrogênio fixado, o aumento da concentração de glutamina induz a desuridililação de GlnB por GlnD. Nestas condições, NtrB catalisa a defosforilação de NtrC, inativando-a (Painel esquerdo). Sob condições de fixação de nitrogênio, quando o nível de nitrogênio fixado é baixo, NtrB catalisa a fosforilação de NtrC que ativa a transcrição de genes alvo como *nifA* e o operon *nifA**nifK**nifD*. Sob estas condições, GlnB e GlnK são uridililadas por GlnD. GlnK uridililada ativa NifA, que ativa a transcrição de outros genes *nif* e consequentemente capacita a síntese de nitrogenase ativa que reduz o nitrogênio atmosférico a amônio. FONTE: CHUBATSU *et al.*, 2011.

A análise *in silico* dos genes encontrados no cluster *nif* permitiu a identificação de um gene localizado a montante do gene *nifA*, designado Hsero\_2872 (Pedrosa *et al.*, 2011). Este gene possui 642 pares de bases e seu produto codifica uma proteína com 213 aminoácidos. Sua identificação é YP\_003776272.1, posição 3260058 a 3260699 do genoma e apresenta sentido de transcrição contrário ao do gene *nifA*. O produto do gene Hsero\_2872 foi anotado como uma proteína pertencente à superfamília das globinas, que contém globinas e hemoglobinas truncadas. Outras duas globinas foram descritas no genoma de *Herbaspirillum seropedicae*, Hsero\_1880 e Hsero\_2855 (Pedrosa *et al.*, 2011). A primeira teve sua estrutura caracterizada por Razzera e colaboradores (2008) e foi classificada como uma hemoglobina truncada do grupo II. A Hsero\_2855 é uma segunda globina presente no cluster *nif* de *H. seropedicae*. Na figura 2 está mostrada a organização dos genes *nif* em *H. seropedicae* e a posição relativa dos genes Hsero\_2872 e Hsero\_2855.



**FIGURA 2 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO CLUSTER *nif* NO GENOMA DE *H. seropedicae*.** Setas indicam genes, triângulos claros caracterizam mutantes e seus fenótipos. *pA* e *pC* indicam promotores dependentes de NifA ou NtrC respectivamente. *p* indica provável promotor dependente de NifA por análise da sequência de DNA. Números indicam *orfs* de acordo com anotação do genoma (nº de acesso no Gen Bank: NC\_014323) (FONTE: CHUBATSU *et al.*, 2011). Destacada posição dos genes Hsero\_2872 e Hsero\_2855.

### 1.3 Globinas

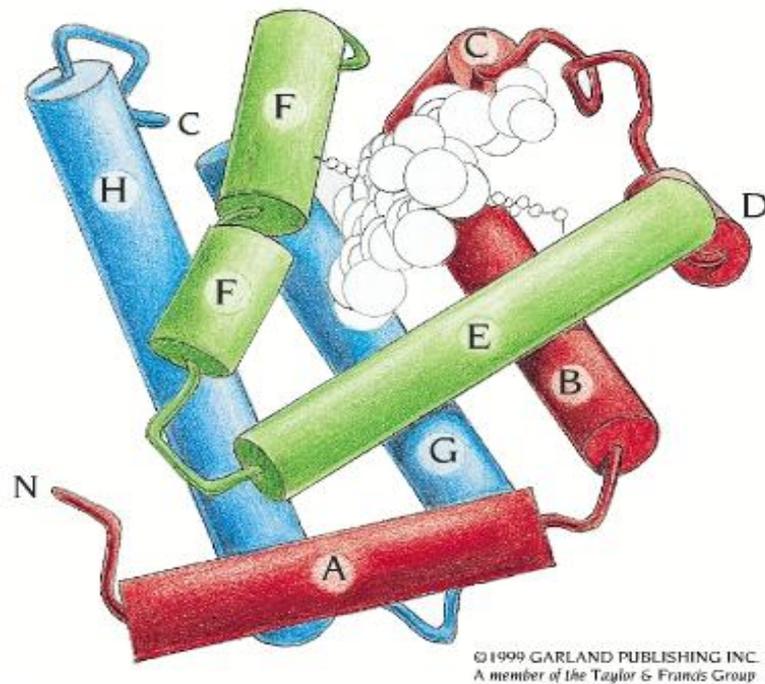
Globinas constituem uma antiga e diversificada superfamília de proteínas. São hemoproteínas que permitem a ligação reversível do oxigênio ao grupo heme (KENDREW *et al.*, 1958). Foram encontradas primeiramente no sangue de vertebrados por causa de sua abundância, mas ocorrem em todos os grupos de organismos, nos três domínios biológicos. A hemoglobina de vertebrados e a mioglobina são, sem dúvida, as globinas mais estudadas. A hemoglobina isolada do sangue de qualquer vertebrado é um heterotetrâmero (duas cadeias alfa e duas beta), com um grupo heme ligado firmemente a cada monômero de globina, e tem a função de levar o oxigênio do pulmão aos tecidos periféricos (BOLTON, COX e PERUTZ, 1968). A mioglobina, uma proteína monomérica, possui estrutura terciária praticamente idêntica à primeira, a clássica estrutura das globinas. Porém, não apresenta a cooperatividade característica das hemoglobinas e tem função de armazenamento e distribuição de oxigênio em muitos tecidos. As plantas, além de produzirem o oxigênio durante o processo de fotossíntese, também usam hemoglobinas para transferi-lo. A primeira hemoglobina de plantas descrita foi descoberta em nódulos nas raízes de legumes (APPLEBY, 1984) que aparecem durante a simbiose entre bactérias do genero *Rhizobium* e a planta, para permitir a fixação biológica do nitrogênio atmosférico. A ligação do oxigênio à leghemoglobina, como foi chamada em plantas, sequestra o oxigênio que é tóxico para a maquinaria de fixação de nitrogênio (HARDISON, 1996). As leghemoglobinas diferem em mais de 80% na composição de aminoácidos em relação às hemoglobinas de vertebrados, porém mantêm a mesma estrutura tridimensional destas últimas. Hemoglobinas não simbióticas, distintas das leghemoglobinas, foram encontradas em raízes, caules e sementes germinadas de muitas outras plantas (LANDSMANN *et al.*, 1986).

A análise cristalográfica de globinas de vertebrados revelou uma estrutura típica que consiste de 6 a 8  $\alpha$ -hélices (nomeadas A – H) conectadas por voltas curtas (PERUTZ, 1979), formando uma estrutura tridimensional em forma de sanduíche (3/3  $\alpha$ -hélices) capaz de ligar o grupo heme com alta afinidade dentro de uma cavidade revestida por resíduos hidrofóbicos. Uma

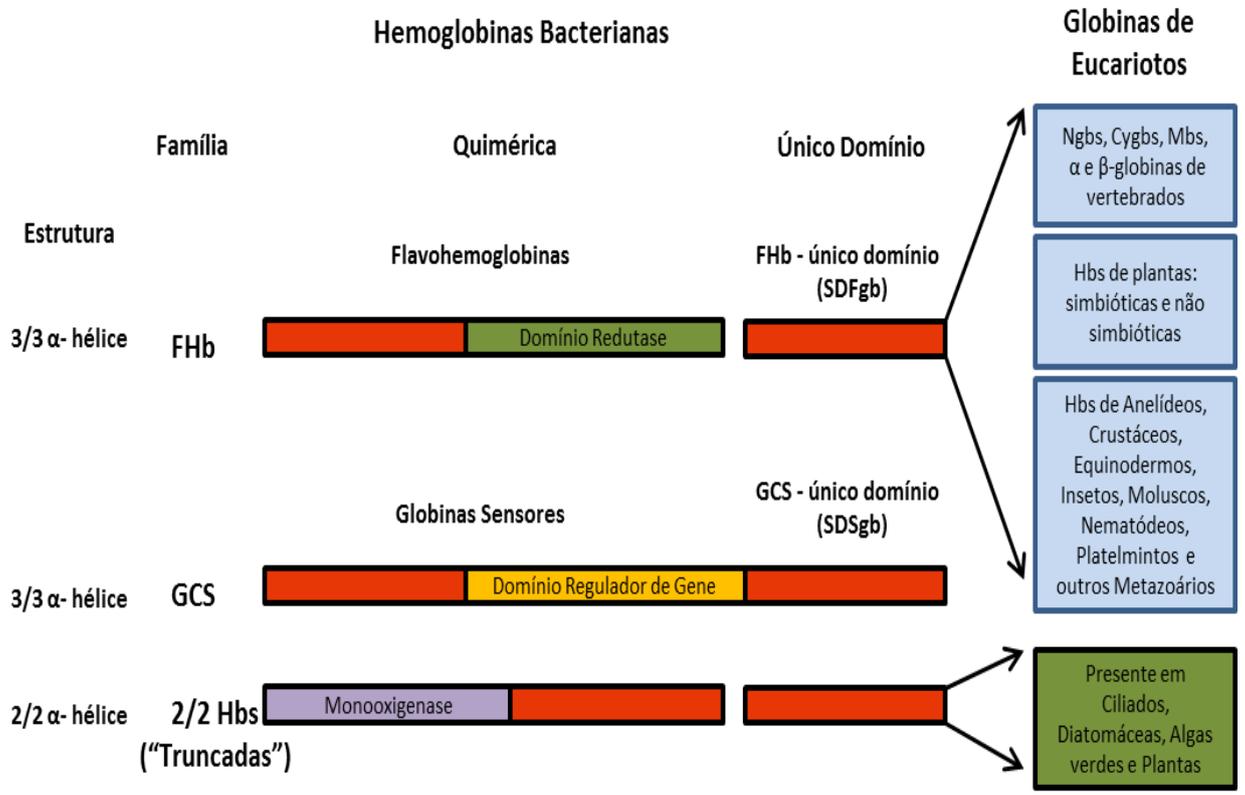
estrutura típica e referente à mioglobina está mostrada na figura 3. Um resíduo invariante de histidina é encontrado na posição F8 e é o responsável pela ligação proximal ao ferro do grupo heme.

Com o fácil acesso à informação genômica dos três domínios biológicos, várias hemoglobinas e globinas putativas têm sido sequenciadas e identificadas. O estudo destas globinas tem revelado que elas se dividem em três famílias e em duas classes estruturais, podendo ainda ser classificadas em globinas quiméricas e globinas único-domínio (VINOGRADOV *et al.*, 2005). As três famílias são: flavohemoglobinas (FHb), globinas-sensor acoplado (GCS) e 2/2Hbs (“hemoglobinas truncadas”). Uma representação das famílias e seus domínios está mostrada na figura 4. Bactérias possuem todos os tipos de globinas, enquanto Arquéias carecem de flavohemoglobinas e Eucariotos não são providos de globinas-sensor acoplado (VINOGRADOV *et al.*, 2006).

A família Flavohemoglobinas (FHb) constitui-se de proteínas quiméricas e de proteínas de único domínio. As quiméricas contêm cerca de 400 resíduos de aminoácidos e possuem um domínio globina N-terminal e um domínio C-terminal ligante de NAD e FAD, semelhante a “ferredoxina-NADH” redutase (MUKAI *et al.*, 2000). Ambas apresentam a típica estrutura 3/3  $\alpha$ -hélice semelhante à mioglobina. A família Globinas-sensor acoplado (CGS) compreende globinas quiméricas (300 a 700 resíduos de aminoácidos) com região N-terminal semelhante à mioglobina e região C-terminal homóloga ao domínio sinalizador citoplasmático de quimiorreceptores bacterianos e único domínio. Sua possível função seria se ligar ao oxigênio diatômico ou outros ligantes gasosos e transmitir o sinal através de um domínio sinalizador (HOU *et al.*, 2001). A família das 2/2 Hbs (ou truncadas) inclui as globinas de único domínio, geralmente menores do que as hemoglobinas de vertebrados, e cuja estrutura cristalográfica exhibe um abreviado modelo 2/2  $\alpha$ -hélice (VULETICH e LECOMTE, 2006). Além disso, as 2/2 Hbs incluem a quimérica monooxigenase 2/2Hb2 (BONAMORE *et al.*, 2007), a única 2/2Hb quimérica conhecida.



**FIGURA 3 – ESQUEMA DE ESTRUTURA TERCIÁRIA DA MIOGLOBINA.** A–H =  $\alpha$ -hélices; N = região N-terminal; C = região C-terminal da proteína; Imagem obtida pelo link: [http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Globinas&lang=3](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Globinas&lang=3)



**FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DAS TRÊS FAMÍLIAS DE GLOBINAS.** Cada uma das famílias compreendendo quiméricas e único domínio e a relação com globinas de eucariotos. A quimérica monooxigenase 2/2Hb2 é a única quimérica 2/2Hb conhecida. Fonte: VINOGRADOV e MOENS, 2008.

### 1.3.1 Hemoglobinas truncadas (2/2 Hbs)

Esta família, conhecida como trHb ou 2/2Hb, é constituída de pequenas hemeproteínas ligadoras de oxigênio, distribuídas em bactérias, plantas e eucariotos unicelulares, formando um grupo distinto dentro da superfamília das hemoglobinas. As trHbs ocorrem em concentração intracelular de nano a micromolar (WITTENBERG *et al.*, 2002) e, geralmente, contem 20 a 40 resíduos de aminoácidos a menos que as hemoglobinas de vertebrados, às quais são pouco relacionadas devido à baixa similaridade entre as sequências. Estruturalmente, as 2/2 Hbs são caracterizadas por um modelo 2/2  $\alpha$ -hélice onde as alfa-hélices antiparalelas B/E e G/H são os principais elementos da estrutura secundária (figura 5). Em relação à estrutura clássica das globinas (3/3  $\alpha$ -hélice), as trHbs apresentam ausência de  $\alpha$ -hélice A ou uma  $\alpha$ -hélice A quase completamente deletada; ausência de hélice D e a região C-D é restrita a três a oito resíduos que fazem uma ponte entre as hélices C e E. A hélice F é substituída por um segmento polipeptídico (pré-F) extenso, seguido de uma volta (grupos I e III), que compreende o resíduo F8 (His) responsável pela coordenação ao ferro do grupo heme (WITTENBERG *et al.*, 2002). Resíduos hidrofóbicos de aminoácidos nas posições C6, C7, CD1, E14, F4, G3, G8 e H11 são responsáveis por prover uma eficiente rede para ligações de van der Waals com o grupo heme. Motivos sequenciais específicos suportam a formação do modelo compacto. Entre estes, dois motivos glicina-glicina, localizados nas voltas AB e EF, e uma glicina localizada imediatamente antes da curta hélice F, ajudam na construção de uma fenda estruturada para ligação do grupo heme em uma cadeia peptídica muito curta. Pouquíssimos resíduos de aminoácidos são muito bem conservados entre as diversas sequências de trHbs, sendo a Histidina-F8 o único resíduo invariante. O par Phe-Tyr é fortemente conservado nas posições B9 e B10, onde a Tyr-B10 participa na estabilização da ligação do grupo heme. O sítio CD1, que nos vertebrados abriga o resíduo Phe, pode apresentar os aminoácidos Phe, Tyr ou His. A posição E14 abriga uma Phe quase invariante, relacionada a uma possível blindagem heme/solvente, juntamente com os resíduos apolares do segmento pré-F (WITTENBERG *et al.*, 2002).

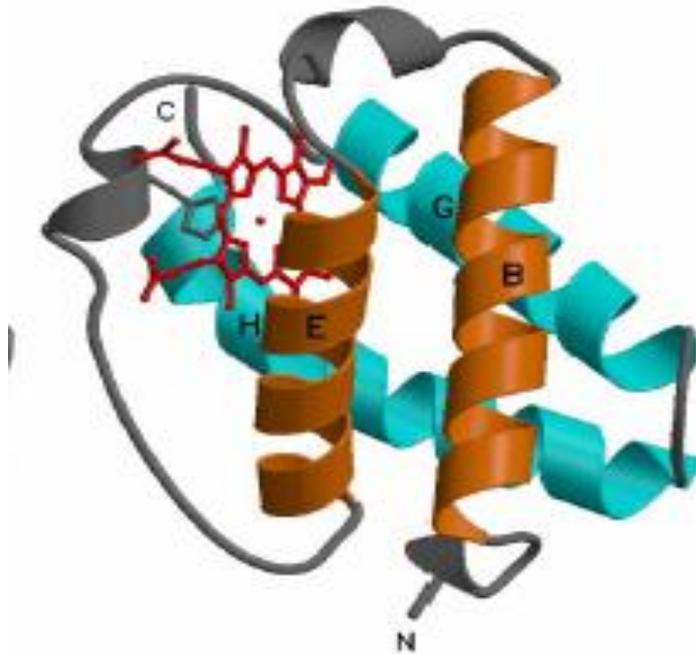
Segundo Pesce e colaboradores (2000 e 2007) as trHbs resultam de uma cuidadosa edição onde sua estabilidade conformacional se deve a substituições e deleções de resíduos de aminoácidos em sítios específicos.

Análises filogenéticas recentes permitiram classificar as hemoglobinas truncadas em três grupos: I (trHbN), II (trHbO) e III (trHbP). A identidade de sequências entre os diferentes grupos é baixa (menos de 20%), mas pode ser bem alta (até 80%) dentro do mesmo grupo. O grupo I é o mais heterogêneo e pode ser separado em dois subgrupos, enquanto o grupo II é comparativamente mais homogêneo e está subdividido em 4 subgrupos (WITTENBERG *et al.*, 2001). O grupo III exibe o maior nível de conservação. Quanto às características estruturais, o grupo I (trHbN) possui um túnel hidrofóbico de acesso ao lado distal do heme, sendo sua formação dependente da ligação do ligante (PESCE *et al.*, 2000). Como resíduos de aminoácidos característicos do grupo I, estão os resíduos formadores das voltas de importância estrutural. Dois pares de glicina, um entre as hélices A e B e um imediatamente após a hélice E, e um resíduo de glicina localizado seis resíduos após o segundo par glicina-glicina, são fortemente conservados. Outro resíduo de interesse é o resíduo de ácido aspártico (D) fortemente conservado entre as hélices B e C (VULETICH e LECOMTE, 2006). A figura 6 mostra um alinhamento entre algumas trHbN, onde estes resíduos são destacados.

O grupo II das trHbs possui maior grau de conservação do que o grupo I, pois cada hélice, exceto hélice A, possui um resíduo fortemente conservado ou de alta similaridade. Uma característica específica é a presença na região entre as hélices E e F de uma “hélice” adicional com 8 resíduos chamada hélice  $\phi$ . Este grupo não possui o túnel hidrofóbico de acesso ao heme detectado no grupo I, entretanto a superfície da globina deste grupo possui uma depressão rasa que provê acesso parcial do solvente ao grupo heme, composto na maioria de resíduos hidrofóbicos (MILANI *et al.*, 2003). A maioria das globinas do grupo II possuem os motivos glicina-glicina conservados no grupo I, sendo os Gly-Gly da volta EF estritamente conservados. O resíduo Tyr-B10 é fortemente conservado, com rara substituição por Histidina (VULETICH e LECOMTE, 2006). Outro resíduo fortemente conservado é o triptofano (W) Trp-

G8 que participa na estabilização do grupo heme. Entre outros resíduos bastante conservados está uma arginina (R) na posição F5 e outra na F7. Resíduos conservados das trHbs II estão mostrados na figura 7.

Apenas um membro do grupo III das trHbs foi caracterizado estruturalmente, até o momento (NARDINI *et al.*, 2006), portanto a análise da sequência é feita baseada em propriedades conhecidas das sequências dos grupos I e II. A maioria das trHbs III vem de Proteobacterias, sendo que as trHbs grupo II das  $\beta$ -proteobacterias apresentam menor conservação que as do grupo III. A posição do grupo heme parece estar mais relacionada àquela do grupo II. O grupo III conta com a maior proporção de posições altamente conservadas. Uma característica observada é a ausência de motivos glicina-glicina neste grupo, indicando que se a estrutura compacta das trHbs for conservada neste grupo, estes motivos não estão envolvidos na formação das voltas. A inserção de três a sete aminoácidos entre as hélices C e E é sempre encontrada no grupo III (PESCE *et al.* 2000). Ao contrário do grupo II, o grupo III apresenta uma Phe invariante na posição CD1. O resíduo Trp G8 também se mostra fortemente conservado (figura 8). O resíduo Tyr B10 bastante conservado parece exibir a mesma função relacionada aos outros grupos, a estabilização das interações com ligantes exógenos. A estrutura do cristal de trHbP de *Campylobacter jejuni* (NARDINI *et al.*, 2006) mostra que no grupo III os únicos resíduos envolvidos na estabilização do heme por ligações de hidrogênio são TyrB10 e TrpG8. Um resíduo importante é uma histidina localizada 26 posições antes da His-F8. Segundo Vuletich e Lecomte (2006) é provável que trHbs do grupo III contenham uma Histidina no sítio distal de ligação ao heme, resíduo que poderia coordenar o ferro na ausência do ligante oxigênio. Um fenômeno que poderia ocorrer nas trHbs grupo III é o estado de ligação do sítio distal estar acoplado ao rearranjo estrutural da proteína.



**FIGURA 5 – EXEMPLO DE ESTRUTURA TERCIÁRIA DAS trHbs.** Estrutura terciária da 2/2 Hb de *Paramecium caudatum*. Em laranja e azul as  $\alpha$ -hélices B-E e G-H. Em vermelho grupo Heme ligado à histidina proximal F8. Fonte: VINOGRADOV e MOENS, 2008.



**FIGURA 6 – ALINHAMENTO DE HEMOGLOBINAS TRUNCADAS DO GRUPO I.** Os dados do alinhamento foram obtidos com o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). (\*) Aminoácidos idênticos; (:) Aminoácidos de alta similaridade; (.) Aminoácidos de baixa similaridade. Resíduos de glicina (G) importantes para formação das voltas, resíduo de ácido aspártico (D) B-C e a histidina (H) F8 destacados em vermelho. *N. punctiforme* e *N. commune* pertencem ao subgrupo II. Letras A a H, acima do alinhamento, correspondem as alfa-hélices tendo como modelo a estrutura secundária de trHbN de *Mycobacterium tuberculosis*. *M. tuberculosis* – *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ; *M. avium* – *Mycobacterium avium* subsp.paratuberculosisK-10; *Synechocystis* – *Synechocystis* sp. PCC6803 ; *T. pyriformis* – *Tetrahymena pyriformis* ; *C. reinhardtii* – *Chlamydomonas reinhardtii* ; *N. punctiforme* – *Nostoc punctiforme* PCC73102 ; *N. commune* – *Nostoc commune* UTEX584.



```

                                B10          CD1
B.vietnamiensis  -----MTSLPASSDTAPARIRDAEPTANIRDLVYAFYDRVRADPLLGPVFDKLDG
Burkholderi      -----MTALPASPSAPARPRDTEPTENIRDLVYAFYDRVRADPLLGPVFDKLEG
S.meliloti1021  MSDELKGHAVQSAAMRERAEAEEMKALGIDEAFIGKLVDTFYARVLAHPELGPVFDARLSG
M.avium          -----MVSGLTMPDLRDRADVEALLRREYGRALDDEVLAEPFARLRAT
                . . . . . : * : * * . . * . *

                                F8          G8
B.vietnamiensis  RWDTHLPKMVSFWSSSLVLGTRGYRGNVQQAHQPLDG---IEPAHFSSRWLSLFLKTVEARY
Burkholderi      RWDTHLPKMVTFWSSSLVLGTRGYRGNVQQAHQPLDG---IEPAHFSSRWLSLFLKTVEARY
S.meliloti1021  RWPEHMEKMS-FWSAVAFRSGAYGGKPVQAHLGVAN---MSPELFPKWLGLFAATLDDIA
M.avium          GLDDHVPTMCDWFETVLFVFRAGRYRGSALQAHARDIHRRTPLSDRHFRRWLTLWHNTVDEMY
                * : . * * * . : : : * * . * * : : . * * * : * :

B.vietnamiensis  TP-AAAVRFMEPALRIAQSLQLSRFGWDYRIPAEQQALLDAIAPRRRDADDDGHALPSRA
Burkholderi      AP-PAAIRFMEPALRIAQSLQLSRFGWDYQIPPEQQALLDAIAPRRRDADDDPHALPSRA
S.meliloti1021  PNEEAKAWFMATAERIARSLTSLF-----YNPALDDPALKRS-----
M.avium          RG-PAADRAKIQAARIAWAMHRRLTGADSPELLVTQVRDDRAPDRTGSDDR-----
                *          * * * * : :          : * * *

```

**FIGURA 8 – ALINHAMENTO DE HEMOGLOBINAS TRUNCADAS DO GRUPO III.**

Os dados do alinhamento foram obtidos com a utilização do programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). (\*) Aminoácidos idênticos; (:) Aminoácidos de alta similaridade; (.) Aminoácidos de baixa similaridade. Resíduos de Tirosina(Y) B10, Fenilalanina (F) CD1, triptofano (W) G8 e a Histidina (H) F8 estão destacados em vermelho. Também destacada a Histidina localizada 26 posições antes da F8.

*B. vietnamiensis* – *Burkholderia vietnamiensis* G4 ; *Burkholderi* – *Burkholderia* sp.383 ; *S. meliloti1021* – *Sinorhizobium meliloti* 1021 ; *M. avium* – *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* K-10.

### 1.3.2 Funções das globinas.

As globinas de vertebrados mais estudadas até o momento apresentam funções bem conhecidas como transporte (Hemoglobina humana) e armazenamento (Mioglobina) de oxigênio. Mais recentemente, tem-se sugerido que a Mioglobina pode também agir como “limpadora” (*scavenger*) de NO (BRUNORI, 2001). Como o NO inibe a respiração, a Mioglobina serviria para proteger a respiração em tecidos onde ela é encontrada, como coração e músculo esquelético. Além disso, foi mostrado que a deoximioglobina possui atividade de nitrito redutase (RASSAF *et al.*, 2007). Mioglobina e Hemoglobinas de metazoários possuem atividade de peroxidase e podem catalisar a oxidação de moléculas biológicas utilizando o peróxido de hidrogênio (REEDER e WILSON, 2005). Dentre as hemoglobinas de plantas, as melhor estudadas são as Leghemoglobinas ou Hemoglobinas simbióticas, encontradas em nódulos resultantes da associação da planta com bactérias. Sua função é manter uma concentração de oxigênio livre baixa o suficiente para impedir a inativação do sistema nitrogenase e providenciar suficiente oxigênio às oxidases terminais da cadeia respiratória (APPLEBY, 1984).

A variedade de hemoglobinas encontradas em espécies microbianas torna claro que as funções de transporte e armazenamento de oxigênio dos vertebrados é uma adaptação relativamente recente e que as funções iniciais devem ter sido enzimáticas e sensoras de oxigênio. Dentre as globinas bacterianas, as que possuem funções melhor estudadas são as da família das Flavohemoglobinas, e a função que se destaca é a proteção contra a toxicidade do NO. A atividade de dioxigenase das Flavohemoglobinas é 20 vezes maior do que a da Mioglobina e Hemoglobina de eucariotos (VINOGRADOV e MOENS, 2008). Outra função é o exemplo da Flavohemoglobina de *E. coli* que liga-se a ácidos graxos insaturados e catalisa a redução de alquilhidroperóxidos aos álcoois correspondentes. Isso sugere que as Flavohemoglobinas podem estar envolvidas no reparo de membranas lipídicas danificadas por oxidação (D`ANGELO *et al.*, 2004).

As Globinas-sensores acoplados são proteínas citoplasmáticas que possuem um N-terminal sensor semelhante à Mioglobina e um domínio

sinalizador semelhante ao domínio sinalizador de quimiorreceptores bacterianos. A função geral das GCSs é ligar o oxigênio diatômico ou outros ligantes gasosos e mediar uma resposta aerotática sobre uma ampla faixa de concentrações de oxigênio (HOU *et al.*, 2001).

A função das Hemoglobinas Truncadas, como um grupo, permanece desconhecida, mas a baixa concentração *in vivo* sugere funções catalíticas em vez de armazenamento de oxigênio. *Mycobacterium tuberculosis* contém uma TrHb grupo I que possui função de detoxificação de NO e uma TrHb grupo II que tem atividade de peroxidase com formação de intermediários férricos (VINOGRADOV e MOENS, 2008). *Nostoc commune*, uma cianobactéria capaz de fixação biológica de nitrogênio, possui uma TrHb grupo I, que é sintetizada em condições de baixa concentração de oxigênio e em células crescidas na ausência de nitrogênio fixado. O gene *trHbI* é localizado adjacente aos genes *nif* no cromossomo. A proteína se localiza na face citosólica da membrana celular e existe uma correlação entre acréscimo de TrHbN e NifH (HILL *et al.*, 1996).

## 2 JUSTIFICATIVA

A regulação da expressão dos genes que codificam proteínas/enzimas envolvidas na fixação de nitrogênio em *Herbaspirillum seropedicae* é dependente do controle da expressão e atividade da proteína NifA, que atua como um ativador transcricional. A presença de possíveis sítios de ligação para a proteína NifA na região a montante do gene Hsero\_2872 sugere que a expressão deste gene seja regulada por NifA e que seu produto possa ter algum papel relevante na regulação da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* ou, apresentar função ainda não descrita que sofre regulação por NifA.

Este trabalho tem o objetivo de auxiliar na elucidação do possível papel da proteína Hsero\_2872 no complexo processo de fixação biológica de nitrogênio pela bactéria *Herbaspirillum seropedicae*.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Caracterizar o gene Hsero\_2872 de *H. seropedicae* SmR1 em relação a seus aspectos estruturais e funcionais.

### **3.2 Objetivos específicos**

1. Analisar *in silico* a sequência do gene Hsero\_2872;
2. Clonar o gene Hsero\_2872 em diferentes vetores;
3. Determinar as condições de expressão da proteína Hsero\_2872;
4. Investigar o possível efeito de ativador transcricional da proteína NifA sobre região promotora do gene Hsero\_2872;
5. Obter um mutante cromossomal do gene Hsero\_2872 e caracterizá-lo fisiologicamente.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Bactérias e plasmídeos

As estirpes de *E. coli* e *H. seropedicae* utilizadas neste trabalho estão listadas nas tabelas 1 e 2 respectivamente. Os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 3.

**TABELA 1 - Estirpes de *Escherichia coli***

Estirpe	Característica	Referência
TOP 10	F- <i>mcrA (mrr-hsdRMS-crBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara 139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen
S 17.1	Sm <sup>R</sup> , Tra <sup>+</sup>	SIMON, PRIEFFER E PUHLER, 1983
ET8000	<i>rbs lacZ::IS1 gyr A hut C<sub>K</sub></i>	MACNEILL, 1982
BL21 (DE3)	<i>Hsd gal (λ clts 857 ind 1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i> (produtora da RNA polimerase do fago T7).	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989.

**TABELA 2 - Estirpes de *Herbaspirillum seropedicae***

<b>Estirpe</b>	<b>Característica</b>	<b>Referência</b>
SmR1	Estirpe selvagem, Sm <sup>R</sup> , Nif <sup>+</sup>	MACHADO <i>et al.</i> ;1995
SmR54	Sm <sup>R</sup> , Nif <sup>-</sup> , Km <sup>R</sup> , <i>nifA</i> ::Km	SOUZA <i>et al.</i> ,1995
DCP286A	Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , <i>ntrC</i> ::Tn5-B20	PERSUHN <i>et al.</i> , 2000
MBFNR2/3/1	SmR1 contendo deleções de aproximadamente 250 nucleotídeos nos genes <i>fnr1</i> , <i>fnr2</i> e <i>fnr3</i>	BATISTA, 2011
EN2872	SmR1 contendo deleção de aproximadamente 230 nucleotídeos na região central do gene Hsero_2872	Este trabalho

**TABELA 3 - Plasmídeos**

<b>Plasmídeo</b>	<b>Característica</b>	<b>Referência</b>
pET28a	Vetor de expressão. Expressa a proteína de fusão com His-Tag/promotor T7. Km <sup>R</sup>	Novagen
pPW452	Tc <sup>R</sup> , vetor fusão transcricional com gene <i>lacZ</i> sem promotor	WODLEY <i>et al.</i> , 1996
pMP220	Tc <sup>R</sup> , vetor fusão transcricional com gene <i>lacZ</i> sem promotor, com sítio de policlonagem do pPW452 invertido	SPAINK <i>et al.</i> , 1987
pSUP202	Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Mob <sup>+</sup>	SIMON, PRIEFFER E PUHLER, 1983
pTZ57R/T	Amp <sup>R</sup> , 3`-T para ligação de fragmentos de DNA amplificados pela Taq Pol	Fermentas
pDB737	Amp <sup>R</sup> , gene <i>nifA</i> de <i>Azotobacter vinelandi</i> clonado no vetor de expressão pT7.7	AUSTIN <i>et al.</i> , 1994
pRW1	Tc <sup>R</sup> , contendo o promotor do gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> em pPW452	WASSEM, 1999
pEMS140	Tc <sup>R</sup> , contendo o promotor do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> em pPW452	REGO <i>et al.</i> , 2006
pMH1701	Km <sup>R</sup> , contém cassete <i>nptI-sacR-sacB</i>	HYNES <i>et al.</i> , 1989
pTZPROM	Produto de PCR com 547 pb contendo região promotora do gene Hsero_2872 ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZEXP	Produto de PCR com 699 pb contendo região codificadora do gene Hsero_2872 ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZDEL1	Produto de PCR com 628 pb contendo parte codificadora inicial do gene Hsero_2872 ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZDEL2	Produto de PCR com 622 pb contendo parte codificadora final do gene Hsero_2872 ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pMPPROM	Fragmento <i>EcoRI</i> e <i>BglII</i> do vetor pTZPROM ligado ao vetor pMP220, linearizado com as mesmas enzimas	Este trabalho

Continua na próxima página

pETEXP	Fragmento <i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i> do vetor pTZEXP ligado ao vetor pET28a, linearizado com as mesmas enzimas	Este trabalho
pEN2872	Fragmento <i>HindIII</i> e <i>BglII</i> do vetor pTZDEL1 e fragmento <i>BglII</i> e <i>BamHI</i> do pTZDEL2 ligados ao vetor pSUP202, linearizado com <i>BamHI</i> e <i>HindIII</i>	Este trabalho
pEN2872sac	pEN2872 contendo cassete <i>sacR-sacB-Km</i> , derivado do vetor pMH1701, ligado ao sítio <i>BamHI</i>	Este trabalho

## 4.2 Reagentes

Antibióticos, enzimas e reagentes foram todos de alto grau de pureza obtidos da Fermentas International Inc., Sigma Chemical Company, Merck Chemical Company, Amersham Biosciences, Invitrogen Inc. (Life Technologies), British Drug House (BDH) e New England Biolabs.

## 4.3 Meios de Cultura e Condições de Cultivo

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 30°C ou 37°C, nos meios líquidos LB (Luria Broth) (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989), SOB (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989) (no caso de preparo de células eletrocompetentes) ou NFDM (Nitrogen-Free Davis and Mingioli) (CANNON *et al.*, 1974) sob agitação (130rpm), ou em meio sólido LA. Após transformação, as células de *E. coli* foram recuperadas em meio SOC (Invitrogen Inc.). Ao meio foram adicionados antibióticos, de acordo com a resistência da estirpe ou do vetor que continham.

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas a 30°C em meio líquido NFb utilizando malato como fonte de carbono (NFb-malato) (KLASSEN *et al.*, 1997), sob agitação (120 rpm). O meio foi suplementado com solução estéril de fosfatos e fonte de nitrogênio (20mmol/L ou 5mmol/L de cloreto de amônio ou 5mmol/L de glutamato de sódio), conforme as concentrações requeridas para cada experimento. Os meios sólido e semissólido foram obtidos pela adição de ágar ao meio NFbHPN líquido nas concentrações de 15g/L e 1,5g/L

respectivamente. Os antibióticos também foram adicionados de acordo com a marca de resistência das diferentes estirpes.

#### 4.3.1 Meios de cultivo

O meio LB tem a composição apresentada na tabela 4. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 4mol/L. O meio sólido LA foi obtido após adição de 15g/L de agar ao meio LB.

**TABELA 4 – Composição do meio LB (Luria Bertani)**

Reagente	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

O meio SOB tem a composição apresentada na tabela 5. O meio SOC foi obtido após a adição de glucose 20mmol/L ao meio SOB.

**TABELA 5 – Composição do meio SOB**

Reagente	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	0,5
Bacto triptona	20,0
Cloreto de potássio	0,186
Sulfato de magnésio	2,4

O meio NFDM é um meio mínimo e tem a composição apresentada na tabela 6. No momento de uso, solução de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  241,2g/L e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  68g/L) foi adicionada ao meio, bem como a fonte de nitrogênio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  20mmol/L).

**TABELA 6 – Composição do meio NFDM**

Reagente	gramas/litro
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,025
Glucose	20

O meio NFb-malato apresenta a composição apresentada na tabela 7. No momento do uso foram adicionados ao meio NFb-malato 50 mL/L de solução de fosfatos (159,4 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 17,8 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), bem como a fonte de nitrogênio na concentração requerida para o experimento.

**TABELA 7 – Composição do meio NFb-malato**

Reagente	gramas/litro
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0,1
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02
CaCl <sub>2</sub>	0,02
Ácido nitrilo acético	5,6x10 <sup>-2</sup>
Biotina	1,0x10 <sup>-4</sup>
Ácido málico	5,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,0x10 <sup>-3</sup>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,4x10 <sup>-3</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8x10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	8,0x10 <sup>-3</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,4x10 <sup>-4</sup>

### 4.3.2 Antibióticos

As concentrações e os antibióticos utilizados na seleção e cultivo das estirpes bacterianas estão apresentados na tabela 8. As soluções estoque foram preparadas como descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Os antibióticos foram adicionados aos meios no momento de uso. Para preparo de meios sólido e semissólido, estes, depois de fundidos, foram resfriados até temperatura de aproximadamente 55°C e então os antibióticos foram adicionados.

**TABELA 8 – Antibióticos utilizados**

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentração inicial</b>	<b>Concentração final <i>E. coli</i></b>	<b>Concentração final <i>H. seropedicae</i></b>
Ác. nalidíxico	10 mg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL
Ampicilina	250 mg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL
Canamicina	100 mg/mL	50 µg/mL	500 µg/mL
Cloranfenicol	30 mg/mL	30 µg/mL	100 µg/mL
Estreptomicina	80 mg/mL	80 µg/mL	80 µg/mL
Tetraciclina	10 mg/mL	10 µg/mL	10 µg/mL

### 4.4 Oligonucleotídeos iniciadores para clonagens em diferentes vetores

Oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com base na sequência de nucleotídeos do gene Hsero\_2872 (figura 10). Sítios de restrição foram inseridos de acordo com os vetores utilizados para clonagem de cada região (tabela 3). Antes da síntese os oligonucleotídeos iniciadores foram testados utilizando o Programa OligoAnalyser (OWCZARZY *et al.* , 2008). A tabela 9 lista os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho.

**TABELA 9 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação das regiões clonadas.**

Oligonucleotídeo	Sequência	Sítio de restrição	Região Amplificada	Temp. de Anelamento (°C)
Prom F	5' ATACTGGAATTCATGCGCTGCCT 3'	EcoRI	PROM	61,0
Prom R	5' CCGGCCAGATCTGGGTCAGATAAC 3'	BglII	547 pb	61,0
Exp F	5' CATCCA GAATTC CCCACT ATGAATGTG 3'	EcoRI	EXP	57,7
Exp R	5' AAGAAA AAGCTT CGGGGCTGCC 3'	HindIII	699 pb	58,4
Del F1	5' CTGAGA AAGCTT GAACCCGCCTTG 3'	HindIII	DEL1	60,4
Del R2	5' CCCGAT AGATCT CACAGCGCCA 3'	BglII	628 pb	60,9
Del F3	5' TTGACG AGATCT GTTTCCCGCCCG 3'	BglII	DEL 2	63,1
Del R4	5' CGAATT GGATCC GCGCGTTGCTGA 3'	BamHI	622 pb	63,8

## 4.5 Manipulação de DNA

### 4.5.1 Amplificação do gene Hsero\_2872 por Reação em Cadeia da Polimerase

A amplificação do gene Hsero\_2872 por PCR utilizou oligonucleotídeos iniciadores desenhados com base na sequência de nucleotídeos do gene disponível no banco de dados do Programa Genopar. Foram inseridos sítios de restrição para enzimas de acordo com o vetor em que os fragmentos amplificados foram clonados. Os iniciadores Universal, Reverso e os iniciadores mutagênicos desenhados foram produzidos pela Invitrogen Inc., ou pela IDT (Integrated DNA Technologies).

A amplificação das regiões do gene Hsero\_2872 de *H. seropedicae* foram feitas pelo método de reação em cadeia da polimerase ou PCR, utilizando como molde DNA genômico de *H. seropedicae* SmR1, em termociclador Mastercycler Gradient da Eppendorf.

O sistema de reação para um volume final de 20µL foi composto de: 0,2U de enzima Taq DNA polimerase (Fermentas Int. Inc.), tampão para Taq

[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] na concentração de 1x o volume final de reação, 1-5ng/mL de DNA genômico de *H. seropedicae*, 0,5pmol/L de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,2mol/L de dNTPs e 1,5mmol/L de MgCl<sub>2</sub>. As condições de reação foram: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 15 segundos, temperatura de anelamento (variável para cada dupla de iniciadores) por 30 segundos, 72°C por 45 segundos, seguidas de 1 ciclo de 72°C por 5 minutos.

#### **4.5.2 Purificação de DNA plasmidial em pequena escala**

A extração de plasmídeos foi realizada segundo o método de lise alcalina modificado (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989). A cultura bacteriana foi coletada por centrifugação a 13.400 rpm por 30 segundos e ressuspensa em 200µL de solução GET (glucose 50mmol/L, Tris.HCl 25mmol/L pH 8.0 e EDTA 10mmol/L) com 1µL de RNase (Invitrogen Inc.). As células foram lisadas pela adição de 200µL de solução com SDS 1% e NaOH 0,18mol/L e leve homogeneização. Foi então adicionado 200µL de solução de KAcF (acetato de potássio 3mol/L, pH 4,8 e ácido fórmico 1,8mol/L) e a mistura foi incubada por 15 minutos no gelo. A mistura foi centrifugada a 13.400 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, tratado com 200µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), misturado com auxílio de vórtex e centrifugado por 5 minutos a 13.400 rpm. A fase aquosa foi retirada com auxílio de uma pipeta, transferido para novo tubo e o DNA plasmidial precipitado com a adição de álcool isopropílico (concentração final de 60%). Após homogeneização vigorosa e centrifugação a 13.400 rpm por 10 minutos, o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 70% e seco à temperatura ambiente. O material plasmidial foi ressuspensado em 30 µL de água destilada esterilizada e estocado à -20°C. Os plasmídeos purificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989).

#### **4.5.3 Clivagem de DNA com enzimas de restrição**

As amostras de DNA foram clivadas utilizando as condições mais adequadas (temperatura, tempo, tampão de reação, proporção enzima/DNA) para a atividade de restrição, conforme indicado pelo fabricante da enzima. As enzimas utilizadas na linearização dos vetores foram as correspondentes aos sítios de restrição nos oligonucleotídeos desenhados para cada segmento amplificado.

#### **4.5.4 Ligação dos fragmentos de DNA aos respectivos vetores**

As reações de ligação foram feitas segundo SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989), nas condições específicas para atividade máxima da enzima. Foram utilizados 2 $\mu$ L de vetor (aproximadamente 50ng/ $\mu$ L), 10 $\mu$ L de inserto (aproximadamente 100ng/ $\mu$ L), 2 $\mu$ L de tampão para a enzima T4 DNA Ligase (10X) e 0,5 U de T4 DNA Ligase, para um volume final de 20 $\mu$ L. A reação foi incubada a 4 °C durante um período de 12 horas.

#### **4.5.5 Preparo dos vetores**

Os vetores utilizados foram clivados com as enzimas de restrição adequadas para as clonagens e a purificação dos vetores foi realizada segundo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). A preparação dos vetores foi feita através da clivagem dos plasmídeos de interesse com as enzimas de restrição adequadas, em uma reação com volume final de 100 $\mu$ L, com 30 $\mu$ L do plasmídeo preparado como descrito no Item 4.4.2, e cerca de 10 unidades de enzima. O material foi incubado a 37 °C durante a noite. Todo o volume foi aplicado em gel de agarose para separação, confirmação da restrição e purificação dos fragmentos através da utilização dos kits Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

#### **4.5.6 Eletroforese de DNA em gel de agarose**

Os segmentos de DNA, após amplificação e restrição, foram analisados em gel de agarose a 1%, horizontal e tampão TBE 1X (Tris-borato 40 mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,3), conforme descrito por SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989). O DNA foi visualizado após tratamento com brometo de etídio (0,5µg/mL) por 10 minutos. O complexo DNA-brometo de etídio foi analisado em transiluminador ultravioleta (312nm) EC3 System – UVP Biolmaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA-USA) e o perfil eletroforético foi registrado em um sistema de vídeo documentação (UVP). O tamanho dos fragmentos foi estimado com base na comparação com marcador de peso molecular 1Kb ladder (Fermentas Int. Inc.).

#### **4.5.7 Reação de sequenciamento**

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando dideoxinucleotídeos terminadores de cadeia marcados com fluoróforos, seguindo metodologia descrita por Sanger, Nicklen e Coulson (1977). Nesta reação foram utilizados 2 pmol dos primers apropriados, aproximadamente 200 a 400ng do DNA plasmidial purificado e 3µL de mistura para sequenciamento Sequencing Reagent Premix (DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, GE Healthcare Biosciences), num volume final de reação de 7,5µL.

A reação foi realizada utilizando o termociclador Mastercycler Gradient da Eppendorf. As condições de reação foram: 1 ciclo de desnaturação a 95°C por 1 minuto e outro para anelamento e extensão a 60°C. O produto da reação foi precipitado com a adição de 60µL de etanol absoluto, 2µL de acetato de amônio 7,5mol/L e centrifugação a temperatura ambiente a 14.000 rpm por 20 minutos. O precipitado foi lavado com 150µL de etanol a 70%. Após secagem completa o precipitado foi dissolvido em 4µL de Formamide Loading Dye (Applied Biosystems), desnaturado por 2 minutos a 96°C e submetido à eletroforese em sequenciador de DNA ABI-PRISM 377 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram submetidas à análise utilizando o programa Bioedit (HALL, 2001).

## **4.6 Transformação Bacteriana**

### **4.6.1 Preparo de células competentes de *E. coli***

As células de *E. coli* foram tornadas competentes conforme protocolo para o eletroporador Cell-Porator Voltage Booster (Invitrogen Inc.), ou utilizando TSS (“*Transformation and storage solution*”) segundo Chung, Niemela e Miller (1989).

#### **4.6.1.1 Preparo de células eletrocompetentes**

Células de *E. coli* (TOP10, S17.1, ET8000) provenientes de uma cultura saturada, previamente crescida em LB durante a noite, foram diluídas 1:100 em meio SOB fresco em um frasco do tipo erlenmeyer e cultivadas a 37°C e 130 rpm por aproximadamente 4 horas ou até que a cultura de células alcançasse uma D.O<sub>595nm</sub> entre 0,2 – 0,4. As células foram transferidas para tubos tipo Falcon, deixadas por 15 minutos em banho de gelo e centrifugadas a 2.500 x g por 8 minutos a 0°C. As células foram posteriormente lavadas por 2 vezes com água ultrapura, esterilizada e gelada. A ressuspensão das células foi feita com a água residual após a segunda lavagem.

#### **4.6.1.2 Preparo de células competentes (protocolo TSS)**

Cultura saturada de células de *E. coli* estirpes TOP10, S17.1 ou ET8000 crescidas em LB durante a noite, foram diluídas 1:100 em meio SOB em frasco tipo erlenmeyer. Após um período de cultivo de aproximadamente 3 a 4 horas ou até que a cultura de células alcançasse uma D.O<sub>595</sub> entre 0,2–0,4, alíquotas de 1mL foram transferidas para microtubos de 1,5mL previamente gelados. O material foi centrifugado em centrífuga *minispin* Eppendorf® a 13.400 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente, e as células foram ressuspensas em 100µL de TSS (LB contendo 10%PEG 6000, 50mmol/L MgCl<sub>2</sub> e 5%DMSO).

#### **4.6.2 Eletroporação**

Para eletroporação, 35µL de células competentes e 1µL do plasmídeo de interesse foram misturados e acondicionados em cubeta para eletroporação. O aparelho foi ajustado para a aplicação de diferença de potencial de 16 a 21kV/cm e um campo elétrico de 4Ω/µF à câmara de eletroporação, com tempo de pulso de 6 a 10ms. Após o choque, as células foram recuperadas em 900µL de meio SOC por 1 hora a 37°C. Em seguida, foram inoculadas em placas contendo meio LA e os antibióticos necessários para a seleção dos clones e, então, incubadas a 37°C durante um período de 12 a 16 horas.

#### **4.6.3 Transformação por Choque Térmico**

Plasmídeos íntegros ou ligações foram misturados a uma suspensão de 100µL de células competentes na proporção de 1:100 e incubadas em banho de gelo por 30 minutos. Após este tempo, a mistura foi levada a banho-maria a 42°C por 30 segundos e incubada novamente em gelo por 2 minutos. Após o choque as células foram recuperadas em 900µL de meio SOC por 1 hora a 37°C.

#### **4.6.4 Transferência de plasmídeos por conjugação**

Os plasmídeos a serem transferidos para as estirpes de *H. seropedicae* foram mantidos em *E. coli* S17.1 (tra<sup>+</sup>). As estirpes de *H. seropedicae* e *E. coli* foram cultivadas em meios NFbHPN-malato e LB respectivamente. Após 16 horas, foram reinoculadas (1:100) nos mesmos meios e incubados por 6 e 3 horas respectivamente, e em seguida misturadas na proporção de 1:20, num volume final de 1050µL. A mistura foi centrifugada e uma gota (aproximadamente 50µL) foi aplicada em meio sólido contendo meios LA e NFbHPN-malato (1:3). Após 16 horas a massa foi raspada, diluída em 1mL de meio NFbHPN-malato e 250µL da suspensão foi plaqueada em meio NFbHP-malato sólido com o antibiótico adequado para seleção dos transconjugantes.

As colônias selecionadas foram confirmadas por análise de restrição e/ou amplificação por reação de PCR dos plasmídeos extraídos.

#### **4.7 Expressão do gene Hsero\_2872**

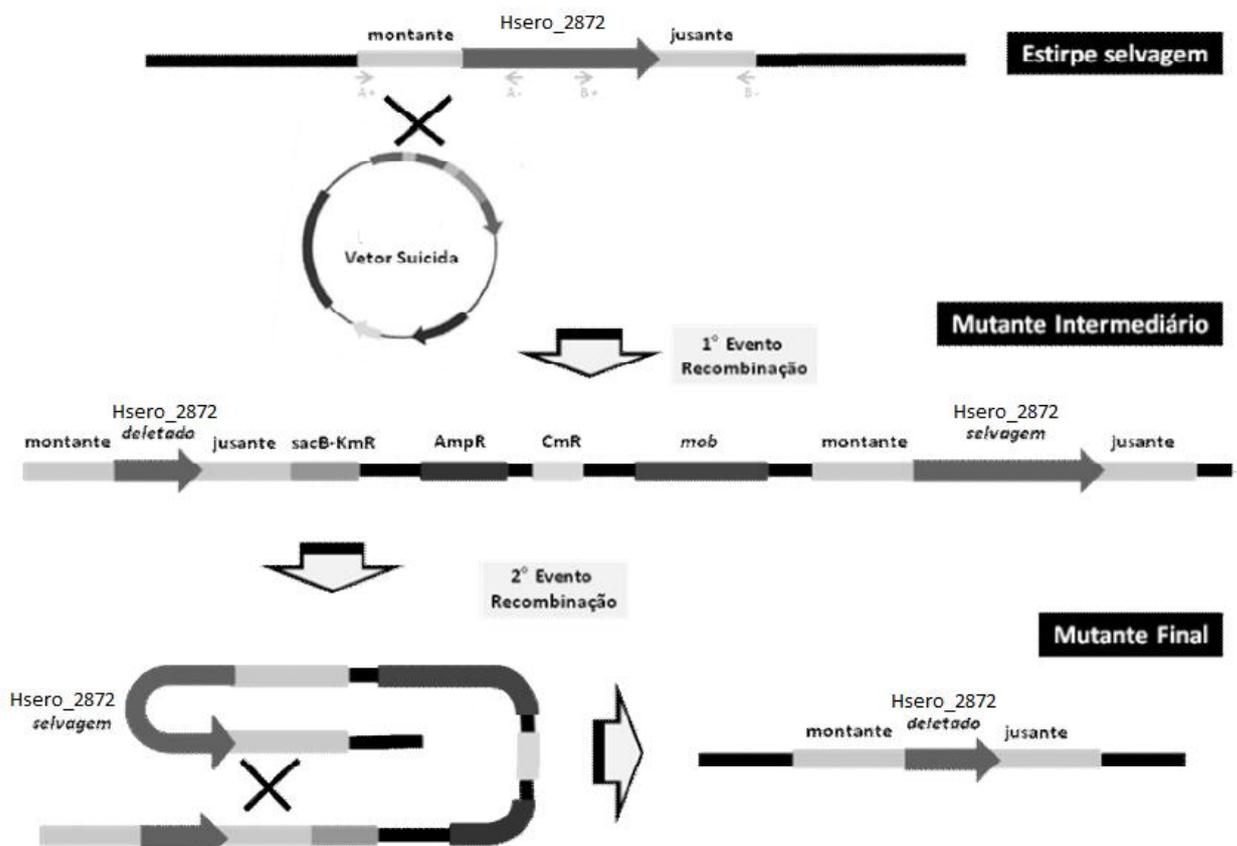
Após a clonagem do gene Hsero\_2872 no vetor pET28a, o plasmídeo construído foi transformado em *E. coli* BL21(DE). A expressão gênica foi induzida com IPTG, utilizando a metodologia descrita por Monteiro (2001). A proteína expressa foi analisada através de separação eletroforética em condições desnaturantes em géis de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE), segundo o procedimento descrito por Laemmli (1970).

#### **4.8 Mutagênese do gene Hsero\_2872**

Com o objetivo de caracterizar o fenótipo de um mutante do gene Hsero\_2872, foi realizada a deleção de aproximadamente 230 bp da região central do gene. Para isso, um fragmento de aproximadamente 620 bp contendo regiões a montante e a jusante do gene Hsero\_2872 foram amplificadas e clonadas em vetor utilizado para mutagênese, juntamente com um marcador de seleção negativa, o gene *sacB* (Gay *et al.*, 1983). A expressão desse gene é letal quando *H. seropedicae* é cultivada em meio contendo sacarose. A levano-sucrase codificada por este gene catalisa a formação de polímeros de frutose no envelope celular que são em seguida liberados para o meio de cultura. Em bactérias Gram negativas, a expressão do gene, em presença de sacarose, leva ao acúmulo destes polímeros no espaço periplasmático, resultando na lise da célula bacteriana (STEINMETZ *et al.*, 1983). O cassete contendo o gene *sacB*, obtido a partir do vetor pMH1701 (HYNES *et al.*, 1989), por restrição com a endonuclease BamHI, possui um gene de resistência a canamicina, o que permitiu a seleção de bactérias que tiveram a integração do vetor ao DNA cromossomal.

O vetor suicida, construído com a fusão das regiões a montante e a jusante do gene Hsero\_2872, amplificadas e do cassete *sacB*, foi conjugado em *H. seropedicae* estirpe SmR1 e as estirpes resistentes ao antibiótico

canamicina foram selecionadas em placas em meio NFbHPN-malato-Km. A ocorrência deste primeiro evento de recombinação foi confirmada por PCR, onde se detectou a presença de 2 cópias (selvagem e deletada) do gene Hsero\_2872. As colônias selecionadas foram reinoculadas em meio contendo sacarose 5%, sem antibiótico, para seleção das estirpes que sofreram o segundo evento de recombinação (eliminação do vetor suicida). Um esquema da estratégia de mutagênese está representado na figura 9 (BATISTA, 2011, com modificações).



**FIGURA 9 – ESQUEMA DA ESTRATÉGIA DE MUTAGÊNESE DO GENE HSERO\_2872.** Num primeiro evento de recombinação o vetor suicida inteiro é integrado ao genoma de *H. seropedicae*. O vetor suicida é eliminado no segundo evento de recombinação, permanecendo apenas a cópia mutada do gene. Fonte: BATISTA, 2011, com modificações.

#### 4.9 Determinação de atividade de $\beta$ -galactosidase

A determinação de atividade de  $\beta$ -galactosidase para avaliar a funcionalidade de um provável promotor do gene Hsero\_2872 de *H. seropedicae* foi feito segundo Miller (1990).

Estirpes de *E. coli* ou *H. seropedicae* foram pré-inoculadas em meio NFDM e NFbHP-malato (20mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), respectivamente. Após alcançarem a saturação foram reinoculadas nos respectivos meios numa D.O<sub>595 nm</sub> inicial de 0,1. Alíquotas foram coletadas em diferentes tempos e determinada a D.O<sub>595 nm</sub>. Alíquotas de 100 $\mu\text{L}$  coletadas foram misturadas a 900 $\mu\text{L}$  de tampão Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  60mol/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  40mol/L, KCl 10mol/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1mmol/L,  $\beta$ -mercaptoetanol 50mmol/L e SDS 0,0027% pH 7,0) em microtubos de 2,0mL. À mistura foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e o sistema de reação foi agitado em vórtex por aproximadamente 15 segundos para lise das células. A mistura foi incubada por 5 minutos a 30°C e a reação foi iniciada pela adição de 200 $\mu\text{L}$  de ONPG (o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactosídeo 4mg/mL preparado em tampão Z com adição de  $\beta$ -mercaptoetanol 50mmol/L e SDS 0,0027%). A reação foi interrompida pela adição de 500 $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1mol/L em diversos tempos. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13.400 rpm e o sobrenadante foi levado para determinação da absorbância em 415nm e 550nm.

#### 4.10 Determinação de Atividade de Nitrogenase

A atividade de nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno (DILWORTH, 1966; SCHÖLLHORN & BURRIS, 1967) em estirpes SmR1 e EN2872 de *H. seropedicae* conforme metodologia descrita por KLASSEN (1997).

Inóculos crescidos em meio NFbHP-malato (com 5mmol/L de glutamato) foram reinoculados em meio NFbHP-malato semissólido suplementado com 0,5mmol/L de glutamato, sem antibióticos, em frascos de 10mL e vedados com rolhas de borracha. Acetileno gasoso na proporção de 10% da fase gasosa foi injetado. A cultura foi incubada a 30°C por 1 hora, então uma amostra de 0,5mL

da fase gasosa foi coletada para análise. A quantificação do etileno formado foi feita em 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 o nitrogênio. Após análise, o meio semissólido foi homogeneizado em vórtex e o material coletado para ensaio de determinação da concentração de proteínas pelo método descrito por Bradford. A atividade de nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína na cultura.

#### **4.11 Dosagem de proteínas**

A dosagem de proteínas foi feita utilizando-se o método colorimétrico descrito por Bradford (1976). O método se baseia na ligação de Comassie Brilhante Blue G-250 à proteína e então determinação da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro.

Para quantificação, 30µL da cultura em meio semissólido homogeneizada foi lisada com adição de 30µL de NaOH 0,4mol/L por aproximadamente 1 hora à temperatura ambiente. Após a lise, 30µL da mistura foi transferido para placa de ELISA (Greiner Bio One) e então adicionado 170µL de reativo de Bradford (Comassie Brilhant Blue G-250 100mg/L, metanol 40mol/L e ácido fosfórico 85% 120mol/L). A solução foi homogeneizada e sua absorbância a 595nm determinada em leitor de microplacas (ELX 800 BIO-TEK Instruments). A curva padrão foi determinada utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise *in silico* da sequência nucleotídica do gene Hsero 2872

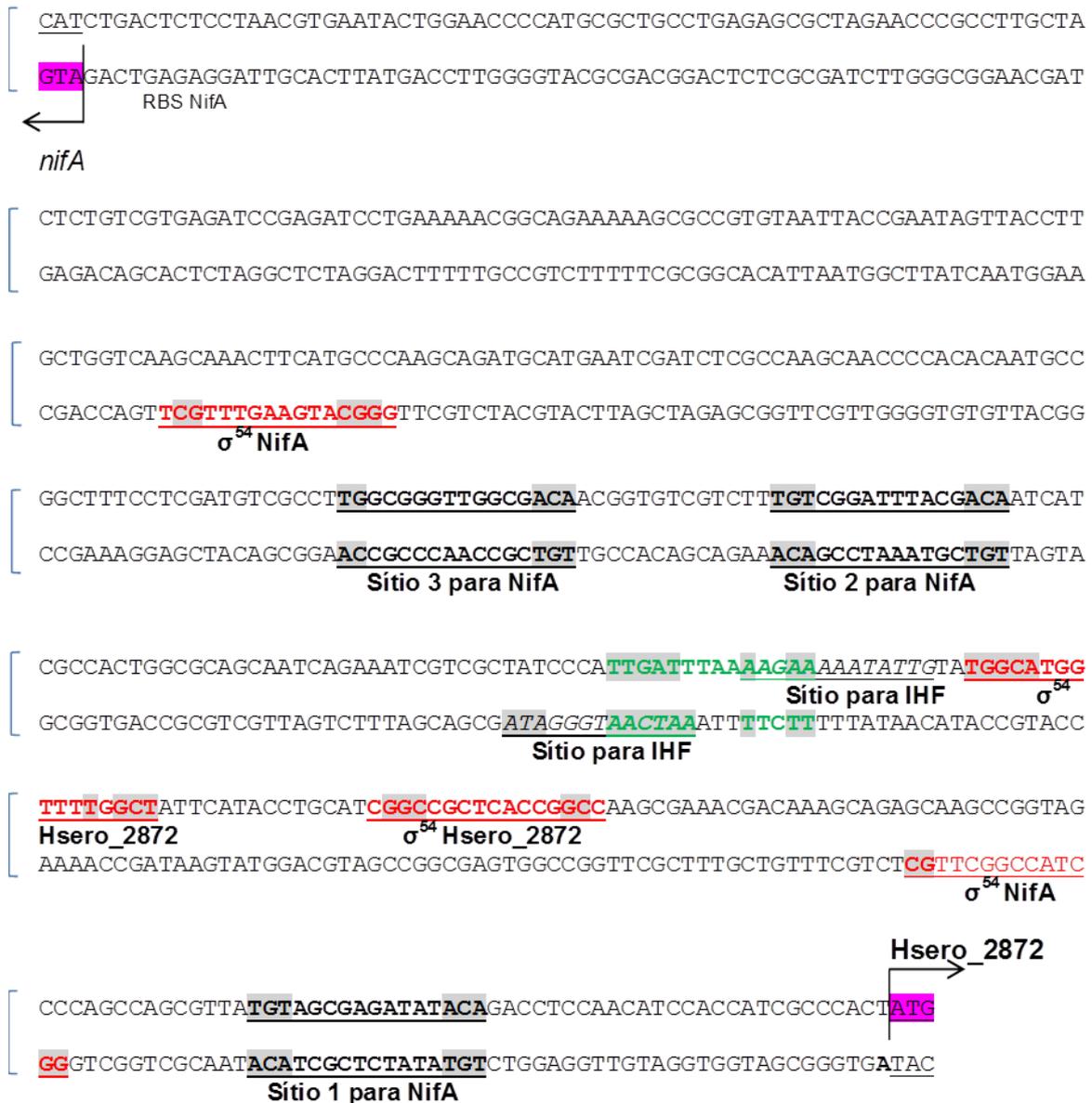
O gene Hsero\_2872 de *H. seropedicae* SmR1 possui 642 pares de bases e está localizado na posição 3260058-3260699 do genoma (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A sequência do gene Hsero\_2872, bem como regiões a montante e a jusante estão mostradas na figura 10.

Na região a montante do códon de início de tradução pode-se observar prováveis sítios de ligação para a proteína NifA (5'**TGT**-N<sub>10</sub>-**ACA**-3') (BUCK *et al.*, 1986) e um provável promotor dependente de  $\sigma^{54}$  (T**GGCAC**-N<sub>5</sub>-**TTGC**) (MERRICK e EDWARDS, 1993). Também existem uma provável região de ligação para a proteína IHF (5'**WATCAA**-N<sub>4</sub>-**TTT**3') (CRAIG e NASH, 1984) e uma sequência para ligação à proteína FNR (**TTGAT**-N<sub>4</sub>-**ATCAA**) (GUEST *et al.*, 1996), que estão parcialmente sobrepostas.

Na região intergênica *nifA*/Hsero\_2872 (figura 11), os prováveis sítios de ligação para NifA da região promotora do gene Hsero\_2872 correspondem aos mesmos sítios de ligação para NifA da região promotora do gene *nifA*, já bem estudados por Wassem e colaboradores (2000). O mesmo acontece para a proteína FNR, porém não para a proteína IHF e prováveis promotores  $\sigma^{54}$ .

ACTGGAACCCCATGCGCTGCCTGAGAGCGCTAGAACCCGCCTTGCTACTCTGTCTGAGATCCGAGATCC  
 TGAAAAACGGCAGAAAAAGCGCCGTGTAATTACCGAATAGTTACCTTGCTGGTCAAGCAAACCTTCATGCC  
 CAAGCAGATGCATGAATCGATCTCGCCAAGCAACCCACACAATGCCGGCTTTCCTCGATGTCGCCTTGG  
 CGGGTTGGCGACAACGGTGTCTTTGTTCGGATTACGACAATCATCGCCACTGGCGCAGCAATCAGAA  
 ATCGTCTGCTATCCCATTTGATTTAAAAGAAAAATATTGTATGGCATGGTTTTGGCTATTTCATACCTGCATC  
 GGCCGCTCACCGGCCAAGCGAAACGACAAAGCAGAGCAAGCCGGTAGCCAGCCAGCGTTATGTAGCGAG  
 ATATACAGACCTCCAACATCCACCATCGCCCACTATGAATGTGCCTTCGACTTCCGAACCCGGTGCACCA  
 CGTGCCTGCTGGGCGCCCTGCTCCAGGCATGTTATCTGACCCTGAACTGGCCGGTGCAGCGCCCGGCGA  
 TGGCGCGCGGCACGCAACAGGTGATATGTGAGCCGCCACAATTACCTCAACCGGCGCACCGGTTGCTGGC  
 GCTGTGTGATGAATCCGGCTTGCGCAAACCTGGTGTGCATCATATGCGGCGCCTGCGCCATTCCTCCGCTG  
 TTCGCACGTTTCGACAATTGTTTTGATTGCGTCAGCTCGCGCATCGCCACTTCGTGGTGGAGTCATGCG  
 GCGGTCCGCTCTACTACAGCCAACGCCATGCCATCTGCAAGCGGGCGCAGGCTTGCCGTTGCTATTGGA  
 CGAAGCTGGGCGCGAACTGTGGCTGGTACAGCTTTGGCATACTTTGACGATATCGGTTTCCCGCCCGCG  
 CTGCGGGCCGACTTCTGGGCTGGGCGAACCCTTGTCGATTCATCTGCTGGTACGTCATGCGCGCGTTCG  
 AACCGCCGCGGCGCTACCCCTATGAGCTGGTACGCAGCTGGTTCCACTCGCCCGCCACCGACATGCTGCC  
 GCCGATAGCGGATCTGATCCGGCCATCGGGAAGATCCGAATCATGACCCTGCGCCATCCGGCATCGCATCC  
 CCGCATCTGTTTCTTGATGCGGCCGGTCTGAGCGATGTCCAACCTCTTTTCCCGTGAACCTGCCATGCCG  
 GATTACCCGCAACGCTACGGCGTCTTCTCAATGTGCGAAAATCCCCATGGCAACGCACGCGATGCGCTGT  
 TGCAGACCGTCGATCATGCCGTCGTGGCAGAGGCCCTGGGCTATCACGATGTCTGGGTGCGCGAGCACCA  
 TTACAGCAGCTTCGCCATCGGCAGCGCCTTGATGGTGTGCTGGCCCAGATCGCCGCACGCACTTCGCGC  
 ATCCGCTCGGTACGGGCGCTTCGTTGCTGGCGCTCAATGATCCCTTGCGGGTTGCCGAGGACGTCGCCA  
 CGCTGGACCTGCTCAGCAACGGCCGGATGGAATTCGGCGTGGCACGCGGCGGCCGTTTCCCGAGCAATA  
 TCGTCACGCCGATTGAGCGGTGCCGATCAGGCGCGCACGCATGATTGAAGCACTGGACGTCATCCAG

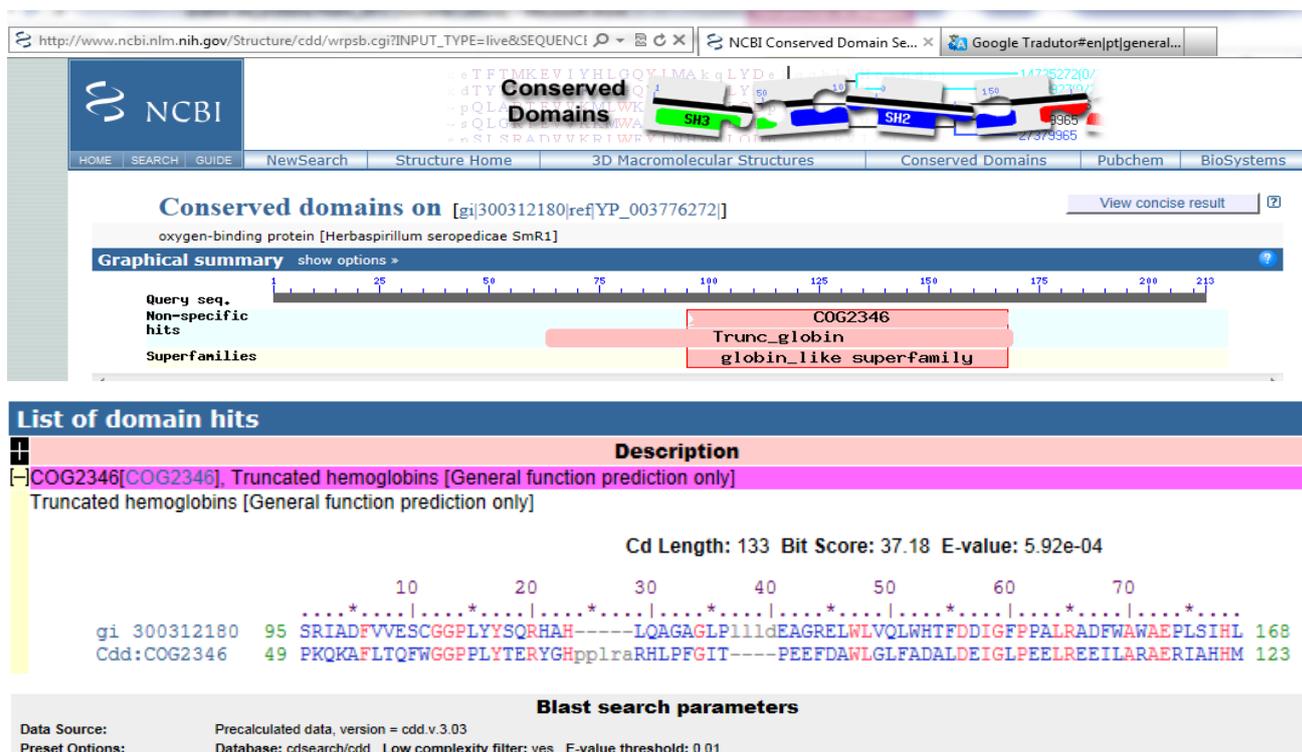
**FIGURA 10 – SEQUÊNCIA DO GENE HSERO\_2872 E REGIÕES A MONTANTE E A JUSANTE.** Em amarelo códon de início (ATG) e término (TGA) da tradução; em rosa prováveis sítios de ligação para a proteína NifA; em vermelho prováveis promotores dependentes de sigma<sup>54</sup>; em verde provável sítio de ligação para proteína FNR; sublinhado e em itálico provável sítio de ligação para a proteína IHF.



**FIGURA 11 – REGIÃO INTERGÊNICA *nifA*/Hsero\_2872** Em rosa códons de início (ATG) da tradução das proteínas NifA e Hsero\_2872; em vermelho prováveis promotores dependentes de sigma<sup>54</sup>; em verde provável sítio de ligação para proteína FNR; realçado em cinza estão as sequências consenso regulatórias conservadas; em itálico e sublinhado provável sítio de ligação para proteína IHF; sítios de ligação para a proteína NifA e RBS na região promotora do gene *nifA* estão mostrados.

## 5.2 Análise *in silico* da proteína codificada pelo gene Hsero\_2872

O gene Hsero\_2872 codifica uma proteína de 213 aminoácidos. A análise por alinhamento de sequência de aminoácidos pelo programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) revelou a presença de domínio conservado relacionado à Superfamília das globinas, que contém globinas e hemoglobinas truncadas (COG2346) (figura 12).



**FIGURA 12 – PREDIÇÃO DA FUNÇÃO GERAL DA PROTEÍNA. COG2346 – domínio conservado de hemoglobinas truncadas. gi/300312180/YP\_003776272.1= identificação do gene Hsero\_2872. Em vermelho: aminoácidos conservados.**

Em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT\\_TYPE=live&SEQUENCE=YP\\_003776272.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=YP_003776272.1)

A sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene Hsero\_2872 foi homóloga às sequências de aminoácidos das seguintes proteínas: proteína Bch1\_08802 de *Burkholderia* sp. 1-1 (67% de identidade), proteína Bxe\_B1477 de *Burkholderia xenovorans* LB400 (72% de identidade) e proteína Bcep1808\_6027 de *Burkholderia vietnamiensis* G4 (62% de identidade). Estas proteínas encontram-se também no cluster nif do genoma das respectivas bactérias. Outras proteínas com identidade menor que 40% são listadas na tabela 10. Mesmo apresentando identidade baixa, a maioria das proteínas listadas foram anotadas como globinas. Pode-se então assumir que a proteína codificada pelo gene Hsero\_2872 é uma globina, ratificando o anotado no genoma de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (PEDROSA *et al.*, 2011).

**TABELA 10 – Porcentagem de identidade da proteína HSERO\_2872 com outras proteínas disponíveis no banco de dados do NCBI**

<b>Acesso (NCBI)</b>	<b>Identificação</b>	<b>Identidade (%)</b>
<a href="#">ZP_09817512.1</a>	hypothetical protein BCh1-_08802 [Burkholderia sp. Ch1-1]	67
<a href="#">YP_553837.1</a>	>gb ABE34487.1  hypothetical protein Bxe_B1477 [Burkholderia xenovorans LB400]	72
<a href="#">YP_001115207.1</a>	>gb ABO58952.1  hypothetical protein Bcep1808_6027 conserved hypothetical protein [Burkholderia vietnamiensis G4]	62
<a href="#">YP_005554302.1</a>	>dbj BAK73985.1  globin [Arcobacter sp. L] unnamed protein product [Arcobacter sp. L]	32
<a href="#">YP_001939874.1</a>	Hemoglobin-like protein [Methylacidiphilum inferorum V4]	37
<a href="#">ZP_10016912.1</a>	>gb ACD83276.1  Hemoglobin-like protein Hemoglobin-like protein [Methylacidiphilum fumarolicum SoIV]	35
<a href="#">YP_004060016.1</a>	>emb CCG92785.1  Hemoglobin-like protein >gb ADR33816.1  globin	34
<a href="#">YP_002219642.1</a>	globin [Sulfuricurvum kujiense DSM 16994]	31
<a href="#">EGQ61218.1</a>	>gb ACH83435.1  globin [Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC 53993] >gb ACK78005.1  conserved domain protein hypothetical protein GGI1_05241 [Acidithiobacillus sp. GGI-221]	31
<a href="#">YP_001490471.1</a>	>gb ABV67801.1  protozoan/cyanobacterial globin-like protein [Arcobacter butzleri RM4018]	28
<a href="#">YP_005538972.1</a>	>dbj BAK71162.1  conserved hypothetical protein [Arcobacter butzleri ED-1]	28
<a href="#">ZP_07892782.1</a>	>gb EFU68892.1  conserved hypothetical protein [Arcobacter butzleri JV22]	28
<a href="#">YP_005554228.1</a>	>dbj BAK73911.1  conserved hypothetical protein [Arcobacter sp. L]	29
<a href="#">YP_003655409.1</a>	>gb ADG92902.1  globin [Arcobacter nitrofigilis DSM 7299]	24
<a href="#">YP_004041281.1</a>	>gb ADQ78296.1  globin [Paludibacter propionicigenes WB4]	27
<a href="#">YP_003891909.1</a>	>gb ADN08897.1  globin [Sulfurimonas autotrophica DSM 16294]	26
<a href="#">YP_004059098.1</a>	>gb ADR32898.1  globin [Sulfuricurvum kujiense DSM 16994]	29
<a href="#">YP_004060307.1</a>	>gb ADR34107.1  globin [Sulfuricurvum kujiense DSM 16994]	30
<a href="#">YP_003892868.1</a>	>gb ADN09856.1  globin [Sulfurimonas autotrophica DSM 16294]	28
<a href="#">YP_003656287.1</a>	>gb ADG93780.1  globin [Arcobacter nitrofigilis DSM 7299]	25

<a href="#">YP_393506.1</a>	unnamed protein product [Arcobacter nitrofigilis DSM 7299] >gb ABB44271.1  Truncated hemoglobin [Sulfurimonas denitrificans DSM 1251]	20
<a href="#">YP_004167228.1</a>	>gb ADV45479.1  globin [Nitratifactor salsuginis DSM 16511]	21
<a href="#">YP_824776.1</a>	>gb ABJ84491.1  globin [Candidatus Solibacter usitatus Ellin6076]	29
<a href="#">ZP_09659972.1</a>	>gb EHQ07735.1  globin [Leptonema illini DSM 21528]	25
<a href="#">YP_005553298.1</a>	>dbj BAK72981.1  globin [Arcobacter sp. L]	24
<a href="#">YP_007978.1</a>	>emb CAF23703.1  conserved hypothetical protein [Candidatus Protochlamydia amoebophila UWE25]	26
<a href="#">ZP_09264283.1</a>	bacterial globin-like protein [Leptospira weilii str. 2006001855]	24
<a href="#">ZP_09254746.1</a>	bacterial globin-like protein [Leptospira santarosai str. 2000030832]	24
<a href="#">ZP_05071177.1</a>	>gb EDZ63825.1  protozoan/cyanobacterial globin family protein [Campylobacteriales bacterium GD 1] >gb EHP30166.1  protein containing Globin [Sulfurimonas sp. GD1]	26
<a href="#">NP_714156.1</a>	>gb AER03943.1  bacterial globin-like protein [Leptospira interrogans serovar Lai str. IPAV]	28

Resultado parcial (30 primeiras proteínas) do alinhamento obtido pelo programa BlastP. Em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

O alinhamento da globina Hsero\_2872 com as proteínas de *Burkholderia sp.* 1-1 (Bch1\_08802), *Burkholderia xenovorans* LB400 (Bxe\_B1477) e *Burkholderia vietnamiensis* G4 (Bcep1808\_6027) utilizando o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) mostrou uma identidade de 70% entre as quatro globinas, similar ao já descrito e obtido pelo programa BlastP.

O alinhamento de aminoácidos da globina Hsero\_2872 com outras duas globinas de *H. seropedicae* mostrou que há 26% de identidade e 43% de similaridade com Hsero\_2855 e 29% de identidade e 45% de similaridade com Hsero\_1880, uma hemoglobina truncada do grupo II que possui sua estrutura bem caracterizada (RAZZERA *et al.*, 2008). Entre Hsero\_2855 e Hsero\_1880 foi encontrado 47% de identidade e 68% de similaridade, e os aminoácidos conservados His-F8, Trp-G8, Phe-B9, Tyr-B10 bem como os dois pares do motivo Gly-Gly das hemoglobinas truncadas grupo II também foram observados (figura 13). Estes resíduos Gly-Gly estão relacionados à construção da estrutura compacta das hemoglobinas truncadas por participarem da formação de voltas estruturais nos grupos I e II.

A análise do alinhamento das três globinas de *H. seropedicae* mostrou 15% de identidade e confirmou a presença de resíduos de aminoácidos conservados His-F8, Trp-G8 e motivo Gly-Gly na região E-F no gene de estudo e na globina putativa Hsero\_2855 (figura 14). Pode-se observar, também, a conservação dos resíduos His-CD1, Phe-E14 e Tyr no segmento pré-F, que são importantes para a regulação da ligação com o grupo heme na globina Hsero\_1808. O alinhamento para a posição B10 não apresenta o aminoácido Tirosina, fortemente conservado das trHbs do grupo II, mas sim uma Leucina, que mantém alta similaridade com o resíduo Tirosina e é o mesmo presente na posição B10 da mioglobina humana.

**A** CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Hsero_2855 -----MPGAS-----KSAPLANPHYQQIGGEP-VVRQLVDRFYAL
Hsero_2872 MNVPSTSEPGAPRACWAPCSQACYLTLNWPVAGPAMARGTQQVICEPPQLQPAHRLAL
          ***.                :.*      **:  **  : *  .*: **

Hsero_2855 MDQLPQAAVVRAMHP-----GDLTPAKQRLFMFLSGWLGPPPLYAEAFGHPRL
Hsero_2872 CDESGLRKLVLHHMRRLRHSPLFARSHNCFDCVSSRIADFVVESCGGPLYYSQR--H---
          *:      :*                . :  ...*: *:  *** *: : *

Hsero_2855 RHAH----AGFA--VDAAARDAWMACMNQALQELVPDEVLRQQLGAAFFKTADFLCNQ--
Hsero_2872 A--HLQAGAGLPLLLDEAGRELWLVQLWHTFDDIGFPPALRADFWAWAEP LSIHLLVRHA
          *  **:.  :*  *.*: *:. : : : : : .** : : *      : .*  :

Hsero_2855 -----
Hsero_2872 RVEPPRRYPYELVRSWFHSPATDMLPPIADLIRPSGRSES
  
```

**B** CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Hsero_1880 MQIEDPNQP-----TFELIGGAEKLR-----EMVDRFYDLMDL
Hsero_2872 MNVPSTSEPGAPRACWAPCSQACYLTLNWPVAGPAMARGTQQVICEPPQLQPAHRLAL
          *::  ...:*          *      :.*  *          : :  : * : *

Hsero_1880 EPEFAG-----IRALHPPSLEGSR-----EKTYMFLSGWTGGPSLYMEKFGHPRL
Hsero_2872 CDESGLRKLVLHHMRRLRHSPLFARSHNCFDCVSSRIADFVVESCGGPLYYSQR--H---
          * .          * *.* : * :          .:  *:  *** * : : *

Hsero_1880 RARHLP---FPIGISE--RDQWLRRCMTWAMQDVGLP-----EDLMKRLLAALY
Hsero_2872 --AHLQAGAGLPLLLDEAGRELWLVQLWHTFDDIGFPPALRADFWAWAEP LSIHLLVRHA
          *  **      :*: :  *:*: * : : : : : : * * * : **

Hsero_1880 QTADWMRNKPE-----
Hsero_2872 RVEPPRRYPYELVRSWFHSPATDMLPPIADLIRPSGRSES
          *      *
  
```

**C** CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Hsero_2855 MPGASKSAPLANPHYQQIGGEPVVRQLVDRFYALMDQLPQAAVVRAMHPGDLTPAKQRLF
Hsero_1880 ---MQIEDPNQPTTFELIGGAEKLRREMVDFFYDLMDLEPEFAGIRALHPPSLEGSREKTY
          . . * . : : *** : : : : * * * * * * * * * * * * * * : : : :

Hsero_2855 MFLSGWLGPPPLYAEAFGHPRLRHAHAGFAVDAAARDAWMACMNQALQELVPDEVLRQQL
Hsero_1880 MFLSGWTGGPSLYMEKFGHPRLRARHLPFPIGISERDQWLRRCMTWAMQDVGLPEDLMKRL
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Hsero_2855 GAAFFKTADFLCNQ--
Hsero_1880 LAALYQTADWMRNKPE
          **:::***::: * :
  
```

**FIGURA 13 – ALINHAMENTO EM PARES DAS GLOBINAS DE *H. seropedicae*.** Os dados do alinhamento foram obtidos com o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). Ajuste manual para alinhamento da His-F8 em A e B. (\*) Aminoácidos idênticos; (:) Aminoácidos de alta similaridade; (.) Aminoácidos de baixa similaridade. Em (A) globinas putativas Hsero\_2872 e Hsero\_2855; em (B) globina Hsero\_2872 e trHb Hsero\_1880; em (C) Hsero\_2855 e Hsero\_1880. Resíduos de aminoácido His-F8, Trp-G8 e motivo Gly-Gly estão destacados.





O alinhamento de Hsero\_2872 com as trHbs grupo II foi ajustado manualmente para His-F8 e não evidenciou o motivo Gly-gly entre as regiões A e B, nem os resíduos Phe-B9 e Tyr-B10 fortemente conservados na hemoglobinas truncadas do grupo II. Os únicos resíduos conservados são o motivo Gly-Gly e uma Tirosina no segmento pré-F e Trp-G8 (figura 16).

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

          A-B          B9B10
M.tuberculosis  DAVGGAKTFDAIVSRFYAQVAEDEVLR-----RVY
T.fusca         EAVGGEETFTRLARRFYEGVAADPVLR-----PMY
G.stearothermophilus EAIGGEETVAKLVEAFYRRVAAHPDLR-----PIF
Burkholderia    ELVGGEARVREMVDRFYDLMDLEPEFAQ-----IRAL
Hsero_1880      ELIGGAEKLRMVDRFYDLMDLEPEFAG-----IRAL
B.vietnamiensis DRLGGAAALARIVDAFYRQMDTRPDAAG-----IRAM
A.tumefaciens   EAIGGDATVRALTRRFYELMDTLPEAAR-----CRAI
Hsero_2872      LTLNWPVAGPAMARGTQQVICEPPQLPQPAHRLALCDESGLRKLVLHHMRRLR
          :  :.      :.      :

M.tuberculosis  PEDDLAGAE-----ERLRMFLEQYWGGPRTYSEQRGHPRLRMFHAPFRISLI
T.fusca         PEEDLGPAE-----ERLRLFLMQYWGGPRTYSERRGHPRLRMFHFPYRIGAE
G.stearothermophilus P-DDLTETA-----RKQKQFLTQYILGGPPLYTAEHGHPMLRARHLRFEITPK
Burkholderia    HPDSDLGSR-----DKFFWFLCGWLGDPDHYLSRFGHPRLRARHLPPFIASV
Hsero_1880      HPPSLEGSR-----EKTYMFLSGWTGGPSILYMEKFGHPRLRARHLPPFIGIS
B.vietnamiensis HGADLGPVK-----TVLVTYLCEWILGGPRHYSQRGHPRLRMFHRAFAIGMA
A.tumefaciens   HPADLSGSE-----AKFYDYLGTGYLGGPPVYVEKHGHPMLRRHFHVAPIGPA
Hsero_2872      HSPLFARSHNCFDCVSSRIADFVVESSCGGPLY--SQRHA----HLQAGAG-L
          :          :.      :      :      :      :

          G8G9
M.tuberculosis  ERDA-----WIRCMHTAVASIDSETLDDEHRRELLDYLEMA
T.fusca         ERDR-----WITHRM---AAVDDLALPAHLEQQLWEYLVYA
G.stearothermophilus ERDA-----WILACMR---AAMDEIGLSGPAREQFYHRLVLT
Burkholderia    ERDQ-----WIRCM---WAMDDIGLPEPLRERLMHSFYDT
Hsero_1880      ERDQ-----WIRCM---WAMQDVGLPEDLMKRLLAALYQT
B.vietnamiensis ERDA-----WILACMR---AALDECGVEPALRDELMOALFKL
A.tumefaciens   ERDE-----WILCFR---RAMDETIENAKLREI IWAPVERL
Hsero_2872      PLLLDEAGRELWLVQLW---HTFDDIGFPPALRADFWAWAEPL
          **      :      :.:.      :

```

**FIGURA 16 – ALINHAMENTO DE HSERO\_2872 COM HEMOGLOBINAS TRUNCADAS DO GRUPO II.** Os dados do alinhamento foram obtidos com a utilização do programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). Ajuste manual para alinhamento da His-F8. (\*) Aminoácidos idênticos; (:) Aminoácidos de alta similaridade; (.) Aminoácidos de baixa similaridade. Resíduos conservados estão destacados. Primeiros 24 resíduos de aminoácidos e 49 resíduos finais do alinhamento de Hsero\_2872 foram excluídos da montagem da figura. *R. eutropha* – *Rasltonia eutropha* H16; *Burkholderia* – *Burkholderia* sp.383 ; *B. vietnamiensis* – *Burkholderia vietnamiensis* G4 ; *A. tumefaciens* – *Agrobacterium tumefaciens* ; *B. subtilis* – *Bacillus subtilis* subsp.Subtilis str.168 ; *G. stearothermophil* - *Geobacillus stearothermophilus*; *M. tuberculosis* – *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; *T. fusca* – *Termobifida fusca*.

Quando Hsero\_2872 foi alinhada com as trHbs do grupo III e as globinas putativas Bch1\_08802 de *Burkholderia sp.* 1-1 e Bxe\_B1477 de *Burkholderia xenovorans* LB400, um maior número de resíduos de aminoácidos conservados foi encontrado, mostrando-se mais parecida com o grupo III. Entre eles estão, além da His-F8 e Trp-G8, os resíduos de Leucina e Arginina na região inicial ( $\alpha$ -hélice B) do domínio semelhante à globina truncada, Phe-CD1, uma fenilalanina na hélice E, Tyr-pré-F, Ala-F7, Prolina na região entre hélices F e G, Lis-G9 e uma alanina na hélice H (figura 17).

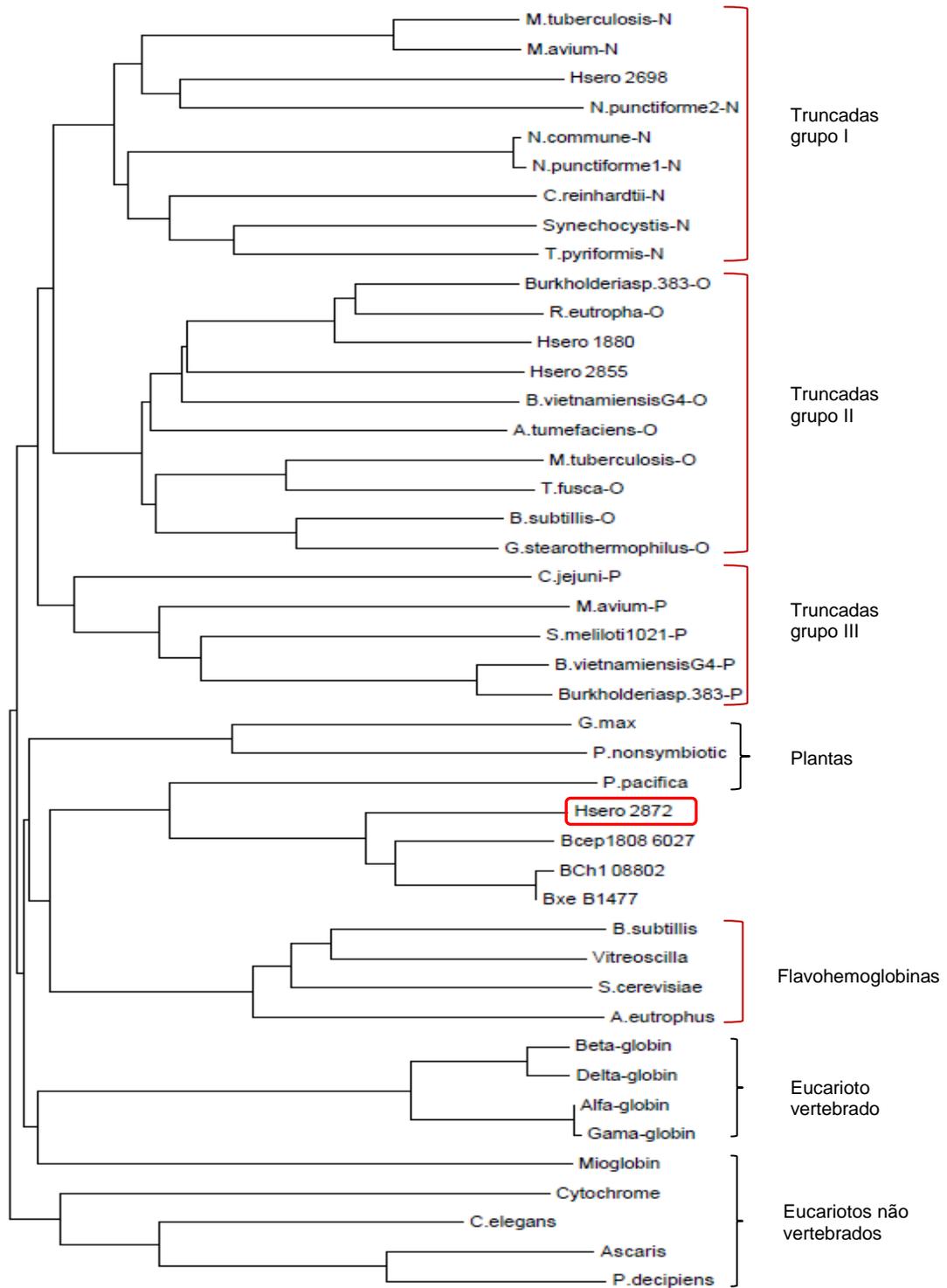


**FIGURA 17 – ALINHAMENTO DE Hsero\_2872 COM HEMOGLOBINAS TRUNCADAS DO GRUPO III.** Os dados do alinhamento foram obtidos com o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). Foi utilizado apenas o domínio de semelhança às hemoglobinas truncadas das proteínas Hsero\_2872, BCh1\_08802 e Bxe\_B1477 para realização do alinhamento. (\*) Aminoácidos idênticos; (:) Aminoácidos de alta similaridade; (.) Aminoácidos de baixa similaridade. Resíduos conservados estão destacados. *B. vietnamiensis* – *Burkholderia vietnamiensis* G4; *BCh1\_08802* – *Burkholderia sp.* Ch1-1 *Bxe\_B1477* - *Burkholderia xenovorans* LB400; *S. meliloti1021* – *Sinorhizobium meliloti* 1021; *M. avium* – *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* K-10.

Pela análise dos alinhamentos feitos entre a Hsero\_2872 e os diferentes grupos de hemoglobinas truncadas, pode-se observar que a Hsero\_2872 possui maior semelhança com as hemoglobinas truncadas do grupo III. A maior proporção de resíduos conservados com este grupo, o alinhamento sem ajuste para a His-F8, além de resíduos característicos como Phe-CD1, Ala-F7, Trp-G8 e Lys-G9 apóiam esta observação, porém não foram encontrados a histidina 26 resíduos a montante da His-F8 e os resíduos Phe-B9 e Tyr-B10 fortemente conservados nas hemoglobinas truncadas. Estes dois últimos resíduos não são fortemente conservados no grupo I das trHbs, principalmente entre o subgrupo II. A Phe bem conservada na hélice E das trHbs do grupo III também é encontrada na maioria das trHbs grupo I subgrupo I e a Ala-F7 pode ser encontrada em algumas trHbs do grupo I.

Análise filogenética realizada por Vuletich e Lecomte (2006) com 111 sequências de trHbs revelou a presença de genes de trHbs grupo II em quase todos os exemplos de organismos que possuem genes de mais de um grupo de trHbs, sugerindo que os genes trHb do grupo II originaram-se antes dos genes trHb do grupo I ou do grupo III. Os autores ainda sugerem que é provável que os genes trHb do grupo I e III resultem de duplicação do gene do grupo II ou por transferência horizontal. Somente os organismos *Mycobacterium avium* e *Methylococcus capsulatus* contém genes de cada um dos três grupos. Nenhuma proteobactéria analisada possui ambos os genes dos grupos I e II, apenas duas actinobactérias analisadas. Quando há a presença de gene do grupo I nas proteobactérias, ele se faz sozinho ou menos frequentemente, com gene de trHb grupo III. Dentre as  $\beta$ -proteobactérias analisadas, nenhuma apresentou gene de trHb grupo I. A maioria dos organismos que possuem gene trHb grupo III são proteobactérias e genomas que contém gene de trHb grupo III contém um gene trHb grupo II tipicamente.

Uma árvore filogenética foi construída com as trHbs citadas neste trabalho e outras globinas de bactérias e eucariotos. Ela organizou as hemoglobinas em famílias e grupos e os eucariotos em vertebrados, não vertebrados e plantas. A posição do Hsero\_2872 está destacada (figura 18).



**FIGURA 18 – ÁRVORE FILOGENÉTICA (MINIMUM EVOLUTION TREE).** Baseada em 44 sequências de globinas de várias subfamílias. O programa utilizado foi o MEGA versão 5.05 (TAMURA *et. al.*, 2011). Identificação das globinas no Anexo 1.

Paralelamente, utilizando o programa PSIPRED versão 3,0 (BUCHAN *et al.*, 2010) obteve-se uma previsão de estrutura secundária para a proteína Hsero\_2872 que mostra uma proteína composta de 6  $\alpha$ -hélices, sendo a primeira e última curtas e de baixo índice de confiança. A análise leva a concluir que a proteína Hsero\_2872 possui, provavelmente, a estrutura de uma hemoglobina truncada 2/2  $\alpha$ -hélice, ratificando a indicação prévia (figura 19). A previsão da estrutura secundária foi confirmada utilizando-se o programa RAPTORX (PENG e XU, 2011) que confirmou a estrutura 2/2  $\alpha$ -hélice. Pelo mesmo programa foi predita uma estrutura terciária utilizando como modelos as seguintes globinas que apresentaram maior *score* de alinhamento (figura 20): trHb O de *Mycobacterium tuberculosis*, trHb de *Bacillus subtilis*, trHb de *Geobacillus stearothermophilus*, trHb de *Thermobifida fusca*, trHb O de *M. tuberculosis* mutante WG8F e trHb grupo II de *Agrobacterium tumefaciens*.

Com a análise *in silico* realizada, é possível sugerir que o produto do gene Hsero\_2872 seja uma globina da superfamília das globinas/hemoglobinas truncadas. Mesmo apresentando maior semelhança com as truncadas do grupo III, a análise filogenética agrupou a Hsero\_2872 e as proteínas com que apresentou índice de similaridade igual ou maior de 70% num grupo distinto das trHbs tipicamente classificadas como grupo III. Portanto, é necessária uma análise estrutural e funcional mais aprofundada para a classificação definitiva da globina Hsero\_2872.

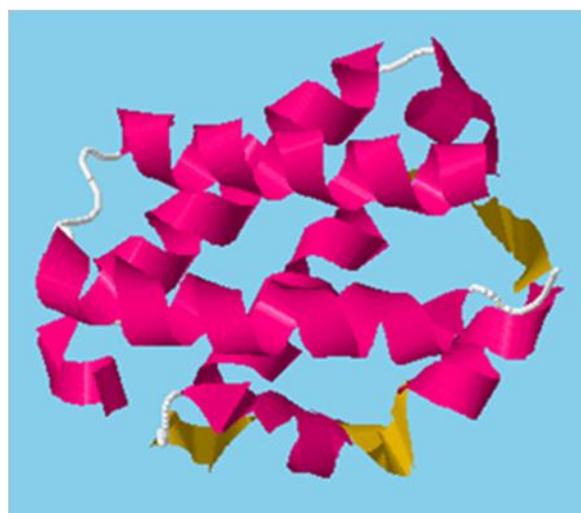
Além disso, utilizando o programa ProtParam (GASTEIGER *et al.*, 2005) disponível no site EXPASY ([www.expasy.ch/tools/protparam.html](http://www.expasy.ch/tools/protparam.html)), foi possível prever também algumas características bioquímicas teóricas da proteína Hsero\_2872, como massa molecular igual a 23964,5 Da e *pI* teórico igual a 7,68. O peso molecular teórico da hemoglobina truncada grupoll Hsero\_1880 foi de 15515,8 Da e o massa molecular aparente desta proteína fusionada a cauda de histidinas foi de 18,2 kDa (His-tag e resíduos adicionais na construção do clone representam aproximadamente 3 kDa) (RAZZERA *et al.*, 2008). A hemoglobina truncada grupo III de *C. jejuni*, a única caracterizada estruturalmente até o momento, apresentou um peso molecular estimado de 14 kDa, após purificação, consistente com o valor teórico de 14060 Da (WAINWRIGHT *et al.*, 2006).



**FIGURA 19 – PREVISÃO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA GLOBINA HSERO\_2872.** O programa utilizado foi o PSIPRED versão 3,0 (BUCHAN *et al.*, 2010).  = hélice;  = confiança da predição; AA = sequência de aminoácidos de Hsero\_2872.



3D for the whole sequence



3D for segment 1 [57, 171]: LLALCDESGL...

Segment	Span	Source	Reference Parent	Parent Span	E-value
segment_1	57-171	Pfam	<a href="#">PF01152</a>	2-119	4.20e-19
segment_2	1-56	Pfam	N/A		
segment_3	172-213	Pfam	N/A		

**FIGURA 20 – PREVISÃO DE ESTRUTURA TERCIÁRIA DA GLOBINA HSERO\_2872.** O programa utilizado foi o RAPTORX (PENG e XU, 2011). A imagem da esquerda mostra a previsão para toda a estrutura, e a da direita mostra previsão de estrutura do segmento 1 (aminoácidos do 57 ao 171), região do domínio conservado das hemoglobinas truncadas. Seis estruturas já determinadas de hemoglobinas truncadas foram utilizadas como modelo.

### 5.3 Clonagem da região codificante do gene Hsero\_2872 visando expressão da proteína

Para expressão do gene Hsero\_2872, a região codificante amplificada foi subclonada no vetor pET28a. Foi amplificada uma região com 699 pb (EXP), incluindo 18 pb a montante do gene e 39 pb a jusante do gene (figura 21). A região codificante foi amplificada, por reação de PCR, com primers contendo sítios de restrição para as enzimas EcoRI e HindIII e clonada no vetor pTZ57R/T, resultando no plasmídeo pTZEXP (figura 22). A integridade da sequência da região promotora amplificada foi conferida por sequenciamento de DNA (item 4.4.7). A confirmação da clonagem do inserto no vetor pTZ57R/T foi feita por reação de PCR e por restrição com as enzimas EcoRI e HindIII (figura 23). Em ambos os casos pode-se observar uma banda entre 500 e 750 pb da região codificante (699 pb). No perfil eletroforético da restrição se observa, também, uma banda do vetor pTZ57R/T linearizado (2886 pb).

ATATACAGACCTCCA**ACATCCACCATCGCCACTATGAATGTGCCTTCGACTTCCGAACCCGGTGCACCA**  
**CGTGCGTGCTGGGCGCCCTGCTCCCAGGCATGTTATCTGACCCTGAACTGGCCGGTCGCCGGCCCGGCGA**  
**TGGCGCGCGGCACGCAACAGGTGATATGTGAGCCGCCACAATTACCTCAACCGGCGCACC GGTTGCTGGC**  
**GCTGTGTGATGAATCCGGCTTGCGCAAACTGGTGTGCATCATATGCGGCGCCTGCGCCATTCCCCGCTG**  
**TTCGCACGTTTCGCACAATTGTTTTGATTGCGTCAGCTCGCGCATCGCCGACTTCGTGGTGGAGTCATGCG**  
**GCGGTCCGCTCTACTACAGCCAACGCCATGCCATCTGCAAGCGGGCGCAGGCTTGCCGTTGCTATTGGA**  
**CGAAGCTGGGCGGAAC TGTGGCTGGTACAGCTTTGGCATACTTTGACGATATCGGTTTCCCGCCCGCG**  
**CTGCGGGCCGACTTCTGGGCTGGGCGAACCCTTGTCGATTTCATCTGCTGGTACGTTCATGCGCGGTGCG**  
**AACCGCCGCGGCGCTACCCCTATGAGCTGGTACGCAGCTGGTTCCACTCGCCCGCCACCGACATGCTGCC**  
**GCCGATAGCGGATCTGATCCGGCCATCGGGAAGATCCGAATCATGA****CCTGCGCCATCCGGCATCGCATCC**  
**CCGCATCTGTTTCTT****GATGCGGCCGGTCTGAGCGATGTCCAACCTCTTTTTCCCGTGAACCTGCCATGCCG**

**FIGURA 21 - REGIÃO CODIFICANTE AMPLIFICADA E CLONADA PARA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA.** Em negrito está destacada a região EXP amplificada com 699 pb; em itálico e sublinhado os oligonucleotídeos iniciadores; em vermelho e sublinhado os códons de início (ATG) e término (TGA) da tradução.

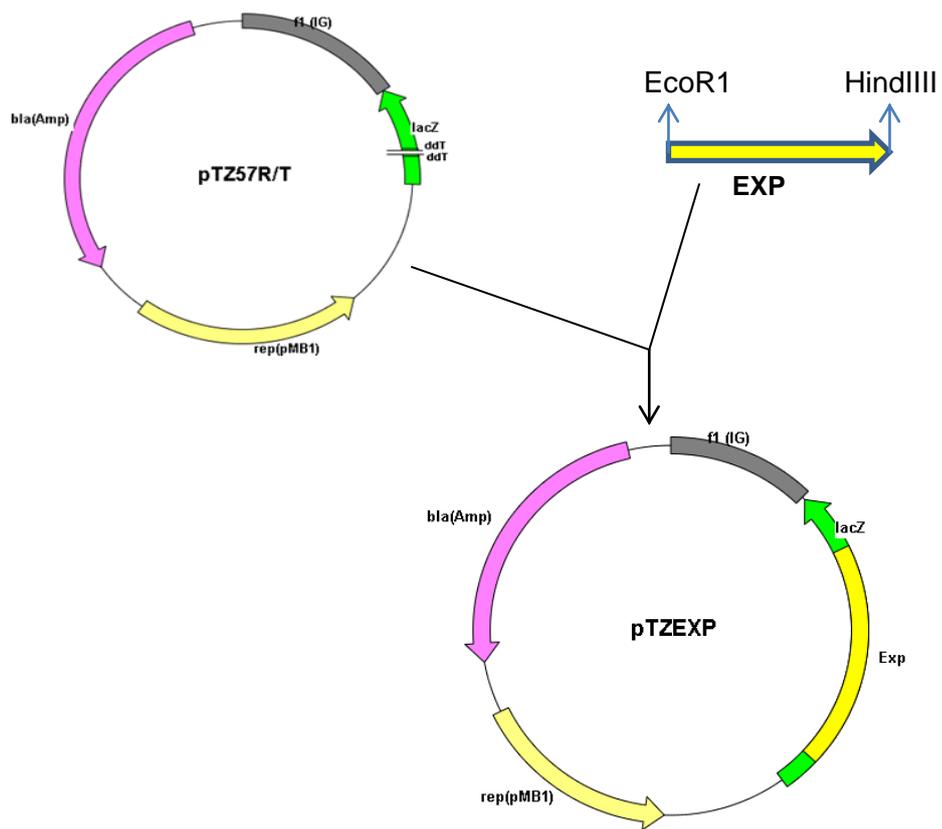
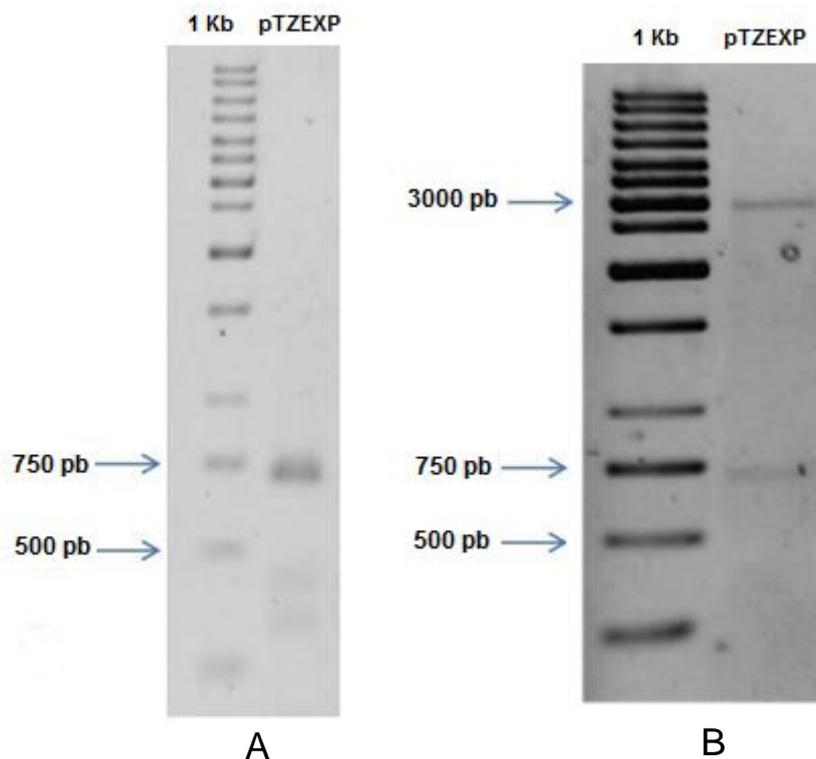
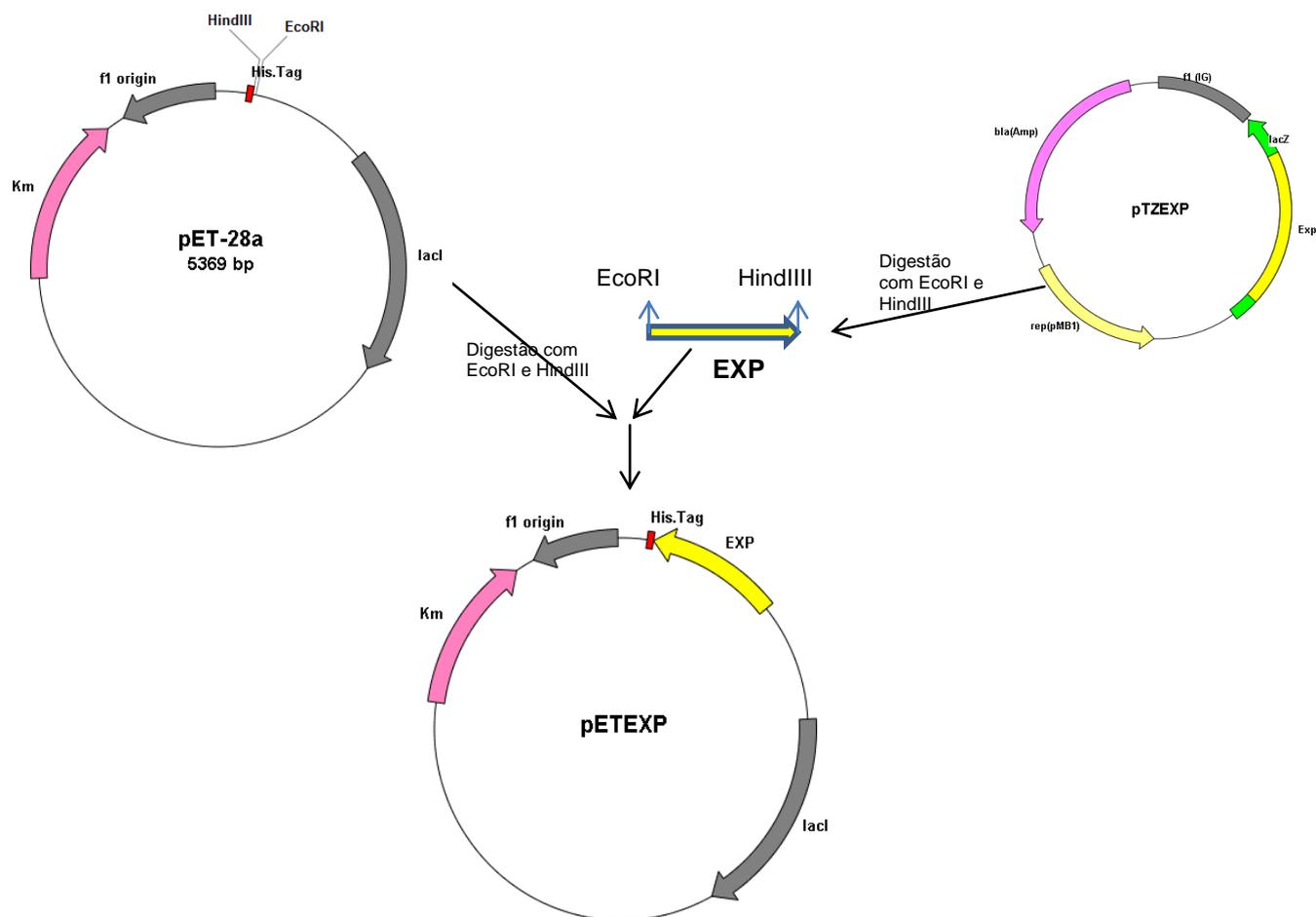


FIGURA 22 – ESQUEMA DA CLONAGEM DA REGIÃO CODIFICANTE DO GENE HSERO\_2872 NO VETOR pTZ57R/T.

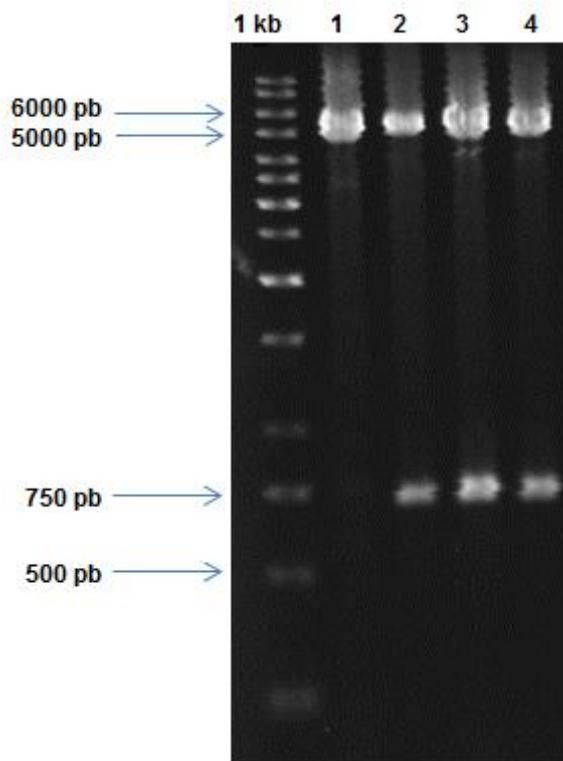


**FIGURA 23 – CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DA REGIÃO CODIFICANTE DO GENE HSERO\_2872 NO VETOR pTZ57R/T.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TBE. 1Kb = 1 Kb ladder (Fermentas). Em A, reação de PCR utilizando como molde o vetor pTZEXP e os oligonucleotídeos desenhados para amplificação da região promotora, mostrando uma banda ( $\approx 699$  pb). Em B, restrição do plasmídeo pTZEXP com enzimas EcoRI e HindIII, mostrando banda ( $\approx 699$  pb) do segmento da região promotora e do vetor pTZ57R/T linearizado ( $\approx 2886$  pb).

Para subclonagem no vetor de expressão, o segmento codificante foi isolado do vetor pTZEXP por restrição com EcoRI e HindII, purificado e ligado ao vetor pET28a previamente linearizado com as mesmas enzimas (figura 24). A confirmação da clonagem do inserto no vetor pET28a foi feita pela presença de bandas correspondentes ao segmento codificante (699 pb) e ao vetor pET28a linearizado (5369 pb), após restrição com as enzimas EcoRI e HindIII, em gel de agarose 1% (figura 25).



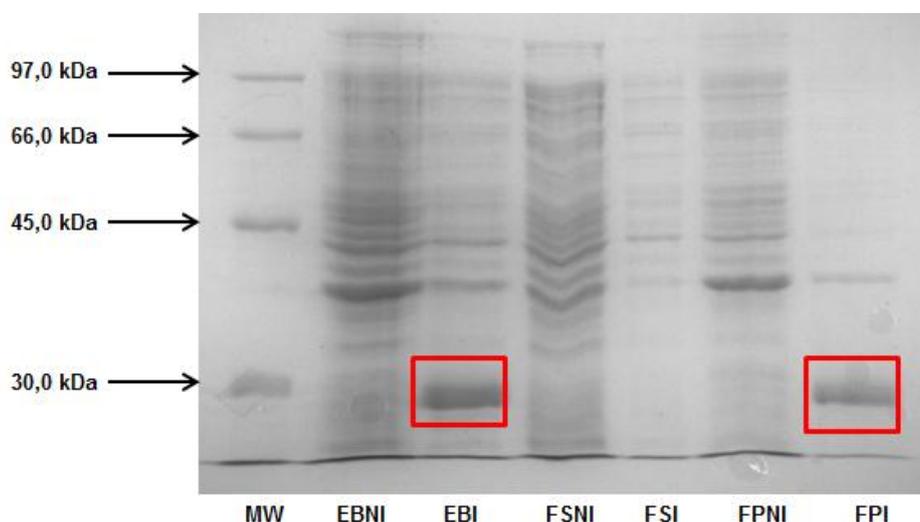
**FIGURA 24 – ESQUEMA DA CLONAGEM DA REGIÃO CODIFICANTE DO GENE HSERO\_2872 NO VETOR pET28a.**



**FIGURA 25 – CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DA REGIÃO CODIFICANTE DO GENE HSERO\_2872 NO VETOR pET28a.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TBE. 1Kb = 1 Kb ladder (Fermentas). Restrição do plasmídeo pTZEXP com enzimas EcoRI e HindIII, mostrando banda ( $\approx 699$  pb) do segmento da região codificante e do vetor pET28a linearizado ( $\approx 5369$  pb). Linha 1, vetor pET28a sem inserto, linhas 2 a 4, plasmídeo pETEXP.

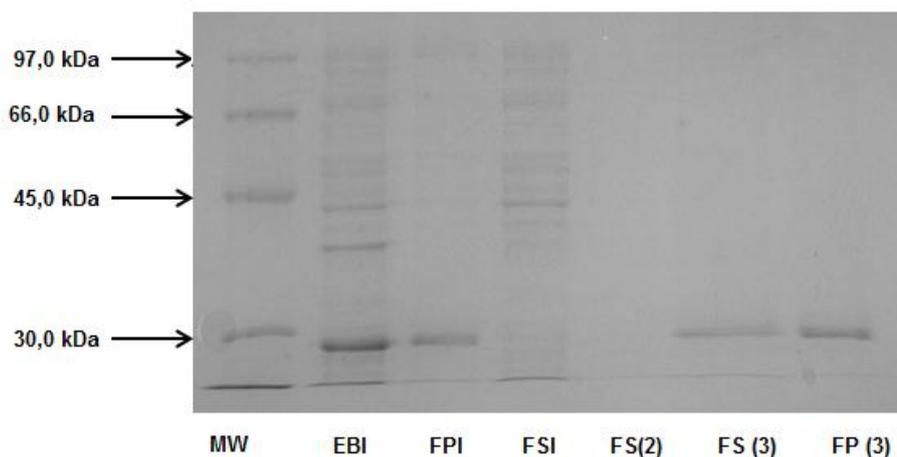
Para teste de expressão da proteína o plasmídeo pETEXP foi transformado por choque térmico (TSS) em *E. coli* estirpe BL21 (DE3). As colônias transformantes, selecionadas em meio com o antibiótico adequado, foram cultivadas em meio LB durante aproximadamente 3 horas, a 37°C, sob agitação, até  $D.O_{595nm}$  de 0,6 a 0,8. Foram, então, induzidas com IPTG (1mmol/L) e cultivadas por mais 3 horas, a 37°C, sob agitação. A cultura foi centrifugada por 5 minutos a 30.000 x *g* e o precipitado de células ressuspense em tampão (300mmol/L NaCl/ 50mmol/L Tris-HCl pH 8). O precipitado ressuspense foi sonicado em 10 ciclos de 30 segundos cada e posteriormente centrifugado por 20 minutos a 4°C e 30.000 x *g*. O sobrenadante (FSI) foi retirado e reservado e o precipitado (FPI) ressuspense novamente em tampão (300mmol/L NaCl/ 50mmol/L Tris-HCl pH 8). A análise das frações em gel de

poliacrilamida 12% confirmou a superexpressão da proteína na fração insolúvel nesta condição (figura 26).



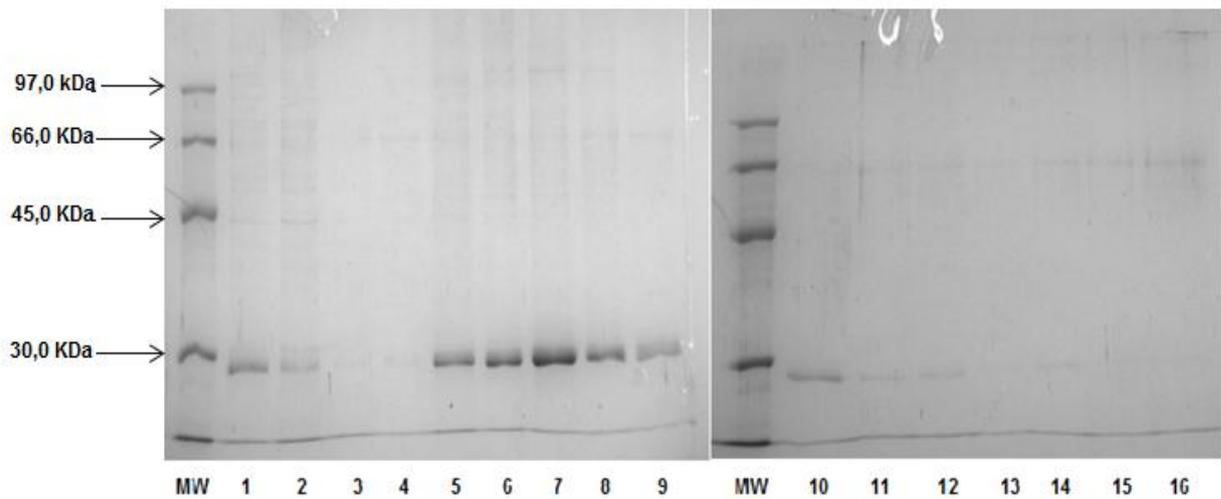
**FIGURA 26 – ELETROFORESE DO EXTRATO BRUTO DA PROTEINA HSERO\_2872.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) do extrato bruto da proteína Hsero\_2872 fusionada a uma cauda de histidinas. MW = padrão de massa molecular; EBNI = extrato bruto não induzido; EBI = extrato bruto induzido; FSNI = fração solúvel não induzido; FSI = fração solúvel induzido; FPNI = fração precipitado não induzido ; FPI = fração precipitado induzido.

Uma estratégia de solubilização da proteína com 8mol/L de uréia foi testada. A fração precipitado ressuspensa foi submetida a mais 10 ciclos de sonicação de 30 segundos cada, seguida de agitação por 1 hora e centrifugação por 20 minutos a 4°C e 30.000 x g. Foram separadas as frações solúvel (FS2) e precipitado (FP2). O precipitado foi ressuspenso em 30 mL de tampão (500mol/L NaCl / 50mmol/L Tris-HCl / 8mol/L uréia / 5mmol/L imidazol pH 8), agitado por 30 minutos e novamente centrifugado por 20 minutos a 4°C e 30.000 x g. A proteína foi observada em parte na fração solúvel (FS3) e fração insolúvel (FP3) (figura 27).



**FIGURA 27 - ELETROFORESE DAS FRAÇÕES DO TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA Hsero\_2872 COM 8mol/L DE URÉIA.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). MW = padrão de massa molecular; EBI = extrato bruto induzido; FSI = fração solúvel induzido; FPI = fração precipitado induzido; FS = fração solúvel; FP = fração precipitado; FS(2) = fração solúvel 2; FS(3) = fração solúvel 3; FP(3) = fração insolúvel 3.

A fração solúvel (FS3) obtida da estratégia de solubilização da proteína Hsero\_2872 expressa foi submetida à purificação em coluna Hi-trap Chelating Ni (1mL). A coluna foi preparada com 4CV (volume de coluna) de EDTA 50mmol/L, 10CV de água ultra pura, 3CV de cloreto de níquel 100mmol/L e 10CV de água ultra pura. O equilíbrio foi feito com 4CV de tampão (500mmol/L NaCl / 50mmol/L Tris-HCl / 8mol/L uréia/ 5mmol/L imidazol / pH 8). Foi injetado 30mL da fração solúvel 3 (FS3) e, em seguida, feita a lavagem com 10mL de tampão (500mmol/L NaCl/ 50mmol/L Tris-HCl 8 mol/L uréia/ 5mmol/L imidazol pH 8). A eluição foi feita com 2CV de tampões (500mmol/L NaCl / 50mmol/L Tris-HCl / 8mol/L uréia pH 8) com 100, 200, 300, 400, 500 e 1000mmol/L de Imidazol. Frações de 1mL da eluição foram colhidas e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Maiores quantidades de proteína foram obtidas nas primeiras frações de eluição com diferentes concentrações de imidazol (figura 28). Novos ensaios deverão ser conduzidos para aprimorar as condições de indução e purificação da proteína Hsero\_2872 para que, então, a mesma possa ser utilizada em ensaios de caracterização “*in vitro*”.



**FIGURA 28 – ELETROFORESE DAS FRAÇÕES ELUÍDAS NA ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HSERO\_2872.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). MW = padrão de massa molecular; 1= FS(3); 2 = após injeção da FS(3); 3 e 4 = após lavagem com tampão; 5 a 16 = frações de 1mL da eluição com tampão – imidazol, sendo: 5 e 6 = 100mmol/L; 7 e 8 = 200mmol/L; 9 e 10 = 300mmol/L; 11 e 12 = 400mmol/L; 13 e 14 = 500mmol/L; 15 e 16 = 1 mol/L).

## 5.4 Clonagem e caracterização funcional do gene Hsero\_2872

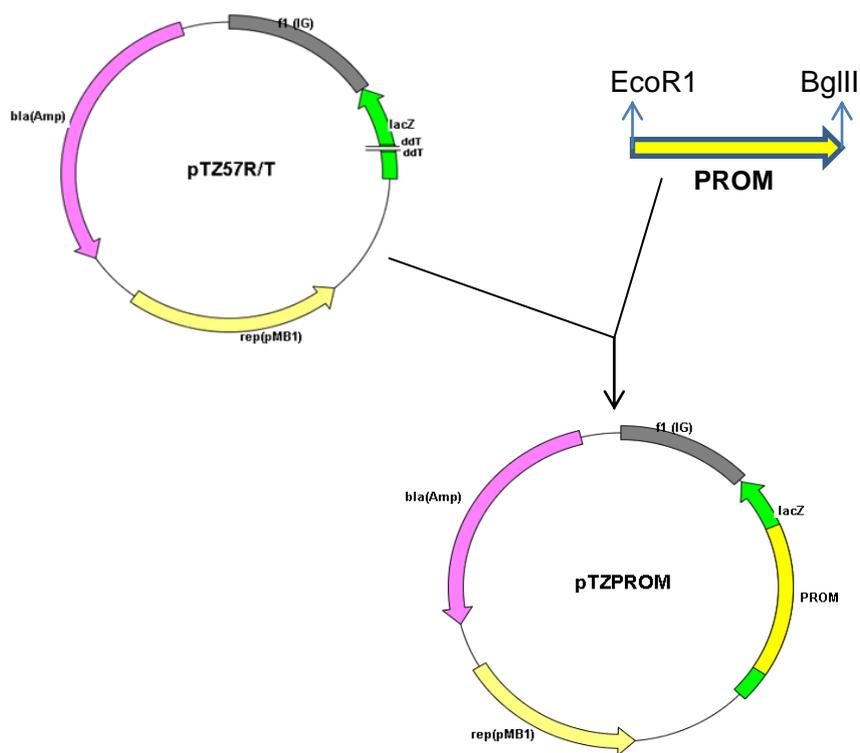
### 5.4.1 Construção da fusão transcricional da região promotora do gene Hsero\_2872 de *Herbaspirillum seropedicae* e análise de sua expressão

Com o objetivo de determinar a funcionalidade do provável promotor  $\sigma^{54}$  do gene Hsero\_2872 foi obtida a fusão transcricional *pHsero\_2872::lacZ*, contendo a região promotora deste gene. Para isso foi amplificada uma região com 547 pb (PROM), contendo 456 pb da região a montante do gene mais 91 pb da região codificante da proteína (figura 29).

```
ATCGTTACGAGTTCTAAATTCACACTGCGGTCGTCGAGAATAGTGGCCATCTGACTCTCCTAACGTGAAT
ACTGGAACCCCATGCGCTGCCTGAGAGCGCTAGAACCCGCCTTGCTACTCTGTCTGTGAGATCCGAGATCC
TGAAAAACGGCAGAAAAAGCGCCGTGTAATTACCGAATAGTTACCTTGCTGGTCAAGCAAACCTTCATGCC
CAAGCAGATGCATGAATCGATCTCGCCAAGCAACCCACACAATGCCGGCTTTCTCGATGTGCCTTGG
CGGGTTGGCGACAACGGTGTCTCTTTGTCTGGATTTACGACAATCATCGCCACTGGCGCAGCAATCAGAA
ATCGTCGCTATCCCATTTGATTTAAAAGAAAAATATTGTATGGCATGGTTTTGGCTATTCATACCTGCATC
GGCCGCTCACCGCCAAGCGAAACGACAAAGCAGAGCAAGCCGGTAGCCAGCCAGCGTTATGTAGCGAG
ATATACAGACCTCCAACATCCACCATCGCCCACTATGAATGTGCCTTCGACTTCCGAACCCGGTGCACCA
CGTGCGTGTGGGGCGCCCTGCTCCCAGGCATGTTATCTGACCCTGAACTGGCCGGTGCGCCGGCCCCGGCGA
TGGCGCGCGGCAGCAACAGGTGATATGTGAGCCGCCACAATTACCTCAACCGGCGCACCCGGTTGCTGGC
GCTGTGTGATGAATCCGGCTTGCGCAAACCTGGTGTGCATCATATGCGGGCGCTGCGCCATTCCCCGCTG
TTGCGACGTTTCGCACAATTGTTTTGATTGCGTCAGCTCGCGCATCGCCGACTTCGTGGTGGAGTCATGCG
GCGGTCCGCTCTACTACAGCCAACGCCATGCCATCTGCAAGCGGGCGCAGGCTTGCCGTTGCTATTGGA
CGAAGCTGGGCGGAACTGTGGCTGGTACAGCTTTGGCATACTTTGACGATATCGGTTTCCCGCCCCGCG
CTGCGGGCCGACTTCTGGGCCCTGGGCCGAACCCCTTGTCGATTTCATCTGCTGGTACGTCATGCGCGCGTCCG
AACCGCCGCGGGCGCTACCCCTATGAGCTGGTACGCAGCTGGTTCCACTCGCCCCGCCACCGACATGCTGCC
GCCGATAGCGGATCTGATCCGGCCATCGGGAAGATCCGAATCATGACCTGCGCCATCCGGCATCGCATCC
CCGCATCTGTTTTCTTGATGCGGCCGGTCTGAGCGATGTCCAACCTTTTTTCCCGTGAACCTGCCATGCCG
```

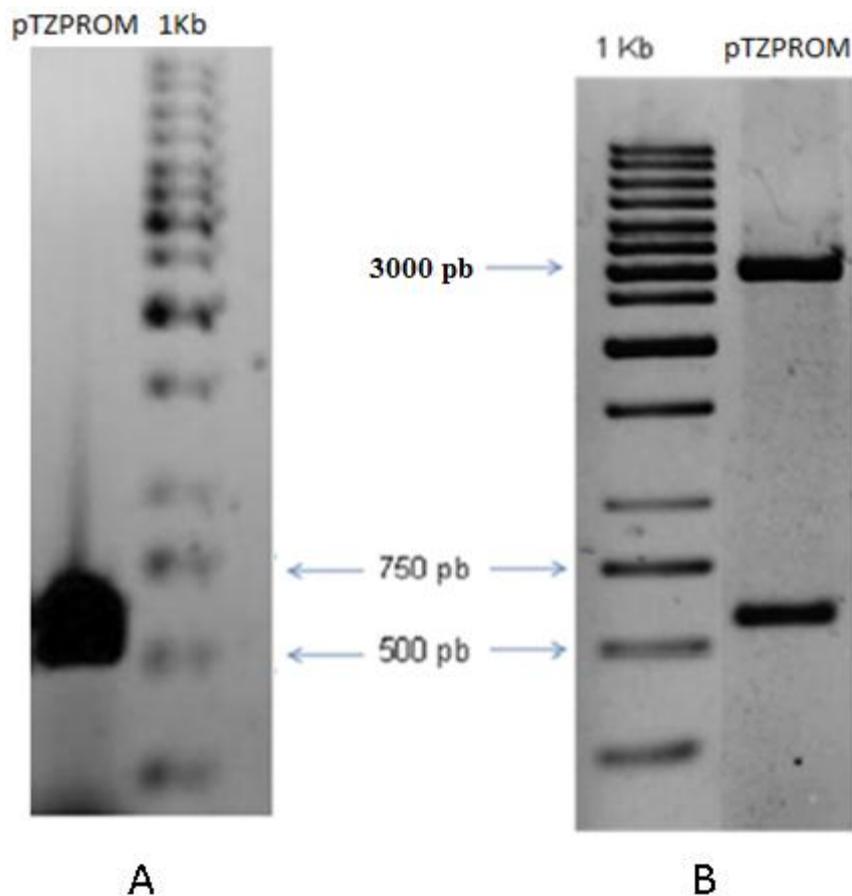
**FIGURA 29 - REGIÃO PROMOTORA AMPLIFICADA.** Em negrito está destacada a região **PROM** amplificada com 547 pb; em itálico e sublinhado os oligonucleotídeos iniciadores; em vermelho e sublinhado os códon de início (ATG) e término (TGA) da tradução.

A região promotora foi amplificada, por reação de PCR, com primers contendo sítios de restrição para as enzimas EcoRI e BglIII (tabela 9) e clonada no vetor pTZ57R/T resultando no plasmídeo pTZPROM (figura 30). A confirmação da integridade da sequência da região promotora amplificada foi obtida por reação de sequenciamento de DNA como descrito no item 4.4.7.



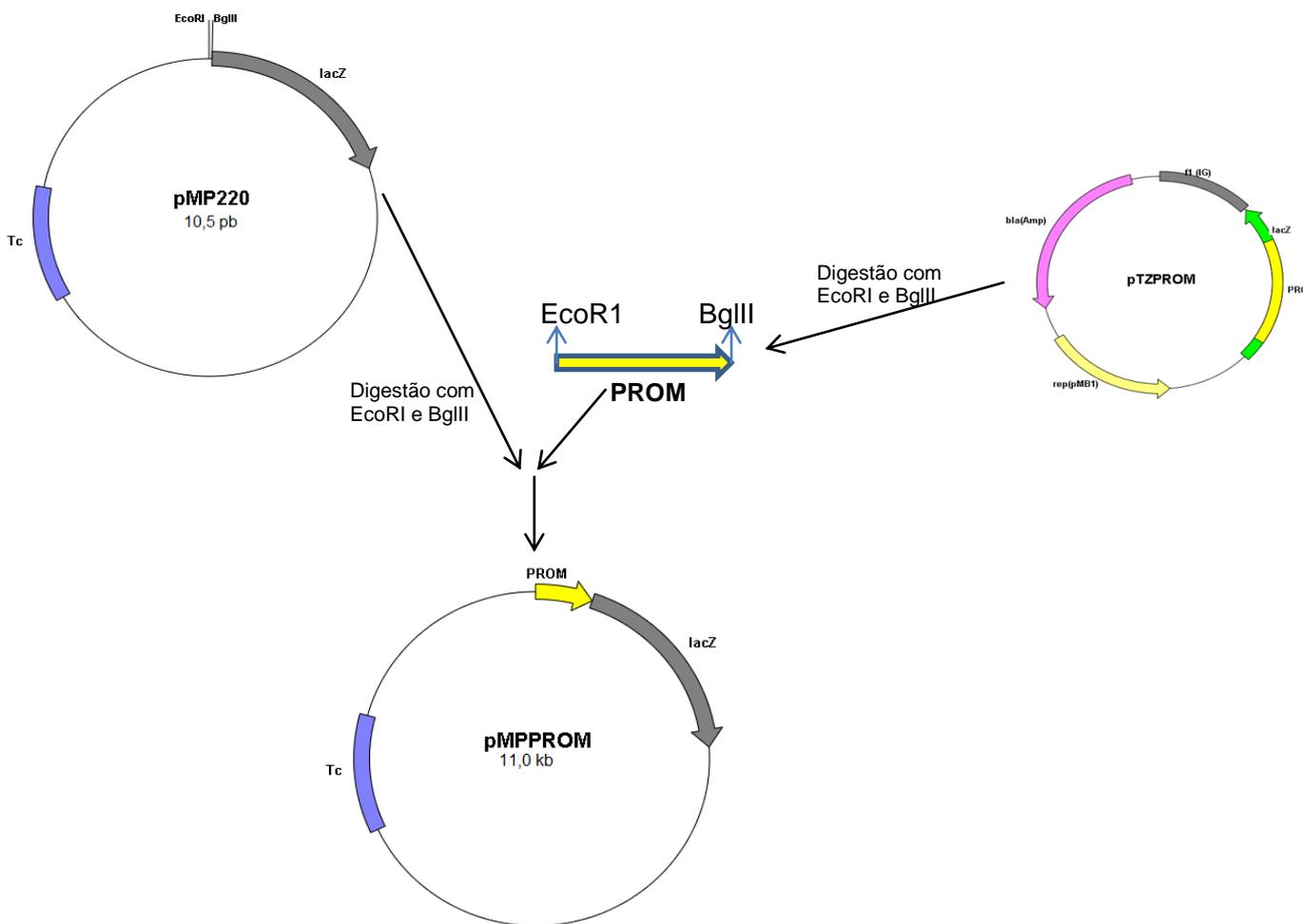
**FIGURA 30 – ESQUEMA DA CLONAGEM DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE HSERO\_2872 NO VETOR pTZ57R/T.**

A confirmação da clonagem do inserto no vetor pTZ57R/T foi feita por reação de PCR e por restrição com as enzimas BglIII e EcoRI (figura 31). Em ambos os casos pode-se observar uma banda entre 500 e 750 pb da região promotora (547 pb). No perfil eletroforético da restrição se observa, também, uma banda do vetor pTZ57R/T linearizado (2886 pb).



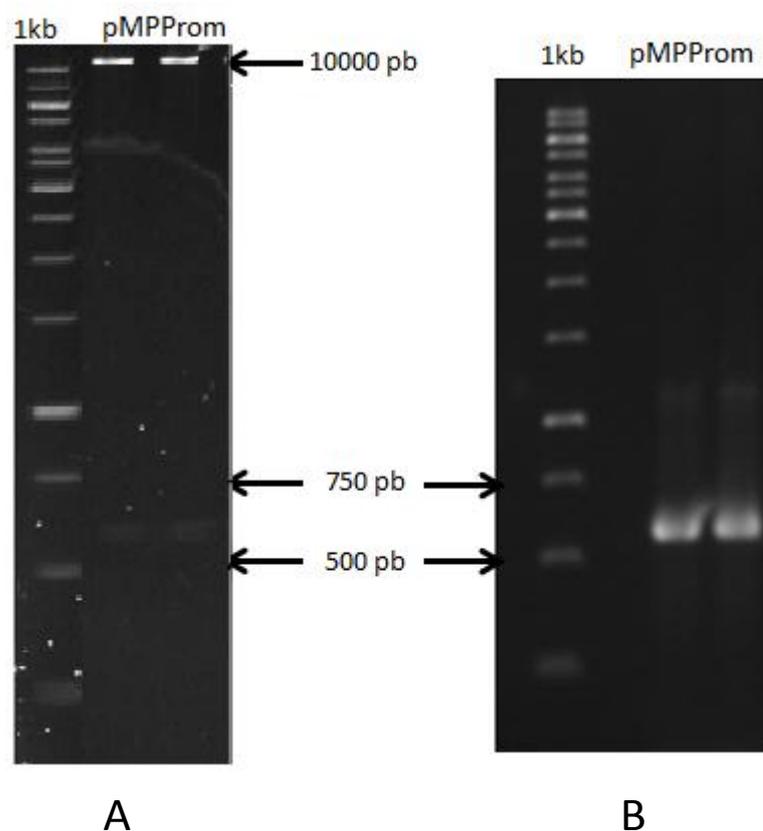
**FIGURA 31 – CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE HSERO\_2872 NO VETOR pTZ57R/T.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TBE. 1Kb = 1 Kb ladder (Fermentas). Em A, reação de PCR utilizando como molde o vetor pTZPROM e os oligonucleotídeos desenhados para amplificação da região promotora, mostrando uma banda ( $\approx 547$  pb). Em B, restrição do plasmídeo pTZPROM com enzimas BglIII e EcoRI, mostrando banda ( $\approx 547$  pb) do segmento da região promotora e do vetor pTZ57R/T linearizado ( $\approx 2886$  pb).

O fragmento de DNA da região promotora foi isolado do plasmídeo pTZPROM por restrição com as enzimas EcoRI e BglII, purificado e subclonado no vetor de fusão pMP220 digerido com as mesmas enzimas, resultando no plasmídeo pMPPROM (figura 32). Os plasmídeos foram transformados em *E. coli* top10. As colônias transformadas foram crescidas em meio LB, e os plasmídeos extraídos para confirmação da clonagem.



**FIGURA 32 – ESQUEMA DA CLONAGEM DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE HSERO\_2872 NO VETOR pMP220.**

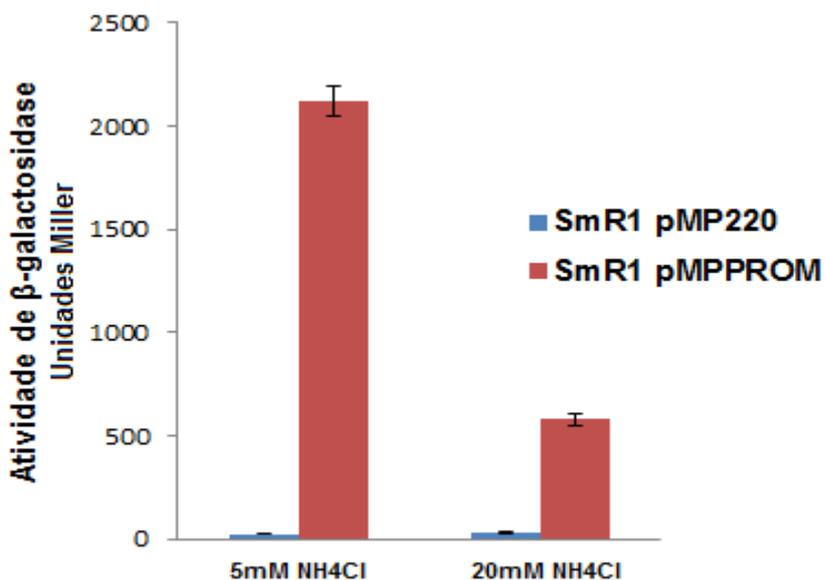
A confirmação da clonagem do inserto no vetor pMP220 foi feita por reação de PCR e por restrição com as enzimas BglII e EcoRI (figura 33). Observa-se, em ambos os casos uma banda da região promotora (547 pb). Uma banda de aproximadamente 10.000 pb (vetor pMP linearizado) observada no perfil de restrição do plasmídeo pMPPROM confirma a clonagem da região promotora no vetor pMP220.



**FIGURA 33 – CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE HSERO\_2872 NO VETOR pMP220.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TBE. 1Kb = 1 Kb ladder (Fermentas). Em A, restrição do plasmídeo pMPPROM com enzimas BglII e EcoRI, mostrando banda ( $\approx 547$  pb) do segmento da região promotora e do vetor pMP220 linearizado ( $\approx 10000$  pb). Em B, reação de PCR utilizando como molde o vetor pMPPROM e os oligonucleotídeos desenhados para amplificação da região promotora, mostrando uma banda ( $\approx 547$  pb). As duas amostras em ambos os géis são plasmídeos extraídos após transformação da subclonagem feita no vetor pMP220.

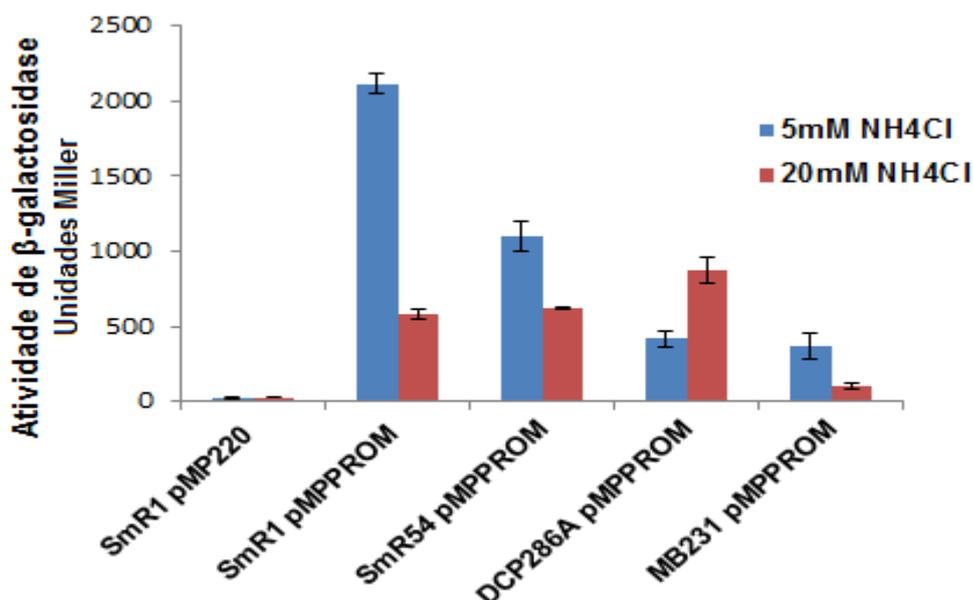
Com o objetivo de determinar as condições de expressão da fusão transcricional pHsero\_2872::lacZ, o plasmídeo pMPPROM foi transformado em *E. coli* S17.1 (item 4.5). As colônias transformadas foram selecionadas em meio LA contendo antibiótico tetraciclina e os clones foram confirmados por restrição com EcoRI e BglII dos plasmídeos extraídos. A estirpe *E. coli* S17.1 (pMPPROM) foi então conjugada com as estirpes de *H. seropedicae*: SmR1, SmR54, DCP286A e MBFNR2/3/1 (tabela 1). Os transconjugantes foram selecionados com os antibióticos apropriados e confirmados por análise de restrição dos plasmídeos extraídos. Os transconjugantes foram crescidos em meio NFb-malato contendo 5mmol/L ou 20mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl e os antibióticos específicos para cada estirpe e, após 24 horas de cultivo, foi realizada a determinação da atividade de β-galactosidase (item 4.9).

A região promotora de Hsero\_2872 mostrou-se funcional na estirpe selvagem de *H. seropedicae* e a expressão foi sensível aos níveis de amônio no meio (figura 34).



**FIGURA 34 – DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE HSERO\_2872 NA ESTIRPE SmR1 DE *H.seropedicae*.** Atividade de β-galactosidase determinada com 24 horas de cultivo em meio NFb-malatoHPN e D.O.<sub>595nm</sub> inicial de aproximadamente 0,01. A estirpe SmR1 contendo o vetor pMP220 foi utilizado como controle negativo. Gráfico representando grupo de quatro experimentos realizados em triplicata.

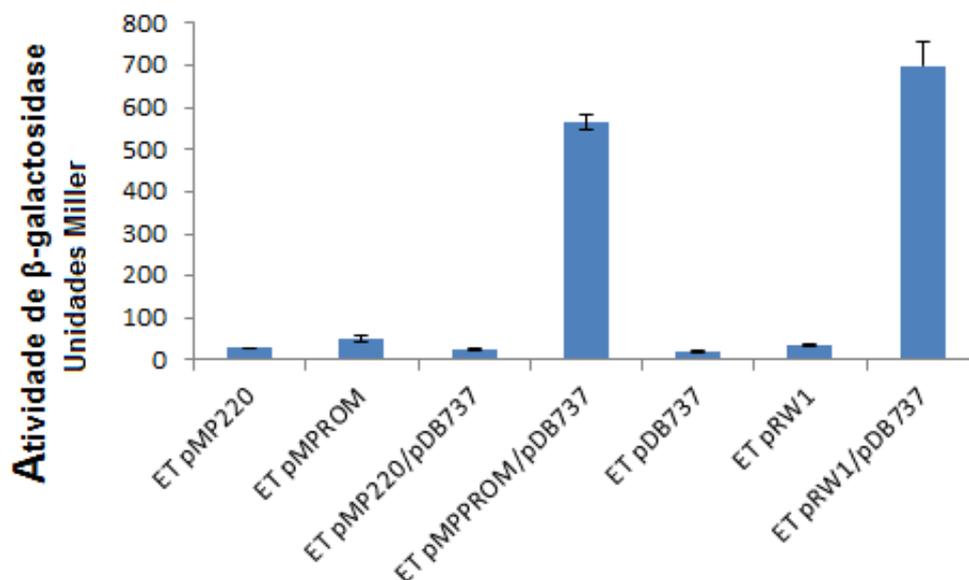
Para avaliar a possível influência das proteínas NifA, NtrC e FNR, foi determinada a atividade de  $\beta$ -galactosidase da fusão transcricional pHsero\_2872::lacZ nas estirpes mutantes SmR54 (*nifA*), DCP286A (*ntrC*) e MBFNR2/3/1 (*fnr*) de *H. seropedicae*. O resultado apresentado na figura 35 demonstrou que a estirpe SmR54 apresentou metade da atividade de  $\beta$ -galactosidase da estirpe selvagem SmR1, na ausência de amônio, e as estirpes DCP286A e MB231 apresentaram aproximadamente 25% da atividade de  $\beta$ -galactosidase nesta mesma condição. A menor atividade de  $\beta$ -galactosidase das estirpes mutantes *nifA*, *fnr* e *ntrC* é indicativa de uma possível participação da proteína NifA na expressão do promotor do gene Hsero\_2872. A atividade de  $\beta$ -galactosidase observada na estirpe selvagem SmR1 na presença de 20mmol/L de cloreto de amônio sugere uma expressão constitutiva do promotor e a maior atividade em baixo amônio indicaria ativação da expressão do promotor por NifA. Batista (2011) sugeriu um possível envolvimento das proteínas FNR na atividade de NifA o que justificaria a menor atividade do promotor no mutante *fnr*.



**FIGURA 35 – DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE HSERO\_2872 EM ESTIRPES MUTANTES DE *H.seropedicae*.** Atividade de  $\beta$ -galactosidase determinada com 24 horas de cultivo em meio NFb-malatoHPN, 20% de oxigênio e D.O.<sub>595nm</sub> inicial de aproximadamente 0,01. A estirpe SmR1 contendo o vetor pMP220 foi utilizado como controle negativo. Gráfico representando grupo de três experimentos realizados em triplicata.

Visando melhor avaliar o envolvimento da proteína NifA na expressão do gene Hsero\_2872, o vetor pMPPROM foi transformado em *E.coli* ET8000 já hospedando os vetores pMP220 (controle), pDB737 (expressa a NifA de *Azotobacter vinelandii*) e pRW1 (contém o promotor do gene *nifA*), em diversas combinações. Colônias foram selecionadas em meio com o antibiótico adequado e os plasmídeos foram confirmados por reação de PCR e/ou restrição. As colônias foram inoculadas em meio NFDM suplementado com solução de fosfatos e 20mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl, por 24 horas, e então a atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinada (figura 36). Observou-se significativa atividade de  $\beta$ -galactosidase apenas na presença da proteína NifA e dos promotores pHsero\_2872 (pMPPROM) e pNifA (pRW1). O nível de ativação do promotor do gene Hsero\_2872 pela proteína NifA foi próximo ao nível de ativação do promotor do gene *nifA* de *H. seropedicae*. Com este resultado é possível afirmar que a expressão do promotor da globina Hsero\_2872 é dependente da

proteína NifA em *Escherichia coli*. Com os resultados obtidos, tanto em *H. seropedicae* como em *E. coli*, é possível concluir que a proteína NifA é importante para a ativação do promotor do gene Hsero\_2872.



**FIGURA 36 – DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE HSERO\_2872 EM *E.coli* ET8000.** Atividade de β-galactosidase determinada com 24 horas de cultivo em meio NFDM, suplementado com fosfatos e 20mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl, com D.O.<sub>595nm</sub> inicial de aproximadamente 0,01. A estirpe ET 8000 contendo o vetor pMP220 foi utilizado como controle negativo. Gráfico representando grupo de três experimentos realizados em triplicata.

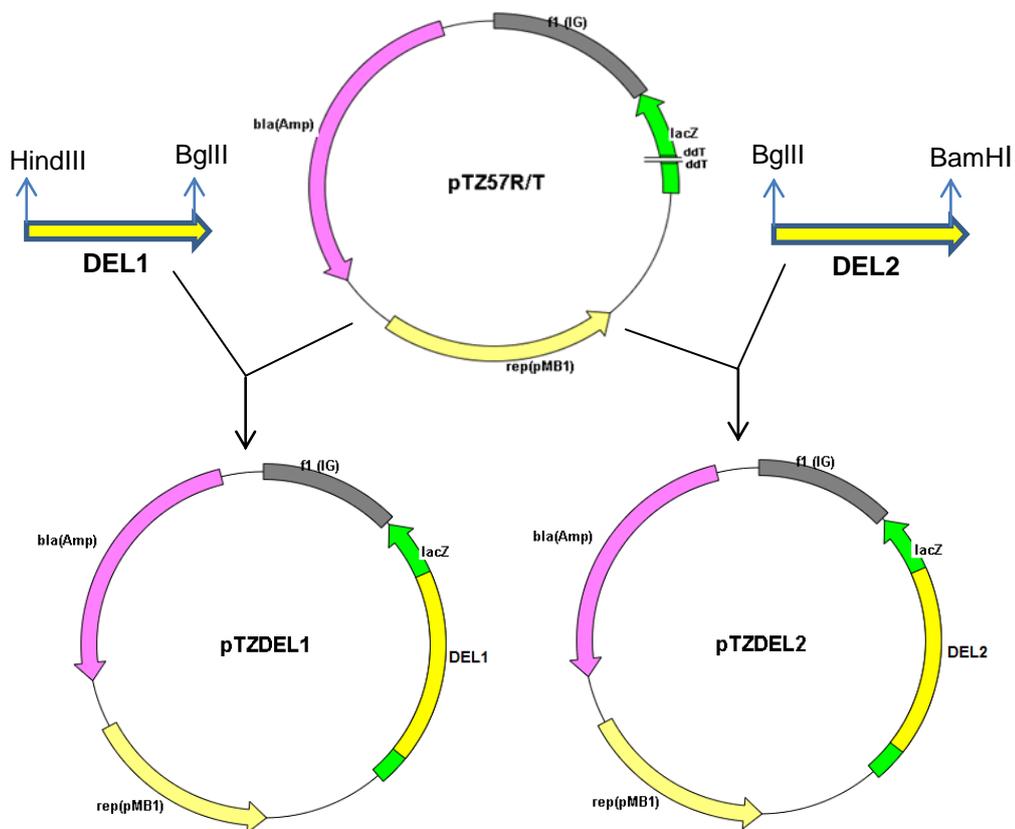
#### 5.4.2 Construção do mutante cromossomal Hsero\_2872 e sua caracterização fisiológica.

Para construção do mutante com deleção de aproximadamente 200 pb da região central do gene foram amplificadas duas regiões. A primeira, de 628 pb (DEL1), contendo 194 pb da região inicial do gene mais 434 da região a montante do gene, e a segunda de 622 pb (DEL2) contendo 212 pb da sequência final do gene mais 410 pb da região a jusante do gene (Figura 37).

```
ACTGGAACCCCATGCGCTGC CTGAGAGCGCTAGAACCCGCCTTGCTACTCTGTCGTGAGATCCGAGATCC
TGAAAAACGGCAGAAAAAGCGCCGTGTAATTACCGAATAGTTACCTTGCTGGTCAAGCAAACCTTCATGCC
CAAGCAGATGCATGAATCGATCTCGCCAAGCAACCCACACAATGCCGGCTTTCCTCGATGTGCCTTGG
CGGGTTGGCGACAACGGTGTGCTCTTTGTGCGATTACGACAATCATGCCACTGGCGCAGCAATCAGAA
ATCGTCGCTATCCCATTGATTTAAAAGAAAAATATTGTATGGCATGGTTTTGGCTATTACATACCTGCATC
GGCCGCTCACCGGCCAAGCGAAACGACAAAGCAGAGCAAGCCGGTAGCCAGCCAGCGTTATGTAGCGAG
ATATACAGACCTCCAACATCCACCATCGCCCACTATGAATGTGCCTTCGACTTCCGAACCCGGTGCACCA
CGTGCGTGTGGGCGCCCTGCTCCCAGGCATGTTATCTGACCCTGAACTGGCCGGTGCCTGGCCCGGCGA
TGGCGCGCGGCACGCAACAGGTGATATGTGAGCCGCCACAATTACCTCAACCGGCGCACCGGTTGCTGGC
GCTGTGTGATGAATCCGGCTTGCGCAAACCTGGTGTGCATCATATGCGGCGCCTGCGCCATTCCCCGCTG
TTCGCACGTTTCGCACAATTGTTTTGATTGCGTCAGCTCGCGCATCGCCGACTTCGTGGTGGAGTCATGCG
GCGGTCCGCTCTACTACAGCCAACGCCATGCCATCTGCAAGCGGGCGCAGGCTTGCCGTTGCTATTGGA
CGAAGCTGGGCGCGAACTGTGGCTGGTACAGCTTTGGCATACTTTGACGATATCGGTTTTCCCGCCCGCG
CTGCGGGCGGACTTCTGGGCCCTGGGCCGAACCCTTGTCGATTTCATCTGCTGGTACGTCATGCGCGCTCG
AACCGCCGCGGCGCTACCCCTATGAGCTGGTACGCAGCTGGTTCCACTCGCCCGCCACCGACATGCTGCC
GCCGATAGCGGATCTGATCCGGCCATCGGGAAGATCCGAATCATGACTGCGCCATCCGGCATCGCATCC
CCGCATCTGTTTTCTTGATGCGGCCGGTCTGAGCGATGTCCAACCTTTTTTCCCGTGAACCTGCCATGCCG
GATTACCCGCAACGCTACGGCGTCTTCCCTCAATGTGCGAAAATCCCATGGCAACGCACGCGATGCGCTGT
TGCAGACCGTTCGATCATGCCGTGCTGGCAGAGGCCCTGGGCTATCACGATGTCTGGGTGCGCGAGACCA
TTACAGCAGCTTCGCCATCGGCAGCGCCTTGATGGTGTGCTGGCCAGATCGCCGCACGCACTTCGCGC
ATCCGCCCTCGGTACGGGCGCTTCGTTGCTGGCGCTCAATGATCCCTTGCGGGTTGCCGAGGACGTCGCCA
CGCTGGACCTGCTCAGCAACGGCCGGATGGAATTCGCGTGGCACGCGGCGGCCGTTTTCCCGAGCAATA
TCGTACGCCGGATTGAGCGGTGCCGATCAGGCGCGCGCACGCATGATTGAAGCACTGGACGTCATCCAG
```

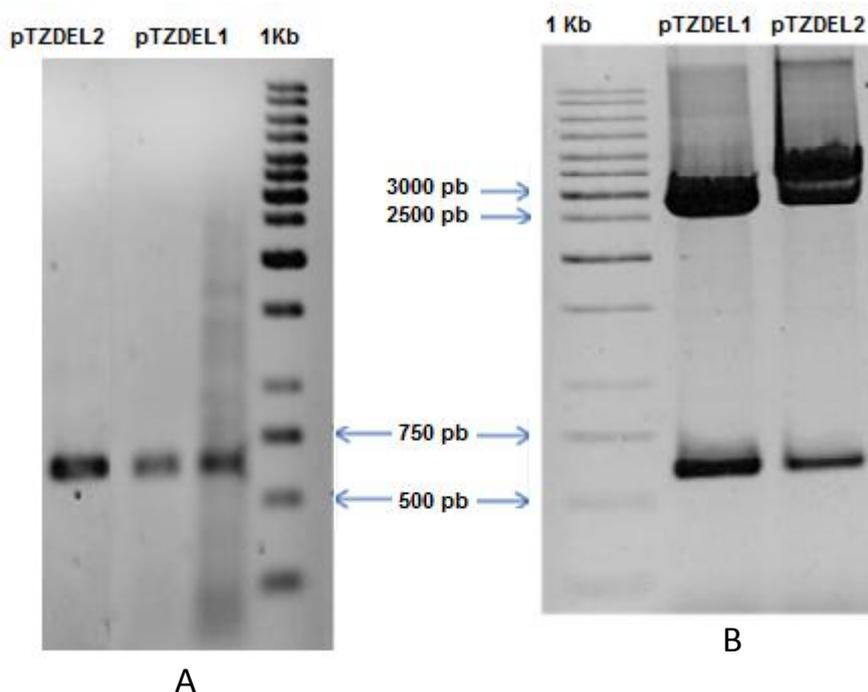
**FIGURA 37 – REGIÕES AMPLIFICADAS VISANDO CONSTRUÇÃO DO MUTANTE.** Em negrito estão destacadas as regiões amplificadas DEL1 (628 pb) e DEL2 (622 pb) com total de 1250 pb; em itálico e sublinhado os oligonucleotídeos iniciadores; em vermelho e sublinhado os códons de início (ATG) e término (TGA) da tradução. Deleção de 236 pb da região central do gene Hsero\_2872 de *H. seropedicae*.

Os segmentos DEL1 e DEL2 (figura 37) foram amplificados por reação de PCR com primers contendo sítios de restrição para as enzimas HindIII/BglIII (DEL1) e BglIII/BamHI (DEL2) e clonados no vetor pTZ57R/T, dando origem aos plasmídeos pTZDEL1 e pTZDEL2 respectivamente (figura 38). A integridade das sequências amplificadas foi confirmada por reação de sequenciamento e análise com o programa BioEdit.



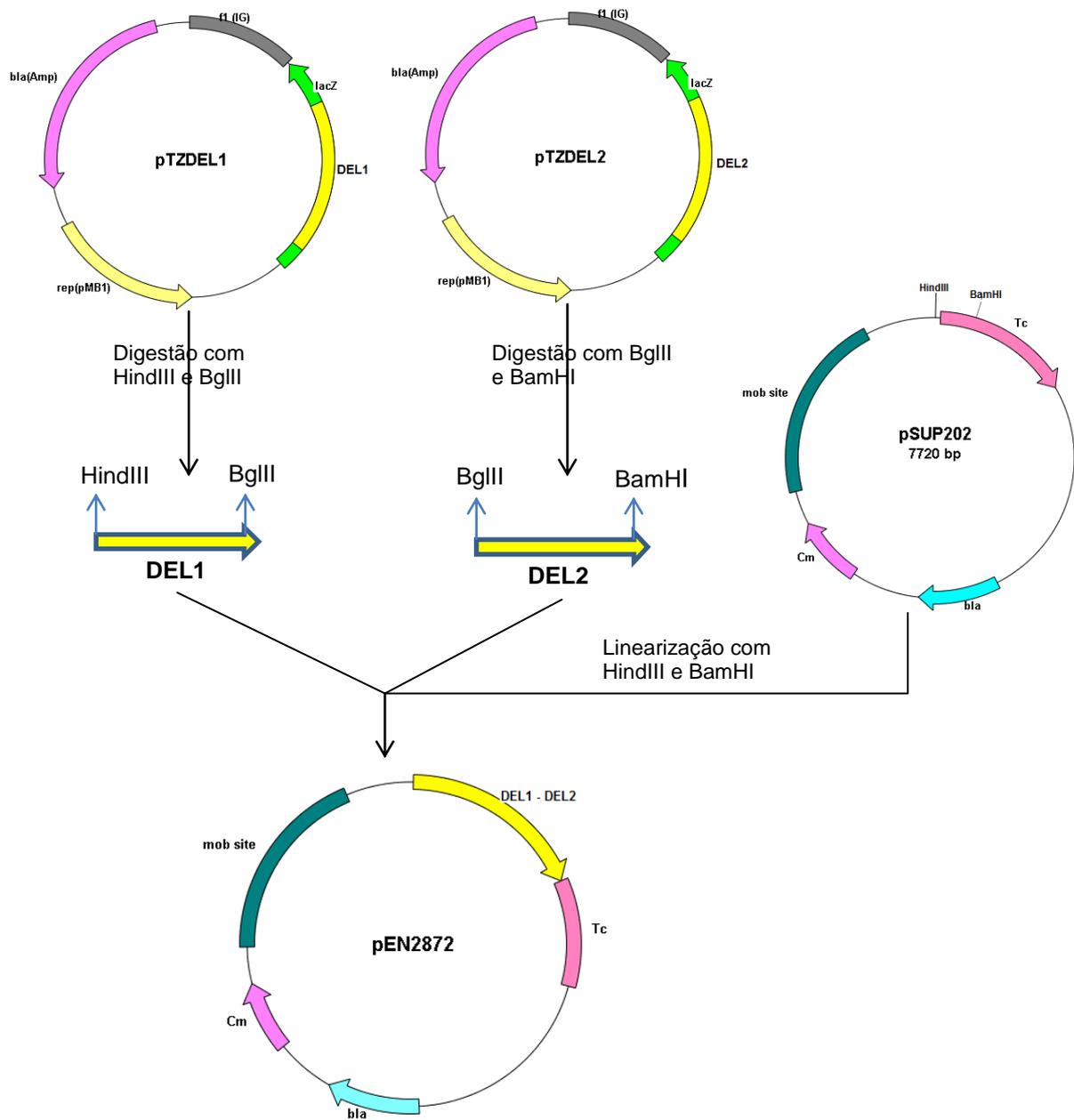
**FIGURA 38 – ESQUEMA DA CLONAGEM DAS REGIÕES PARA CONSTRUÇÃO DO MUTANTE DO GENE HSERO\_2872 NO VETOR pTZ57R/T.**

A confirmação dos insertos no pTZ57R/T foi feita por reação de PCR e restrição dos plasmídeos pTZDEL1 e pTZDEL2 com as enzimas HindIII/BglIII e BglIII/BamHI respectivamente (figura 39). Foram observadas as bandas correspondentes aos segmentos clonados DEL1 (628 pb) e DEL 2 (622 pb), bem como do vetor pTZ57R/T linearizado (2886 pb) no perfil eletroforético da restrição.

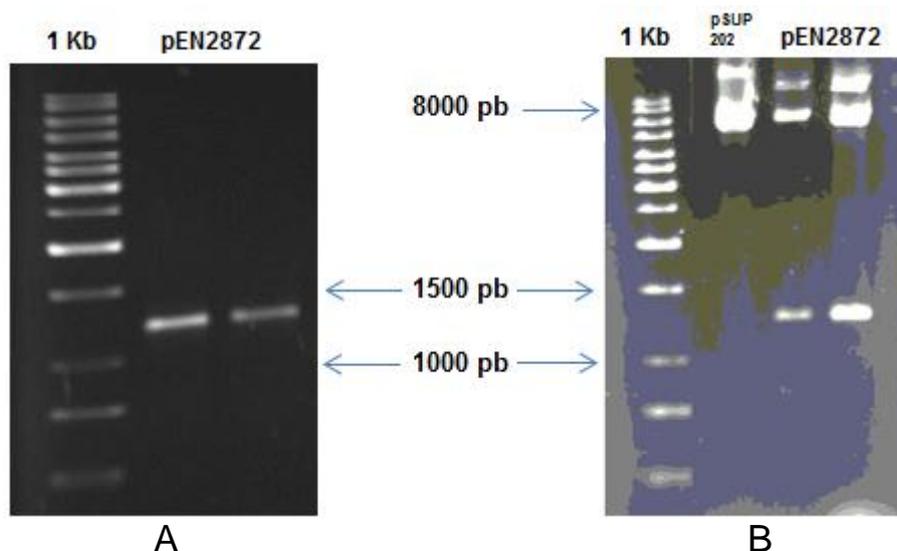


**FIGURA 39 – CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DAS REGIÕES PARA CONSTRUÇÃO DO MUTANTE DO GENE HSERO\_2872 NO VETOR pTZ57R/T.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TBE. 1Kb = 1 Kb ladder (Fermentas). Em A, amplificação por reação de PCR; Em B restrição do plasmídeo pTZDEL1 com enzimas HindIII e BglIII, mostrando banda ( $\approx 628$  pb) do segmento da região DEL1 e restrição do vetor pTZDEL2 com enzimas BglIII e BamHI, mostrando banda ( $\approx 622$  pb) da região DEL2 e banda ( $\approx 2886$  pb) do vetor pTZ57R/T linearizado.

Após confirmação da clonagem e da integridade das sequências amplificadas, os segmentos DEL1 e DEL2 foram isolados por restrição dos plasmídeos PTZDEL1 e pTZDEL2 respectivamente e foram ligados um ao outro e ao plasmídeo pSUP202 dando origem ao plasmídeo pEN2872 (figura 40). A confirmação da clonagem foi feita por reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores DelF1 e DelR4 (tabela 9) e por análise de restrição com as enzimas HindIII e BamHI (figura 41). Foi confirmada a clonagem pela observação das bandas do fragmento DEL1-DEL2 (1250 pb) e do vetor pSUP linearizado (7720 pb) no perfil eletroforético de restrição.



**FIGURA 40 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO MUTAGÊNICO pEN2872.**



**FIGURA 41 – CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DOS SEGMENTOS DEL1 E DEL2 NO VETOR pSUP202.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TBE. 1Kb = 1 Kb ladder (Fermentas). Em A, amplificação por reação de PCR com primers DelF1 e DelR4; Em B restrição do plasmídeo pEN2872 com enzimas HindIII e BamHI, mostrando banda ( $\approx 1250$  pb) do segmento DEL1-DEL2 e banda ( $\approx 7720$  pb) do vetor pSUP202 linearizado.

O plasmídeo pEN2872 foi então linearizado com a enzima BamHI e ligado ao cassete SacR-SacB-Km<sup>R</sup> (item 4.8) dando origem ao plasmídeo pEN1872sac (figura 42). A clonagem foi confirmada pela presença de uma banda do segmento DEL1- DEL2 (1250 pb), uma banda do vetor pSUP linearizado (7720 pb) e três bandas correspondentes ao perfil de restrição do cassete SacB-Km<sup>R</sup> após restrição com as enzimas BamHI e HindIII (figura 43).

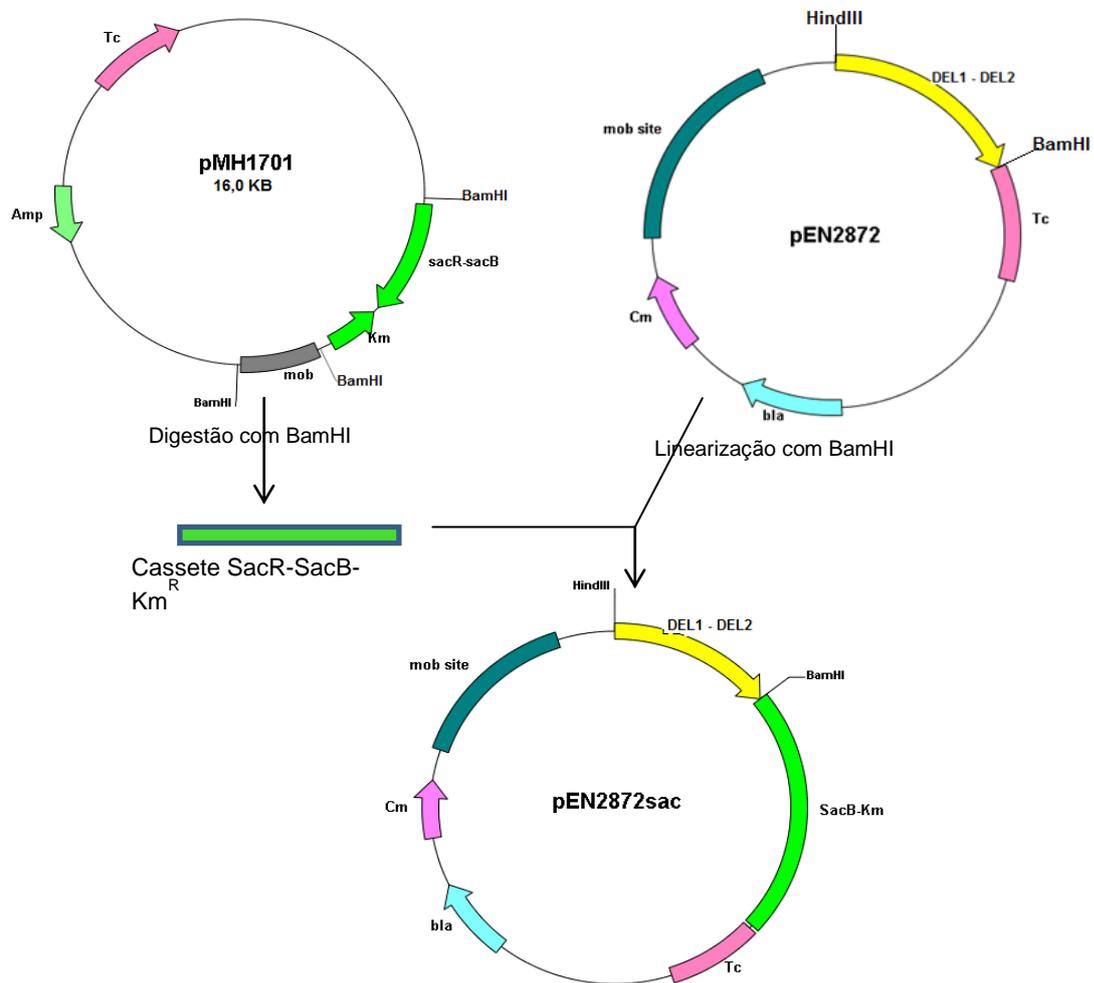
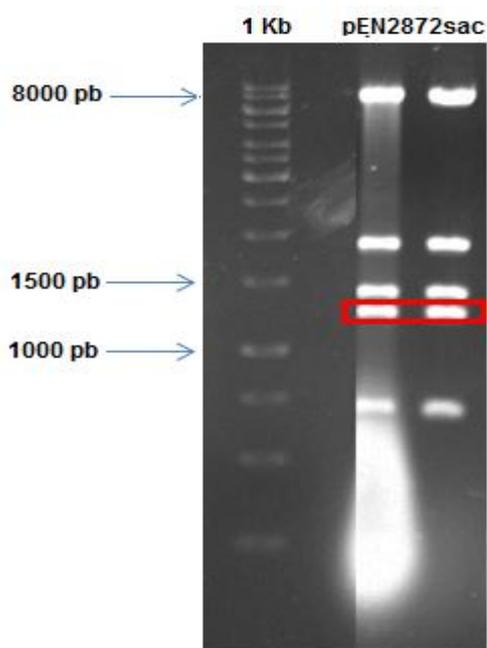


FIGURA 42 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO MUTAGÊNICO pEN2872sac.



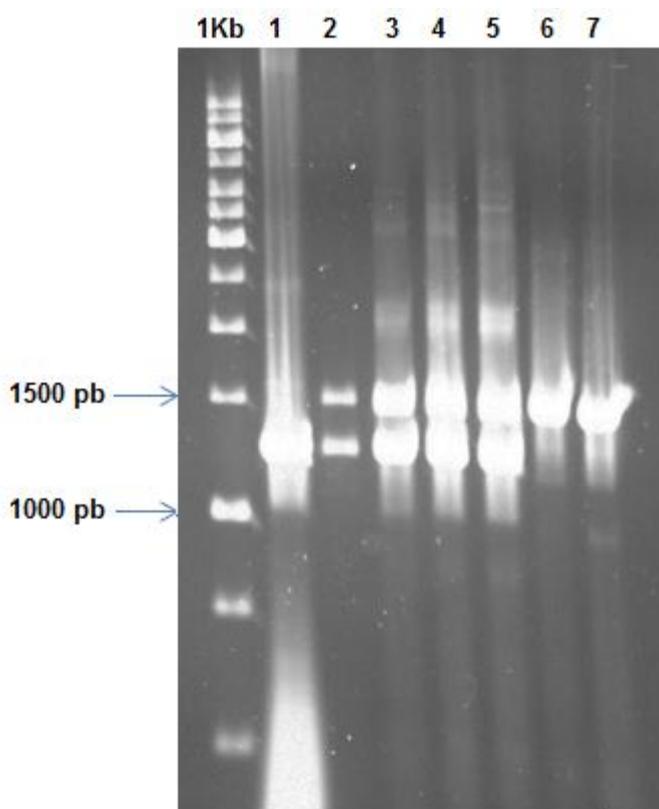
**FIGURA 43 – CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pEN2872SAC.**

Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TBE. Restrição do plasmídeo pEN2872sac com enzimas HindIII e BamHI, mostrando banda ( $\approx 1250$  pb, destacada em vermelho) do segmento DEL1-DEL2 e banda ( $\approx 7720$  pb) do vetor pSUP202 linearizado. As 3 bandas restantes correspondem ao perfil de restrição do cassete SacB-Km<sup>R</sup>. 1Kb = 1 Kb ladder (Fermentas).

Para construção do mutante cromossomal Hsero\_2872, o plasmídeo pEN2872sac foi transformado na estirpe S17.1 de *E. coli*. As colônias transformadas foram selecionadas em meio LA contendo os antibióticos canamicina e cloranfenicol. Após a transformação, uma colônia isolada foi inoculada em meio LB e utilizada para conjugação com a estirpe SmR1 de *H. seropedicae* como descrito no item 4.5.4.

As colônias transconjugantes crescidas em meio NFbHPN-malato contendo estreptomicina, cloranfenicol e canamicina foram reinoculadas no mesmo meio, adicionado ou não de sacarose 5%. As colônias obtidas foram submetidas a reação de PCR para avaliar a ocorrência de recombinação homóloga (primeiro evento de recombinação). O resultado está mostrado na figura 44. Foi constatada a presença de dois fragmentos (linhas 2 a 5), sendo o

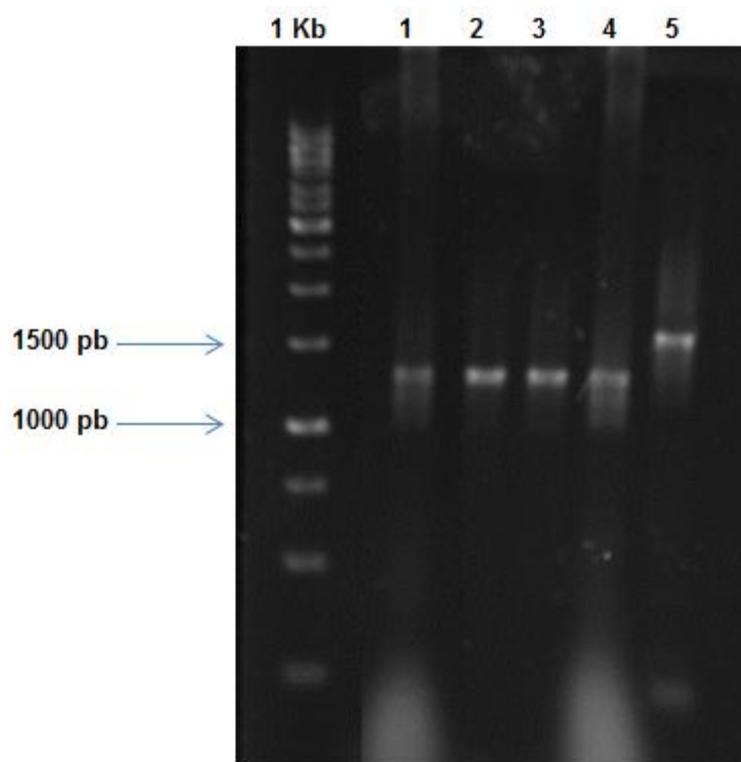
de maior número de bases o da cópia selvagem do gene (1486 pb) e o menor, o da cópia mutada (1250 pb) do gene Hsero\_2872 .



**FIGURA 44 – CONFIRMAÇÃO DO PRIMEIRO EVENTO DE RECOMBINAÇÃO.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TBE. Reação de PCR com oligonucleotídeos DelF1 e Del R4 para confirmação dos mutantes Hsero\_2872 de *H. seropedicae*. 1Kb = 1 Kb ladder (Fermentas). Em: 1 = plasmídeo pEN2872; 2 a 5 = colônias transconjugantes selecionadas; 6 = cultura de *H. seropedicae* SmR1; 7 = DNA de *H. seropedicae* estirpe SmR1.

As colônias transconjugantes confirmadas foram inoculadas em meio NFbHPN-malato sem antibióticos a 30°C e 120 rpm por 16 horas. Depois deste tempo, 100µL de cultura foi reinoculado em meio NFbHPN-malato com 5% de sacarose e estreptomicina 80µg/mL ( $Sm^{80}$ ), a 30°C por 36 a 48 horas. As colônias crescidas neste meio foram reinoculadas em meio sólido NFbHPN-malato contendo: 1°-  $Sm^{80}$ ,  $Km^{500}$ ,  $Cm^{30}$  ou 2°-  $Sm^{80}$ . As colônias crescidas

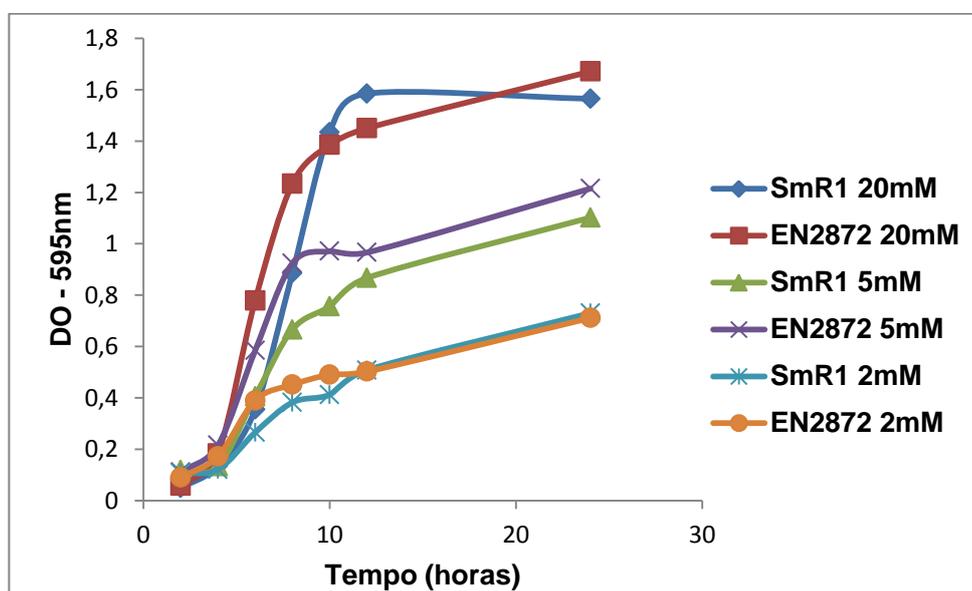
somente na presença de Sm<sup>80</sup> foram analisadas por reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos DelF1 e DelR4. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese (figura 45). Foi possível confirmar a deleção da cópia selvagem do gene Hsero\_2872 (segundo evento de recombinação) (colônias 2 a 4). O mutante foi utilizado em ensaios de caracterização fisiológica.



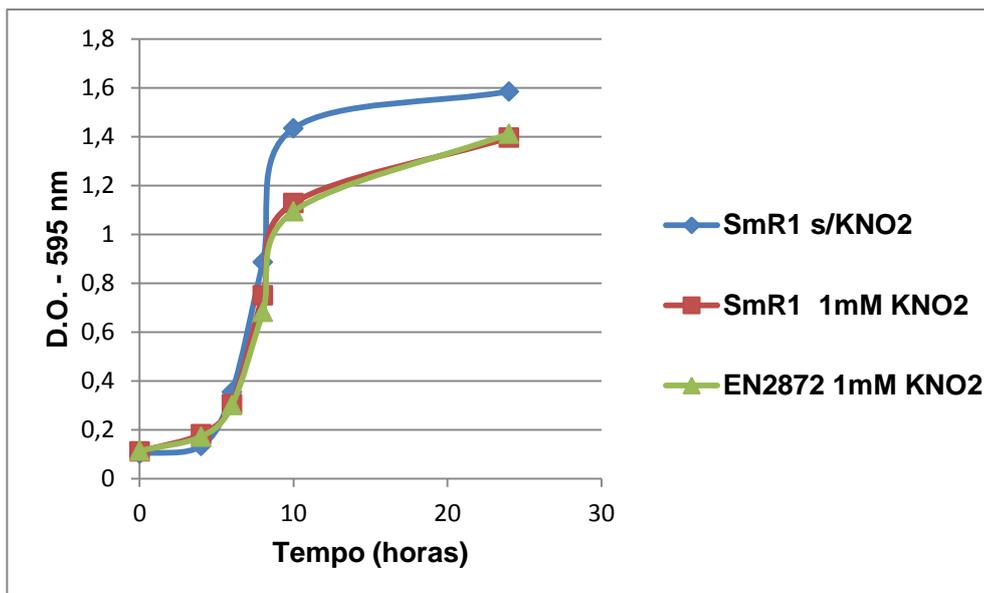
**FIGURA 45 – CONFIRMAÇÃO DO SEGUNDO EVENTO DE RECOMBINAÇÃO.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TBE. Reação de PCR com oligonucleotídeos DelF1 e Del R4 para confirmação dos mutantes Hsero\_2872 de *H. seropedicae*. 1Kb = 1 Kb ladder (Fermentas). Em: 1 = plasmídeo pEN2872; 2 a 4 = DNA amplificado das colônias transconjugantes selecionadas; 5 = DNA de *H. seropedicae* estirpe SmR1.

#### 5.4.2.1 Caracterização funcional do mutante cromossomal Hsero\_2872 .

Inicialmente foi analisado o perfil de crescimento em meio contendo cloreto de amônio (20, 5 ou 2mmol/L) ou nitrito de potássio (1mmol/L), a fim de avaliar possível efeito do produto do gene na detoxificação celular quando na presença de espécies reativas de nitrogênio e em atmosfera limitante de oxigênio. Curvas de crescimento foram obtidas e comparadas à da estirpe selvagem SmR1. As estirpes mutantes cultivadas em meio NFbHP-malato com diferentes concentrações de cloreto de amônio não apresentaram mudança no perfil quando comparadas com a estirpe selvagem (figura 46). O mesmo foi observado quando cultivadas em meio NFbHPN-malato acrescido de 1mmol/L de  $\text{KNO}_2$  (figura 47). Os resultados sugerem que a ausência do produto do gene Hsero\_2872 não influencia o perfil de crescimento de *H. seropedicae* nas diferentes concentrações de nitrogênio fixado, nem possui papel importante na detoxificação do NO.

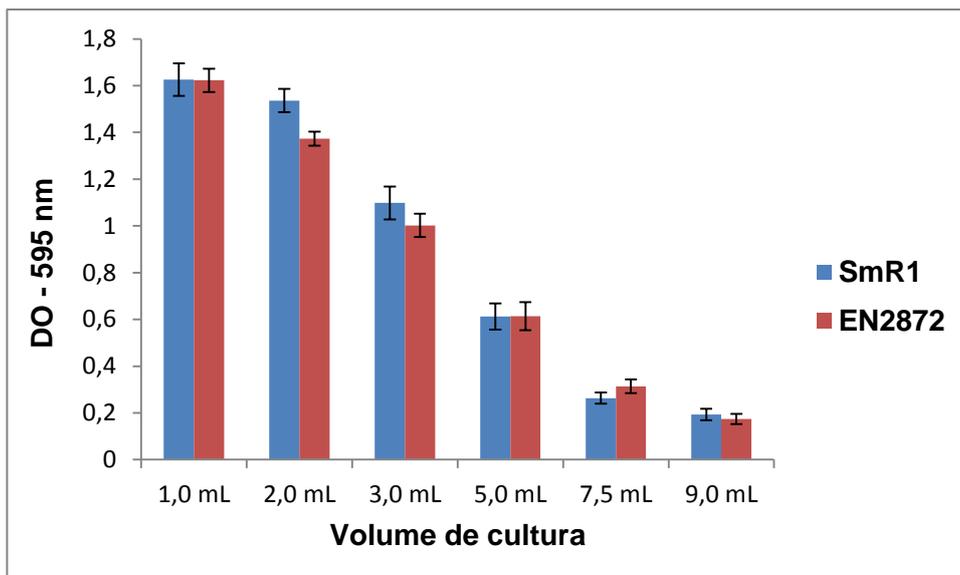


**FIGURA 46 – PERFIL DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE AMÔNIO.** Crescimento acompanhado por determinação da densidade óptica em comprimento de onda de 595 nm. A D.O.  $_{595\text{nm}}$  inicial foi de 0,01. Gráfico representativo de 2 experimentos realizados em duplicata.



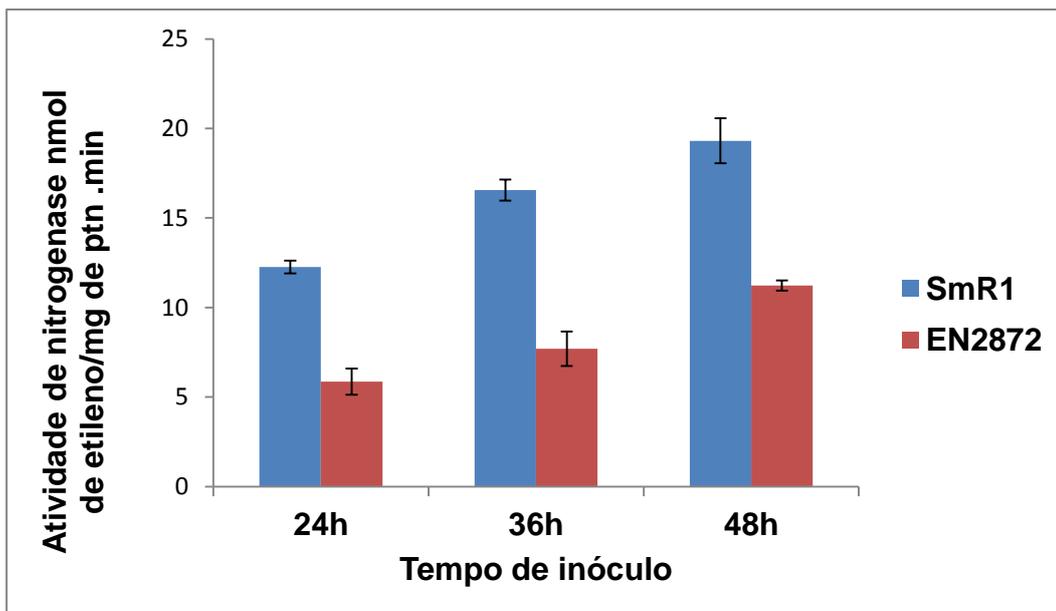
**FIGURA 47 – PERFIL DE CRESCIMENTO EM 1mmol/L DE NITRITO DE POTÁSSIO.** Crescimento acompanhado por determinação da densidade ótica em comprimento de onda de 595 nm. A D.O. <sub>595nm</sub> inicial foi de 0,01. Gráfico representativo de 2 experimentos realizados em duplicata.

Para caracterizar o perfil de crescimento em condições diferenciadas de oxigênio, as estirpes foram cultivadas em meio NFbHPN-malato, em frascos de igual volume (10mL), porém com diferentes volumes de cultura (BATISTA, 2011). Devido a esta variação o consumo do oxigênio durante o crescimento poderia acarretar condições diferenciadas de concentração de oxigênio, que poderiam ou não ser limitantes ao crescimento. Conforme mostrado na figura 48 não foi observada diferença no perfil de crescimento entre a estirpe mutante e a selvagem nas condições testadas. Os resultados indicam que, nas condições analisadas, a ausência do produto do gene Hsero\_2872, não alterou as condições de crescimento de *H. seropedicae* em diferentes níveis de O<sub>2</sub>.



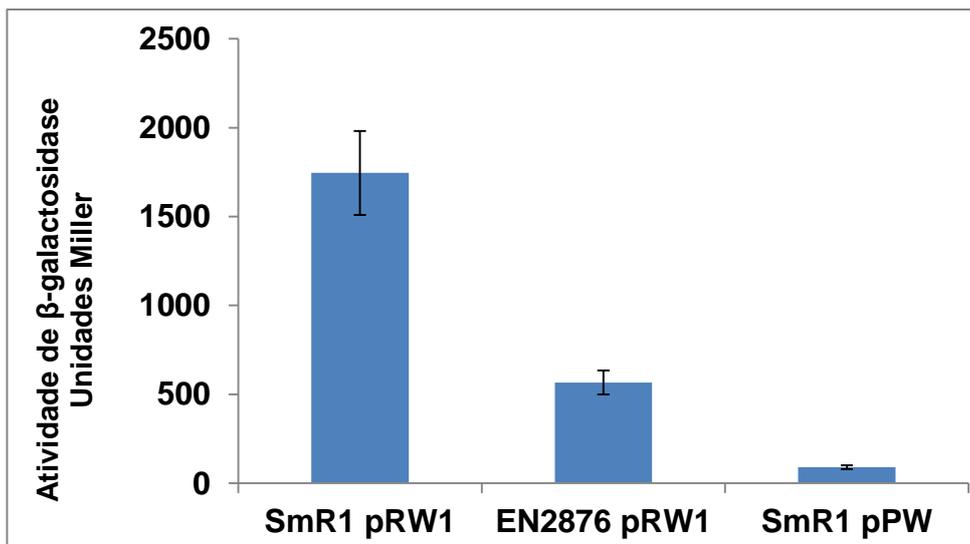
**FIGURA 48 – PERFIL DE CRESCIMENTO EM ATMOSFERA LIMITANTE DE OXIGÊNIO.** Crescimento acompanhado por determinação da densidade ótica em comprimento de onda de 595 nm. A D.O.  $_{595\text{nm}}$  inicial foi de 0,01. Foram cultivadas em frascos de 10mL com diferentes volumes de cultura (1,0mL; 2,0mL; 3,0mL; 5,0mL; 7,5mL e 9,0mL) fechados com tampa de borracha, com agitação de 120 rpm, a 30°C, durante 24 horas. Gráfico representativo de 2 experimentos realizados em triplicata.

Com o objetivo de avaliar o efeito da mutação no gene *Hsero\_2872* sobre a fixação biológica de nitrogênio, foi determinada a atividade de nitrogenase da estirpe mutante EN2872 e comparada com a estirpe selvagem SmR1. Os testes foram realizados como descrito no item 4.9. Nestes ensaios foram utilizadas culturas com D.O. $_{595\text{nm}}$  de aproximadamente 1,5 para inóculo em meio semissólido e obtidas curvas de 16 a 50 horas de cultivo. A figura 49 mostra atividade da enzima determinada em 24, 36 e 48h. A estirpe mutante apresentou atividade de nitrogenase cerca de 40 a 55% menor que a atividade da estirpe selvagem na maioria dos pontos, sugerindo que o produto do gene *Hsero\_2872* é importante para a melhor atividade de nitrogenase em *H. seropedicae*.



**FIGURA 49 – ATIVIDADE DE NITROGENASE DAS ESTIRPES MUTANTE EN2872 e SELVAGEM SmR1.** Ensaio realizado em meio semissólido NFbHP-malato com 0,5mmol/L de glutamato nos tempos indicados. A atividade foi expressa como nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína na cultura. Resultados de 3 experimentos diferentes realizados em triplicata.

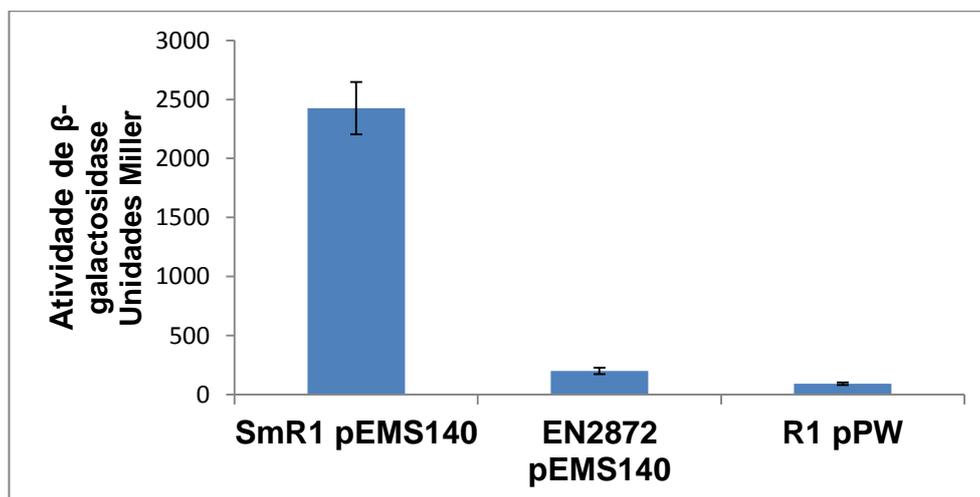
Com a finalidade de determinar o efeito da mutação do gene Hsero\_2872 na expressão da proteína NifA de *H. seropedicae* foram realizados experimentos de determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase, utilizando o plasmídeo pRW1 (Wassem, 2000). Este plasmídeo que contém a fusão promotor *nifA*::gene *lacZ* foi transformado em *E. coli* S17.1 e esta foi conjugada com as estirpes EN2872 e SmR1 de *H. seropedicae*. As colônias transconjugantes foram selecionadas em meio com antibiótico adequado. A atividade na estirpe mutante foi duas vezes menor que na estirpe SmR1 (figura 50), sugerindo o envolvimento do produto do gene Hsero\_2872 na expressão do gene *nifA* em *H. seropedicae*.



**FIGURA 50 – ATIVIDADE DE β-GALACTOSIDASE DAS ESTIRPES MUTANTE EN2872 E SELVAGEM SmR1 CONTENDO PLASMÍDEO pRW1.** Teste realizado em meio líquido NFbHP-malato com 5,0mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl, como descrito no item 4.8. A D.O.<sub>595nm</sub> inicial foi de 0,01. Figura mostra ensaio realizado com 20h de cultivo. A estirpe SmR1 contendo vetor pPW452 (gene para β-galactosidase sem promotor) foi utilizada como controle negativo. Gráfico representativo de três experimentos diferentes realizados em triplicata.

Para avaliar o efeito do gene Hsero\_2872 sobre a atividade da proteína NifA foi utilizado o plasmídeo pEMS140 que contém o promotor do gene *nifB* fusionado ao gene *lacZ*. O gene *nifB* tem sua expressão regulada pela proteína NifA, assim como outros genes relacionados à fixação biológica de nitrogênio. O plasmídeo pEMS140 foi transformado em *E. coli* S17.1 e, então, a estirpe contendo o plasmídeo foi conjugada com as estirpes SmR1 ou EN2872 de *H. seropedicae*. As colônias transconjugantes foram selecionadas em meio com o antibiótico adequado e confirmadas por reação de PCR. A determinação da atividade de β-galactosidase foi realizada após 20h de cultivo em meio NFbHP-malato com 5mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl, mais 5h de cultivo em atmosfera com 2% de oxigênio em frascos tampados. A atividade da proteína NifA na estirpe EN2872 foi aproximadamente de 15% da atividade da estirpe selvagem SmR1 (figura 51). O resultado mostra que a ausência do produto do gene Hsero\_2872 afeta negativamente a atividade da proteína NifA. Com base nos resultados obtidos

com as fusões contendo tanto o promotor do gene *nifA* como do *nifB* é possível sugerir que o efeito do produto do gene Hsero\_2872 se faz sobre a atividade da proteína NifA já que a expressão desta proteína é ativada por ela mesma.



**FIGURA 51 – ATIVIDADE DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE DAS ESTIRPES MUTANTE EN2872 E SELVAGEM SmR1 CONTENDO PLASMÍDEO pEMS140.** Teste realizado em meio líquido NFbHP-malato com 5,0mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , como descrito no item 4.8. A  $\text{D.O.}_{595\text{nm}}$  inicial foi de 0,01. Após 20h de cultivo, os frascos foram tampados com rolha de borracha e o ar foi trocado para uma atmosfera com 2% de oxigênio. As amostras foram cultivadas a 30°C, agitação de 120 rpm por mais 5 horas, após o que foi determinada a atividade de  $\beta$ -galactosidase. A estirpe SmR1 contendo vetor pPW452 (gene para  $\beta$ -galactosidase sem promotor) foi utilizada como controle negativo. Gráfico representativo de três experimentos diferentes realizados em triplicata.

## 6. CONCLUSÕES

1. O promotor do gene Hsero\_2872 é funcional e sua expressão é aumentada quando os níveis de amônio no meio diminuem;
2. As proteínas NifA, FNR e NtrC são importantes para a expressão do gene Hsero\_2872;
3. A atividade do promotor do gene Hsero\_2872 em *E. coli* ET8000 só foi significativa quando houve expressão de proteína NifA concomitantemente;
4. O gene Hsero\_2872 tem, aparentemente, efeito no metabolismo do nitrogênio uma vez que a atividade de nitrogenase do mutante foi aproximadamente 50% da atividade da estirpe selvagem;
5. O mutante Hsero\_2872 com fusões *pnifA/lacZ* e *pnifB/lacZ* apresentou menor atividade de  $\beta$ -galactosidase que a estirpe selvagem SmR1, sugerindo necessidade do gene Hsero\_2872 para maior atividade da proteína NifA;
6. O produto do gene Hsero\_2872 possui similaridade com as hemoglobinas truncadas do grupo III, porém sua classificação mais precisa necessita de maior caracterização estrutural e funcional.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ALVES, L.R. **Análise funcional dos genes *ntrY* e *ntrX* de *Herbaspirillum seropedicae***. Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

APLLEBY, C. A. Leghemoglobin and Rhizobium respiration **Annu Rev Plant Physiol** v.35, p.443-478, 1984.

ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; WEISS, R. L.; NINFA, A. J. Reversible Uridylylation of the *Escherichia coli* PI1 Signal Transduction Protein Regulates Its Ability to Stimulate the Dephosphorylation of the Transcription Factor Nitrogen Regulator I (NRI or NtrC). **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 28288-28293, 1994.

AUSTIN, S.; BUCK, M.; CANNON, W.; EYDMANN, T.; DIXON, R. Purification and In Vitro Activities of the Nitrogen Fixation Control Proteins NifA and NifL. **J. Bacteriol.**, v.176, p.3460-3465, 1994.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DOBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **An Acad Bras Cienc**, v.56, p.365, 1984.

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. Syst. Bacteriol.**, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, 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. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, p. 802–810, 1996.

BATISTA, M. B. Construção e Caracterização de estirpes mutantes de *Herbaspirillum seropedicae* nos Genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3*. Curitiba, 2011. **Tese (Mestrado em Ciências – Bioquímica)** – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Evidences for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 179, p. 4623-4626, 1997.

BENELLI, E. M.; BUCK, M.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.** v .47, p. 309-314, 2001.

BONAMORE, A.; ATTILI, A.; ARENGHI, F.; CATAACCHIO, B.; CHIANCONE, E.; MOREA, V.; BOFFI, A. A novel chimera: The “truncated hemoglobin-antibiotic monooxygenase” from *Streptomyces avermitilis*. **Gene (Amst.)**, v.398, p.52-61, 2007.

BONATTO, A.C., COUTO, H., SOUZA, E.M., ARAUJO, L.M., PEDROSA, F.O., NOINDORF, L., BENELLI, E.M. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expr. Purif.** v. 55, n.2, p.293-29, 2007.

BOLTON, W.; COX, J. M.; PERUTZ, M. F. A three-dimensional Fourier synthesis of horse deoxyhaemoglobin at 5.5 Å resolution. Structure and function of haemoglobin. IV. **J.Mol.Biol.**, v.33, p.283-297, 1968.

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. 48-254, 1976.

BRUNORI, M. Nitric oxide, cytochrome-c oxidase and myoglobin. **TIBS**, v. 26, p.21-23, 2001.

BUCHAN, D.W.; WARD, S.M.; LOBLEY, A.E.; NUGENT, T.C.; BRYSON, K.; JONES, D.T. Protein annotation and modelling servers at University College London. **Nucl. Acids Res.**, v.38 Suppl, p.563-568, 2010.

CANNON, F.C.; DIXON, R.A.; POSTGATE, J.R. Chromosomal integration of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation genes in *E. coli*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 80, p. 227-239, 1974.

CARDOSO, R. L. A. MONTAGEM GENÔMICA DA BACTÉRIA ENDOFÍTICA DIAZOTRÓFICA *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 Curitiba, 2011. **Tese (Mestrado em Bioinformática)** – Setor de Educação Profissional e Tecnológica, Universidade Federal do Paraná. 109 páginas.

CHUBATSU, L.S.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; OLIVEIRA, M.A.S.; YATES, M.G.; WASSEM, R.; BONATTO, A.C.; HUERGO, L.F.; STEFFENS, M.B.R.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil**, DOI 10.1007/s11104-011-0819-6.

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.

D'ANGELO, P.; LUCARELLI, D.; DELLA LONGA, S.; BENFATTO, M.; HAZEMANN, J. L.; FEIS, A.; SMULEVICH, G.; ILARI, A.; BONAMORE, A.; AND BOFFI, A. Unusual Heme Iron-Lipid Acyl Chain Coordination in *Escherichia coli* Flavohemoglobin **Biophys. J.**, v.86, p.3882–3892, 2004.

DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasterianum*. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.127, p.387-395, 1966.

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen.nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicates* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.54, p.2223-2230, 2004.

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

DOBRITSA, A.P.; REDDY, M.C.; SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with description of *H. huttiense* subsp. *Huttiense* subsp. nov. and *H. hittiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description os *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.60, p.1418-1426, 2010.

FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 58, p. 352-375, 1994.

GASTEIGER E.; HOOGLAND C.; GATTIKER A.; DUVAUD S.; WILKINS M.R.; APPEL R.D.; BAIROCH, A. Protein identification and Analysis Tools on the ExPASy Server (In) John M. Walker (ed): **The Proteomics Protocols Handbook**, Humana Press, p.571-607, 2005.

GAY, P.; LE COQ, D.; STEINMETZ, M.; FERRARI, E.; HOCH, J.A. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *B. subtilis*: expression of the gene in *E. coli*. **J. Bacteriol.**, v.153, p.1424-1431, 1983.

HALL, T.A. **BioEdit 4.8**. Raleigh, 1997-2001. 1 arquivo (11,5 Mb); Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>> BioEdit: a userfriendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.

HARDISON, R. C. A brief history of hemoglobins: Plant, animal, protist and bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p.5675-5679, 1996.

HILL, D.R.; BELBIN, T.J.; THORSTEINSSON, M.V.; BASSAM, D.; BRASS, S.; ERNST, A.; BOGER, P.; PAERL, H.; MULLIGAN, M.E.; POTTS, M. Gln (cyanoglobin) is a peripheral membrane protein that is restricted to certain *Nostoc* spp. **J. Bacteriol.**, v.178, p.6587-6598, 1996.

HOWARD, J.B.; REES, D.C. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Chem. Rev.**, v.96, p. 2965-2982, 1996.

HOU, S.; FREITAS, T.; LARSEN, R. W.; PIATIBRATOV, M.; SIVOZHELEZOV, V.; YAMAMOTO, A.; MELESHKEVITCH, E. A.; ZIMMER, M.; ORDAL, G. W.; ALAM, M. Globin-coupled sensors: a class of heme-containing sensors in Archaea and Bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, p.9353–9358, 2001.

HYNES, M. F.; QUANDT, J.; O'CONNELL, M. P.; PUHLER, A. Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis sacB* gene. **Gene**, v.78, p.111-120, 1989.

IM, W.T.; BAE, H.S.; YOKOTA, A.; LEE, S.T. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.54, p.851-855, 2004.

JIANG, P. NINFA, A.J. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. **J. Bacteriol.**, p.1906-1911, 1999.

JUNG, S.Y.; LEE, M.H.; OH, T.K.; YOON, J.H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov. isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.57, p.2284-2288, 2007.

KENDREW J. C.; BODO, G.; DINTZIS, H. M.; PARRISH, R. G.; WYCKOFF, H.; PHILLIPS, D. C.. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. **Nature**, v.181, p.662–666, 1958.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.51, p.157-168, 2001.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* strain SMR1. **Can. J. Microbiol., Ottawa**, v.43, p. 841-846, 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.**, Amsterdam, v.118, p.165-170, 1999.

KLASSEN, G. **Análise genética e funcional dos genes *nifENXorf1orf2*, *nifQmodABCfixXC* de *Herbaspirillum seropedicae***. Tese de doutorado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, (London), v. 277, p. 680-685, 1970.

LANDSMANN, J.; DENNIS, E. S.; HIGGINS, T. J. V.; APPLEBY, C. A.; KORTT, A. A.; PEACOCK, W. J. Common evolutionary origin of legume and non-legume plant haemoglobin. **Nature** (London), v.324, p.166-168, 1986.

MACHADO, I.M.P.; YATES, M.G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 29, n.12, p.1599-1602, 1996.

MacNEIL, T.; MacNEIL, D.; TYLER, B. Fine-structure deletion map and complementation analysis of the *glnA-glnL-glnG* region in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.150, n°3, p.1302-1313, 1982.

MERRICK, M.J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol Rev.**, v.59, p.604-622, 1995.

MILANI, M.; SAVARD, P. Y.; OUELLET, H.; ASCENZI, P.; GUERTIN, M.; BOLOGNESI, M. A TyrCD1/TrpG8 hydrogen bond network and a TyrB10-TyrCD1 covalent link shape the heme distal site of *Mycobacterium tuberculosis* hemoglobin O. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, p.5766 – 5771, 2003.

MILLER, J. H.; Experiments in Molecular Genetics. New York. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, N. Y., p.325-355, 1990.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O; CHUBATSU, L. S. Expression and functional analysis of a N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.** V. 447, p. 283-286, 1999a.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O; CHUBATSU, L. S. In-trans regulation of the N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N-terminal domain. **FEMS Microbiol. Lett.** V. 180, p. 157-161, 1999b.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E. M.; WASSEM, R.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Inter-domain cross-talk controls the NifA protein activity of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.** V. 508, p. 1-4, 2001.

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 Cterminal domain of *Herbaspirillum seropedicae* NifA protein. **Protein Express. Purif.** v. 27, p. 313-318, 2003.

MORET, E.; BUCK, M. NifA dependent in vivo protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. **Proc. Natl. Acac. Sci. USA**, v. 85, p.9401-9405, 1988.

MUKAI, M.; MILLS, C. E.; POOLE, R. K.; YEH, S. Flavohemoglobin, a Globin with a Peroxidase-like Catalytic Site. **J. Biol. Chem.**, v.276, p.7272-7277, 2001

NARDINI, M.; PESCE, A.; LABARRE, M.; RICHARD, C.; BOLLI, A.; ASCENZI, P.; GUERTIN, M.; BOLOGNESI, M. Structural determinants in the group III truncated hemoglobin from *Campylobacter jejuni*. **J. Biol. Chem.**, v.281, p.37803 – 37812, 2006.

NINFA, E. G.; ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; NINFA, A. J. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): transphosphorylation between subunits. **J. Bacteriol.**, v.175, p.7024-7032, 1993.

NOINDORF, L. **Clonagem, sequenciamento e caracterização dos genes *glnK* e *amtB* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2002. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências- Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NOINDORF, L.; REGO, F. G. M.; BAURA, V.A.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; RIGO, L.U.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Characterization of the orf1glnkamt operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.**, v.185, p. 55-62, 2006.

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. **Biol. Fertil. Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.

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

OWCZARZY, R. ; TATAUROV, A. V.; WU, Y.; MANTHEY, J. A.; MCQUISTEN, K. A.; ALMABRAZI, H. G.; PEDERSEN, K. F.; LIN, Y.; GARRETSON, J.; McENTAGGART, N. O.; SAILOR, C. A.; DAWSON, R. B.; PEEK, A. S.. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic Acids Res.** 36 (Web Server Issue) w163-w169, 2008.

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

PEDROSA, F. O.; BENELLI, E. M.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A.; KLASSEN, G.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Biotechnol.**, v. 91, p. 189-195, 2001.

PENG, J.; JINBO XU, J. RaptorX: exploiting structure information for protein alignment by statistical inference. **PROTEINS**, 2011 Em: <http://raptorx.uchicago.edu/myjobs/7872/>

PERSUHN, D.C., SOUZA, E.M., STEFFENS, M.B.R., PEDROSA, F.O.; YATES, M.G., RIGO, L.U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of lutaminyesynthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 192, p. 217–221, 2000.

PERUTZ, M. F. Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. **Annu Rev. Biochem.** v.48, p.327-386, 1979.

PESCE, A.; COUTURE, M.; DEWILDE, S.; GUERTIN, M.; YAMAUCHI, K.; ASCENZI, P.; MOENS, L.; BOLOGNESI, M. A novel two-over-two  $\alpha$ -helical sandwich fold is characteristic of the truncated hemoglobin family. **EMBO J.**, v.19, p.2424 – 2434, 2000.

PESCE, A.; NARDINI, M.; MILANI, M.; BOLOGNESI, M. Protein Structure in The Truncated (2/2) Hemoglobin Family. **Life**, v.59 (8-9), p.535-541, 2007.

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

POSTGATE, J.R. Nitrogen Fixation. **Phill Trans. R. Soc. Lond.**, p.12-22, 1998.

RASSAF, T.; FLOGEL, U.; DREXHAGE, C.; HENDGEN-COTTA, U.; KELM, M.; SCHRADER, J. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. **Circ. Res.**, v.100, p.1749–1754, 2007.

RAZZERA, G.; VERNAL, J.; BARUH, D.; SERPA, V. L.; TAVARES, C.; LARA, F.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; ALMEIDA, F. C. L.; TERENCE, H.; VALENTE, A. P. Spectroscopic characterization of a truncated hemoglobin from the nitrogen-fixing bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bio. Inorg. Chem.**, v.13, p.1085-1096, 2008.

REEDER, B. J.; WILSON, M. T. Desferrioxamine inhibits production of cytotoxic heme to protein cross-linked myoglobin: a mechanism to protect against oxidative stress without iron chelation. **Curr. Med. Chem.**, v.12, p.2741–2751, 2005.

REGO, F. G. M.; PEDROSA, F. P.; YATES, M. G.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M. Regulation of *nifB* gene of *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXVI<sup>a</sup> REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1997 : Caxambu). **Resumos...** Caxambu, 1997. p.50.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **Int J Syst. Evol. Microbiol.**, v.56, p.1341-1348, 2006.

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

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

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

SCHÖLLHORN, R.; BURRIS, R.H. Acetylene as a competitive inhibitor of N<sub>2</sub> fixation. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA**, v.58, p.213-216, 1967.

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.** , Ottawa, v. 37, p.425-429, 1991.

SOUZA, E.M.; MACHADO, H.B.; YATES, M.G. Deletions analysis of the promoter region of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae*. In: TIKHONOVICH, I. A.; PROVAROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E. (eds), Nitrogen Fixation: Fundamentals and applications. .260. X International Congress on Nitrogen Fixation. St. Petersburg. 1995.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L.U.; YATES, M.G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 681–684, 1999.

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 of the –24/-12 promoter element. **Microbiol.**, v.146, p.1407-1418, 2000.

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

STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.; SOUZA, E. M.; MACHADO, H.B.; PERSUHN, D.C.; RIGO,L.U. Sequence analysis of the regulatory genes *ntrB* and *ntrC* of *Herbaspirillum seropedicae*. In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1997: Caxambu) **Resumos...** Caxambu, 1997, p.50.

STEINMETZ, M.; Le COQ, D.; DJEMIA, H.B.; GAY, P. Analyse génétique de *sacB*, gene de structure d'une enzyme secrétée, la lévane-saccharase de *Bacillus subtilis* Marburg. **Mol. Gen. Genet.**, v.191, p.138-144, 1983.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2005. (submitted). Publicação em: <http://www.kumarlabs.net/publications>)

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. e GIBSON, T.J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22:4673–4680, 1994.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; GUTIERREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J.M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associates with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Int. Syst. Evol. Microbiol.**, v.53, p.1979-1983, 2003.

VINOGRADOV, S.; HOOGEWIJS, D.; BAILLY, X.; ARREDONDO-PETER, R.; GOUGH, J.; DEWILDE, S.; MOENS, L.; VANFLETEREN, J. Three globin lineages belonging to two structural classes in genomes from the three kingdoms of life. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.102, p.11385–11389, 2005.

VINOGRADOV, S.; HOOGEWIJS, D.; BAILLY, X.; ARREDONDO-PETER, R.; GOUGH, J.; GUERTIN, M.; DEWILDE, S.; MOENS, L.; AND VANFLETEREN, J. A phylogenomic profile of globins. **BMC Evol. Biol.**, v.6, p.31–67, 2006.

VINOGRADOV, S. N.; MOENS, L.. Diversity of Globin Function: Enzymatic, Transport, Storage and Sensing. **J. Biol. Chem.**, v.283, p. 8773-8777, 2008.

VOIGT, E. L. Identificação e análise estrutural de genes a montante do gene *nifA* em *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 2000. **Tese (Mestrado em Ciências – Bioquímica)** – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

VULETICH D.; LECOMTE, J. T. J.. A phylogenetic and structural analysis of truncated hemoglobins. **J. Mol. Evol.**, v. 62, p.196-210, 2006.

WAINWRIGHT, L. M.; WANG, Y.; PARK, S. F.; YEH, S.; POOLE, R. K. Purification and spectroscopic characterization of Ctb, a group III truncated hemoglobin implicated in oxygen metabolism in the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni*. **Biochemistry**, v. 45, p.6003–6011, 2006.

WASSEM, R.; SOUZA, E.M.; YATES, G.M.; PEDROSA, F.O.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 756–764, 2000.

WEISS, V. A. Estratégias de finalização da montagem do genoma da bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. Curitiba, 2010. **Tese (Mestrado em Ciências – Bioquímica)** – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

WITTENBERG, J. B.; BOLOGNESI, M.; WITTENBERG, B. A.; AND GUERTIN, M.. Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p.871–874, 2002.

WOODLEY, P.; Identification of sequences important for recognition of *vnf* genes by the Vnf A transcriptional activator in *Azotobacter vinelandu*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 135, p. 213-221, 1996.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman & Hall, New York, p. 43-86, 1992.

## ANEXO 1 – Globinas utilizadas para construção da árvore filogenética

<b>M. tuberculosis-N</b>	trHbN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv
<b>M. avium-N</b>	trHbN de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10
<b>Hsero_2698</b>	Hsero_2698 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>
<b>N. punctiforme2 -N</b>	trHbN de <i>Nostoc punctiforme</i> PCC73102 (Npum_R1005)
<b>N. commune-N</b>	trHbN de <i>Nostoc commune</i> UTEX 584 (NOSCYGLOB)
<b>N. punctiforme1-N</b>	trHbN de <i>Nostoc punctiforme</i> PCC73102 (Npum_R0416)
<b>C. reinhardt-N</b>	putative truncated hemoglobin de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
<b>Synechocystis-N</b>	trHbN de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (NP_441311)
<b>T. pyriformis-N</b>	trHbN de <i>Tetrahymena pyriformis</i> (TRHBN_TETPY)
<b>Burkholderiasp.383-O</b>	trHbO de <i>Burkholderia</i> sp. 383 (Bcep18194_A5606)
<b>R. eutropha-O</b>	trHbO de <i>Ralstonia eutropha</i> H16 (H16_A1023)
<b>Hsero_1880</b>	Hsero_1880 trHbO de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>
<b>Hsero_2855</b>	Hsero_2855 trHbO de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>
<b>B. vietnamiensisG4_O</b>	trHbO de <i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4 (Bcep1808_6013)
<b>A. tumefaciens-O</b>	trHbO de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Atu2380)
<b>M. tuberculosis-O</b>	trHbO de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv
<b>T. fusca-O</b>	trHbO de <i>Thermobifida fusca</i>
<b>B. subtilis-O</b>	trHbO de <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Subtilis</i> str. 168 (NP_389038)
<b>G. stearothermophilus-O</b>	trhbO de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> (Q5L1S0)

<b>C. jejuni-P</b>	trHbP de <i>Campylobacter jejuni</i> (Cj0465c)
<b>M. avium-P</b>	trHbP de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10
<b>S. meliloti1021-P</b>	trHbP de <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 (SMc02351)
<b>B. vietnamiensisG4-P</b>	trHbP de <i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4 (Bcep1808_1776)
<b>Burkholderiasp.383-P</b>	trHbP de <i>Burkholderia</i> sp.383 (Bcep18194_A5150)
<b>G. max</b>	Leghemoglobina de <i>Glycine max</i>
<b>P. nonsymbiotic</b>	Hemoglobina de <i>Parasponia nonsymbiotic</i>
<b>P. pacifica</b>	FAD-binding protein PPSIR1_31848 de <i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1
<b>Hsero_2872</b>	Hsero_2872 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>
<b>Bcep1808_6027</b>	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> (strain G4 / LMG 22486)
<b>BCh1 08802</b>	<i>Burkholderia</i> sp. Ch1-1
<b>Bxe B1477</b>	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400
<b>B. subtilis</b>	Flavohemoglobina de <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168
<b>Vitreoscilla</b>	Hemoglobina de <i>Vitreoscilla</i> sp. C1
<b>S. cerevisiae</b>	Flavohemoglobin de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM789
<b>A. eutrophus</b>	Flavohemoglobina de <i>Alcaligenes Eutrophus</i> At 1.75
<b>Beta-globin</b>	Beta –globina humana
<b>Delta-globin</b>	Delta-globina humana
<b>Alfa-globin</b>	Alfa-globina humana
<b>Gama-globin</b>	Gama-globina humana
<b>Mioglobin</b>	Mioglobina de <i>Homo sapiens</i>
<b>Cytochrome</b>	Citocromo c de <i>Homo sapiens</i>

<b>C. elegans</b>	Hemoglobina de <i>Caenorhabditis elegans</i>
<b>Ascaris</b>	Hemoglobina de <i>Ascaris suum</i>
<b>P. decipiens</b>	Hemoglobina de <i>Pseudoterranova decipiens</i>