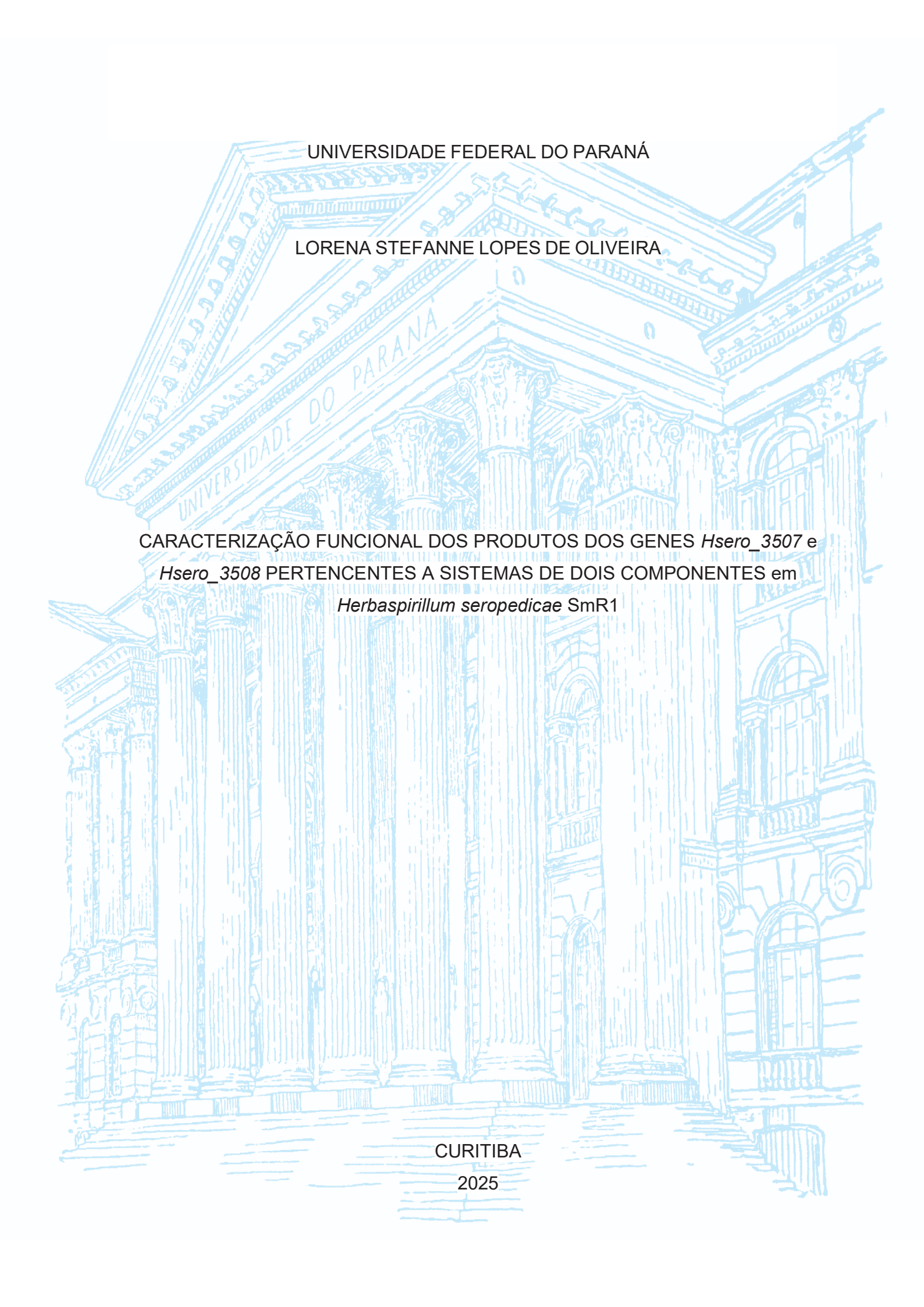




UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LORENA STEFANNE LOPES DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS PRODUTOS DOS GENES *Hsero_3507* e
Hsero_3508 PERTENCENTES A SISTEMAS DE DOIS COMPONENTES em
Herbaspirillum seropedicae SmR1

CURITIBA

2025

LORENA STEFANNE LOPES DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS PRODUTOS DOS GENES *Hsero_3507* e
Hsero_3508 PERTENCENTES A SISTEMAS DE DOIS COMPONENTES em
Herbaspirillum seropedicae SmR1

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica e biologia molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em ciências (Bioquímica).

Orientadora: Prof^a. Dr^a Rose Adele Monteiro

Coorientadora: Prof^a Dr^a. Edileusa Cristina Marques Gerhardt

Coorientador: Dr. Adriano Alves Stefanello

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Oliveira, Lorena Stefanne Lopes de

Caracterização funcional dos produtos dos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3580* pertencentes a sistemas de dois componentes em *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 / Lorena Stefanne Lopes de Oliveira. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Prof^a. Dr^a Rose Adele Monteiro.

Coorientadora: Prof^a Dr^a. Edileusa Cristina Marques Gerhardt

Coorientador: Dr. Adriano Alves Stefanello.

1. Herbaspirillum. 2. Sistemas de dois componentes. 3. Transdução de sinais. 4. Histidina quinase. I. Monteiro, Rose Adele, 1973-. II. Gerhardt, Edileusa Cristina Marques, 1985-. III. Stefanello, Adriano Alves, 1990-. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). V. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LORENA STEFANNE LOPES DE OLIVEIRA**, intitulada: **Caracterização funcional dos produtos dos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* pertencentes a sistemas de dois Componentes em *Herbaspirillum seropedicae* SmR1**, sob orientação da Profa. Dra. ROSE ADELE MONTEIRO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Julho de 2025.

Assinatura Eletrônica

04/08/2025 13:21:56.0

ROSE ADELE MONTEIRO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

31/07/2025 11:30:21.0

LUCIANO FERNANDES HUERGO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/07/2025 23:18:39.0

MARCO AURELIO SCHÜLER DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Assinatura Eletrônica

31/07/2025 09:19:08.0

ANA CLAUDIA BONATTO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, expresso minha profunda gratidão à minha orientadora, Prof^a Dr^a. Rose Adele Monteiro, cuja orientação e incentivo foram fundamentais para a realização deste trabalho. Sou especialmente grata pela oportunidade de integrar o Núcleo de Fixação de Nitrogênio (NFN), onde pude crescer tanto academicamente quanto pessoalmente.

Agradeço ao Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza pela generosidade em compartilhar seu conhecimento, pela paciência em esclarecer dúvidas e pelas valiosas sugestões que enriqueceram a execução dos experimentos.

Ao meu coorientador, Dr. Adriano Stefanello, reconheço sua disponibilidade, apoio essencial e ensinamentos que nortearam o desenvolvimento desta pesquisa. Destaco com apreço o trabalho dedicado dos técnicos Roseli Prado e Valter Baura, cuja competência e comprometimento foram indispensáveis para o funcionamento harmonioso do laboratório.

À minha mãe, Maria do Livramento Lopes de Oliveira, dedico meu reconhecimento pelo amor incondicional, apoio e incentivo que sustentaram minha jornada. À minha tia Socorro Lopes, agradeço pela fé em meu potencial. À querida D. Ivone, meu carinho pela acolhida e apoio.

Ao meu marido Henrique Peschl, expresso minha gratidão pelo companheirismo, incentivo e amor que fortaleceram meus passos mesmo nos momentos mais desafiadores.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e aos docentes do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, agradeço pela formação qualificada e pelo ambiente acadêmico enriquecedor.

Agradeço a todos os colegas do Grupo NFN que direta ou indiretamente tenham contribuído nessa jornada.

Por fim, à CAPES, pelo apoio financeiro que viabilizou esta pesquisa.

RESUMO

Os organismos vivos alteram a expressão de seus genes em resposta a modificações ambientais por meio de mecanismos que incluem sistemas de transdução de sinais. Um número significativo de proteínas desses sistemas não estão caracterizadas, o que aumenta a lacuna da nossa compreensão sobre função e mecanismos de sinalização ainda não conhecidos em microrganismos não modelo, como *Herbaspirillum seropedicae*. *H. seropedicae* um microrganismo de relevância à agricultura, como promotora de crescimento vegetal de diversas culturas importantes do ponto de vista econômico como, arroz, milho, cana de açúcar e sorgo. Estudos genômicos revelaram um potencial sistema de dois componentes contendo a histidina quinase Hsero_3508 e o regulador de resposta Hsero_3507. Análises do transcriptoma de *H. seropedicae* relataram a co-expressão dos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* em variadas condições de crescimento, inclusive durante a interação planta-bactéria. Neste contexto, este estudo teve o objetivo de caracterizar funcionalmente os produtos dos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* em *H. seropedicae* SmR1. Análises *in silico* revelaram que Hsero_3507 possui um domínio REC solitário, enquanto Hsero_3508 apresenta domínios sensoriais (BaeS e RbsRD) e catalíticos (HATPase_c). Ensaio de expressão em *E. coli* BL21(DE3) confirmaram a produção das proteínas, purificadas por cromatografia de afinidade. A interação direta entre Hsero_3507 e Hsero_3508 não foi detectada *in vitro* por ensaios *pull down*, sugerindo dependência de condições específicas. Experimentos com extratos celulares de *H. seropedicae* identificaram parceiros de interação para Hsero_3507, incluindo a fosfatase CheZ (quimiotaxia) e proteínas de estresse geral e transporte de nitrato, indicando seu papel na regulação de processos adaptativos. Ensaio de atividade nitrogenase demonstraram que as estirpes mutantes *Hsero_3507Tn* e *Hsero_3508Tn* mantêm capacidade de fixação de N₂ não sendo essenciais para a fixação biológica do nitrogênio nesse microrganismo, no entanto, alterações fenotípicas sugerem envolvimento em motilidade e resposta ao estresse. Resultados de ensaios de β -galactosidase verificaram que a expressão do promotor do gene *Hsero_3507* e *Hsero_3508* em *H. seropedicae* SmR1 são ativados em condição de limitação de nitrogênio no meio de cultivo. Conclui-se que Hsero_3507 possa atuar como integrador de sinais ambientais, modulando respostas pós-traducionais, enquanto Hsero_3508 possa funcionar como sensor de estresse ambiental.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*; sistemas de dois componentes; histidina quinase; regulador de resposta; interação proteína-proteína.

ABSTRACT

Living organisms alter their gene expression in response to environmental changes through mechanisms that include signal transduction systems. A significant number of proteins from these systems remain uncharacterized, widening our understanding of the function and signaling mechanisms still unknown in non-model microorganisms, such as *Herbaspirillum seropedicae*. *H. seropedicae* is a microorganism of agricultural relevance, promoting plant growth in several economically important crops, such as rice, corn, sugarcane, and sorghum. Genomic studies have revealed a potential two-component system containing the histidine kinase Hsero_3508 and the response regulator Hsero_3507. Transcriptome analyses of *H. seropedicae* reported the co-expression of the *Hsero_3507* and *Hsero_3508* genes under various growth conditions, including during plant-bacteria interactions. In this context, this study aimed to functionally characterize the products of the *Hsero_3507* and *Hsero_3508* genes in *H. seropedicae* SmR1. In silico analyses revealed that Hsero_3507 possesses a solitary REC domain, while Hsero_3508 presents sensory (BaeS and RbsRD) and catalytic (HATPase_c) domains. Expression assays in *E. coli* BL21(DE3) confirmed the production of the proteins, which were purified by affinity chromatography. Direct interaction between Hsero_3507 and Hsero_3508 was not detected in vitro by pull-down assays, suggesting dependence on specific conditions. Experiments with *H. seropedicae* cell extracts identified interacting partners for Hsero_3507, including the phosphatase CheZ (chemotaxis) and general stress and nitrate transport proteins, indicating its role in the regulation of adaptive processes. Nitrogenase activity assays demonstrated that the mutant strains Hsero_3507Tn and Hsero_3508Tn maintain N₂ fixation capacity, although they are not essential for biological nitrogen fixation in this microorganism. However, phenotypic alterations suggest involvement in motility and stress response. Results of β -galactosidase assays verified that the expression of the *Hsero_3507* and *Hsero_3508* gene promoters in *H. seropedicae* SmR1 are activated under nitrogen-limited conditions in the culture medium. We conclude that Hsero_3507 may act as an integrator of environmental signals, modulating post-translational responses, while Hsero_3508 may function as an environmental stress sensor.

Keywords: *Herbaspirillum*; *seropedicae*; two-component systems; histidine kinase; response regulator; protein-protein interaction.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DE UMA VIA DE FOSFORILAÇÃO EM UM SISTEMA DE DOIS COMPONENTES	16
FIGURA 2 - ESTRUTURA E MECANISMO DE SINALIZAÇÃO DAS HISTIDINAS QUINASES DE CLASSE I E II	18
FIGURA 3 - DOMÍNIO RECEPTOR DA PROTEÍNA HSERO_3507	40
FIGURA 4 - PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA DA PROTEÍNA HSERO_3507	42
FIGURA 5 - ARQUITETURA DOS DOMÍNIOS CONSERVADOS DA PROTEÍNA HSERO_3508.....	45
FIGURA 6 - PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA DA PROTEÍNA HSERO_3508	47
FIGURA 7 - PERFIL DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS HSERO_3507 E HSERO_3508 COM CAUDA DE HISTIDINA E DA PROTEÍNA HSERO_3508 EM SUA FORMA NATIVA EM <i>E. Coli</i> BL21.	50
FIGURA 8 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HSERO_3507 COM CAUDA DE HISTIDINA, POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR NÍQUEL.....	51
FIGURA 9 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HIS_HSERO_3508 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR NÍQUEL.....	52
FIGURA 10 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HSERO_3508 NATIVA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	53
FIGURA 11 - COBERTURA DE SEQUÊNCIA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF	54
FIGURA 12 - CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO	55
FIGURA 13 - ENSAIO DE ATIVIDADE DA ENZIMA B-GALACTOSIDASE DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> SmR1 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO.....	56

FIGURA 14 - ATIVIDADE DA ENZIMA NITROGENASE EM <i>H. seropedicae</i> SmR1 E ESTIRPES HSERO_3507TN E HSERO_3508TN EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE NITROGÊNIO.....	58
FIGURA 15 - TESTE DE AFINIDADE PROTEÍNA-LIGANTE ENTRE AS PROTEÍNAS HIS-HSERO_3507 E HSERO_3508 NATIVA AO LIGANTE MAGNEHIS-NI.	59
FIGURA 16 - ENSAIO DE CO-PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS HIS_3507 E HSERO_3508.....	61
FIGURA 17 - ENSAIO DE INTERAÇÃO DA PROTEÍNA HIS_HSERO_3507 E PROTEÍNAS ALVO EM <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTIRPES BACTERIANAS.....	26
TABELA 2 - PLASMÍDEOS	26
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO LB	27
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO NFB-MALATO.....	28
TABELA 5 - ANTIBIÓTICOS	28
TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS DO EXTRATO OBTIDO DE <i>H. seropedicae</i> SmR1	37
TABELA 7 - POSSÍVEIS PROTEÍNAS ALVO DA PROTEÍNA HSERO_3507 EM <i>H. seropedicae</i> SmR1	43
TABELA 8 - POSSÍVEIS PROTEÍNAS ALVO DA PROTEÍNA HSERO_3508 EM <i>H. seropedicae</i> SmR1	48
TABELA 9 - PROTEÍNAS DIFERENCIAIS IDENTIFICADAS DURANTE A INTERAÇÃO DE HIS-HSERO_3507 E EXTRATO DE <i>H. seropedicae</i> SmR1 ANALISADAS POR MALDI-TOF	63

LISTA DE SIGLAS

Amp	Ampicilina
CDART	<i>Conserved Domain Architecture Retrieval Tool</i>
CDD	<i>Conserved Domain Database</i>
COGs	<i>Clusters of Orthologous Groups</i>
DO	Densidade óptica
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
HK	<i>Histidine kinase</i>
<i>Hsero_3507</i>	Gene que codifica uma proteína reguladora de resposta em <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1
<i>Hsero_3508</i>	Gene que codifica uma histidina quinase em <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
Km	Canamicina
LB	Luria-Bertani
LA	Luria-Bertani Ágar
MALDI-TOF/MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
MCPs	Proteínas de quimiotaxia aceitadoras de metil
Nal	Ácido nalidíxico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFbHP	<i>Nitrogen-free broth high phosphate</i>
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
REC	<i>Receiver domain</i>
RR	<i>Response regulator</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SMART	<i>Simple Modular Architecture Research Tool</i>
Sm	Estreptomicina
SmR1	Estirpe de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>
TCA	<i>Tricarboxylic Acid cycle</i>
TCS	<i>Two-component systems</i>
Tc	Tetraciclina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 SISTEMAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DE DOIS COMPONENTES EM BACTÉRIAS.....	12
3.2 HISTIDINAS QUINASES.....	14
3.2.1 Estrutura e função das proteínas histidinas quinases	14
3.3 REGULADORES DE RESPOSTA.....	20
3.3.1 Arquitetura estrutural e mecanismos de ativação	21
3.3.2 Mecanismos não canônicos de regulação	21
3.4 SISTEMAS DE DOIS COMPONENTES EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	22
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 MICRORGANISMOS E PLASMÍDEOS	26
4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO	27
4.3 ANTIBIÓTICOS	28
4.4 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS EM PEQUENA ESCALA	28
4.5 PREPARO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	29
4.6 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS POR CONJUGAÇÃO BACTERIANA	30
4.7 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA POR PCR	30
4.8 QUANTIFICAÇÃO DO DNA POR ESPECTROFOTOMETRIA	31
4.9 DIGESTÃO DE DNA POR ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	31
4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA NITROGENASE	31
4.11 SUPEREXPRESSÃO DE PROTEÍNAS.....	32
4.12 ELETROFORESE DE PROTEÍNA SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES SDS-PAGE.....	33
4.13 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS NATIVAS HSERO_3507 E HSERO_3508	33

4.14 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS HSERO_3507 E HSERO_3508 COM CAUDA DE HISTIDINA	34
4.15 TESTE DE AFINIDADE PROTEÍNA-LIGANTE ENTRE A PROTEÍNA HIS-HSERO_3507 E PARTÍCULAS DE NÍQUEL MAGNÉTICAS.....	34
4.16 ENSAIO DE CO-PRECIPITAÇÃO PARA VERIFICAR A INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA HIS-HSERO_3507 E A PROTEÍNA NATIVA HSERO_3508	35
4.17 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS HIS-HSERO_3507 E HSERO_3508 NATIVA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO TIPO MALDI-TOF/MS	36
4.18 ENSAIO DE INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS HIS_HSERO_3507 E HIS_HSERO_3508 E PROTEÍNAS ALVO NO EXTRATO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	36
4.19 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONA	37
4.20 ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE	37
4.21 ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	39
5 RESULTADOS	40
5.1 ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i> DA PROTEÍNA HSERO_3507	40
5.1.1 Arquitetura dos domínios da proteína Hsero_3507	40
5.1.2 Predição da estrutura tridimensional do regulador de resposta Hsero_3507	41
5.1.3 Análise <i>in silico</i> da sublocalização celular de Hsero_3507	42
5.1.4 Análise <i>in silico</i> da interação da Hsero_3507 com proteínas alvo em <i>H. seropedicae</i> SmR1	42
5.2 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA PROTEÍNA HSERO_3508.....	44
5.2.1 Arquitetura dos domínios sensores da proteína Hsero_3508	44
5.2.2 Predição da estrutura tridimensional da proteína sensora Hsero_3508	46
5.2.3 Análise <i>in silico</i> da sublocalização celular de Hsero_3508	47
5.2.4 Análise <i>in silico</i> da interação da histidina quinase Hsero_3508 com proteínas alvo em <i>H. seropedicae</i> SmR1	48
5.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS HSERO_3508 E HSERO_3507 EM <i>E. coli</i> BL21 .	49
5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS HSERO_3508 E HSERO_3507 COM CAUDA DE HISTIDINA E HSERO_3508 NATIVA POR MALDI-TOF/MS	53

5.5 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO DOS GENES <i>Hsero_3507</i> E <i>Hsero_3508</i> DE <i>H. seropedicae</i> SmR1	54
5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA NITROGENASE DAS ESTIRPES <i>Hsero_3507</i> Tn e <i>Hsero_3508</i> Tn E SELVAGEM DE <i>H. seropedicae</i> SmR1	57
5.7 ENSAIO DE CO-PRECIPITAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS HIS-HSERO_3507 E HSERO_3508 NATIVA.....	59
5.7.1 Teste proteína-ligante entre as proteínas His_ <i>Hsero_3507</i> e <i>Hsero_3508</i> nativa e o ligante MagneHis-Ni	59
5.7.2 Ensaio de co-precipitação entre as proteínas His-Hsero_3507 e <i>Hsero_3508</i>	60
5.8 INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA HSERO_3507 E PROTEÍNAS ALVO NO EXTRATO DE <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	61
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de dois componentes (TCS, do inglês *Two-component systems*) constituem um dos principais mecanismos de transdução de sinal em bactérias, permitindo a percepção de estímulos ambientais e a regulação coordenada de respostas fisiológicas adaptativas (STOCK et al, 2000). Esses sistemas são tipicamente compostos por uma histidina quinase sensorial (HK) e uma proteína reguladora de resposta (RR), que atuam em conjunto através de um mecanismo de fosfotransferência para modular a expressão gênica (GAO; STOCK, 2009).

Estudos têm demonstrado que os TCS desempenham funções críticas em processos bacterianos essenciais, incluindo metabolismo nutricional, virulência e interação com hospedeiros (STOCK, ROBINSON, GOUDREAU, 2000; ZSCHIEDRICH et al, 2016).

Apesar dos avanços significativos no entendimento desses sistemas em bactérias modelo, ainda existe uma lacuna sobre as características de várias proteínas que participam de sistemas de dois componentes em procariotos, constituindo o que tem sido denominado "matéria escura da transdução de sinais bacterianos" (BARRETTO et al, 2024). Esta lacuna no conhecimento representa tanto um desafio quanto uma oportunidade para pesquisas futuras, particularmente no desenvolvimento de novas estratégias de otimização de bactérias benéficas para aplicações agrícolas. A caracterização desses sistemas promete não apenas avançar nossa compreensão fundamental da sinalização microbiana, mas também abrir novas fronteiras no controle de patógenos e no aproveitamento de microrganismos para fins biotecnológicos.

O gênero *Herbaspirillum* compreende bactérias diazotróficas endofíticas de relevância agrícola, destacando-se pela capacidade de promover o crescimento vegetal em culturas economicamente importantes, como milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Entre as bactérias do gênero *Herbaspirillum*, a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1 (*H. seropedicae* SmR1) emerge

como um modelo particularmente relevante, cujo genoma completamente sequenciado, revelou a presença de diversas proteínas participantes de TCS com funções ainda não elucidadas (PEDROSA et al, 2011).

Análises transcriptômicas indicam que os genes *Hsero_3507* (codifica um RR) e *Hsero_3508* (codifica uma HK) podem estar envolvidos na resposta a condições de estresse nutricional, particularmente à limitação de fosfato e amônio (BALSANELLI et al, 2016; BONATO et al, 2024). Esses nutrientes são frequentemente limitantes em solos agrícolas, sugerindo um potencial papel desses genes nos mecanismos de adaptação bacteriana durante a colonização de plantas.

Considerando a importância dos TCS na regulação de processos bacterianos fundamentais e o potencial biotecnológico de *H. seropedicae* SmR1 como promotor de crescimento vegetal, este trabalho tem como objetivo caracterizar os produtos dos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* buscando obter informações sobre sua função na fisiologia bacteriana e na interação planta-microrganismo, empregando abordagens genômicas, bioquímicas e fisiológicas integradas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização dos produtos dos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* pertencentes a sistemas de dois componentes em *H. seropedicae* SmR1.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar e purificar as proteínas *Hsero_3507* e *Hsero_3508* em *E. coli* BL21 (DE3).
- Verificar a interação entre as proteínas *Hsero_3507* e *Hsero_3508* por meio de ensaios de co-precipitação *in vitro*.
- Identificar proteínas alvo das proteínas *Hsero_3507* e *Hsero_3508* em *H. seropedicae* SmR1.
- Determinar a atividade nitrogenase das estirpes *Hsero_3507Tn* e *Hsero_3508Tn* em condições de limitação da fonte de nitrogênio.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SISTEMAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DE DOIS COMPONENTES EM BACTÉRIAS

A capacidade de perceber e responder a variações ambientais é fundamental para a sobrevivência bacteriana. Em um contexto de constantes mudanças nas condições externas, as células desenvolveram sofisticados mecanismos de sinalização que lhes permitem adaptar rapidamente seu metabolismo e fisiologia. Entre esses mecanismos, os sistemas de dois componentes (TCS) destacam-se como um dos principais módulos de transdução de sinal em bactérias (STOCK et al, 2000).

Os TCS foram inicialmente caracterizados em *Escherichia coli* (*E. coli*) na década de 1980 (NIXON et al, 1986), revelando uma arquitetura molecular eficiente. Esses sistemas são compostos por dois elementos principais: uma histidina quinase (HK), que atua como sensor ambiental e uma proteína reguladora de resposta (RR), responsável por gerar a resposta celular apropriada. Em conjunto, essas proteínas desempenham três funções essenciais: (1) detecção de estímulos específicos, (2) transdução do sinal intracelular e (3) regulação da expressão gênica (GAO; STOCK, 2009).

A nomenclatura "Sistemas de dois componentes" origina-se da observação de domínios conservados em diversas proteínas regulatórias bacterianas. Esses componentes comunicam-se através de um mecanismo preciso de fosfotransferência, envolvendo dois resíduos de aminoácidos-chave: uma histidina na HK e um aspartato na RR. Os sistemas de fosfotransferência His-Asp representam o principal mecanismo de sinalização em bactérias, enquanto em eucariotos predominam cascatas de fosforilação em serina, treonina e tirosina. Ambos os esquemas podem ocorrer tanto em procariotos quanto em eucariotos, embora com frequências distintas (STOCK et al, 2000). O mecanismo molecular dos sistemas de dois componentes envolve uma cascata de sinalização altamente conservada. O processo inicia-se com a percepção de estímulos ambientais pela histidina quinase, que sofre autofosforilação em um resíduo específico de histidina. Subsequentemente, o grupo fosfato é transferido para um resíduo de aspartato na proteína reguladora de resposta, ativando sua função regulatória. Por seguinte, a RR fosforilada atua modulando a expressão de genes essenciais para a

adaptação bacteriana, por meio de diferentes mecanismos de comunicação celular. Alguns mecanismos ocorrem por meio de interações físicas diretas, como no caso de RRs com domínios REC solitários (sem domínio efetor), que interagem com outras proteínas pela ligação do domínio efetor ao DNA para ativar a transcrição de genes, ou ainda pela participação em sistemas mais complexos de fosforelay, nos quais múltiplas proteínas intermediárias se comunicam para amplificar e diversificar a resposta celular. Esta versatilidade permite a regulação precisa de diversos processos fisiológicos, desde a adaptação a variações ambientais (luz, temperatura, oxigênio) até comportamentos complexos como quimiotaxia, formação de biofilmes e esporulação (STOCK, ROBINSON, GOUDREAU; GAO; STOCK, 2009).

Um exemplo da importância dos TCS na interação bactéria-plantas é o sistema GacS-GacA, amplamente conservado em proteobactérias. Em *Pseudomonas fluorescens* estirpe CHAO, este sistema regula a produção de metabólitos secundários antifúngicos e enzimas extracelulares essenciais para sua atividade de biocontrole na rizosfera (BULL et al, 2001). Em contrapartida, em um outro exemplo de sistemas de dois componentes observado agora na bactéria *Dickeya oryzae* EC1, observa-se um papel oposto, onde a variante TzpS-TzpR regula a produção de zeaminas, toxinas cruciais para a virulência deste patógeno (CHEN et al, 2022). Esta variabilidade funcional ilustra a plasticidade evolutiva dos TCS.

A importância fisiológica dos sistemas de dois componentes (TCS) inclui a percepção de íons metálicos essenciais. Muitos microrganismos utilizam esses sistemas para monitorar a disponibilidade de metais de transição, como ferro (Fe^{2+} , Fe^{3+}), zinco (Zn^{2+}), manganês (Mn^{2+}) e cobre (Cu^+ , Cu^{2+}), que além de atuarem como cofatores enzimáticos, frequentemente regulam a expressão de fatores de virulência (PAREDES et al, 2023). Esta capacidade de integrar múltiplos sinais ambientais torna os TCS alvos promissores para intervenções biotecnológicas.

Diferentes técnicas estão sendo usadas para investigar a via regulatória ligada a um TCS. Uma abordagem é modular um sinal ambiental já conhecido por desencadear o TCS de interesse, seja suplementando ou esgotando o meio de cultura com esse sinal específico (nutrientes ou compostos químicos), como temos realizado no presente trabalho. No entanto, os TCSs funcionam levando a resultados variáveis dependendo da amplitude da variação do sinal ambiental, como é o caso do regulon do fosfato (LAMARCHE et al, 2008). Assim, silenciar ou desativar a expressão do gene TCS tem

sido uma estratégia experimental relevante para identificar o papel de um TCS (CONNAN et al, 2012; DAHLSTEN et al, 2013).

3.2 HISTIDINAS QUINASES

As histidinas quinases representam uma classe enzimática que está presente em todo domínio procariótico, atuando como elementos centrais nos sistemas de dois componentes. Estas enzimas exercem dupla função molecular, servindo simultaneamente como sensores ambientais e reguladores da atividade dos componentes efetores através de mecanismos de fosforilação (STOCK et al, 1990).

Embora apresentem similaridades catalíticas com as proteínas quinases de Serina, Treonina e Tirosina (STY), as HKs distinguem-se fundamentalmente em sua química de fosforilação. Enquanto as quinases STY formam fosfoésteres, as HKs catalisam a formação de fosforamidatos, diferença estrutural com profundas implicações termodinâmicas e funcionais (WARD; ZUSMAN, 1997).

A natureza química distinta dos intermediários fosforilados influencia significativamente a estabilidade das proteínas em sistemas de transdução de sinais em sistemas biológicos. Apenas uma pequena fração da população de HKs se mantém no estado fosforilado em condições fisiológicas. Essa diferença fundamental na estabilidade dos intermediários tem importantes consequências funcionais. Nas vias de sinalização mediadas por HKs, o fluxo dinâmico de grupos fosforila assume maior relevância do que a fosforilação estequiométrica, contrastando com os sistemas baseados em quinases STY (WARD; ZUSMAN, 1997). Neste contexto, a arquitetura modular dos domínios catalíticos das HKs evoluiu para otimizar o fluxo fosforilativo, permitindo respostas rápidas e reguladas às variações ambientais. A eficiência catalítica posiciona as HKs como elementos importantes para sistemas de sinalização que demandam rápida ativação e desativação em resposta a estímulos ambientais transitórios.

3.2.1 Estrutura e função das proteínas histidinas quinases

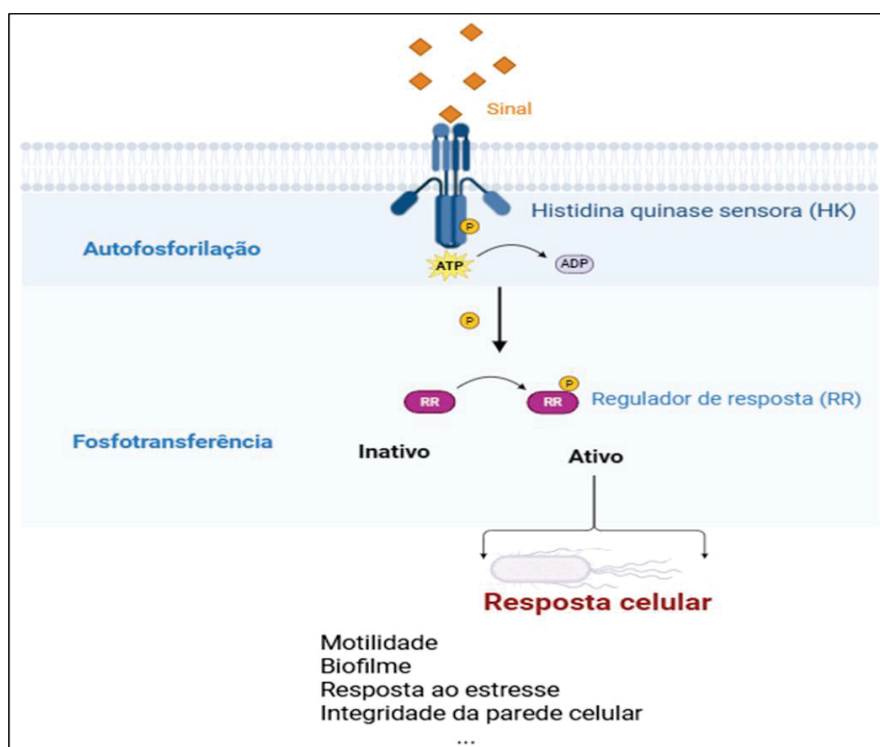
As histidinas quinases são enzimas sensoras cruciais em sistemas de transdução de sinais bacterianos, especialmente em sistemas de dois componentes. Sua arquitetura molecular é composta por domínios distintos, cada um com características funcionais

específicas que determinam sua capacidade de detectar estímulos e iniciar a cascata de fosforilação. De modo geral, as HKs apresentam um domínio sensor N-terminal não conservado, frequentemente transmembranar, responsável pela detecção de estímulos extracelulares. Esse domínio é altamente variável, refletindo a diversidade de sinais que podem ser percebidos, como mudanças químicas, osmolaridade ou luz. Quando um estímulo é detectado, inicia-se a fosforilação de um resíduo de histidina conservado, processo que depende da hidrólise de Adenosina Trifosfato (ATP) no sítio catalítico (MASCHER et al, 2006).

O domínio CA (HATPase_c), localizado na região C-terminal, é altamente conservado entre as HKs e contém o sítio de ligação para ATP. Embora as HKs apresentem diferenças estruturais em relação às proteínas quinases de eucariotos, seu domínio CA assemelha-se ao de outras proteínas que interagem com ATP. Esse domínio conecta-se ao domínio DHp (HisKA), que contém o resíduo de histidina fosforilável e é essencial para a dimerização da HK. A dimerização permite a autofosforilação intramolecular, na qual o grupamento fosfato do ATP é transferido para a histidina do domínio DHp no monômero adjacente (GAO et al, 2009).

Após a fosforilação da histidina, o grupo fosfato é transferido para uma proteína reguladora de resposta, especificamente para um resíduo de aspartato conservado em seu domínio RD (*receiver domain*) (FIGURA 1). Essa transferência desencadeia uma mudança conformacional na RR, ativando-a e permitindo que ela regule a expressão gênica ou outras respostas celulares adaptativas. Para que a fosfotransferência ocorra, os domínios CA e DHp devem interagir de forma transitória, garantindo a transferência do fosfato do ATP para a histidina e, posteriormente, para a RR. Essa comunicação entre domínios é essencial para a sinalização eficiente e para a geração de uma resposta celular coordenada ao estímulo ambiental. A interação entre os domínios CA e DHp é fundamental para a autofosforilação e subsequente ativação da RR, culminando em ajustes metabólicos ou transcrpcionais (GAO et al, 2009).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DE UMA VIA DE FOSFORILAÇÃO EM UM SISTEMA DE DOIS COMPONENTES



A histidina quinase (HK) liga-se ao ATP e autofosforila um resíduo de histidina conservada no domínio DHp do seu homodímero. O grupo fosforil é então transferido para um aspartato na proteína reguladora de resposta (RR). A fosforilação do regulador de resposta ativa seu domínio de saída para efetuar alterações em diferentes processos biológicos. Fonte: Elaboração do autor.

A caracterização estrutural das histidinas quinases revela padrões conservados essenciais para sua classificação e compreensão funcional. Essas enzimas apresentam cinco regiões características de similaridade de aminoácidos: a região H no domínio DHp (responsável pela dimerização e aceitação do grupo fosfato), as regiões N, G1, G2 e F no domínio CA (envolvido na ligação do ATP) (FIGURA 2). Esses motivos estruturais são particularmente relevantes para distinguir entre histidinas quinases canônicas e formas não convencionais com organização estrutural mais complexa (ADEBALI et al, 2017).

Um exemplo notável de histidina quinase não convencional é a CheA, amplamente estudada por seu papel central na quimiotaxia de procariotos. Como destacado por Adebali et al. (2017), a CheA apresenta características estruturais distintas: é uma proteína citoplasmática que carece de domínio sensorial transmembrana, e seu resíduo de histidina fosforilável está localizado em um domínio

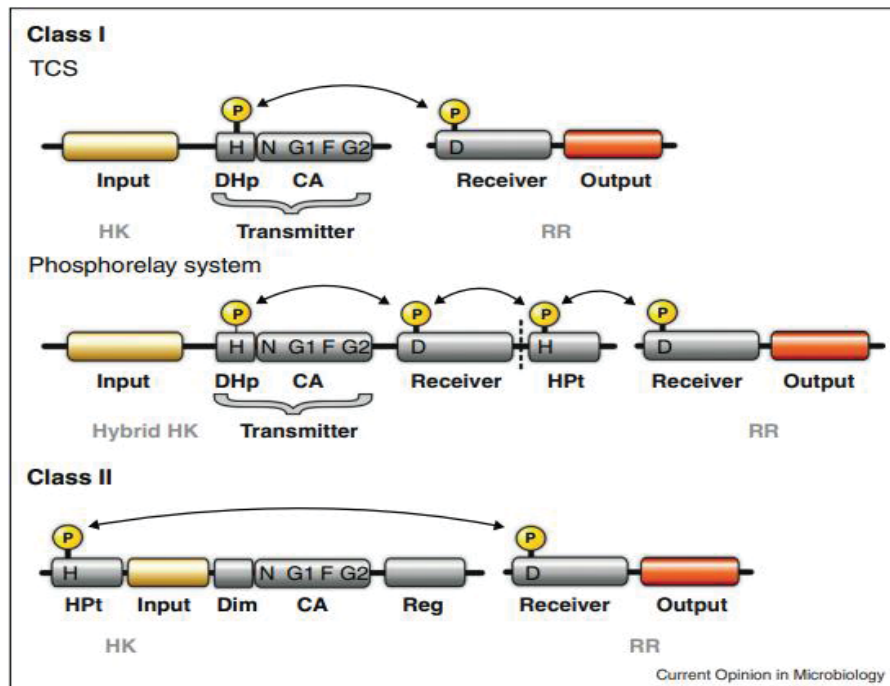
HPT especializado, diferindo da localização usual no domínio DHp observada na maioria das histidinas quinases.

Essas diferenças estruturais fundamentaram a classificação das histidinas quinases em três categorias principais. As de Classe I representam as formas clássicas, enquanto as de Classe II (FIGURA 2) incluem enzimas especializadas em quimiotaxia como a CheA. Mais recentemente, foi descrita uma Classe III que exibe características híbridas, combinando elementos estruturais tanto da Classe I (como o módulo sensor N-terminal e domínio DHp) quanto da Classe II (domínio HPT). Como demonstrado por Adebali et al. (2017), essas enzimas híbridas estão envolvidas na modulação da motilidade mediada por pili tipo IV, expandindo nossa compreensão sobre a diversidade funcional deste importante grupo de proteínas sinalizadoras.

Uma variação dos sistemas de dois componentes são os sistemas fosforelay. Embora o TCS clássico envolva apenas uma histidina quinase sensora (HK) e uma proteína reguladora de resposta (RR) (FIGURA 1), o fosforelay introduz etapas intermediárias de transferência de fosfato, permitindo uma modulação mais complexa e fina da resposta celular (FIGURA 2). Em sistemas de fosforelay, o fosfato é sucessivamente transferido para um resíduo de aspartato em um domínio receptor (REC), depois para um resíduo de histidina em uma proteína intermediária do tipo HPT (*Histidine Phosphotransfer*), e finalmente, para um segundo resíduo de aspartato na proteína reguladora de resposta (RR).

A RR fosforilada sofre alterações conformacionais que promovem a interação do RR com outros fatores de transcrição para regular a expressão gênica, adicionando uma camada extra de complexidade regulatória ao modelo tradicional de TCS. A principal vantagem do sistema fosforelay são as múltiplas etapas de fosforilação ocorrendo dentro de um mesmo complexo proteico ou em proteínas intimamente associadas (física e funcionalmente), sem necessidade de grandes deslocamentos espaciais no citoplasma (TÉRAN-MELO et al, 2019; FOULKES et al, 2025). O sistema RcsC/RcsD/RcsB de bactérias entéricas é um exemplo de sistema fosforelay que controla diversas propriedades, incluindo a motilidade e as propriedades da superfície celular bacteriana. (MAJDALANI et al, 2005).

FIGURA 2 - ESTRUTURA E MECANISMO DE SINALIZAÇÃO DAS HISTIDINAS QUINASES DE CLASSE I E II



A figura ilustra a arquitetura modular das HKs de Classe I (modelo clássico) e Classe II (HK especializadas em quimiotaxia), destacando as diferenças na localização da histidina fosforilável e nos domínios de interação com o regulador de resposta. A Classe I apresenta domínios sensor transmembrana, DHp com a caixa H e CA com os motivos catalíticos N, G1 e G2. Já a Classe II possui os domínios P1 (com a histidina fosforilável) e P2 (para reconhecimento do RR), conectados por regiões flexíveis ao domínio de dimerização. O esquema também mostra o fluxo fosforilativo em cascatas fosforelay, que incorporam domínios intermediários HPT e REC. As setas mostram o fluxo de fosfotransferência (Fonte: Jung et al., 2012) (Fonte: Jung et al, 2012).

A compreensão dos sistemas de dois componentes bacterianos avança significativamente quando analisamos a diversidade estrutural das histidinas quinases (HKs) e sua relação com os mecanismos de transdução de sinais. Estudos estruturais revelam que as HKs podem ser categorizadas em três grupos principais com base na localização e natureza de seus domínios sensores, uma classificação que reflete diretamente sua função biológica na percepção ambiental (MASCHER et al, 2006).

As HKs com sensores periplasmáticos representam o grupo mais numeroso e bem caracterizado. Nestas proteínas, um domínio sensor extracelular é flanqueado por duas regiões transmembranares, frequentemente associado a domínios regulatórios como HAMP ou PAS (MASCHER et al, 2006). O sistema EnvZ/OmpR de *E. coli* serve como modelo exemplar desta classe, onde estudos estruturais demonstraram que o subdomínio HisKA (DHp) de EnvZ forma um dímero estável através de um feixe de quatro hélices α , sendo o resíduo de histidina fosforilável acessível ao domínio catalítico

CA (HWANG et al, 2017). Esta organização estrutural permite que EnvZ atue como um dímero funcional, integrando sinais do periplasma com a atividade catalítica citoplasmática.

Um segundo grupo distinto compreende as HKs ancoradas na membrana, particularmente prevalentes em sistemas de *quorum sensing* de bactérias gram-positivas. Estas enzimas apresentam uma arquitetura marcante com múltiplas regiões transmembranares (2 a 20) conectadas por loops curtos, refletindo sua especialização na detecção de alterações na membrana celular, como estresse mecânico ou gradientes iônicos (MASCHER, 2006; BELLINENY-RABELO et al, 2021). Exemplos notáveis incluem PlnB de *Lactobacillus plantarum*, envolvida na regulação da biossíntese de bacteriocinas, e as proteínas LuxN e CqsS de bactérias gram-negativas, que desempenham papéis centrais em sistemas de *quorum sensing* (FUQUA et al, 2001; DIEP et al, 2009).

O terceiro grupo principal é formado por HKs com sensores citoplasmáticos, especializadas na detecção de solutos intracelulares ou indicadores do estado metabólico. Estas proteínas tipicamente possuem 2 a 4 regiões transmembranares e domínios sensores intracelulares. Sistemas como RsbT/RsbR em *Bacillus subtilis* e BaeS/BaeR em *E. coli* ilustram a importância deste grupo na resposta a estresses ambientais, regulando desde a expressão de bombas de efluxo até mecanismos de proteção contra estresse salino e térmico (PANÉ-FARRÉ et al, 2005; AKBAR et al, 1997; BURY-MONÉ et al, 2009).

Uma característica notável que transcende estes grupos é a ocorrência frequente de múltiplos domínios sensores em uma única HK. Esta modularidade permite tanto a integração de múltiplos sinais ambientais quanto a regulação fina da atividade quinase através de mecanismos mutuamente exclusivos (STEPHENSON; HOCH, 2001; BRAY, 2002; BELLINENY-RABELO, 2021; WINSKI et al, 2023). A presença de domínios adicionais como PAS, GAF ou HAMP frequentemente confere maior sensibilidade e especificidade na detecção de sinais, permitindo que as células bacterianas respondam de maneira precisa a flutuações ambientais.

A classificação baseada na arquitetura de domínios vai além da mera descrição estrutural, ela reflete fundamentalmente o papel biológico destas proteínas na interface entre a célula e seu ambiente. Como demonstrado pelos diversos exemplos, a organização estrutural das HKs está intrinsecamente ligada à natureza dos estímulos

que detectam e aos mecanismos de resposta que desencadeiam, tornando esta abordagem essencial para compreender a sinalização bacteriana em toda sua complexidade.

3.3 REGULADORES DE RESPOSTA

As proteínas reguladoras de resposta representam o componente efetor terminal dos sistemas procarióticos de dois componentes, atuando como interruptores moleculares ativados por fosforilação para implementar respostas adaptativas. Embora tradicionalmente consideradas dependentes da fosfotransferência das histidinas quinases associadas, a literatura revela uma notável autonomia funcional dessas proteínas. Evidências demonstram que pequenas moléculas como fosfato de acetila, fosfato de carbamoíla e fosfato de imidazol podem servir como doadores de fosfato alternativos, permitindo que as RRs catalisem tanto a fosfotransferência quanto a desfosforilação independentemente das HKs (STOCK et al, 2000). Esta plasticidade funcional sugere mecanismos regulatórios mais complexos do que inicialmente previsto nos sistemas de sinalização bacteriana.

A organização genômica dos sistemas de dois componentes apresenta padrões distintos entre sistemas clássicos e não clássicos. Nos sistemas convencionais, as HKs e suas RRs cognatas são tipicamente co-transcritas em um operon (MITROPHANOV et al, 2010). Ademais, para certos operons do sistema de dois componentes, um único promotor é usado para fornecer expressão basal e autorregulada, como nos genes que especificam o sistema de dois componentes ComD/ComE na bactéria gram-positiva *Streptococcus pneumoniae* (MARTIN et al, 2010). A transcrição dos genes *comD* e *comE* em condições não indutoras requer tanto o sensor ComD quanto a capacidade de ComE se tornar fosforilada.

Um aspecto da regulação transcricional destes sistemas reside na capacidade das RRs de autorregular sua própria expressão, enquanto as HKs são co-reguladas por seus parceiros. Os promotores constitutivos que controlam esses genes apresentam atividade basal fraca, um mecanismo importante para prevenir ativação espontânea na ausência de estímulos específicos. Essa regulação fina é particularmente importante considerando que as RRs frequentemente funcionam como homodímeros, cuja fosforilação e consequente ativação podem ocorrer mesmo na ausência da HK, desde

que condições favorecem a dimerização (MITROPHANOV et al, 2010; GROISMAN, 2021).

3.3.1 Arquitetura estrutural e mecanismos de ativação

A superfamília de RRs compartilha uma arquitetura conservada centrada no domínio regulador/receptor (REC), caracterizado por uma estrutura α/β que abriga resíduos ácidos críticos em seu sítio ativo. O ácido aspártico na extremidade C-terminal da folha β_3 serve como sítio primário de fosforilação, enquanto outros resíduos ácidos na alça β_1 - α_1 coordenam um íon Mg^{2+} essencial para as reações de fosfotransferência e hidrólise (SAITO, 2001).

A diversidade funcional das RRs deriva principalmente de seus domínios efetores variáveis determinam a natureza da resposta celular. Proteínas, como a CheY envolvida na regulação flagelar, frequentemente atuam como intermediários em vias de sinalização ou reguladores alostéricos. Em *Bacillus subtilis*, por exemplo, o domínio REC único sem domínio efetor, *spo0F* funciona como intermediário fosforilado sem regular diretamente as respostas de saída (GAO; STOCK, 2009; VARUGHESE, 2005; HOCH, 2017). A estrutura canônica do domínio REC compreende cinco folhas β circundadas por cinco hélices α anfipáticas, organização que permite transições conformacionais sutis mas críticas para a regulação da atividade.

As proteínas reguladoras de resposta em sistemas de dois componentes regulam sua própria expressão no qual o domínio REC têm atividade enzimática, catalisando tanto a transferência de fosforilação quanto a auto desfosforilação, enquanto a expressão da HK é tipicamente co-regulada pelo RR (GROISMAN, 2010). A maioria destes corresponde a proteínas CheY codificadas em operons de quimiotaxia, muitos dos quais regulam a motilidade por meio de interações intermoleculares com proteínas motoras. Outros domínios REC independentes, como o *spo0F* de *Bacillus subtilis* funcionam como intermediários fosforilados em vias de fosforelay. Esses domínios REC não regulam diretamente as respostas de saída (GAO; STOCK, 2009).

3.3.2 Mecanismos não canônicos de regulação

A regulação alostérica emerge como um mecanismo importante na sinalização por dois componentes. RRs sem domínios efetores, como DivK de *Caulobacter crescentus*, podem modular alostericamente a atividade de suas HKs cognatas (Paul et al, 2008). O sistema DesK/DesR de *Bacillus subtilis* ilustra outro mecanismo não convencional, onde a ativação ocorre através de interações proteína-proteína sem fosfotransferência direta (TRAJTENBERG et al, 2014).

Esses exemplos destacam a complexidade dos mecanismos regulatórios que transcendem o paradigma linear de fosfotransferência. As alterações conformacionais induzidas por fosforilação são sutis, envolvendo deslocamentos estruturais de aproximadamente 1 Ångstrom. Resíduos altamente conservados, incluindo serina e treonina na região C-terminal da folha $\beta 4$ e fenilalanina/tirosina na folha $\beta 5$, medeiam essas transições, propagando as mudanças desde o sítio ativo até a superfície $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ (STOCK et al, 2000; ROBINSON et al, 2000). A fosforilação reorienta esses resíduos, estabilizando a conformação ativa da proteína, embora a magnitude desses efeitos varie entre diferentes RRs (GAO; STOCK, 2009).

Condições experimentais revelam que concentrações elevadas de RRs podem inibir sua própria ativação, exigindo sinais indutores para superar este bloqueio (GROISMAN, 1995). Na maioria dos sistemas, as RRs são expressas em níveis mais altos que suas HKs parceiras, um desequilíbrio que pode suprimir a transcrição gênica quando invertido (SONCINI et al, 1995; YEO et al, 2012). Esta plasticidade regulatória permite ajustes finos na expressão gênica, adaptando as respostas celulares às demandas ambientais.

3.4 SISTEMAS DE DOIS COMPONENTES EM *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

O gênero *Herbaspirillum* tem despertado crescente interesse científico desde o isolamento pioneiro de *H. seropedicae*, uma bactéria não patogênica, aeróbica, endofítica e fixadora de nitrogênio, pertencente à classe *Betaproteobacteria* e à família *Oxalobacteraceae* (OLIVARES et al., 1996). Além dessas características, também destaca-se sua capacidade de produzir fitormônios, como o ácido indol-3-acético, (BASTIÁN et al, 1998). Esses fatores, contribuem para o potencial de *H. seropedicae* como biofertilizante, reduzindo assim, a necessidade de fertilizantes nitrogenados sintéticos em culturas importantes do ponto de vista econômico, como por exemplo, arroz

(*Oryza sativa*) e o milho (*Zea mays*) (GYANESHWAR et al., 2002; BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2017; CUNHA et al., 2022).

Entre as diversas linhagens de *H. seropedicae*, a estirpe SmR1 um mutante espontâneo da estirpe Z78, destaca-se pelo seu potencial biotecnológico. O genoma da estirpe SmR1, possui um genoma circular contendo 5.513.887 pares de bases e 4.804 genes, seu genoma foi completamente sequenciado por Pedrosa e seus colaboradores em 2011, o tornando acessível para estudos (PEDROSA et al, 2011),

Estudos transcriptômicos têm revelado diferentes padrões de expressão gênica em *H. seropedicae* SmR1 sob diferentes condições ambientais, com destaque para a expressão de numerosos genes codificantes de componentes de sistemas de dois componentes (TCS) (BONATO et al, 2024). A caracterização funcional dos sistemas de sinalização representa uma fronteira importante para a compreensão dos mecanismos moleculares que governam o reconhecimento e colonização de plantas por bactérias diazotróficas, podendo fornecer subsídios para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas na agricultura.

Entre os TCS melhor caracterizados em *H. seropedicae* encontra-se o sistema NtrB/NtrC, componente central da regulação do metabolismo nitrogenado em β -proteobactérias. Este sistema responde a condições de limitação de nitrogênio através de um mecanismo bem conservado: a histidina quinase NtrB autofosforila-se e transfere o grupo fosforil para o regulador de resposta NtrC, que então modula a expressão de genes relacionados à assimilação de nitrogênio (DIXON et al, 2004; SOUZA et al, 1991; PERSUHN et al, 2000). Apesar do conhecimento sobre este sistema específico, a análise genômica de *H. seropedicae* SmR1 revela que aproximadamente 24% de seus 4.735 ORFs codificam proteínas com funções desconhecidas ou apenas previstas (PEDROSA et al, 2011), incluindo diversas proteínas ainda não caracterizadas.

Neste contexto, os genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* se mostram como alvos promissores para a investigação, codificando um regulador de resposta (*Hsero_3507*) e uma histidina quinase sensora (*Hsero_3508*). Estes genes foram alvo de um estudo realizado por Cassilla (2018), que construiu estirpes mutagenizadas através de recombinação homóloga utilizando um plasmídeo contendo um fragmento do gene interrompido pela inserção de transposon. Os fenótipos observados nos mutantes obtidos, revelaram que enquanto o mutante *Hsero_3508Tn* apresentou crescimento reduzido e motilidade aumentada mesmo na presença de altas concentrações de

nitrogênio, o mutante *Hsero_3507Tn* exibiu comprometimento de motilidade, com ausência de halo de crescimento e formação de película em meio semissólido. Esses resultados indicam que o produto do gene *Hsero_3507* possa estar envolvido na regulação da motilidade flagelar, enquanto *Hsero_3508* parece desempenhar papel no controle do crescimento bacteriano.

Análises de predição de interações proteicas utilizando a plataforma STRING (SZKARCZYK et al, 2023) revelaram que a proteína *Hsero_3507* potencialmente interage com oito parceiros moleculares, incluindo a proteína de quimiotaxia CheY e um regulador transcricional da família MarR (CASSILHA, 2018). Estas predições foram parcialmente validadas por estudos complementares (LIBL, 2019, dados não publicados), que confirmaram a manutenção da capacidade de quimiotaxia nas estirpes mutagenizadas, embora com alterações significativas nos padrões de motilidade e crescimento, corroborando os achados de Cassilha (2018).

Evidências adicionais sobre a importância fisiológica destes genes vieram de estudos de transcriptômica realizados por Balsaneli et al. (2016), entre os resultados, foi observada a regulação positiva de ambos os genes durante a colonização de raízes de milho por *H. seropedicae* SmR1. Estes dados sugerem um papel para estes componentes de sinalização nos processos adaptativos durante a interação planta-bactéria. Mais recentemente, Bonato e seus colaboradores (2024) revelaram também entre seus resultados, que a expressão dos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* em altas concentrações de amônio e em condições de microaerobiose, indicando que suas funções podem se estender além da regulação do metabolismo do nitrogênio, possivelmente envolvendo respostas a outros estresses ambientais.

O possível sistema de dois componentes formado por *Hsero_3507* e *Hsero_3508*, pode não ser constituído apenas pela histidina quinase e a proteína reguladora de resposta. Há também a possibilidade das proteínas *Hsero_3507* e *Hsero_3508* estarem envolvidas com proteínas auxiliares, que regulam a atividade da HK ou influenciam a estabilidade da fosforilação da RR. Por fim, a proteína *Hsero_3507* é uma proteína de domínio REC solitário, o qual pode ser possuidora de diversas funções, seja para se ligar a outras proteínas, podendo por exemplo estar envolvida na regulação de proteínas motoras do flagelo celular como acontece com proteínas estruturalmente similares como a proteína CheY, ou funcionando como intermediários fosforilados em vias de transdução de sinal.

Assim, o conhecimento detalhado de participantes de sistema de dois componentes, pode fundamentar o desenvolvimento de inoculantes bacterianos mais eficientes, estratégias inovadoras de biofertilização nitrogenada e até aplicações em biorremediação ambiental, haja vista a participação desses sistemas na adaptação bacteriana e sensoriamento ambiental, assim, informações sobre esses sistemas são relevantes para otimizar a interação benéfica entre bactérias diazotróficas e plantas cultivadas, contribuindo para uma agricultura mais sustentável.

4 METODOLOGIA

4.1 MICRORGANISMOS E PLASMÍDEOS

As estirpes dos microrganismos utilizados estão listados na TABELA 1 e os plasmídeos utilizados estão listados na TABELA 2.

TABELA 1 - ESTIRPES BACTERIANAS

Estirpes	Características	Referência
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15ΔlacX74 recA1 araD139 Δ (araleu) 7697 galU galKtpsL (Sm ^R) endA1 nupG	INVITROGEN
<i>E. coli</i> S17.1	Tra ⁺ , Sm ^R	SIMON et al, 1983
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	hsdSB, gal(λclts 857 ind 1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)	SAMBROOK et al, 1989
<i>H. seropedicae</i> SmR1	Nif ⁺ , Sm ^R , Estirpe selvagem	SOUZA et al, 2000
<i>H. seropedicae</i> 3508Tn	Sm ^R , Km ^R , Tc ^R , SmR1 contendo plasmídeo pSUP3508Tn inteiro na região do genoma ligado ao <i>Hsero_3508</i>	CASSILHA, 2018
<i>H. seropedicae</i> 3507Tn	Sm ^R , Km ^R , Tc ^R , Smr1 contendo a inserção do plasmídeo pSUP3507Tn inteiro na região do genoma ligado ao <i>Hsero_3507</i>	CASSILHA, 2018
SmR1:LacZ	Sm ^R , Km ^R , Nif ⁺ , SmR1 contendo uma fusão cromossomal <i>nifH:lacZ</i>	AQUINO et al, 2015

TABELA 2 - PLASMÍDEOS

Plasmídeo	Característica	Referência
pSUP202	Ap ^R , Tc ^R , Cm ^R , mob site	SIMON et al, 1983
pET28a	Km ^R , vetor de expressão (promotor T7)	NOVAGEN
pSUP3508Tn	Amp ^R , Km ^R , Tc ^R , contém o gene <i>Hsero_3508</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 interrompido pelo transposon EZ-Tn5 TM <KAN-2> em pSUP202	CASSILHA et al, 2018
pSUP3507Tn	Amp ^R , Km ^R , Tc ^R , contém o gene <i>Hsero_3507</i> de <i>H. seropedicae</i> SMR1 interrompido pelo transposon EZ-Tn5 TM <KAN-2> em pSUP202	CASSILHA et al, 2018
pET3508P	Km ^R , contém a sequência codificadora da proteína <i>Hsero_3508</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada em pET28a, que expressa a proteína com cauda histidina	CASSILHA et al, 2018
pET3507P	Km ^R , contém a sequência codificadora da proteína <i>Hsero_3507</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada em pET28a, que expressa a proteína com cauda de histidina	CASSILHA et al, 2018
pT7-7	Ap ^R , vetor para expressão a partir do promotor T7	TABOR; RICHARDSON, 1985
pT7-7_3507	Ap ^R , vetor para expressão a partir do promotor T7 contém a sequência codificadora da proteína	LIBL, 2019 (não publicado)

Hsero_3507 de <i>H. seropedicae</i> clonada em pT7-7		
pT7-7_3508	Ap ^R , vetor para expressão a partir do promotor T7, contém a sequência codificadora da proteína Hsero_3508 de <i>H. seropedicae</i> clonada em pT7-7	LIBL, 2019 (não publicado)
pMP220	Tc ^R , vetor com o gene <i>lacZ</i> sem promotor. (apresenta sítio de policlonagem em orientação inversa ao pPW452)	SPAINK et al, 1987
pPW452	Tc ^R , vetor com o gene <i>lacZ</i> sem promotor	WOODLEY et al, 1996
pPW_Hsero_3507	Tc ^R , vetor com o gene <i>lacZ</i> sem promotor contendo a região promotora do gene <i>Hsero_3507</i>	LIBL, 2019 (não publicado)
pPW_Hsero_3508	Tc ^R , vetor com o gene <i>lacZ</i> sem promotor contendo a região promotora do gene <i>Hsero_3508</i>	LIBL, 2019 (não publicado)

4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas sob agitação constante a 37°C em meio líquido Luria-Bertani (LB), e sem agitação em meio sólido Luria-Bertani ágar (LA) (SAMBROOK et al, 1989). O meio sólido (LA) foi obtido pela adição de ágar (15g/L) ao meio líquido (LB). A composição do meio LB está descrita na TABELA 3.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO LB	
Composição	Concentração
Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de sódio	10 g/L
Triptona	10 g/L

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas a 30°C a 120 rpm sob agitação constante em meio NFbHP utilizando malato (KLASSEN et al, 1997) com diferentes concentrações de cloreto de amônio (20 mmol/L, 4 mmol/L ou glutamato de sódio 5 mmol/L) como fonte de nitrogênio e com os antibióticos apropriados. A sigla NFbHP refere-se à composição do meio de cultivo, onde HP significa alto fosfato. A composição do meio de cultivo NFB-Malato está descrita na TABELA 4. O meio sólido e o meio semissólido foram obtidos pela adição de ágar 15g/L e 1,75 g/L, ao meio NFb-Malato líquido, respectivamente. O Meio de cultivo possuía pH 6,5. Além disso, a mistura de fosfatos foi esterilizada por autoclavação separadamente ao meio NFb-Malato e adicionada fria ao meio em um volume de 50 mL/LA composição da solução de fosfatos foi K₂HPO₄ 17,8 g/L e KH₂PO₄ 159,5 g/L.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO NFB-MALATO

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

Os meios de cultura listados acima foram previamente esterilizados por autoclavação a 120°C durante 60 minutos. As estirpes de *E. coli* foram armazenadas em glicerol 50% e armazenadas a - 80°C, e os estoques foram repicados uma vez ao ano. Para preparo dos estoques das estirpes de *H. seropedicae* SmR1, 4 mL de meio de cultura semi-sólido ou meio sólido foram incubadas sem agitação, a 30°C, em frasco de vidro de 5 ml com os antibióticos adequados, lacradas com fita de silicone e mantidas à temperatura ambiente. Os estoques foram repicados a cada seis meses.

4.3 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados estão listados na TABELA 5. Todas as soluções de antibióticos foram mantidas a -20°C.

TABELA 5 - ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Concentração utilizada na seleção de <i>H. seropedicae</i> (µg/mL)	Concentração utilizada para seleção de <i>E. coli</i> (µg/mL)
Ácido Nalidíxico (Nal)	10	10
Ampicilina (Amp)	-	250
Canamicina (Km)	500	100
Estreptomicina (Sm) 0	80	-
Tetraciclina (Tc)	10	-

4.4 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS EM PEQUENA ESCALA

A purificação de plasmídeos a partir das culturas bacterianas foi realizada seguindo método de lise alcalina, conforme descrito por Sambrook e colaboradores (1989) com adaptações. Após o crescimento das culturas bacterianas por cerca de 12 horas, 1,5 mL de cultura foram centrifugados a 13.400 rpm por 1 minuto. O *pellet*

resultante foi ressuspendido em 120 μ L de tampão GET (contendo 50 mmol/L de glucose, 10 mmol/L de EDTA, 25 mmol/L de Tris-HCl, pH 8,0).

A lise celular foi realizada adicionando 120 μ L de uma solução de lise contendo 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 180 mmol/L de NaOH, com homogeneização lenta. Em seguida, foram adicionados 120 μ L de acetato de potássio 3 mmol/L, homogeneizado lentamente, em seguida a mistura foi mantida em gelo por 10 minutos. Após centrifugação a 13.400 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e misturado com 120 μ L de clorofórmio álcool-isoamílico (24:1), seguido de nova centrifugação a 13.400 rpm por 5 minutos. A fase aquosa, contendo o DNA dos plasmídeos foi transferida para um novo tubo e adicionado 1 mL de etanol absoluto e deixado em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, a suspensão foi centrifugada a 13.400 rpm por 5 minutos, o DNA plasmidial precipitado foi lavado com 0,5 mL de etanol 70%, centrifugado novamente a 13.400 rpm por 5 minutos, seco em estufa 37°C por até 20 minutos e dissolvido em 20 μ L de água ultrapura estéril. O DNA purificado foi quantificado no equipamento Nanodrop, a concentração final foi ajustada para 50 ng/ μ L.

4.5 PREPARO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

As células de *E. coli* TOP 10 e S17.1 quimiocompetentes foram armazenadas em alíquotas de 100 μ L em tubos tipo eppendorf estéreis a - 80°C para transformação bacteriana, 3 μ L do DNA de interesse com concentração de 50 ng/ μ L foi adicionado a suspensão de células quimiocompetentes e incubado por 15 minutos em gelo, seguido de incubação por 2 minutos a 42°C e resfriamento por 5 minutos em gelo. Em seguida, 900 μ L de meio LB foram adicionados e a suspensão incubada por 60 minutos em estufa a 37°C para recuperação das células. Em seguida, em capela de fluxo laminar estéril, as células foram plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos apropriados para a seleção das bactérias transformantes. Após isso, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 12 horas.

4.6 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS POR CONJUGAÇÃO BACTERIANA

Os plasmídeos recombinantes de interesse foram previamente transformados em *E. coli* S17.1. As estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas um dia antes da conjugação bacteriana nos meios NFbHPN-Malato (NH₄Cl 20 mmol/L) e LB, respectivamente contendo os antibióticos apropriados para a seleção. No dia da realização da conjugação, as culturas saturadas foram utilizadas para o reinóculo das estirpes de interesse nos meios de cultura adequados sem adição de antibióticos. Um volume de 75 µL das estirpes de *H. seropedicae* SmR1 foram inoculadas em 2,5 mL de NFbHPN-malato 3 horas antes do inóculo de 25 µL da estirpe S17.1 de *E. coli* em 2 mL de meio LB.

Os tempos de incubação, no dia da conjugação, das estirpes de *H. seropedicae* e *E. coli* S17.1 foram de, respectivamente, 6 e 3 horas nas condições ideais de crescimento (Item 4.2). Em seguida foram preparadas misturas da cultura de *H. seropedicae* com cultura de *E. coli* em duas proporções (50 µL da cultura de *H. seropedicae* com 5 µL da cultura de *E. coli* S17.1) e em outro tubo 100 µL da cultura de *H. seropedicae* com 2 µL da cultura de *E. coli* S17.1.

As suspensões de células de ambas misturas foram aplicadas como uma gota em pólos opostos na placa com meio LA/NFbHPN-malato (1:3) e incubadas a 30°C por 24 horas. A massa de células crescidas na placa foi raspada, ressuspensa em 1 mL de NFb-Malato líquido, submetidas a diluição seriada (10⁻¹ e 10⁻²) e então 100 µL de cada diluição foram plaqueadas separadamente em meio NFb-Malato sólido contendo NH₄Cl 20 mmol/L e antibióticos adequados.

4.7 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA POR PCR

A amplificação dos fragmentos do gene *Hsero_3507* e *Hsero_3508* foi realizada pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (MULLIS e FALOONA, 1987). Para a amplificação da construção *Hsero_3507Tn* utilizando os primers para o gene selvagem, foi utilizado 10 pmol dos respectivos primers forward e reverse, 50 ng/µL de DNA molde, dNTPs 0,2 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, 1U de GoTaq®DNA polimerase e tampão GoTaq®(PROMEGA) em uma reação de volume final de 20 µL. As condições de temperatura da PCR foram os seguintes: 1 ciclo de 95°C por 2 min, 25 ciclos com uma

etapa de 95°C por 30 segundos, gradiente de temperatura de anelamento para tubos individuais com os reativos da reação em: 43°C, 50°C, 55°C, 60°C por 30 segundos e outra de 72°C por 2 minutos e, um ciclo de extensão de 72°C por 5 minutos.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DO DNA POR ESPECTROFOTOMETRIA

A concentração do DNA foi estimada pela absorbância da amostra em 260 nm. A quantificação foi realizada em aparelho Nanodrop 2000 (Thermo-Fischer Scientific). A quantificação da amostra foi determinada pela relação absorbância 260 nm/absorbância 280 nm. O score 2 foi considerado para inferir a pureza da amostra. Valores mais próximos de 2 inferem maior pureza.

4.9 DIGESTÃO DE DNA POR ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As digestões de DNA foram executadas apenas para confirmação dos padrões de restrição do vetor pSUP202 com banda de 8000 pb e as bandas correspondentes ao *Hsero_3508Tn* de 2400 pb e do *Hsero_3507Tn* de 1600 pb. Os sistemas foram realizados seguindo as recomendações dos fabricantes das enzimas (FERMENTAS ou INVITROGEN) em um volume final de 10 µL, contendo 1 unidade de EcoRI, 1 µg de DNA, tampão CutSmart®1x. O sistema foi incubado a 37°C. Após a incubação, os sistemas foram aquecidos a 70°C por 30 minutos para inativação enzimática.

4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA NITROGENASE

A atividade da nitrogenase foi verificada utilizando o método de redução do acetileno para etileno, conforme descrito por Dilworth (1966) e Schollhorn & Burris (1967), com adaptações realizadas por Klassen e colaboradores (1997). No dia anterior ao experimento, as culturas de *H. seropedicae* SmR1, *Hsero_3507Tn* e *Hsero_3507Tn* foram cultivadas a 30°C com agitação constante a 120 rpm em meio NFbHP-Malato (NH₄Cl 20 mmol/L) até atingirem a saturação. Posteriormente, foram reinoculadas em frascos contendo meio NFbHP-Malato semissólido suplementado glutamato 0,5 mmol/L e vedados com rolhas de borracha.

Após a vedação dos frascos acetileno gasoso (10% do volume da fase gasosa do frasco de 10 mL) foi injetado nos frascos e em seguida as culturas foram incubadas a 30°C por 1 hora. Após esse tempo, uma amostra de 500 µL da fase gasosa dos frascos foi coletada para análise do etileno formado, utilizando um cromatógrafo Varian Star 3400 CX equipado com uma coluna de Porapak N e detector de ionização de chama. A temperatura da coluna foi mantida em 120°C e do detector em 200°C, com nitrogênio utilizado como gás de arraste. O etileno padrão (100 ppm) foi fornecido pela empresa White Martins S.A. A fase gasosa dos frascos foi coletada para análise, enquanto o meio semissólido foi homogeneizado em aparelho vórtex e utilizado para realizar o ensaio de determinação da concentração de proteínas, seguindo o método de Bradford (1976). A atividade da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína da cultura. Para comparar a atividade da nitrogenase entre as estirpes selvagens e mutagenizadas sob diferentes condições de nitrogênio (N- e N+), utilizou-se o teste *T* não pareado com correção de Welch. Essa abordagem foi escolhida devido à heterogeneidade das variâncias entre os grupos (identificada por diferenças significativas nos desvios padrão), que viola o pressuposto de homocedasticidade do teste *T* tradicional. A correção de Welch ajustou os graus de liberdade para garantir a robustez dos resultados, especialmente quando as amostras têm tamanhos ou variâncias desiguais (RUXTON et al, 2006). As análises foram realizadas no Python (pacote SciPy, v1.8), com significância estatística definida como $p < 0,05$.

4.11 SUPEREXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

Os plasmídeos pET3507P e pET3508P (CASSILHA, 2018) e os plasmídeos pT7-7 3507P e pT7-7 3508P (LIEBL, 2019), foram transformados em *E. coli* BL21 (λDE3). As colônias transformantes de *E. coli* BL21 (λDE3) contendo os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 20 mL de LB com 20 µL de canamicina 100 µg/ml (plasmídeos pET3507P, pET3508P) e ampicilina 250 µg/ml (plasmídeos pT73507P e pT73508P) e então incubadas durante a noite a 37°C. A partir desse pré-inóculo foi feito um inóculo 1:50 (6 mL de pré-inóculo para 300 mL de meio LB) em Erlenmeyer de 1L, sendo incubado em um agitador shaker a 120 rpm e 37°C até atingir D.O₆₀₀ entre 0,5 a 0,7. Atingida a absorbância desejada, foram adicionados 150 µL de IPTG 1M, e incubou-se

por 3 horas a 37°C. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi armazenado a -20°C.

4.12 ELETROFORESE DE PROTEÍNA SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES SDS-PAGE

A eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes com SDS, foi realizada em gel de poliacrilamida 12,5 ou 15% (LAEMMLI, 1970). As amostras de interesse foram diluídas em tampão de amostra desnaturante (Tris HCl 60 mmol/L, 10% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 0,02% azul de bromofenol, pH 6,8), fervidas por 3 minutos e aplicadas no gel. As eletroforeses das amostras foram realizadas em sistema vertical (sistema Mini Protean, Biorad). As corridas eletroforéticas ocorreram a 170 V, em tampão de corrida 1X (3 g/L Tris, 14,4 g/L glicina, 0,1% SDS) por 60 minutos. O gel foi corado com solução de Comassie Blue (50% metanol, 10% ácido acético, 0,55 g/L Brilliant Blue (R) por trinta minutos, o corante excedente foi retirado com solução descorante (50% metanol, 10% ácido acético) até obter a visualização das bandas proteicas.

4.13 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS NATIVAS HSERO_3507 E HSERO_3508

Para realização da purificação com resina em falcon, foram utilizados 1mL das resinas DEAE, e Q em seus respectivos tubos Falcons, e deixadas decantar para possibilitar a remoção da camada líquida referente ao etanol 20% onde as resinas estão armazenadas. Foi realizada uma lavagem com 1 mL de água ultrapura, após decantar, o sobrenadante foi removido. Foi então adicionado 1 mL do tampão A (Tris-HCl 50 mmol/L, KCl 100 mmol/L, pH 8,0), a resina foi vortexada com este tampão, centrifugada por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado e 500 µL do tampão A foi adicionado ao falcon onde se encontrava a resina, 5 mL da fração solúvel do lisado centrifugado (20.000 g por 10 minutos) foi adicionada e o tubo homogeneizado por meio de vórtex e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos sob agitação. Em seguida o tubo foi submetido a centrifugação (30 segundos a 5.000 rpm). O sobrenadante foi coletado e chamado de fração não ligada (NL). Foi adicionado 1 mL de tampão A, o tubo foi agitado por aparelho vórtex, centrifugado por 30 segundos a 5.000 rpm e o sobrenadante coletado, este foi chamado de fração de lavagem (L).

O tampão B (Tris-HCl 50 mmol/L, KCl 1M, pH 8,0) foi preparado em diferentes concentrações (15, 35, 50, 70 e 100 (%)) para eluir as proteínas, para cada concentração o tubo foi “vortezado”, depois foi centrifugado por 30 segundos a 5.000 rpm e a fração coletada. 20 µL das frações coletadas foram submetidas a SDS-PAGE. As frações mais enriquecidas da proteína foram agrupadas e submetidas a Desalting com tampão Tris HCl 50 mmol/L, KCl 100 mmol/L, 15% de glicerol. A presença de proteínas foi confirmada por adição de 100 µL do reagente Bradford, para 10 µL de amostra, em placa de 96 poços. As amostras foram aliquotadas em tubos de eppendorf e armazenadas a -20C.

4.14 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS HSERO_3507 E HSERO_3508 COM CAUDA DE HISTIDINA

A coluna *Hitrap Chelating* foi carregada com NiCl₂, como descrito pelo fabricante, e lavada com água ultrapura para retirar o excesso de cloreto de níquel. A coluna foi equilibrada com 5 volumes de coluna de tampão A (Tris HCl 50 mmol/L, KCl 100 mmol/L, Imidazol 25 mmol/L, pH 8,0) e em seguida carregada com a Fração Solúvel (FS) das proteínas (a fração solúvel foi obtida após sonicação e centrifugação do extrato celular). As proteínas não ligadas foram coletadas e a fração foi chamada de Fração não Ligada (FNL). Depois disso, a coluna foi lavada com o tampão A, cerca de 10 volumes de coluna, e coletada a Fração de Lavagem (FL). A eluição da proteína ocorreu por meio de gradiente de imidazol que variou de 100 mmol/L a 500 mmol/L sendo coletadas frações de aproximadamente 1,5 mL. As frações foram analisadas por gel de SDS-PAGE. As frações com maior concentração de proteína foram agrupadas e submetidas a Desalting em tampão Desalting (Tris-HCl 50 mmol/L, KCl 100 mmol/L, Glicerol 15%).

4.15 TESTE DE AFINIDADE PROTEÍNA-LIGANTE ENTRE A PROTEÍNA HIS-HSERO_3507 E PARTÍCULAS DE NÍQUEL

A resina Magne-His Ni foi lavada 2x com tampão (Tris HCL 50 mmol/L, pH 7,5 ou 8,0, KCl 100 mmol/L, glicerol 10%, Imidazol 10 mmol/L). Após a lavagem e remoção do sobrenadante, 4 µL da resina foi coletada e adicionada a um eppendorf com 200 µL de tampão de interação. O eppendorf foi agitado no aparelho vórtex e submetido a contato com um ímã, e o sobrenadante foi descartado. Em outro tubo, foi adicionado 70,1 µL da

proteína purificada mais 79,9 de tampão. Em um terceiro tubo, aplicou-se 41,49 μL da fração solúvel do extrato celular lisado (centrifugado a 20.000 g por 10 minutos) e 108,51 μL do tampão de interação (20 μL de cada tubo foi coletado para SDS-PAGE). Aos tubos foi adicionado 4 μL de resina Magne-His Ni e agitados no aparelho vórtex, mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos. Após este tempo, foram submetidos ao ímã e o sobrenadante removido. 20 μL do sobrenadante de cada tubo foram coletados após adição da resina, e submetidos a SDS-PAGE, 12,5%. As eluições ocorreram com concentração final de 500 mmol/L ou 1 mol/L de imidazol no tampão de eluição (Tris HCl 50 mmol/L, pH 7,5 ou 8,0, KCl 100 mmol/L, glicerol 10%, Imidazol 500 mmol/L ou 1 mol/L).

4.16 ENSAIO DE CO-PRECIPITAÇÃO PARA VERIFICAR A INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA HIS-HSERO_3507 E A PROTEÍNA NATIVA HSERO_3508

O ensaio de co-precipitação foi realizado utilizando a proteína purificada His-Hsero_3507 e a proteína Hsero_3508 purificada com resina Q em tubo de falcon. As proteínas purificadas foram dosadas por Bradford. O tampão de interação continha Tris HCl 50 mmol/L, pH 8,0, KCl 100 mmol/L, glicerol 10% e Imidazol 10 mmol/L. A quantidade de 4 μL de Magne-His Ni foi posta em contato com as proteínas individualmente (controles) e ambas as proteínas no tubo para avaliação da interação. Os tubos após submissão ao vórtex foram mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos, com a agitação a cada 3 minutos. Após 15 minutos o tubo foi submetido ao ímã, o sobrenadante foi removido (Fração Não Ligada) e 20 μL foram coletados para a etapa de SDS-PAGE. O tampão de interação variou apenas em relação a quantidade de imidazol (Imidazol 50 mmol/L para lavagem e 500 mmol/L para eluição). A análise foi realizada por SDS-PAGE 12,5%, o gel foi corado com Comassie Blue R.

4.17 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS HIS-HSERO_3507 E HSERO_3508 NATIVA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO TIPO MALDI-TOF/MS

A expressão de cada proteína de interesse foi confirmada por SDS-PAGE e a banda do gel de poliacrilamida de tamanho e abundância compatíveis foi extraída para análise. A banda foi descorada em tubo eppendorf por lavagens com solução de

acetonitrila 50% e bicarbonato 25 mmol/L pH 8.0 (400 µL). O descorante foi removido e a banda desidratada com 200 µL de solução de acetonitrila 100% por 5 minutos. Uma solução contendo 15 ng/µL de tripsina, 36 µL de bicarbonato de amônio 50 mmol/L, 9 µL de água ultra pura, e 5 µL de acetonitrila 100% foi preparada e mantida em banho de gelo por 30 minutos com o gel para reidratação. O gel hidratado foi cortado em pedaços e incubado durante a noite a 37°C. No dia seguinte a matriz foi preparada (100 µL de acetonitrila, 92 µL de água ultra pura, 8 µL de TFA 2,5%) e adicionada com a amostra na placa de análise até a cristalização. Os espectros de massas foram adquiridos por meio espectrofotômetro MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). As massas foram adquiridas em modo reflexor positivo. A lista de picos foi produzida por meio do software Mascot versão 2.8 e o banco de dados utilizado de *H. seropedicae* SmR1

4.18 ENSAIO DE INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS HIS_HSERO_3507 E HIS_HSERO_3508 E PROTEÍNAS ALVO NO EXTRATO DE *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

Para o ensaio controle, foi adicionado 1 mg da proteína purificada em uma coluna *Hitrap chelating* de 1 mL (GE Healthcare) previamente carregada com níquel 100 mmol/L. A coluna estava previamente lavada com 15 mL de tampão 1 (Tris-HCl 50 mmol/L [pH 8], KCl 100 mmol/L, Imidazol 50 mmol/L) para remover proteínas ligadas inespecíficas antes da adição do extrato de *H. seropedicae* SmR1. O extrato de *H. seropedicae* SmR1 obtido a partir do cultivo em quatro condições com diferentes concentrações de nitrogênio. A aeração foi alterada utilizando frascos Erlenmeyer com diferentes volumes (2 L para O+ e 1 L para O -, com 400 mL de meio NFb-Malato em cada). A medição da turbidez da suspensão celular foi realizada em espectrofotômetro, com o comprimento de ondas a 600 nanômetros (D.O₆₀₀). A D.O inicial foi D.O₆₀₀ 0,05. O cultivo seguiu por 26 horas. A tabela 6, apresenta as características do extrato celular utilizado neste experimento como: a concentração de amônio, a D.O₆₀₀ no momento da coleta e quantidade de proteínas obtidas na fração solúvel.

Para obter a fração solúvel, o extrato bruto foi submetido à sonicação com 10 mL de tampão 2 (Tris-HCl 50 mmol/L [pH 8], KCl 100 mmol/L e Imidazol 20 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L, ATP 1 mmol/L) e submetido à centrifugação (30.000 × g a 4 °C por 30 min).

A coluna controle foi lavada com 5 mL de tampão 2 (Tris-HCl 50 mmol/L [pH 8], KCl 100 mmol/L, Imidazol 20 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L, ATP 1 mmol/L) e a fração solúvel do extrato foi injetada (aproximadamente 6 mg de proteína em 5 mL). Em seguida, a coluna controle foi lavada com 20 mL de tampão 2 e as duas últimas frações coletadas. A eluição aconteceu com 3 mL de tampão 3 (Tris-HCl 50 mmol/L [pH 8], KCl 100 mmol/L e Imidazol 20 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L, ATP 1 mmol/L, Imidazol 500 mmol/L) e as 3 últimas frações foram coletadas (1 mL em cada fração). À coluna 1 e 2 foram injetadas as proteínas His_Hsero_3507 e His_Hsero_3508, respectivamente (2 mg de proteína purificada foi aplicada em cada coluna).

As etapas de lavagem e eluição foram realizadas conforme as etapas descritas anteriormente para o ensaio controle. As frações do eluato foram precipitadas com acetona pura gelada e aplicadas no gel SDS-PAGE.

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS DO EXTRATO OBTIDO DE *H. seropedicae* SmR1

Condição de cultivo	D.O ₆₀₀	[] final de amônio no meio	[] de proteínas no extrato
N- O+	1,121	0,078 mmol/L	2,13 µg/uL
N+ O-	1,233	21,85 mmol/L	2,49 µg/uL
N+ O+	1,419	21,4 mmol/L	3,64 µg/uL
N- O-	1,238	0,071 mmol/L	2,58 µg/uL

[] indica concentração

4.19 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONA

A cetona foi previamente resfriada à -20°C. A amostra de proteína foi adicionada a um tubo eppendorf compatível com acetona, em seguida foi adicionado quatro vezes o volume da amostra de acetona fria ao tubo. O tubo foi agitado no aparelho vórtex e incubado por 60 minutos à -20°C. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 15.000 ×g e o sobrenadante descartado. A acetona remanescente no tubo foi deixada evaporar em temperatura ambiente por 30 minutos. Após, foi adicionado ao *pellet* 150 µL de tampão de sonicação (Tris HCl 50 mmol/L, MgCl₂ 25 mmol/L, KCl 100 mmol/L) e homogeneizado para dissolver o *pellet* de proteína.

4.20 ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA β-GALACTOSIDASE

Foi realizado um pré-inóculo da bactéria *H. seropedicae* SmR1 carregando os plasmídeos pPW_452 ou pPW_3507 ou pPW_3508 (LIBL, 2019) em 3 mL de meio NFb-Malato HPN em frascos médios utilizando amônio 20 mmol/L e manter durante a noite sob agitação (120 rpm) a 30°C por até 16 horas, com os antibióticos adequados. Em seguida, a bactéria foi reinoculada em 3 mL de meio NFb-Malato HPN sob a mesma condição, novamente até 16 horas. No dia seguinte, a bactéria foi reinoculada em triplicata de 200 microlitros de pré-inóculo em 10 mL de NFb-Malato em duas condições separadas, uma em que o meio continha amônio 4 mmol/L e no outro amônio 20 mmol/L, fosfatos 50 mmol/L em cada frasco. Os frascos continham um volume de 250 mL e volume final de 100 mL.

Para a determinação das densidades ópticas foi utilizado o espectrofotômetro (Synergy-BIOTEK, USA) com leitor de microplacas. A densidade óptica a 600 nm ($D.O_{600}$) das culturas foi acompanhada a partir de $D.O_{600}$ 0,05 até 30 horas de crescimento. A cada duas horas ou 3 horas. Cem microlitros da cultura foram utilizados para determinação da atividade da enzima β -galactosidase. Para isso, foram adicionados a 900 μ L de tampão Z (Na_2HPO_4 60 mmol/L, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 40 mmol/L, KCl 10 mmol/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mmol/L dissolvido em 500 mL de Água Mili-Q ultrapura) em tubos de 2 mL, Para o controle foi adicionado 900 μ L de tampão Z e 100 μ L de água a outro tubo de 2 mL. Aos tubos foram adicionados uma gota de clorofórmio e estes agitados em aparelho vórtex. As amostras foram deixadas em banho Maria a 30°C durante 10 minutos.

Após o banho Maria, aos tubos foram adicionados 200 μ L de O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) (4 mg/mL⁻¹). Os tubos foram agitados no aparelho vórtex e novamente levados ao banho Maria a 30°C. O tempo foi cronometrado desde a adição de ONPG no primeiro tubo até aparecer coloração, e então a reação foi parada com adição de 500 μ L de carbonato de sódio 1M.

A densidade óptica das culturas foi medida a 420 nm e 550 nm e a atividade de β -galactosidase foi calculada em unidades Miller: Unidades Miller = $(DO_{420} - (1,75 \times DO_{550})/T \times V \times DO_{600} \times 1000$. Onde, DO_{420} e DO_{550} são leituras da reação. DO_{600} é a leitura da densidade da suspensão de células. T é o tempo de reação em minutos e V é o volume de cultura no ensaio durante a reação em mL.

4.21 ANÁLISES *IN SILICO*

As análises *in silico* foram realizadas a partir das sequências de nucleotídeos e das sequências primárias de aminoácidos deduzidas dos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* obtidas no projeto de sequenciamento do genoma da bactéria *H. seropedicae* (GENOPAR). O alinhamento das sequências de aminoácidos foi realizado utilizando o Clustaw (MADEIRA, et al, 2022), BlastP (PSI- BLAST- Position-Specific Iterated BLAST) (SAYERS et al, 2021).

As análises de arquitetura de domínio foram realizadas no Interpro (PAYSAN-LAFOSSE et al, 2023), SMART (Schultz, 2000), *Conserved Domain Architecture Retrieval Tool* - CDART (GEER et al, 2002), *Conserved Domain Database*- CDD (WANG et al, 2023) a partir da sequência primária de aminoácidos depositado no NCBI (National Center for Biotechnology Information). Foi realizada busca no banco de dados Uniprot (código de acesso: D8IPU0_HERSS) e análise da estrutura tridimensional no Swiss-model através do método Alphafold (WATERHOUSE et al, 2018).

5 RESULTADOS

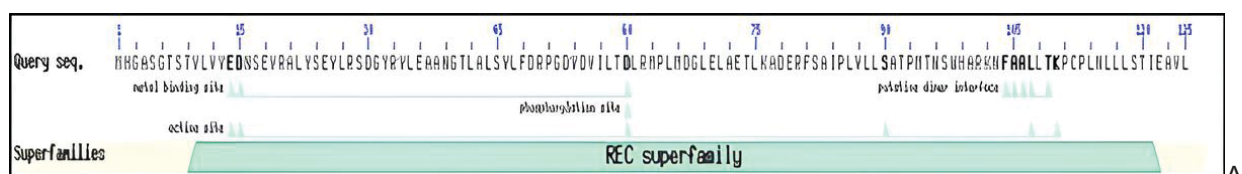
5.1 ANÁLISE *IN SÍLICO* DA PROTEÍNA HSERO_3507

5.1.1 Arquitetura dos domínios da proteína Hsero_3507

A sequência de aminoácidos da proteína Hsero_3507 foi analisada utilizando as ferramentas InterProScan, SMART e CDD. Os resultados do CDD confirmaram a presença de um único domínio REC (FIGURA 3), concluindo que Hsero_3507 é uma proteína de domínio solitário. Análises complementares no InterProScan corroboram esse achado. O InterProScan revelou que a proteína Hsero_3507 pertence à superfamília de reguladores de resposta ao estresse.

A análise da sequência de aminoácidos de Hsero_3507 identificou resíduos ligantes de metal (D15 e D60), que possivelmente se ligam de forma específica ao cálcio. O sítio de fosforilação, um resíduo de aspartato (D60), está localizado em uma região crucial da estrutura primária da proteína, composta por 125 aminoácidos (FIGURA 3). Observou-se uma interface de dimerização na região C-terminal, sugerindo um possível mecanismo de regulação por oligomerização.

FIGURA 3 - DOMÍNIO RECEPTOR DA PROTEÍNA HSERO_3507



A proteína Hsero_3507 é composta por 125 aminoácidos. Na região N-terminal, em destaque estão os resíduos de ácido glutâmico (E) e Aspartato (D) como ligantes de metal. Na posição 60 está o resíduo Aspartato fosforilável e na região C-terminal o sítio de dimerização FAALLTK, formados por Fenilalanina, Alanina, Leucina, Treonina e Lisina.

A análise *in silico* do domínio REC da proteína Hsero_3507 sugere função possivelmente relacionada à resposta ao estresse, segundo análises no banco de dados Interpro. O sítio ativo desta proteína contém um aglomerado de resíduos ácidos conservados, incluindo o ácido aspártico que é o sítio de fosforilação. Nas proteínas de domínio único, resíduos ácidos adicionais são encontrados e posicionam um íon metálico divalente, comumente o Mg^{2+} necessário tanto para a fosfotransferência e hidrólise do grupo fosforil. Nesta análise a estrutura da proteína Hsero_3507 sugere que o Ca^{+} como possível íon metálico ligante.

Estudos demonstraram que o Ca^{2+} citosólico livre aumenta em resposta a diferentes estímulos ambientais, atuando como um transdutor de sinal em condições

como estresse oxidativo em *Bacillus subtilis* (HERBAUD et al, 1998), estresse salino e osmótico em *Anabaena* sp. PCC7120 (TORRECILLA et al, 2001). No presente estudo, foi observado *in silico* presença de resíduos ácidos adicionais na proteína Hsero_3507 e um resíduo de ligação ao cálcio, podendo indicar que possa haver um mecanismo regulatório no qual o Ca^{2+} poderia de alguma maneira está envolvido em auxiliar a função de Hsero_3507.

Informações adicionais sobre a estrutura da proteína Hsero_3507 foram obtidas no ProtParam (GASTEIGER et al, 2005) revelando um índice alifático de 117,04 o que indica que Hsero_3507 possa ser uma proteína termoestável a qual pode ser um importante parâmetro bioquímico durante processos celulares em que ela esteja envolvida.

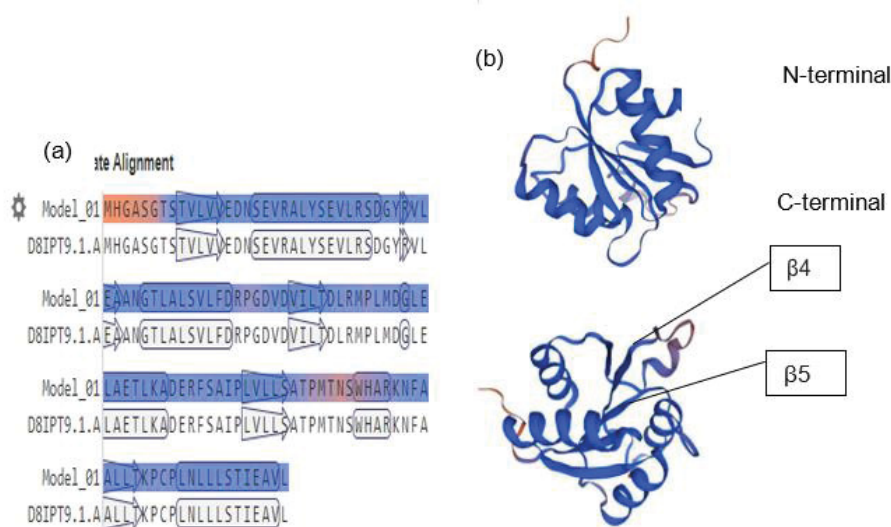
O índice de instabilidade também foi obtido (26,32). Geralmente, uma proteína com um índice de instabilidade superior a 40 é considerada instável (GURUPRASAD et al, 1990). A proteína Hsero_3507 pode ser considerada uma proteína com estabilidade global elevada, com meia vida *in vivo* estimada em média >10 horas comparado a meia vida de proteínas do microrganismo *E.coli*, ao considerar o N-terminal da sequência de aminoácidos com metionina.

5.1.2 Predição da estrutura tridimensional do regulador de resposta Hsero_3507

Com o objetivo de conhecer a estrutura tridimensional da proteína Hsero_3507, foi realizada busca da sequência primária no banco de dados Uniprot (código de acesso: D8IPT9_HERSS) e análise da estrutura tridimensional no Swiss-model pelo método AlphaFold2. Os diedros da espinha dorsal ocuparam 95,93% da área, segundo estatísticas de Ramachadran e conformações improváveis (score 0,81%). A validação do Molprobit 4.4 de qualidade do modelo em nível global e local para proteínas, obteve um score de 0,96. O valor GMQE score de 0,91. A cobertura e identidade obtida para este modelo obteve escore de 100.0 de identidade e 0.60 de similaridade em relação à sequência alvo no método AlphaFold2.

A proteína modelada apresentou estruturas secundárias regulares do tipo hélice- α e folha- β paralelas, contendo cinco folhas β e cinco α hélices, as folhas β 4- β 5 mostraram uma estrutura irregular relatada nas proteínas REC de domínio único, como pode ser observado na FIGURA 4.

FIGURA 4 - PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA DA PROTEÍNA HSERO_3507



Modelo estrutural da proteína Hsero_3507 em estado monomérico. (a) sequência de aminoácidos, os resíduos são coloridos pelo seu valor de qualidade local. (b) as cores indicam o fator de confiança do modelo no servidor Swiss-Model; regiões azuis escuras denota muito alta confiabilidade na análise; azul claro confiabilidade alta; amarelo denota baixa confiabilidade e laranja muito baixa confiabilidade para a região.

5.1.3 Análise *in silico* da sublocalização celular de Hsero_3507

A previsão da sublocalização celular foi realizada no PSORTdb e PSIPRED. Um score elevado foi encontrado (score 9, 26), sugerindo que Hsero_3507 é uma proteína citoplasmática. O resultado condiz com o observado na literatura para os reguladores de resposta em sistemas de dois componentes, em que uma histidina quinase de membrana detecta estímulos externos fosforilando seu regulador de resposta citoplasmático (URAO et al, 2000; HIRAKAWA et al, 2020; LIAO et al, 2021).

5.1.4 Análise *in silico* da interação da Hsero_3507 com proteínas alvo em *H. seropedicae* SmR1

A busca no banco de dados STRING 12.0 (SZKLARCZYK et al, 2023) foi realizada com o objetivo de prever interações com as proteínas de interesse neste estudo, e, estimar possíveis processos celulares em que elas possam estar envolvidas. A TABELA 7, apresenta seis proteínas alvo do regulador de resposta Hsero_3507 com alta pontuação de confiabilidade (>0,700), o que inclui a proteína Hsero_3508 como possível proteína alvo.

TABELA 7 - POSSÍVEIS PROTEÍNAS ALVO DA PROTEÍNA HSERO_3507 EM *H. seropedicae*

ID Genbank	Proteína	Score
ADJ64071.1	Proteína histidina quinase sensora de dois componentes	0,819
ADJ62750.1	Proteína híbrida de histidina quinase com sensor Hpt	0,791
ADJ65990.1	Sensor híbrido de dois componentes histidina quinase/proteína reguladora de resposta	0,746
ADJ65990.1	Proteína histidina quinase de transdução de sinal do sensor	0,717
ADJ65207.1	Proteína hipotética; S -Função desconhecida.	0,716
ADJ64987.1	Proteína histidina quinase sensora de dois componentes	0,702

SmR1

Com base nos resultados obtidos através de buscas de sequências no NCBI e identificação de domínios funcionais utilizando as ferramentas SMART e CDART, foi possível caracterizar *in silico* as possíveis proteínas alvo das proteínas em estudo, de acordo com seus respectivos Scores. A proteína Hsero_2572 (ADJ64071.1), que apresentou o maior escore, caracteriza-se pela presença de um domínio quimiorreceptor combinado com um domínio PAS sensível a oxigênio, sugerindo seu potencial envolvimento em processos celulares associados a mecanismos de redox e quimiotaxia.

No caso da proteína Hsero_1234 (ADJ62750.1), trata-se de uma quinase híbrida portadora de um domínio sensor BarA, reconhecido por sua capacidade de detectar concentrações de acetato durante o metabolismo de compostos acetogênicos, incluindo glicose e ácidos carboxílicos de cadeia curta como o propionato. Adicionalmente, esta proteína apresenta um domínio PAS, conhecido por mediar a percepção de diversos estímulos ambientais e nutricionais, tais como a presença de metabólitos específicos, variações na concentração de gases, intensidade luminosa e flutuações no potencial redox. A proteína Hsero_4524 (ADJ65990.1) é uma histidina quinase sensora relacionada ao transporte de C4-dicarboxilatos através da membrana celular. Esses dicarboxilatos, que atuam como intermediários no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), podem ser utilizados por diversas bactérias como fonte de carbono e energia, tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas (KROM et al, 2003).

A proteína Hsero_3729 (ADJ65207), contém um domínio CACHE, cujo nome deriva de "canais de cálcio e receptores de quimiotaxia". Esse domínio extracelular está associado ao reconhecimento de pequenas moléculas em uma variedade de proteínas, incluindo receptores de quimiotaxia bacteriana. A proteína Hsero_3508 (ADJ64987.1), foi classificada nos COGs (Clusters of Orthologous Groups) como uma proteína

envolvida no transporte e metabolismo de íons inorgânicos (GRILLO-PUERTAS, 2021). Segundo análise das proteínas alvo, a proteína Hsero_3508 pode estar relacionada com o transporte de íons e pequenas moléculas durante processos como quimiotaxia, potencial redox e metabolismo em condições anaeróbicas ou aeróbicas, o que corrobora com os processos relacionados às proteínas da vizinhança gênica do gene *Hsero_3508* que codifica para essa proteína.

5.2 ANÁLISE *IN SILICO* DA PROTEÍNA HSERO_3508

5.2.1 Arquitetura dos domínios sensores da proteína Hsero_3508

A análise estrutural da histidina quinase Hsero_3508, realizada através de buscas nos bancos de dados CDD e InterPro a partir de sua sequência de aminoácidos, revelou a presença de dois domínios sensores principais. Na região N-terminal foi identificado o domínio RbsRD, enquanto na região C-terminal, contendo a histidina fosforilável (H166), encontra-se o domínio BaeS.

O domínio RbsRD está tipicamente associado à regulação do fator sigma B em bactérias Gram-positivas, onde atua na resposta a estresses como alta salinidade, etanol e variações de temperatura (PANÉ-FARRÉ et al, 2005). Embora bactérias gram-negativas não possuam o fator sigma B, a presença deste domínio em Hsero_3508 sugere sua possível participação em mecanismos de resposta a estresses ambientais através de vias alternativas.

O domínio BaeS (FIGURA 5), característico de bactérias gram-negativas, está envolvido na detecção de alterações físico-químicas no ambiente externo, regulando a expressão de genes relacionados a diversos processos celulares, incluindo a resposta ao estresse do envelope celular, transporte de multidroga, biossíntese flagelar, quimiotaxia e detecção de *quorum sensing* (NISHINO et al, 2000). Análises mais detalhadas no CDART e CDD permitiram identificar neste domínio um sítio específico de ligação ao Mg^{2+} (N280) e um domínio HATPase_c (CAI et al, 2017; ZHANG et al, 2017).

A presença do domínio HATPase_c classifica a Hsero_3508 como membro da superfamília GHKL, que agrupa histidinas quinases caracterizadas pela dobra de Bergerat, uma estrutura tridimensional não convencional, evolutivamente conservada nesta superfamília especializada na ligação ao ATP.

A atividade catalítica das Histidinas quinases demonstra dependência do íon Mg^{2+} , embora sua função completa requeira adicionalmente a presença de íons potássio (K^+), que se mostraram indispensáveis para os processos de ligação e hidrólise de nucleotídeos. O sítio de ligação para cátions monovalentes, especificamente adaptado para K^+ , apresenta elevado grau de conservação entre os membros da superfamília GHKL e parece ser crucial para as atividades ATPase e quinase. Paralelamente, na bolsa de ligação ao ATP, a presença de um íon magnésio divalente (Mg^{2+}) também se revela essencial para o pleno funcionamento dessas atividades enzimáticas (DUTTA et al, 2000; HU et al, 2003).



A figura apresenta os 401 aminoácidos da proteína Hsero_3508. Na região N-terminal está o domínio RsbRD_N e na região C-terminal está o domínio BaeS.

A análise estrutural realizada no InterPro revelou que o domínio RsbRD_N está localizado entre os resíduos 9 e 114, enquanto a maior parte da região catalítica da histidina quinase se encontra no terminal C, abrangendo tanto o domínio semelhante a BaeS (resíduos 139-386) quanto o domínio HATPase (resíduos 266-381). Estes resultados sugerem que o domínio BaeS pode exercer um papel funcional mais relevante em Hsero_3508 quando comparado ao RsbRD.

Informações adicionais foram obtidas no ProtParam, classificando Hsero_3508 como uma proteína termoestável (índice alifático de 92, 33) no entanto, menos termoestável que Hsero_3507 (117, 04). O índice de instabilidade foi 31,25, a classificando como uma proteína estável, com meia vida >10 horas, assim como Hsero_3507, considerando a presença do resíduo metionina N-terminal. Essas características podem ser importantes para manutenção de Hsero_3508 em sua localização celular.

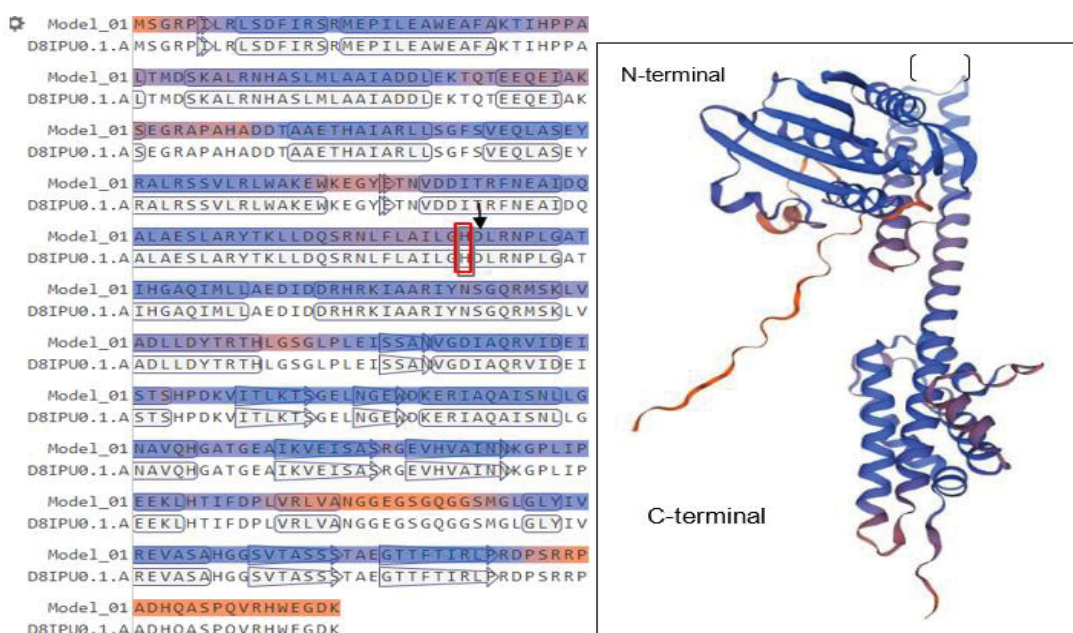
5.2.2 Predição da estrutura tridimensional da proteína sensora Hsero_3508

Objetivando prever a estrutura tridimensional da proteína Hsero_3508 obteve-se o código de acesso Uniprot: D8IPU0_HERSS. A partir dessa entrada, foi modelada a estrutura monomérica. No modelo, diedros da espinha dorsal ocuparam 97,49% da área,

segundo estatísticas de Ramachadran; conformações improváveis obtiveram score de 0,75%. O Molprobit 4.4 avaliou a qualidade do modelo (score de 0,97). O valor GMQE que representou a soma das estimativas de qualidade por resíduo normalizadas pelo comprimento da sequência alvo obteve score de 0,81. A cobertura e identidade obtida para este modelo obteve score de 100.0 de identidade e 0.60 de similaridade em relação à sequência alvo. Segundo esses resultados, o modelo pode ser considerado de elevada confiabilidade.

O modelo da estrutura revelou estruturas secundárias helicoidais (hélices α representadas como espirais e cadeias β representadas como setas. A estrutura possui uma bolsa de ligação do ATP em uma fenda entre os dois domínios presentes. Nesses domínios há cinco folhas β e nove alfa hélices, contendo um núcleo catalítico com um domínio N-terminal menor, principalmente formado de folha β e um domínio C-terminal maior principalmente helicoidal, como pode ser observado na FIGURA 6.

FIGURA 6 - PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA DA PROTEÍNA HSERO_3508



Modelo estrutural da proteína Hsero_3508 em estado monomérico. A vista lateral esquerda retrata a histidina quinase e seus domínios N-terminal e C-terminal rotuladas de acordo com a convenção padrão. As cores indicam o grau de confiança do modelo no servidor SWISS-MODEL; regiões azuis escuras denotam muita alta confiabilidade na análise para aquela região; azul denota alta confiabilidade; verde a vermelho diminui gradualmente a confiabilidade do modelo na região, onde amarelo denota baixa confiabilidade e laranja muito baixa confiabilidade do modelo para a região. As setas indicam a fenda entre os dois domínios onde fica a bolsa de ligação ao ATP. Os parênteses indicam a borda externa da região de ligação ao ATP. A caixa vermelha na sequência de aminoácidos marca a histidina fosforilável e o aspartato imediatamente adjacente, uma característica que diferencia as histidinas clássicas das histidinas atípicas

5.2.3 Análise *in silico* da sublocalização celular de Hsero_3508

As histidinas quinases clássicas são tipicamente proteínas de membrana, embora existam variantes citoplasmáticas solúveis que não apresentam domínios transmembrana (PANÉ-FARRÉ, 2005). No caso da proteína em estudo, a análise preditiva realizada no Psortdb 3.0 indicou a membrana como a sublocalização mais provável, com um escore significativo de 7.88, além de demonstrar correlação com proteínas integrais de membrana. Para validar esses achados, foi empregado o serviço PSIPRED, cujos resultados corroboraram as previsões iniciais, confirmando a previsão do caráter membranar da proteína.

A histidina quinase Hsero_3508 pode ser classificada no terceiro grupo de histidinas quinases, caracterizado pela presença de proteínas de membrana com domínio sensor voltado para a região citoplasmática (BELLINENY-RABELO, 2021). Este

grupo engloba proteínas integrais de membrana que possuem domínios sensores localizados nas regiões N-terminal ou C-terminal citoplasmáticas. Essas proteínas sensoras são especializadas na detecção de solutos citoplasmáticos, estado metabólico ou estágios do ciclo celular. Entre os membros representativos deste grupo destacam-se a proteína osmosensora KdpD, que regula a resposta adaptativa a variações de osmolaridade, e a proteína BaeS, presente em bactérias gram-negativas e envolvida na resposta ao estresse extracitoplasmático e processos de detoxificação (PANÉ-FARRÉ et al, 2005; AKBAR et al, 1997; BURY-MONÉ et al, 2009).

5.2.4 Análise *in silico* da interação da histidina quinase Hsero_3508 com proteínas alvo em *H. seropedicae* SmR1

Para investigar as potenciais interações da histidina quinase Hsero_3508, foi realizada uma análise preditiva utilizando os mesmos parâmetros descritos no item 5.1.3 considerando interações com escore superior a 0,700, como estatisticamente significativas (TABELA 8). A proteína demonstrou maior probabilidade (score 0,860) com a histidina quinase híbrida Hsero_2490 (ADJ63989.1), que contém domínios sensores e reguladores envolvidos na resposta ao estresse ambiental e regulação do ciclo celular. Outras interações relevantes incluíram a proteína Hsero_0547 (ADJ63801.1; score 0,773), um regulador transcricional da superfamília FhlA envolvido no metabolismo de formiato, e a proteína CheY-4 (score 0,770), responsável pela transdução de sinais quimiotáticos.

TABELA 8 - POSSÍVEIS PROTEÍNAS ALVO DA PROTEÍNA HSERO_3508 EM *H. seropedicae* SmR1

ID Genbank	Proteína	Score
ADJ63989.1	Sensor híbrido de dois componentes histidina quinase/proteína reguladora de resposta	0,860
ADJ62066.1	Proteína histidina quinase híbrida multissensor.	0,779
ADJ63801.1	Proteína reguladora de resposta de histidina quinase híbrida com sensor PAS/PAC.	0,773
CheY- 4	Proteína CheY de quimiotaxia.	0,770
lpdA	2-oxoglutarato desidrogenase, componente E3, proteína lipoamida desidrogenase	0,761
YgiX	Proteína reguladora de reguladora de resposta	0,754

ADJ66197.1	Proteína reguladora de resposta de dois componentes.	0,749
ADJ65990.1	Domínios PAS/PAC HisKAATPase_c contendo proteína histidina quinase de transdução de sinal do sensor	0,748
ADJ64872.1	Sistema de dois componentes, família OmpR, regulador de resposta TctD	0,747
ADJ64864.1	Proteína reguladora de resposta de dois componentes	0,746

A análise *in silico* revelou que Hsero_3508 possa estabelecer interações preferenciais com proteínas híbridas. A presença de interações com proteínas híbridas nos dá a hipótese de que Hsero_3508 participa de sistemas de fosfotransferência em cascata, característicos de vias de sinalização bacteriana complexas.

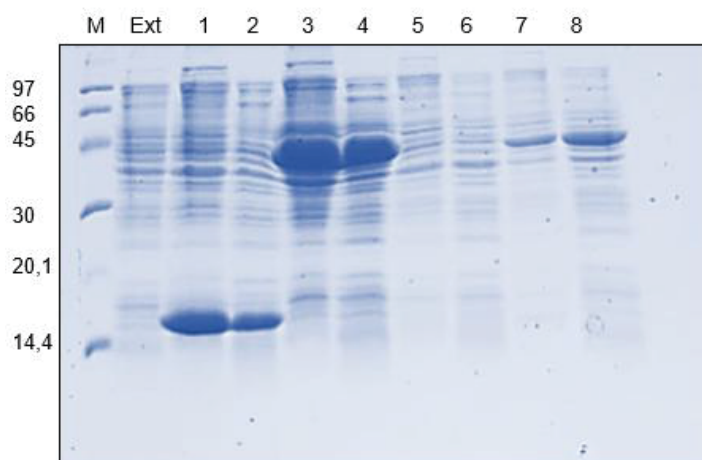
Adicionalmente, foram identificadas interações com componentes metabólicos como a dihidrolipoamida acetiltransferase LpdA (score 0,761), relacionada à produção energética através dos complexos piruvato/2-oxoglutarato desidrogenase, e com reguladores de resposta da família OmpR (Scores 0,747 - 0,749), envolvidos na assimilação de fosfato.

Esses resultados apontam para uma possível participação de Hsero_3508 em uma rede de sinalização complexa para modulação da quimiotaxia, metabolismo energético e homeostase de nutrientes.

5.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS HSERO_3508 E HSERO_3507 EM *E. coli* BL21

A caracterização dos produtos dos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* foi iniciada com experimentos em *E. coli*. A estirpe BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pET28a_Hsero_3507, pET 28a_Hsero_3508 e pT7-7_Hsero_3508, foram crescidas em LB suplementado com os antibióticos adequados, até uma DO₆₀₀ 0,4-0,5 e induzidas com 0,5 mmol/L de IPTG por 3 horas a 37°C sob agitação de 120 rpm. Então essas culturas foram centrifugadas, sonicadas e aplicadas em um gel de SDS-PAGE e corados com Coomassie Blue, como mostra a FIGURA 7. A análise do perfil de expressão dessas proteínas, revelou que ambas se distribuem entre as frações solúvel e insolúvel do lisado celular.

FIGURA 7 - PERFIL DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS HSERO_3507 E HSERO_3508 COM CAUDA DE HISTIDINA E DA PROTEÍNA HSERO_3508 EM SUA FORMA NATIVA EM *E. Coli* BL21.

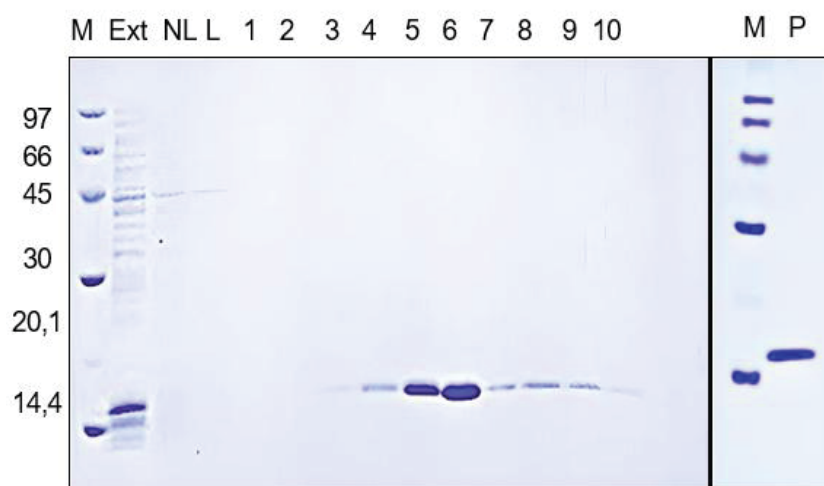


Gel de poliacrilamida SDS-PAGE apresentando a expressão das proteínas Hsero_3507 e Hsero_3508 nativas ou com fusionadas a cauda de histidina. M: Marcador de peso molecular; Ext: extrato bruto (células transformadas com pET28a vazio). 1-2: Frações insolúvel e solúvel de His_Hsero_3507; 3-4: Frações insolúvel e solúvel de His_Hsero_3508; 5-6: Frações insolúvel e solúvel de Hsero_3507 nativa (sem expressão detectável); 7-8: Frações insolúvel e solúvel de Hsero_3508 nativa. Peso molecular: Hsero_3508 (~45 kDa) e Hsero_3507 (~14,4 kDa).

O experimento de expressão da proteína Hsero_3507 em sua forma nativa, foi realizado a partir do vetor pT7-7 (pT7-7_3507) transformado em *E.coli* BL21, no entanto, não foi observada expressão, mesmo após múltiplas tentativas experimentais independentes. Em contraste, as proteínas His-Hsero_3507 e His_Hsero_3508, assim como Hsero_3508 em sua forma nativa, foram expressas com sucesso e posteriormente purificadas para ensaios de co-precipitação.

A FIGURA 8, apresenta as frações do eluato de His-Hsero_3507 após cromatografia de afinidade a níquel, destacando um maior enriquecimento proteico das frações correspondentes aos picos 5 e 6 do gradiente de imidazol. Essas frações foram submetidas a um processo de Desalting para remoção de sais, imidazol e outras moléculas de baixo peso molecular. Após purificação e quantificação pelo método de Bradford, obteve-se 10 mL de proteína purificada em diferentes experimentos, com uma concentração média de 0,4 µg/µL.

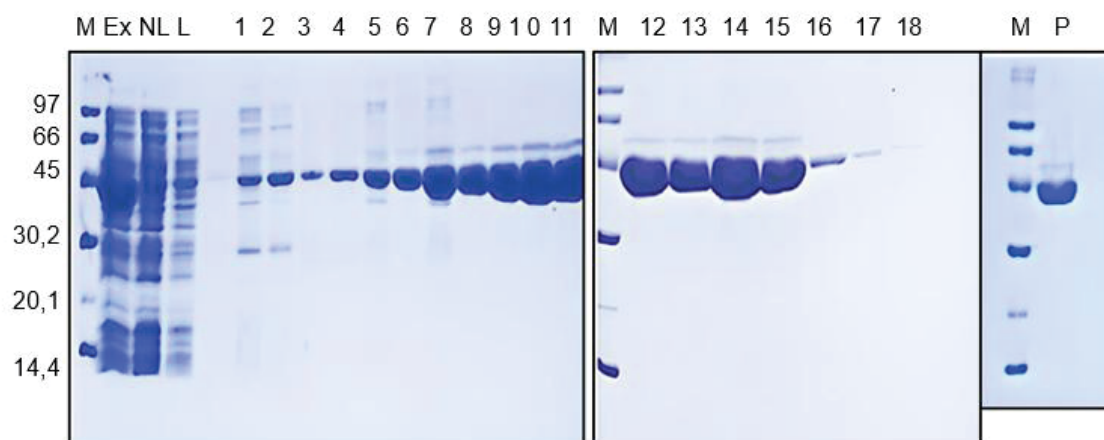
FIGURA 8 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HSERO_3507 COM CAUDA DE HISTIDINA, POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR NÍQUEL.



Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5%. Purificação da proteína His_Hsero_3507 (~14,4 kDa). Extração solúvel após centrifugação do lisado; NL: fração não ligada; L: fração de lavagem. Linhas 3 a 10 picos de eluição da proteína His-Hsero_3507 em gradiente crescente de imidazol (25 a 500 mmol/L).

A FIGURA 9, apresenta o perfil eletroforético da purificação da proteína His-Hsero_3508 por cromatografia de afinidade a níquel. As frações correspondentes aos picos de eluição (linhas 4 a 15) foram agrupadas e submetidas a um passo de *Desalting* para remoção de impurezas. O processo iniciou-se com 300 mL de cultura bacteriana, dos quais se obteve um extrato bruto utilizado para a purificação. Após quantificação por espectrofotometria, verificou-se um rendimento final de aproximadamente 10 mL de proteína purificada em cada experimento independente, com concentração média de 1 µg/µL. Esses resultados demonstram a eficiência e reprodutibilidade do protocolo estabelecido para purificação das proteínas fusionadas à cauda de histidina, garantindo rendimentos adequados para análises posteriores.

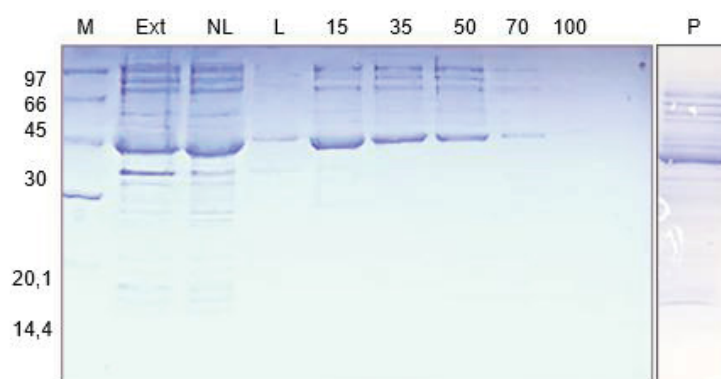
FIGURA 9 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HIS_HSERO_3508 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR NÍQUEL.



Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) de frações resultantes da purificação da proteína His_Hsero_3508, corados com azul brilhante de coomassie. Ext- fração solúvel do extrato bruto após lisado e centrifugado; NL- fração não ligada; L- fração de lavagem. Linhas 1 a 18- picos de eluição da proteína His-Hsero_3508 em gradiente crescente de imidazol (25 a 500 mmol/L). A seta na cor preta indica a banda correspondente a proteína His-Hsero_3508 (45 kDa).

Com o objetivo de verificar a ligação da proteína Hsero_3508 em sua forma nativa às resinas comumente usadas em coluna cromatográfica de troca iônica para obter a proteína purificada, foram testadas as resinas DEAE, Q, Heparina, SP e CM Sepharose Fast Flow (GE HealthCare). Observou-se nos testes maior ligação da proteína alvo às resinas Q e DEAE. Entretanto, após purificação em coluna cromatográfica HiTrap® Q ou DEAE, o rendimento final obtido se apresentou reduzido, observando-se grande parte da proteína presente na fração não ligada (NL). Nesse sentido, foram realizados diferentes ensaios de purificação com resina em tubo. A purificação em tubos com as resinas Q e DEAE ocorreu utilizando maior volume de extrato proteico solúvel (5 mL). A FIGURA 10 mostra a obtenção da proteína Hsero_3508 nativa semi-purificada.

FIGURA 10. PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HSERO_3508 NATIVA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA



Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) das frações resultantes da purificação da proteína Hsero_3508 nativa por troca iônica com resina Q Sepharose Fast Flow. Coloração azul brilhante de coomassie. Ext- fração solúvel do extrato bruto após lisado e centrifugado; NL- fração não ligada; L1 e L2- frações de lavagem. Linhas 4-10: picos de eluição da proteína Hsero_3508 nativa. Eluição com tampão B contendo KCl 1M (Tris HCL 50 mM, KCl 1M, pH 8.0)

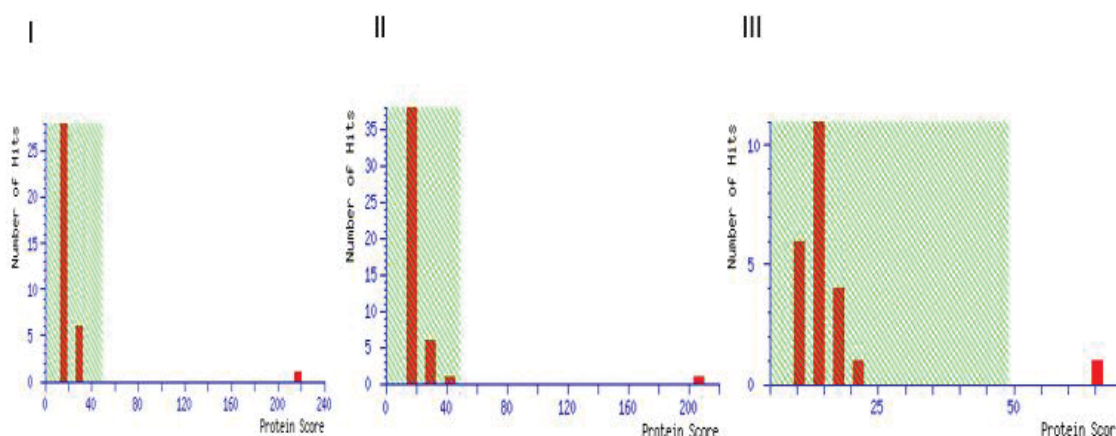
5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS HSERO_3508 E HSERO_3507 COM CAUDA DE HISTIDINA E HSERO_3508 NATIVA POR MALDI-TOF/MS

Após a expressão das proteínas e obtenção das proteínas purificadas, as amostras foram submetidas a análise por espectrometria de massas, com objetivo de confirmar se as proteínas purificadas estavam corretas quanto à sua identificação. Foram submetidas à análise as proteínas Hsero_3508, Hsero_3507 com cauda de histidina e a proteína purificada Hsero_3508 nativa. Para que o objetivo fosse alcançado, as proteínas de interesse foram tripsinizadas e em seguida, foi realizada a adição de matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinamico). A análise por espectrometria de massas foi realizada no aparelho MALDI-TOF Autoflex II (BrukerDaltonics, Bremen Germany). Todas as etapas seguiram de acordo com o descrito no tópico 4.17.

Para comparar os espectros de massa obtidos experimentalmente com bancos de dados de espectros de massa teóricos, foi utilizado o software MASCOT a partir do banco de dados de *H. seropedicae* SmR1. A calibração externa foi realizada considerando uma janela de erro de 200 ppm, oxidação (M) massa monoisotópica, score (20) número de consultas (22) estado de carga (1+) máximo de clivagens perdidas aceitas (1) e busca por impressão digital de massa de peptídeos. A FIGURA 11, é um histograma das pontuações das dez principais correspondências. A análise conclui que

as proteínas identificadas são as proteínas de interesse neste estudo. Os scores maiores que 20 demonstram elevada possibilidade de acerto.

FIGURA 11 - COBERTURA DE SEQUÊNCIA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

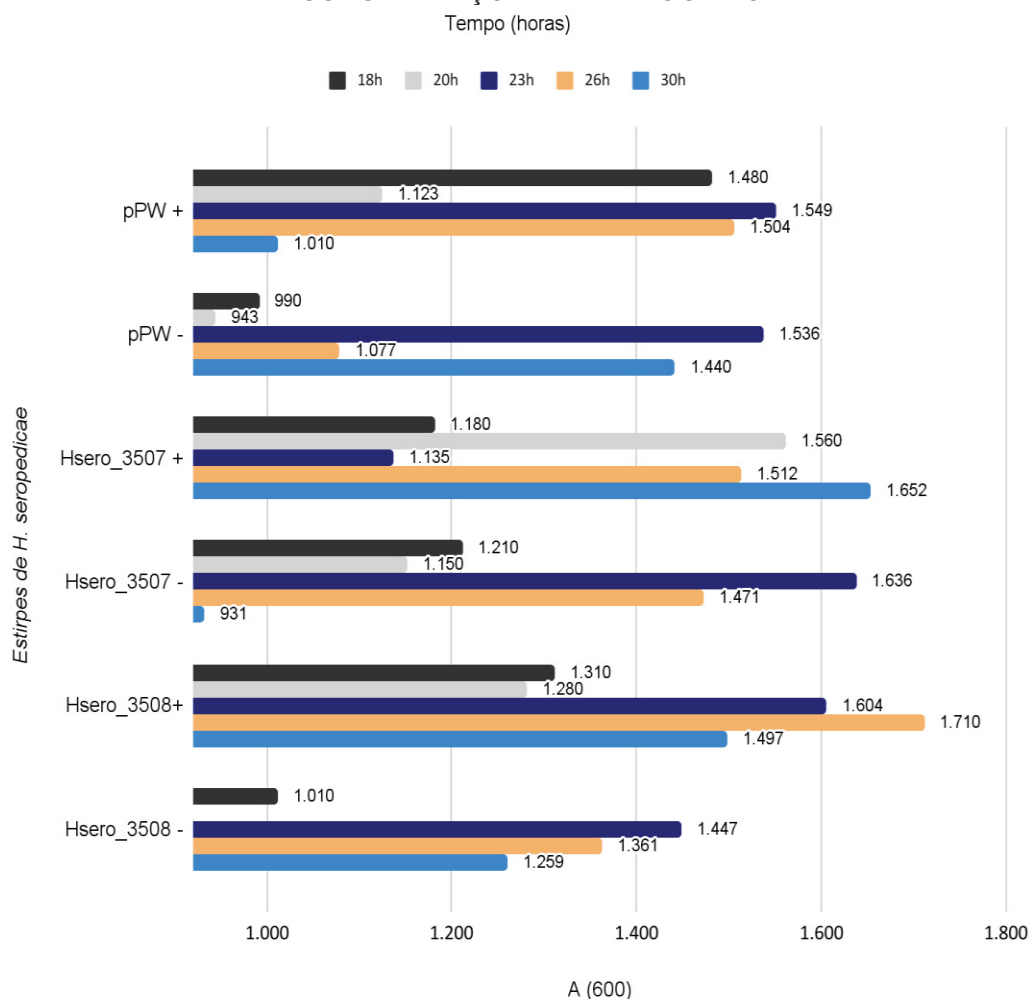


As regiões sombreadas em verde no histograma indicam correspondências aleatórias e sem significado. A barra fora da região sombreada indica correspondências com significância estatística, ultrapassam o limiar de pontuação baseado em probabilidade. (a) Identificação da proteína Hsero_3508 nativa, score 217 (b) Identificação da proteína His-Hsero_3508, score 207 (c) Identificação da proteína Hsero_3507, score 65.

5.5 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO DOS GENES *Hsero_3507* E *Hsero_3508* DE *H. Seropedicae* SmR1

A determinação das condições de expressão dos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* de *H. seropedicae* SmR1 foi realizada através da detecção da atividade de β -galactosidase e foram conduzidos conforme Miller (1992). Como controle negativo, utilizou-se a estirpe SmR1 contendo somente o vetor pPW452, como controle positivo foi utilizada a estirpe *SmR1:LacZ*. As estirpes foram crescidas em diferentes concentrações de nitrogênio (4 mmol/L e 20 mmol/L). Nestas condições, foram realizadas curvas de crescimento de 0 a 30 horas (FIGURA 12) e a cada tempo realizada a determinação da atividade da enzima β -galactosidase, de acordo o descrito no tópico 4.20. A análise dos dados de densidade óptica (DO_{600}) ao longo do tempo revela padrões de crescimento bacteriano que refletem a capacidade das linhagens de *H. seropedicae* em responder às condições de disponibilidade de nitrogênio.

FIGURA 12 - CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE *H. SEROPEDICAE* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO



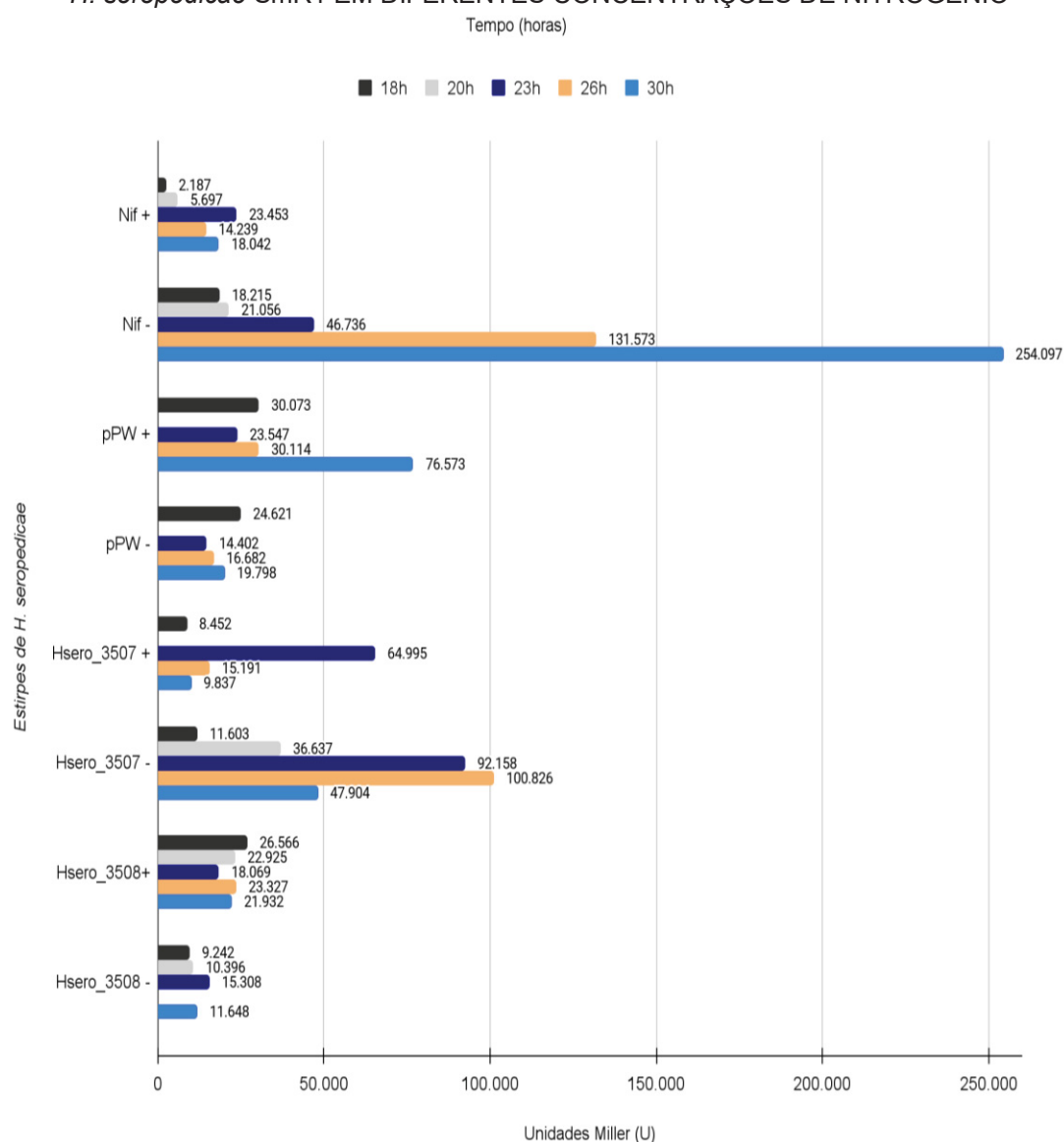
Crescimento bacteriano em diferentes concentrações de nitrogênio. Valores de densidade óptica ($D.O_{600}$) ao longo do tempo (18–30 horas) para estirpes de *H. seropedicae* em meio NFb-Malato com N+ (20 mmol/L) ou N- (4 mmol/L). pPW: estirpe *pPW452* (Controle negativo). Hsero_3507: estirpe *pPW_Hsero_3507*. Hsero_3508: estirpe *pPW_Hsero_3508*. A (600): medidas da absorbância a 600 nanômetros. Células vazias indicam medições não realizadas.

A atividade da enzima β -galactosidase foi avaliada por 18, 20, 23, 26 e 30 horas verificando-se a ativação das regiões promotoras dos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508*, como observado na FIGURA 13. O nível de expressão do promotor do gene *Hsero_3507* apresentou aumento contínuo após 20 horas de cultivo em baixas concentrações de nitrogênio e expressão similar ao controle negativo em altas concentrações de nitrogênio. Foram realizados os mesmos experimentos com elevadas concentrações de nitrogênio (20 mmol/L) também com *pPW_Hsero_3508*, no entanto a expressão ao longo de 30 horas foi similar ao controle negativo.

Considerando a atividade β -galactosidase de *pPW_Hsero_3507*, como apresentado na FIGURA 13, pode-se observar maior expressão a partir de 20 horas de

cultivo na condição N- (4 mmol/L), isto é um indício que esta possa ser a condição de expressão desse promotor em *H. seropedicae* SmR1. Estes resultados sugerem que a expressão do promotor do gene *Hsero_3507* em *H. seropedicae* SmR1 é dependente da concentração de nitrogênio no meio de cultivo, sendo induzida em condições de limitação de nitrogênio (N-, 4 mmol/L), com um pico de atividade da β -galactosidase após 26 horas.

FIGURA 13 - ENSAIO DE ATIVIDADE DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* SmR1 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO



Atividade de β -galactosidase das estirpes SmR1: NifH (fusão cromossomal), pPW452, pPW_Hsero_3507 e pPW_Hsero_3508. (-) indica presença de 4 mmol/L de amônio e (+) 20 mmol/L de amônio no cultivo em aerobiose. Dados representam médias de três repetições biológicas. Células vazias indicam medições não realizadas.

5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA NITROGENASE DAS ESTIRPES *Hsero_3507Tn* e *Hsero_3508Tn* E SELVAGEM DE *H. seropedicae* SmR1

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo bioquímico essencial no qual o gás dinitrogênio (N_2) da atmosfera é convertido em amônio (NH_4^+) pela ação do complexo enzimático da nitrogenase. Esse mecanismo desempenha um papel fundamental no ciclo do nitrogênio, garantindo a disponibilidade desse elemento crucial para os ecossistemas (LARA-CABEZAS et al, 2007). Além de sua importância ecológica, a FBN tem grande relevância econômica, uma vez que o nitrogênio é um dos nutrientes mais limitantes para a produção agrícola (REETZ et al, 2016). Neste contexto, considerando a importância do microrganismo *H. seropedicae*, realizamos o ensaio de determinação da atividade da enzima nitrogenase, para determinar se a ausência dos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* alteram FBN nessa bactéria. Foram utilizadas as estirpes *Hsero_3507Tn* e *Hsero_3508Tn* nessa análise, uma vez que os genes foram interrompidos pela inserção de transposon. A atividade de nitrogenase foi determinada em culturas crescidas em meio NFbHP semissólido suplementado com glutamato (0,5 mmol/L). Foram realizados três experimentos independentes.

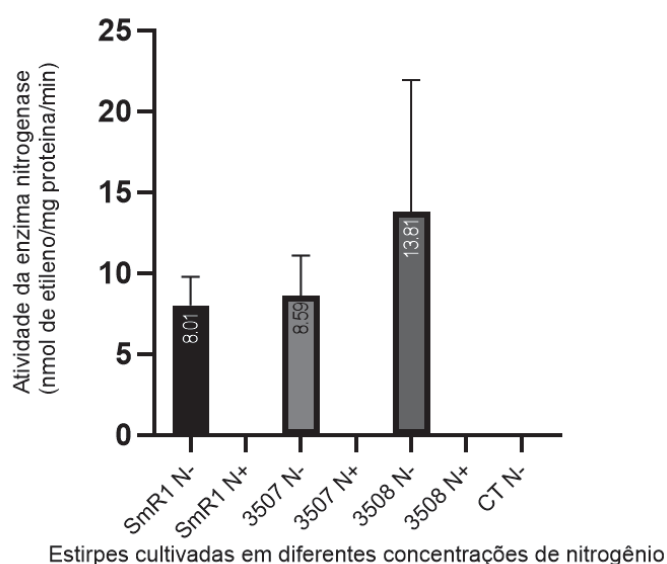
As concentrações de etileno formado a partir de acetileno, foram determinadas utilizando um cromatógrafo gasoso, conforme descrito por KLASSEN (1997). A atividade específica de nitrogenase foi expressa em nmoles de etileno formado por mg de proteína total na cultura por minuto (FIGURA 14). Para análise estatística foi realizado teste *T* não pareado com correção de Welch, utilizado para comparar as médias da atividade nitrogenase, entre estirpe selvagem e estirpes *Hsero_3507Tn* ou *Hsero_3508Tn*, em diferentes concentrações de nitrogênio.

A estirpe selvagem SmR1 apresentou atividade elevada sob condição N^- (8,01 nmol de etileno/mg de proteína/min), como esperado, já que a limitação de nitrogênio induz a atividade da nitrogenase. Sob condição N^+ , no entanto, a atividade foi praticamente nula (0,01), indicando repressão da enzima na presença de alto nitrogênio fixado. A estirpe *Hsero_3507Tn* exibiu comportamento semelhante ao da estirpe selvagem, com atividade alta na condição N^- (8,59) e inibida na condição N^+ (0,01) conforme pode ser visualizado na FIGURA 14, sugerindo que essa mutação não comprometeu o controle da expressão da nitrogenase. Por outro lado, *Hsero_3508Tn* apresentou a maior atividade observada no experimento sob condição N^- (13,81), apesar

disso, não há diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$). O controle negativo (meio sem inoculação) apresentou atividade residual mínima (0,06), atribuída ao ruído experimental. Os resultados indicaram que a atividade da nitrogenase em *H. seropedicae* é fortemente reprimida pela presença de nitrogênio (N^+) ($p < 0.001$) como descrito na literatura (KLASSEN et al, 1997).

Casilha (2018) concluiu que a estirpe mutante 3508Tn possui maior motilidade em ensaios de motilidade em meio semissólido em (N^+) do que a estirpe selvagem SmR1, principalmente em condição de alto nitrogênio, sugerindo a possibilidade do gene *Hsero_3508* participar do sensoriamento de íons amônio, porém sem se relacionar com o complexo da nitrogenase. Os resultados do ensaio de nitrogenase no presente trabalho, confirmam a hipótese de Casilha (2018) de que não há relação desses genes com o complexo da nitrogenase, uma vez que a ausência dos genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* não afetou a capacidade de fixação de N_2 nas condições testadas ($p > 0.05$) demonstrando que nessas condições esses genes não são essenciais para a fixação biológica do nitrogênio desse microrganismo.

FIGURA 14 - ATIVIDADE DA ENZIMA NITROGENASE EM *H. seropedicae* SmR1 E ESTIRPES *HSERO_3507TN* E *HSERO_3508TN* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE NITROGÊNIO



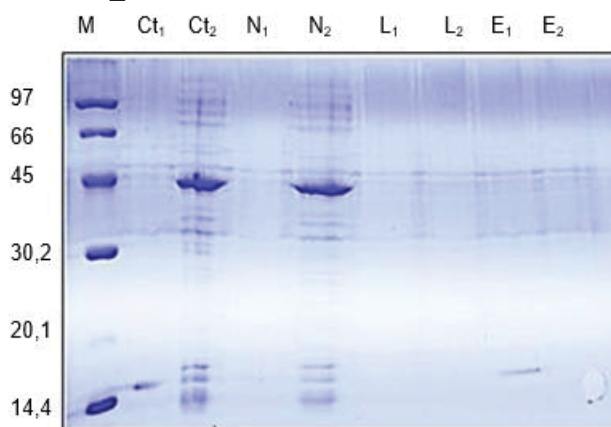
Atividade da nitrogenase em estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* cultivadas em diferentes fontes de nitrogênio (N^+ , 20 mmol/L) e (N^- , glutamato 0,5 mmol/L). A enzima é ativa apenas sob condição N^- . A estirpe *Hsero_3508Tn* em N^- , apresentou a maior atividade, enquanto manteve baixa atividade na presença de nitrogênio (N^+). CT N^- : controle negativo. Dados representam médias de três repetições biológicas.

5.7 ENSAIO DE CO-PRECIPITAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS HIS-HSERO_3507 E HSERO_3508 NATIVA

5.7.1 Teste proteína-ligante entre as proteínas His_Hsero_3507 e Hsero_3508 nativa e o ligante MagneHis-Ni

Antes de proceder com os ensaios de co-precipitação entre a proteína His-Hsero_3507 (com cauda de histidina) e a Hsero_3508 nativa, realizamos um ensaio controle de afinidade entre a Hsero_3508 nativa e as *beads* MagneHis-Ni (FIGURA 15). Esse teste foi importante para verificar se a proteína nativa apresentava ligação inespecífica à matriz de níquel, o que poderia interferir nos resultados. Como esperado, a Hsero_3508 nativa não se ligou às *beads*, confirmando a ausência de interações não específicas com a resina. Para validar esse resultado, esse ensaio foi realizado também com His-Hsero_3507 (controle positivo) e a Hsero_3508 nativa nas mesmas condições. Apenas a His-Hsero_3507 foi retida pelas *beads* de níquel, enquanto a Hsero_3508 nativa não apresentou ligação detectável.

FIGURA 15 - TESTE DE AFINIDADE PROTEÍNA-LIGANTE ENTRE AS PROTEÍNAS HIS-HSERO_3507 E HSERO_3508 NATIVA AO LIGANTE MAGNEHIS-NI.



M- Marcador de peso molecular. (a) Ct₁- His-Hsero_3507 sem adição de MagneHis-Ni. Ct₂- Hsero_3508 nativa sem adição de MagneHis-Ni. N₁- Fração não ligada de His-Hsero_3507 à MagneHis-Ni; N₂- Fração não ligada Hsero_3508 à MagneHis-Ni. L₁- Fração de lavagem His_Hsero_3507 (Imidazo 50 mmol/LI). L₂- Fração de lavagem Hsero_3508 nativa (50 mM de imidazol). E₁- Eluato de His_Hsero_3507 (Imidazol 500 mmol/L). E₂- Eluato de Hsero_3508 (Imidazol 1 mol/L).

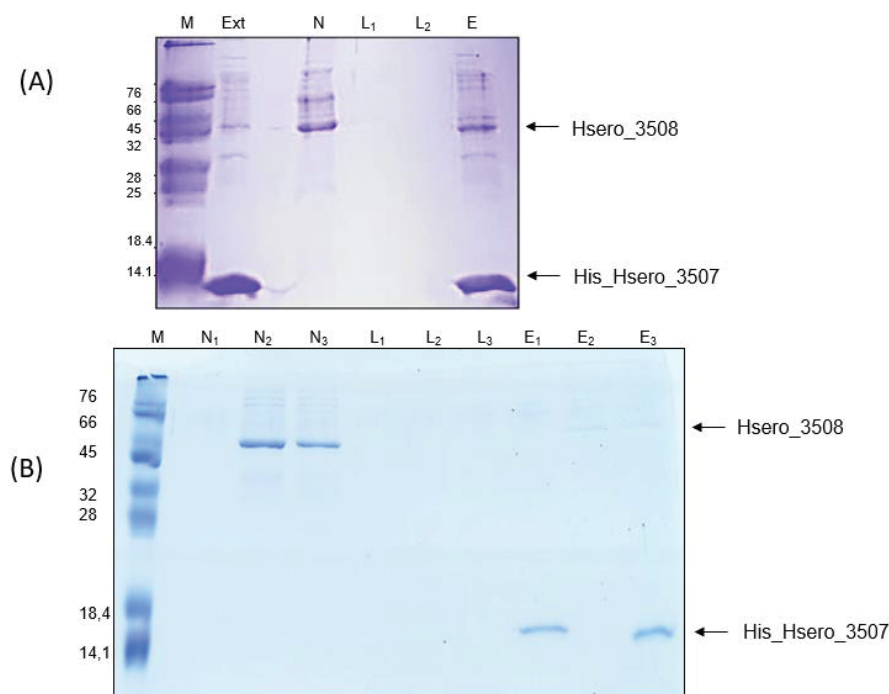
5.7.2 Ensaio de co-precipitação entre as proteínas His-Hsero_3507 e Hsero_3508

Os ensaios de co-precipitação foram realizados de acordo com o item 4.16, objetivando verificar a interação entre a proteína histidina quinase Hsero_3508 e a sua possível reguladora de resposta Hsero_3507 em um sistema de dois componentes.

No gel A, FIGURA 16, observa-se a presença de uma banda compatível com a massa molecular de His_Hsero_3507 (~14 kDa) na fração eluída (E), confirmando a purificação da proteína marcada com histidina por afinidade. Além disso, uma banda adicional com massa estimada em ~45 kDa, correspondente à proteína Hsero_3508 (não marcada), também é visível no eluato, apesar de não possuir cauda His. A mesma banda de ~45 kDa está ausente nos controles e frações não ligadas, mas co-elui com a proteína His_Hsero_3507. Esses dados sugerem que Hsero_3508 foi co-purificada com His_Hsero_3507, o que pode indicar uma interação fraca entre essas duas proteínas nas condições do ensaio. Isso é compatível com o modelo funcional de sistemas de dois componentes, nos quais uma histidina quinase interage fisicamente com sua reguladora de resposta.

No gel B, FIGURA 16, foram realizados dois controles (N1 e N3). N1 apresenta a fração não ligada de His_Hsero_3507 individualmente submetida ao contato com as *beads* magnéticas, enquanto N3 Apresenta a fração não ligada de Hsero_3508 individualmente submetida ao contato com as *beads*. N2 apresenta a fração não ligada de His_Hsero_3507 e Hsero_3508, ambas em contato com as *beads*. Os eluatos sugerem uma interação inespecífica entre Hsero_3508 e as *beads magnéticas*. Isso pode ser explicado pela adição de além dos co-fatores ATP 1 mmol/L e MgCl₂ 5 mmol/L. Neste ensaio para viabilizar a fosforilação da proteína, foi adicionado acetil fosfato 10 mmol/L. Diante disso, a interação inespecífica observada no Eluato 2 (E2), pode ser devido a alteração da carga superficial de proteínas causadas pelo acetil fosfato que pode ter aumentado a afinidade com as *beads*. Além disso, a proteína fosforilada muda de conformação, o que pode ter exposto regiões hidrofóbicas ou novas superfícies que aderem inespecificamente às *beads* (mesmo sem interação específica com a proteína-alvo). Apesar do observado, o resultado do SDS-PAGE não é suficiente para demonstrar definitivamente uma interação específica (uma vez que a co-purificação pode ocorrer por interações não específicas ou agregação), no entanto, a presença das duas proteínas na mesma fração do eluato, em ambos os experimentos representativos indica que possa ter ocorrido interação entre elas as duas proteínas alvo, mesmo que de forma transitória.

FIGURA 16 - ENSAIO DE CO-PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS HIS_3507 E HSERO_3508



(A) Gel corado com Coomassie mostrando a co-precipitação das proteínas His_3507 e Hsero_3508. A proteína His_Hsero_3507 aparece em ~14 kDa e Hsero_3508 em ~45 kDa. Ext: extrato celular; N: fração não ligada; L₁- L₂: lavagens; E: eluato. (B) N1: Fração não ligada de His_Hsero_357; N2-N3: Fração não ligada de Hsero_3408 nativa; L1-L3: Lavagens; E1: His_Hsero_3507; E2: Eluato Hsero_3508; E3: Eluato His_Hsero_3507 e Hsero_3508 nativa.

5.8 INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA HSERO_3507 E PROTEÍNAS ALVO NO EXTRATO DE *H. seropedicae* SmR1

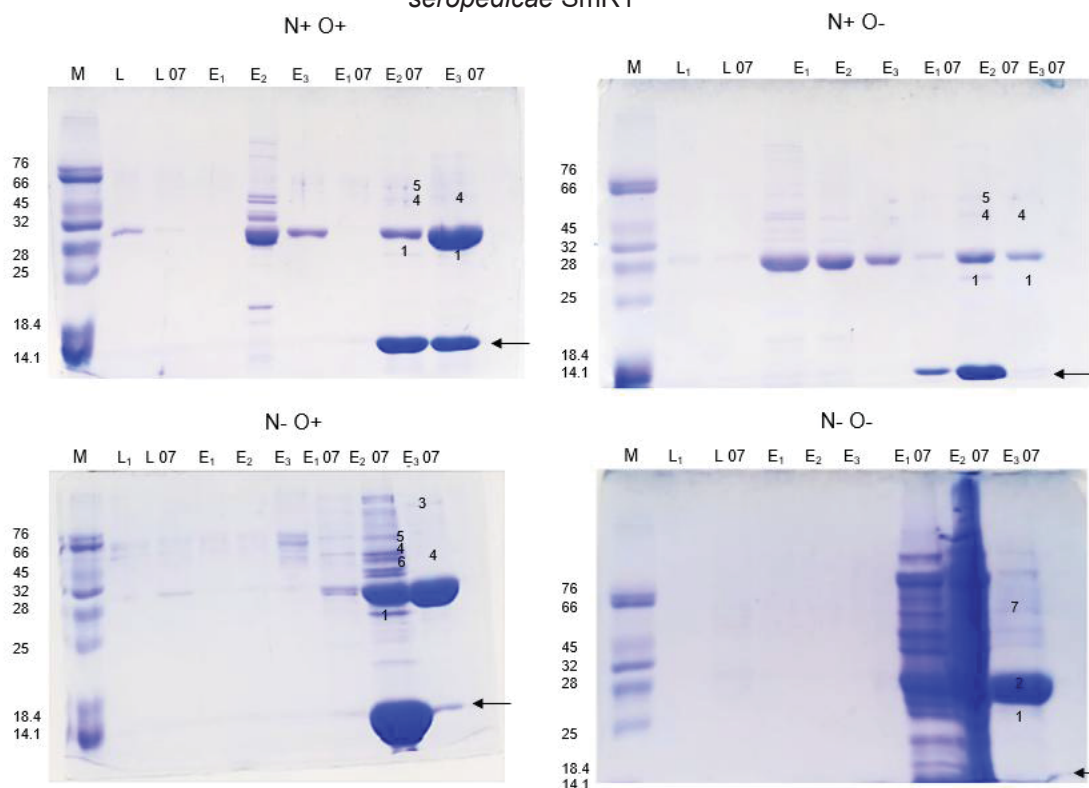
Com objetivo de conhecer as proteínas alvo da proteína Hsero_3507 foi realizado um ensaio de interação por meio de cromatografia de afinidade. Nesse ensaio, foi utilizada a proteína His_Hsero_3507 purificada e o extrato do microrganismo *H. seropedicae* SmR1 para a co-purificação. A identificação das interações entre as proteínas co-purificadas foi realizada por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF, conforme descrito no item 4.17. Foi revelado um conjunto diversificado de parceiros potenciais de interação nas condições fisiológicas distintas: N+/O+, N-/O+ e N+/O- e N-/O-, conforme apresentado na TABELA 9 e FIGURA 14. Durante este ensaio foram identificadas 10 proteínas que interagem com a proteína His_Hsero_3507, destas, a proteína CheZ, uma fosfatase envolvida na regulação da quimiotaxia bacteriana, foi detectada de forma recorrente em todas as condições testadas, sugerindo uma

associação funcional com Hsero_3507. Essa interação recorrente é particularmente relevante considerando que Hsero_3507 é uma reguladora de resposta de domínio único, ou seja, composta apenas pelo domínio REC, sem domínio efetor associado. As demais proteínas apresentaram padrões de expressão dependentes do estado nutricional (N+ ou N-) e de oxigenação (O+ ou O-). Esse tipo de RR não atua diretamente na transcrição gênica, como fazem os reguladores canônicos, mas exerce sua função principalmente por meio de interações proteína-proteína, servindo como intermediário de sinalização ou modulador de atividade de proteínas parceiras.

A detecção de outras proteínas co-purificadas, como a dGTPase (relacionada ao metabolismo de nucleotídeos), transportadores de membrana (porina e transportador ABC de nitrato), proteínas envolvidas com quimiotaxia e regulação da tradução (HisS), reforça essa hipótese (FIGURA 17). Esses parceiros potenciais apontam para uma possível função de Hsero_3507 como modulador de processos celulares por meio de interação direta, sem a necessidade de regulação transcricional. Esse padrão é compatível com mecanismos alternativos observados em outros sistemas bacterianos como spo0F de *Bacillus subtilis*, em que o regulador de resposta de domínio único funciona como “encaminhadores de dados” ou “trampolim” molecular ativados por fosforilação, alterando a conformação e afinidade por alvos proteicos específicos.

A presença de UreE (proteína acessória da urease) e de uma proteína de estresse geral (detectada com massa molecular alterada) sob condições de nitrogênio limitado ou estresse, respectivamente, pode refletir a capacidade de Hsero_3507 de atuar como um sensor integrador do ambiente celular, modulando a atividade de proteínas em diferentes contextos fisiológicos. Assim, mesmo na ausência de um domínio de saída clássico, Hsero_3507 pode desempenhar um papel regulador importante na fisiologia de *H. seropedicae*, possivelmente coordenando respostas a estímulos externos por meio de um mecanismo exclusivamente pós-traducional e baseado em interação direta. Embora interações inespecíficas não possam ser totalmente descartadas, principalmente em função do uso de ATP/ADP nos tampões e da complexidade do extrato celular, o uso de coluna controle (sem proteína His) e a recorrência de interações específicas fornecem suporte à relevância biológica dessas associações.

FIGURA 17 - ENSAIO DE INTERAÇÃO DA PROTEÍNA HIS_HSERO_3507 E PROTEÍNAS ALVO EM *H. seropedicae* SmR1



Eletróforese SDS-PAGE apresentando padrão de interação da proteína His-Hsero_3507 com proteínas de *H. seropedicae* SmR1 em quatro condições fisiológicas distintas: N+O+ (20 mmol/L NH_4^+ , aeróbico), N+O- (20 mmol/L NH_4^+ , baixo oxigênio), N-O+ (4 mmol/L NH_4^+ , aeróbico) e N-O- (4 mmol/L NH_4^+ , baixo oxigênio). M: Massa molecular; L: Fração de lavagem do controle; L07: Fração de lavagem da proteína Hsero_3507; E₁ e E₂: Eluatos; E₁₀₇ e E₂₀₇: Eluatos do ensaio com a proteína Hsero_3507. A numeração correspondente às proteínas mais observadas nas condições testadas: 1- CheZ (27,8 kDa; fosfatase de quimiotaxia). 2- ADH (41 kDa; álcool desidrogenase). 3- proteína de estresse geral (127,7 kDa), 4- dGTPase (45,4 kDa), 5- HisS-histidinil-tRNA transferase (51,7 kDa), 6- transportador ABC de nitrato (46,8 kDa), 7- proteína FixC. A análise de identificação foi realizada por espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS). Marcadores de peso molecular (kDa) são indicados à esquerda; a seta indica a proteína His_Hsero_3507.

TABELA 9 - PROTEÍNAS DIFERENCIAIS IDENTIFICADAS DURANTE A INTERAÇÃO DE HIS-HSERO_3507 E EXTRATO DE *H. seropedicae* SmR1 ANALISADAS POR MALDI-TOF

Proteína	*MMT(KDa	**MMC (KDa- Gel)	Score
Condição N+ O+			
CheZ fosfatase de quimiotaxia	26,5	27,78	28
dGT desoxiguanosina trifosfato trifosfohidrolase(dGTPase)	43.8	45,39	98
Condição N - O+			
UreE proteína acessória urease	19,5	20,98	54
Desoxiguanosinatrifosfato trifosfohidrolase (dGTPase)	43.8	45,39	98

Proteína da membrana externa (porina)	39,3	40,39	101
CheZ fosfatase de quimiotaxia	26,5	27,78	28
Proteína de stress geral	71.2	127,66	23
HisS Histidinil tRnA transferase	50,4	51,67	87
Condição N+ O-			
CheZ fosfatase de quimiotaxia	26,5	27,78	28
Transportador de nitrato tipo ABC	45.3	46,78	26
Proteína transmembrana de quimiotaxia aceptora de metil	58.3	60,00	27
Condição N- O-			
Flavoproteína FixC	47.9	49.01	36
Álcool desidrogenase	39,7	41	135

*Massa molecular teórica

**Massa Molecular Calculada foi obtida a partir do gel por equação da reta, utilizando os padrões de migração dos marcadores de massa molecular

6 DISCUSSÃO

A análise estrutural das proteínas *in silico* Hsero_3507 e Hsero_3508, mostrou características moleculares que ajudaram a compreender a função dos produtos desses genes em *H. seropedicae* SmR1. Conforme demonstrado na FIGURA 3, a proteína Hsero_3507 apresenta um domínio REC solitário com resíduos conservados para fosforilação (D60) e ligação de íons metálicos (D15) que possivelmente ligam de forma específica o cálcio, mas não possui domínios efetores. Esta arquitetura é consistente com a classificação proposta por Gao e Stock (2009) para reguladores de resposta de domínio único, que atuam predominantemente através de interações proteína-proteína.

Os dados do ProtParam indicaram que Hsero_3507 possui um índice alifático de 117,04 e índice de instabilidade de 26,32, características que sugerem uma proteína estável e possivelmente termorresistente. Essas propriedades físico-químicas são relevantes considerando o ambiente variável da rizosfera onde *H. seropedicae* coloniza plantas. A previsão de localização citoplasmática (PSORTdb) corrobora com o papel proposto para esta proteína como intermediária em vias de sinalização intracelular. Já o produto do gene *Hsero_3508* apresenta uma organização modular típica de histidinas quinases sensoras, com domínios BaeS e RbsRD na região N-terminal e o domínio catalítico HATPase_c na região C-terminal (FIGURA 5). A presença do motivo conservado H166 no domínio HisKA sugere o sítio de autofosforilação, enquanto os resíduos N280 no domínio HATPase_c indicam um possível sítio de ligação para Mg^{2+} que pode ser essencial para a atividade quinase. Essas características estruturais são consistentes com a hipótese que Hsero_3508 possui a função de sensor ambiental.

Embora as análises *in silico* (TABELA 7) prevejam uma interação com score de 0,819 para interação entre Hsero_3507 e Hsero_3508, os ensaios de co-precipitação (FIGURA 13, A e B) não detectaram uma interação estável, sugerindo uma interação fraca e transitória entre as proteínas purificadas. Esta discrepância pode ser explicada por vários fatores entre eles, o observado por Trajtenberg et al. (2014), em que muitas histidinas quinases requerem condições específicas para interagir com seus reguladores cognatos, incluindo a presença de ligantes ou modificações pós-traducionais. O fato de Hsero_3508 possuir domínios sensores (BaeS e RbsRD) sugere que sua conformação ativa pode depender de estímulos ambientais não presentes nos ensaios *in vitro*. A análise por MALDI-TOF/MS (FIGURA 8) confirmou a identidade das proteínas His_Hsero_3507, His_Hsero_3508 e Hsero_3508 nativa purificadas, mas não descarta

possíveis problemas de dobramento ou modificações pós-traducionais ausentes no sistema heterólogo de expressão em *E. coli*.

Os estudos de expressão gênica (descritos na seção 4.20) forneceram informações sobre a regulação do sistema de dois componentes, em que as proteínas Hsero_3507 e Hsero_3508 participam em *H. seropedicae* SmR1. A fusão transcricional pPW_Hsero_3507, apresentou expressão significativamente aumentada em condições de limitação de nitrogênio. Esse resultado concluiu que a expressão do promotor do gene *Hsero_3507* é dependente da disponibilidade de nitrogênio. Neste contexto, o sistema Ntr é um forte candidato para mediar essa resposta, podendo estar relacionado a ativação do promotor de *Hsero_3507* quando há limitação de nitrogênio, dado seu papel central na regulação de genes de assimilação de nitrogênio em Proteobactérias.

A literatura mostra que o sistema Ntr ativa uma rede de reguladores transcricionais para preparar a célula para a falta de nitrogênio e também sincroniza o metabolismo do nitrogênio com as vias de equilíbrio de carbono e redox (BONATO et al, 2024), dentre os genes ativados por Ntr estão os genes Nif. A interação de Hsero_3507 na condição N-/O- com a proteína FixC, reforça a sugestão do papel de Hsero_3507 em vias de assimilação de nitrogênio. Essa hipótese é corroborada com o fato de que o promotor do gene *FixC*, é dependente da regulação por NifA (SPEROTTO et al, 2004).

Além do sistema Ntr, sistemas alternativos de metabolismo do nitrogênio são importantes para a sobrevivência de *H. seropedicae*, como o sistema de redução de nitrato. A redução de nitrato a nitrito é catalisada pela nitrato redutase, e ocorre também no metabolismo anaeróbico de nitrogênio, como o observado em *Escherichia coli*, que assimila o nitrito gerado pela respiração anaeróbica do nitrato (STEWART, 1994). Os sistemas relacionados ao nitrato são importantes tanto na redução assimilatória, onde o nitrato é convertido em amônia, quanto na redução dissimilatória, onde o nitrato é usado comoceptor final de elétrons em condições anaeróbicas, levando a produtos como amônia. A interação de Hsero_3507 com a proteína transportadora de nitrato do tipo ABC na condição N+/O-, pode indicar a atuação desse regulador de resposta no equilíbrio do metabolismo de nitrogênio e detoxificação sob hipóxia.

Outros aspectos foram avaliados no presente estudo em condições de estresse relacionadas a limitação de nitrogênio ou de oxigênio, ou ambas. Os ensaios de atividade da enzima nitrogenase demonstraram que as estirpes mutantes *Hsero_3507Tn* e *Hsero_3508Tn*, mantêm a capacidade de fixar N₂ em baixas concentrações de amônio.

Esses resultados, combinados com os fenótipos observados por Cassilla (2018), onde *Hsero_3507Tn* apresentou defeitos em motilidade e *Hsero_3508Tn* mostrou alterações no crescimento em microaerobiose, sugerem que este sistema de dois componentes, está mais envolvido na adaptação geral ao estresse relacionado à disponibilidade de nitrogênio, do que no controle direto da fixação de nitrogênio. Além disso, a análise das proteínas que interagem com Hsero_3507 (FIGURA 17) revelou um perfil consistente com esta interpretação, porque, além da interação com FixC, os experimentos com extratos celulares de *H. seropedicae* revelaram que Hsero_3507 interage com múltiplas proteínas, incluindo CheZ uma fosfatase envolvida na quimiotaxia.

A identificação recorrente de CheZ sugere que Hsero_3507 possa modular o comportamento de motilidade de *H. seropedicae* SmR1, em resposta a condições ambientais como o estresse relacionado à limitação de nitrogênio ou a limitação de oxigênio. Isso é indicado também pela interação dessa proteína com a proteína de estresse geral em condições de limitação de nitrogênio (condição N- O+). O papel principal da resposta geral ao estresse é prevenir e reparar danos subletais e letais. Em bactérias Gram-negativas, a resposta geral ao estresse promove a sobrevivência sob estresses ambientais, onde Hsero_3507 pode estar envolvida.

A interação com a proteína transmembrana de quimiotaxia aceptora de metil (condição N+ O-) também foi revelada. As proteínas de quimiotaxia aceitadoras de metila (MCPs), constituem uma família grande altamente conservada de proteínas associadas à quimiossensibilidade bacteriana. Dentre o grupo dessas proteínas, estão as proteínas de aerotaxia como por exemplo, as do tipo Aer, as quais são sensores para potencial redox celular, fazendo que a bactéria se mova para fontes com maior quantidade de oxigênio em caso de escassez (STOCK; BAKER, 2009). Isto sugere que Hsero_3507 possa ter um papel na ativação de proteínas relacionadas à modulação da aerotaxia.

Além disso, quando analisada a sequência de aminoácidos de Hsero_3507 foi analisada *in silico* no banco de dados Interpro, havia uma previsão de que esta proteína estava relacionada ao estresse, mas sem dados na literatura para sustentar essa previsão. Os resultados do presente estudo, indicam que Hsero_3507 possa atuar na regulação do metabolismo de nitrogênio e estresse, integrando sinais de várias quinases, não apenas de Hsero_3508 como é previsto *in silico* e sugerido *in vitro*.

Com base nos dados apresentados, propomos um modelo onde Hsero_3507 é um regulador de resposta que integra múltiplos sinais, possivelmente relacionados ao

estado redox ou disponibilidade de nutrientes, que por sua vez modularia a atividade de proteínas efetoras como CheZ através de interações diretas. Isso independente da interação com Hsero_3508, tendo em vista que a literatura mostra que proteínas reguladores de resposta, frequentemente funcionam como homodímeros, cuja fosforilação e consequente ativação, podem ocorrer mesmo na ausência da HK, desde que condições favoreçam a dimerização (MITROPHANOV et al, 2010). Isto permitiria respostas rápidas e ajustáveis sem envolver mudanças na expressão gênica, sendo particularmente adequado para condições de estresse transitório.

Os resultados obtidos são importantes na compreensão da complexa rede de sinalização que permite a *H. seropedicae* colonizar e promover o crescimento de plantas, em condições ambientais variáveis, abrindo novas perspectivas para aplicações biotecnológicas na agricultura sustentável.

7 CONCLUSÃO

1. A proteína Hsero_3507 é um regulador de resposta de domínio único (REC solitário), sem domínios efetores adicionais e Hsero_3508 apresenta arquitetura modular característica de histidinas quinases sensoras.

2. A expressão de Hsero_3507 é induzida em condições de limitação de nitrogênio, abrindo a possibilidade que seu promotor seja regulado pelo sistema Ntr

3. As proteínas Hsero_3507 e Hsero_3508 não apresentam interação estável *in vitro* nas condições testadas.

4. Hsero_3507 interage *in vitro* com múltiplas proteínas efetoras, particularmente componentes do sistema de quimiotaxia (CheZ), proteínas de estresse geral, transportadoras de nitrato do tipo ABC e proteína FixC, indicando que Hsero_3507 possa estar relacionada à integração de sinais ambientais relacionados ao estresse e regulação de processos adaptativos como motilidade e quimiotaxia.

5. As estirpes mutantes *Hsero_3507Tn* e *Hsero_3508Tn* mantêm capacidade de fixação de N₂, portanto, os genes *Hsero_3507* e *Hsero_3508* não são essenciais para a fixação biológica do nitrogênio.

REFERÊNCIAS

AQUINO, B; STEFANELLO, A. A; OLIVEIRA, M. A. S; PEDROSA, F. O; SOUZA, E. M., MONTEIRO, R. A; & CHUBATSU, L. S. Effect of point mutations on *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n.8, p. 683–690, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/1414-431X20154522>.

ADEBALI, Ogun et al. Class III Histidine Kinases: a recently accessorized kinase domain in putative modulators of type IV pilus-based motility. *J. Bacteriol*, v. 199, n. 18, 2017. **American Society for Microbiology**. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00218-17>.

AKBAR, S. et al. Modulator protein RsbR regulates environmental signaling in the general stress pathway of *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 567–578, 1997. Available at: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3631732.x>.

BALSANELLI, E.; TADRA-SFEIR, M. Z.; FAORO, H.; PANKEVICZ, V. C.; BAURA, V. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; DIXON, R.; MONTEIRO, R. A. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2343-2356, 2016. DOI: 10.1111/1462-2920.12887.

BARRETTO, Luke A. F. et al. Conserved patterns of sequence diversification provide insight into the evolution of two-component systems in *Enterobacteriaceae*. **Microbial Genomics**, v. 10, n. 3, p. 0-0, 2024. Microbiology Society. Available at: <http://dx.doi.org/10.1099/mgen.0.001215>.

BASTIÁN, Fabiola; COHEN, Ana; PICCOLI, Patricia; LUNA, Virginia; BOTTINI, Rubén; BARALDI, Rita. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, [S.l.], v. 24, p. 7–11, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1005809604846>.

BELLIENY-RABELO, D.; PRETORIUS, W. J. S.; MOLELEKI, L. N. Novel two-component system-like elements reveal functional domains associated with restriction-modification systems and paraMORC ATPases in bacteria. **Genome Biology and Evolution**, v. 13, n. 3, 2021. DOI: 10.1093/gbe/evab024.

BONATO, P.; CAMILIOS-NETO, D.; TADRA-SFEIR, M. Z.; MOTA, F. J. T.; MULLER-SANTOS, M.; WASSEM, R.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. The role of NtrC in the adaptation of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 to nitrogen limitation and to nitrate. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 7, p. 310, 2024. DOI: 10.1007/s00203-024-04044-x.

BRAY, D. Bacterial chemotaxis and the question of gain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 1, p. 7-9, 2002. DOI: 10.1073/pnas.022641699.

BULL, C. T. et al. Characterization of spontaneous gacS and gacA regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, p. 327-336, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1012061014717>.

BURY-MONÉ, S. et al. Global Analysis of Extracytoplasmic Stress Signaling in *Escherichia coli*. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 9, e1000651, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000651>.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C.; GILARD, F.; BRULÉ, L.; QUILLERÉ, I.; GOURION, B.; RATET, P.I; MALTEMPI DE SOUZA, E.; LEA, P. J.; HIREL, B. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 611, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.00611.

CAI, Y.; SU, M; AHMAD, A; HU, X; SANG, J; KONG, L; CHEN, X; WANG, C; SHUAI, J; HAN, A. Conformational dynamics of the essential sensor histidine kinase WalK. *Acta*

Crystallographica Section D: **Structural Biology**, v. 73, p. 793–803, 2017. DOI: 10.1107/S2059798317013043.

CONNAN, C; BRUEGGEMANN, H; MAZUET, C; RAFFESTIN, S; CAYET, N; POPOFF, M.R. Two-component systems are involved in the regulation of botulinum neurotoxin synthesis in *Clostridium botulinum* type A strain Hall
PLoS One, v.7, p. e41848, 2012.

CUNHA, E. T.; PEDROLO, A. M.; BUENO, J. C. F.; PEREIRA, T. P.; SOARES, C. R. F. S.; ARISI, A. C. M. Inoculation of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 increases biomass in maize roots DKB 390 variety in the early stages of plant development.
Archives of Microbiology, v. 204, n. 7, p. 373, 2022. DOI: 10.1007/s00203-022-02986-8.

DAHLSTEN, E; ZHANG, Z; SOMERVUO, P; MINTON, N.P; LINDSTRÖM, M; ORKEALA, H. The cold-induced two-component system CBO0366/CBO0365 regulates metabolic pathways with novel roles in cold tolerance of group I *Clostridium botulinum* ATCC 3502.
Appl Environ Microbiol, v. 80, p. 306-319, 2013.

DIEP, D. B.; STRAUME, D.; KJOS, M.; TORRES, C.; NES, I. F. An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. **Peptides**, v. 30, n. 8, p. 1562-1574, 2009. DOI: 10.1016/j.peptides.2009.05.014.

DILWORTH, M. J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 127, n. 2, p. 285-294, 1966. DOI: 10.1016/0304-4165(66)90383-7.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621-631, 2004. DOI: 10.1038/nrmicro954.

DUTTA, R.; INOUE, M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 24-28, 2000.

FUQUA, C.; PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. **Annual Review of Genetics**, v. 35, p. 439-468, 2001. DOI: 10.1146/annurev.genet.35.102401.090913.

FOULKES, Daniel M.; COOPER, Daniel M.; WESTLAND, Catherine; BYRNE, Dominic P. Regulation of bacterial phosphorelay systems. **RSC Chemical Biology**, [S.l.], v. 6, n. 8, p. 1252–1269, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1039/d5cb00016e>.

GAO, Rong; STOCK, Ann M. Biological insights from structures of two-component proteins. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 133–154, 2009. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073214.

GASTEIGER, E.; HOOG-LAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. **Protein identification and analysis tools on the ExPASy server**. In: WALKER, J. M. (Ed.). The Proteomics Protocols Handbook. Totowa: Humana Press, 2005.

GEER, L. Y.; DOMRACHEV, M.; LIPMAN, D. J.; BRYANT, S. H. CDART: protein homology by domain architecture. **Genome Research**, v. 12, n. 10, p. 1619-1623, 2002. DOI: 10.1101/gr.278202.

GROISMAN, E. A. Feedback control of two-component regulatory systems. **Annual Review of Microbiology**, v. 70, p. 103-124, 2021. DOI: 10.1146/annurev-micro-102215-095331.

GRILLO-PUERTAS, M.; VILLEGAS, J. M.; PANKEVICZ, V. C. S.; TADRA-SFEIR, M. Z.; MOTA, F. J. T.; HEBERT, E. M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L.; PEDRAZA, R. O.; PEDROSA, F. O.; RAPISARDA, V. A.; SOUZA, E. M. Transcriptional responses of *Herbaspirillum seropedicae* to environmental phosphate concentration. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 666277, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.666277.

GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V.; PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Engineering**, v. 4, n. 2, p. 155-161, 1990. DOI: 10.1093/protein/4.2.155.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; REDDY, P. M.; LADHA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, [S.I.], v. 154, p. 131–145, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00371.x>.

HERBAUD, M. L.; GUISEPPI, A.; DENIZOT, F.; HAIECH, J.; KILHOFFER, M. C. Calcium signalling in *Bacillus subtilis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1448, n. 2, p. 212-226, 1998. DOI: 10.1016/s0167-4889(98)00145-1.

HIRAKAWA, H.; KURUSHIMA, J.; HASHIMOTO, Y.; TOMITA, H. Progress overview of bacterial two-component regulatory systems as potential targets for antimicrobial chemotherapy. **Antibiotics**, v. 9, n. 10, 635, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9100635.

HOCH, J. A. A life in *Bacillus subtilis* signal transduction. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, p. 1-19, 2017. DOI: 10.1146/annurev-micro-030117-020355.

HU, X.; MACIUS, M.; YANG, W. Monovalent cation dependence and preference of GHKL ATPases and kinases. **FEBS Letters**, v. 544, n. 1-3, p. 268-273, 2003. DOI: 10.1016/s0014-5793(03)00519-2.

HWANG, E. et al. Crystal structure of the EnvZ periplasmic domain with CHAPS. **FEBS letters**, v. 591, 2017. DOI: 10.1002/1873-3468.12658.

JUNG, K.; FRIED, L.; BEHR, S.; HEERMANN, R. Histidine kinases and response regulators in networks. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 118-124, 2012. DOI: 10.1016/j.mib.2011.11.009.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J.**

Microbiol., Ottawa, v. 43, p. 887-891, 1997.

KROM, B. P.; WARNER, J. B.; KONINGS, W. N.; LOLKEMA, J. S. Transporters involved in uptake of di- and tricarboxylates in *Bacillus subtilis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 84, n. 1, p. 69-80, 2003. DOI: 10.1023/a:1024445131925.

LARA-CABEZAS, W. A. R.; PADUA, R. V. Eficiência e distribuição de nitrogênio aplicado em cobertura na cultura de milho consorciada com *Brachiaria ruziziensis*, cultivada no sistema Santa Fé. **Bragantia**, v. 66, p. 131-140, 2007. DOI: 10.1590/S0006-87052007000100016.

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

LAMARCHE, M.G; WANNER, B.L; CRÉPIN, S; HAREL, J. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 461-473, 2008.

LIAO, B.; YE, X.; CHEN, X.; ZHOU, Y.; CHENG, L.; ZHOU, X.; REN, B. The two-component signal transduction system and its regulation in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 1884-1899, 2021. DOI: 10.1080/21505594.2021.1949883.

MADEIRA, F.; PEARCE, M.; TIVEY, A. R. N.; BASUTKAR, P.; LEE, J.; EDBALI, O.; MADHUSOODANAN, N.; KOLESNIKOV, A.; LOPEZ, R. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. **Nucleic Acids Research**, v. 50, 2022. DOI: 10.1093/nar/gkac240.

MARTIN B, GRANADEL C, CAMPO N, HENARD V, PRUDHOMME M, Claverys JP. Expression and maintenance of ComD-ComE, the two-component signal-transduction system that controls competence of *Streptococcus pneumoniae*. **Molecular Microbiology**, v.75, p.1513-28, 2010.

MAJDALANI N, GOTTESMAN S. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. **Annual Review of Microbiology**, v. 59, p. 379-405, 2005.

MASCHER, T.; HELMANN, J. D.; UNDEN, G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 4, p. 910-938, 2006. DOI: 10.1128/MMBR.00020-06.

MITROPHANOV, A. Y.; HADLEY, T. J.; GROISMAN, E. A. Positive autoregulation shapes response timing and intensity in two-component signal transduction systems. **Journal of Molecular Biology**, v. 401, n. 4, p. 671-680, 2010. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.06.051.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987. DOI: 10.1016/0076-6879(87)55023-6.

NISHINO, K.; NIKAIDO, E.; YAMAGUCHI, A. Regulation of multidrug efflux systems

involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 24, p. 9066-9075, 2007. DOI: 10.1128/JB.01045-07.

NIXON, B. T., RONSON, C. W., AUSUBEL, F. M. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 20, p. 7850–7854, 1986 DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.83.20.7850>.

OLIVARES, Fabio L.; BALDANI, Vera L. D.; REIS, Veronica M.; BALDANI, Jose I.; DÖBEREINER, Johanna. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum spp.* in roots, stems, and leaves, predominantly of *Gramineae*. **Biology and Fertility of Soils**, [S.I.], v. 21, p. 197–200, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00335936>.

PANÉ-FARRÉ J.; LEWIS R.J.; STÜLKE J. The RsbRST stress module in bacteria: a signalling system that may interact with different output modules. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 65-76, 2005. DOI:10.1159/000088837.

PAREDES, A.; IHEACHO, C.; SMITH, A. T. Metal messengers: communication in the bacterial world through transition-metal-sensing two-component systems. **Biochemistry**, v. 62, n. 16, p. 2339-2357, 2023. DOI: 10.1021/acs.biochem.3c00296.

PAYSAN-LAFOSSE, T.; BLUM, M.; CHUGURANSKY, S.; GREGO, T.; PINTO, B. L.; SALAZAR, G. A.; BILESCHI, M. L.; BORK, P.; BRIDGE, A.; COLWELL, L.; GOUGH, J.; HAFT, D. H.; LETUNIĆ, I.; MARCHLER-BAUER, A.; MI, H.; NATALE, D. A.; ORENGO, C. A.; PANDURANGAN, A. P.; RIVOIRE, C.; SIGRIST, C. J. A.; SILLITOE, I.; THANKI, N.; THOMAS, P. D.; TOSATTO, S. C. E.; WU, C. H.; BATEMAN, A. InterPro in 2022. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n.1, p. D418-D427, 2023. DOI: 10.1093/nar/gkac993.

PEDROSA, F. O. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 5, 2011. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002064.

PERSUHN, D. C.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 192, n. 2, p. 217-221, 2000. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09385.x.

REETZ JR., H. F. 2016. **Fertilizers and their efficient use**. Paris: International Fertilizer Use Association, 2016.

RUXTON, G. D. The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann-Whitney U test. **Behavioral Ecology**, v. 17, n. 4, p. 688-690, 2006. DOI: 10.1093/beheco/ark016.

SAITO, H. Histidine phosphorylation and two-component signaling in eukaryotic cells. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 8, p. 2497-2529, 2001. DOI: 10.1021/cr000243+.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed. **Cold**

Spring Harbor Laboratory, 1989.

SAYERS, E. W.; BECK, J.; BOLTON, E. E.; BOUREXIS, D.; BRISTER, J. R.; CANESE, K.; COMEAU, D. C.; FUNK, K.; KIM, S.; KLIMKE, W.; MARCHLER-BAUER, A.; LANDRUM, M.; LATHROP, S.; LU, Z.; MADDEN, T. L.; O'LEARY, N.; PHAN, L.; RANGWALA, S. H.; SCHNEIDER, V. A.; SKRIPCHENKO, Y.; WANG, J.; YE, J.; TRAWICK, B. W.; PRUITT, K. D.; SHERRY, S. T. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D10-D17, 2021. DOI: 10.1093/nar/gkaa892.

SCHOLLHORN, R.; BURRIS, R. H. Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 58, n. 1, p. 213-216, 1967. DOI: 10.1073/pnas.58.1.213.

SCHULTZ, J.; COPLEY, R. R.; DOERKS, T.; PONTING, C. P.; BORK, P. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 231-234, 2000. DOI: 10.1093/nar/28.1.231.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. **Nature Biotechnology**, v. 1, p. 784-791, 1983. DOI: 10.1038/nbt1183-784.

SONCINI, F. C.; VÉSCOVI, E. G.; GROISMAN, E. A. Transcriptional autoregulation of the *Salmonella typhimurium* phoPQ operon. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 15, p. 4364-4371, 1995. DOI: 10.1128/jb.177.15.4364-4371.1995.

SPAINK, H. P.; OKKER, R. J.; WIJFFELMAN, C. A.; PEES, E.; LUGTENBERG, B. J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1Jl. **Plant Molecular Biology**, v. 9, n. 1, p. 27-39, 1987. DOI: 10.1007/BF00017984.

SPEROTTO, R. A.; GROSS, J.; VEDDOY, C.; PASSAGLIA, L. M. P.; SCHRANK, I. S. The electron transfer flavoprotein fixABCX gene products from *Azospirillum brasilense* show a NifA-dependent promoter regulation. **Current Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 267-273, 2004. DOI: 10.1007/s00284-004-4318-3.

SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Sequence and structural organization of a nif A-like gene and part of a nif B-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Journal of General Microbiology**, v. 137, n. 7, p. 1511-1522, 1991. DOI: 10.1099/00221287-137-7-1511.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. Expression of the nifA gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v. 146, Pt 6, p. 1407-1418, 2000. DOI: 10.1099/00221287-146-6-1407.

STEPHENSON, K.; HOCH, J. A. PAS-A domain of phosphorelay sensor kinase A: a catalytic ATP-binding domain involved in the initiation of development in *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 26, p. 15251-15256, 2001. DOI: 10.1073/pnas.251408398.

STEWART, V. Regulation of nitrate and nitrite reductase synthesis in enterobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 66, p. 37-45, 1994. DOI: 10.1007/BF00871631.

STOCK, J. B.; BAKER, M. D. Chemotaxis. In: SCHAECHTER, M. (Ed.). **Encyclopedia of Microbiology**. 3rd ed. Oxford: Academic Press, 2009. p. 529-544. DOI: 10.1016/B978-012373944-5.00068-7.

STOCK, A. M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU, P. N. Two-component signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 183-215, 2000. DOI: 10.1146/annurev.biochem.69.1.183.

STOCK, J. B.; STOCK, A. M.; MOTTONEN, J. M. Signal transduction in bacteria. **Nature**, v. 344, p. 395-400, 1990. DOI: 10.1038/344395a0.

SZKARCZYK, D.; KIRSCH, R.; KOUTROULI, M.; NASTOU, K.; MEHRYARY, F.; HACHILIF, R.; GABLE, A. L.; FANG, T.; DONCHEVA, N. T.; PYYSALO, S.; BORK, P.; JENSEN, L. J.; VON MERING, C. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D638-D646, 2023. DOI: 10.1093/nar/gkac1000.

TABOR, S.; RICHARDSON, C. C. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 4, p. 1074-1078, 1985. DOI: 10.1073/pnas.82.4.1074.

TERÁN-MELO, Juan Luis.; RODRÍGUEZ-RANGEL, Claudia.; GEORGELLIS, Dimitris.; ÁLVAREZ, Adrián F. Mecanismos de autofosforilación y transfosforilación en sistemas de dos componentes bacterianos. **Revista especializada en ciencias químico-biológicas**, Ciudad de México, v. 22, 2019. DOI: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.162>.

TORRECILLA, I.; LEGANÉS, F.; BONILLA, I.; FERNÁNDEZ-PIÑAS, F. Calcium transients in response to salinity and osmotic stress in the nitrogen-fixing *cyanobacterium Anabaena* sp. PCC7120, expressing cytosolic apoaerugin. **Plant, Cell & Environment**, v. 24, n. 6, p. 641-648, 2001. DOI: 10.1046/j.0016-8025.2001.00708.x.

TRAJTENBERG, F.; ALBANESI, D.; RUÉTALO, N.; BOTTI, H.; MECHALY, A. E.; NIEVES, M.; AGUILAR, P. S.; CYBULSKI, L.; LARRIEUX, N.; DE MENDOZA, D.; BUSCHIAZZO, A. Allosteric activation of bacterial response regulators: the role of the cognate histidine kinase beyond phosphorylation. **mBio**, v. 5, n. 6, e02105, 2014. DOI: 10.1128/mBio.02105-14.

URAO, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two-component systems in plant signal transduction. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 2, p. 67-74, 2000. DOI: 10.1016/s1360-1385(99)01542-3.

VARUGHESE, K. I. Conformational changes of spo0F along the phosphotransfer

pathway. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 24, p. 8221-8227, 2005. DOI: 10.1128/JB.187.24.8221-8227.2005.

WANG, J., CHITSAZ, F., DERBYSHIRE, M. K., GONZALES, N. R., GWADZ, M., LU, S., MARCHLER, G. H., SONG, J. S., THANKI, N., YAMASHITA, R. A., YANG, M., ZHANG, D., ZHENG, C., LANCZYCKI, C. J., & MARCHLER-BAUER, A. The conserved domain database in 2023. **Nucleic acids research**, v. 51, p. 384-388, 2023. DOI: 10.1093/nar/gkac1096.

WARD, M. J.; ZUSMAN, D. R. Regulation of directed motility in *Myxococcus xanthus*. **Molecular Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 885-893, 1997.

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G.; GUMIENNY, R.; HEER, F. T.; BEER, T. A. P.; REMPFER, C.; BORDOLI, L.; LEPORE, R.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. 296-303, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky427.

WINSKI, A.; LUDWICZAK, J.; ORLOWSKA, M.; MADAJ, R.; KAMINSKI, K.; DUNIN-HORKAWICZ, S. AlphaFold2 captures the conformational landscape of the HAMP signaling domain. **Protein Science**, v. 32, n. 12, 2023. DOI: 10.1002/pro.4846.

WOODLEY, P.; BUCK, M.; KENNEDY, C. Identification of sequences important for recognition of vnf genes by the VnfA transcriptional activator in *Azotobacter vinelandii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 135, n. 2-3, p. 213-221, 1996. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb07992.x.

ZHANG, M.; SHEN, Z.; MENG, G.; LU, Y.; WANG, Y. Genome-wide analysis of the *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. Hsp90 gene family reveals molecular evolution and expression profiling under drought and salt stresses. **PLOS ONE**, v. 12, n.12, e0189187, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0189187.

ZSCHIEDRICH, Christopher P.; KEIDEL, Victoria; SZURMANT, Hendrik. Molecular mechanisms of two-component signal transduction. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n.19, p. 3752-3775, 2016. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.08.003.