

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

AMANDA RUOSO LAZZARI ALMEIDA

EXPRESSÃO E ATIVIDADE *in vivo* DAS ISOFORMAS DE ASPARAGINA
SINTETASE DE *Herbaspirillum seropedicae*.

Maringá

2023

AMANDA RUOSO LAZZARI ALMEIDA

EXPRESSÃO E ATIVIDADE *in vivo* DAS ISOFORMAS DE ASPARAGINA SINTETASE
DE *Herbaspirillum seropedicae*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Marco Aurélio Schüler de Oliveira

Maringá

2023

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

A447e Almeida, Amanda Ruoso Lazzari
Expressão e atividade *in vivo* das isoformas de asparagina sintase de *Herbaspirillum seropedicae* / Amanda Ruoso Lazzari Almeida. -- Maringá, PR, 2023.
51 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Schuler de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2023.

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. RT-qPCR - Reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction. 3. *Herbaspirillum seropedicae*. I. Oliveira, Marco Aurélio Schuler de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). III. Título.

CDD 23.ed. 572.4

Ademir Henrique dos Santos - CRB-9/1065

AMANDA RUOSO LAZZARI ALMEIDA

EXPRESSÃO E ATIVIDADE *in vivo* DAS ISOFORMAS DE ASPARAGINA SINTETASE
DE *Herbaspirillum seropedicae*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas pela Banda Examinadora composta pelos membros:

Aprovado em: 19 de junho de 2023

BANCA EXAMINADORA

Marco Aurélio Schuler de Oliveira (Presidente)

Prof. Dr. Quirino Alves de Lima Neto

Profa. Dra. Josielle Abrahão de Souza

BIOGRAFIA

Amanda Ruoso Lazzari Almeida nasceu em Campo Mourão/PR em 09 de fevereiro de 1999. Desde criança sempre gostou muito de biologia e química. Então, surgiu o desejo de fazer medicina, mas os anos no ensino médio passaram, fez um ano de cursinho e percebeu que talvez este sonho estaria muito longe da sua realidade financeira. E sem pretensão nenhuma, prestou o vestibular para Bioquímica na Universidade Estadual de Maringá em 2016. Não era o que de fato gostava no começo, mas foi ali que sua curiosidade começou a ser sanada. Se interessou muito pela área de biologia molecular na graduação e então, em 2018 realizou sua iniciação científica no laboratório de procariotos do DBQ. Se formou em 2020, em meio a uma pandemia, e em 2021 iniciou seu estudo mais aprofundado na área, graças ao Mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela minha vida, por me permitir superar todos os desafios até agora e por colocar no meu caminho cada uma das pessoas que irei citar aqui.

Agradeço meu orientador Marco Aurélio, por todo suporte, confiança e paciência durante o mestrado, apoio com novas ideias e incentivos que foram de extrema importância.

Agradeço aos meus pais, Suzana e Jair, pelos ensinamentos e por proporcionar todas as oportunidades para que eu focasse nos meus estudos. À minha irmãzinha, Gabi, por ser uma das razões da minha vida.

Ao meu noivo, Felipe, pelo apoio, compreensão em cada momento difícil, principalmente durante o período que ficamos longe.

A todos os professores que tive o apoio durante esse processo: Quirino, Paulo Sérgio, Josi, Rogério e principalmente à professora Cida, que abriu as portas do seu laboratório com todo carinho para que eu realizasse boa parte desse trabalho. E também, agradeço aos seus alunos Nivaldo e Daniel, que me ensinaram várias das técnicas aqui utilizadas.

Agradeço aos meus parceiros de laboratório: Larissa, Bárbara, Eduardão, Eduardinho e Ana - pelo apoio diário, brincadeiras e pelo café de senhores, que as vezes duravam 5 minutos pois todo mundo tinha muita coisa para fazer e que as vezes duravam 30 minutos, de pura risada (as vezes de desespero) e muitos memes.

À Camila, por surtar comigo desde o dia que saiu a lista dos aprovados no mestrado, por ouvir todas as minhas reclamações e surtos cada vez que alguma coisa dava errado ou quando algo dava muito certo.

Ao COMCAP, por disponibilizar os equipamentos necessários para esse trabalho.

A todos os técnicos dos laboratórios, por todo auxílio necessário, especialmente Nunis e Marli, que fizeram com que eu nunca explodisse uma autoclave, gratidão.

A CAPES pelo suporte financeiro essencial para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001.

APRESENTAÇÃO

Em concordância com as normas fixadas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, a dissertação foi redigida na forma de um artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Bacteriology* com modificações para facilitar o entendimento do texto.

**EXPRESSÃO E ATIVIDADE *in vivo* DAS ISOFORMAS DE ASPARAGINA
SINTETASE DE *Herbaspirillum seropedicae*.**

Almeida ARL, Oliveira MAS

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica – Maringá,
Paraná, Brasil.

LISTA DE ABREVIATURAS

GS - Glutamina Sintetase
ATP - Adenosina trifosfato
2-OG - 2-oxoglutarato
ADP - Adenosina difosfato
AMP - Adenosina monofosfato
ATase - Enzima adenililtransferase
UTase - Enzima uridililtransferase
DNA - Ácido desoxirribonucleico
RNA – Ácido ribonucleico
mRNA – RNA mensageiro
cDNA – DNA complementar
DO600 - Densidade óptica a 600 nanômetros
GDH - Glutamato desidrogenase
GOGAT - Glutamato sintetase
pb - pares de base
PCR - Reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR – PCR em tempo real com ação da transcriptase reversa
NO - Óxido de nitrogênio
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
PII – Proteínas do tipo PII (GlnB e GlnK)
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
AsnA – Asparagina sintetase tipo A
AsnB - Asparagina sintetase tipo B
OPA – O –ftaldialdeído
TCA – Ácido tricloroacético
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
UDG – Uracil-DNA glicosilase

SUMÁRIO

1 Introdução	11
1.1 Fixação Biológica de Nitrogênio	11
1.2 Bactérias fixadoras	11
1.3 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	12
1.4 Sistema Ntr	13
1.5 Glutamina Sintetase	13
1.6 Asparagina Sintetase	14
1.7 Bactérias super fixadoras de nitrogênio	15
2 Materiais e métodos	16
2.1 Crescimento bacteriano	16
2.2 Eletroforese de DNA	16
2.3 Eletroforese de RNA	17
2.4 Quantificação de proteínas	17
2.5 Extração de RNA	17
2.6 Quantificação de RNA	18
2.7 Reação de DNase	18
2.8 Síntese de cDNA	18
2.9 RT-qPCR	19
2.10 Quantificação de aminoácidos nos extratos	20
2.11 Atividade das Asparaginas Sintetases de <i>H. seropedicae</i> em extratos celulares	20
3 Resultados e discussões	22
3.1 Extração de RNA	22
3.2 Teste da DNase I	23
3.3 RT-qPCR	24
3.4 Análise qPCR	27
3.4.1 Curvas de amplificação	28
3.5 Quantificação de aminoácidos nos extratos	39
3.6 Atividade das Asparaginas Sintetases de <i>H. seropedicae</i> em extratos celulares	41
4 CONCLUSÕES	43
5 REFERÊNCIAS	45

RESUMO GERAL

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* é capaz de fixar nitrogênio e colonizar os tecidos internos de plantas com interesse econômico, estimulando o crescimento do hospedeiro. Por isso, essa bactéria tem potencial para ser utilizada como um biofertilizante. No entanto, a aplicação de *H. seropedicae* como um inoculante comercial depende do aumento da capacidade de promoção de crescimento vegetal da bactéria. Uma das possibilidades para alcançar esse objetivo depende de engenharia genética para gerar estirpes bacterianas superfixadoras de nitrogênio. Dentre as vias cuja perturbação pode gerar estirpes superfixadoras são as de assimilação de amônio. A via de assimilação de amônio mais bem estudada dessa bactéria é aquela composta pelas enzimas Glutamina Sintetase (GS) e Glutamato Sintase (GOGAT). No entanto, recentemente foram encontrados quatro genes codificadores da Asparagina Sintetase no genoma de *H. seropedicae*, que foram aqui chamados de *asnB1* a *asnB4*. Ortólogos dessa enzima em outros organismos já foram descritas como capazes de assimilar amônio através da aminação do aspartato para formar asparagina, mas ainda não há nenhuma informação sobre essa função sobre as isoformas de *H. seropedicae*.

Para caracterizar a função das isoformas de asparagina sintetase de *H. seropedicae*, nós inicialmente determinamos o padrão de expressão dos quatro genes codificadores da enzima. Para isso, cultivou-se a bactéria em condição de alto nitrogênio e em condição de baixo nitrogênio. A expressão foi analisada utilizando a técnica de RT-qPCR e o método de expressão relativa comparativa, utilizando o modelo matemático $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ desenvolvido pela PE Applied Biosystems (Perkin Elmer). Nesse método é feita uma normalização do gene alvo com a expressão do gene de referência, de expressão constitutiva, neste trabalho foi utilizado o *rpoA*, que codifica subunidade α da DNA polimerase e provou ter seu nível de expressão constitutivo.

Os resultados desse trabalho sugerem que três das quatro isoformas de asparagina sintetase foram expressas nas condições testadas – *asnB1*, *asnB3* e *asnB4*, sendo que todas são mais expressas em condição limitante de nitrogênio, porém *asnB1* se mostrou ainda mais expresso nessa condição do que *asnB3* e *asnB4*.

Além da verificação da expressão, nós utilizamos HPLC para quantificar *in vivo* os aminoácidos aspartato, glutamato e asparagina nas mesmas condições nas quais a expressão dos genes foi quantificada – excesso e limitação de nitrogênio. Os resultados sugerem que uma grande quantidade de glutamato se acumula na célula em condição de excesso de nitrogênio. Aspartato e asparagina foram encontrados em baixas concentrações nas duas condições. Porém,

a quantificação desses aminoácidos nos extratos não necessariamente reflete a atividade das isoformas da asparagina sintetase, já que ocorre o consumo dos mesmos por outras vias metabólicas. Portanto, para determinarmos a atividade das isoformas da asparagina sintetase realizou-se uma reação *in vivo*, utilizando o extrato bacteriano como fonte enzimática. Como substratos dessa reação foram utilizados aspartato com glutamina ou amônio. A formação de asparagina a partir de glutamina e amônio seria um indicativo da capacidade de assimilação de amônio por uma ou mais isoformas da asparagina sintetase. Os resultados indicaram que houve a formação de asparagina, tanto a partir de glutamina como a partir de amônio. Considerando a síntese de asparagina a partir de amônio sendo uma via de assimilação de nitrogênio, houve assimilação de amônio somente na condição de alto nitrogênio. Os achados no presente estudo permitiram a elaboração de um modelo do papel da asparagina sintetase na assimilação de amônio, que é apresentado no trabalho.

Comentado [JA1]: Ocorreu formação de asparagina?

RESUMO

O nitrogênio é frequentemente o nutriente limitante para o crescimento bacteriano em diversos ambientes. Por isso, as bactérias desenvolveram sistemas complexos e sofisticados de sensoriamento e resposta à diferentes fontes e quantidades de nitrogênio ambiental, permitindo a adaptação e sobrevivência em tais ambientes. A fonte de nitrogênio preferida para assimilação é o amônio, que é utilizado para a síntese de aminoácidos, os quais servem como doadores de grupos amina para reações biossintéticas. As vias de assimilação de amônio mais conhecidas produzem glutamina e glutamato. No entanto, em algumas bactérias já foi descrito um papel da enzima asparagina sintetase na assimilação de amônio. Uma busca no genoma da bactéria fixadora de nitrogênio *Herbaspirillum seropedicae*, alvo do presente estudo, indicou a presença de 4 genes codificadores da Asparagina Sintetase, denominados aqui de *asnB1* a *asnB4*. Para estudarmos a função e a relação hierárquica das 4 isoformas, nós utilizamos RT-qPCR para quantificar relativamente a expressão de cada um dos 4 genes na condição de nitrogênio alto ou limitante. Os resultados indicaram que os genes *asnB1*, *asnB3* e *asnB4* são expressos, e sua expressão é regulada de acordo com os níveis de nitrogênio: em condições limitantes de nitrogênio a expressão foi aumentada. A expressão do gene *asnB2* não foi detectada em nenhuma das condições testadas. Nós investigamos ainda a atividade de Asparagina Sintetase em extratos de *H. seropedicae* crescido nas duas condições de nitrogênio utilizadas nesse trabalho. Em ambas condições testadas, o extrato enzimático foi capaz de produzir asparagina a partir de aspartato e glutamina, confirmando a presença dessa enzima. Ainda, nos extratos enzimáticos de bactérias crescidas em alto nitrogênio, a atividade de asparagina sintetase mostrou ser capaz de assimilar amônio, indicando que essa é uma via possível de assimilação de amônio em *H. seropedicae*.

Comentado [JA2]: A proteína assimilou amônio?

Comentado [JA3R2]: A assimilação envolve diversas enzimas.

ABSTRACT

Nitrogen is often the limiting nutrient for bacterial growth in many environments. Hence, bacteria developed complex and sophisticated molecular systems to sense and respond to highly diverse quantity and quality of nitrogen sources, allowing adaptation and surviving in such environments. The preferred nitrogen source for bacteria is ammonium, which is used for synthesis of amino acids that serve as amine donors for biosynthetic reactions. The long-known ammonium assimilation pathways produce glutamine and glutamate. However, in some bacteria a role for the Asparagine Synthetase enzyme in ammonium assimilation have been described. A search at the genome of *Herbaspirillum seropedicae*, the issue of the present study, indicated the presence of 4 Asparagine Synthetase coding genes, named *asnB1* to *asnB4*. In order to study the function and the hierarchical relationship between these 4 isoforms, we used RT-qPCR to relatively quantify the expression of the 4 genes in two conditions, nitrogen-plenty and nitrogen-scarce medium. The results indicated that the genes *asnB1*, *asnB3* and *asnB4* are expressed, and this expression is regulated according to the nitrogen availability: in nitrogen-scarce condition, the expression was higher. The expression of the *asnB2* variant was not detected in any of the tested conditions. We also investigated the Asparagine Synthetase activity in *H. seropedicae* enzymatic extracts of cultures grown in both nitrogen conditions of the study. The synthesis of Asparagine from Aspartate and Glutamine was observed in both extracts. Besides, the enzymatic extracts of nitrogen-plenty bacteria were capable of assimilating ammonium, suggesting that the Asparagine Synthetase is a possible pathway to assimilate ammonium in *H. seropedicae*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fixação biológica de nitrogênio

A fixação do nitrogênio é uma parte importante do ciclo bioquímico deste elemento. Ela consiste na redução do nitrogênio atmosférico a amônio por um pequeno grupo de procariotos, chamados diazotróficos (Dixon and Kahn, 2004). Organismos diazotróficos podem converter nitrogênio atmosférico, altamente estável, em moléculas mais reativas contendo nitrogênio, as quais estão disponíveis para outros seres vivos. Fazendo isso, os diazotrofos repõem o nitrogênio na biosfera perdido pela desnitrificação (Dixon and Kahn, 2004).

Além desta importância ambiental, a fixação biológica do nitrogênio é muito importante para a agricultura. O nitrogênio é geralmente o fator limitante para a produtividade das culturas agrícolas, promovendo grande demanda por fertilizantes nitrogenados na agricultura. Porém, o uso de fertilizantes químicos constitui a maior interferência humana no ciclo do nitrogênio, provocando aumento nas emissões de óxido de nitrogênio (NO), acidificação do solo e a eutrofização de rios. O nitrogênio fixado pelos microrganismos, no entanto, é menos suscetível a lixiviação e a volatilização (Dixon and Kahn, 2004).

Além disso, a produção industrial de amônia pelo processo de Harber-Bosch, para uso em fertilizantes nitrogenados, requer temperaturas de até 500 °C e pressões de nitrogênio correspondentes a centenas de atmosferas, pois trata-se da quebra da ligação tripla com energia de 930kJ/mol (Nelson and Cox, 2011). Uma alternativa para a fertilização nitrogenada é a inoculação das culturas com bactérias fixadoras de nitrogênio que podem promover um aumento na produtividade. Várias bactérias promotoras de crescimento de plantas já foram descritas. Este grupo de bactérias inclui as de vida livre, aquelas que estabelecem relações simbióticas específicas com as plantas e aquelas que podem colonizar a superfície e os tecidos internos das plantas, assim chamadas endofíticas (Glick, 2012).

1.2 Bactérias fixadoras

As bactérias promotoras de crescimento de plantas mais amplamente utilizadas como inoculante vegetal são as bactérias rizóbios, tal como *Rhizobium leguminosarum* e *Bradyrhizobium japonicum*. Estas bactérias formam nódulos nas raízes de plantas da família Fabaceae (leguminosas). Tais nódulos são estruturas únicas da planta para hospedar as células dos rizóbios, que se especializam para formar bacterioides. O ambiente do nódulo é otimizado para fixação do nitrogênio, e o nitrogênio fixado desta forma é incorporado na biomassa da

planta. Estima-se que a economia com fertilizantes nitrogenados atribuída ao uso de rizóbios em soja no Brasil seja em torno de US\$ 7 bilhões por ano (Hungria *et al.*, 2012).

Apesar de a inoculação de culturas com bactérias rizóbios ser uma tecnologia amplamente empregada, as culturas de gramíneas não podem ser beneficiadas com ela. Isto porque nódulos de rizóbios são formados exclusivamente em raízes de leguminosas. Como as gramíneas estão entre as principais culturas vegetais no mundo, o desenvolvimento de um inoculante com bactérias promotoras de crescimento vegetal para essas plantas teria um gigantesco interesse ambiental e econômico. Em tal perspectiva, muitas bactérias diazotróficas endofíticas capazes de colonizar tecidos internos de gramíneas têm sido isoladas e caracterizadas. Este grupo inclui a bactéria que o presente trabalho estudou: *Herbaspirillum seropedicae*.

1.3 *Herbaspirillum seropedicae*

Trata-se de uma bactéria gram-negativa, vibrióide, membro da classe β do filo proteobactérias, com grande motilidade quando próximas de uma fonte de O₂, capaz de colonizar os tecidos internos das plantas, sem causar qualquer dano aparente ao hospedeiro (Baldani *et al.*, 1986; Olivares *et al.*, 1997).

H. seropedicae expressa os genes *nif*, codificadores da maquinaria enzimática responsável pela fixação biológica de nitrogênio, dentro dos tecidos da planta. Dessa forma, a bactéria reduz o nitrogênio atmosférico em amônia sem causar danos ao seu hospedeiro (Roncato-Maccari *et al.*, 2003; James *et al.*, 2002; Olivares *et al.*, 1997).

Gyaneshwar e colaboradores (2002) mostraram que após 30 dias de inoculação de *H. seropedicae* em plantas de arroz, houve aumento significativo no conteúdo total de nitrogênio do hospedeiro, sugerindo que o nitrogênio fixado por essa bactéria é incorporado à biomassa da planta hospedeira. Em outro trabalho, Muthukumarasamy e colaboradores (2006), inocularam *H. seropedicae* em cana-de-açúcar micropropagada e mostraram que houve o aumento da biomassa total da planta em comparação com a não-inoculada, indicando que a bactéria auxilia no crescimento do seu hospedeiro.

Além disso, *H. seropedicae* pode contribuir para o crescimento da planta pela produção de fitohormônios (Bastian *et al.*, 1998). A bactéria já foi isolada da rizosfera e tecidos de várias plantas, incluindo espécies economicamente importantes, como cana de açúcar, milho, trigo e arroz (Baldani *et al.*, 1986; Baldani *et al.*, 1992; Baldani *et al.*, 2005). Esses fatores fazem com que a *H. seropedicae* tenha grande potencial para ser utilizado como um biofertilizante, sendo uma alternativa mais eficiente e menos poluente que os fertilizantes nitrogenados.

1.4 Sistema Ntr

Os metabolismos de carbono e de nitrogênio são fundamentais para todas as formas de vida e, para lidar com mudanças no fornecimento desses nutrientes, as bactérias sensoriam e adaptam seu metabolismo conforme necessário para sua sobrevivência. Para isso, elas coordenam a expressão de diferentes genes e a regulação de enzimas chave, para que as cascatas de interações entre as moléculas ocorram efetivamente, contribuindo para o funcionamento adequado das vias (Commichau *et al.*, 2006).

Especificamente com as moléculas nitrogenadas, esse processo ocorre graças à regulação do metabolismo pelo sistema Ntr (“Nitrogen regulation system”). O sistema Ntr consiste em um conjunto de proteínas com função integrada que regulam o metabolismo de nitrogênio em proteobactérias. O sistema Ntr de *Escherichia coli* é o mais bem estudado. Dentre as proteínas que fazem parte do sistema Ntr são incluídas NtrB, NtrC, UTase (GlnD), PII (GlnB e GlnK), ATase (GlnE), proteína de membrana AmtB e Glutamina Sintetase (GS ou GlnA) (Merrick and Edwards, 1995).

Entre as respostas ao sistema Ntr, temos a regulação da expressão de genes cujos produtos são necessários para mobilizar outras fontes de nitrogênio, como nitrato e aminoácidos. Essas respostas dependem de sinais que demonstram as condições intracelulares de nitrogênio e da transmissão desses sinais de uma proteína para outra.

A fonte preferencial de nitrogênio em bactérias é o amônio, o qual pode ser combinado com o esqueleto carbônico do 2-oxoglutarato (2-OG) para formar glutamina e glutamato (Merrick and Edwards, 1995). Esses aminoácidos, por sua vez, servem como doadores de nitrogênio para reações biossintéticas.

1.5 Glutamina Sintetase

Quando o amônio é utilizado pela enzima GS, o glutamato é aminado formando glutamina, a qual tem seu grupo amida transferido para o 2-oxoglutarato pela enzima GOGAT para formar duas moléculas de glutamato (Bulen and Lecomte, 1966; Hageman and Burris, 1978).

A glutamina e o glutamato formados servem como doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas da bactéria e, por se tratar de um fluxo metabólico muito custoso do ponto de vista energético, ele é consequentemente altamente regulado, evitando desperdícios de ATP.

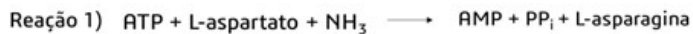
A atividade de GS pode ser regulada de múltiplas formas. Metabolicamente, o fluxo através de GS pode ser regulado em até quatro vezes, de acordo com os níveis de substrato

(amônio e glutamato intracelular), níveis do produto (glutamina), o estado redox da célula (NADPH) e o estado energético da célula (ATP) (Van Heeswijk, 2013).

Além da regulação metabólica, a atividade de GS pode ser inativada por adenililação reversível de um resíduo conservado de tirosina em cada subunidade (Reitzer, 2003). Essa modificação pós traducional é realizada em altos níveis de nitrogênio pela enzima ATase - GlnE (Arcondéguy *et al*, 2001). A modificação intensifica a sensibilidade aos inibidores alostéricos, assim, atividade enzimática diminui à proporção que mais subunidades vão sendo adenililadas (Nelson and Cox, 2014).

1.6 Asparagina Sintetase

Além das vias de assimilação de nitrogênio na forma de glutamato e glutamina, algumas bactérias podem promover a assimilação de amônio a partir do aminoácido asparagina. As Enterobactérias *E. coli* e *Klebsiella aerogenes* possuem genes para duas isoenzimas diferentes, denominadas asparaginas sintetases, que catalisam a síntese de asparagina: AsnA, que utiliza aspartato e amônia como substratos (Reação 1), e a AsnB, que utiliza aspartato e glutamina para produzir asparagina (Reação 2) (Reitzer and Magasanik, 1982).



Em geral, aminotransferases que são dependentes de glutamina, como a AsnB, geram NH_3 pela hidrólise de glutamina, seguida pelo transporte do NH_3 e posterior condensação por atividade enzima-específica da sintetase. Em algumas condições, essas enzimas podem usar amônio citosólico no lugar da glutamina e, ao fazê-lo, funcionam como enzimas de assimilação de amônio. Assim, ambas as asparagina sintetases são, em princípio, capazes de catalisar reações de assimilação de amônio (Reação 1) (Van Heeswijk *et al.*, 2013). De fato, Li e colaboradores (2007) mostraram, por meio de HSQCS (*Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*) que a asparagina sintetase B de *E. coli* foi capaz de assimilar nitrogênio através do amônio citosólico, formando asparagina, por meio do experimento utilizando amônio com nitrogênio marcado (^{15}N).

Em *E. coli* foi relatado que a expressão do gene *asnA* é dependente de uma proteína ativadora, a AsnC, e também é regulada por NtrC, a ativadora transcricional do sistema Ntr. Nesse modelo de regulação, em baixas concentrações de nitrogênio fixado, a NtrC estimula a

síntese do fator Nac. Assim, Nac reprime a expressão do gene *asnC*, impedindo a transcrição de *asnA*. Dessa forma, a expressão de *asnA* é reprimida em condições limitantes de nitrogênio (Poggio *et al.*, 2002).

1.7 Bactérias super fixadoras de nitrogênio

Uma das estratégias para incrementar a possibilidade de aplicação de bactérias fixadoras de nitrogênio como biofertilizantes é o uso de engenharia genética, que exige um conhecimento especializado sobre o metabolismo do organismo e principalmente, neste caso, na assimilação de amônio. *H. seropedicae* tem grande potencial para ser utilizada como biofertilizante na agricultura, mas para que isso ocorra é necessário desenvolver linhagens da bactéria com menor capacidade de assimilar nitrogênio e, conseqüentemente, com maior capacidade de fornecer moléculas nitrogenadas para a planta hospedeira. De fato, diversos trabalhos já demonstraram que modificações nos sistemas de assimilação de amônio em diazotrofos promoveram uma maior capacidade de fixação de nitrogênio, bem como uma capacidade aumentada de excreção de amônio (Machado *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2017; Mus *et al.*, 2018). Dessa forma, a manipulação das vias de assimilação de amônio dessa bactéria pode ser útil para a sua utilização comercial.

Após realizarmos buscas no genoma da *H. seropedicae* SmR1, verificou-se a presença de quatro diferentes genes codificantes de asparagina sintetase, todas do tipo [AsnB], nomeados neste trabalho de *ansB1* (ADJ65681.1), *ansB2* (ADJ64245.1), *ansB3* (ADJ65669.1) e *ansB4* (ADJ65684.1). Possivelmente essa enzima é capaz de utilizar glutamina ou amônio para formar asparagina. No entanto, não há na literatura, pelo nosso conhecimento, qualquer informação sobre a importância de uma ou mais isoformas de asparagina sintetases na assimilação de amônio em *H. seropedicae*. Considerando que a assimilação de amônio é um ponto sensível do metabolismo para interferência com o objetivo de se produzir bactérias com maior capacidade de fixação de nitrogênio, o estudo dessas enzimas se torna interessante. Para determinar o papel de cada isoforma e verificar a possibilidade de assimilação de amônio através desta via, é necessário, em um primeiro momento, estudar o padrão de expressão dos referentes genes em diferentes condições de nitrogênio disponível e então verificar a atividade enzimática no extrato bruto, o que foi realizado no presente trabalho.

Comentado [JA4]: Possivelmente utiliza glutamina e aspartato para formar asparagina e glutamato.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Crescimento bacteriano

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFb-malato (Klassen *et al.*, 1997). A composição do meio NFb-malato é detalhada a tabela 1. No momento do uso, foi adicionada ao meio NFb-malato uma solução de fosfatos (159,4 g/L de KH_2PO_4 e 17,8 g/L de K_2HPO_4) e uma fonte de nitrogênio, conforme detalhado em cada experimento. Duas condições de nitrogênio diferentes foram utilizadas: 20 mM de NH_4Cl para a condição de alto nitrogênio disponível, nomeada neste trabalho como S20. E utilizou-se 5 mM de glutamato para a condição limitante de nitrogênio, nomeada neste trabalho como S5.

Para o preparo do NFb-malato sólido foi adicionado 15 g/L de ágar e para o semi-sólido 1,5 g/L. O estoque das estirpes de *H. seropedicae* foi feito em meio NFb-malato semi-sólido durante este trabalho.

Tabela 1- Composição do meio NFb-malato

Elemento	gramas/litro
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
NaCl	$1,0 \cdot 10^{-1}$
CaCl_2	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Ácido nitrilo-triacético	$5,6 \cdot 10^{-2}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Ácido málico	$5,0 \cdot 10^0$
Biotina	$1,0 \cdot 10^{-4}$
$\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,35 \cdot 10^{-3}$
H_3BO_3	$2,8 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,4 \cdot 10^{-4}$

2.2 Eletroforese de DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose 1% (m/v), segundo descrito por Sambrook e colaboradores (1989).

2.3 Eletroforese de RNA

As eletroforeses de RNA foram realizadas da mesma forma que as de DNA, porém no preparo do gel foi adicionado hipoclorito de sódio com concentração final de 1,5%.

2.4 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita através do método colorimétrico de Bradford. Esse método é baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 com proteínas (Bradford, 1976). O sistema de reação continha um volume final de 200 µL, sendo 170 µL da solução do corante (solução Bradford – 10 mg/L Coomassie Brilliant Blue G-205, 95% etanol e 85% ácido fosfórico) e 30 µL da amostra, a qual foi diluída quando necessário. Essa mistura foi homogeneizada e a absorbância à 595 nm determinada com o auxílio do equipamento Flex Station 3 (Molecular Devices). A curva padrão foi feita utilizando albumina de soro bovina como padrão, preparada no mesmo tampão das proteínas a serem quantificadas. A faixa de sensibilidade deste método foi de 1 a 10 µg de proteína.

2.5 Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico da estirpe SmRI de *H. seropedicae* foi feito seu cultivo em meio NFb-malato líquido, após o crescimento retirou-se algumas alíquotas para tubos eppendorf e em seguida, foram colocados em banho-maria a 80 °C durante 20 minutos.

2.6 Extração de RNA

As moléculas de RNA da estirpe SmRI de *H. seropedicae* foram extraídas pelo método TRIzol™ LS Reagent (Chomczynski and Sacchi, 1987). As bactérias foram cultivadas nas condições desejadas, e 1,5 mL da cultura foi centrifugada a 13000 rpm por 60 s. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspensionado em 1 ml do reagente TRIzol™ LS Reagent. Essa mistura foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos, seguida pela adição de 200 µL de clorofórmio e agitação vigorosa. A mistura então foi incubada a temperatura ambiente por 3 minutos, e então centrifugada a 13000 por 5 min. Após centrifugação, a fase aquosa contendo RNA foi transferida para um novo tubo, no qual o RNA foi precipitado com 500 µL de isopropanol. Em seguida, adicionou-se 500 µL de etanol 70% para lavagem, descartou-se o etanol e a ressolubilização do *pellet* foi feita em 50 µL de água ultrapura livre de RNase. Para conservar o RNA, o mesmo foi armazenado em solução com 3x etanol 100%

e 1/10 de acetato de amônio 7,5M de acordo com a quantidade de RNA extraído e armazenado no freezer.

Comentado [A5]: Inserir concentração utilizada

Comentado [JA6]: Conserva no freezer? Quanto tempo?

2.7 Quantificação RNA

Após dissolver a amostra em água livre de RNase, foi feita a leitura espectrofotométrica em Nanodrop a 260nm e 280nm. Para garantir a pureza da amostra, a razão $A_{260/280}$ deve ficar entre 1,9 e 2,1 e a razão $A_{260/230}$ deve ficar ser de 1,5 a 1,8. O equipamento forneceu a quantidade de RNA em ng/ μ L.

2.8 Reação da DNase

Para a degradação de possível contaminação com DNA genômico, foi utilizado o Kit de DNase I, Amplification Grade (Invitrogen), seguindo as normas do fabricante. Para a reação, foram utilizados 1 μ g de RNA, 1 μ g de 10x DNase I Reaction Buffer, 1 μ g de DNase I e com água ultra-pura livre de RNases q.s.p. 10 μ L de reação. Incubou-se por 15 minutos em temperatura ambiente. Para inativar a DNase foi utilizado 1 μ L de EDTA 25 mM (pH 8.0) e incubou-se por 10 minutos a 65 °C no banho-maria seco.

2.9 Síntese do cDNA

Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa utilizando o Kit iScript[™] cDNA Syntheses (BIO-RAD) seguindo protocolo do fabricante a partir de 1 μ g de RNA total tratado previamente com DNase I. Para cada reação já tratada com DNase I, adicionou-se 4 μ L do iScript[™] Mix, 1 μ L de transcriptase reversa e 4 μ L de H₂O livre de nucleases, completando uma reação com 20 μ L. Em seguida, utilizou-se o termociclador para realizar a conversão de mRNA para cDNAs, seguindo o protocolo de temperaturas mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Ciclo de temperaturas para síntese de cDNA.

Etapa	Temperatura	Duração
Priming	25 °C	5 min
Reverse Transcription	46 °C	20 min
RT inactivation	95 °C	1 min
Hold	4 °C	hold

Síntese de cDNA

Etapa	Temperatura	Duração
Priming	25 °C	5 min
Reverse Transcription	46 °C	20 min
RT inactivation	95 °C	1 min
Hold	4 °C	hold

2.10 RT-qPCR

A quantificação da expressão dos genes *glnA*, *glnE*, *ansB1*, *ansB2*, *ansB3*, *ansB4*, *nifA* e *nifH* foi feita de forma relativa. As análises foram feitas comparando a expressão dos genes na bactéria crescida em condição de alto nitrogênio (20 mM de NH₄Cl) e em baixo nitrogênio (5 mM de glutamato). A estirpe crescida em alto nitrogênio foi considerada como controle para todas as análises, sendo considerada a sua condição normal de crescimento.

A técnica requer um confiável gene de referência para garantir a qualidade dos resultados, para isso utilizamos o gene *rpoA*. Trata-se do gene codificante da subunidade α da RNA polimerase. O gene *rpoA* tem expressão estável e é ideal para uso como referência em estudos de expressão gênica de *H. seropedicae* (Pessoa *et al.*, 2016).

As reações de PCR foram feitas utilizando o kit SYBR[®] Select Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com o manual do fabricante e executadas no equipamento StepOnePlus[™]. Os primers que foram utilizados estão mostrados na tabela 3.

Comentado [JA7]: xcQuantidade de cDNA que foi colocada na reação?

Comentado [JA8]: Qual é a concentração?

Comentado [JA9]: Volume final da reação.

Tabela 3 - Lista de oligonucleotídeos iniciadores (primers) que foram utilizados nas reações de RT-qPCR.

Gene	Direção	Sequência
<i>rpoA</i>	Forward	GCACGAATACTCGTCCCTGG
	Reverse	CCTTCGCCTTCCTTCTTCAG
<i>glnA</i>	Forward	GTCTGGAAGGATGGCAAGAA
	Reverse	TTGGTGATGGCGTTCAGAG
<i>glnE</i>	Forward	GAGTTCACCAGCCAGGTATTC
	Reverse	GGGCGTCTCCAGGTATTG
<i>ansB1</i>	Forward	CATCGGCATTACCGACCTATC
	Reverse	GGAACCAAGGCGCCATAA
<i>ansB2</i>	Forward	CTACCGCTATGCGATGAATGA
	Reverse	CGCTTCGAAGGTGGTCTT
<i>ansB3</i>	Forward	TGTTCTGGTGGGAAGACAAG
	Reverse	CGCAATACCTCTGCGAGATTA

<i>ansB4</i>	Forward	GCCGATCCATACGTTTCAGTT
	Reverse	TCGATGAGACTCTCCAGATCAT
<i>nifA</i>	Forward	CAACTCCAGGGCAAGTACAA
	Reverse	AGGCGCAGGAAATCTACATC
<i>nifH</i>	Forward	AGGCGCAGGAAATCTACATC
	Reverse	GCCAGTTCAGTTCCTTGT

Gene	Direção	Sequência
<i>rpoA</i>	Forward	GCACGAATACTCGTCCCTGG
	Reverse	CCTTCGCCTTCCTTCTTCAG
<i>glnA</i>	Forward	GTCTGGAAGGATGGCAAGAA
	Reverse	TTGGTGATGGCGTTCAGAG
<i>glnE</i>	Forward	GAGTTCACCAGCCAGGTATTC
	Reverse	GGGCGTCTTCCAGGTATTG
<i>ansB1</i>	Forward	CATCGGCATTACCGACCTATC
	Reverse	GGAACCAAGGCGCCATAA
<i>ansB2</i>	Forward	CTACCGCTATGCGATGAATGA
	Reverse	CGCTTCGAAGGTGGTCTT
<i>ansB3</i>	Forward	TGTTTCGTGGTGGGAAGACAAG
	Reverse	CGCAATACCTCTGCGAGATTA
<i>ansB4</i>	Forward	GCCGATCCATACGTTTCAGTT
	Reverse	TCGATGAGACTCTCCAGATCAT
<i>nifA</i>	Forward	CAACTCCAGGGCAAGTACAA
	Reverse	AGGCGCAGGAAATCTACATC

2.11 Quantificação de aminoácidos nos extratos

Os extratos celulares foram obtidos de 3 mL de meio NFb-malato inoculados em suas respectivas condições de nitrogênio. As células foram coletadas por centrifugação ao alcançarem $DO_{600} = 0,9$, ressuspensas em 400 μ L KCl 1% e então lisadas por sonicação.

Para a dosagem dos aminoácidos, foi utilizada uma alíquota de 100 μ L de cada extrato, a qual foi submetida a uma reação de derivatização com O-ftaldialdeído (Benson and Hare, 1975). Para a derivatização, as alíquotas foram acidificadas com 100 μ L de HCl 0,1 M e depois combinadas com 400 μ L de tampão borato-NaOH (pH 9,5). Em seguida, adicionou-se 625 μ L de O-ftaldialdeído e 5 μ L de 2-mercaptoetanol. Após 3 minutos, a solução resultante (20 μ L) foi injetada em um cromatógrafo líquido (Prominence System, Shimadzu®, Japão). Os aminoácidos foram separados usando uma Coluna C_{18} de fase reversa Shimpack® CLC-ODS (M) (250 \times 4,6 mM, tamanho de partícula de 5 μ m) equipada com uma pré-coluna equivalente (10 \times 4,6 mM). O detector de fluorescência foi ajustado com comprimento de onda de excitação em 265 nm e emissão em 480 nm e o resultado foi dado em μ mol/100 μ L de extrato.

2.12 Atividade *in vivo* da asparagina sintetase

Os extratos enzimáticos foram obtidos de 3 mL de meio NFb-malato inoculados em suas respectivas condições de nitrogênio. As células foram coletadas por centrifugação ao alcançarem $DO_{600} = 0,9$, ressuspensas em 400 μ L KCl 1% e então lisadas por sonicação.

Para a atividade enzimática utilizamos o método proposto por Xu H. e colaboradores (2017) com algumas modificações. As reações foram realizadas utilizando 12 μ g de proteínas totais do extrato, em conjunto com o mix reacional contendo HEPES 100 mM, Aspartato 1,6 mM, Glutamina 10 mM ou Amônio 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM e DTT 1 mM. As reações foram disparadas com ATP 100 mM e interrompidas com TCA 20 % após 5 minutos de reação a 30 °C e em seguida foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Para analisar os aminoácidos de interesse utilizamos uma reação de derivatização com O-ftaldialdeído (Benson and Hare, 1975). Para a derivatização, 100 μ L da reação foram acidificados com 100 μ L de HCL 0,1 M e depois combinadas com 400 μ L de tampão borato-NaOH (pH 9,5). Em seguida, adicionou-se 625 μ L de O-ftaldialdeído e 5 μ L de 2-mercaptoetanol e após 3 minutos, injetou-se a reação (20 μ L) em um cromatógrafo líquido (Prominence System, Shimadzu®, Japão). Os aminoácidos foram separados usando um Shimpack® Coluna C_{18} de fase reversa CLC-ODS (M) (250 \times 4,6 mM, tamanho de partícula

de 5 μm) equipada com uma pré-coluna equivalente ($10 \times 4,6 \text{ mM}$). O detector de fluorescência foi ajustado com comprimento de onda de excitação em 265 nm e emissão em 480 nm.

Para calcular a concentração dos aminoácidos a partir das áreas dos picos utilizou-se o método proposto por Brandão, A. D modificado (2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Extração de RNA

A quantidade e qualidade do RNA isolado podem ser avaliadas por espectrofotometria e por isso, neste trabalho utilizou-se o espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c. A leitura em 260 nm como comprimento de onda é realizada para avaliar a quantidade de ácidos nucleicos, já que nesse comprimento de onda se tem a absorção máxima dessas moléculas (Sambrook and Russel, 2001). A razão A_{260}/A_{280} indica, portanto, a pureza do RNA, sendo que os valores adequados são próximos de 2,0. Valores muito inferiores a este podem indicar contaminação com fenol, utilizado na extração, já que esse composto absorve luz próxima a 280 nm (Sambrook and Russel, 2001). Já para a razão A_{260}/A_{230} espera-se valores entre 2,0 e 2,2. Valores abaixo disso, indicam presença de agentes que absorvem luz à 230 nm, como: EDTA, fenol, carboidratos, glicogênio ou guanidina (Nanodrop, 2010). A partir desses parâmetros de qualidade, avaliamos os RNAs isolados para o presente trabalho e podemos garantir a pureza dos mesmos já que a razão A_{260}/A_{230} das amostras ficou entre 2,0 e 2,2 e a razão A_{260}/A_{280} para todas as amostras ficou próxima de 2,0.

Outro parâmetro de qualidade é avaliar a integridade das amostras após a extração, para seguir com a metodologia. Para isso foi realizada eletroforese em gel de agarose com 1,5% de hipoclorito de sódio, ou seja, em condição desnaturante. Isso impede que o RNA se dobre alterando sua estrutura secundária, já que nessa condição as pontes de hidrogênio são rompidas e o RNA migra pelo gel como fita simples.

Essa análise é feita utilizando o rRNA como referência indireta de qualidade, já que é o mais abundante nas células, ocupando cerca de 80 % do RNA celular total, enquanto que o mRNA faz parte de apenas 2 % (Aranda *et al*, 2012).

Como mostra a figura 1, as fitas de RNA estão íntegras em todas as amostras pois apresentaram duas bandas fortes e bem definidas acima, correspondentes aos RNAs ribossomais 23S e 16S. E uma banda mais abaixo, menos definida, correspondente ao RNA 5S. Sabendo que o rRNA está íntegro, consideramos que o mRNA também está, portanto decidimos utilizar as amostras para as análises seguintes (Aranda *et al*, 2012).

Comentado [JA10]: Essa informação já está na metodologia. Sugiro remover de lá e manter aqui na discussão.

Comentado [JA11]: Da célula mesmo? Ou em relação ao total de RNAs?

Comentado [JA12]: Colocar a figura 1 após a citação no texto.

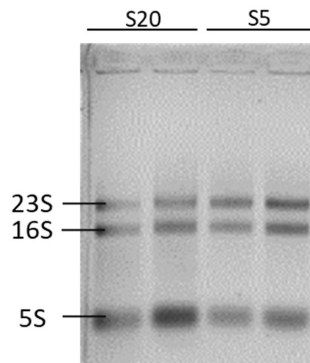


Figura 1: Integridade do RNA. Os dois primeiros poços contêm amostras de RNA da condição S20 e os dois subsequentes, amostras de RNA da condição S5.

3.2 Teste da DNase I

Após a extração adequada de RNA, foi feita a dosagem por meio do Nanodrop a 260 nm e 280 nm. A partir da dosagem de cada amostra, foi utilizado 1 µg de RNA na reação da DNase I Amplification Grade (Invitrogen).

Para verificar a ação da enzima, como um controle, as amostras de RNA extraído foram utilizadas como molde em reações de PCR com oligonucleotídeos iniciadores (primers) para amplificação do gene *nadk*, disponível na tabela 3, já que tem um bom padrão de amplificação já estabelecido pelo grupo anteriormente. Como controle positivo foi feita a amplificação do gene *nadK* utilizando o DNA genômico como molde.

A reação de DNase I garantiu que não há DNA genômico nas amostras S20 e S5, como mostrado na figura 2, a serem utilizadas para síntese de cDNA.

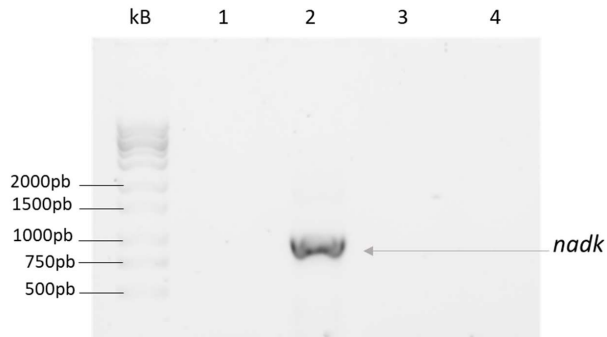


Figura 2: Teste de atividade da DNase I. O primeiro poço contém o marcador de pares de base 1 Kb ladder (Ludwig Biotecnologia), seguido pelo (1) Branco da PCR com *nadk* (sem adição de DNA molde), (2) PCR que teve como molde o DNA genômico da *H. seropedicae* SmR1, (3) e (4) são as amostras de RNA extraído S20 e S5 respectivamente, tratados com DNase I.

Assim, com base no resultado apresentado na figura 2, a degradação de possível DNA genômico contaminante foi efetiva, já que nas reações de PCR que tiveram como molde S20 e S5 (poços 3 e 4) tratadas com DNase I não houve amplificação do gene de *nadk* com 918pb. Esse controle é necessário para que não ocorra falsos positivos na análise por RT-qPCR.

3.3 RT-qPCR

A técnica de RT-qPCR nos permite analisar a expressão gênica e a sua variação conforme alteramos as condições em que uma célula se encontra. E isso é muito importante para a biologia molecular, já que a expressão gênica representa o recrutamento e a intensidade de um conjunto de genes.

Após a confirmação da qualidade do RNA, realizou-se a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando o Kit iScript™ cDNA Syntheses (BIO-RAD) seguindo protocolo do fabricante.

Para verificar o funcionamento dos cDNAs sintetizados, realizou-se PCR convencional utilizando estes como molde e oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene de referência *rpoA* constituído por 129 pb (Figura 3).

Comentado [JA13]: Foi feita a PCR com a amostra de RNA sem tratamento com a DNase? Como você sabe que tinha DNA genômico na amostra de RNA?

Comentado [JA14]: Você que fez a extração do DNA genômico? Não está na metodologia..

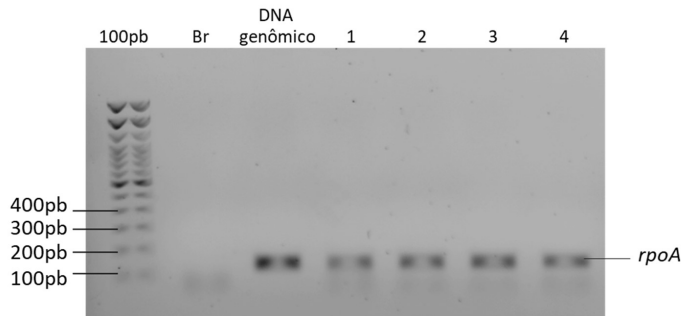


Figura 3: Teste de qualidade do cDNA utilizando o gene *rpoA* (196 pb). 100 pb = marcador de pares de base 100 pb (Ludwig Biotecnologia); Br = branco da PCR, feito na ausência de um molde (controle negativo); DNA genômico = PCR da *rpoA* com molde o DNA genômico da *H. seropedicae* SmR1 (controle positivo); (1) e (2) PCR com molde o cDNA de S20; (3) e (4) PCR com molde o cDNA de S5.

Comentado [JA15]: São replicatas?

Como mostra a figura 3, não houve amplificação no controle negativo, enquanto que houve ótima amplificação no controle positivo. Além disso, as quatro amostras de cDNAs tiveram boa amplificação do *rpoA*, similar ao controle positivo. Portanto, as amostras estavam com qualidade adequada para qPCR.

Neste trabalho, foi utilizado um intercalante fluorescente de DNA, em que a intensidade dessa fluorescência produzida é proporcional à amplificação do gene alvo ao longo da PCR. O agente intercalante utilizado foi o SYBR® Green, um intercalante inespecífico, ou seja, ele pode intercalar qualquer amostra de DNA contida em nossa PCR, por isso é tão importante realizar todos os controles de qualidade e garantir que a fluorescência produzida é somente devido à amplificação dos nossos genes de interesse.

A qPCR foi realizada utilizando o kit SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems) e foi executada no equipamento StepOnePlus™ conforme manual do fabricante, utilizando placas de 96 poços MicroAmp® Fast Optical. Para melhor análise e maior confiabilidade, o experimento foi realizado em duplicata biológica e triplicata técnica.

O procedimento dos ciclos da RT-qPCR que foi utilizado é apresentado na tabela a seguir.

Tabela 4: Procedimento dos ciclos utilizado para RT-qPCR.

Ciclo StepOnePlus (Primer Tm ≥ 60 °C)

Etapa	Temperatura	Duração
Ativação UDG	50 °C	2 min
AmpliTa ^q ® DNA polimerase	95 °C	2 min
Desnaturação	95 °C	3 seg
Anelamento/Extensão	60 °C	30 seg

Ativação UDG é o momento em que a uracil-DNA glicosilase termolábil se torna ativa, e ela hidrolisa ligações uracil-glicosídicas em sítios de DNA contendo dU. Isso permite verificar a ausência de amplificação inespecífica por eletroforese de agarose até 72 horas após a amplificação (SYBR Select Master Mix User Guide).

O equipamento também foi programado para realizar a análise de curva de *melting* logo após os ciclos da qPCR propriamente dita, conforme mostra a tabela 5.

Tabela 5: Procedimento dos ciclos para formação da curva de melting.

Melting (Primer Tm ≥ 60 °C)

Etapa	Temperatura	Duração
Desnaturação	95 °C	15 seg
Anelamento/Extensão	60 °C	1 min
Curva de dissociação	95 °C	15 seg

O perfil de dissociação de cada gene é diferente e ocorre de acordo com o tamanho do fragmento, quantidade de bases e a proporção G/C da sua constituição, pois são regiões mais difíceis de desnaturar devido à presença de três ligações de hidrogênio entre os nucleotídeos.

Na curva de melting, essa característica é utilizada para verificar se a fluorescência emitida é devido à amplificação do alvo e não de dímeros de primers ou fragmentos inespecíficos que podem estar presentes.

Para isso, primeiramente os alvos são desnaturados a 95 °C, em seguida ocorre a etapa de anelamento e extensão a 60 °C. Após a extensão o cDNA se mantém em fita dupla e por isso, nesta fase a fluorescência emitida é máxima. A medida que a temperatura sobe gradativamente (1 °C a cada 15 segundos) o DNA dissocia, ocorrendo a redução da

Comentado [JA16]: O que isso quer dizer?

Comentado [A17R16]: Que esse ciclo é para primer com a temperatura de melting maior ou igual a 60°C

Comentado [JA18]: O que é essa ativação?

Comentado [A19R18]: uracil-DNA glicosilase (UDG) termolábil.

Tratamento com termolábil UDG é útil na prevenção da reamplificação de produtos de PCR.

Ele atua por hidrólise de ligações uracil-glicosídicas em sítios de DNA contendo dU, a enzima causa a liberação de uracil, criando assim um sítio apirimídico sensível a álcalis no DNA. A enzima não tem atividade no RNA ou DNA contendo dT (Longo et al., 1990).

Devido à presença de UDG termolábil, você pode gerar uma curva de melting até 72 horas após a execução da PCR em tempo real e você pode verificar a ausência de amplificação inespecífica por eletroforese em gel de agarose até 72 horas após amplificação.

Comentado [JA20]: Começa em 60 graus ou sobe pra 80 e depois sobe de 1 em 1? Na figura 4 mostra só a partir de 80.

fluorescência emitida. Por fim, forma-se uma curva de decaimento (mostrado um modelo na figura 4), gerando padrões de curvas de acordo com diferentes genótipos (Tomaz *et al*, 2016). A temperatura de melting é a temperatura em que 50 % do fragmento alvo foi dissociado.

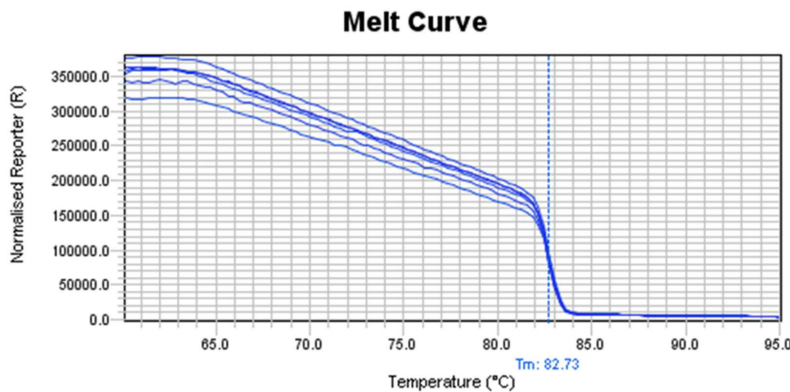


Figura 4: Comportamento de dissociação da dupla fita de DNA em análise da curva de melting do gene *asnB3*. As diferentes curvas em azul indicam as replicatas.

Fazendo a derivatização dos valores da fluorescência desse gráfico, tem-se um gráfico com picos no exato momento da temperatura de *melting*, ou seja, em que o fragmento estava 50% dissociado. Caso esse gráfico apresente mais de um pico para a mesma amostra, pode ser que esteja contaminado com fragmento inespecífico ou haja formação de dímeros de primer. Essa derivatização é realizada automaticamente pelo software StepOne™ v2.3, utilizado neste trabalho.

Com os dados da qPCR, o programa StepOne™ v2.3 gerou os gráficos da expressão de cada gene e os valores de C_t , ou seja, o ciclo da PCR que a amplificação alcançou o *threshold* determinado para cada gene.

Em uma reação de PCR em tempo real, "Ct" significa "Cycle threshold" (limiar de ciclo, em tradução livre). O Ct é um valor numérico que representa o ciclo de amplificação no qual a quantidade de produto de PCR atinge um limiar pré-determinado de detecção (threshold). O Ct é determinado pelo ponto em que o sinal de fluorescência atinge este limiar.

O valor de Ct é utilizado para estimar a quantidade inicial do alvo de amplificação na amostra. Quanto menor o valor de Ct, maior a quantidade do alvo inicialmente presente na amostra.

Threshold é um nível de sinal normalizado que é usado para determinar o Ct nos ensaios de Real Time. Deve estar ajustado acima do *baseline* - região dos primeiros ciclos da reação,

Comentado [JA21]: Melhorar explicação do Ct: Em uma reação de PCR em tempo real, "Ct" significa "Cycle threshold" (limiar de ciclo, em tradução livre). O Ct é um valor numérico que representa o ciclo de amplificação no qual a quantidade de produto de PCR atinge um limiar pré-determinado de detecção. O Ct é determinado pelo ponto em que o sinal de fluorescência ultrapassa o limiar de detecção, indicando que há uma quantidade detectável do produto de PCR. O valor de Ct é utilizado para estimar a quantidade inicial do alvo de amplificação na amostra. Quanto menor o valor de Ct, maior a quantidade do alvo inicialmente presente na amostra. O Ct também é usado para realizar análises comparativas, como a quantificação relativa de expressão gênica entre diferentes amostras, por exemplo, utilizando a técnica de $\Delta\Delta Ct$ (delta delta Ct).

que contém muitos ruídos - mas suficientemente baixo para estar na região de crescimento exponencial de uma amplificação.

3.4 Análises da qPCR

Os dois métodos mais utilizados para analisar a PCR em tempo real são: quantificação absoluta e a quantificação relativa. A quantificação absoluta determina o número de cópias de entrada relacionando a uma curva padrão. Já a quantificação relativa relaciona o sinal de amplificação do alvo em um grupo de tratamento com um grupo controle não tratado.

Para este trabalho, o mais adequado foi utilizar a quantificação relativa usando o Ct comparativo, já que estamos interessados em saber a variação da expressão dos genes alvos entre a condição controle de nitrogênio disponível (20 mM amônio) e a condição de baixo nitrogênio disponível (5 mM de glutamato) e como isso afeta o metabolismo de nitrogênio. Por isso, nessa situação, afirmar que um determinado gene é 2,5 vezes mais expresso em uma condição do que na outra é mais relevante do que afirmar que na mesma condição houve a expressão de 2500 cópias do gene enquanto que no controle houve 1000 cópias (Pfaffl, 2001). Além disso, esta metodologia economiza reagentes já que não é necessário realizar uma curva padrão.

Para isso, utilizou-se o método matemático $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ para comparar os resultados da expressão relativa comparativa, desenvolvido pela Applied Biosystems (Perkin Elmer) (Livak e Schmittgen, 2001). Esse método é baseado em uma transcrição de referência, ou seja, é feita uma normalização do gene alvo com a expressão do gene de referência, normalmente um gene de expressão constitutiva, para compensar variações dentro da própria PCR, isso porque tudo que acontecer com os genes alvo, vai acontecer também com o gene de referência.

Além disso, no modelo matemático de expressão relativa estão incluídos controles adicionais para padronizar cada execução de reação em relação à integridade do RNA, eficiência da transcriptase reversa ou variações de carga de amostra de cDNA (Pfaffl, 2001).

Os valores de Ct dos genes mostrados pelo software StepOne™ v2.3 foram exportados para o Microsoft Excel e a expressão relativa dos alvos foi calculada de acordo com o método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, onde Ct é o ciclo da PCR em que a amplificação atinge o *threshold* (fase logarítmica), e ΔCt é a diferença de expressão ou Cts entre o gene alvo e o controle endógeno da mesma amostra, e $\Delta\Delta Ct$ corresponde à diferença entre o ΔCt da amostra de interesse e o ΔCt da amostra controle:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra tratada} - \Delta Ct \text{ amostra controle}$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ do gene alvo} - Ct \text{ do gene de referência}$$

Comentado [JA22]: Algumas horas fala controle, outras horas alto nitrogênio / maior quantidade de nitrogênio. Padronizar.

Comentado [JA23]: É um site?

Neste caso, o que queremos avaliar é a expressão dos genes alvo citados anteriormente em diferentes condições de crescimento, em baixo nitrogênio S5 (condição tratada) e em alto nitrogênio S20 (condição controle) e o gene de referência utilizado foi o *rpoA*.

$$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{S5} - \Delta Ct_{S20}$$

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{rpoA}$$

A partir dessa relação, obtivemos quanto o gene alvo está mais ou menos expresso na condição de baixo nitrogênio disponível em relação à condição de alto nitrogênio.

3.4.1 Curvas de amplificação

Aqui, consideramos a condição com mais nitrogênio (S20) como a referência para a análise. Então, os valores de *threshold* de cada gene da condição S20 foram dados pelo Software StepOne™ v2.3 e os valores foram aplicados de forma manual para a condição de baixo nitrogênio (S5). Dessa forma, para obter todos os resultados de amplificações deste trabalho, cada gene teve um valor de *threshold* determinado, sendo este valor utilizado tanto para análise da condição S5 quanto para S20.

rpoA

Pessoa e colaboradores (2016) testaram alguns genes *housekeeping* para utilização como genes de referência em análises de RT-qPCR em *H. seropedicae* e o gene *rpoA* apresentou melhores níveis de estabilidade em diferentes fontes de carbono e em diferentes softwares de análise. Por isso, foi escolhido para ser utilizado como controle neste trabalho.

Como já esperado, a sua expressão se manteve estável também com as duas diferentes condições de nitrogênio disponível, assim como mostra a figura 5, comparando sua amplificação nas condições controle e baixo nitrogênio.

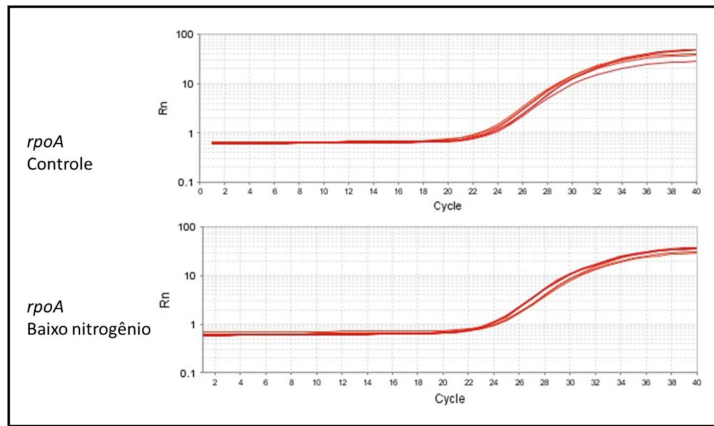


Figura 5: PCR em tempo real do gene *rpoA*. Gráficos da amplificação do *rpoA* gerados pelo Software StepOne™ v2.3 em diferentes condições de nitrogênio disponível.

Utilizando o mesmo *threshold* para ambas condições, o Ct médio do gene *rpoA* foi igual a 25.83903 para S5 e 25.08833 para S20, ou seja, foi necessário a mesma quantidade de ciclos de amplificação para atingir o limiar estabelecido, resultado similar ao obtido por Pessoa e colaboradores em 2016. Por isso, utilizamos este gene como referência em todas as posteriores análises de expressão, fazendo a normalização da técnica.

Porém, como para cada gene alvo foi utilizado um valor de *threshold*, conforme altera-se este valor, altera-se também o Ct do gene de referência, já que é outra forma de normalização da técnica.

nifA

O gene *nifA* codifica a proteína de mesmo nome, que é responsável por ativar a transcrição dos genes *nif*, os quais codificam as proteínas que fazem parte da estrutura e montagem do complexo enzimático da nitrogenase, responsável pela fixação do nitrogênio atmosférico. O gene *nifA* tem sua transcrição ativada pela proteína ativadora NtrC em condições de baixo nitrogênio (Souza *et al*, 1999; Souza *et al*, 2000). Como o padrão de regulação da transcrição do gene *nifA* pelos níveis de nitrogênio já foi bem descrito anteriormente, nós decidimos verificar a expressão desse gene para servir como controle das condições de alto nitrogênio (S20) e nitrogênio limitante (S5). Os resultados são mostrados na figura 6.

Comentado [JA24]: Existe um valor máximo de erro?

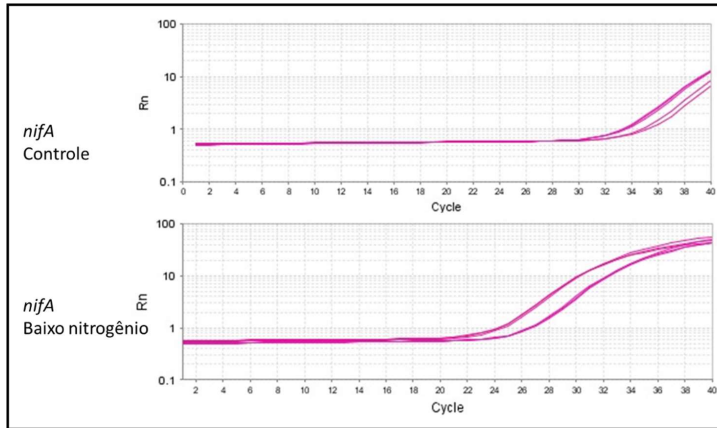


Figura 6: PCR em tempo real do gene *nifA*. Gráficos da amplificação do *nifA* gerados pelo Software StepOne™ v2.3 em diferentes condições de nitrogênio disponível.

A partir dos dados gerados pelo software, estabelecemos o mesmo valor de *threshold* para as duas condições e utilizando o método $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$, tivemos que *nifA* foi quase 1000 vezes mais expresso em baixo nível de nitrogênio disponível do que em alto nitrogênio, como podemos ver no gráfico a seguir.

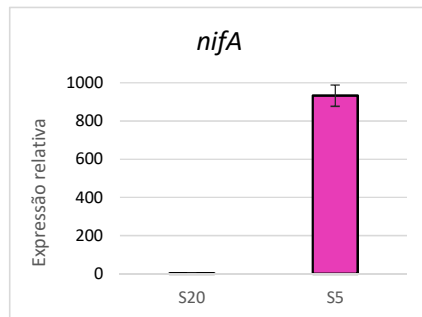


Figura 7: Determinação da expressão relativa de *nifA* entre S20 (20 mM amônio) e S5 (5 mM glutamato).

O resultado corrobora com o modelo de regulação previamente descrito, contribuindo para o aumento da confiabilidade dos nossos métodos de cultivo em baixo e alto nitrogênio e na nossa técnica de RT-qPCR.

Comentado [JA25]: Quanto menor o valor de Ct, maior é a expressão.

Comentado [JA26]: Muito bom! Mais um controle positivo!

nifH

O gene *nifH* codifica uma proteína importante no processo de fixação de nitrogênio, a dinitrogenase redutase, também conhecida como proteína Fe. Essa proteína faz parte do complexo enzimático da nitrogenase: a proteína Fe consome ATP para transferir elétrons para a proteína FeMo, ou dinitrogenase, que utiliza os elétrons transferidos pela proteína Fe para reduzir o nitrogênio atmosférico (Dixon e Kahn, 2004). Sua expressão é regulada por NifA, de acordo com os níveis de oxigênio molecular e de nitrogênio fixado, para minimizar o consumo desnecessário de energia (Monteiro *et al*, 1999; Oliveira *et al*, 2009; Oliveira *et al*, 2012). Portanto espera-se que sua expressão seja maior em condições de baixo nitrogênio fixado e baixo oxigênio. Os resultados da RT-qPCR do gene *nifH* de nas condições S5 e S20 são mostrados na figura 8.

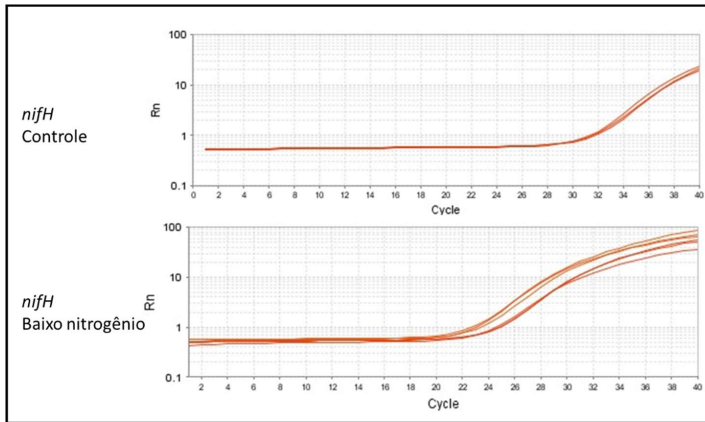


Figura 8: PCR em tempo real do gene *nifH*. Gráficos da amplificação do *nifH* gerados pelo Software StepOne™ v2.3 em diferentes condições de nitrogênio disponível.

A partir dos dados gerados pelo Software e utilizando o método $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ tivemos que a expressão de *nifH* é aproximadamente 900 vezes maior em condição de nitrogênio limitante do que em alto nitrogênio disponível, como mostra a figura 9. Novamente, esse resultado contribui para comprovar o sucesso na simulação de alto nitrogênio (S20) e baixo nitrogênio (S5). Além disso, como NifA é regulada pelos níveis de nitrogênio e oxigênio, esse resultado indica que a alta densidade celular no crescimento propiciou um ambiente de microaerobiose, com uma concentração de oxigênio baixa o suficiente para que NifA fosse capaz de ativar a transcrição a partir de seus promotores.

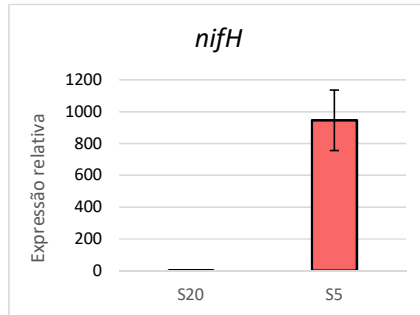


Figura 9: Determinação da expressão relativa de *nifH* entre S20 (20 mM amônio) e S5 (5 mM glutamato).

O resultado acima corrobora com o esperado e contribui para a confiabilidade das técnicas aplicadas.

glnA

O gene *glnA* codifica a enzima glutamina sintetase, responsável por parte da assimilação de nitrogênio da *H. seropedicae* realizando a síntese de glutamina a partir de glutamato, amônio e ATP.

A proteína NtrC é necessária para ativar a expressão de *glnA* de um promotor forte σ^{54} -dependente sob condições limitantes de nitrogênio; porém, em condições de excesso de nitrogênio, NtrC é inativa e a expressão de *glnA* ocorre por meio de promotor σ^{70} constitutivo mais fraco (Persuhn *et al* 2000; Schwab *et al*, 2007). Levando isso em consideração, espera-se encontrar expressão de *glnA* nas duas condições testadas, porém com maior expressão na condição S5. Os resultados experimentais são mostrados na figura 10.

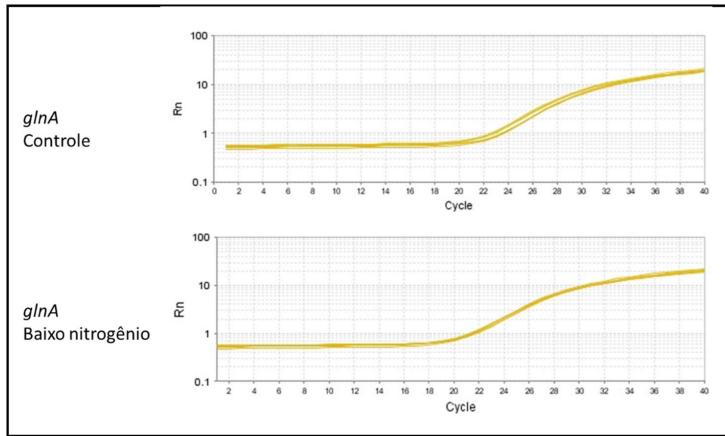


Figura 10: PCR em tempo real do gene *glnA*. Gráficos da amplificação do *glnA* gerados pelo Software StepOne™ v2.3 em diferentes condições de nitrogênio disponível.

O resultado acima não mostra grande diferença visível na expressão de *glnA* entre as duas condições de nitrogênio disponível, porém, a partir do cálculo da expressão relativa tivemos que *glnA* foi 4,5 vezes mais expressa em condição limitante de nitrogênio, como mostra a seguir, corroborando com o modelo de regulação já anteriormente descrito.

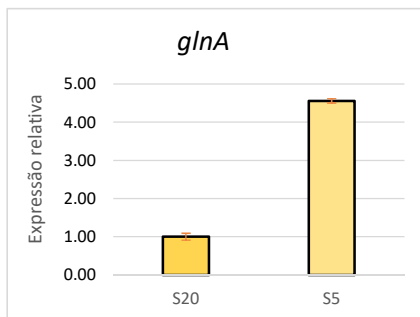


Figura 11: Determinação da expressão relativa de *glnA* entre S20 (20 mM amônio) e S5 (5 mM glutamato).

glnE

O gene *glnE* codifica a enzima bifuncional de mesmo nome, a qual é responsável pela regulação pós-traducional de GS por meio da adenililação e desadenililação. Em condições limitantes de nitrogênio, GlnE é ativada por uma proteína PII, removendo grupos AMP de GS, deixando-a mais ativa para assimilar nitrogênio produzindo glutamina. E em condições de alto nitrogênio disponível, GlnE promove a adição dos grupos AMP em GS, deixando-a mais

Comentado [JA27]: Primeiro resultado que não se sabe o que esperar.

inativa e conseqüentemente reduzindo a assimilação. Muitos trabalhos já se dedicaram a estudar com detalhes a regulação da atividade de GlnE, no entanto, até onde vai nosso conhecimento, não há estudos relacionados com a regulação da expressão de *glnE*. Com isso, buscamos saber se há variação na expressão desse gene entre as duas condições de nitrogênio estabelecidas. Os resultados são mostrados na figura 12.

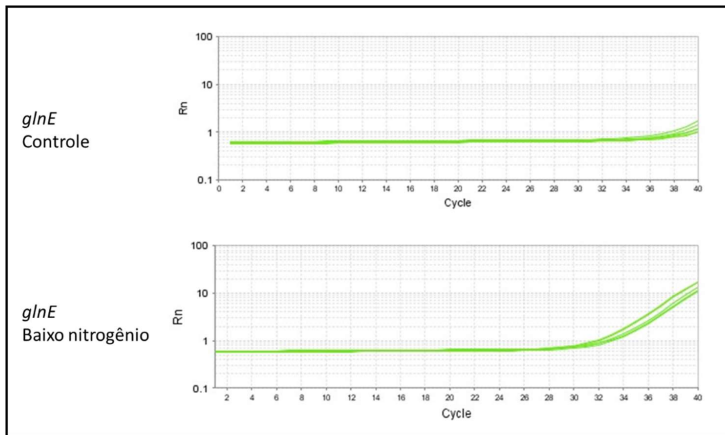


Figura 12: PCR em tempo real do gene *glnE*. Gráficos da amplificação do *glnE* gerados pelo Software StepOne™ v2.3 em diferentes condições de nitrogênio disponível.

É perceptível nos resultados acima que *glnE* teve menor expressão em alto nitrogênio, porém na condição de nitrogênio limitante sua expressão também foi baixa, já que sua amplificação só alcançou o *threshold* estabelecido após o 30º ciclo da qPCR.

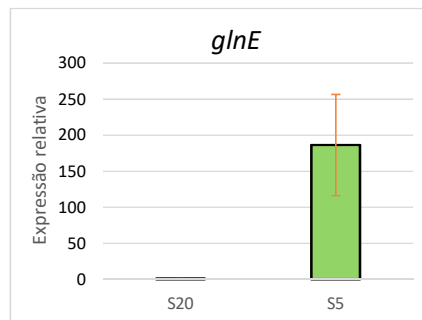


Figura 13: Determinação da expressão relativa de *glnE* entre S20 (20 mM amônio) e S5 (5 mM glutamato).

Como a expressão em alto nitrogênio foi praticamente nula, os valores de Ct ficam mais sujeitos a interferências devido à amplificação de dímeros de primers e outros fatores, isso acaba gerando um valor de erro maior do que o adequado. Porém, mesmo considerando esse erro, *glnE* foi no mínimo 100 vezes mais expresso em baixo nitrogênio, como mostra a figura 13.

asnB1

Como já foi discutido anteriormente, não há na literatura informações sobre a regulação da expressão dos genes codificadores da Asparagina Sintetase de *H. seropedicae*. Com a técnica RT-qPCR, buscamos analisar o padrão de expressão das quatro isoformas e possível efeito nas respectivas expressões devido a diferentes condições de nitrogênio.

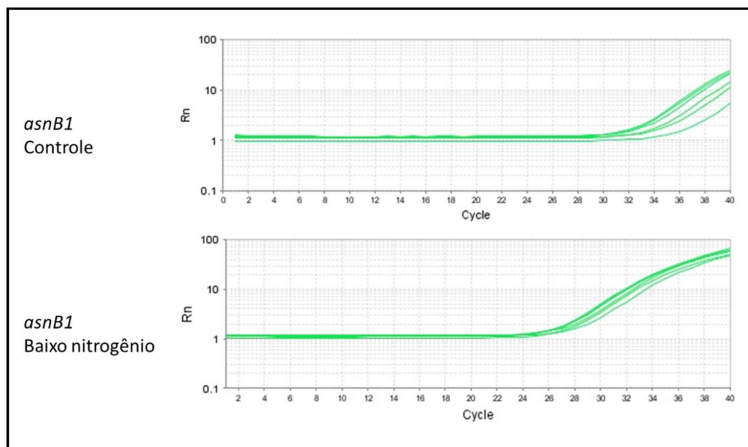


Figura 14: PCR em tempo real do gene *asnB1*. Gráficos da amplificação do *asnB1* gerados pelo Software StepOne™ v2.3 em diferentes condições de nitrogênio disponível.

Os resultados mostraram que *asnB1* foi mais expresso em condição limitante de nitrogênio, já que alcançou o *threshold* estabelecido próximo ao 28º ciclo, enquanto que na condição de 20 mM de amônio isso ocorre somente no 34º ciclo.

Para um resultado quantitativo, utilizou-se os dados gerados pelo Software e com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ tivemos que a expressão de *asnB1* é aproximadamente 100 vezes maior em condição de nitrogênio limitante do que em alto nitrogênio disponível, como mostra a figura 15.

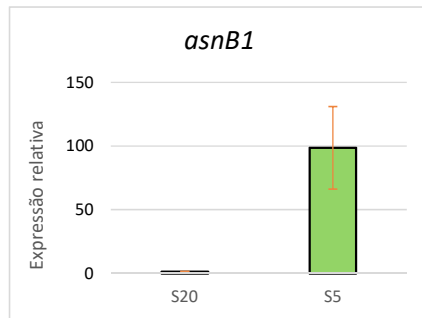


Figura 15: Determinação da expressão relativa de *asnB1* entre S20 (controle) e S5 (baixo nitrogênio).

asnB2

O gene codificante da isoforma AsnB2 praticamente não foi expresso em nenhuma das duas condições de nitrogênio disponível, como mostra o gráfico da RT-qPCR na figura 16. Com isso, o software não gerou valores de Ct para realizarmos o cálculo do método da expressão relativa, já que a amplificação não alcançou o valor do *threshold* estabelecido.

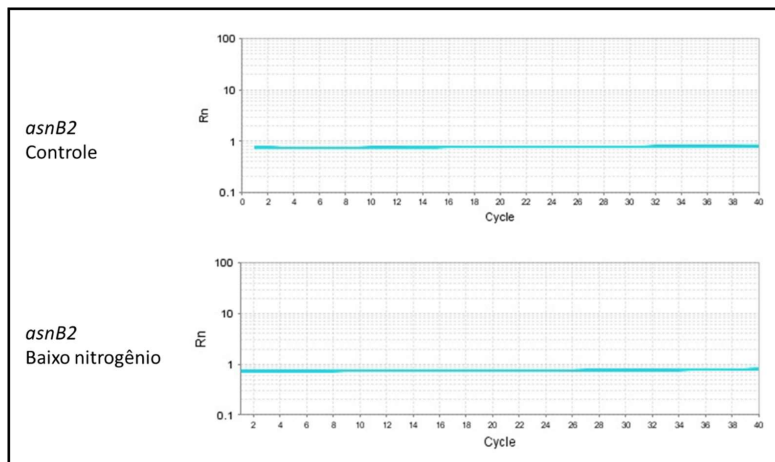


Figura 16: PCR em tempo real do gene *asnB2*. Gráficos da amplificação do *asnB2* gerados pelo Software StepOne™ v2.3 em diferentes condições de nitrogênio disponível.

A ausência de amplificação indicada na figura 16 não pode ser atribuída a problemas dos primers de *asnB2*, já que todos os mesmos foram testados em PCR convencional antes de ser feita a RT-qPCR. O primer se mostrou efetivo pois houve amplificação do gene *asnB2* com aproximadamente 200 pb quando utilizado como molde o DNA genômico de *H. seropedicae* (Figura 17). É possível que as condições testadas aqui nesse trabalho não sejam adequadas para

a expressão, a qual dependeria de algum fator específico para a desrepressão. Alternativamente, é possível que esse gene nunca seja expresso, e a sequência encontrada seja um pseudogene.

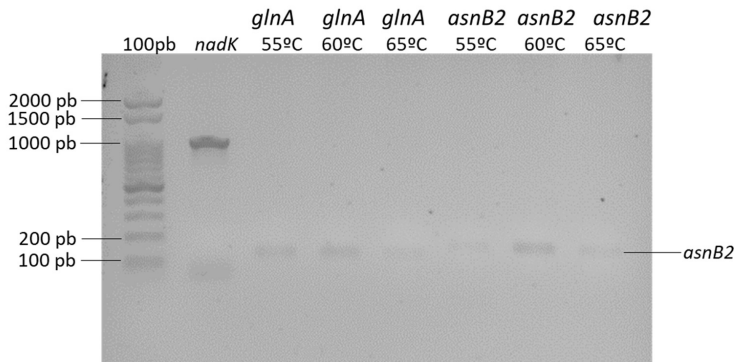


Figura 17: Teste dos primers de *glnA* e *asnB2*. PCR convencional utilizando DNA genômico de *H. seropedicae* e diferentes temperaturas de anelamento, para verificar a melhor temperatura para amplificação de cada primer. O primeiro poço contém o marcador de pares de base 100 pb (Ludwig Biotecnologia), seguido pela amplificação do primer para *nadK* com 918 pb (controle da amplificação). Em seguida, temos PCR com *glnA* e *asnB2* em 55 °C, 60 °C e 65 °C.

asnB3

Os resultados mostraram que *asnB3* foi pouco mais expresso em condição limitante de nitrogênio, já que alcançou o *threshold* estabelecido próximo ao 25º ciclo, enquanto que na condição de 20 mM de amônio isso ocorre próximo ao 26º ciclo.

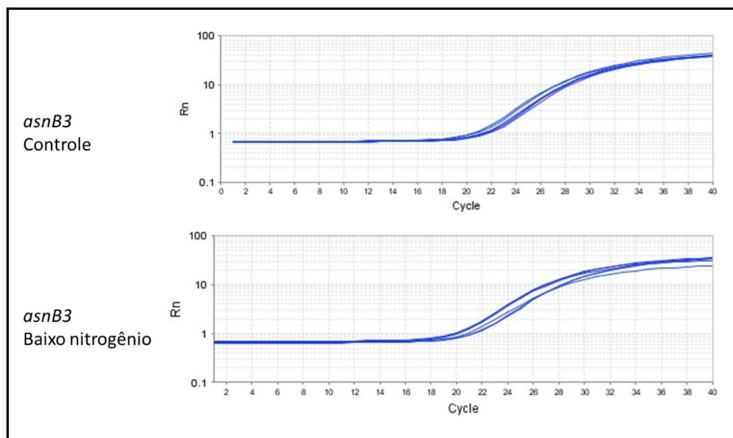


Figura 18: Determinação da expressão relativa de *asnB3* entre S20 (20 mM amônio) e S5 (5 mM glutamato).

Como os gráficos anteriores mostraram uma amplificação muito similar, para um resultado quantitativo, utilizou-se os dados gerados pelo Software e o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Obtivemos que a expressão de *asnB3* é aproximadamente 2 vezes maior em condição de nitrogênio limitante do que em alto nitrogênio disponível, como mostra a figura 19. De todos os genes das isoformas AsnB analisados no presente trabalho, esse é o que teve menor diferença nas duas condições de nitrogênio testadas.

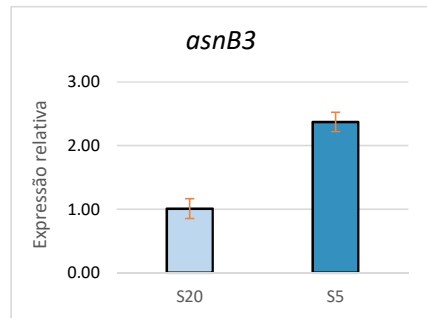


Figura 19: Determinação da expressão relativa de *asnB3* entre S20 (controle) e S5 (baixo nitrogênio).

asnB4

Os resultados mostraram que *asnB4* foi mais expresso em condição limitante de nitrogênio, já que alcançou o *threshold* estabelecido próximo ao 20º ciclo, enquanto que na condição de 20 mM de amônio isso ocorre próximo ao 23º ciclo.

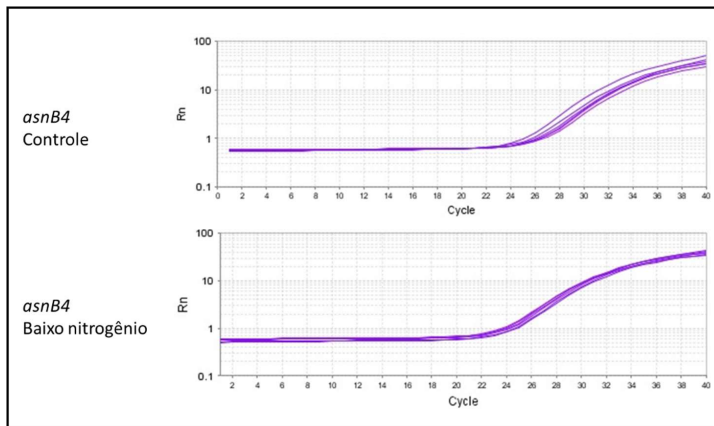


Figura 20: Determinação da expressão relativa de *asnB4* entre S20 S20 (controle) e S5 (baixo nitrogênio).

Para um resultado quantitativo, utilizou-se os dados gerados pelo Software e com o método $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ tivemos que a expressão de *asnB4* é aproximadamente 7 vezes maior em condição de nitrogênio limitante do que em alto nitrogênio disponível, como mostra a figura 20.

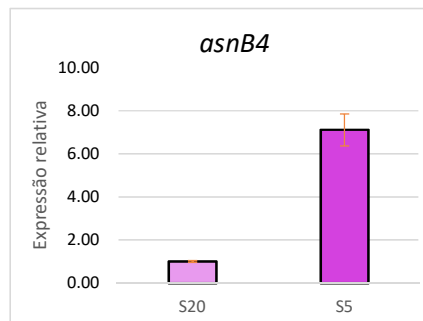


Figura 21: Determinação da expressão relativa de *asnB4* entre S20 (controle) e S5 (baixo nitrogênio).

Os resultados de expressão utilizados como controle da técnica (*rpoA*, *nifA* e *nifH*) nos mostraram confiabilidade, já que condizem com estudos anteriores e resultados já esperados. Em relação aos genes codificadores das proteínas AsnB, os resultados nos mostram que há diferenças nos níveis de expressão de acordo com a condição de nitrogênio disponível, sendo que *asnB1*, *asnB3* e *asnB4* são mais expressas em nitrogênio limitante, enquanto *asnB2* não foi expressa em nenhuma das condições. Além disso, *asnB1* teve maior diferença de expressão em relação as outras. Tais resultados podem significar uma relação funcional das respectivas enzimas de acordo com as condições de crescimento da *H. seropedicae*.

3.5 Quantificação de aminoácidos nos extratos

Os resultados mostrados nas figuras 14, 18 e 20 sugerem que 3 dos 4 genes codificadores da Asparagina Sintetase de *H. seropedicae* são expressos. Os resultados indicam, ainda, que parece haver uma diversidade funcional entre eles, já que o gene *asnB1* é aparentemente muito mais expresso na condição de repressão do que *asnB3* e *asnB4*. A análise do mapa do metabolismo de aminoácidos de *H. seropedicae* contido no KEGG (Kenisha e Goto, 2000) mostrou que essa bactéria possui apenas uma via capaz de sintetizar asparagina, a que usa uma das isoformas da Asparagina Sintetase B, código 6.3.5.4 (Figura 22). Dessa forma, se nós quantificássemos o aminoácido asparagina em extratos celulares de *H. seropedicae* nas condições S20 e S5 teríamos uma indicação apenas da atividade das isoformas *asnB1*, *asnB3* e *asnB4*. As quantificações foram feitas utilizando HPLC e estão mostradas na figura 23.

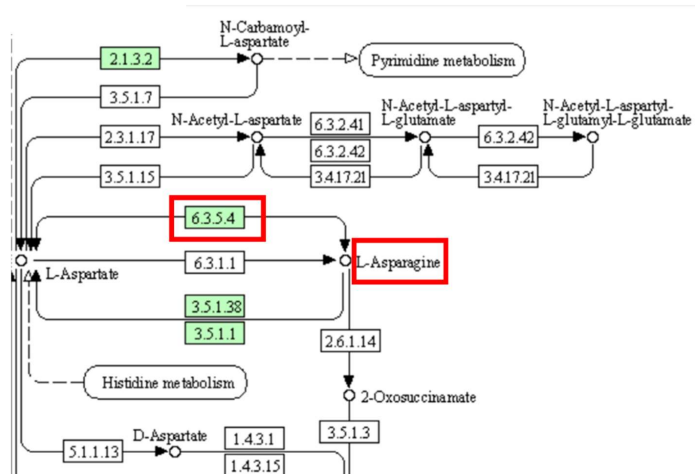


Figura 22: Recorte do mapa metabólico do KEGG (código hse00250) – metabolismo de alanina, aspartato e glutamato. Os nós representam metabólitos e as caixas representam enzimas. As enzimas hachuradas em verde estão presentes na bactéria *H. seropedicae*, e com fundo branco estão ausentes. A asparagina e a Asparagina Sintetase estão destacadas na moldura vermelha.

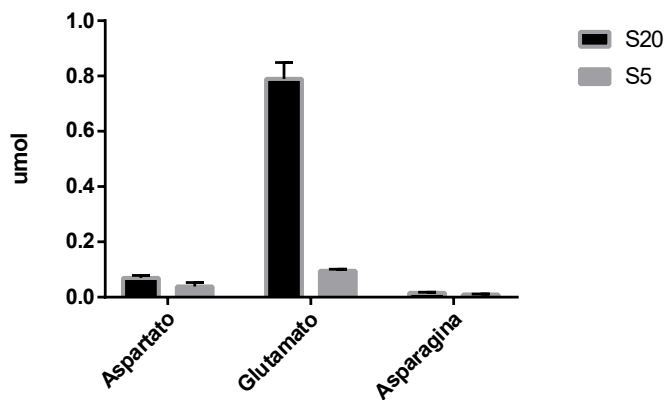


Figura 23: Quantificação *in vivo* de aminoácidos. Utilizou-se uma alíquota 100 μL de cada extrato S20 e S5 para a reação de derivatização com OPA e então aplicadas no HPLC para quantificação de aspartato, glutamato e asparagina. A quantificação foi feita em duplicada biológica e é dada em μmol de cada aminoácido por 100 μL de extrato.

A quantificação *in vivo* dos aminoácidos nos mostra que glutamato está presente em grande quantidade no extrato na condição de excesso de nitrogênio e muito pouco em baixo

nitrogênio. Em condições limitantes de nitrogênio, a enzima GlnE promove a desadenililação de GS, aumentando a sua atividade, que consiste na amidação do glutamato para formar glutamina. Possivelmente, a baixa concentração intracelular de glutamato encontrada na condição S5 se deve à alta atividade de GS nessas condições, que consome o *pool* de glutamato para formar glutamina, a qual, por sua vez, é consumida pelas reações biossintéticas. Em altas concentrações de amônio (S20), a GS é adenilada por GlnE, diminuindo a sua atividade. Com uma menor atividade de GS, o *pool* de glutamato fica protegido da atividade de GS e se acumula.

O resultado da quantificação intracelular de glutamato é diferente do que foi encontrado em outro trabalho para *E. coli*, onde a concentração intracelular de glutamato permaneceu estável em qualquer condição de nitrogênio testada (Schumacher *et al*, 2013). Em *E. coli*, supõe-se que os níveis de glutamato são protegidos mesmo em baixo amônio por ele possuir uma presumida função homeostática para a célula (Yan, 2007). Nas enterobactérias, altas concentrações intracelulares de glutamato são associadas com a manutenção de um balanço de íons potássio, agindo como um contra-íon (Yan *et al*, 1996). A grande variação na concentração intracelular de glutamato em *H. seropedicae* mostrada na figura 23 sugere que a homeostase iônica nesta bactéria parece envolver um mecanismo diferente.

Aspartato e asparagina estão presentes em pouca quantidade em ambas as condições, quando comparado com o glutamato. Porém, a quantificação desses aminoácidos nos extratos não pode ser considerada como produto da atividade de Asparagina sintetase, pois assim que se ocorre a síntese, eles são consumidos por outras vias metabólicas da bactéria.

3.6 Atividade das Asparaginas Sintetases de *H. seropedicae* em extratos celulares

Com a dificuldade na detecção da Asparagina nos extratos intracelulares (Figura 23), e considerando que a concentração intracelular de Asparagina não é apenas função da atividade das Asparagina Sintetases, mas também do consumo da Asparagina pelas asparaginases, nós decidimos verificar a atividade imediata das Asparagina Sintetases dos extratos celulares S5 e S20. Esse experimento também permitiria verificar a atividade das isoformas utilizando glutamina ou amônio como substrato. Para isso, nós misturamos aspartato com amônio ou glutamina, na presença de ATP, e verificamos a formação de asparagina após a adição de extratos bacterianos S5 ou S20. Os resultados são mostrados na figura 24. Nenhuma asparagina foi detectada no controle sem adição de aspartato (dados não mostrados). Portanto, os resultados apresentados não são referentes à asparagina endógena e correspondem à atividade imediata da Asparagina Sintetase do extrato.

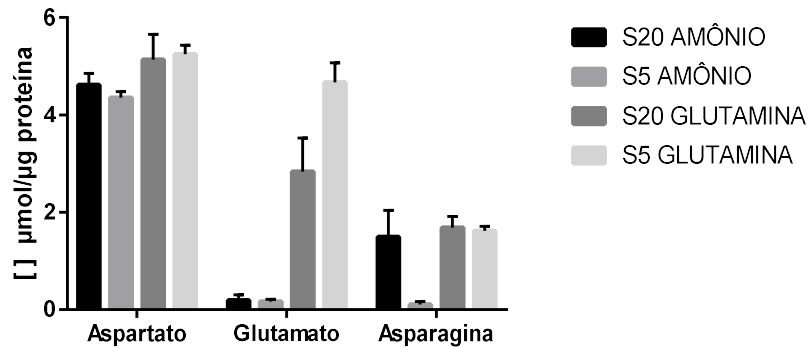


Figura 24: Atividade das isoformas de Asparagina sintetase B no extrato bruto de *H. seropedicae*. Extrato controle (S20) com amônio e extrato baixo nitrogênio (S5) com amônio são as reações feitas com os extratos crescidos em respectiva condição e com amônio 10 mM como principal substrato. Extrato controle (S20) com glutamina e extrato baixo nitrogênio (S5) com glutamina são as reações feitas com os extratos crescidos em respectiva condição e com glutamina 10 mM como principal substrato da reação.

Comentado [JA28]: Extrato controle + amônio; Extrato baixo nitrogênio + amônio.

A partir do resultado apresentado concluímos primeiramente que o aspartato adicionado foi o suficiente para a reação acontecer, pois mesmo após a reação tem grande concentração do aminoácido. Portanto, uma possível falta de asparagina não poderia ser devido a falta do substrato.

Além disso, vemos que o glutamato não foi formado na reação com amônio mas foi produzido com o substrato glutamina, em que provavelmente a glutamina utilizada na reação sofreu transaminação com 2-OG e formou-se glutamato. Porém, sua formação foi ainda maior na condição de desrepressão de nitrogênio, provavelmente por estar acontecendo mais a assimilação pela GS e em seguida a ação da GOGAT, produzindo mais glutamato.

Em relação a formação de asparagina, nas duas condições de nitrogênio disponível com glutamina como substrato houve praticamente a mesma produção de asparagina, provavelmente por transaminação da glutamina.

Asparaginas sintetases em contato com aspartato e amônio podem realizar a assimilação do nitrogênio, e o resultado da figura 24 nos mostra que só houve assimilação na condição de alto nitrogênio. Um resultado inesperado, já que a expressão dos genes *asnB1*, *asnB3* e *asnB4* foi maior em condição de repressão de nitrogênio (Figuras 14, 18 e 20). Embora esses genes de fato estivessem sendo mais expressos na condição S5, a expressão em S20 foi observada

para os 3 genes, sendo que *asnB1* estava com expressão bem maior em relação as outras duas. Dessa forma, a hipótese que temos é que mesmo a isoforma B1 sendo muito mais expressa que B3 e B4 em baixo nitrogênio, ela não promoveu a assimilação como mostrado na figura 23. Enquanto que B3 e B4 são bem expressas em alto nitrogênio, indicando que uma delas, ou mesmo ambas, são candidatas a serem capazes de realizar a assimilação do mesmo.

Além disso, sabendo que GS é mais inibida na condição em condição de alto nitrogênio, outra hipótese formada a partir dos dados desse trabalho é que as isoformas B3 e B4 atuem nesse papel de inibição, sendo que é a condição que elas mais assimilaram nitrogênio. Nesse modelo de assimilação de amônio em *H. seropedicae*, a via GS-GOGAT é responsável pela assimilação de amônio de alta afinidade quando ele está em baixas concentrações no ambiente. Em condições de alto amônio, a GS está inibida, tanto por adenililação quanto por regulação alostérica, e o amônio é assimilado por Asparagina Sintetase.

4. CONCLUSÕES

- Os genes *ansB1*, *ansB3* e *ansB4* de *H. seropedicae* são expressos e têm sua expressão regulada pelos níveis de nitrogênio ambiental.
- O glutamato se acumula no citosol de células de *H. seropedicae* crescendo em alto amônio.
- As isoformas das Asparagina Sintetase de *H. seropedicae* são capazes de formar asparagina a partir de glutamina ou amônio.

5. REFERÊNCIAS

- ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in Soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v. 252, p. 1-9, 2003.
- ARANDA, P. S.; LAJOIE, D. M.; JORCYK, C. L. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. **Electrophoresis**, v. 33, n. 2, p. 366-369, 2012.
- ARCONDEGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 80-105, 2001.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V. L. D.; SAMPAIO, M. J. A. M.; DOBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 56, p.365, 1984.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Sys. Bacteriol.**, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F.; DOBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65-73, 1992.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An. Acad. Bras. Ciênc.** v. 77, n. 3, 2005.
- BÁSTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regul.** v. 24, p. 7-11, 1998.
- BENDER, R. A., JANSSEN, K. A., RESNICK, A. D., BLUMENBERG, M., FOOR, F., & MAGASANIK, B. Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. **Journal of Bacteriology**, 129(2), 1001-1009, (1977).
- BENSON, J. R., HARE, P. E., O-phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 72:619-622, 1975.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization: the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANDÃO, A. D. Papel da redutase do nitrato em soja [*Glycine max* (L.) Merr. Cv [AC-17] sob condições de hipóxia do sistema radicular. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- BULEN, W. A.; LECOMTE, J. R. The Nitrogenase System of *Azotobacter*: two-enzyme requirement for N₂ reduction, ATP-dependent H₂ evolution and ATP-hydrolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 56, p. 979-986, 1966.

CLANCY, P.; XU, Y., VAN HEESWIJK, W.C., VASUDEVAN, S.G., OLLIS, D.L. The domains carrying the opposing activities in adenylyltransferase are separated by a central regulatory domain. **FEBS J**, v. 274, p. 2865-2877, 2007.

COMMICHAU, F. M., FORCHHAMMER, K., STÜLKE, J. Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. **Cur Opin Microbiol**. 9: 167-172, 2006.

CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. 1987 Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. **Anal. Biochem**. 162, 156-159

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, A. B.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L) Merrill). **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67. p. 2375 – 2379, 2001.

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

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v.2012, p. 1-15, 2012.

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

HAGEMAN, R. V.; BURRIS, R. H. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 75, p. 2699-2702, 1978.

HELLING, R. B. Pathway Choice in Glutamate Synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 180: 4571-4575, 1998.

HUERGO, L. F.; NOINDORF, L.; GIMENES, C.; LEMGRUBER, R. S. P.; CORDELINI, D. F.; FALARZ, J.; CRUZ, L. M.; MONTEIRO, R. A.; PEDORA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R. Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* reveals ammonium-induced AmtB-dependent membrane sequestration of PII proteins. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 308, p. 40-47, 2010.

JAMES, C. L. & VIOLA, R. E. Production and characterization of bifunctional enzymes. Domain swapping to produce new bifunctional enzymes in the aspartate pathway. **Biochemistry**, v. 41, p. 3720–3725, 2002.

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

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

- MERRICK, M. J., EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Reviews**, v. 59: 604-622, 1995.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; GOVINDARAJAN, M.; VADIVELU, M.; REVATHI, G. N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. **Microbiol. Res.**, v. 161, p. 238-245, 2006.
- NELSON, D. L., COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 5. ed. São Paulo: **Artmed**, 2011.
- OLIVARES, F. L.; JAMS, E. K.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugarcane by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **New Phytol.**, v. 135, p. 723-737, 1997.
- POGGIO, S., DOMEINZAIN, C., OSORIO, A., CAMARENA, L. The nitrogen assimilation control (Nac) protein represses *asnC* and *asnA* transcription in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.** 206: 151-156, 2002.
- PERSUHN D. C, SOUZA E. M, STEFFENS M. B. R., PEDROSA F. O., YATES M. G., RIGO L. U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol Lett** 192:217–221, 2000.
- PESSOA, D. D. V. Validation of reference genes for RT-qPCR analysis in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of microbiological methods**, v. 127, p. 193-196, 2016.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.
- REITZER, L. Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 155-176, 2003.
- RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M. B. R. and SOUZA. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* 936 Maize colonization by *H. seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 45 p. 39-47, 2003.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 2ed., 1989.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.
- SCHWAB S., SOUZA E.M., YATES M.G., PERSUHN D.C., STEFFENS M.B.R., CHUBATSU L.S., PEDROSA F.O., RIGO L.U. The *glnAntrBC* operon of *Herbaspirillum seropedicae* is transcribed by two oppositely regulated promoters upstream of *glnA*. **Can J Microbiol** 53:100–105, 2007.
- TOMAZINI, L.F. Regulação do estado de modificação pós-traducional da Glutamina Sintetase de *Herbaspirillum seropedicae*. **Dissertação de Mestrado** (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá), 2020.

TOMAZ, P. R. X.; SANTOS, J. R.; SANTOS, P. C. J. L. Aspectos da aplicabilidade da análise da curva de melting. **RBAC**, v. 48, n. 1, p. 19-23, 2016.

VAN HEESWIJK, W.C., WESTERHOFF, H.V., BOOGERD, F.C. Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: Putting molecular data into a systems perspective. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77: 628-95, 2013.

YAN D, IKEDA TP, SHAUGER AE, KUSTU S. **Proc Natl Acad Sci USA**, 93:6527–6531, 1996.

YAN D. Protection of the glutamate pool concentration in enteric bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 104:9475–9480, 2007.

YURGEL, S.N., RICER, J., KAHN, M. Transcriptome analysis of the role of GlnD/GlnNK in Nitrogen Stress adaptation by *Sinorhizobium mililoti Rm1021*. **PLoS ONE** 8(3): e58028, 2012.