

**REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE
Gluconacetobacter diazotrophicus POR FOSFORILAÇÃO DE UMA
TIROSINA QUINASE**

KATYANNE MACIEL WANDERLEY

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA

CAMPINA GRANDE - PB

FEVEREIRO 2019

**REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE
Gluconacetobacter diazotrophicus POR FOSFORILAÇÃO DE UMA
TIROSINA QUINASE**

KATYANNE MACIEL WANDERLEY

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Ciências Agrárias/Área de concentração: Biotecnologia e melhoramento vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses

CAMPINA GRANDE

FEVEREIRO DE 2019

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

P436r Pereira, Katyanne Maciel Costa.
Regulação da biossíntese de exopolissacarídeos de *Gluconacetobacter diazotrophicus* por fosforilação de uma Tirosina quinase [manuscrito] / Katyanne Maciel Costa Pereira. - 2019.
44 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2019.
"Orientação : Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses, Coordenação de Curso de Biologia - CCBS."
1. Fosforilação. 2. Tirosina quinase. 3. Regulação gênica.
4. Endofítico diazotrófico. I. Título
21. ed. CDD 571.2

**REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE
Gluconacetobacter diazotrophicus POR FOSFORILAÇÃO DE UMA
TIROSINA QUINASE**

KATYANNE MACIEL WANDERLEY

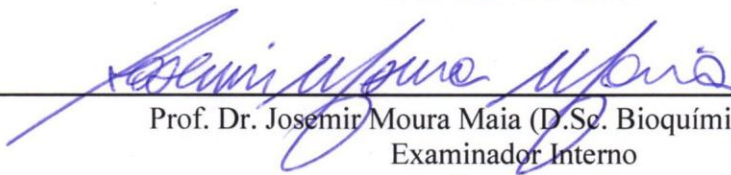
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Ciências Agrárias/Área de concentração: Biotecnologia e melhoramento vegetal.

Aprovada em: 25 / 02 / 19

Banca Examinadora:



Dra. Marcia Soares Vidal (D.Sc. Ciências Biológicas, Genética) – EMBRAPA
Agrobiologia
Examinador Externo



Prof. Dr. Josemir Moura Maia (D.Sc. Bioquímica) – UEPB
Examinador Interno



Prof. Dr. Carlos Henrique S. Gadêlha Meneses (D.Sc. Biotecnologia Vegetal) – UEPB
Orientador

A minha mãe Maria Suely e a minha filha Maria Alice, que de formas diferentes, essas Maria's me ensinam o verdadeiro valor da vida. Obrigada Mãe, pelo incentivo primordial para que eu chegasse até aqui.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora por nunca desistirem de mim. Obrigada por todo discernimento, sabedoria, força e livramentos por toda a caminhada, obrigada por tanto amor, por tudo. Sem a vossa presença não sou nada!

A minha mãe por todo esforço em me manter estudando longe de casa, e mesmo com todos os obstáculos que surgiram, nunca desistiu de me passar o que à fez vencedora: A EDUCAÇÃO!

Em especial a meu marido, companheiro de jornada, parceiro, amigo leal, por toda paciência e incentivo. Obrigada meu amor, pois nos momentos de estresse e ansiedade me ouviu, acalmou e me deixou “de pé”, demonstrando todo seu cuidado, amor e atenção.

A minha família, por tantos ensinamentos. Cada um com seu jeitinho especial me ensinam a enxergar um mundo melhor e a nunca desistir. A certeza que nunca estarei só. Ohana!

A meu orientador, parceiro de pesquisa e além de tudo grande amigo Professor Carlos Meneses, obrigada pela confiança depositada, por em momentos de muitas dúvidas não me deixar desistir me mostrando que tudo posso. Se hoje já estou aprovada em um doutorado, grande parcela é sua, que me apoiou, incentivou e vibrou junto comigo. Obrigada de coração!

Aos amigos do mestrado que tornaram a jornada mais leve, somando e dividindo. Em especial, minha amiga Bárbara, que por muitas vezes escutou pacientemente, minhas dúvidas e anseios. Obrigada amiga, você é especial!

As amigas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (Isabella, Vitória, Izamara) que trouxeram alegria e “leseiras” na reta final. E o Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Universidade Federal da Paraíba, onde foi feito os ensaios de fosforilação *in vivo*. Muito obrigada.

A Universidade Estadual da Paraíba e a todos que fazem o programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

A todos os professores por todos ensinamentos divididos e momentos compartilhados. Em especial, Professor Josemir Moura Maia e professora Márcia Soares Vidal, membros da banca, por todas contribuições que serão geradas para a conclusão do trabalho.

A CAPES/FAPESQ pela concessão da bolsa de estudo, fundamental para realização do trabalho.

Quero agradecer a todos que colaboraram, direta ou indiretamente para realização de mais essa etapa da minha vida.

Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1.INTRODUÇÃO	13
1.2 Objetivo geral.....	15
1.2 Objetivos específicos	15
2.REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	16
2.2 Interação entre <i>G. diazotrophicus</i> e arroz.....	18
2.3 Exopolissacarídeos.....	19
2.4 Tirosinas de fosforilação e de desfosforilação em bactérias.....	20
2.5 Tirosinas quinases bacterianas.....	20
2.6 Proteínas fosfotirosinas fosfatases.....	21
2.7 Alvos das tirosinas quinases e seu papel fisiológico.....	21
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Caracterização do local da pesquisa.....	23
3.2 Meio de cultivo.....	23
3.3 Caracterização in silico da proteína tirosina quinase no genoma de <i>G. diazotrophicus</i> Pal5.....	23
3.4 Ensaio da atividade da proteína tirosina quinase com ATP radiomarcado.....	24
3.5. Ensaio de imunoprecipitação para detecção da dinâmica de fosforilação da proteína tirosina quinase com ATP radiomarcado.....	26

3.6. Expressão gênica da tirosina quinase quando <i>G. diazotrophicus</i> é crescida em diferentes fontes de carbono.....	27
3.7. Análises estatística.....	28
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Análise computacional da proteína codificada por GDI2549 de <i>G. diazotrophicus</i>	29
4.2 Atividade da proteína tirosina quinase de <i>G. diazotrophicus</i>	34
4.3 Expressão gênica da tirosina quinase em diferentes fontes de carbono.....	37
5.CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Detalhamento dos primers utilizados.....	28
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização da região de domínio conservado na sequência de aminoácidos de GDI2549.....	29
Figura 2. Alinhamento da região C-terminal conservada de GDI2549 de <i>G. diazotrophicus</i> , com os atribuídos a partir de proteínas como tirosina quinases.....	30
Figura 3. Árvore filogenética das proteínas tirosinas quinases dos organismos analisados.....	31
Figura 4. Predição da estrutura secundária de GDI2549 de <i>G. diazotrophicus</i> pelo o servidor PsiPred.....	32
Figura 5. Topologia das prováveis regiões transmembrânicas da proteína GDI2549.....	33
Figura 6. Ensaio para detecção da atividade quinase de GDI2549.....	35
Figura 7. Ensaio de imunoprecipitação indicando a autofosforilação da tirosina quinase no mutante gumD.....	36
Figura 8. Representação esquemática das sucessivas etapas da regulação da biossíntese de EPS por <i>G. diazotrophicus</i> PAL5.....	37
Figura 9. Expressão relativa do gene <i>GDI2549</i> de <i>G. diazotrophicus</i> envolvido na regulação da biossíntese de expolissacarídeos.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

EPS – Exopolissacarídeo

LPS – Lipopolissacarídeo

PTKs – Proteínas tirosina quinase

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

ATP - Adenosina trifosfato

DTT – ditioneitol

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

ORF - Janela Aberta de Leitura

PAL5 - Estirpe selvagem de *G. diazotrophicus*

NCBI - National Center for Biotechnology Information

RESUMO

WANDERLEY, M. Katyanne. Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, Fevereiro de 2019. **Regulação da biossíntese de exopolissacarídeos de *gluconacetobacter diazotrophicus* por fosforilação de uma tirosina quinase.** Campina Grande, PB, 2019.p.46. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses.

A fosforilação de proteínas tirosinas quinases ocorre em todos os organismos vivos e desempenha um papel central, regulando uma grande variedade de processos celulares, como proliferação e diferenciação. Dessa forma, um sistema biológico em que a fosforilação da proteína tirosina é responsável por importante papel na síntese de exopolissacarídeo (EPS), foram explorados em *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Foram avaliadas as características da sequência que codifica uma proteína tirosina quinase no genoma de *G. diazotrophicus* Pal5 (*GDI2549*), atividade quinase, avaliação da influência da tirosina quinase em *G. diazotrophicus*, e do efeito sobre a expressão gênica, quando a bactéria foi cultivada em diferentes fontes de carbono. Os resultados obtidos indicam que *GDI2549* é uma tirosina quinase que regula a biossíntese de EPS em *G. diazotrophicus*, também sugerindo que apresenta atividade quinase em diferentes fontes de carbono utilizada durante o cultivo. Na estirpe mutante para o gene *gumD* de *G. diazotrophicus* *GDI2549* apresentou uma autofosforilação em culturas radiomarcadas. A estirpe selvagem Pal5 de *G. diazotrophicus* apresentou diferentes padrões de expressão relativa do gene *GDI2549*, quando a bactéria foi cultivada em diferentes fontes de carbono. Este estudo demonstrou que a biossíntese de EPS em *G. diazotrophicus* é regulada por um mecanismo de fosforilação em padrões de retroalimentação positiva, onde a presença de EPS é primordial nesta nota.

Palavras-chave: Endofítico diazotrófico, Fosforilação, Exopolímeros, Regulação gênica.

ABSTRACT

WANDERLEY, M. Katyanne. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, February, 2019. **Regulation of the biosynthesis of exopolysaccharides of gluconacetobacter diazotrophicus by phosphorylation of a tyrosine kinase.** Campina Grande, PB, 2019.p.46. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses.

Protein Phosphorylation by tyrosine kinases occurs in all living organisms and plays a central role in regulating a wide variety of cellular processes, such as proliferation and differentiation. Thus, a biological system in which protein phosphorylation by tyrosine protein is responsible for important role in exopolysaccharide (EPS) synthesis was explored in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. The characteristics of the sequence encoding a protein tyrosine kinase in the genome of *G. diazotrophicus* Pal5 (GDI2549), kinase activity, evaluation of the influence of tyrosine kinase in *G. diazotrophicus*, and the effect on gene expression, when the bacterium was cultured in different carbon sources. The results indicate that GDI2549 is a tyrosine kinase that regulates the EPS biosynthesis in *G. diazotrophicus*, also suggesting that it presents kinase activity in different sources of carbon used during cultivation. In the mutant gumD strain of *G. diazotrophicus*, GDI2549 showed an autophosphorylation in radiolabeled cultures. The wild-type Pal5 strain of *G. diazotrophicus* showed different patterns of relative expression of the GDI2549 gene, when the bacterium was cultured on different carbon sources. This study demonstrated that EPS biosynthesis in *G. diazotrophicus* is regulated by a phosphorylation mechanism in positive feedback patterns, where the EPS presence is paramount in note.

Keywords: Diazotrophic endophytic, Phosphorylation, Exopolymers, Gene regulation.

1. INTRODUÇÃO

Gluconacetobacter diazotrophicus Pal5 é uma bactéria fixadora de nitrogênio originalmente isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil, descoberta em meio semi-sólido com alto teor de açúcar e livre de nitrogênio (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988). Possui importantes características biotecnológicas, como fixação de nitrogênio, promoção do crescimento de plantas, vias metabólicas para diversos tipos de açúcares, secreção de ácidos orgânicos, síntese de fitohormônios e a ocorrência de bacteriocinas.

Posteriormente, esta bactéria foi detectada colonizando endofiticamente outras plantas, como a batata doce (PAULA et al., 1991), café (JIMÉNEZ-SALGADO et al., 1997), abacaxi (TAPIA-HERNÁNDEZ et al., 2000) e o arroz (MUTHUKUMARASAMY et al., 2007), que por sua facilidade de manipulação se tornou um modelo de planta para estudar a interação com *G. diazotrophicus* (ROUWS et al., 2010; MENESES et al., 2011; ALQUÉRES et al., 2013; MENESES et al., 2017).

Dessa forma, as bactérias produzem diversos biopolímeros com propriedades químicas variadas através da utilização de inúmeros substratos que podem ser simples ou complexos e muitos destes biopolímeros apresentam a mesma função, enquanto outros são específicos para determinadas espécies e têm funções biológicas distintas (WHITFIELD, 2006; NWODO et al., 2013).

Em resposta à defesa vegetal, além da proteção exercida por enzimas antioxidantes, os EPS e lipopolissacarídeos (LPS) sintetizados por bactérias também podem estar envolvidos (BERTALAN et al., 2009). Muitas bactérias de fixação de nitrogênio são conhecidas por produzir EPS, incluindo *Azoarcus sp.* estirpe BH72 (HUREK e REINHOLD-HUREK, 2003), *R. leguminosarum bv. trifolii* estirpe TA1 (SKORUPSKA et al., 2006), *Azospirillum brasilense* estirpe Sp7 (VALVERDE et al., 2008), *S. meliloti* estirpe Rm1021 (MORRIS e GONZÁLEZ, 2009), *Burkholderia kururiensis* estirpe M130 (HALLACK et al., 2010), *Bradyrhizobium sp.*

estirpe MAFF211645 (FITRIYANTO et al., 2011) e *G. diazotrophicus* estirpe Pal5 (SERRATO et al., 2013).

A sequência completa do genoma de *G. diazotrophicus* foi publicada (BERTALAN et al., 2009), facilitando assim o estudo funcional de genes envolvidos no processo de infecção e colonização de *G. diazotrophicus* em plantas hospedeiras, como por exemplo, os genes com provável função na biossíntese de polissacarídeos capsulares (CPS), lipo-polissacarídeos (LPS), proteínas de superfície envolvidas na motilidade e adesão (pili e flagelos) e polissacarídeos extracelulares (EPS) os quais foram identificados no genoma de *G. diazotrophicus*. Em geral a biossíntese de EPS por bactérias Gram negativas é catalisada por enzimas codificadas pelos operons gum, eps e exp. Estes genes são nomeados de gumB a gumM no genoma das bactérias fitopatogênicas do tipo *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (KATZEN et al., 1998). Homólogos destes genes foram também encontrados em outras bactérias fitopatogênicas como *Xylella fastidiosa* (DA SILVA et al., 2001) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (DA SILVA et al., 2002). Da mesma forma, também foram encontrados homólogos em *G. diazotrophicus* (GRIFFIN et al., 1996).

Dessa forma, proteínas pertencentes à família das tirosinas quinases bacterianas (PTKs), generalizadas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, estão envolvidas em várias funções celulares e processos de sinalização não compartilhando semelhanças estruturais, de mecanismo e de sequências de aminoácidos com quinases eucarióticas (CUTHBERTSON et al., 2009), possuindo assim, organizações de domínio diferentes, onde as PTKs de bactérias Gram-negativas são geralmente proteínas grandes compostas de um domínio N-terminal e um domínio PTK citosólico C-terminal, em contraposição com as PTKs de bactérias Gram-positivas que são separadas naturalmente em duas proteínas distintas. Assim, propondo que estas enzimas podem ser reguladas de formas diferentes (GRANGEASSE et al., 2012).

A produção de EPS tem despertado o interesse mundial de pesquisadores, e a descoberta de como a regulação dessa produção acontece pode ser grandiosa, considerando sua relevância biotecnológica e comercial, afinal, suas propriedades físicas únicas e inovadoras como bioadesivos, biofloculantes, bioabsorventes, gelificantes, probióticos, estabilizantes e espessantes, tornando-os adequados para inúmeras aplicações comerciais nos setores de bionanotecnologia, alimentos, farmacêuticos, cosméticos, petróleo, construção civil e meio ambiente, ainda apresentando vantagens fundamentais por serem ecologicamente corretos, não-tóxicos e biodegradáveis (FREITAS et al., 2011; DONOT et al., 2012).

Portanto, o estudo da regulação da biossíntese de EPS de *G. diazotrophicus* é de bastante relevância, visto que uma análise aprofundada sobre esses mecanismos em bactérias Gram-

negativas irá corroborar sobre pontos ainda não visualizados dessas enzimas modificadoras de proteínas, permitindo insights significativos e possível influência na quantidade e propriedades do polissacarídeo produzido e assim, controle dessa produção.

1.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral investigar o papel do gene *GDI2549* de *G. diazotrophicus* Pal5 na regulação da biossíntese de exopolissacarídeos e seu mecanismo de fosforilação.

1.2 Objetivos Específicos

Comparar e correlacionar à sequência de aminoácidos da proteína tirosina quinase (codificada pela ORF *GDI2549*) da via de biossíntese de EPS em *G. diazotrophicus* Pal5 com as de outras espécies bacterianas;

Detectar a atividade quinase da proteína tirosina quinase (codificada pela ORF *GDI2549*), *in vivo*, crescida em diferentes fontes de carbono;

Avaliar a influência da proteína tirosina quinase sobre a regulação da biossíntese de EPS em *G. diazotrophicus*;

Mensurar a expressão do gene para tirosina quinase, possivelmente envolvido na regulação de EPS em *G. diazotrophicus*, quando a bactéria for crescida em diferentes fontes de carbono.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *G. diazotrophicus*

A família *Acetobacteraceae* inclui quatro gêneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* e *Acidomonas* (YAMADA et al., 1997). Subsequentemente, baseados em análises de 16S rRNA, *A. diazotrophicus* foi renomeada como *G. diazotrophicus* (KOJIMA et al., 1998); foram também acrescentadas mais duas espécies fixadoras de nitrogênio à lista: *G. johannae* e *G. azotocaptans* (FUENTES-RAMIREZ et al., 2001).

G. diazotrophicus pertence ao filo das Proteobactéria, classe α -proteobacteria, família *Acetobacteraceae* do gênero *Gluconacetobacter*, é uma bactéria Gram-negativa, não apresenta movimento espiralado, com pH ótimo de crescimento na faixa de 4,5-5,8 e com células variando entre (0,7 a 0,8) x (2 a 4) μm . Esta bactéria pode ser isolada em meio semi sólido LGI-P (REIS et al., 1994) e, após o período de sete a dez dias, apresenta uma película alaranjada, sendo que, abaixo da película, o meio fica incolor devido à assimilação do azul de bromotimol (DÖBEREINER et al., 1993).

Esta bactéria cresce em alta concentração de sacarose (10% sacarose) e pH muito baixo (3,0) e tem a habilidade de fixar nitrogênio em condições microaerofílicas (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988). A fonte de carbono que melhor promove o seu crescimento é a sacarose a 10% e a bactéria pode crescer até mesmo em concentrações mais altas de sacarose (30%). Como a sacarose não pode ser transportada ou respirada, *G. diazotrophicus* cresce secretando uma enzima extracelular denominada levansacarase que hidrolisa sacarose em frutose e glicose (ARRIETA et al., 1996). Outras boas fontes de carbono incluem gluconato, glicose, frutose, manitol, arabinose, meso-inositol, i-inositol, sorbitol, glicerol, galactose e gluconato de sódio (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999).

Aminoácidos como glutamato, serina, alanina e histidina podem ser eficazmente usados como fonte de carbono e de nitrogênio por *G. diazotrophicus* (ATTWOOD et al., 1991). Porém,

celobiose, amido, meso-eritritol e metanol (1%) não favorecem o seu crescimento. Nenhum dos ácidos orgânicos comuns (succinato e outros ácidos dicarboxílicos) promove o crescimento de *G. diazotrophicus*, exceto o ácido 2-ceto glucônico presente em plantas de cana-de-açúcar (ASHBOLT e INKERMAN, 1990). Foi relatado que esta bactéria utiliza ácido 2-ceto glucônico como uma fonte de carbono, o que favorece a fixação de nitrogênio. O pH ótimo para crescimento está ao redor de 5,5, embora os valores de pH e taxa de respiração possam variar consideravelmente de acordo com as fontes de carbono (STEPHAN et al., 1991).

G. diazotrophicus tem alta tolerância a tratamentos de calor e concentrações de sais no meio de cultura (TEJERA et al., 2003). O tratamento térmico (50°C por 2 a 3 h), usualmente usado para controle de patógenos causadores de doenças na cana-de-açúcar, não mata (ORTEGA et al., 2001). Dentre as propriedades fisiológicas características dessa espécie de bactéria destacam-se a tolerância a altas concentrações de sacarose; acidez e habilidade de excretar o nitrogênio fixado, conforme demonstrado por Cojho et al. (1993). A infecção e colonização da cana-de-açúcar pela *G. diazotrophicus* foi demonstrada por meio de microscopia eletrônica e ótica (JAMES et al., 1994; OLIVARES et al., 1996). Na superfície da raiz, a bactéria se concentra nas regiões de junção de raízes laterais (JAMES et al., 1994). Dentro da raiz, pode ser vista nos espaços intercelulares do parênquima, bem como, dentro de vasos do xilema, através dos quais a bactéria parece migrar para a parte aérea da cana-de-açúcar (DONG et al., 1994).

A associação de *G. diazotrophicus* com cana-de-açúcar representa um novo tipo de associação entre um diazotrófico e uma monocotiledônea. Considerando a associação de *G. diazotrophicus* com cana-de-açúcar, esta é endofítica obrigatória (porém cultivável), visto que esta bactéria não pode ser isolada de solos livres de raízes e só pôde ser isolada, até o momento, de plantas, fungos, insetos, etc. Porém, baseado na singularidade da associação, Reinhold-Hurek e Hurek (1998) propuseram o termo “endofítico oportunista”, visto que elas não colonizam o citoplasma da planta viva ou células do hospedeiro ou formam qualquer organela como observado em fungos micorrízicos ou rizóbios.

A fixação endofítica de nitrogênio depende da capacidade do microrganismo estabelecer-se endofiticamente no interior da planta e, para que isso ocorra, o microrganismo deve ser capaz de invadir e proliferar nos tecidos da planta hospedeira, ultrapassando as barreiras físicas e químicas que a planta estabelece, instituindo vias de infecção e sítios de colonização. O estabelecimento desta relação depende de uma sequência de etapas e de uma relação específica entre planta e bactéria. Vários compostos de origem bacteriana estão envolvidos no sucesso do processo de infecção e colonização destas bactérias e, dentre estas substâncias, encontram-se os

EPS microbianos que possuem um papel importante tanto na sobrevivência da bactéria quanto na associação desta com a planta, auxiliando na adesão da célula a superfícies, na concentração de nutrientes, evitam a dessecação, evitam o contato direto com o hospedeiro e na proteção contra moléculas tóxicas (SUTHERLAND, 2001).

2.2. Interação entre a *G. diazotrophicus* e arroz

G. diazotrophicus Pal5 foi a primeira bactéria diazotrófica isolada do interior de plantas de cana-de-açúcar (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988). Foi demonstrado que essa bactéria promove o crescimento da cana-de-açúcar por meio da fixação biológica de nitrogênio, mas a produção de substâncias moduladoras de crescimento é um fator adicional que também beneficia o crescimento vegetal (SEVILLA et al., 2001).

Vários estudos mostraram que a cana-de-açúcar e o arroz respondem ativamente à inoculação com *G. diazotrophicus*, através da alteração vegetal da expressão de vários genes (VINAGRE et al., 2006; ROCHA et al., 2007). Por outro lado, pouco se sabe sobre os mecanismos, relacionados com a bactéria, que possibilitam *G. diazotrophicus* colonizar a superfície e o interior da planta e que levam a uma interação benéfica com a mesma. Estudos microscópicos têm mostrado a colonização de plantas de arroz *in vitro*, na superfície de raízes, principalmente na ponta da raiz e nos locais de emergência de raízes laterais e, em seguida, a bactéria é encontrada no interior do vegetal, inclusive nas partes aéreas (ROUWS et al., 2010; MENESES et al., 2011).

Os mecanismos pelos quais a bactéria reconhece os sítios de colonização e pelos quais a mesma procede são desconhecidos. Em outras espécies bacterianas, a presença de estruturas de superfície como adesinas, flagelos, *pili*, EPS, capacidade de formar biofilmes e produção de moléculas sinalizadoras estão comumente envolvidas nestas interações (DANHORN e FUQUA, 2007). É provável que estes mecanismos estejam envolvidos na interação entre o arroz e *G. diazotrophicus*.

O estabelecimento de um método eficiente para a geração de mutantes por inserção e sua análise molecular, no laboratório de Biotecnologia Vegetal, têm facilitado a identificação de fatores genéticos responsáveis pela interação benéfica entre o arroz e *G. diazotrophicus* (MENESES et al., 2017).

Após o sequenciamento do genoma de *G. diazotrophicus* (BERTALAN et al., 2009), análises genômicas de *G. diazotrophicus* Pal5 revelaram a presença de um agrupamento de 15 janelas abertas de leitura (ORFs, do inglês Open Reading Frame), semelhantes aos genes *gum*

presentes em *Xanthomonas campestris* e responsáveis pela biossíntese de EPS nesta bactéria. A presença de algumas ORFs envolvidas na síntese de açúcares precursores e a existência de genes relacionados à regulação e montagem da estrutura de EPS sugeriu que *G. diazotrophicus* Pal5 é capaz de sintetizar um novo tipo de EPS (MENESES et al., 2011).

2.3. Exopolissacarídeos

Muitos microrganismos produzem EPS que são excretados para o meio permanecendo bem aderidos à célula sob a forma de cápsula. Estes exopolímeros intervêm na adesão microbiana a superfícies (SUTHERLAND, 1979) promovendo a formação de uma complexa película viscosa ao redor das células microbianas. Estas biopelículas ou biofilmes constituem um envoltório dinâmico em que as células bacterianas parecem alcançar um estado de homeostasia de uma ótima organização para fazer uso de todos os nutrientes disponíveis (GARCIA-CRUZ, 2008; SUTHERLAND, 2001).

Análises genômicas da bactéria diazotrófica endofítica *G. diazotrophicus* Pal5 revelaram a presença de um agrupamento de genes *gum* contendo 15 ORFs, relacionadas à biossíntese de EPS em outras bactérias. Um mutante para o gene *gumD* revelou várias alterações derivadas da ausência da transcrição desse gene, como: ausência na produção de EPS, diferenças morfológicas na colônia em relação à estirpe selvagem, capacidade alterada para aderir-se a lâ de vidro, bem como diminuição na adesão do mutante em raízes de arroz (MENESES et al., 2011). Neste sentido, também existem diversos estudos com *X. campestris* pv. *Phaseoli* sendo encontrado nos mesmos sintomas característicos da obstrução dos vasos xilemáticos. Em *Sinorhizobium meliloti*, o EPS executa um papel importante no processo de simbiose com plantas, assim como na formação de nódulos e, portanto, na fixação de nitrogênio (KANNENBERG et al., 1994; GONZALEZ et al., 1996).

As análises *in silico* realizadas no genoma de *G. diazotrophicus* sugerem que a regulação da biossíntese de EPS em *G. diazotrophicus* provavelmente ocorre por meio de uma tirosina quinase representada pela ORF *GDI2549* localizada entre os 15 genes do operon encontrado no genoma.

2.4. Tirosinas de fosforilação e de desfosforilação em bactérias

A fosforilação de proteínas é uma modificação pós-traducional covalente que dissemina importantes eventos moleculares em eucariotos e procariotos, sendo responsável pela regulação

de muitas funções celulares. A fosforilação de proteínas é uma modificação reversível, na qual grupos fosforil são adicionados por proteínas quinases e removidos por fosfatases fosfoproteicas. O primeiro evento de fosforilação mediado por tirosinas quinases em bactérias foi identificado em *Escherichia coli* (MANAI e COZZONE, 1982), desde então, usando anticorpos contra tirosinas fosforiladas, muitas proteínas que contêm tirosinas em estado fosforilado foram relatadas e caracterizadas.

2.5. Tirosinas quinases bacterianas

As proteínas pertencentes à família das tirosinas quinases bacterianas, que são generalizadas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, estão envolvidas em várias funções celulares e processos de sinalização e não compartilham semelhanças estruturais, de mecanismo e de sequências de aminoácidos com quinases eucarióticas (GRANGEASSE et al., 2012; CUTHBERTSON, 2009). A síntese de EPS pode depender de tirosinas quinases que consistem em um sistema de dois componentes: um componente de membrana e um componente de quinase, que se fundem em bactérias Gram-negativas. O EPS interage com o domínio extracelular (componente de membrana), que é um receptor, para controlar a atividade da quinase. Na ausência de EPS, a quinase é inativada por autofosforilação. A presença de EPS inibe a autofosforilação e, em vez disso, promove a fosforilação de uma glicosiltransferase na via biossintética, estimulando assim a produção de EPS.

As proteínas pertencentes à família das tirosinas quinases bacterianas contêm motivos de ligação ao ATP chamados “Walker A” e “Walker B”, com resíduos de aminoácidos bem conservados que se mostram necessários para a ligação entre o ATP e o sítio catalítico das proteínas (GRANGEASSE et al., 2012). O motivo Walker A é localizado entre a primeira folha β (β_1) e a primeira hélice α (α_1) contendo a sequência conservada GXXXXGKT/S (WALKER et al., 1982), onde X representa um aminoácido qualquer. Este motivo dá forma ao laço de ligação do fosfato (P-loop). Além do motivo Walker A, uma segunda sequência conservada ZZDXXG chamada de motivo Walker B (WALKER et al., 1996) é observada, onde Z representa um resíduo hidrofóbico (PEREIRA et al., 2004; FREITAS et al., 2010), onde se acomoda o íon Mg^{2+} .

O domínio citoplasmático das tirosinas quinases bacterianas é capaz de trans-fosforilar resíduos de tirosina múltiplos, localizados na extremidade C-terminal da proteína, que constituem um conjunto de tirosinas (GRANGEASSE et al., 2002; PAIMENT et al., 2002). O número de tirosinas presentes no agrupamento varia entre as proteínas, mas os agrupamentos podem conter até sete tirosinas, todas potencialmente fosforiláveis. Um resíduo de tirosina

adicional geralmente é encontrado em proteobactérias. Este resíduo está localizado a quatro aminoácidos do motivo “Walker A” e mostrou-se envolvido na *cis*-fosforilação. A fosforilação neste site aumenta a fosforilação do agrupamento de tirosina. No entanto, esta tirosina não é encontrada sistematicamente nesta posição e mesmo quando presente pode não ser capaz de *cis*-fosforilar (WUGEDITSCH et al., 2001).

2.6. Proteínas fosfotirosinas fosfatases

As proteínas fosfotirosinas fosfatases estão envolvidas em mecanismos reguladores de fosforilação de tirosina, sendo responsáveis pela desfosforilação da tirosina. O papel das proteínas fosfotirosinas fosfatases foi descrito pela primeira vez por Grangeasse (1998) com a caracterização funcional da proteína fosfotirosina fosfatase da bactéria *Acinetobacter johnsonii*. Foi demonstrado que a proteína fosfotirosina fosfatase especificamente desfosforila as tirosinas quinases bacterianas. Deste modo, foi proposto que o papel da fosforilação de tirosina reversível mediada por proteínas tirosinas quinases e seus pares de proteínas fosfotirosinas fosfatases tenha um papel importante na fisiologia microbiana.

2.7. Alvos das tirosinas quinases e seu papel fisiológico

As tirosinas quinases bacterianas foram inicialmente descritas como exclusivamente enzimas autofosforilantes e sua atividade foi ligada ao controle da produção de EPS (VINCENT et al., 2000; WUGEDITSCH et al., 2001). O estado de autofosforilação de tirosinas quinases bacterianas, regulado pelas proteínas fosfotirosinas fosfatases conhecidas, mostrou influenciar a quantidade, o comprimento e as propriedades do polissacarídeo produzido (NIEMEYER e BECKER, 2001; WUGEDITSCH et al., 2001; MORONA et al., 2003). Wugeditsch e colaboradores (2001) usaram mutantes Wzb (proteína fosfotirosina fosfatase) e Wzc (tirosina quinase bacteriana) incapazes de produzir EPS em *E. coli* para hipotetizar que a função de Wzc, onde esta requer um ciclo entre formas fosforiladas e desfosforiladas. Mesmo que o papel preciso dos homólogos de Wzc na produção de EPS ainda não seja claro, existem evidências apontando um papel para essas proteínas como co-polimerases, interagindo com uma polimerase de polissacarídeo (Wzy). As proteínas co-polimerases influenciam no comprimento e/ou na exportação de polissacarídeos por mecanismos ainda não compreendidos (MORONA et al., 2003).

Após 2003, vários estudos mostraram a existência de substratos exógenos para tirosinas quinases bacterianas, podendo fosforilar outras proteínas além de si mesmas. Os primeiros substratos para proteínas tirosina quinases bacteriana identificados foram UDP-açúcar desidrogenases e uma glicosiltransferase (GRANGEASSE et al., 2012; BECHET et al., 2010; MIJAKOVIC et al., 2003). A fosforilação dessas proteínas mostrou aumentar sua atividade, contribuindo para o controle da produção de exopolissacarídeos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização do local da pesquisa

As etapas de caracterização *in silico*, molecular e bioquímica foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Estadual da Paraíba – Campus I e no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Universidade Federal da Paraíba, UFPB.

3.2. Meio de cultivo

As estirpes selvagem e mutante de *G. diazotrophicus* foram cultivadas nos seguintes meios de cultura:

LGI (composição por g.L⁻¹): K₂HPO₄ 0,2; KH₂PO₄ 0,6; MgSO₄.7HO 0,2; CaCl₂.2H₂O 0,02; Na₂MoO₄.2H₂O 0,002; FeCl₃.6H₂O 0,018; pH 5,5 contendo 1mM de ácido glutâmico (ROUWS, 2010) e suplementado com um fontes de carbono (sacarose 5 g.l⁻¹). Os frascos foram inoculados com uma suspensão bacteriana de aproximadamente 1x10⁶ e cultivados sob agitação de 200 rpm a 30°C.

LGI modificado (composição por g.L⁻¹): K₂HPO₄ 0,2; KH₂PO₄ 0,6; MgSO₄.7HO 0,2; CaCl₂.2H₂O 0,02; Na₂MoO₄.2H₂O 0,002; FeCl₃.6H₂O 0,018; pH 5,5 contendo 1mM de ácido glutâmico (ROUWS, 2007) e suplementado com quatro fontes de carbono independentes (sacarose, glicose, frutose e manitol, 20 g.l⁻¹). Os frascos foram inoculados com uma suspensão bacteriana de aproximadamente 1x10⁶ e cultivados sob agitação de 200 rpm a 30°C.

3.3. Caracterização *in silico* da proteína tirosina quinase no genoma de *G. diazotrophicus* Pal5.

A primeira etapa para os estudos de comparação e correlação da ORF *GDI2549* provavelmente envolvida na regulação da biossíntese de EPS foi à análise detalhada das

informações já disponíveis para localização e caracterização de sequências relacionadas às proteínas em estudo.

A sequência proteica anotada, possivelmente relacionada à regulação da biossíntese de EPS (GDI2549), foi submetida à busca por similaridade no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) através do programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), determinando a similaridade desta com sequências já depositadas no referido banco de dados. O alinhamento múltiplo de todas as sequências foi realizado com o auxílio do programa CLUSTALX, versão 1.82 (THOMPSON et al., 2002), para aminoácidos. Assim, detalhando os domínios conservados das sequências, assinaturas proteicas e sítios catalíticos no Pfam (<https://pfam.xfam.org/>), isso possibilitando a construção de uma árvore filogenética pelo software MEGA-X (www.megasoftware.net) realizada analisando os critérios de (similaridade, amplamente estudada, diazotróficas) explicando a origem da proteína. Adicionalmente foi analisada todas as características físico-químicas da proteína codificada por GDI2549, pelo servidor

(<https://web.expasy.org/protparam/>), bem como a estrutura secundária da proteína codificada (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

Em posse destes resultados, realizou-se uma análise de possíveis regiões transmembrânicas pelo software Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>).

3.4. Ensaio da atividade da proteína tirosina quinase com ATP radiomarcado

Para avaliação da atividade da tirosina quinase (GDI2549) de *G. diazotrophicus* Pal5 sobre a regulação da biossíntese de EPS, foi utilizado como controle positivo a estirpe selvagem Pal5 (crescida em diferentes fontes de carbono: glicose, frutose, sacarose e manitol) e como controle negativo um mutante defectivo para produção de EPS, gumD⁻ (MENESES et al., 2011), segundo ensaio para detecção de atividade quinase descrito por Karra et al. (2017).

Após a lise de 200 µL das culturas celulares de *G. diazotrophicus* (aproximadamente, 1 mg.mL⁻¹ de proteína), foram adicionado 2 µL de anticorpo anti-GDI2549 (aproximadamente, 1 mg.mL⁻¹, devido ao uso de anticorpos monoclonais foram adicionados 5 µg de anticorpo de coelho anti-IgG de rato) e incubado a 4 °C por 1 h sob agitação.

Beads contendo G-agarose foram lavados 3 vezes com tampão de lise (50 mM HEPES pH 7,7; 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 10% glicerol; 0,2 mM ortovanadato de sódio; 100 mM fluoreto de sódio; 50 mM β-glicerofosfato, 0.1% Triton X 100) por centrifugação breve a 4 °C durante 1 minuto a 5.000 xg, logo após ocorreu a remoção do sobrenadante e resuspensão dos beads em tampão de lise.

Após o tempo de incubação, das amostras contendo cultura e o anticorpo, as mesmas foram incubadas durante uma hora, depois de adicionado 30 μL de uma suspensão a 50% dos beads com G-agarose e tampão de lise a 4 °C sob agitação. As amostras após a incubação foram centrifugadas a 4 °C por 10 minutos a 10.000 $\times g$ para sedimentação dos beads e remoção do sobrenadante.

O material precipitado foi lavado 3 vezes com 1 mL de tampão de lavagem dos beads (1 M NaCl, 20 mM Tris, pH 7,4) e incubado uma vez com tampão de reação para quinase 1x (10 mM HEPES pH 8,0; 10 mM MgCl_2). Logo após as amostras foram centrifugadas a 4 °C por 10 minutos a 10.000 $\times g$ para sedimentação dos beads e remoção do sobrenadante.

As amostras foram mantidas em gelo, para o preparo do tampão 5x quinase (50 mM HEPES pH 8,0; 50 mM MgCl_2 ; 50 mM Benzamidina; 50 mM DTT; 250 μM ATP, não marcado). As amostras foram mantidas em tubos de 1,5 mL no gelo, para o preparo da mistura reacional em tubos separados de 1,5 mL arrefecidos. A marcação radioativa consistiu de uma mistura reacional, contendo: 21 μL de H_2O ; 6 μL de tampão de reação quinase 5x; 1 μL de ATP radiomarcado (^{32}P) e 2 μL de proteína básica de mielina, como substrato (aproximadamente, 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Para iniciar o ensaio, foi adicionada toda a mistura de reação à amostra e incubada a 30 °C por 1 hora. Para o encerramento das reações, as mesmas foram mantidas em gelo e adicionados 7,5 μL de tampão Laemmli 5x (10% SDS; 50% glicerol; 25% 2- β mercaptoetanol; 0,02% azul de bromofenol; 0.3125 M Tris HCl, pH 6,8).

Para aplicação no gel de SDS-PAGE 10-15% as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 30 segundos e adicionadas 20 μL em cada poço. Após o tempo de migração no gel (aproximadamente, 1 h a potência constante de 5 W), o gel foi removido da placa de vidro e corado em 50 mL de uma solução de Coomassie (10% de ácido acético glacial, 50% de metanol, 0,25% de corante G-250) durante 1 hora em agitador orbital ajustado para 50 rpm. Após a coloração o gel foi fixado em uma solução fixadora (10% de ácido acético glacial, 20% de metanol) a fim de desidrata-lo, durante a noite em um agitador orbital a 50 rpm. Em seguida, o gel foi em 200 mL de metanol por 2 minutos com agitação suave até o gel ficar branco leitoso, isso ajudando a evitar rachaduras durante a etapa de secagem.

O gel foi colocado na parte frontal de uma folha de papel filtro qualitativo de 14 cm x 14 cm, umedecido com metanol e posto em secador a vácuo. O gel foi recoberto com filme plástico e mantido no secado por 1,5 hora a 80 °C.

Após 1,5 horas o gel seco foi removido e verificada a intensidade do sinal, com auxílio de um contador Geiger. Em um quarto escuro, o gel seco foi colocado um cassete com filme de

raio-X e uma tela de intensificação na seguinte ordem de cima para baixo: gel, filme, tela de intensificação. No final da exposição, o filme foi removido e exposto a uma solução reveladora (microservice 21569) por dois minutos, lavado em água destilada e imediatamente mergulhado em outra solução fixadora por mais dois minutos (microservice 21570).

Após a revelação e documentação do filme de raio-X, o mesmo foi colocado sobre o papel de filtro e o gel seco para alinhamento da imagem do marcador / pontos com os marcadores / pontos no gel seco. No filme foram marcadas as bandas correspondentes aos padrões de tirosina quinase estudada. Os padrões de proteína foram rotulados e as bandas do gel que correspondem às bandas de interesse no filme foram removidas e colocadas em frascos de cintilação de 7 mL. Adicionou-se 4 mL de fluido de cintilação e analisadas por um contador de cintilação líquida LS 6800 (Beckman, USA).

3.5. Ensaio de imunoprecipitação para detecção da dinâmica de fosforilação da proteína tirosina quinase com ATP radiomarcado

Para avaliação da dinâmica molecular da atividade da tirosina quinase (GDI2549) de *G. diazotrophicus* Pal5 sobre a regulação da biossíntese de EPS, foi utilizado como controle positivo a estirpe selvagem Pal5 e como controle negativo um mutante defectivo para produção de EPS, gumD⁻ (MENESES et al., 2011). A estirpe selvagem Pal5 auxiliará na verificação da fosforilação da glicosiltransferase (gumD) e a estirpe mutante gumD⁻ na autofosforilação da tirosina quinase, segundo ensaio de imunoprecipitação.

As estirpes foram crescidas em meio LGI durante 72 horas, até atingirem uma população de 10^6 UFC.mL⁻¹. Após esse crescimento, 500 µL de cultura de ambas as estirpes foram lavadas 3 três vezes em solução salina estéril, para remoção de todo meio de cultura. Logo após as células foram ressuscitadas em meio LGI modificado, neste caso ocorreu a troca de K₂HPO₄ e KH₂PO₄ por ortofosfato ³²P, marcado radioativamente. As estirpes foram crescidas na presença de ortofosfato ³²P durante 12 horas e os resultados detectados por imunoprecipitação.

Para o preparo dos lisados totais, as células foram lisadas em tampão PBS pH 7,4 contendo 1% de Triton X-100, coquetel inibidores de protease e fosfatase (pH 7,4 contendo 1% de Triton X-100, 200 µg.mL⁻¹ de Lisozima (Sigma), coquetel contendo inibidores de protease (1:10, Sigma-Aldrich®) e inibidores de fosfatase (1:10, Roche)). Os lisados foram passados três vezes por uma seringa de 1 mL 26G 1/2 e congelados (-80°C) e descongelados três vezes. Os lisados foram ainda sonicados por 30 minutos em amplitude de 60 Hz (Branson Sonifier 250) com a sonda em banho de gelo. Esse material foi então centrifugado a 10.000×g

por 10 minutos a 4°C. Após isso, os sobrenadantes foram coletados e diluídos em PBS pH 7,4 para a concentração final de 0,1% Triton X-100. O pre-clearing dos lisados foi feito incubando-se as amostras com 30 µL de beads de proteína G-agarose (Life Technologies) já lavados com tampão PBS pH 7,4, por duas horas a 4 °C. Após centrifugação a 100 g por 2 minutos a 4 °C, o sobrenadante contendo o lisado de proteínas solúveis foi cuidadosamente removido para ser utilizado nas imunoprecipitações.

Para as imunoprecipitações, 50 µL de beads de proteína G-agarose foram lavados e incubados com anticorpos (5 µL do anticorpo anti-GDI2549), devido ao uso de anticorpos monoclonais foram adicionados 5 µg de anticorpo de coelho anti-IgG de rato, agitado, e a reação incubada por mais duas horas a 4 °C sob agitação constante. Após isso, os beads foram lavados 3 vezes com PBS pH 7,4 para a remoção dos anticorpos que não se ligaram. Em seguida, os beads foram bloqueadas com PBS pH 7,4 contendo 1 mg/mL de BSA por 30 minutos a 4 °C.

Para a próxima etapa, os beads de proteína G-agarose contendo anticorpos anti-GDI2549 ligados foram incubados com os lisados celulares por 16 horas a 4 °C sob agitação constante. Após a incubação das amostras, os beads foram lavados por centrifugação três vezes com PBS pH 7,4 contendo os coquetéis inibidores de proteases e de fosfatases.

Para a eluição das proteínas que se ligaram aos anticorpos, os beads foram ressuspensos em tampão Laemmli, aquecidos a 100°C por dez minutos e analisados conforme item 3.5.

3.6. Expressão gênica da tirosina quinase, quando *G. diazotrophicus* é crescida em diferentes fontes de carbono

Logo após a confirmação da funcionalidade desse sistema de regulação foi realizado estudos de mensuração da expressão gênica da ORF GDI2549 em *G. diazotrophicus* Pal5 crescida em meio LGI e meio LGI modificado, pH 5,5, com 1 mM de ácido glutâmico (MENESES et al., 2011) e suplementado com quatro fontes de carbono independentes (sacarose, glicose, frutose ou manitol, 20 g.l⁻¹).

Para análise da expressão da ORF GDI2549, amostras de bactérias sedimentadas a partir de cultura líquida foram coletadas, mantidas em nitrogênio líquido onde, em seguida, realizada a extração de RNA das amostras, por meio da utilização do kit de extração Kit FastRNA SPIN MICROBES (MPBIomedicals®) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total foi extraído a partir de três repetições por amostra biológica, a fim de aumentar a eficiência no isolamento de sequências expressas, mRNA, relacionadas ORF *GDI2549*.

Após as extrações do RNA total, as amostras foram quantificadas via espectrofotometria no aparelho NanoDrop 2000c (ThermoScientific), e a análise da integridade do RNA verificada pelo Qubit 4.0 (ThermoScientific).

Os oligonucleotídeos específicos para tirosina quinase em estudo foram sintetizados por meio do programa primer 3, utilizando como molde as sequências obtidas através do genoma depositado de *G. diazotrophicus* Pal5, na base de sequências do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Tabela 1).

Tabela 1. Detalhamento dos primers utilizados.

Primer	Sequência dos Primers	Tam. do	
		amplicom	TM
GDI2549	F: 5' CTGGCGCAATTGTCCTGT 3'	100 pb	60.0 °C
	R: 5' AGTAGGCCAGCGAACTCTTG 3'		
23S	F: 5' AAAGCCGGATCAATCCGTTA 3'	95 pb	59.0 °C
	R: 5' AAGCCGTAGTCGATGGAAAC 3'		

Após o tratamento com DNase I, foi utilizado 1 µg de RNA total para síntese de DNA complementar (cDNA) usando o kit SuperScript® VILO™ (Invitrogen). As reações qPCR foram executadas em um Termociclador de PCR em tempo real Step One Plus (Life Technologies, EUA). Cada reação contendo 12,5 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,4 µL mM de cada oligonucleótido específico, quantidades apropriadas de cDNA (1 µL, diluição 1: 4) e 10,7 µL de água de PCR obtendo um volume final de 25 µL.

As reações de qPCR foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, seguido por 40 ciclos de: 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos e uma extensão final de 60°C durante 5 minutos (ALQUÉRES et al., 2013; MENESES et al., 2017). O método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi aplicado para quantificar a expressão relativa do gene presente no cDNA, o gene 23S rRNA foi utilizado como um controle interno de referência (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Os resultados foram expressos pela média de três técnicas de cada amostra biológica, tendo como amostra calibradora a estirpe selvagem Pal5 crescida em meio LGI.

3.7. Análises estatística

Os dados das variáveis respostas foram submetidos à análise de variância pelo teste F, até 5% de significância comparando-se as médias por meio de Teste Tukey a 5%, para os fatores qualitativos, utilizando-se do programa SIGMAPLOT 11.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise computacional da proteína codificada por GDI2549 de *G. diazotrophicus*

O resultado do alinhamento no banco de famílias de proteínas (Pfam) revelou que a proteína GDI2549 de *G. diazotrophicus* possui uma região compreendida entre os aminoácidos Gln₃₈₄ e Tyr₅₀₀ bastante conservada, com *e-value* de $2.91e^{-25}$ (Figura 1), quando comparada a outras tirosinas quinases.

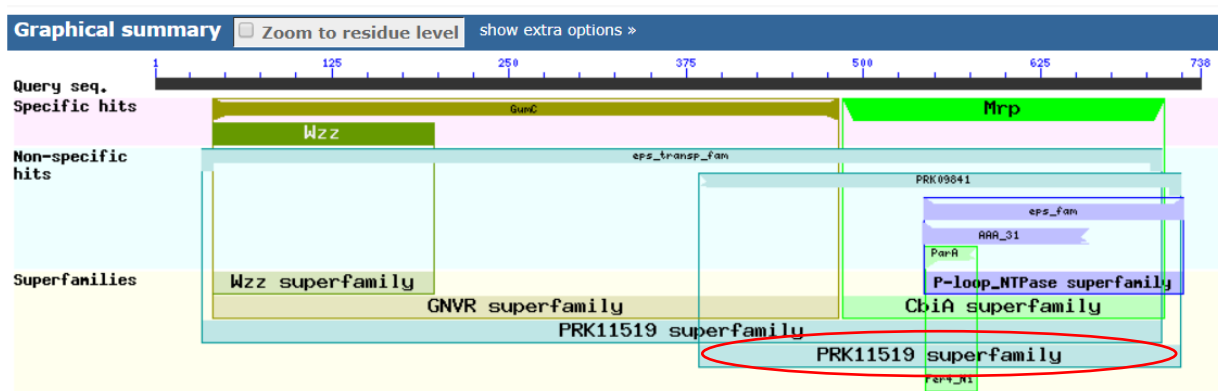


Figura 01. Localização da região de domínio conservado na sequência de aminoácidos de GDI2549, (<https://pfam.xfam.org/>).

Análises *in silico* identificaram GDI2549 como sendo supostamente uma tirosina quinase, revelando uma sequência de alta identidade em seu domínio C-terminal, para enzimas do tipo tirosina quinase bem estudadas em *E. coli* K12 (Figura 2). Esta alta identidade com *E. coli* K12 é explicada pela proximidade taxonômica entre as duas espécies indicando que a produção de EPS é um processo evolucionário bastante conservado e extremamente relacionado ao estilo de vida da bactéria (GRIFFIN et al., 1996). Os autores, a partir de análises evolutivas, descrevem que este tipo de proteína pode ter evoluído a partir do gene ancestral e adicionalmente se dividiu em duas classes: tirosinas quinases para bactérias Gram-negativas e tirosinas quinases para bactérias Gram-positivas.

Grangeasse et al. (2003) observaram em seus estudos com *E. coli*, que a organização dos domínios de tirosina quinases em Gram-positivas e Gram-negativas são ativados através de mecanismos opostos para que ocorra a fosforilação das desidrogenases, refletindo também, em possíveis métodos de regulação diferentes. Através de análises *in silico*, observou-se em GDI2549 de *G. diazotrophicus* (Gram-negativa), uma sequência de alta similaridade em seu domínio C terminal (Figura 2).

<i>G. diazotrophicus</i> PAL5	(541)	GRVITVAGASPGDGTSLAYW (15aa)	DGDHREGYR	----	RGGTPVP-HG (55aa)	NLIIDSPPLQ (50aa)	AEASA	---	SAFPGYHRYGETYYRYAYNYDS	-----	(738)
<i>K. sucrofermentans</i>	(521)	PLCLAITGAGPEEGSTLALW (15aa)	DADHRRGILDHYLTDGATGRPSLG (55aa)	ELIIDCPPLL (50aa)	VEDNA	---	MDVMGYSY-GNRDIRILSRFDEQ	-----			(724)
<i>Gluconacetobacter</i> SXCC-1	(506)	PLCLAITGAGPEEGSTLALW (15aa)	DADHRRGILDQYLTDTVTTGRPSLG (55aa)	ELIIDCPPLL (50aa)	VEDNA	---	MDVMGYSYGNRYKLYRFDEK	-----			(710)
<i>Azospirillum</i> sp. TSH100	(559)	HRVILFSGSVPGEGRSSVAAA (15aa)	DCDLRRGYLH	----	EMLGMSNRRG (55aa)	DRIVLDSPPVL (50aa)	VDTRR	---	HAQYEYDP-SGRYHGYYRYAN	-----	(757)
<i>Azospirillum lipoferum</i>	(614)	HRVILFSGSVPGEGRSSVAAA (15aa)	DCDLRRGYLH	----	EMLGMSNRRG (55aa)	DRIVLDSPPVL (50aa)	VDTRR	---	HAQYEYDP-SGRYHGYYRYAN	-----	(812)
<i>Azospirillum brasilense</i>	(559)	QRVILFSGSVPGEGRSSIAAA (15aa)	DCDMRRGYLH	----	PMLGLENRHG (55aa)	DRVILDSPPVL (50aa)	VDIRR	---	HAQYEYDP-SGRYHGYYRYAN	-----	(757)
<i>Escherichia coli</i> K12	(525)	NNVLMMTGVSPSIGTFVCAN (15aa)	DCDMRKGTYH	----	ELLGTNNVNG (55aa)	DLVLIDTPPIL (50aa)	IFRRA	-----	SAYQDYG--YYEYKSDAK	-----	(720)
<i>Escherichia coli</i> K30	(525)	NNVLMISGASPSAGTFISSN (15aa)	DADLRKGYAH	----	KMFGHKNDKG (55aa)	DLIIDTPPIL (50aa)	VVKKA	-----	SSYYRYGHNHYGYSYDCK	-----	(721)
<i>Erwinia amylovora</i>	(528)	NNILMITGASPGIGTFVCAN (15aa)	DGDMRRCYTH	----	ELLGAESKTG (55aa)	DLVLIDTPPIL (50aa)	VVRKS	-----	ANYGYGYDYDYSYQQGEKS	----	(726)
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	(534)	NNLITISGPAPEVGSFISTN (15aa)	DADLRRCYLH	----	KYFNLDTPG (55aa)	DHVIDTPPVL (50aa)	IQRSS	-----	AGYGYGYNYAYKANKESD	---	(733)
<i>Rastonia solanacearum</i>	(542)	NNLVLTGTPGVGGSFVSAN (15aa)	DADMRKCYLH	----	QYFGKDRKPG (55aa)	DLVLVDTPPVL (50aa)	LDPNTYRYGYSRYGRYRYVQYGYTSNSKPPEAES	-----			(750)

Figura 2. Alinhamento da região C-terminal conservada de GDI2549 de *G. diazotrophicus*, com os atribuídos a partir de proteínas como tirosina quinases, ou seja, *Komagataeibacter sucrofermentans* (*K. sucrofermentans*), *Gluconacetobacter* SXCC-1, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* K30, *Erwinia amylovora*, *Acinetobacter johnsonii*, *Rastonia*. Em cinza, na primeira coluna temos o domínio Walker A, em preto, a coluna de resíduos conservado do aminoácido Lisina, em vermelho temos o resíduo conservado de tirosina, a segunda coluna em cinza temos o domínio Walker B, e na região C-terminal em cinza, está presente o cluster de tirosina. O alinhamento múltiplo parcial foi realizado utilizando ClustalW, GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Para Elsholz et al. (2014), o que poderia regular todo esse cluster de tirosinas, na posição C-terminal da proteína, é a auto regulação mediada pela tirosina quinase, estabelecendo vínculo com a produção de EPS mesmo tendo-o em nível basal, como foi relatado por Gerwig et al. (2014). GDI2549 é uma proteína altamente conservada em todas as estirpes sequenciadas de *Gluconacetobacter* e *Escherichia*. No entanto, pode ser encontrada em *Azospirillum* e homólogos também estão presentes em *Rhizobium* (*exoY*), *Burkholderia cepacia* (*bceA*) (MULLER et al., 1993; GRIFFIN et al., 1996; SOUSA et al., 2007).

A sequência de aminoácidos foi alinhada com onze sequências com *e-value* $>10^{-56}$, onde a análise Pfam mostrou que as onze sequências também possuem domínios para tirosina quinases, a árvore filogenética, gerada pelo MEGA-X, mostra que a proteína GDI2549 de *G. diazotrophicus* está muito próxima de uma tirosina quinase de *G. SXCC-1* ambas pertencentes à classe das α -proteobactérias, e estas duas enzimas sendo agrupadas em um grupo maior junto com dez sequências todas pertencentes ao filo das Proteobacterias (Figura 3).

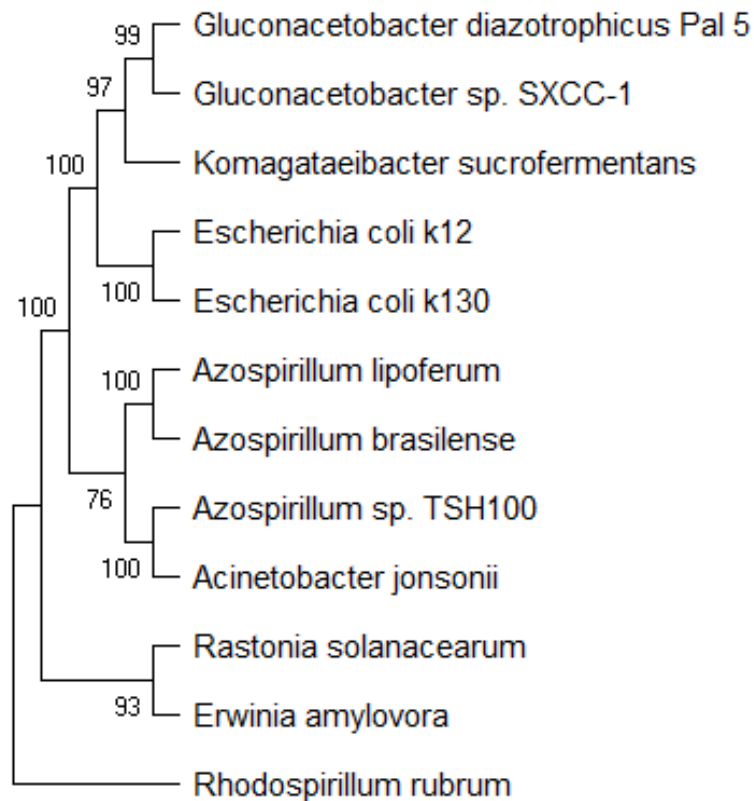


Figura 3. Árvore filogenética das proteínas tirosinas quinases dos organismos analisados, calculada pelo método Neighbor-Joining, fornecida pelo MEGA X (www.megasoftware.net).

Foi publicada a existência e a sequência de um agrupamento GDI2549 em *G. diazotrophicus* (BERTALAN et al., 2009), também presente e bastante conservado em uma outra espécie de *Gluconacetobacter* (*Gluconacetobacter* sp. SXCC-1). Curiosamente este agrupamento também possui semelhanças ao agrupamento tirosinas quinases de *E. coli* K12, que é evolutivamente muito distante de *G. diazotrophicus*, mas compartilha a mesma proteína. Esse agrupamento é semelhante o suficiente ao de espécies de *Azospirillum* e merece uma hipótese de transferência horizontal de genes recente (GRANGEASSE et al., 2003).

Os resultados da análise físico-químicas apontaram que a proteína GDI2549 possui uma massa molecular de ~78.19kDa, 11.032 átomos, um ponto isoelétrico teórico de 8,31, uma fórmula estrutural de $C_{3403}H_{5540}N_{1022}O_{1045}S_{22}$ e é considerada uma proteína bastante estável, e de caráter hidrofóbico.

A predição das estruturas secundárias de GDI2549 revelou a presença de 56,77% de α -hélices, 6,77% de folhas- β e, finalmente, 36,46% de conexões do tipo alças e voltas (*loops* e *turns*, respectivamente) (Figura 4).

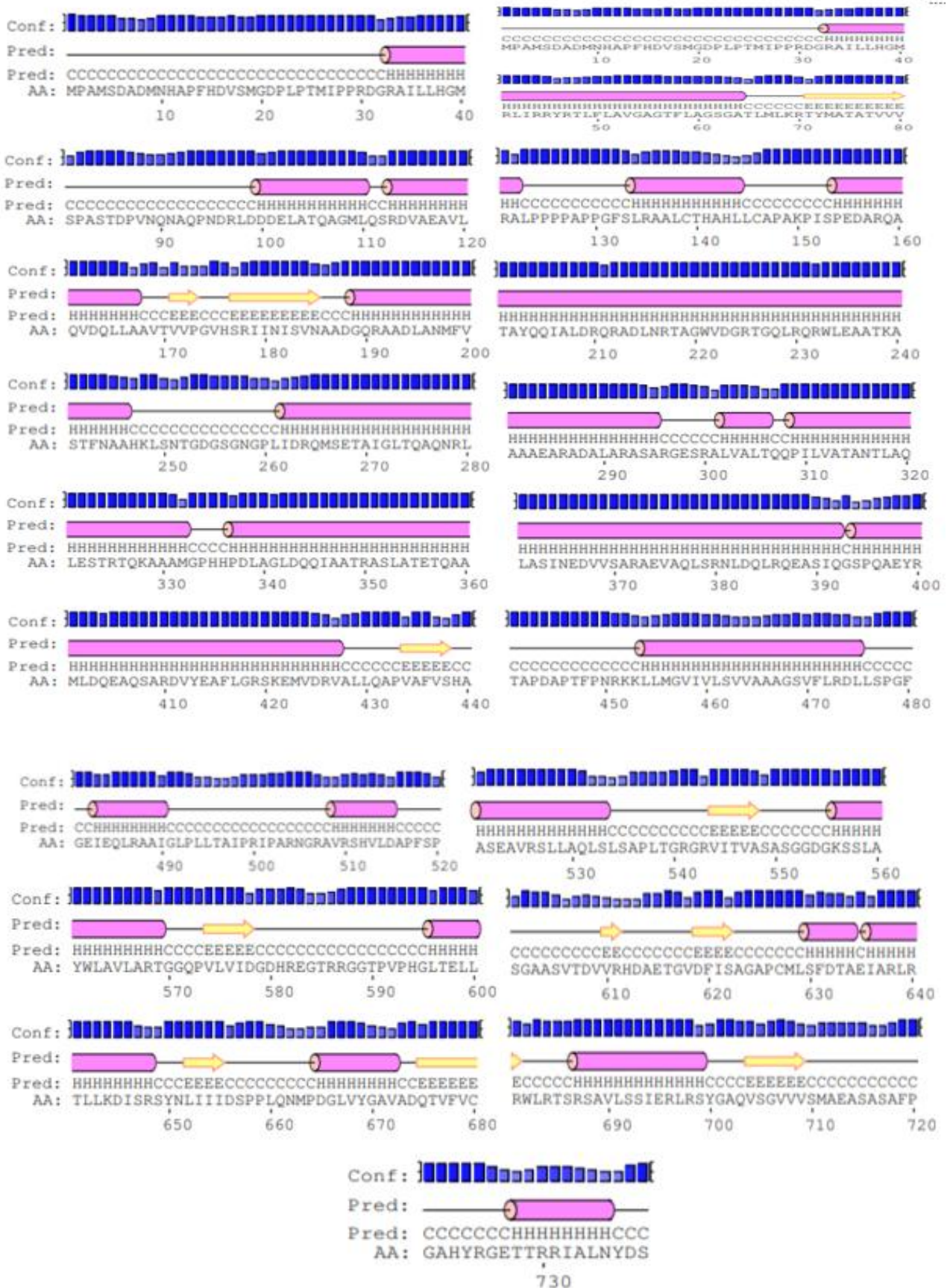


Figura 4. Predição da estrutura secundária de GDI2549 de *G. diazotrophicus* pelo o servidor PsiPred. A predição da estrutura secundária está sobre a sequência. Os cilindros rosas representam α -hélices e as setas amarelas

representam as folhas- β enquanto que os *loops* estão representados por um traço preto. As colunas azuis mostram a confiabilidade da predição, PsiPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

O programa Protter acusou duas prováveis regiões transmembrânicas e que estão compreendidas entre os resíduos 49-68 (*escore*: 1,391) e 454-472 (*escore*: 0,718) (Figura 5). Dessa forma, ao apresentar essas possíveis regiões transmembrânicas, acredita-se que para ocorrer a fosforilação e produção de EPS, precisa-se dessa alta intensidade de tirosina na região C terminal (722-736), como mostra a figura 5.

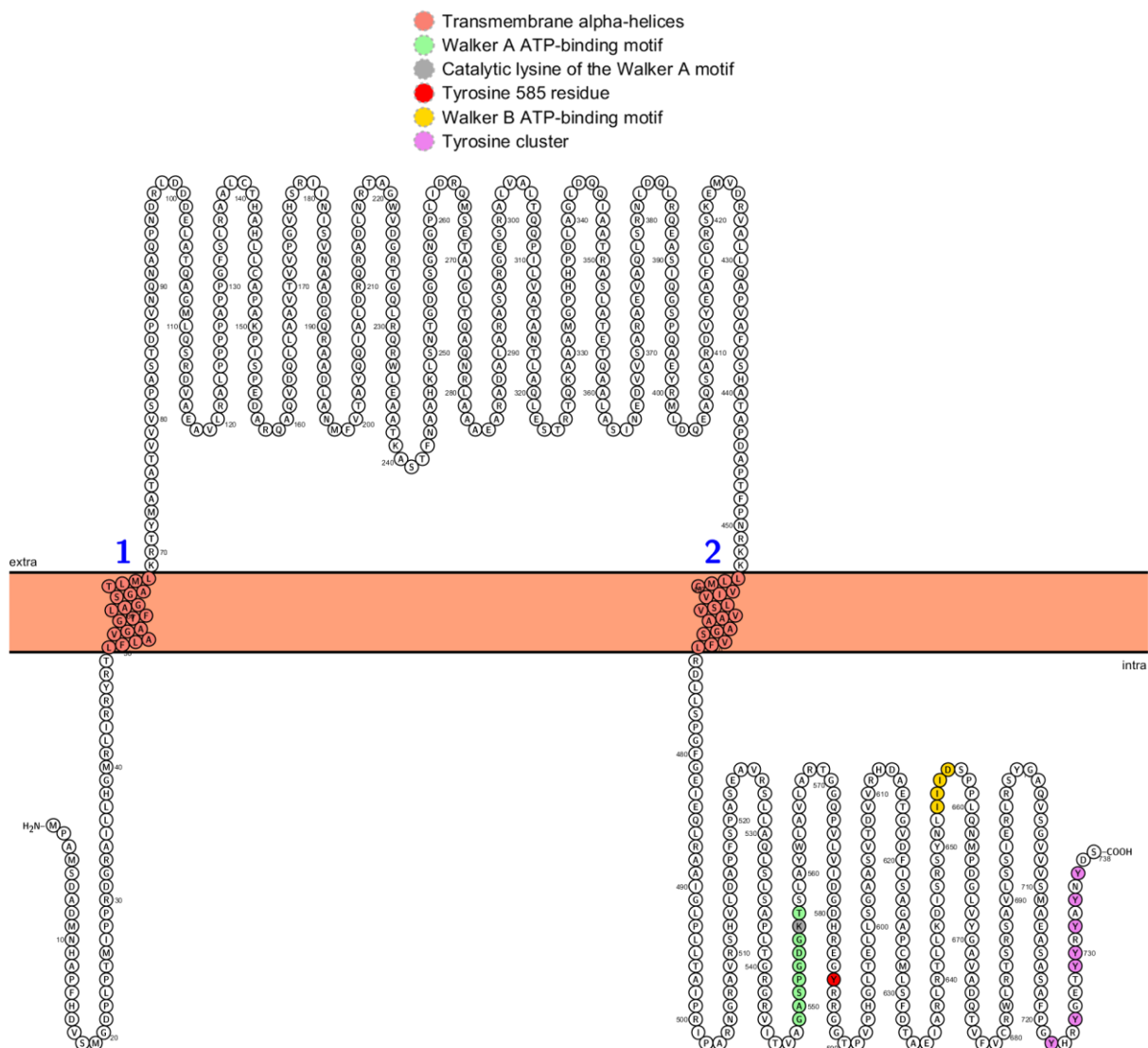


Figura 5. Topologia das prováveis regiões transmembrânicas da proteína GDI2549. Figura gerada pelo programa Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>).

As proteínas tirosina quinases de bactérias Gram-negativas são geralmente proteínas grandes (~ 80 kDa) compostas de um domínio transmembrana N-terminal e um domínio tirosina quinase citosólico C-terminal (DOUBLET et al., 2002) contendo os sítios ativos Walker A e B (Figura 5). As diferentes organizações de domínio em proteínas tirosina quinases de bactérias

Gram-negativas e Gram-positivas sugeriram que estas enzimas podem ser reguladas de maneira diferente. De fato, embora a autofosforilação intermolecular no cluster de tirosina C-terminal (cinco tirosinas da posição 708 para a posição 715) seja estimulada por autofosforilação intramolecular em Tyr₅₆₉ (GRANGEASSE et al., 2002), em *G. diatrophicus* Tyr₅₈₅. Diversos estudos foram realizados para avaliar o papel biológico da fosforilação do cluster de tirosina localizado na extremidade C-terminal proteínas tirosina quinases. Em bactéria Gram-positivas, como *Streptococcus pneumoniae*, a fosforilação de apenas um dos diferentes resíduos de tirosina no cluster de tirosina parece ser suficiente para inativar a inativação da glicosil transferase posterior (MORONA et al., 2003). Em qualquer caso, qualquer que seja o mecanismo utilizado, parece que a fosforilação é necessária para modular a atividade das proteínas tirosina quinases no metabolismo dos exopolisacarídeos.

4.2. Atividade da proteína tirosina quinase de *G. diazotrophicus*

Logo após uma caracterização *in silico* da proteína codificada pela ORF GDI2549, foi realizado um ensaio para detecção da sua atividade quinase *in vivo* (Figuras 6A e B). Como podemos observar, durante o ensaio realizado a proteína foi capaz de fosforilar o substrato utilizado no ensaio, isso indicando realmente sua função de tirosina quinase, predito nas análises *in silico*.

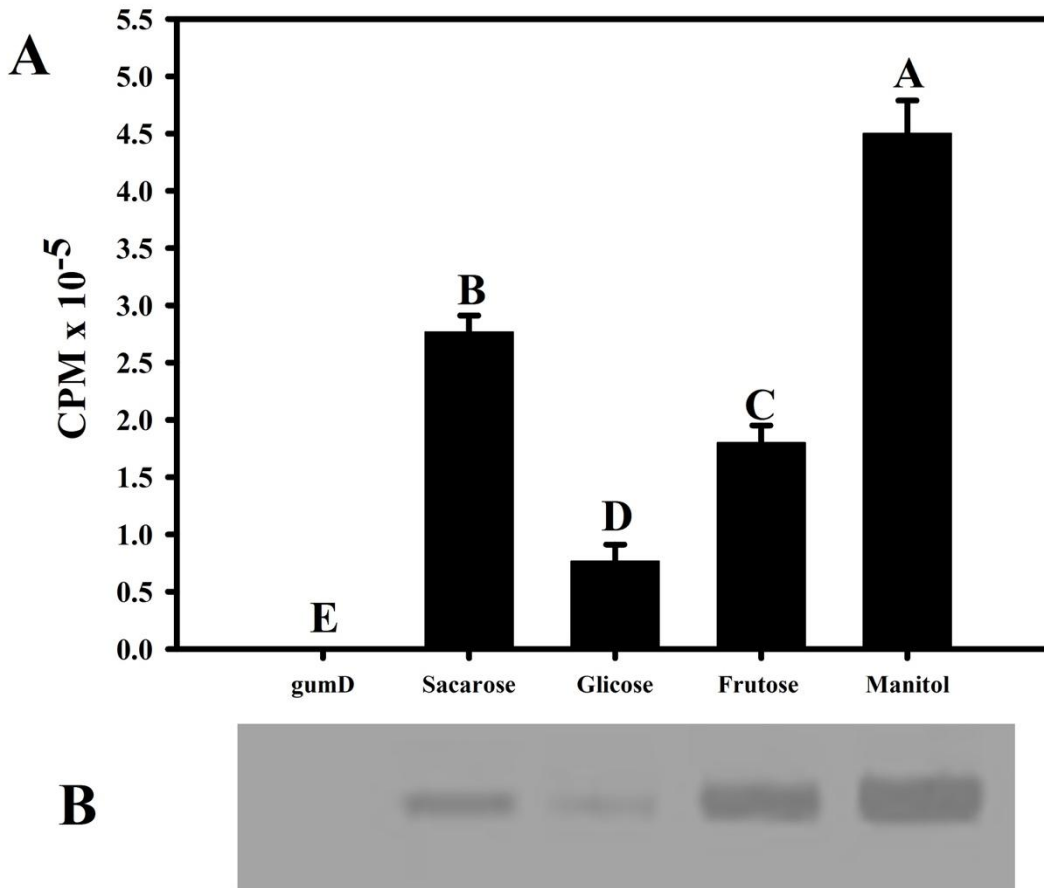


Figura 6. Ensaio para detecção da atividade quinase de GDI2549. A. Quantificação absoluta da cintilação emitida pela estirpe mutante gumD e selvagem Pal5 e em diferentes fontes de carbono; B. Autorradiografia indicando a atividade quinase da proteína codificada pela GDI2549.

Ainda vale ressaltar que a atividade quinase de GDI2549, está condicionada ao crescimento em diferentes fontes de carbono, isso mostrando que quanto mais EPS produzido pela bactéria (MENESES et al., 2011), maior a atividade tirosina quinase da proteína. Atividade semelhante encontrada em bactérias Gram-negativas, como: *E. coli* K12 (GRANGEASSE, et al., 2002) e em bactérias Gram-positivas, como: *Bacillus subtilis* (ELSHOLZ et al., 2014).

O autoradiograma forneceu uma visualização qualitativa dos resultados (Figura 7B), onde pode-se observar nitidamente a autofosforilação da proteína tirosina quinase de *G. diazotrophicus* no mutante gumD⁻. Para uma quantificação mais precisa, a incorporação de ³²P foi aferida com um contador de cintilação líquida. Os dados foram usualmente expressos em termos de atividade absoluta, como mostrado na Figura 7A. Enquanto as condições entre os tratamentos se mantiveram uniformes para todas as amostras, as medições absolutas de atividade específica foram suficientes para comparar os tratamentos.

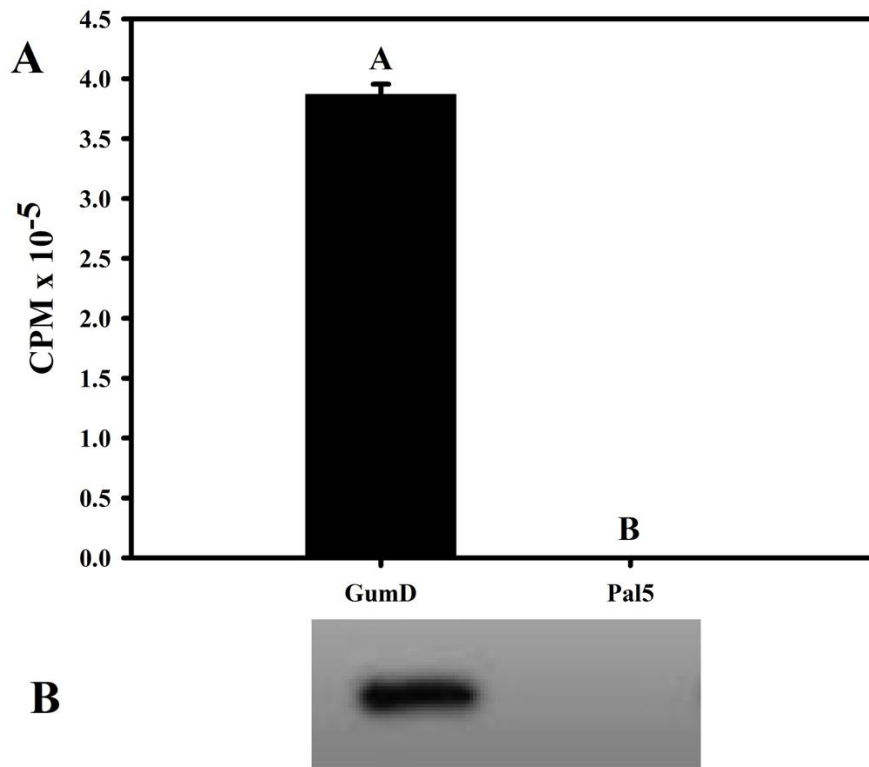


Figura 7. Ensaio de imunoprecipitação indicando a autofosforilação da tirosina quinase no mutante gumD. A. Quantificação absoluta da cintilação emitida pela estirpe selvagem Pal5 e pelo mutante deficiente na produção de exopolissacarídeos Gum-; B. Autorradiografia indicando a autofosforilação do mutante gumD-.

Na estirpe selvagem Pal5 o EPS interage com o domínio extracelular (componente de membrana) da tirosina quinase, que é um receptor, para controlar a sua atividade da quinase sobre uma glicosiltransferase. Na ausência de EPS, mutante gumD⁻, a quinase é inativada por autofosforilação. Logo, a presença de EPS inibe a autofosforilação e, em vez disso, promove a fosforilação de uma glicosiltransferase na via biossintética, estimulando assim a produção de EPS (GRANGEASSE, et al., 2010). Como sugerido no modelo proposto abaixo (Figura 8).

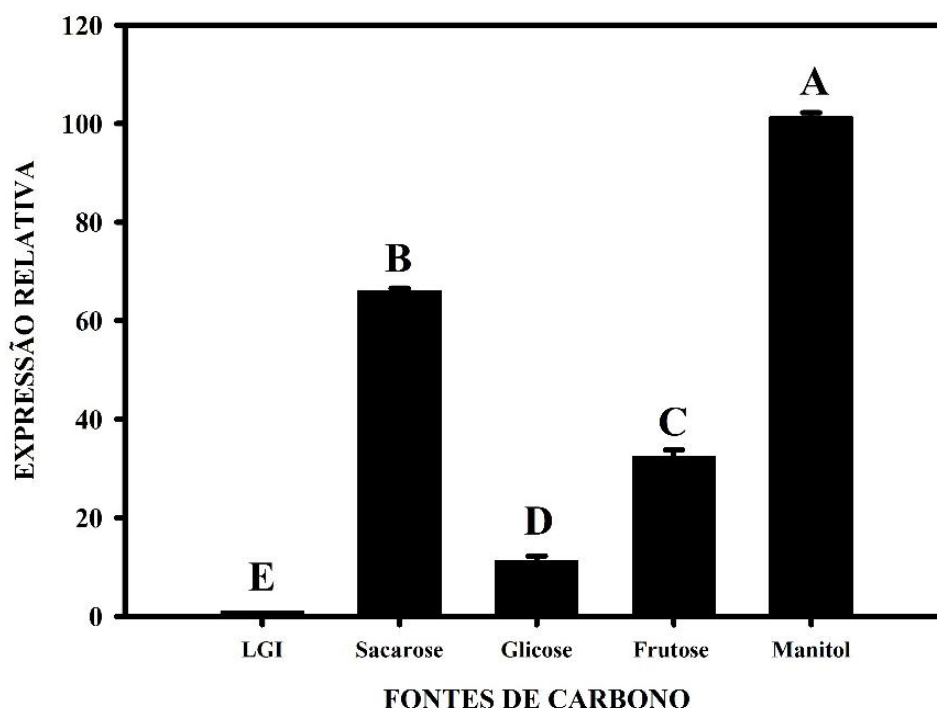


Figura 9: Expressão relativa do gene *GDI2549* de *G. diazotrophicus* envolvido na regulação da biossíntese de exopolissacarídeos. Expressão relativa do mRNA correspondente ao gene *GDI2549* em culturas crescidas durante 72h. O nível dos transcritos é representado como a taxa (expressão relativa) do valor absoluto do gene estudado pelo valor absoluto do gene na condição de crescimento em meio LGI. Os valores foram normalizados em relação a expressão do gene constitutivo 23S. Média +/- barra de erros de três experimentos independentes são apresentados.

Identificou-se que com 72h de crescimento, quase todos os tratamentos analisados apresentaram um aumento no número de transcritos para *GDI2549*, quando comparados a condição de crescimento em meio LGI, vale ressaltar que o menor valor de expressão relativa foi para o tratamento suplementado com glicose. Foi possível observar uma resposta generalizada da bactéria, aumentando a expressão do gene *GDI2549*, quando crescido na presença de manitol. Esses dados sugerem que o padrão de expressão gênica pode ser correlacionado com as diferentes fontes de carbono presentes no meio de crescimento. Estes dados corroboram com os encontrados por Meneses et al. (2011), onde estudaram a produção de exopolissacarídeos em diferentes fontes de carbono, encontrando resultados bastante semelhantes. Esse fato indica que a maior concentração de exopolissacarídeos na célula aumenta os níveis de expressão da tirosina quinase expressa pela GDI 2549.

5. CONCLUSÕES

As análises *in silico* identificaram que existe pelo menos uma via de regulação da biossíntese de EPS em *G. diazotrophicus*, por tirosina quinase;

As análises sugerem que a ORF GDI2549, é homóloga ao gene que codifica uma tirosina quinase, que fosforila uma glicosiltransferase iniciadora da biossíntese de EPS em *G. diazotrophicus*;

A ORF GDI2549 de *G. diazotrophicus* apresenta atividade quinase, em diferentes níveis a depender da fonte de carbono utilizada no crescimento;

A estirpe mutante para o gene *gumD*⁻ de *G. diazotrophicus* apresentou alteração na atividade quinase em culturas radiomarcadas;

A estirpe selvagem Pal5 de *G. diazotrophicus* apresentou alterações na expressão relativa do gene *GDI2549*, quando a bactéria foi crescida em diferentes fontes de carbono, sugerindo dessa forma um mecanismo de regulação por retroalimentação positiva;

REFERÊNCIAS

- ALQUÉRES, S.; MENESES, C.H.S.G.; ROUWS, L.F.M; ROTHBALLER, M.; BALDANI, J.I.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. The Bacterial Superoxide Dismutase and Glutathione Reductase Are Crucial for Endophytic Colonization of Rice Roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 8, p. 937-945, 2013.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.
- ASHBOLT, N. J.; INKERMAN, P. A. Acetic-acid bacterial biota of the pink sugar-cane, *Saccharococcus sacchari*, and its environs. **Applied and environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 707-712, 1990.
- ARRIETA, J.; HERNANDEZ, L.; COEGO, A.; SUAREZ, V.; BALMORI, E.; MENENDEZ, C.; PETITGLATRON, M. F.; CHAMBERT, R.; SELMANHOUSEIN, G. Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. **Microbiology**, v. 142, p. 1077-1085, 1996.
- ATTWOOD, M. M.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 72, n. 2, p. 101-105, 1991.
- BECHET, E.; GRUSZCZYK, J.; TERREUX, R.; GUEGUEN-CHAIGNON, V.; VIGOUROUX, A.; OBADIA, B.; COZZONE, A. J.; NESSLER, S.; GRANGEASSE, C. Identification of structural and molecular determinants of the tyrosine-kinase Wzc and implications in capsular polysaccharide export. **Molecular Microbiology**, p. 1315-1325, 2010.
- BERTALAN, M.; ALBANO, R.; PÁDUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HERMERLY, A.; TEIXEIRA, K.; SCHAWAB, S.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, A.; FRANÇA, L.; MAGALHÃES, V.; ALQUÉRES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIRA, W.; LOUREIRO, M.M.; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMÃO, T.; MACEDO, J.; VALADÃO, A.; DRESCHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M.; GUEDES, H.; RODRIGUES, E.; MENESES, C.H.S.G.; BRIOSO, P.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; JUNIOR, J.; SOUZA-FILHO, G.; FLORES, V.M.Q.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; QUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L.; MACEDO, J.; ALVES-FERREIRA, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; COELHO, A.; SANTOS, E.; AMARAL, G.; NEVES, A.; PACHECO, A.B.; CARVALHO, D.; LERY, L.; BISCH, P.; RÖSSLE, S.C.; ÜRMÉNYI, T.; PEREIRA, A.R.; SILVA, R.;

RONDINELLI, E.; KRÜGER, W.; MARTINS, O.; BALDANI, J.I.; FERREIRA, P.C.G. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, v. 10, 2009.

CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.

COJHO, E. H.; REIS, V. M.; SCHENBERG, A. C. G.; DOBEREINER, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. **Fems Microbiology Letters**, v. 106, n. 3, p. 341-346, 1993.

CUTHBERTSON L. MAINPRIZE I.L. NAISMITH J.H. WHITFIELD C. Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria. **Microbiology Molecular Biology Reviews** v.73, p. 155–177, 2009.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.61, p. 401-422, 2007.

DA SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M.; DO AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, R. C.; FERRO, M. I.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459-63, 2002.

DA SILVA, F. R.; VETTORE, A. L.; KEMPER, E. L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidious gum: The *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 203, n. 2, p. 165-171, 2001.

DÖBEREINER; V.L.D., B.; OLIVARES, F.L.; REIS, V. M. Endophytic diazotrophs: the key to BNF in gramineous plants. In: HEGAZI, N. A.; FAYEZ, M.; MONIB, M. (Ed.). **Nitrogen Fixation with Non-Legumes**. Giza, Egypt: Faculty of Agriculture, Cairo University, 1993. p. 395-408.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; MCCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. R.; FERNANDEZ CABADILLA, C.; ORTEGA, E.; RODES, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. **Plant Physiology**, v. 105, n. 4, p. 1139-1147, 1994.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J.C. GALINDO, S.S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951– 962, 2012.

DOUBLET, P.; GRANGEASSE, C.; OBADIA, B.; VAGANAY, E.; COZZONE, A. J. Structural Organization of the Protein-tyrosine Autokinase Wzc within *Escherichia coli* Cells. **Journal Biological Chemistry**, v.277, 37339–37348, 2002.

ELSHOLZ, A. K. W.; WACKER, S. A.; LOSICK R. Self-regulation of exopolysaccharide production in *Bacillus subtilis* by a tyrosine kinase. **Genes Dev.** 28,1710-1720, 2014.

FITRIYANTO, N.A.; FUSHIMI, M.; MATSUNAGA, M.; PERTIWININGRUM, A.; IWAMA, T.; KAWAI, K. Molecular structure and gene analysis of Ce³⁺-induced methanol dehydrogenase of *Bradyrhizobium* sp. MAFF211645. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 6, p. 613-617, 2011.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A. M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 388-398, 2011.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; PAIS, J.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M. A. M. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 297-305, 2010.

FUENTES-RAMIREZ, L. E.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; JIMENEZ-SALGADO, T.; WANG, E. T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLEROMELLADO, J. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp nov and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp nov, associated with coffee plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1305-1314, 2001.

GARCIA-CRUZ, C.H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A.N. Alginato bacteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, v.31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.

GERWIG, J.; KILEY, T. B.; GUNKA, K.; STANLEY-WALL, N.; STULKE, J. The protein tyrosine kinases EpsB and PtkA differentially affect biofilm formation in *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, v.160, p. 682–691, 2014.

GONZALEZ, J. E.; REUHS, B. L.; WALKER, G. C. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 16, p. 8636-8641, 1996.

GRANGEASSE, C.; DOUBLET, P.; VINCENT, C.; VAGANAY, E.; RIBERTY, M.; DUCLOS, B.; COZZONE, A. J. Functional characterization of the low-molecular-mass phosphotyrosineprotein phosphatase of *Acinetobacter johnsonii*. **Journal of Molecular Biology**, v.47, p. 278-339, 1998.

GRANGEASSE, C.; DOUBLET, P.; COZZONE, A. J. Tyrosine phosphorylation of protein kinase *wzc* from *Escherichia coli* k12 occurs through a two-step process. **Journal Biological Chemistry**, v.277, 7127–7135, 2002.

GRANGEASSE, C.; COZZONE, A.J.; DEUTSCHER, J.; MIKAKOVIC, I. Tyrosine phosphorylation: and emerging regulatory device of bacterial physiology. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 2, p. 86-94, 2003.

GRANGEASSE, C.; TERREUX, R.; NESSLER, S. Bacterial tyrosine-kinases: structure-function analysis and therapeutic potential. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804, n. 3, p. 628-634, 2010.

GRANGEASSE, C.; NESSLER, S.; MIKAKOVIC, I. Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 367, p. 2640-2655, 2012.

GRIFFIN, A. M.; MORRIS, V. J.; GASSON, M. J. Identification, cloning and sequencing the *aceA* gene involved in acetan biosynthesis in *Acetobacter xylinum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 137, n. 1, p. 115-121, 1996.

HALLACK, L.F.; PASSOS, D.S.; MATTOS, K.A.; AGRELLOS, O.A.; JONES, C.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J.O.; TODESCHINI, A.R. Structural elucidation of the repeat unit in highly branched acidic exopolysaccharides produced by nitrogen fixing *Burkholderia*. **Glycobiology**, v. 20, n.3, p. 338-347, 2010.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. **Journal of Biotechnology**, v. 106, p. 169-178, 2003.

JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Infection of sugar-cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 275, p. 757-766, 1994.

JIMENEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L.E.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; MASCARUA-ESPARZA, M.A.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3676-3683, 1997.

- KANNENBERG, E. L.; PEROTTO, S.; BIANCIOTTO, V.; RATHBUN, E. A.; BREWIN, N. J. Lipopolysaccharide epitope expression of rhizobium bacteroids as revealed by in-situ immunolabeling of pea root-nodule sections. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 7, p. 20212032, 1994.
- KARRA, A.S.; STIPPEC, S.; COBB, M. H. Assaying protein kinase activity with radiolabeled ATP. **Journal of Visualized Experiments**, v. 123, p.55504, 2017;
- KATZEN, F.; FERREIRO, D. U.; ODDO, C. G.; IELMINI, M. V.; BECKER, A.; PUHLER, A.; IELPI, L. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: Effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 7, p. 1607-1617, 1998.
- KOJIMA, Y.; TONOUCHE, N.; TSUCHIDA, T.; YOSHINAGA, F.; YAMADA, Y. The characterization of acetic acid bacteria efficiently producing bacterial cellulose from sucrose: The proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *Nonacetoxi* dans subsp. nov. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 185-187, 1998.
- 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.
- MANAI, M.; COZZONE, A. J. Endogenous protein phosphorylation in *Escherichia coli* extracts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, p.981-988, 1982.
- MENESES, C.H.S.G.; GONÇALVES, T.; ALQUÉRES, S.; ROUWS, L.; SERRATO, R.; VIDAL, M.; BALDANI, J.I. *Gluconacetobacter diazotrophicus* exopolysaccharide protects bacterial cells against oxidative stress in vitro and during rice plant colonization. **Plant and Soil**, v. 416, p. 133-147, 2017.
- MENESES, C.H.S.G.; ROUWS, L.F.M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J.I. Exopolysaccharide Production is Required for Biofilm Formation and Plant Colonization by the Nitrogen-Fixing Endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 12, p. 1448-1458, 2011.
- MIJAKOVIC, I.; PONCET S.; BOËL G.; MAZÉ A.; GILLET S.; JAMET E.; DECOTTIGNIES P.; GRANGEASSE C.; DOUBLET P. Transmembrane modulator-dependent bacterial tyrosine kinase activates UDP-glucose dehydrogenases. **The EMBO Journal** v. 22, p.4709–4718, 2003.
- MORONA, J.K.; MORONA, R.; MILLER, D.C.; PATON, J.C. Mutational analysis of the carboxy-terminal (YGX)₄ repeat domain of CpsD, an autophosphorylating tyrosine kinase required for capsule biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Bacteriology** p. 3009-3019, 2003.
- MORRIS, J.; GONZÁLEZ, J. E.; The Novel Genes *emmABC* Are Associated with Exopolysaccharide Production, Motility, Stress Adaptation, and Symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 19, p. 5890-5900, 2009.

MULLER, P.; KELLER, M.; WENG, W. M.; QUANDT, J.; ARNOLD, W.; PUHLER, A. Genetic-analysis of the *Rhizobium meliloti* exoYFQ operon - exoY is homologous to sugar transferases and exoQ represents a transmembrane protein. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, n. 1, p. 55-65, 1993.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 2, p. 157-164, 1999.

MUTHUKUMARASAMY, R.; KANG, U.G.; PARK, K.D.; JEON, W.T.; CHO, Y.S.; KWON, S.W.; SONG, J.; ROH, D.H.; REVATHI, G. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 981-991, 2007.

NIEMEYER, D.; BECKER, A. The molecular weight distribution of Succinoglycan produced by *Sinorhizobium melilotis* influenced by specific tyrosine phosphorylation and ATPase activity of the cytoplasmic domain of the ExoP protein. **Journal of Bacteriology** p. 5163-5170, 2001.

NWODO, U.; U, AGUNBIADE, M. O.; GREEN, E.; NWAMADI, M.; RUMBOLD, K.; OKOH, A.I. Characterization of an exopolymeric flocculant produced by a *Brachy bacterium* sp. **Materials**. 2013.

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

ORTEGA, E.; RODES, R.; DE LA FUENTE, E.; FERNANDEZ, L. Does the routine heat treatment of sugarcane stem pieces for xylem pathogen control affect the nitrogenase activity of an N₂-fixing endophyte in the cane? **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 907-912, 2001.

PAIMENT, A.; HOCKING, J.; WHITFIELD, C. Impact of phosphorylation of specific residues in the tyrosine autokinase, Wzc, on its activity in assembly of group 1 capsules in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.184, p. 6437-6447, 2002.

PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, v. 11, p. 111-115, 1991.

PEREIRA, M.F.N.; FERNANDES, S.A.F.; NASCIMENTO, A.R.; SIU, E.R.; HESS, R.A.; OLIVEIRA, C. A.; PORTO, C.S.; LAZARI, M.F.M. Effects of the oestrogen receptor antagonist Fulvestrant on expression of genes that affect organization of the epididymal epithelium. **Andrology** v.2, p. 559-571, 2014.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 1, p. 29-54, 1998.

REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; DOBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, n.4, p.401-405, 1994.

ROCHA FR, PAPINI-TERZI FS, NISHIYAMA JR MY, VÊNCIO RZN, VICENTINI R, DUARTE RDC, DE ROSA JR VE, VINAGRE F, BARSALOBRES C, MEDEIROS AH, RODRIGUES FA, ULIAN EC, ZINGARETTI SM, GALBIATTI JÁ, ALMEIDA RS, FIGUEIRA AVO, HEMERLY AS, SILVA-FILHO MC, MENOSSI M, SOUZA GM. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **Biomed Central Genomics** v. 8, p.71, 2007.

ROUWS, L.F.M.; MENESES, C.H.S.G.; GUEDES, H.V.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J.I.; SCHWAB, S. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. **Letters in Applied Microbiology**, v.51, p.325-330, 2010.

SERRATO, R.V.; MENESES, C.H.S.G.; VIDAL, M.S.; SANTANA-FILHO, A.P.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G.L.; BALDANI, J.I. Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **Carbohydrate Polymers**, v.98, p.1153-1159, 2013.

SEVILLA, M.; BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif⁻ mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 3, p. 358-366, 2001.

SKORUPSKA, A.; JANCZAREK, M.; MARCZAK, M.; MAZUR, A.; KRÖL, J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. **Microbial Cell Factories**, v.5:7, 2006.

SOUSA, S. A.; MOREIRA, L. M.; WOPPERER, J.; EBERL, L.; SA-CORREIA, I.; LEITAO, J. H. The *Burkholderia cepacia* bceA gene encodes a protein with phosphomannose isomerase and GDP-D-mannose pyrophosphorylase activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, n. 1, p. 200-206, 2007.

STEPHAN, M. P.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K. R. S.; MARTINEZ-DRETS, G.; DOBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 77, n. 1, p. 67-72, 1991.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**, v. 8, p. 142-213, 1979.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 663-674, 2001.

TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; BUSTILLOS-CRISTALES, M.R.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L.E. Natural endophytic occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. **Microbial Ecology**, v.39, p.49-55, 2000.

TEJERA, N. A.; ORTEGA, E.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; LLUCH, C. Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 528-535, 2003.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.; HIGGINS, D.G. Multiple sequence alignment using CLUSTALW and CLUSTALX. **Current Protocols in Bioinformatics**, Chapter 2, Unit 2 3, 2002.

VALVERDE, A.; CASTRO-SOWINSKI, S.; LERNER, A.; FIBACH, S.; MATAN, O.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Exopolysaccharide production and cell aggregation in *Azospirillum brasilense*. **Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture**, v. 42, p. 319-320, 2008

VINAGRE, F.; VARGAS, C.; SCHWARCZ, K.; CAVALCANTE, J.; NOGUEIRA, M.E.; BALDANI, I.J.; FERREIRA, G.C.P.; HEMERLY, S.A. SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant–N₂-fixing endophytic bacteria association. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 559–569, 2006.

VINCENT, J.; THOMPSON, J.; DONOVAN, K. Death of root-nodule bacteria on drying. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.13, p.258-270, 2000.

WALKER, J. E.; SARASTE, M.; RUNSWICK, M. J.; GAY, N. J. Distantly related sequences in the α - and β subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. **The EMBO Journal**, v.1, p. 945-951, 1982.

WALKER, G. R.; BURGESS, D. R.; KINSEY, W. H. Fertilization promotes selective association of the Abl-kinase with the egg cytoskeleton. **European Journal of Cell Biology**, V.70, p. 165-171, 1996.

WHITFIELD, C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. **Annual Review of Biochemistry**, v.75, p.39-68, 2006.

WUGEDITSCH T.; PAIMENT A.; HOCKING J.; DRUMMELSMITH J.; FORRESTER C.; WHITFIELD C. Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, p.2361–2371, 2001.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. Taxonomic studies of acetic acid bacteria and allied organisms .11. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level.

Bioscience Biotechnology and Biochemistry, v. 61, n. 8, p. 1244-1251, 1997.