

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Explorando a fixação de nitrogênio via nitrogenase alternativa em *Paenibacillus sonchi* SBR5<sup>T</sup>: aspectos filogenéticos e abordagem proteômica**

IGOR DANIEL ALVES RIBEIRO

Porto Alegre

Abril de 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Explorando a fixação de nitrogênio via nitrogenase alternativa em *Paenibacillus sonchi* SBR5<sup>T</sup>: aspectos filogenéticos e abordagem proteômica**

IGOR DANIEL ALVES RIBEIRO

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular)**

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciane Maria Pereira Passaglia

Porto Alegre

Abril de 2023

Este trabalho foi desenvolvido no Núcleo de Microbiologia Agrícola, Laboratório de Genética Molecular Vegetal, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) responsável pela concessão de bolsa de estudos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Luciane Passaglia pela oportunidade, suporte e postura inspiradora ao longo desses anos, com quem muito pude e sigo aprendendo.

Agradeço a todos os colaboradores que se envolveram direta e indiretamente nesse projeto, em especial à Evelise Bach pela parceria que se estende desde o meu mestrado.

Agradeço à Gabriela Fernandes pelas sugestões e discussões, e por desbravar pioneiramente os caminhos tortuosos da fixação alternativa de nitrogênio em *Paenibacillus* deixando essa estrada mais fácil de ser percorrida. Espero que outros continuem se enveredando por ela.

Agradeço ao Prof. Henrique Ferreira e à Jéssica Paes por todo suporte no preparo das amostras do experimento de proteômica e por suas valiosas sugestões.

Agradeço à Equipe do Laboratório de espectrometria de massas vinculado ao Laboratório de Nacional de Biociências (LNBio - CNPEM) pelas análises.

Agradeço ao Prof. Volker Wendisch e toda a sua equipe por terem me recebido gentilmente em seu laboratório em Bielefeld e por suas sugestões nesse trabalho.

Agradeço à Edileusa Gerhardt por seu apoio em alguns ensaios exploratórios e por sugestões que com certeza serão úteis para os desmembramentos deste trabalho.

Agradeço ao PPGBM pela oportunidade, e ao Elmo Cardoso por ser sempre tão prestativo e fazer com que tudo aconteça na máxima eficiência possível.

Agradeço à Leticia Gal por sempre estar tão gentilmente disposta a auxiliar e por muito ter auxiliado ao longo desses anos.

Agradeço aos colegas da Genética Molecular Vegetal e especialmente do Núcleo de Microbiologia Agrícola.

Agradeço à FAPERGS pelo financiamento deste trabalho e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A todos muito obrigado!

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1 Micro-organismos rizosféricos: características e importância.....	11
1.2 Fixação biológica de nitrogênio: importância agrícola e ambiental.....	11
1.3 Fixação biológica de nitrogênio: aspectos genéticos, bioquímicos e moleculares.....	12
1.4 A regulação da fixação biológica de nitrogênio.....	15
1.5 Regulação da fixação biológica do nitrogênio em gram-positivos: o caso do gênero <i>Paenibacillus</i> .....	19
1.6 <i>Paenibacillus sonchi</i> genomovar Riograndensis SBR5 <sup>T</sup> .....	21
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
<b>3 CAPÍTULO I Alternative nitrogenase of <i>Paenibacillus sonchi</i> genomovar Riograndensis: An insight in the origin of Fe-nitrogenase in the Paenibacillaceae Family.....</b>	<b>25</b>
<b>4 CAPÍTULO II Proteome Profiling of <i>Paenibacillus sonchi</i> genomovar Riograndensis SBR5<sup>T</sup> Under Conventional and Alternative Nitrogen Fixation.....</b>	<b>52</b>
<b>5 CAPÍTULO III Distribution of PII Protein Amongst Paenibacillaceae Family Genomes.....</b>	<b>83</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>110</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>114</b>

**ANEXO I..... 121**

## LISTA DE ABREVIATURAS

2-OG – 2-oxoglutarato

ADP – Adenosina difosfato

AFC – *Alternative Fixing Condition* (Condição de fixação alternativa)

ATP – Adenosina trifosfato

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta básica de busca por alinhamento local)

CFC – *Conventional Fixing Condition* (Condição de fixação convencional)

DNA - *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DraG – *dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase* (Dinitrogenase redutase glicohidrolase)

DraT - *dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase* (Dinitrogenase redutase ADP-ribosil transferase)

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

GO - *Gene Ontology*

GOGAT – Glutamato sintase

GS – Glutamina sintase

HGT – *Horizontal Gene Transfer* (Transferencia horizontal de genes)

IRS - Indução de Resistência Sistêmica

LPSN – *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*

ML – *Maximum likelihood* (Máxima verossimilhança)

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NFC – *Non-fixing Control* (Controle de não fixação)

PFOR – *pyruvate-flavodoxin oxidoreductase* (Piruvato-flavodoxina oxidorreductase)

PGPR - *Plant growth promoting rhizobacteria* (Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal)

SSN - *Sequence Similarity Network* (Redes de similaridade de sequências)

## RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma das etapas chave no ciclo biogeoquímico desse elemento. Por trás deste, que constitui um dos mais importantes processos biológicos, existe um complexo enzimático que carrega em seu sítio ativo um cofator metálico ( $\text{Fe}_7\text{MoS}_9\text{C}$ ) bastante singular. Alternativamente à enzima convencional, duas outras homólogas são capazes de utilizar vanádio (V) ou apenas ferro (Fe) em substituição ao molibdênio (Mo) em seus cofatores, as ditas V- e Fe-nitrogenases, respectivamente. A FBN pelas nitrogenases alternativas é menos estudada que sua contraparte convencional, especialmente em bactérias gram-positivas. *Paenibacillus sonchi* genomovar *Riograndensis* SBR5<sup>T</sup> é uma bactéria aeróbica facultativa formadora de endósporos. Essa estirpe é capaz de fixar nitrogênio, tanto pela nitrogenase convencional como pela Fe-nitrogenase. No entanto, vários aspectos relativos à origem, regulação e funcionamento da Fe-nitrogenase nesse organismo são pouco elucidados. Nesse trabalho, a ocorrência de Fe-nitrogenases foi explorada no contexto da família Paenibacillaceae, sendo identificada em diferentes gêneros. Os resultados sugerem que esse sistema tenha sido adquirido por uma linhagem ancestral de alguns desses gêneros e que os eventos de perda e, possivelmente, de transferência horizontal marcaram a história evolutiva das Fe-nitrogenases nessa família. O pangenoma desses diazotróficos foi explorado ressaltando importantes características adaptativas desses organismos. O proteoma de *P. sonchi* SBR5<sup>T</sup> foi analisado em condições de fixação de nitrogênio sob ausência de molibdênio. Diversos processos relacionados à adaptação geral desse organismo a essas condições foram identificados, bem como a atuação de um possível mecanismo de regulação pós-transcricional da dinitrogenase, componente da nitrogenase convencional. A ocorrência de proteínas PII, que atuam como transdutores de sinais em processos regulatórios do metabolismo do nitrogênio, também foi explorada na família Paenibacillaceae. Homólogos foram encontrados em um número limitado de genomas. Um grupo distinto de proteínas PII, ao qual se insere a proteína de *P. sonchi* SBR5<sup>T</sup>, foi identificado, estando filogeneticamente relacionado ao grupo NifI; porém, diferentemente dessas, não estando inserido no contexto gênico de nitrogenases. Esses resultados reascendem a necessidade de uma caracterização funcional mais detalhada dessa proteína nesse grupo bacteriano. Esse trabalho traz várias elucidções acerca das origens e funcionamento do sistema alternativo de fixação de nitrogênio em *Paenibacillus*, ajudando a expandir o entendimento desse processo nesse importante gênero.

## ABSTRACT

Biological nitrogen fixation (BNF) is one of the key steps in the biogeochemical cycle of this element. Behind this process, which constitutes one of the most important biological processes, a complex enzymatic system carries a unique ( $\text{Fe}_7\text{MoS}_9\text{C}$ ) metal co-factor at its active site. Alternatively to the conventional enzyme, two other homologs are capable of using vanadium (V) or only iron (Fe) to replace the molybdenum (Mo) of their co-factors, the so-called V- and Fe-nitrogenases, respectively. BNF by alternative nitrogenases is less studied than its conventional counterpart, especially in Gram-positive bacteria. *Paenibacillus sonchi* genomovar Riograndensis SBR5<sup>T</sup> is a facultative aerobic endospore-forming bacterium, which can fix nitrogen via the conventional and the alternative Fe-nitrogenases. However, the origin, regulation, and functioning of this enzyme in this organism are poorly understood. In this work, the occurrence of Fe-nitrogenases was explored in the context of the Paenibacillaceae family, being identified in different genera. The results suggest that this system may have been acquired by an ancestral lineage of some of these genera, and that loss events and possibly horizontal transfer marked the evolutionary history of Fe-nitrogenases in this family. The pangenome of these diazotrophs was explored, highlighting important adaptive characteristics of these organisms. The proteome of *P. sonchi* SBR5<sup>T</sup> was analyzed under nitrogen fixation conditions in the absence of molybdenum. Several processes related to the general adaptation of this organism to these conditions were identified, as well as the operation of a possible post-transcriptional regulation mechanism of dinitrogenase, a component of conventional nitrogenase. The occurrence of PII proteins that act as signal transducers in regulatory processes of nitrogen metabolism was also explored in the Paenibacillaceae family. Homologs were found in a limited number of genomes. A distinct group of PII proteins, to which the *P. sonchi* SBR5<sup>T</sup> protein belongs, was identified as phylogenetically related to the NifII group, but unlike these, not being inserted in the nitrogenase gene context. These findings underscore the need for a more detailed functional characterization of this protein in this group. This work provides several insights into the origins and functioning of the alternative nitrogen fixation system in *Paenibacillus*, helping to expand the understanding of these processes in this important bacterial group.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Micro-organismos rizosféricos: características e importância

A rizosfera constitui um dos grandes e mais importantes *hotspot* de diversidade microbiana. Essa região, que compreende a porção de solo imediatamente aderida e influenciada pelas raízes de plantas, abriga uma ampla gama de micro-organismos que favorecem o desenvolvimento vegetal (Zhang et al. 2017). As bactérias com essa habilidade são tradicionalmente conhecidas como PGPR (*Plant growth promoting rhizobacteria*) e beneficiam as plantas por mecanismos bastante diversificados. Um grupo específico desses micro-organismos pode apresentar, ainda, a capacidade de penetrar e colonizar internamente os tecidos vegetais, sem danos aparente ao hospedeiro, sendo conhecidos como micro-organismos endofíticos (Liu et al. 2017; Gouda et al. 2018).

As PGPR estimulam diretamente o crescimento vegetal através da disponibilização de nutrientes insolúveis do solo, como o fosfato, sendo capazes, também, de fornecer nitrogênio pelo processo de fixação, além de produzirem sideróforos e uma grande variedade de hormônios vegetais, tais como auxinas. Podem, também, modular os níveis de etileno, aumentando a tolerância das plantas a diferentes condições de estresse biótico e abiótico (Souza et al. 2015). Indiretamente, promovem o crescimento vegetal por inibir o desenvolvimento de micro-organismos fitopatogênicos. Atuam via a produção de enzimas e metabólitos secundários contra patógenos invasores ou por indução de resistência sistêmica (IRS), tornando as plantas menos susceptíveis a infecções subsequentes (Tabassum et al. 2017).

Além de sua importância ecológica, as interações mutualísticas entre PGPR e plantas têm sido exploradas biotecnologicamente no desenvolvimento de inoculantes agrícolas. Trata-se de formulações envolvendo rizobactérias associadas em diferentes combinações com substâncias carreadoras, que podem ser aplicadas por diversas vias nas lavouras ou sementes (Bashan et al. 2014; O'Callaghan 2016). Esses produtos integram uma possibilidade econômica para o aumento de produtividade, além de possuírem um forte apelo ambiental ao permitir a redução no uso de agroquímicos convencionais (Vejan et al. 2016).

## 1.2 Fixação biológica de Nitrogênio: importância agrícola e ambiental

O nitrogênio é o macro-nutriente mais limitante para o crescimento vegetal. A incapacidade das plantas de assimilarem diretamente esse elemento a partir de sua forma atmosférica, o gás  $N_2$ , torna bastante estratégica a associação com micro-organismos que dispõe dessa capacidade (Chanway et al. 2014). A habilidade de captar o nitrogênio elementar e romper sua tripla ligação, levando à formação de produtos nitrogenados facilmente metabolizáveis é restrita apenas a alguns grupos de bactérias e arqueas. Esse processo, conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN), constitui uma etapa chave em um dos ciclos biogeoquímicos mais relevantes do ponto de vista agrícola e ecológico (Vitousek et al. 2013).

A demanda por nitrogênio em sua forma assimilável ( $NO_3^-$ ;  $NH_4^+$ ) por vegetais tem sido suprida na agricultura através do uso de fertilizantes nitrogenados. A produção industrial desses compostos representou um grande avanço para o desenvolvimento da sociedade no último século. No entanto, é realizada principalmente pelo método de Haber–Bosch, que necessita de condições de alta pressão e elevado consumo de energia (Galloway et al. 2013). Além dos custos elevados de produção, o uso de fertilizantes nitrogenados esbarra em problemas ambientais diversos. O nitrogênio aplicado nas lavouras pode ser facilmente lixiviado, indo parar em corpos hídricos, onde contribui para o processo de eutrofização. Além disso, o uso e a produção de adubos nitrogenados também estão relacionados à emissão de gases do efeito estufa e aquecimento global (Erisman et al. 2013; Zahoo et al. 2014).

As bactérias fixadoras de nitrogênio, também conhecidas como bactérias diazotróficas, estabelecem diferentes níveis de associação com as plantas. Em relações mais estreitas, como o processo simbiótico entre rizóbios e leguminosas, as bactérias podem suprir toda a demanda nutricional da planta por nitrogênio. O uso de rizóbios como inoculantes agrícolas já é realizado há várias décadas e pode chegar a substituir completamente o uso de fertilizantes nitrogenados (Santos et al. 2019). Embora a associação entre rizobactérias diazotróficas não-simbiontes e plantas não atinja o mesmo nível de eficiência, é crescente o uso desses micro-organismos em associação a outras culturas. Um exemplo notável tem sido a aplicação bem-sucedida da bactéria *Azospirillum brasilense* em diversas gramíneas de importância agrônômica, com potencial de redução parcial na aplicação de adubo nitrogenado (Hungria 2011; Mus et al. 2016; Roper and Gupta 2016).

### **1.3 Fixação biológica de nitrogênio: aspectos genéticos, bioquímicos e moleculares**

A capacidade dos micro-organismos diazotróficos em fixar nitrogênio se dá pela expressão da enzima nitrogenase. Essa enzima é capaz de converter a molécula de  $N_2$  em amônia, em um processo cuja estequiometria demanda 16 moléculas de ATP e 8 e<sup>-</sup> para cada molécula de  $N_2$  fixado. A equação completa pode ser descrita como:  $N_2 + 8H^+ + 16 ATP + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$  (Hoffman et al. 2009). Sabe-se que a nitrogenase é composta por dois principais componentes: a dinitrogenase (componente I), que comporta o sítio ativo da enzima, e a dinitrogenase redutase (componente II). O processo de fixação envolve o acoplamento e desacoplamento desses dois componentes, com transferência de elétrons da dinitrogenase redutase para a dinitrogenase (Gaikwad 2010). Por sua vez, os doadores primários de elétrons para a dinitrogenase redutase são ferredoxinas ou flavodoxinas reduzidas. A redução desses últimos componentes pode envolver variados tipos de processos, conforme as características fisiológicas e metabólicas do organismo diazotrófico (Poudel et al. 2018).

A dinitrogenase é uma proteína Fe-Mo, sendo o componente proteico um heterotetrâmero ( $\alpha_2\beta_2$ ) composto por duas subunidades  $\alpha$  (codificadas pelo gene *nifD*) e duas subunidades  $\beta$  (codificadas pelo gene *nifK*). O componente I possui, ainda, dois *clusters* metálicos: o cofator Fe-Mo, presente no sítio ativo da enzima em cada subunidade  $\alpha$ , e o *cluster* P (Fe<sub>8</sub>S<sub>7</sub>), localizado na interface entre subunidades  $\alpha/\beta$  e que está envolvido na transferência de elétrons do componente II para o sítio ativo (Hu e Ribbe 2013; Hoffman et al. 2014). A dinitrogenase redutase (codificada pelo gene *nifH*) ou Fe-proteína, por sua vez, é um homodímero composto por duas subunidades ( $\gamma_2$ ), contendo um grupo Fe-S (Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>) interposto entre elas, além de um sítio de ligação ao ATP em cada subunidade (Jasniewski et al. 2018).

Até a década de 1980, todas as nitrogenases purificadas consistiam essencialmente em uma Fe-proteína e uma Mo-Fe-proteína. No entanto, evidências da fixação de nitrogênio em *Azotobacter vinelandii* nas condições de depleção de molibdênio e deleção dos genes *nif* estruturais demonstraram a existência de um sistema alternativo de fixação (Bishop et al. 1980; Bishop et al. 1982). Robson e colaboradores (Robson et al. 1986) purificaram a primeira nitrogenase alternativa em *Azotobacter chroococcum*, constatando que se tratava de uma proteína associada ao vanádio. Atualmente são conhecidas duas proteínas homólogas à nitrogenase convencional de Fe-Mo, que diferem essencialmente na composição do *cluster* metálico de seu cofator no sítio ativo da enzima. Alternativamente ao molibdênio, estão

presente o vanádio e o ferro, constituindo as V-nitrogenases e as Fe-nitrogenases, respectivamente (Hu e Ribbe 2015; Mus et al. 2018).

As proteínas V-Fe e Fe-Fe, que compõe as dinitrogenases nas nitrogenases alternativas, são componentes heterohexaméricos ( $\alpha_2\beta_2\delta_2$ ), possuindo uma subunidade  $\delta$  adicional, ligada às subunidades  $\alpha$ . Do mesmo modo que a nitrogenase convencional, possuem um *cluster* P análogo, além de seus cofatores diferenciais citados. A Fe-proteína que constitui a dinitrogenase redutase nas V-nitrogenases e Fe-nitrogenases é também estruturalmente semelhante à Fe-proteína da Mo-nitrogenase (Hu e Ribbe 2015; Hu e Ribbe 2016).

Os genes envolvidos com a fixação de nitrogênio são denominados genes *nif*, quando relacionados ao sistema convencional (Mo-nitrogenase). Para as nitrogenases alternativas são denominados genes *vnf* (V-nitrogenase) e *anf* (Fe-nitrogenase). A Mo-nitrogenase é codificada pelos genes *nifH* e *nifDK*, a V-nitrogenase pelos genes *vnfDGK* e *vnfH*, a Fe-nitrogenase pelos genes *anfDGKG* e *anfH* (Reis e Teixeira 2006; Mus et al. 2018). Além dos componentes estruturais da nitrogenase, uma série de produtos gênicos suplementares pode ser necessária para sustentar o processo de fixação. Isso envolve genes relacionados tanto à biossíntese dos *clusters* metálicos, quanto à montagem da própria enzima nitrogenase, além de componentes relacionados aos processos de regulação (Hu e Ribbe 2013; Ribbe et al. 2014).

O primeiro micro-organismo a ser caracterizado quanto aos genes relacionados à FBN foi *Klebsiella oxytoca*, para o qual foram identificados pelo menos 20 genes relacionados ao processo, organizados em 8 operons, em um *cluster* de 24 Kb, sendo todos os genes estruturais dispostos em uma única unidade transcricional (Arnold et al. 1988). Mas a quantidade de genes envolvidos no processo de fixação, bem como sua organização, pode ser variável entre os grupos taxonômicos. No caso de alguns fixadores, como *Frankia* sp. EulK1, foram identificados sistemas mais compactos, contando com apenas 12 genes *nif* (Oh et al. 2012). Em *Paenibacillus* o sistema é ainda mais reduzido, foi demonstrado que apenas 9 genes *nif* são necessários para síntese de uma nitrogenase convencional funcional (*nifBHDKENXhesAnifV*) (Wang et al. 2013). A análise genômica de diazotróficos tem possibilitado identificar a ocorrência de pelo menos seis genes altamente conservados

(*nifHDK* e *nifENB*) e que se cogita serem constituintes indispensáveis para fixação de nitrogênio em qualquer organismo (Dos Santos et al. 2012).

Na espécie *Azotobacter vinelandii*, a primeira a ser descrita quanto ao sistema alternativo de FBN, a organização dos genes *nif* conta com dois agrupamentos distintos, sendo que todos os genes estruturais estão contidos em um mesmo operon *nifHDKTYENX*. Já os genes para Fe-nitrogenase são todos agrupados na mesma unidade transcricional *anfHDGK*, contrastando com os componentes da V-nitrogenase, distribuídos em dois operons separados: *vnfDGK* e *vnfH* (Setubal et al. 2009).

Não é conhecido nenhum micro-organismo diazotrófico que possua apenas Fe-nitrogenases ou V-nitrogenases operantes. A teoria emergente na atualidade é a de que os sistemas alternativos surgiram evolutivamente a partir da Mo-nitrogenase (Boyd et al. 2011), sendo que a expressão de alguns genes *nif* não-estruturais se manteve necessária para sustentar a atividade das nitrogenases alternativas. A requisição de genes *nif* para o funcionamento do sistema alternativo já foi demonstrada em alguns organismos, como *Rhodobacter capsulatus*, *Paenibacillus* sp. e *Azotobacter vinelandii* (Kennedy e Dean 1992; Schüddekopf et al. 1993; Yang et al. 2014). Em *Paenibacillus*, além dos quatro genes estruturais das Fe-nitrogenase, a fixação de nitrogênio via nitrogenase alternativa depende de mais quatro genes (*nifBnifXhesAnifV*) (Li et al. 2021).

#### **1.4 A regulação da fixação biológica de nitrogênio**

A FBN é um processo energeticamente dispendioso, não apenas pelo alto consumo de ATP no processo catalítico, como também pela síntese da própria nitrogenase que, devido ao seu baixo *turnover*, está presente em altas concentrações celulares. Um fator que também compromete a eficiência do processo é alta sensibilidade de todos os tipos de nitrogenases ao oxigênio. Esses fatores tornam a fixação de nitrogênio um processo finamente regulado, ocorrendo em resposta à necessidade e restrito a condições bastante propícias. A regulação da fixação de nitrogênio pode ocorrer tanto em nível transcricional como pós-transcricional. (Martinez-Argudo et al. 2005; Hoffmann 2007).

A fixação de nitrogênio ocorre em resposta principalmente à disponibilidade de nitrogênio (concentração de íons  $\text{NH}_4^+$ ) e às concentrações de oxigênio. Sendo também regulada em função da disponibilidade de energia, da presença dos íons metálicos que atuam



A expressão do gene *nifA* está sob o controle do sistema NtrB-NtrC. NtrC é o componente que ativa a transcrição de *nifA*. A atividade de NtrC, por sua vez, é controlada por NtrB via fosforilação (Gussin et al. 1986; Halbleib e Ludden 2000) (Figura 1). Nesse caso, a atuação do sistema NtrB/NtrC que além da expressão de NifA controla vários genes do metabolismo nitrogênio, depende da percepção dos níveis celulares de nitrogênio. A amônia é o produto direto da FBN e, também, a fonte de nitrogênio preferencial dos microorganismos. Ela é incorporada ao metabolismo celular através da enzima glutamina sintase (GS), que promove a síntese de glutamina a partir de amônia e glutamato (Eisenberg et al. 2000). Este último é sintetizado a partir de 2-oxoglutarato (2-OG) produzido no ciclo do ácido tricarboxílico. Os níveis de glutamina modulam atividade da enzima codificada pelo gene *glnD*, uma UTase/UR que adiciona ou remove uridina nas proteínas PII (Gomes et al. 2001; Leigh e Dodsworth 2007) (Figura 1). As proteínas PII são importantes agentes transdutores de sinais que atuam em vários processos regulatórios. Em sua forma uridilada, que ocorre em resposta à baixa concentração de glutamina, a proteína PII (Proteobacterias) perde a sua capacidade de interagir com NtrB. Esse regulador, por sua vez, fosforila, nessa condição, o ativador NtrC, levando o último a induzir a expressão do gene *nifA* (Dixon e Kahn, 2004; Hoffmann, 2007).

Existem vários homólogos da proteína PII, a supracitada função é desempenhada em Proteobacterias por um homólogo codificado pelo gene *glnB*. Outros importantes grupos de PII incluem os produtos gênicos de *glnK* e *nifI*, sendo bastante atuantes em diversos processos regulatórios no metabolismo geral e do nitrogênio (Huergo et al. 2013). As proteínas GlnK são tradicionalmente descritas por sua associação a transportadores de amônio (AmtB). Em condições de altos níveis de nitrogênio, essas proteínas tendem a se ligar ao AmtB bloqueando a importação de íons amônio. Em contrapartida, quando os níveis intracelulares de nitrogênio diminuem, elas tendem a ser uridiladas via GlnD perdendo sua capacidade de interagir com AmtB e, portanto, liberando a importação de amônio (Coutts et al. 2002; Merrick 2015).

As proteínas PII descritas como NifI estão associadas a nitrogenases e em alguns organismos podem atuar diretamente na regulação dessas enzimas. Proteínas PII também sentem diretamente os níveis de energia e a relação nitrogênio/carbono na célula através da ligação de efetores como 2-OG e ATP, modulando sua capacidade de interação com outras

proteínas (Radchenko e Merrick 2011). Isto inclui componentes da própria nitrogenase. É o caso da regulação dessa enzima em *Methanococcus maripaludis* como resposta ao 2-OG que atua como sinal da deficiência de nitrogênio. A PII liga-se a FeMo-proteína da nitrogenase (dinitrogenase), prevenindo o acoplamento com a Fe-proteína (dinitrogenase redutase) e a transferência de elétrons para o processo catalítico (Dodsworth e Leigh 2007).

Outros exemplos de regulação pós-transcricional das nitrogenases também ocorrem em bactérias como *Azospirillum brasilense* e *Rhodospirillum rubrum*, porém envolvendo mecanismos distintos. Nessas bactérias, adição de resíduos de ADP-ribose pela enzima DraT (*dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase*) na Fe-proteína, em resposta a altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , bloqueia a atividade da nitrogenase. Essa molécula, por sua vez, é removida pela ação de DraG (*dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase*) em resposta à deficiência de nitrogênio (Lowery et al. 1986; Nordlund e Högbom 2013). A atividade de DraT é controlada pela interação com a proteína PII GlnB (Moure et al. 2013).

No caso da regulação da nitrogenase em resposta ao oxigênio, um dos principais agentes envolvidos em alguns diazotróficos é o anti-ativador NifL. Essa proteína possui um domínio PAS relacionado ao sensoriamento dos níveis de oxigênio e apresenta uma molécula de FAD como grupo prostético. Em altas concentrações de  $\text{O}_2$ , há uma conversão da forma reduzida  $\text{FADH}_2$  para  $\text{FAD}^+$ , que induz a ligação de NifL à NifA, impossibilitando a ativação da transcrição dos genes *nif* (Schmitz et al. 2002; Martinez-Argudo et al. 2005). Outros sistemas de regulação descritos envolvem os reguladores RegB e FixL, também sensíveis aos níveis de oxigênio e capazes de modular NifA (Elsen et al. 2004; Wright et al. 2018).

Quanto à regulação das nitrogenases alternativas, em *Azotobacter vinelandii* são observados os genes regulatórios *vnfA* e *anfA* como contrapartes similares ao ativador transcricional codificado por *nifA*, presente no sistema convencional. A expressão do gene *anfA* é reprimida pela presença de íons  $\text{NH}_4^+$ , embora o mesmo não seja observado em relação aos genes *vnfA* (Mus et al. 2018). A presença de molibdênio leva à repressão dos genes *vnfA* e *anfA*, enquanto que a presença de V também inibe a expressão de *anfA*. VnfA atua simultaneamente como repressor na expressão da Mo-nitrogenase e como ativador da transcrição da V-nitrogenase (Masepohl e Klipp 1996). Os genes relacionados ao transporte de molibdato também podem ter um papel bastante relevante na regulação das nitrogenases alternativas. Sugere-se que o regulador ModE, que atua como repressor do operon

*modABCD* (sistema de transporte de Mo) também seja capaz de agir como inibidor dos genes *anfA* (Premakumar et al. 1998).

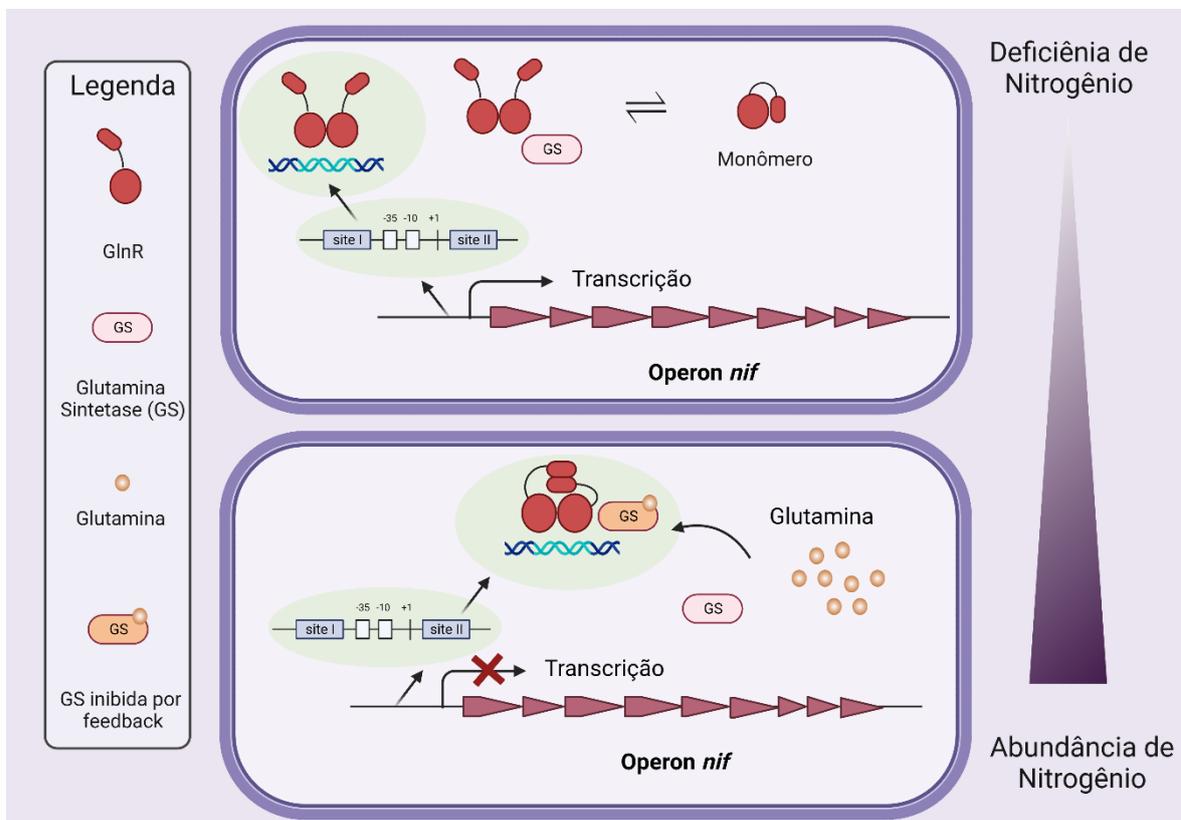
### **1.5 Regulação da fixação do nitrogênio em gram-positivos: o caso do gênero *Paenibacillus***

No que diz respeito a regulação geral do metabolismo do nitrogênio, em *Bacillus subtilis*, organismo modelo de bactérias gram-positivas, está ausente o mecanismo clássico Ntr de gram-negativas. O sistema de regulação gênica em resposta a esse elemento conta com duas proteínas reguladoras fundamentais: TnrA e GlnR (Wray et al. 1996). Ambas são proteínas pertencentes à mesma família (MerR) e que se ligam aos mesmos sítios regulatórios no DNA. TnrA atua ativando a expressão gênica em condições limitantes de nitrogênio, enquanto GlnR atua como repressor em condições de abundância desse nutriente (Fisher 1999). A regulação genica nesse processo é bastante afetada pela capacidade de TnrA de ligar-se a seus alvos. Sabe-se que a proteína PII (produto do gene *glnK*) interage diretamente com AmtB, proteína transmembrana relacionada à importação de íons amônio, e ao ligar-se simultaneamente a AmtB e TnrA, a PII sequestra este último regulador. Essa interação é controlada pelos níveis de ATP e 2-OG. Mas a atividade de TnrA é também modulada por sua interação com GS inibida por *feedback* de glutamina, afetando a capacidade de TnrA de ligar-se ao DNA. Sendo que PII e GS competem ambas por sua associação com a proteína TnrA (Leigh e Dodsworth 2007; Amon et al. 2010).

No contexto específico da FBN, em bactérias gram-positivas os sistemas regulatórios carecem de uma série de elucidações em comparação aos bem caracterizados mecanismos regulatórios dos organismos gram-negativos. Sabe-se que alguns grupos taxonômicos, como, por exemplo, bactérias do gênero *Frankia* e dos gêneros *Clostridium* e *Paenibacillus*, os genes reguladores *nifA* e *nifL* estão ausentes (Harriott et al. 1995; Chen 2005; Oh et al. 2012)

No gênero *Paenibacillus*, que abarca bactérias aeróbicas facultativas gram-positivas, incluindo diversas estirpes diazotróficas, a regulação dos genes *nif* em resposta a disponibilidade de nitrogênio parece estar sobre o controle de GlnR (Fernandes et al., 2017a). O regulador TnrA presente em *Bacillus subtilis* está ausente nesse gênero. Um modelo tem sido proposto para regulação de *nif* em *Paenibacillus*, a partir de estudos realizados com *Paenibacillus polymyxa* por Wang et al (2018). Nesse modelo (Figura 2), o

GlnR encontra-se no ambiente intracelular em forma monomérica, incapaz de se ligar ao DNA, e em formas diméricas. Em condições de deficiência de nitrogênio, GlnR liga-se fracamente ao sítio I na região promotora do operon *nif* permitindo a transcrição. Nessas mesmas condições GlnR também pode interagir, mas de maneira fraca com GS. Nas condições de suficiência de nitrogênio, os níveis intracelulares de glutamina aumentam inibindo por *feedback* a GS. Esta enzima inibida, por sua vez, liga-se fortemente com GlnR dimérico por interação com a cauda C-terminal, aumentando a afinidade de ligação do GlnR ao DNA, em especial ao sítio II. A ligação de GlnR nesta posição na região promotora bloqueia o processo de transcrição dos genes *nif* (Wang et al., 2018).



**Figura 2:** Regulação do operon *nif* em resposta ao nitrogênio pelo regulador GlnR em *Paenibacillus* de acordo com modelo proposto por Wang et al. (2018). GlnR existe no meio intracelular em suas formas monoméricas e dimerizada. A interação com GS ocorre de maneira fraca em condições de deficiência de nitrogênio. Em condições de abundância de nitrogênio, GlnR interage fortemente com GS inibida por *feedback* de glutamina e liga-se com alta afinidade ao sítio II no promotor *nif* bloqueando a transcrição. Figura baseada em Wang et al. (2018) com adaptações. Criado com Biorender.com

Quanto a regulação da fixação de nitrogênio em resposta ao oxigênio, sabe-se que *Paenibacillus*, sendo organismos aeróbicos facultativos tendem a expressar suas nitrogenases em condições de anaerobiose. A percepção e resposta de *Paenibacillus* ao oxigênio parece ser controlada pelo sistema Fnr (*fumarate and nitrate reduction*). Ainda que esse fator de transcrição não se ligue diretamente na região promotora do operon *nif*, ele indiretamente aparenta controlar a expressão da nitrogenase (Shi et al. 2020). No entanto, esse processo carece de uma investigação mais aprofundada.

### **1.6 *Paenibacillus sonchi* genomovar Riograndensis SBR5<sup>T</sup>**

*Paenibacillus sonchi* genomovar Riograndensis SBR5<sup>T</sup>, inicialmente descrito como *Paenibacillus riograndensis*, é uma bactéria gram-positiva formadora de endósporos, isolada a partir da rizosfera de trigo (*Triticum aestivum*) (Beneduzi et al. 2008; Beneduzi et al. 2010). Esse micro-organismo apresenta diversas características relacionadas à promoção do crescimento vegetal, tais como a produção de ácidos indólicos, solubilização de fosfato, produção de sideróforos, competência rizosférica e fixação de nitrogênio. Experimentos realizados em câmara de crescimento demonstraram o potencial dessa bactéria em estimular o crescimento da parte aérea, bem como aumentar a biomassa em plantas inoculadas, apontando-a como uma candidata promissora para o desenvolvimento de inoculantes (Beneduzi et al. 2008; Beneduzi et al. 2010; Bach et al. 2016a; Brito et al. 2020).

Com a disponibilização do genoma completo dessa bactéria rizosférica [número de acesso no RefSeq: GCF\_000981585.1, (Bruto et al. 2015)] surgiram novas possibilidades quanto à investigação dos mecanismos moleculares relacionados às características de interesse nesse organismo, especialmente quanto à caracterização funcional do sistema genético relacionado à FBN. A análise taxonômica desse micro-organismo, utilizando-se de métricas genômicas (ANI, gANI, dDDH) levou, no entanto, à reclassificação de *P. riograndensis* como sinônimo heterotípico tardio de *Paenibacillus sonchi*, recebendo a denominação de *P. sonchi* genomovar Riograndensis SBR5<sup>T</sup> (Sant'Anna et al. 2017).

O genoma desse organismo, composto de um cromossomo circular de aproximadamente 7.370.000 pb, apresenta 23 genes relacionados à fixação de nitrogênio. Foi encontrado, ainda, um elevado número genes para fatores sigma, sugerindo uma grande

versatilidade quanto aos mecanismos de regulação gênica (Beneduzi et al. 2011; Brito et al. 2015).

Os genes relacionados à FBN estão organizados em três agrupamentos gênicos. O agrupamento principal compreende um único operon (*nifBHDKENXorf1hesAnifV*) contendo 10 genes relacionados ao processo. Um agrupamento secundário também presente e incluindo cópias extras dos genes *nifH*, *nifB*, *nifD* e *nifK*, interrompidos por ORFs não-*nif*, no entanto, não se mostrou funcional (Fernandes et al. 2014). Além disso, esse organismo conta com um terceiro agrupamento que inclui dois operons. Um deles está relacionado ao processo de fixação pelo sistema alternativo da Fe-nitrogenase (*anfHDGK*) e o outro contém genes *nifENX*. Análises transcricionais demonstraram que o sistema de fixação alternativo é funcional e expresso em condições de depleção de molibdênio (Fernandes et al. 2014).

Foi demonstrado nesse organismo que a proteína GlnR atua como um regulador negativo dos genes *nif*, de modo similar ao que foi posteriormente caracterizado em *Paenibacillus Polymyxa* (Fernandes et al. 2017a; Wang et al. 2018). Foram encontrados sítios de ligação para essa proteína próximos a sítios de ligação para o fator  $\sigma^A$  na região promotora dos operons relacionados à FBN, bem como outros genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio. Foi demonstrado que GlnR também é capaz de interagir com a glutamina sintase (GS), inibida por *feedback*, aumentando a estabilidade de sua ligação com o DNA. Além da GS relacionada à GlnR, foram encontrados dois outros genes que codificam homólogos dessa enzima, um dos quais não apresenta atividade enzimática (Fernandes et al. 2017a).

Apesar de sua função no processo regulatório dos genes *nif* em resposta ao nitrogênio, GlnR aparenta não regular o sistema alternativo *anf* nesse organismo. Além disso, a estirpe SBR5 apresenta também um gene codificante para um dos homólogos da proteína PII, mas sua interação com GlnR e eventual participação na regulação da FBN não se confirmou (Fernandes 2017b). Conforme mencionado, a proteína PII participa ativamente da regulação do metabolismo de nitrogênio por sua interação com TnrA no sistema regulatório GlnR\TnrA em algumas bactérias gram-positivas (Leigh and Dodsworth 2007). *P. sonchi* genomovar *Riograndensis*, no entanto, apresenta apenas o regulador GlnR. Além da já supracitada função das proteínas PII em alguns mecanismos de regulação da FBN, esse regulador tem um papel primordial no metabolismo geral do nitrogênio em diversas outras

espécies bacterianas, sendo encontrada também em arqueas e plantas. As proteínas PII conseguem modular enzimas centrais do metabolismo, controlar a atividade de proteínas transportadoras, além de regular a expressão de fatores transcricionais diversos (Amon et al. 2010; Huergo et al. 2013). No entanto, permanece a ser esclarecido o papel que essa proteína desempenha em *P. sonchi* SBR5<sup>T</sup>.

Além do sistema de regulação da nitrogenase alternativa não ser plenamente elucidado nesse organismo, vários aspectos gerais do funcionamento da Fe-nitrogenase em *Paenibacillus* são igualmente pouco compreendidos. Isso inclui as principais adaptações as condições de fixação alternativa, o metabolismo de metais e co-fatores necessários a síntese da enzima, fornecimento de energia e elétrons para o processo catalítico de redução, entre outros. Logo uma abordagem global dos principais processos relacionados a expressão da nitrogenase alternativa se faz necessária à um maior entendimento sobre essa enzima e a FBN nesta estirpe e gênero bacteriano, e que possa servir, portanto, de base a um processo investigativo mais aprofundado desses mecanismos.

Nesse sentido, este trabalho avalia em seu Capítulo I a presença de sistemas alternativos de fixação de nitrogênio em *Paenibacillus* e em toda a família Paenibacillaceae, explorando a origem dessas enzimas e aspectos genômicos de estirpes diazotróficas nestes grupos. No capítulo II é considerada a resposta proteômica de *P. sonchi* SBR5<sup>T</sup> as condições de fixação alternativa de nitrogênio. Por último, no capítulo III é discutida a distribuição de proteínas PII dentro da família Paenibacillaceae, suas características filogenéticas e implicações potenciais.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Explorar aspectos evolutivos e funcionais da fixação alternativa de nitrogênio em *Paenibacillus sonchi* SBR5<sup>T</sup>

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a ocorrência de nitrogenases alternativas, em especial Fe-nitrogenases, na família Paenibacillaceae analisando as origens evolutivas desse sistema neste grupo bacteriano e as principais características genômicas relacionadas às estirpes diazotróficas;
- Caracterizar o perfil proteômico de *Paenibacillus sonchi* SBR5<sup>T</sup> em condição de fixação de nitrogênio via nitrogenase alternativa;
- Analisar a distribuição, filogenia e contexto gênico de proteínas PII na família Paenibacillaceae e suas potenciais implicações nesse grupo bacteriano.

**CAPÍTULO I - Alternative nitrogenase of *Paenibacillus sonchi* genomovar Riograndensis: An insight in the origin of Fe-nitrogenase in the Paenibacillaceae family**

---

Artigo publicado na revista “*Molecular Phylogenetics and Evolution*” em 2022

DOI: 10.1016/j.ympev.2022.107624

**CAPÍTULO II - Proteome Profiling of *Paenibacillus sonchi* genomovar Riograndensis  
SBR5<sup>T</sup> Under Conventional and Alternative Nitrogen Fixation**

---

Manuscrito a ser submetido à revista “*Journal of Proteomics*”

**CAPÍTULO – III Distribution of PII Protein Amongst Paenibacillaceae Family Genomes**

---

Manuscrito em preparação a ser submetido ao periódico “*Molecular Phylogenetics and Evolution*”.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos estudos filogenéticos e de genômica comparativa realizados no capítulo I foi possível estabelecer algumas hipóteses sobre as origens das Fe-nitrogenases em *Paenibacillus sonchi* e na família Paenibacillaceae. Esse sistema aparenta ter sido adquirido pelo menos por uma linhagem ancestral dos gêneros *Paenibacillus* e *Fontibacillus* e eventos subsequentes de perda genica e HGT marcaram a história evolutiva dessa enzima. Os resultados também corroboram com a hipótese de que Fe-Fe nitrogenases teriam emergido em uma Arqueia metanogênica (Boyd and Peters, 2013). A linhagem de Fe-Fe nitrogenases de Paenibacillaceae, nesse contexto, é colocada em um dos ramos mais profundos dessa filogenia.

No Capítulo II abordamos a principal resposta em nível de proteoma de *Paenibacillus sonchi* frente a condições distintas de fixação de nitrogênio. Esse trabalho ajuda a identificar alguns dos principais processos necessários à manutenção desse sistema nesse grupo bacteriano, principalmente no que diz respeito ao crescimento anaeróbico, aos sistemas potencialmente envolvidos na transferência de elétrons para a fixação que não são bem elucidados nesse grupo, bem como ao metabolismo geral do nitrogênio. Sugeriu-se também uma possível regulação pós-transcricional da dinitrogenase (NifDK) da nitrogenase convencional em resposta à disponibilidade de molibdênio. Se esse processo ocorre via ncRNAs e é mediado por Hfq, cuja expressão também foi alterada, a modelo do que ocorre em outros diazotróficos (Zhan et al., 2016), é algo que precisa ser cuidadosamente investigado.

O sistema de regulação das nitrogenases alternativas em *Paenibacillus* é desconhecido. O operon *anf* parece não estar sujeito à regulação de GlnR em resposta aos níveis de nitrogênio, do modo como ocorre com o operon da nitrogenase convencional (Fernandes et al., 2017a). Reguladores clássicos presentes em Proteobactérias como VnfA e AnfA, que controlam a expressão transcricional das nitrogenases alternativas em resposta ao vanádio e molibdênio, não possuem homólogos conhecidos no genoma de Paenibacillaceae diazotróficos conforme demonstrado no capítulo I. Logo, uma análise do perfil proteômico de *P. sonchi* sob condições favoráveis à fixação alternativa de nitrogênio poderia apontar possíveis proteínas co-reguladas com a Fe-nitrogenase que poderiam ser candidatas a agentes reguladores desse sistema. Não encontramos nenhum fator de transcrição que possa

ser diretamente atribuído à regulação de *anf*. O transportador de molibdênio de alta afinidade (ModB) foi uma das proteínas co-expressas com a nitrogenase alternativa, sugerido uma regulação comum. Nenhum dos clássicos reguladores de ModABC, como ModE que já foi relacionado ao controle de nitrogenases alternativas (Demtröder et al., 2019), possui homólogos no genoma de *P. sonchi* SBR5<sup>T</sup>. No entanto, uma nova classe de reguladores transcricionais recentemente descrita para transportadores de tungstato (Rajeev et al., 2019) e atribuída também à regulação de proteínas do metabolismo do molibdênio possui pelo menos um homólogo no genoma de *P. sonchi* SBR5<sup>T</sup>. Uma relação entre esse fator de transcrição putativo, o transportador ModAB e a nitrogenase alternativa necessita de uma investigação mais apurada dentro do contexto regulatório.

Foram empreendidas tentativas de se encontrar um possível regulador transcricional do sistema *anf* utilizando uma abordagem de *Pull-down* DNA-Proteína. Sondas biotinizadas contendo as sequências promotoras dos operons *anf* e *nif* foram imobilizadas em microesferas magnéticas com estreptavidina e usadas para capturar possíveis proteínas ligando-se à região a partir de extratos da cultura de *P. sonchi* SBR5<sup>T</sup> em condições de fixação de nitrogênio com e sem adição de molibdênio. Nenhuma proteína foi recuperada. Uma otimização dos protocolos utilizados pode ser necessária para obtenção de resultados mais satisfatórios.

Considerando o papel central que as proteínas PII exercem como transdutores de sinais na regulação da homeostase do nitrogênio e no metabolismo geral de bactérias, procurou-se explorar a possível atuação dessas proteínas no metabolismo de *P. sonchi* e organismos relacionados. Os estudos filogenéticos do capítulo III sugerem que essa proteína não aparenta ser um elemento indispensável nos processos regulatórios nessa família bacteriana, considerando que sua distribuição não é universal mesmo entre espécies de um mesmo gênero. A identificação de um grupo distinto de proteínas PII filogeneticamente relacionado às proteínas NifI, porém não inseridas no contexto gênico de nitrogenases, sugere que essas proteínas possam ter uma atividade funcional igualmente distinta nesses organismos. Isso pode ser cogitado principalmente considerando que a proteína PII de *P. sonchi* SBR5, que pertence a esse grupo, aparenta não interagir com o regulador transcricional GlnR da nitrogenase convencional e tão pouco com as glutamina-sintetases (GS) nesse organismo (Fernandes et al., 2017b).

Com objetivo de se caracterizar funcionalmente a proteína PII de SBR5<sup>T</sup> foram realizadas tentativas de se produzir *Knockout* gênico e *Knodown* para esse regulador. Um sistema de interferência de mRNA baseado em CRISPR-dCas9 já havia sido previamente otimizado para uso neste micro-organismo. Durante o período de doutoramento, esse vetor foi utilizado para produzir construções plasmidiais carregando como alvo do gRNA do sistema CRISPR-dCas9 duas regiões genicas distintas da proteína PII. No entanto, a baixa eficiência de transformação de *P. sonchi* utilizando esse vetor resultou na obtenção de poucos transformantes. Porém, entre estes nenhuma redução transcricional significativa de PII foi observada por RT-qPCR, ressaltando a necessidade de se avaliar a eficiência de diferentes outras sequências alvo. Devido à dificuldade técnica de se realizar transformações genéticas nesta estirpe, o uso dessa abordagem foi a partir de então desconsiderada.

*P. sonchi* é conhecido por ser bastante recalcitrante quanto à manipulação genética e alguns protocolos já foram desenvolvidos baseados em estratégias distintas de transformação por eletroporação e por uso de *aminoclays* (Bach et al., 2016b; Brito et al., 2020). Ambas foram empregadas com variações e sem maiores sucessos. Sabe-se que os sistemas de restrição bacterianos são alguns dos maiores empecilhos na manipulação genética de algumas estirpes. Pelo menos três sistemas distintos foram encontrados no genoma desse organismo e uma caracterização mais detalhada desses sistemas pode ser um fator essencial para o desenvolvimento de futuras estratégias de manipulação genética de *P. sonchi* SBR5.

Uma abordagem muito útil na caracterização de proteínas que interagem com a proteína PII é o uso de ensaios de interação baseados no emprego de efetores como o 2-OG e ATP para eluirm proteínas de extratos celulares que interagiram com a proteína PII imobilizada em colunas de purificação (Gerhardt et al., 2020). Uma estratégia semelhante foi empregada com a proteína PII de *P. sonchi* SBR5 que, a partir da adição de uma strep-tag, foi imobilizada em uma coluna com streptactina e recebeu extratos celulares de cultivo de SBR5 em meio de crescimento padrão. Possíveis interatuantes foram eluidos em tampão com 2-OG e ATP e analisados por cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas (LC-MS/MS). Pelo menos 15 proteínas foram exclusivamente encontradas nas repetições em colunas com proteína PII imobilizada em comparação aos controles negativos. Várias dessas proteínas foram relacionadas ao metabolismo de carbono e nitrogênio, incluindo proteínas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, contexto gênico da PII e interatuantes já conhecidos de homólogos dessa proteína. No entanto, resultados de trabalhos anteriores

envolvendo *Isothermal Titration Calorimetry* (ITC) foram incapazes de demonstrar a ligação entre a proteína PII de *P. sonchi* com esses efetores clássicos [dados não publicados, (Fernandes, 2017b)]. Esse fato coloca sob questionamento os dados obtidos via o ensaio de interação, sendo necessário adoção de novas estratégias de avaliação da interação proteica que possam corroborar com esses resultados.

Em síntese, esse trabalho trouxe novos *insights* acerca das origens e distribuição da nitrogenases alternativas na família Paenibacillaceae. Do mesmo modo, ajudou a caracterizar alguns dos principais processos relacionados à atividade de fixação alternativa de nitrogênio nesse organismo, servindo de base para novos estudos investigativos sobre o funcionamento desse sistema nesse grupo bacteriano.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amon J, Titgemeyer F and Burkovski A (2010) Common patterns – unique features: nitrogen metabolism and regulation in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34:588–605.

Arnold W, Rump A, Klipp W, Priefer UB and Puhler A (1988) Nucleotide sequence of a 24,206 base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *J Mol Biol* 203:715–738.

Bach E, Seger GD dos S, Fernandes G de C, Lisboa BB and Passaglia LMP (2016a) Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied Soil Ecology* 99:141–149.

Bach E, de Carvalho Fernandes G and Passaglia LMP (2016b) How to transform a recalcitrant *Paenibacillus* strain: From culture medium to restriction barrier. *J Microbiol Methods* 131:135–143.

Bashan Y, De-Bashan LE, Prabhu SR and Hernandez J-P (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives. *Plant Soil* 378:1–33.

Beneduzi A, Campos S, Ambrosini A, de Souza R, Granada C, Costa P, Arruda L, Moreira F, Vargas LK, Weiss V et al. (2011) Genome Sequence of the Diazotrophic Gram-Positive Rhizobacterium *Paenibacillus riograndensis* SBR5T. *J Bacteriol* 193:6391–6392.

Beneduzi A, Costa PB, Parma M, Melo IS, Bodanese-Zanettini MH and Passaglia LMP (2010) *Paenibacillus riograndensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:128–133.

Beneduzi A, Peres D, da Costa PB, Bodanese Zanettini MH and Passaglia LMP (2008) Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. *Res Microbiol* 159:244–250.

Bishop PE, Jarlenski DM and Hetherington DR (1980) Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77:7342–7346.

Bishop PE, Jarlenski DM and Hetherington DR (1982) Expression of an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 150:1244–1251.

Boyd ES, Anbar AD, Miller S, Hamilton TL, Lavin M and Peters JW (2011) A late methanogen origin for molybdenum-dependent nitrogenase. *Geobiology* 9:221–232.

Boyd ES and Peters JW (2013) New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2013.00201

Brito LF, Bach E, Kalinowski J, Rückert C, Wibberg D, Passaglia LM and Wendisch VF (2015) Complete genome sequence of *Paenibacillus riograndensis* SBR5T, a Gram-positive diazotrophic rhizobacterium. *J Biotechnol* 207:30–31.

- Brito LF, López MG, Straube L, Passaglia LMP and Wendisch VF (2020) Inorganic Phosphate Solubilization by Rhizosphere Bacterium *Paenibacillus sonchi*: Gene Expression and Physiological Functions. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2020.588605
- Chanway CP, Anand R and Yang H (2014) Nitrogen Fixation Outside and Inside Plant Tissues. *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*. InTech, pp 3–22
- Chen J-S (2005) Genomic Aspects of Nitrogen Fixation in the Clostridia. *Genomes and Genomics of Nitrogen-fixing Organisms*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp 13–26
- Coutts G, Thomas G, Blakey D and Merrick M (2002) Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *EMBO J* 21:536–545.
- Demtröder L, Narberhaus F and Masepohl B (2019) Coordinated regulation of nitrogen fixation and molybdate transport by molybdenum. *Mol Microbiol* 111:17–30.
- Dixon R and Kahn D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* 2:621–631.
- Dodsworth JA and Leigh JA (2007) NifH inhibits nitrogenase by competing with Fe protein for binding to the MoFe protein. *Biochem Biophys Res Commun* 364:378–382.
- Dos Santos PC, Fang Z, Mason SW, Setubal JC and Dixon R (2012) Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. *BMC Genomics* 13:162.
- Eisenberg D, Gill HS, Pfluegl GMU and Rotstein SH (2000) Structure–function relationships of glutamine synthetases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1477:122–145.
- Elsen S, Swem LR, Swem DL, Carl E and Bauer CE (2004) RegB / RegA , a Highly Conserved Redox-Responding Global Two-Component Regulatory System RegB / RegA , a Highly Conserved Redox-Responding Global Two-Component Regulatory System. *68:263–279*.
- Erismann JW, Galloway JN, Seitzinger S, Bleeker A, Dise NB, Petrescu AMR, Leach AM and de Vries W (2013) Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368:20130116–20130116.
- Fernandes G de C (2017b) Novos elementos regulatórios da fixação biológica do nitrogênio em *Paenibacillus riograndensis* SBR5<sup>T</sup>. Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- Fernandes G de C, Hauf K, Sant’Anna FH, Forchhammer K and Passaglia LMP (2017a) Glutamine synthetase stabilizes the binding of GlnR to nitrogen fixation gene operators. *FEBS J* 284:903–918.
- Fernandes G de C, Trarbach LJ, De Campos SB, Beneduzi A and Passaglia LMP (2014) Alternative nitrogenase and pseudogenes: Unique features of the *Paenibacillus riograndensis* nitrogen fixation system. *Res Microbiol* 165:571–580.

Fisher SH (1999) Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! Mol Microbiol 32:223–32.

Gaikwad RW (2010) Nitrogenase Enzyme: A Review. Der Pharmacia Sinica 1:77–84.

Galloway JN, Leach AM, Bleeker A and Erisman JW (2013) A chronology of human understanding of the nitrogen cycle. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 368:20130120–20130120.

Gerhardt ECM, Parize E, Gravina F, Pontes FLD, Santos ARS, Araújo GAT, Goedert AC, Urbanski AH, Steffens MBR, Chubatsu LS et al. (2020) The Protein-Protein Interaction Network Reveals a Novel Role of the Signal Transduction Protein PII in the Control of c-di-GMP Homeostasis in *Azospirillum brasilense*. mSystems. doi: 10.1128/mSystems.00817-20

Gomes FT, Pereira GD, Borges AC, Mosquim PR and Fontes PCR (2001) Metabolismo do nitrogênio em alfafa nodulada sob supressão e ressuprimento de fósforo. Braz J Plant Physiol 13:342–357.

Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS and Patra JK (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. Microbiol Res 206:131–140.

Gussin GN, Ronson CW and Ausubel FM (1986) Regulation of Nitrogen Fixation Genes. Annu Rev Genet 20:567–591.

Halbleib CM and Ludden PW (2000) Regulation of Biological Nitrogen Fixation. J Nutr 130:1609–1612.

Harriott OT, Hosted TJ and Benson DR (1995) Sequences of *nifX*, *nifW*, *nifZ*, *nifB* and two ORF in the *Frankia* nitrogen fixation gene cluster. Gene 161:63–67.

Hoffman BM, Dean DR and Seefeldt LC (2009) Climbing Nitrogenase: Toward a Mechanism of Enzymatic Nitrogen Fixation. Acc Chem Res 42:609–619.

Hoffman BM, Lukoyanov D, Yang Z-Y, Dean DR and Seefeldt LC (2014) Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage. Chem Rev 114:4041–4062.

Hoffmann LV (2007) Biologia Molecular da Fixação Biológica do Nitrogênio. In: Silveira APD da and Freitas S dos S (eds) Microbiota do solo e qualidade ambiental. Omnipax, Campinas, pp 153–312

Hu Y and Ribbe MW (2013) Nitrogenase assembly. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1827:1112–1122.

Hu Y and Ribbe MW (2015) Nitrogenase and homologs. Journal of Biological Inorganic Chemistry 20:435–445.

Hu Y and Ribbe MW (2016) Biosynthesis of the Metalloclusters of Nitrogenases. Annu Rev Biochem 85:455–483.

Huergo LF, Chandra G and Merrick M (2013) PII signal transduction proteins: Nitrogen regulation and beyond. FEMS Microbiol Rev 37:251–283.

- Hungria M (2011) Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo, 2nd ed. Embrapa Soja
- Jasniewski AJ, Sickerman NS, Hu Y and Ribbe MW (2018) The Fe Protein: An Unsung Hero of Nitrogenase. *Inorganics (Basel)* 6:25.
- Kennedy C and Dean D (1992) The *nifU*, *nifS* and *nifV* gene products are required for activity of all three nitrogenases of *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Genetics and Genomics* 231:494–8.
- Leigh JA and Dodsworth JA (2007) Nitrogen Regulation in Bacteria and Archaea. *Annu Rev Microbiol* 61:349–377.
- Li Q, Zhang H, Zhang L and Chen S (2021) Functional analysis of multiple *nifB* genes of *Paenibacillus* strains in synthesis of Mo-, Fe- and V-nitrogenases. *Microb Cell Fact* 20:139.
- Liu H, Carvalhais LC, Crawford M, Singh E, Dennis PG, Pieterse CMJ and Schenk PM (2017) Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. *Front Microbiol* 8:1–17.
- Lowery RG, Saari LL and Ludden PW (1986) Reversible regulation of the nitrogenase iron protein from *Rhodospirillum rubrum* by ADP-ribosylation in vitro. *J Bacteriol* 166:513–518.
- Martinez-Argudo I, Little R, Shearer N, Johnson P and Dixon R (2005) Nitrogen fixation: key genetic regulatory mechanisms. *Biochem Soc Trans* 33:152–156.
- Masepohl B and Klipp W (1996) Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. *Arch Microbiol* 165:80–90.
- Merrick M (2015) Post-translational modification of PII signal transduction proteins. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2014.00763
- Moure VR, Danyal K, Yang ZY, Wendroth S, Müller-santos M, Pedrosa FO, Scarduelli M, Gerhardt ECM, Huergo LF, Souza EM et al. (2013) The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase adpribosyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein glb. *J Bacteriol* 195:279–286.
- Mus F, Alleman AB, Pence N, Seefeldt LC and Peters JW (2018) Exploring the alternatives of biological nitrogen fixation. *Metallomics* 10:523–538.
- Mus F, Crook MB, Garcia K, Costas AG, Geddes BA, Kouri ED, Paramasivan P, Ryu MH, Oldroyd GED, Poole PS et al. (2016) Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Appl Environ Microbiol* 82:3698–3710.
- Nordlund S and Högbom M (2013) ADP-ribosylation, a mechanism regulating nitrogenase activity. *FEBS Journal* 280:3484–3490.
- O’Callaghan M (2016) Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:5729–5746.

Oh CJ, Kim HB, Kim J, Kim WJ, Lee H and An CS (2012) Organization of nif gene cluster in *Frankia* sp. EuIK1 strain, a symbiont of *Elaeagnus umbellata*. Arch Microbiol 194:29–34.

Poudel S, Colman DR, Fixen KR, Ledbetter RN, Zheng Y, Pence N, Seefeldt LC, Peters JW, Harwood CS and Boyd ES (2018) Electron Transfer to Nitrogenase in Different Genomic and Metabolic Backgrounds. J Bacteriol. doi: 10.1128/JB.00757-17

Premakumar R, Pau RN, Mitchenall LA, Easo M and Bishop PE (1998) Regulation of the transcriptional activators AnfA and VnfA by metals and ammonium in *Azotobacter vinelandii*. FEMS Microbiol Lett 164:63–68.

Radchenko M and Merrick M (2011) The role of effector molecules in signal transduction by PII proteins. Biochem Soc Trans 39:189–194.

Rajeev L, Garber ME, Zane GM, Price MN, Dubchak I, Wall JD, Novichkov PS, Mukhopadhyay A and Kazakov AE (2019) A new family of transcriptional regulators of tungstoenzymes and molybdate/tungstate transport. Environ Microbiol 21:784–799.

Reis VM and Teixeira KRDS (2006) Fixação Biológica de Nitrogênio – Estado da Arte. Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável, 28th ed. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 151–180

Ribbe MW, Hu Y, Hodgson KO and Hedman B (2014) Biosynthesis of nitrogenase metalloclusters. Chem Rev 114:4063–4080.

Robson RL, Eady RR, Richardson TH, Miller RW, Hawkins M and Postgate JR (1986) The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. Nature 322:388–390.

Roper MM and Gupta VVSR (2016) Enhancing Non-symbiotic N Fixation in Agriculture. Open Agric J 10:7–27.

Sant’Anna FH, Ambrosini A, de Souza R, de Carvalho Fernandes G, Bach E, Balsanelli E, Baura V, Brito LF, Wendisch VF, de Oliveira Pedrosa F et al. (2017) Reclassification of *Paenibacillus riograndensis* as a genomovar of *Paenibacillus sonchi*: Genome-based metrics improve bacterial taxonomic classification. Front Microbiol 8:1–13.

Santos MS, Nogueira MA and Hungria M (2019) Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. AMB Express 9:205.

Schmitz R a, Klopprogge K and Grabbe R (2002) Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii*: NifL, transducing two environmental signals to the nif transcriptional activator NifA. J Mol Microbiol Biotechnol 4:235–242.

Schüddekopf K, Hennecke S, Liese U, Kutsche M and Klipp W (1993) Characterization of anf genes specific for the alternative nitrogenase and identification of nif genes required for both nitrogenases in *Rhodobacter capsulatus*. Mol Microbiol 8:673–684.

Setubal JC, Dos Santos P, Goldman BS, Ertesvåg H, Espin G, Rubio LM, Valla S, Almeida NF, Balasubramanian D, Cromes L et al. (2009) Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J Bacteriol* 191:4534–4545.

Shi H, Li Y, Hao T, Liu X, Zhao X and Chen S (2020) The Role of Fnr Paralogs in Controlling Anaerobic Metabolism in the Diazotroph *Paenibacillus polymyxa* WLY78. *Appl Environ Microbiol*. doi: 10.1128/AEM.03012-19

Souza R De, Ambrosini A and Passaglia LMP (2015) Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet Mol Biol* 38:401–419.

Tabassum B, Khan A, Tariq M, Ramzan M, Iqbal Khan MS, Shahid N and Aaliya K (2017) Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. *Applied Soil Ecology* 121:102–117.

Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S and Nasrulloha Boyce A (2016) Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules* 21:573.

Vitousek PM, Menge DNL, Reed SC and Cleveland CC (2013) Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*. doi: 10.1098/rstb.2013.0119

Wang L, Zhang L, Liu Z, Zhao D, Liu X, Zhang B, Xie J, Hong Y, Li P, Chen S et al. (2013) A Minimal Nitrogen Fixation Gene Cluster from *Paenibacillus* sp. WLY78 Enables Expression of Active Nitrogenase in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 9:e1003865.

Wang T, Zhao X, Shi H, Sun L, Li Y, Li Q, Zhang H, Chen S and Li J (2018) Positive and negative regulation of transferred *nif* genes mediated by indigenous GlnR in Gram-positive *Paenibacillus polymyxa*. *PLoS Genet* 14:e1007629.

Wray L V, Ferson AE, Rohrer K and Fisher SH (1996) TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:8841–8845.

Wright GSA, Saeki A, Hikima T, Nishizono Y, Hisano T, Kamaya M, Nukina K, Nishitani H, Nakamura H, Yamamoto M et al. (2018) Architecture of the complete oxygen-sensing FixL-FixJ two-component signal transduction system. *Sci Signal*. doi: 10.1126/scisignal.aag0825

Yang J, Xie X, Wang X, Dixon R and Wang Y-P (2014) Reconstruction and minimal gene requirements for the alternative iron-only nitrogenase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:E3718–E3725.

Zahoo, Ahmad W, Hira K, Ullah B, Khan A, Shah Z, Khan FA and Raja Mohib Muazzam Naz (2014) Role of Nitrogen Fertilizer in Crop Productivity and Environmental Pollution. *International Journal of Agriculture and Forestry* 4:201–206.

Zhan Y, Yan Y, Deng Z, Chen M, Lu W, Lu C, Shang L, Yang Z, Zhang W, Wang W et al. (2016) The novel regulatory ncRNA, NfiS, optimizes nitrogen fixation via base pairing with the nitrogenase gene *nifK* mRNA in *Pseudomonas stutzeri* A1501. Proceedings of the National Academy of Sciences. doi: 10.1073/pnas.1604514113

Zhang R, Vivanco JM and Shen Q (2017) The unseen rhizosphere root–soil–microbe interactions for crop production. *Curr Opin Microbiol* 37:8–14.

## ANEXO I

### Outras produções desenvolvidas durante o período do doutorado:

❖ **Ribeiro, I.D.A.**, Volpiano, C.G., Vargas, L.K., Granada, C.E., Lisboa, B.B. & Passaglia, L.M.P. (2020). Use of Mineral Weathering Bacteria to Enhance Nutrient Availability in Crops: A Review. *Frontiers in Plant Science*, 11:590774. DOI: 10.3389/fpls.2020.590774

❖ **Ribeiro, I. D. A.**, Bach, E., da Silva Moreira, F., Müller, A. R., Rangel, C. P., Wilhelm, C. M., ... & Passaglia, L. M. P. (2021). Antifungal potential against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary and plant growth promoting abilities of *Bacillus* isolates from canola (*Brassica napus* L.) roots. *Microbiological Research*, 248, 126754. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126754

❖ Bach, E., Rangel, C. P., **Ribeiro, I. D. A.**, & Passaglia, L. M. P. (2022). Pangenome analyses of *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, and *Priestia megaterium* exploring the plant-associated features of bacilli strains isolated from canola. *Molecular Genetics and Genomics*, 297(4), 1063-1079. DOI: 10.1007/s00438-022-01907-0