

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
LABORATÓRIO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS

**ANÁLISE EVOLUTIVA DAS SUBUNIDADES LIGADORAS DE SUBSTRATO
PRESENTES NO SISTEMA DE OSMOPROTEÇÃO EM PROCARIOTOS**

TARCISIO JOSÉ DOMINGOS COUTINHO

JOÃO PESSOA – PARAÍBA
2012

TARCISIO JOSÉ DOMINGOS COUTINHO

**ANÁLISE EVOLUTIVA DAS SUBUNIDADES LIGADORAS DE SUBSTRATO
PRESENTES NO SISTEMA DE OSMOPROTEÇÃO EM PROCARIOTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Prof. Dr. Sávio Torres de Farias

ORIENTADOR

**JOÃO PESSOA – PARAÍBA
2012**

C871a Coutinho, Tarcisio José Domingos.

Análise evolutiva das subunidades ligadoras de substrato presentes no sistema de osmoproteção em procariotos / Tarcisio José Domingos Coutinho.-- João Pessoa, 2012.

97f. : il.

Orientador: Sávio Torres de Farias

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN

1. Biologia Celular e Molecular. 2. Procariotos - sistema de osmoproteção. 3. Análise filogenética. 4. Glicina betaína e osmo adaptação.

TARCISIO JOSÉ DOMINGOS COUTINHO

Dissertação de mestrado avaliada em: 13/12/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sávio Torres de Farias – orientador
(Departamento de Biologia Molecular – CCEN – UFPB)

Prof.^a Dr.^a Thaís Gaudencio do Rêgo – membro externo
(Unidade Acadêmica de Tecnologia do Desenvolvimento - CDSA – UFCG)

Prof. Dr. Luís Fernando Marques dos Santos – membro interno
(Departamento de Biologia Molecular – CCEN – UFPB)

Dr.^a Teresa Cristina Soares de Lima Grisi – membro suplente
(Departamento de Biologia Molecular – CCEN – UFPB)

A Tarcisio Pessoa Coutinho (*In memoriam*).
Sei que ele estaria muito feliz. Saudades!

AGRADECIMENTOS

A Deus, “não tenho palavras para agradecer tua bondade, dia após dia me cercas com fidelidade, nunca me deixes esquecer que tudo o que tenho, tudo o que sou e o que vier a ser vem de Ti, Senhor”.

À minha mãe, Eunice, meu exemplo de vida. Obrigado por tudo. Se hoje estou aqui é porque a senhora esteve sempre ao meu lado.

À minha irmã, Tatiany, que sempre foi uma força a me mostrar que podia ir mais longe. Valeu, mana!

À minha tia Tarcísia (segunda mãe). Não sei nem como agradecer por tanto que fez em meu favor. Obrigado, tia, por acreditar tanto em mim.

Ao meu tio Arnaldo Barreto (segundo pai). Seu carinho e atenção não têm limites. Obrigado por me permitir ser um membro de sua família.

Aos meus primos Aline, Liane e Barreto Filho (irmãos). Obrigado pelo carinho, vocês são um presente.

Aos meus primos Beto, Carla, Danilo, Caio e Tiago pelo incentivo, carinho e cuidado.

À minha mais nova família, a família Maul, que me recebeu de braços abertos e em especial à matriarca Dona Márcia, cujo carinho a mim demonstrado jamais poderia ser descrito em palavras.

A Ludmilla Maul, que entrou na minha vida sem querer e provocou uma verdadeira revolução. Estar aqui hoje tem uma participação fundamental desta incrível pessoa que conheci e com a qual pretendo dividir o resto dos meus dias. Te amo.

Ao meu orientador Sávio Torres de Farias. Não tenho palavras pra te agradecer. Obrigado por ter ido comigo até o fim.

Ao ilustre professor Luís Fernando, meu amigo, se posso assim dizer. Nunca esquecerei sua atitude no momento mais difícil desta caminhada. Estar aqui hoje é também sua responsabilidade.

Aos demais membros da banca: professora Thaís Gaudêncio e Teresa Cristina pela gentileza e disponibilidade de participarem deste momento tão especial.

Ao professor Plínio Delatorre pela incrível capacidade de questionamento que me ensinou a enxergar a pesquisa com outros olhos.

Aos professores do Departamento de Biologia Molecular pelas contribuições significativas ao meu crescimento intelectual.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, que trabalham diuturnamente em seus laboratórios realizando pesquisas de qualidade e que contribuirão muito para a continuidade do sucesso do Programa.

Ao atual coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, professor Eleonidas Moura, pelo trabalho em prol de melhorias para que o Programa seja melhor.

À minha turma de mestrado: Guilherme, Yara, Danielle. Foi um prazer dividir este momento com vocês.

Ao meu grupo de estudo: Nureyev, Jonathas, Suellen, Vanessa e Danielle. Minha visão sobre biologia molecular nunca mais será a mesma depois de tantas noites estudando com vocês. Foi um honra conhecê-los.

Ao meu amigo Jonathas. Minha visão e interpretação de moléculas concatenadas e de transposons nunca mais será a mesma depois de nossas discussões. Muito sucesso e um brinde com Santa Felicidade, você merece!

Ao meu amigo e irmão Nureyev, porque é isso que você é pra mim. Espero ter você sempre por perto. Jamais esquecerei tudo que vivemos, conversamos e compartilhamos ao longo desse tempo.

Ao meus colegas de laboratório: Priscilla Anne, Juliana, Danilo, Soraya, Francisco, Ariadne, Mayra, Janaína, Patrícia e Lobão pelo carinho. Em especial, Priscilla e Juliana, por terem tido muita paciência comigo enquanto estive na bancada.

Aos técnicos do laboratório de Genética de Micro-organismos Bosco e Severina. Ter vocês por perto deixou o final deste trabalho muito mais agradável. Obrigado pelo carinho.

À professora Daniela Priscila e ao meu amigo Luiz Cláudio. Nossas conversas sempre foram muito animadas e revigorantes. Embora estejam há pouco tempo em minha vida, mas já são especiais.

À família de tio Wilson (tio de Nureyev). Os finais de noite, especialmente depois de dias que não pareciam ter fim, sempre foram revigorantes, recheados de muita risada e carinho.

Ao meu amigo de infância e irmão, Luíz Antonio Junior. Obrigado por estar sempre comigo.

A Cláudia Gracielle e família, pois durante o tempo que estive com vocês, sempre fui incentivado a seguir em frente.

A Aquilino Ramalho, diretor do colégio Classe A, por ser um incentivador do crescimento profissional e por ter me compreendido tão bem, adequando os horários para que eu pudesse cursar as disciplinas do mestrado.

A Martha Arcela, coordenadora do Instituto João XXIII, pelo carinho e compreensão quando precisava cobrir minhas ausências.

Ao professor e diretor do Colégio Motiva, Karamuh Martins, por ter compreendido tão bem minha decisão de deixar sua escola. Obrigado pelo incentivo.

Aos meus amigos professores Guilherme Stanford, Job Fonseca e Moabe Pina. Não poderia haver melhor equipe de biologia nesta cidade e será sempre uma honra dividir uma sala de aula com vocês.

Aos meus alunos, que durante o tempo deste mestrado, sofreram e se alegraram comigo. Sou muito feliz por ser professor e jamais deixarei de ser.

E a todos aqueles que a memória não recorda, mas que passaram pela minha vida neste tempo de mestrado, o meu muito obrigado.

Toda caminhada começa com um primeiro passo,
a natureza não tem pressa segue seu compasso e
inexoravelmente chega lá!

Flávio José
(Poeta e músico paraibano)

RESUMO

As subunidades ligadoras de substrato são componentes muito importantes do sistema de importação de soluto conhecido, como sistema de osmoproteção, que consiste em uma proteína de membrana pertencente à superfamília ABC. Estas moléculas reconhecem substratos específicos que apresentam papéis fisiológicos diversos em procariotos, incluindo a colaboração para a sobrevivência destes organismos em ambientes com elevada concentração de sal. Utilizando o software MEGA 5.05, foi realizada uma análise filogenética de 431 sequências nucleotídicas destas subunidades, ortólogas entre si, coletadas a partir do banco de dados contido no site <http://www.genome.jp/kegg/>. Como resultado desta análise, foram geradas árvores filogenéticas que demonstraram claramente que houve a transferência horizontal de alguns dos genes devido ao compartilhamento por organismos diferentes. Foram geradas também duas prováveis sequências ancestrais que apresentam homologia com permeases que transportam colina, glicina betaína e carnitina, que são aminas trimetiladas, presentes atualmente em diversos procariotos. Portanto, este sistema provavelmente surgiu em organismos procarióticos com a função básica de captura de nutrientes e por desempenhar esta função basal, ao ser compartilhado com outros organismos, foi fixado aos genomas. No entanto, a partir da diversificação de habitats, por parte dos procariotos, este sistema colaborou de forma decisiva para a adaptação destes organismos aos mais diversos ambientes, incluindo, especialmente os ambientes que apresentavam uma elevada concentração de sal, atuando e sendo caracterizado atualmente como um sistema de osmoproteção.

PALAVRAS CHAVE: transporte, análise filogenética, glicina betaína e osmo Adaptação

ABSTRACT

Substrate-binding subunits are very important components of the solute importation system, known as the osmoprotectant system, which consists of a membrane protein belonging to the ABC superfamily. These molecules recognize specific substrates that have different physiological roles in prokaryotes, i.e. roles that contribute to the survival of these organisms in environments with high concentrations of salt. Using MEGA 5.05 software, this study performed a phylogenetic analysis of 431 nucleotide sequences of these subunits, orthologous to each other, collected from the database contained on the website <http://www.genome.jp/kegg/>. As a result of this analysis, phylogenetic trees were generated that clearly demonstrated that there was a horizontal transfer of some genes due to the sharing by different organisms. Also, two probable ancestral sequences were generated that showed homology with permeases that transport choline, glycine betaine and carnitine, which are trimethylamines currently present in various prokaryotes. Therefore, this system probably arose in prokaryotic organisms with the basic function of capturing nutrients, and by performing this basal function of being shared with other organisms, was fixed to the genome. However, because of the diversification of habitats by the prokaryotes, this system contributed decisively to the adaptation of these organisms to different environments, especially environments that had a high salt concentration; thus, acting and being currently characterized as a system of osmoprotection.

KEY WORDS: Transport, Phylogenetic analysis, Glycine betaine, Osmoadaptation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alguns solutos compatíveis.....	19
Figura 2. Síntese de metionina em <i>Sinorhizobium meliloti</i>	20
Figura 3. Vias metabólicas de síntese de glicina betaína.....	21
Figura 4. Esquema da estrutura básica de proteínas ABC importadoras e exportadoras....	22
Figura 5. Estrutura básica de proteínas ABC e suas regiões conservadas.....	23
Figura 6. Alguns membros do sistema de importação osmoprotetora.....	26
Figura 7. Estrutura da subunidade ligadora de substrato de OpuC.....	28
Figura 8: Possíveis destinos de um gene duplicado.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais famílias de importadores ABC presentes em procariotos.....24

Tabela 2: Principais famílias de exportadores ABC presentes em procariotos.....25

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

Asp – ácido aspártico (aminoácido)

ATP – *Adenosine triphosphate* (trifosfato de adenosina)

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

MEGA – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Análises Genéticas Moleculares Evolutivas).

K⁺ - Íon potássio

mRNA - *Messenger ribonucleic acid* (ácido ribonucleico mensageiro)

Na⁺ - Íon sódio

NBD – *Nucleotide binding domain* (domínio de ligação de nucleotídeo)

SBP – *Substrate binding domain* (domínio de ligação do substrato)

Superfamília ABC – *ATP Binding Cassete*

TMD – *Transmembrane domain* (domínio transmembrana)

Thr – treonina (aminoácido)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Estresse e ambiente.....	16
1.2. Organismos halófilos e osmo adaptação.....	17
1.3. Glicina betaína.....	19
1.4. Superfamília de proteínas ABC.....	21
1.5. Sistema de osmoproteção.....	26
1.6. Subunidades ligadoras de substrato.....	27
1.7. Análise comparativa de genes.....	29
2. OBJETIVOS.....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4. CONCLUSÃO.....	59
5. REFERÊNCIAS.....	61

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESTRESSE E AMBIENTE

O estresse ambiental é a principal força evolutiva que age sobre os seres vivos, uma vez que, promove alterações ambientais com impacto sobre os sistemas biológicos e processos evolutivos (NEVO, 2011).

A conservação de uma espécie depende primariamente de sua adaptação às mudanças abióticas que ocorrem em seu habitat, ou seja, deve haver um equilíbrio entre a fisiologia dos organismos e suas adaptações ao ambiente, por isso, a chave principal para compreensão das mudanças evolutivas deve ser de caráter ecológico, com destaque para a quantidade de energia necessária para manutenção de um organismo em ambiente estressante, o que pode ser utilizado como base para justificar vários padrões de mudanças na composição de seres vivos de um ambiente (PARSONS, 2005).

Organismos presentes em ambientes estressantes aumentam seu custo energético. Na sequência de uma perturbação ambiental grave, o balanço de energia intracelular muda de manutenção e produção para reparação e recuperação, por isso a organização metabólica destes organismos consiste em um fator fundamental para sobrevivência (PARSONS, 2005).

As células dos organismos vivos são expostas a vários tipos de estresses ao longo da vida (RÖSGEN; PETTITT; BOLEN, 2007) tais como: disponibilidade de nutrientes, variações de temperatura, pH e osmolaridade (SPANHEIMER; MULLER, 2008). Diante de tantas possibilidades de variações abióticas o maior desafio para uma célula é manter sua homeostase, ou seja, ajustar as propriedades físicas e químicas do meio intracelular em resposta a processos fisiológicos e alterações ambientais (WOOD, 2011).

Dentre os diversos tipos de estresse ambiental, as variações de osmolaridade são importantes, já que são responsáveis pela alteração do balanço hídrico e os organismos necessitam de mecanismos que dificultem a perda de água para o ambiente. Mudanças externas de osmolaridade permitem o fluxo de água ao longo do gradiente osmótico, causando turgência em condições hipotônicas e plasmólise ou desidratação em condições hipertônicas (JEBBAR et al., 2005).

1.2. ORGANISMOS HALÓFILOS E OSMOADAPTAÇÃO

Halófilos são organismos adaptados a viver em ambientes que apresentam variações nas condições de salinidade (PAUL et al., 2008) e são encontrados nos três domínios da vida: Archaea, Bacteria e Eukarya (MA et al., 2010).

De acordo com a concentração ótima de sal para crescimento, os halófilos são classificados nas seguintes categorias: ligeiramente halófilos – crescem otimamente em meio contendo de 0,2 à 0,5 M de sal; halófilos moderados - crescem otimamente em meio contendo de 0,5 à 2,5 M de sal e halófilos extremos - crescem otimamente em meio contendo de 2,5 à 5,2 M de sal (KUSHNER, 1985, *apud* VENTOSA; NIETO, 2005).

Para viver em ambientes com elevada concentração de sal são necessárias adaptações moleculares, dentre as quais, as relacionadas com proteínas, uma vez que, estas moléculas exercem papel fundamental na fisiologia celular (PAUL et al., 2008). Análises comparativas entre proteomas de procariontes halófilos e não halófilos têm comprovado a existência de uma assinatura molecular na composição dos aminoácidos em proteínas com adaptação à ambientes com elevada concentração de sal. Tais proteínas apresentam um aumento na quantidade de resíduos carregados negativamente, como ácido glutâmico e ácido aspártico, que estão mais distribuídos pela superfície da proteína, além disso, estas moléculas apresentam uma diminuição do conteúdo hidrofóbico total (TADEO et al., 2009).

Em ambientes com elevada concentração de sal, torna-se importante também, evitar a perda de água para o ambiente, uma vez que a água é a principal molécula relacionada com o metabolismo celular por propiciar um meio adequado para ocorrência das mais diversas reações químicas intracelulares e lidar com variações internas de água é essencial para a sua sobrevivência. A perda de água para o ambiente é uma ameaça comum, ocorrendo devido à evaporação, excreção de resíduos e osmose nos mais diversos ambientes. Quanto ao estresse hídrico, os organismos foram tradicionalmente divididos em dois grupos: osmorreguladores – que utilizam transporte de íons para, homeostaticamente, regular a pressão osmótica intracelular e osmoconformadores – costumam utilizar solutos compatíveis para manter a pressão osmótica intracelular igual a do ambiente exterior (YANCEY, 2005).

A estratégia de importação de íons parece estar presente apenas em arqueas halófilas extremas da família *Halobacteriaceae* que inclui os gêneros *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Natronobacterium* e *Natronococcus*, em bactérias da ordem *Haloanaerobiales* e na bactéria *Salinibacter ruber*. Notavelmente, K^+ é o principal íon

acumulado, ocorrendo também importação de Na^+ , no entanto, o citoplasma destes organismos requer que a maioria de suas enzimas sejam ricas em aminoácidos ácidos e suas atividades dependentes da presença dos íons. A outra estratégia envolve o acúmulo e/ou síntese de moléculas com baixo peso molecular, denominadas, solutos orgânicos compatíveis que proporciona várias possibilidades de adaptação a ambientes que variam osmoticamente e isto pode ser comprovado pela grande variedade de microrganismos que dependem exclusivamente destes solutos para a osmoadaptação (EMPADINHAS; DA COSTA, 2008).

Os solutos compatíveis apresentam uma propriedade físico-química, em especial, que provavelmente foi alvo da seleção natural e que permitiu a animais, vegetais e microrganismos adaptarem-se a ambientes extremos. Esta propriedade, conhecida como efeito osmofóbico, permite que proteínas mantenham-se enoveladas mesmo o organismo estando em um ambiente estressante. Este efeito tem como referencia a interação desfavorável que ocorre entre o soluto compatível e o esqueleto de carbonos da cadeia polipeptídica, o que força a proteína manter sua conformação mesmo em condições ambientais adversas (BOLEN; BASKAKOV, 2001).

Os tipos de moléculas orgânicas que são caracterizados como solutos compatíveis incluem: polióis e derivados, açúcares e derivados, aminoácidos e derivados, betaínas, ectoínas e ocasionalmente alguns peptídeos (Figura 1). Normalmente, bactérias e eucariotos acumulam solutos neutros, enquanto, arqueas tendem a modificar muitos destes solutos, em moléculas carregadas negativamente. O fato destas moléculas não inibirem as funções celulares, embora possam atuar modulando a atividade de enzimas individuais, foi motivo pelo qual as mesmas foram designadas como solutos compatíveis e seu acúmulo intracelular ajuda a manter a turgescência, pressão e volume celular (ROBERTS, 2005).

No ambiente, solutos compatíveis podem ser lançados no meio, após a morte de organismos ou através de processos de efluxo, o que permite que estas moléculas tornem-se acessíveis a outros organismos e sejam utilizadas para osmoadaptação ou como fonte de carbono. Em certos casos, os sistemas de captação são fundamentais para os microrganismos que não possuem a maquinaria bioquímica de síntese destes compostos, por isso, é comum encontrar sistemas de transporte (influxo) com elevada afinidade por estas moléculas o que permite que sejam rapidamente importadas e seus níveis intracelulares sejam prontamente restabelecidos caso seja esta a necessidade ou possam responder rapidamente a variações de salinidade do meio (EMPADINHAS; DA COSTA, 2008).

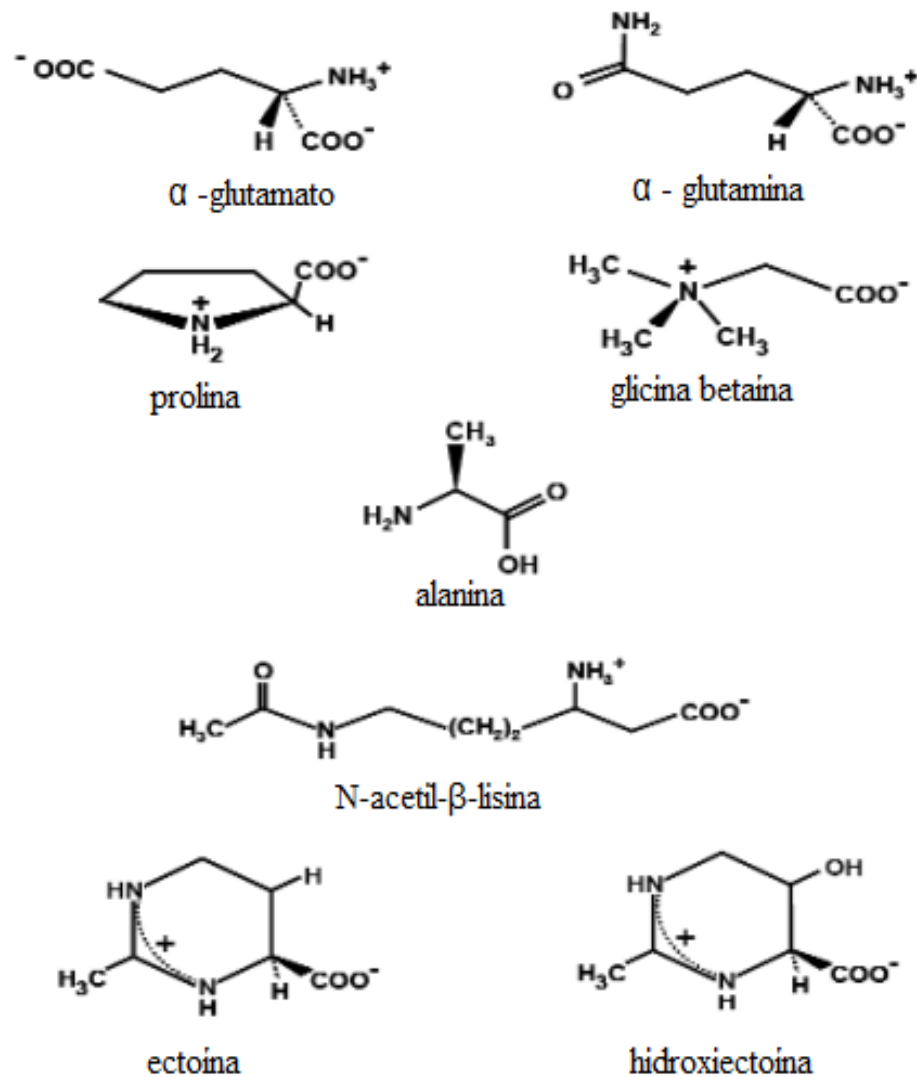


Figura 1: Alguns solutos compatíveis (EMPADINHAS; DA COSTA, 2008)

Dentre os solutos compatíveis importados do meio por procariotos, as amins trimetiladas, como a colina, carnitina e glicina betaína estão associadas à capacidade de osmoadação de muitos desses organismos e seus transportadores têm sido cada vez mais estudados (ZIEGLER; BREMER; KRÄMER, 2010).

1.3. GLICINA BETAÍNA

A glicina betaína (FIGURA 1) é um derivado trimetilado do aminoácido glicina (NAU-WAGNER et al., 2012) que é encontrado em uma grande variedade de microrganismos, plantas e animais (CHEN; MURATA, 2008).

Esta molécula é particularmente eficaz como um citoprotetor, atuando contra vários tipos de estresse abiótico, sendo capaz de estabilizar enzimas e diversas outras proteínas mesmo quando os organismos estão expostos a condições desfavoráveis de temperatura e salinidade (CHEN; MURATA, 2008).

Outro aspecto importante, relacionado aos papéis fisiológicos que desempenha a glicina betaína, consiste em atuar como doadora de grupos metil (Figura 2), participando assim do ciclo da metionina (BARRA et al., 2006).

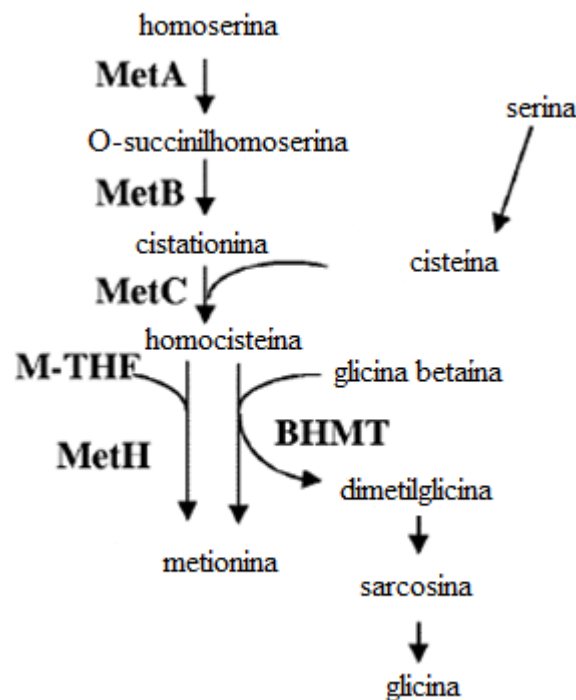


Figura 2: Síntese de metionina em *Sinorhizobium meliloti*. Enzimas envolvidas: MetA, homoserina O-succiniltransferase; MetB, cistationina gamasintase; MetC, cistationina beta-liase; MetH, 5-metiltetrahidrofolato- homocisteína metiltransferase; BHMT, betaina-homocisteína metil transferase. M-THF representa metiltetrahidrofolato. Modificado de Barra et al. 2006.

Os microrganismos apresentam duas vias diferentes para sintetizar glicina betaína, uma oxidativa e outra a partir da metilação da glicina (Figura 3). A via oxidativa ocorre normalmente utilizando um sistema proteico associado à membrana codificado a partir de genes organizados em um operon (bet) e seus componentes são: colina desidrogenase (betA), glicina betaína aldeído desidrogenase (betB), e um regulador (betI). A desidrogenase catalisa a oxidação de colina para o aldeído de betaína, que é então oxidado para betaína pelo produto do gene *betB* (CÁNOVAS et al., 2000; ROBERTS, 2005). As três reações de metilação da glicina são catalisadas pelas enzimas: glicina sarcosina metiltransferase (gsm), que catalisa a

metilação de glicina ou sarcosina formando sarcosina ou dimetilglicina e dimetilglicina sarcosina metiltransferase (sdm) que catalisa a metilação de sarcosina ou dimetilglicina formando betaína dimetilglicina ou glicina betaína (KIMURA et al., 2010).

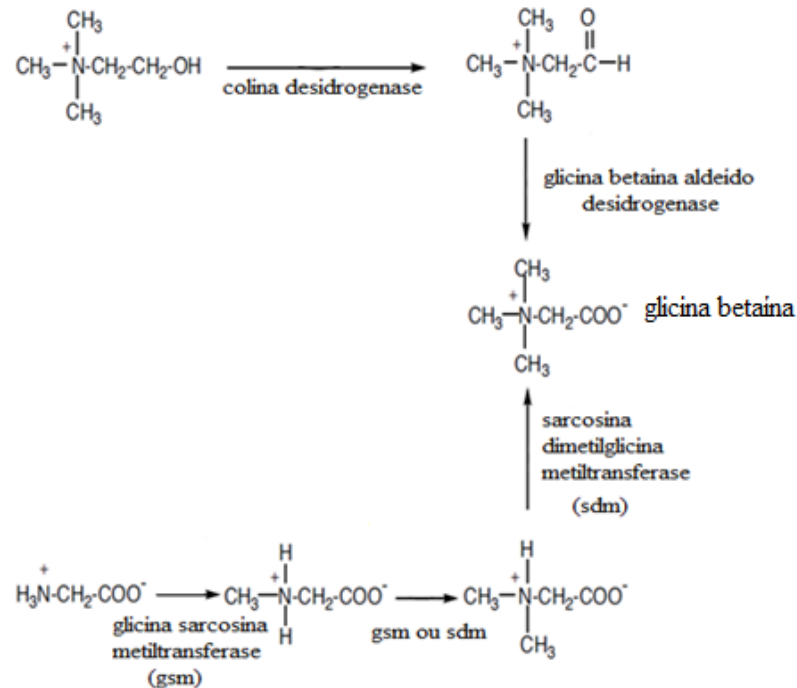


Figura 3: Vias metabólicas de síntese de glicina betaína. Modificado de Roberts, 2005

1.4. SUPERFAMÍLIA DE PROTEÍNAS ABC

As proteínas pertencentes à superfamília ABC (*ATP binding cassette*) constituem um dos maiores sistemas de superfamílias proteicas de sequências parálogas e são encontradas em todos os gêneros dos três domínios da vida. Estas proteínas utilizam energia da hidrólise do ATP para a realização de uma variedade impressionante de fenômenos biológicos essenciais, que incluem não apenas o transporte transmembrana, pelo qual são mais conhecidos, como também processos não relacionados ao transporte, tais como, alongamento da tradução e reparo de DNA (DAVDISON et al., 2008).

Estas proteínas podem ser divididas em três categorias funcionais: importadores - responsáveis por mediar a absorção de nutrientes em procariotos, transportando desde monossacarídeos e oligossacarídeos, íons orgânicos e inorgânicos, aminoácidos, vitaminas e até metais; exportadores - envolvidos na secreção de diversas moléculas, tais como,

peptídios, lípidios, drogas hidrofóbicas, polissacarídeos e proteínas, incluindo toxinas, como a hemolisina A; a terceira categoria aparentemente não está envolvida no transporte, mas em outros processos fisiológicos como a tradução de mRNA e no reparo do DNA (DAVDISON et al., 2008).

Independentemente do sentido do transporte (importação ou exportação), a natureza do substrato transportado (baixo ou alto peso molecular) e a função fisiológica, as proteínas da superfamília ABC são compostas de dois domínios transmembranares hidrofóbicos (TMD – *transmembrane domain*) e dois domínios de ligação a nucleotídeos (NDB – *nucleotide domains binding*). Em importadores, além dos quatro domínios básicos há também a participação de uma subunidade ligadora de substrato (SBP – *substrate domains protein*) (Figura 4) que é a responsável pela captura do soluto específico que será transportado (VAN DER DOES; TAMPÉ, 2004).

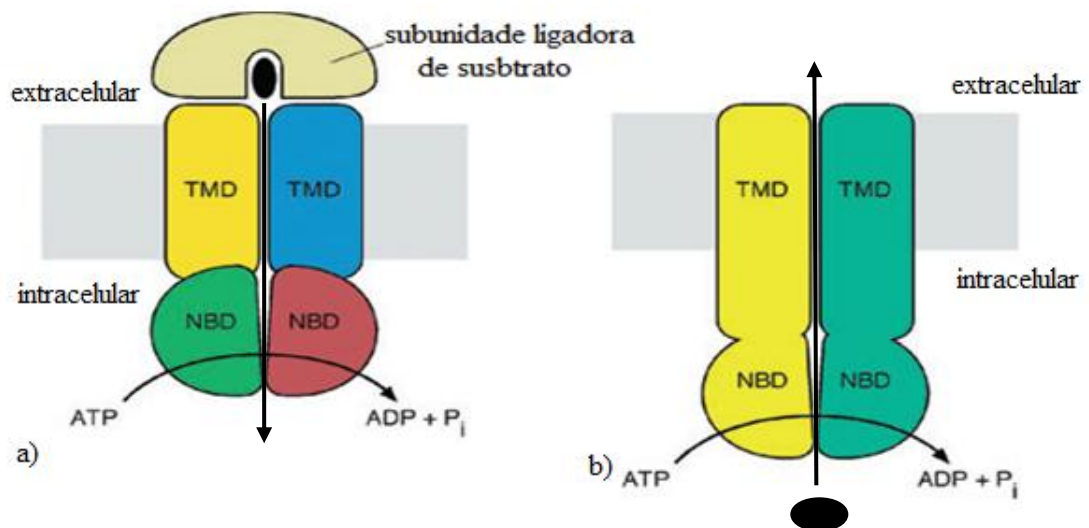


Figura 4: Estrutura básica de proteínas ABC importadoras (a) e exportadoras (b). Modificado de Dawson; Hollestein; Lacher, 2007.

Os domínios transmembranares são duas subunidades altamente hidrofóbicas ou dois domínios proteicos que criam um canal pelo qual o substrato passa durante a translocação. Nos importadores, eles formam o sítio de encaixe para a subunidade ligadora de substrato e de transdução de sinal aos domínios de ligação de nucleotídeos que hidrolisam o ATP. Estes domínios atravessam a membrana várias vezes sendo muitos dos transportadores formados por uma estrutura de doze segmentos α -hélice transmembranares por unidade funcional (BIEMANS-OLDEKINKEL; DOEVEN; POOLMAN, 2006).

A região de ligação de nucleotídeo consiste em dois domínios, o domínio do núcleo catalítico Rec-A e um estruturalmente diverso denominado de domínio α -helicoidal que é único para os transportadores ABC. O domínio catalítico consiste tipicamente em duas β -

folhas e seis α -hélices, onde há um motivo Walker A (GXXGKGKS/T, onde X é qualquer aminoácido) ou *P-loop* e um motivo Walker B ($\phi\phi\phi\phi$ D, dos quais ϕ é um resíduo hidrofóbico). O domínio helicoidal é constituído por três ou quatro hélices e a assinatura característica de proteínas ABC, também conhecidos como sequência LSGGQ. Neste domínio, também há um resíduo de glutamina em uma alça denominada *Q loop*, que está envolvida na interação entre NBD e TMD, particularmente na região da hidrólise de nucleótidos para as alterações conformacionais do TMD durante a translocação do substrato. O motivo H, ou região de troca, contém um resíduo de histidina altamente conservado, que é também importante na interação do domínio com ATP (Figura 5) (REES; JOHNSON; LEWINSON, 2009).

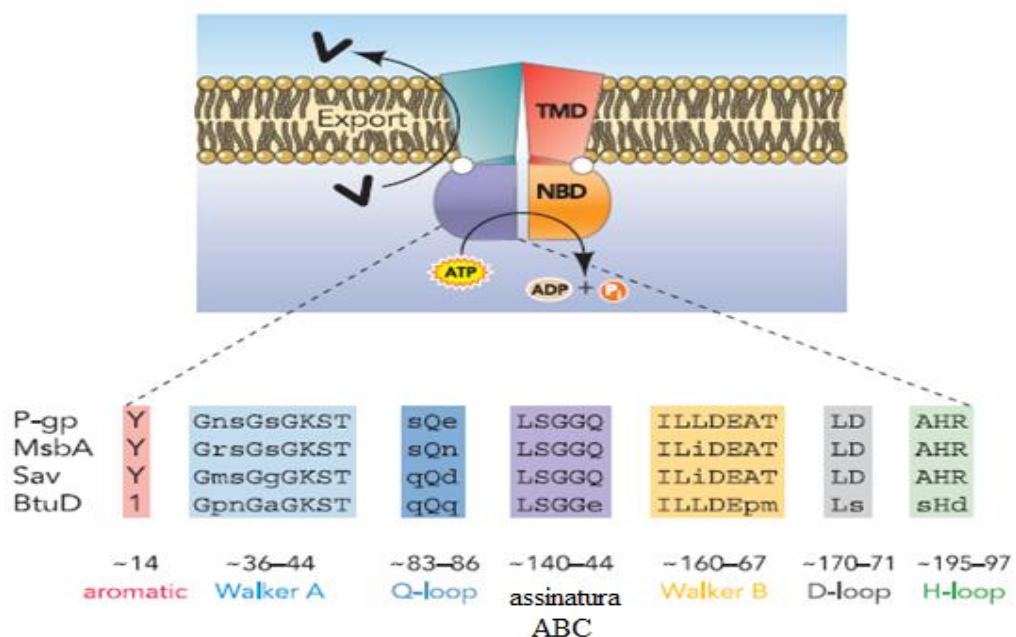


Figura 5: Estrutura básica de proteínas ABC e seus domínios conservados. As letras maiúsculas representam resíduos invariáveis enquanto que as letras minúsculas representam resíduos variáveis. Modificado de Linton, 2007.

Em bactérias, o número de sistemas de transporte de tipo ABC está geralmente relacionado com o tamanho do genoma, cerca de 2-5% das proteínas codificadas pertencem à família ABC. No entanto, algumas bactérias de solo contêm um número relativamente elevado destes transportadores representando cerca de 40-70% de todas as proteínas transportadoras codificadas pelo genoma. Estes sistemas são essenciais para a captação de nutrientes e pode refletir o aspecto competitivo, entre organismos, pela aquisição de nutrientes do solo garantindo a sobrevivência (GIULIANI et al., 2011).

Em procariotos as proteínas pertencentes a família ABC estão divididas em importadoras (Tabela 1) e exportadoras (Tabela 2), onde cada uma dessas categorias apresenta famílias de proteínas que são agrupadas normalmente com base na filogenia e no tipo de soluto que transporta (DAVIDSON; CHEN, 2004).

Tabela 1: Principais famílias de importadores ABC presentes em procariotos. Modificado de Milton; Saier, 2000.

IMPORTADORES ABC	
TRANSPORTADORES	FAMÍLIAS
Importador de carboidrato 1	CUT -1
Importador de carboidrato 2	CUT-2
Importador de aminoácidos polares	PAAT
Importador de aminoácidos hidrofóbico	HAAT
Importador de peptideo	PepT
Importador de sulfato	SulT
Importador de fosfato	PhoT
Importador de molibdênio	MolT
Importador de fosfanato	PhnT
Importador de íon férrico	FeT
Importador de poliamina e fosfanato	POPT
Importador de aminas quaternárias	QAT
Importador de vitamina B ₁₂	VB ₁₂ T
Importador de ferro quelado	FeCT
Importador de ferro quelado, manganês e zinco	MZT
Importador de nitrato, nitrito e cianato	NitT
Importador de taurina	TauT
Importador de cobalto	CoT
Importador de tiamina	ThiT

Tabela 2: Principais famílias de exportadores ABC presentes em procariotos. Modificado de Modificado de Milton; Saier, 2000.

EXPORTADORES ABC	
TRANSPORTADORES	FAMÍLIAS
Exportador de cápsula polissacarídica	CPSE
Exportador de lipooligossacarídeo	LOSE
Exportador de lipopolissacarídeo	LPSE
Exportador de ácido teicóico	TAE
Exportador de drogas	DrugE1
Exportador de lipídio A	LipidE
Exportador de grupo heme	HemeE
Exportador de β glucano	GlucanE
Exportador de proteína 1	ProtE1
Exportador de proteína 2	ProtE2
Exportador de peptídeo 1	PepE1
Exportador de peptídeo 2	PepE2
Exportador de peptídeo 3	PepE3
Exportador de glicolipídio	DevE
Exportador de sódio	NaE
Exportador de microcina B17	McbE
Exportador de drogas 2	DrugE2
Exportador de microcina J25	McjD
Exportador de drogas 3	DrugE3

1.5. SISTEMA DE OSMOPROTEÇÃO

Os ambientes nos quais ocorrem variações frequentes do conteúdo de água, como por exemplo, camadas mais superficiais de solo, consistem em um desafio fisiológico para microrganismos e para que estes possam sobreviver em tais ambientes, eles necessitam de mecanismos adaptativos. Um desses mecanismos consiste em um sistema de importação de soluto compatível denominado sistema de importação osmoprotetora (Opu – *osmoprotectant uptake*) (Figura 6), que é formado por cinco membros, dos quais, três transportadores pertencem à superfamília de proteínas ABC – OpuA (transporta glicina betaína e prolina betaína), OpuB (transporta apenas colina) e OpuC (transporta vários solutos compatíveis tais como glicina betaína, prolina betaína, carnitina, colina, γ -butirotetaina, colina-O-sulfato e ectoína), e os dois outros são os transportadores secundários OpuD e OpuE (DU et al., 2011).

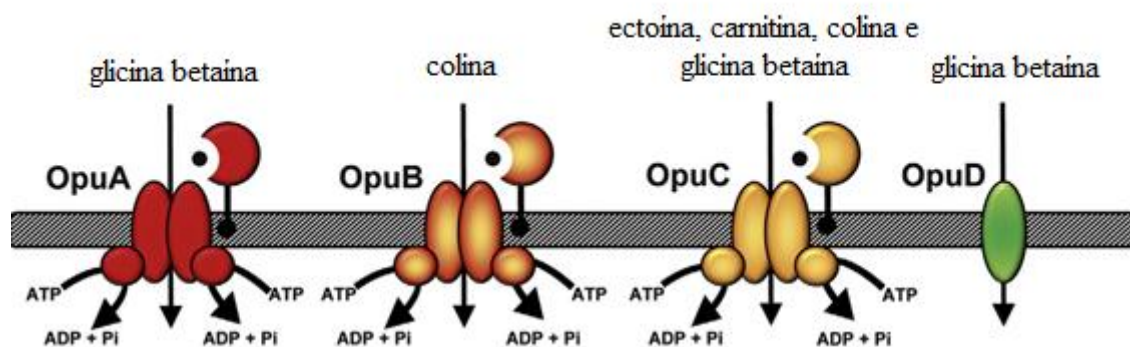


Figura 6: Alguns membros do importador osmoprotetor. Modificado de Pittelkow et al., 2011.

As proteínas OpuA, OpuB e OpuC são, denominadas individualmente, como um sistema de osmoproteção (*osmoprotectant system*), muito comum em procariotos (KAPPES et al. 1999). Dentre os seus membros, apenas OpuC apresenta uma grande diversidade de solutos transportados, incluindo ectoína e carnitina que são exclusivas deste transportador (DU et al., 2011). Entretanto o principal soluto a ser transportado é a glicina betaína pelo fato de apresentar uma elevada afinidade por essa molécula (CHEN; BEATTIE, 2007).

Outro fator observado quanto ao sistema de osmoproteção é que este transporta essencialmente aminas trimetiladas, o que pode sugerir uma ancestralidade comum para este sistema e que este tipo de soluto deve ter sido transportado desde o seu surgimento.

Esta modalidade de transporte (importação) aliado ao tipo de molécula de soluto transportado reforça a importância das aminas trimetiladas na resposta osmótica a variações

de salinidade do ambiente, especialmente em condições de elevada salinidade (ROBERTS, 2005). Esta especificidade no transporte deste tipo de amina está diretamente relacionada à presença da subunidade ligadora de substrato presente nos membros deste sistema (DAVIDSON et al., 2008).

1.6. SUBUNIDADES LIGADORAS DE SUBSTRATO

Proteínas (subunidades) ligadoras de substrato (SBP – *substrate binding protein*) ou domínios de ligação ao substrato formam uma classe ou domínio de proteínas que são frequentemente associados a complexos proteicos de transporte de substâncias ou transdução de sinal ligados à membrana. Foram inicialmente associadas apenas às proteínas ABC, no entanto, atualmente já há comprovações de sua associação com outros complexos proteicos de membrana. Uma característica marcante destas moléculas é que elas apresentam pouca semelhança, no que diz respeito à sequência de resíduos de aminoácidos, mas suas estruturas tridimensionais são altamente conservadas. O núcleo destas moléculas é formado por dois domínios estruturalmente conservados sendo, entre estes domínios, a região de ligação do substrato, que ao se ligar, estabiliza a estrutura fechada da molécula (BERNTSSON et al., 2010).

Em bactérias gram-negativas, as subunidades ligadoras de substrato estão localizadas no periplasma celular, enquanto que em gram-positivas e arqueas estão ancoradas em lipídios de membrana ou fundidas aos domínios transmembrana (SMITS et al., 2008).

Quanto à estrutura das subunidades ligadoras de substrato características do sistema de osmoproteção, a região responsável pelo reconhecimento do substrato apresenta um “cinturão aromático” que é onde se encaixa a porção carregada positivamente da amina trimetilada (Figura 7). Cada subunidade apresenta seu cinturão aromático característico, por exemplo, em OpuC o cinturão é formado por quatro resíduos de tirosina, enquanto que em OpuA é formado por três resíduos de triptofano. Além dos resíduos aromáticos, na região de encaixe do substrato, há também resíduos acessórios, que também são importantes para a correta acomodação do substrato. A capacidade de transportar diversos substratos, sendo a maioria deles com a mesma estrutura molecular básica, como ocorre em OpuC, tem chamado a atenção, não apenas do ponto de vista osmoadaptativo, já que se pode importar várias moléculas diferentes que exercerão o mesmo papel fisiológico, mas também sob o ponto de vista evolutivo (Du et al., 2011).

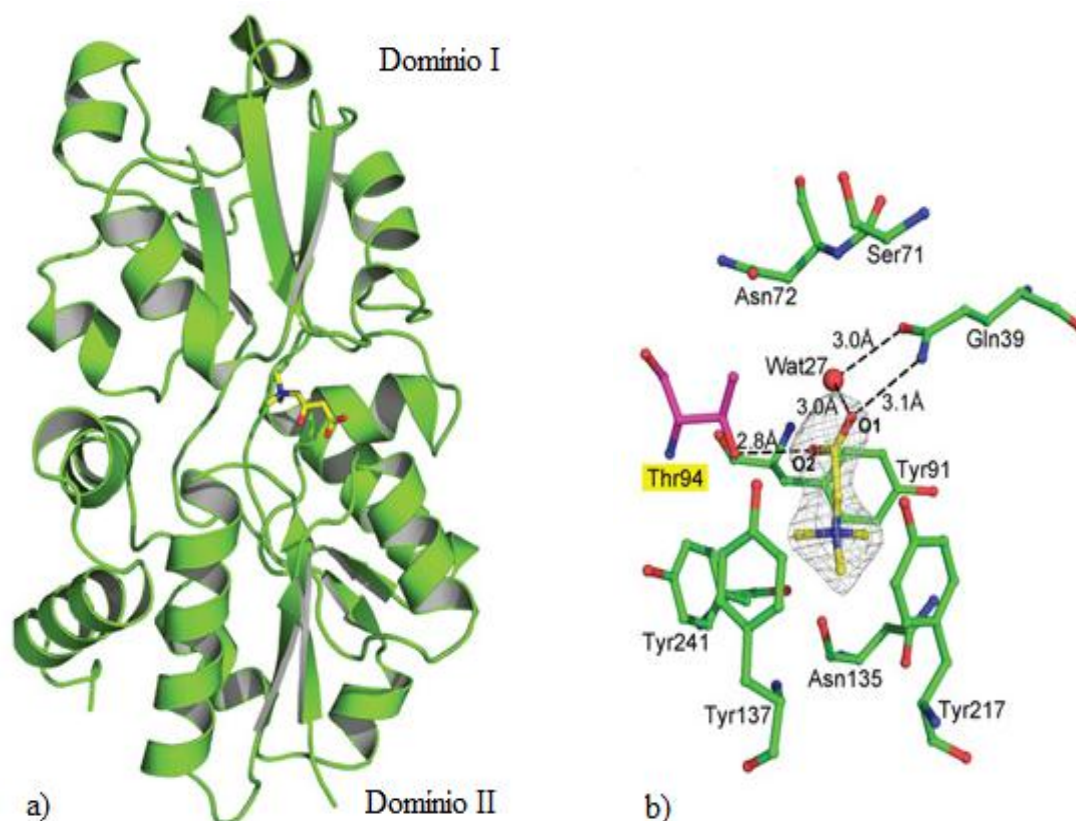


Figura 7: a) A subunidade ligadora de substrato de OpuC ligado à carnitina; b) participação dos resíduos aromáticos e não aromáticos na acomodação da glicina betaína em OpuC. Modificado de Du et al., 2011.

As subunidades ligadoras de substrato OpuB e OpuC apresentam pouca similaridade, quanto a sequência de resíduos de aminoácidos, quando comparados com a de OpuA. Provavelmente estas duas subunidades surgiram a partir da duplicação de uma proteína primordial, no entanto, OpuB transporta apenas colina, enquanto OpuC transporta vários solutos diferentes. O alinhamento realizado com as sequências destas subunidades revelou apenas duas diferenças entre elas: a presença de uma Thr⁹⁴ em OpuC e de uma Asp⁹⁶ em OpuB. O grupo funcional carboxila, presente na cadeia lateral de Thr⁹⁴, não compromete o encaixe dos diversos solutos transportados por OpuC, inclusive ainda estabelece uma ligação de hidrogênio com a glicina betaína. Já quanto à presença do resíduo Asp⁹⁶, o grupo carboxil carregado negativamente presente em sua cadeia lateral, promoverá uma repulsão eletrostática com o grupo carboxil da glicina betaína, carnitina e ectoína, impossibilitando o transporte destes solutos, mas não impedindo a ligação com a colina que diferente dos demais solutos apresenta um grupo hidroxil e por isso, OpuB transporta apenas este soluto (DU et al., 2011).

1.7. ANÁLISE COMPARATIVA DE GENES

A seleção natural promove a sobrevivência dos indivíduos mais aptos dentro de uma espécie. Ao longo de muitas gerações, isso pode resultar na manutenção de traços ancestrais (conservação através de seleção purificadora), ou o aparecimento de novas características benéficas (adaptação por seleção positiva). Ao nível genético, o efeito purificador ou positivo pode promover a evolução lenta ou rápida dos genes, o que permite identificar quais dessas forças evolutivas estão agindo sobre os seres vivos em um determinado ambiente (SHAPIRO; ALM, 2008).

O grau de seleção varia de acordo com o papel de um determinado gene na sobrevivência celular. Genes com pouca contribuição para a manutenção da homeostase celular são mais suscetíveis à inativação e mutações deletérias, enquanto que aqueles que são essenciais para o perfeito funcionamento do organismo são menos susceptíveis. Além disso, o grau da seleção que está atuando sobre um gene em particular, pode mudar ao longo do tempo e de acordo com um determinado contexto ecológico, por exemplo, a inativação ou perda de um ou mais genes pode aumentar o valor adaptativo de outros e as alterações na ecologia ou estilo de vida de um organismo podem tornar alguns genes redundantes. Tão importante quanto a intensidade de seleção é a sua eficácia, a qual depende, dentre outros fatores, do tamanho e estrutura da população. Em grandes populações, mutações deletérias em genes benéficos não são susceptíveis de fixar-se por acaso, mas em pequenas populações, mesmo genes úteis pode ser inativados e excluídos. Assim, os organismos que apresentam tamanhos populacionais pequenos são mais propensos à deterioração e perda de genes, mesmo para os que apresentam uma função benéfica para a célula (OCHMAN; DAVALOS, 2006).

Os mecanismos que explicam a diversidade de repertórios de genes em genomas, ou seja, o processo pelo qual os genes são adquiridos ou perdidos tem sido objeto de numerosos estudos. Em procariontes, os principais processos relacionados ao repertório gênico, quanto ao ganho de novos genes, encontrado nos mais diversos genomas, são a duplicação e a transferência horizontal de genes. Estes dois processos são responsáveis pela quantidade excepcional de duplicatas gênicas nestes genomas e por isso têm sido correlacionados com necessidades ecológicas específicas. Estas duplicatas gênicas podem ser mantidas em seus genomas de origem ou transferidas horizontalmente entre organismos que compartilham um mesmo ambiente, sendo assim, incorporados a genomas diferentes. O sucesso de uma transferência horizontal de genes depende do processo metabólico afetado pelo gene

incorporado. Genes que interferem em processos metabólicos periféricos ou que interagem, até mesmo complementando a atividade de genes naturais do genoma, são mais susceptíveis a serem fixados (ABBY; DAUBIN, 2007).

Existem três possibilidades para um gene que foi duplicado e fixado no genoma (Figura 8): a inativação, o desenvolvimento de uma nova função ou a manutenção do padrão de expressão do gene original, que será dividido entre as duplicatas que atuarão complementando uma à atividade da outra, o que caracteriza uma subfunção gênica (HURLES, 2004)

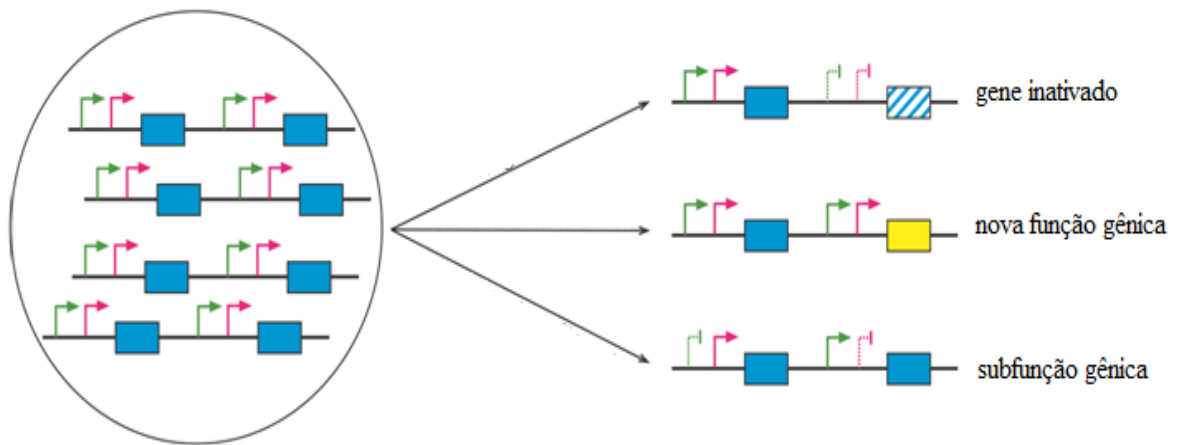


Figura 8: Possibilidades para um gene duplicado e fixado em um genoma. Modificado de Hurles, 2004.

O aumento do material genético representa também um aumento no custo energético para a maioria dos organismos. Desta forma, qual o motivo pelo qual os procariotos, normalmente retêm os genes duplicados? A resposta a esta pergunta está nas novas funções que podem ser desempenhadas pelas duplicatas e que podem por exemplo permitir a adaptação destes organismos em ambientes estressantes (ZHANG, 2003)

A capacidade de adaptação é fundamental para a sobrevivência do organismo em um ambiente estressante e para que o gene duplicado não seja suprimido, deve apresentar uma mutação que o torne vantajoso diante das novas condições ambientais, seja por responder diretamente a estas novas condições ou por apenas permitir um aumento na dosagem do gene como resposta a um aumento da procura de seu produto de transcrição (BRATLIE et al., 2010).

Uma duplicação gênica pode produzir genes ortólogos ou parálogos. Genes ortólogos são genes de espécies diferentes que foram originados a partir de um único gene no último

ancestral comum das espécies (REMM; STORM; SONNHAMMER, 2001), enquanto que parálogos são genes que embora tenham um ancestral comum a duplicação que deu origem a estes genes ocorreu depois da especiação (BRATLIE et al., 2010).

A correta identificação de ortólogos é de fundamental importância tanto para os aspectos funcionais, quanto para os evolutivos da genômica comparativa, uma vez que, ortólogos ocupam o mesmo nicho funcional em diferentes organismos, por isso, esta categoria de genes é utilizada quando se quer fazer uma análise filogenética para averiguar a relação de parentesco entre espécies diferentes (MARAKOVA et al., 2007).

Por isso que, ao compararmos ortólogos de um gene presente em diversos organismos que estão adaptados a ambientes tão diferentes, podemos assim propor a história evolutiva deste gene, sugerindo razões para sua fixação e possibilitamos uma melhor compreensão do papel fisiológico do mesmo e suas diversas contribuições para a adaptação dos organismos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar uma análise evolutiva das subunidades ligadoras de soluto presentes no sistema de osmoproteção de procariotos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Propor a história evolutiva deste sistema, analisando as possíveis estruturas moleculares ancestrais, as causas pelas quais este foi fixado e o tipo de seleção a que está sendo submetido.
- Analisar a ocorrência de processos evolutivos no nível de genoma, tais como, duplicação e/ou transferência horizontal de genes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O artigo *Phylogenetic analysis of substrate-binding subunits in an osmoprotectant system* apresenta uma análise evolutiva/filogenética das sequências nucleotídicas ortólogas de diversas subunidades ligadoras de substrato presentes em organismos procarióticos.

O artigo está aceito pela *Genetics and Molecular Research – Online Journal*, e aguarda publicação, conforme registro anexo.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Phylogenetic analysis of substrate-binding subunits in an osmoprotectant system

Authors: Coutinho TJD¹, Rodrigues NF¹, and Farias ST¹.

1 – Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Brasil.

Abstract: Substrate-binding proteins are very important components of the solute uptake system, known as the osmoprotectant system, which consists of a membrane protein belonging to the ABC superfamily. These molecules recognize specific substrates that have different physiological roles in prokaryotes, i.e. roles that contribute to the survival of these organisms in environments with high concentrations of salt. Using MEGA software, this study performed a phylogenetic analysis of 431 nucleotide sequences of these subunits, orthologous to each other, collected from the database contained on the website <http://www.genome.jp/kegg/>. As a result of this analysis, phylogenetic trees were generated that clearly demonstrated that there was a horizontal transfer of some genes due to the sharing by different organisms. Also, two probable ancestral sequences were generated that showed homology with permeases that transport choline, glycine betaine and carnitine, which are trimethylamines currently present in various prokaryotes. Therefore, this system probably arose in prokaryotic organisms with the basic function of capturing nutrients, and by performing this basal function of being shared with other organisms, was fixed to the genome. However, because of the diversification of habitats by the prokaryotes, this system contributed decisively to the adaptation of these organisms to different environments, especially environments that had a high salt concentration; thus, acting and being currently characterized as a system of osmoprotection.

KEY WORDS: Transportation, Phylogenetic analysis, Glycine betaine, Osmoadaptation.

INTRODUCTION

Water is the most important molecule related to life and the capacity of an organism to cope with the internal variations of water for its survival. Water loss to the environment is a common threat, due to evaporation, excretion of waste and osmosis in various environments. As for water stress, organisms were traditionally divided into two groups: osmoconformers - usually using compatible solutes to maintain intracellular osmotic pressure equal to the outside environment; and osmoregulators – using ion transport to homeostatically regulate intracellular osmotic pressure (Yancey, 2005).

The types of organic molecules that are characterized as compatible solutes include: polyols and derivatives, sugars and derivatives, amino acids and derivatives, betaines, ecotins, and occasionally some peptides. Normally, bacteria and eukaryotes accumulate neutral solutes while archaea tend to modify many of the solutes accumulated by bacteria and eukaryotes, in negatively charged molecules. The fact that these molecules do not inhibit cellular functions, although they may act by modulating the activity of individual enzymes, was why they were designated as compatible solutes and their intracellular accumulation helps maintain cell turgidity, pressure and volume (Roberts, 2005).

In the natural environment, compatible solutes may be introduced into the medium after organism death, or by efflux processes which allow these molecules to become accessible to other organisms and be used for osmoadaptation or as a carbon source. In certain cases, capture systems are essential to the microorganisms that lack the biochemical machinery for synthesis of these compounds, and because of this, it is common to find transport systems (influx) with high affinity for these molecules that allow that they be rapidly imported and their intracellular levels be readily restored if there is a necessity or respond quickly to changes in salinity of the medium (Empadinhas and Da Costa, 2008).

Environments in which frequent variations occur in water content, for example, in the most superficial layers of soil, there is a physiological challenge for microorganisms, and for them to survive in such environments requires adaptive mechanisms. One such mechanism consists of a system for importing compatible solute called Osmoprotectant uptake (Opu), which is formed by five members, of which three transporters belong to the ABC superfamily of proteins (ATP-binding cassette) - OpuA (transports glycine betaine and proline betaine), OpuB (transports only choline) and OpuC (transports several compatible solutes such as glycine betaine, proline betaine, carnitine, choline, γ -butyrobetaine, choline-O-sulfate and ectoine), which use the energy released by ATP hydrolysis to import solutes (Du et al., 2011); a transporter of the BCCT family (betaine-choline-carnitine transporter) - OpuD that uses the energy of the driving force of sodium symport transport for importing solutes (Ziegler et al., 2010); and a transporter from the family of sodium/solute symport transporters - OpuE, which is specific for importing proline (Moses et al., 2012).

ABC transporters are integral membrane proteins found in all domains of life that have, as a rule, two transmembrane domains or subunits (TMDs) that form the translocation pathway and two cytoplasmic domains or subunits of nucleotide binding (NBDs) that hydrolyze ATP. These transporters diverged very early from the evolutionary point of view,

creating two categories related to the transport of substrate: exporters and importers. In the exporters, the TMDs and the NDBs are fused, while in the importers, besides the TMDs and NDBs being unfused subunits, there is also one more subunit which binds with high affinity to the substrates in order to deliver them to the TMDs (Oldham et al., 2008).

Of the subunits forming solute importers, the substrate-binding subunit SBP (substrate-binding protein) is extremely important for prokaryotes since it is fairly widespread in the genomes of these organisms (Thomas, 2010). Besides this, it provides an interesting structural diversity, since in Gram-negative bacteria it is located in the periplasmic space between the outer and inner membrane, and in Gram-positive bacteria it can be bound to lipoproteins of the extracellular face of the plasma membrane, to the transmembrane domain (TMD) of the ABC transporter (Davidson et al., 2008), or anchored in lipids of the external face of the plasma membrane (Biemans-Oldehinkel et al., 2006). On the other hand, in archaea there are lipoproteins of the plasma membrane or components of a transport system known as the bindosome.

Due to these multiple variations of SBPs, the degree of specificity for substrates and their distribution by the three Domains of life, this article aims to draw a phylogenetic profile of these subunits and to answer questions that will give us a better understanding of what happened over time with these molecules and how they were and are being selected by the environment.

MATERIALS AND METHODS

Data collection

This study selected and used 431 SBP gene sequences from the online database <http://www.genome.jp/kegg/>. These sequences correspond to SBPs belonging to the trimethylamine transporters (glycine betaine, proline betaine, carnitine, choline) and proline of prokaryotic organisms (bacteria, cyanobacteria and archaea) present in the most diverse environments.

B. subtilis 168 was used as reference organism, and from its SBP gene sequence, a search for orthologous sequences was performed in the same database (Kanehisa et al., 2012; Kanehisa and Goto, 2000).

Sequence alignment and nucleotide substitution model

Sequence alignment was done using ClustalW, contained in the software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 5.05) (Higgins et al., 1994; Tamura et al., 2011), and used to test which evolutionary model would be consistent with the data.

Among the models offered by the software, the best suited to be used in phylogenetic reconstruction was GTR (General Time Reversible) with Gamma distribution with 2 parameters.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis was performed with the software MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011), using the statistical method of maximum likelihood with 1000 bootstrap replications.

All nucleotide substitution sites were used, the heuristic method was the Nearest-Neighbor-Interchange (NNI) (Das Gupta et al., 2000), and all codons (1st+2nd+3rd + non-coding) were used.

Additionally, as control, 16S ribosomal RNA gene sequences of the organisms were used.

Selection test

A Z-test of selection, with 1000 bootstrap replications, was conducted based on codons, using MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011), where the model was the Nei-Gojobori method - Proportion (Saitou and Nei, 1987) with synonymous and non-synonymous type substitutions.

The null hypothesis tested was $H_0: d_N = d_S$, where d_N is the number of non-synonymous substitutions per non-synonymous sites, whereas d_S is the number of synonymous substitutions per synonymous sites. For this hypothesis, three alternative hypotheses were tested: (a) $d_N \neq d_S$ (test for neutrality), (b) $d_N > d_S$ (positive selection), and (c) $d_N < d_S$ (purifying selection) - which are only validated if the p value is less than 0.05.

Ancestral sequences

Hypothetical ancestral sequences were generated from MEGA (Tamura et al., 2011) using the statistical method of maximum likelihood and the GTR nucleotide substitution model (General Time Reversible) with Gamma distribution with 2 parameters (Tamura et al., 2011), which were analyzed using the online tool BLASTN (for nucleotides) and BLASTP (for amino acids) present on the site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> to find some probable similarity to an actual subunit. Besides this analysis, three-dimensional models were also generated through the site <http://swissmodel.expasy.org>, according to their standard parameters, for comparison with current models.

Analysis of codon usage

SBPs sequences were analyzed and genomes of the organisms selected with regard to codon usage and for this, the database found on the website <http://www.kazusa.or.jp/codon/> was used.

RESULTS

Phylogenetic analysis

The tree generated by sequence analysis (SUPPLEMENTAL MATERIAL) shows the existing relationship between SBPs. At the end of each branch, the reference organisms of each sequence are shown, and for some, the annotation of the gene in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and the type of solute for each SBP (Figure 1).

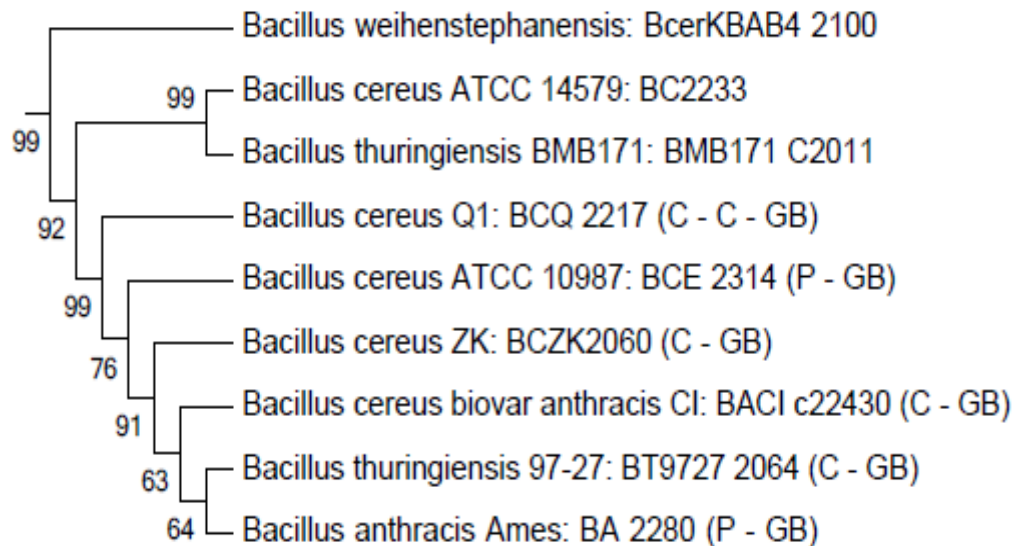


Figure 1: Organisms, gene annotation of the SBP in KEGG and type of solute transported (P-GB: proline and glycine betaine; C: choline; C-GB: choline and glycine betaine; C-C-GB: carnitine, choline and glycine betaine; When the type of solute is not specified, it is because only glycine betaine is transported).

In the analysis of this tree, there were two ways of organism grouping observed: a grouping of phylogenetically related organisms, which would be the most anticipated; and also a grouping of phylogenetically unrelated organisms, which suggests, in this second case, horizontal gene transfer. An example of this multiple form of grouping occurs with a non-virulent soil bacteria from the family *Rizhobiaceae* known as *Agrobacterium radiobacter* K84, which has a main chromosome or chromosome 1 and a secondary chromosome, chromosome 2, which can also be regarded as a mega-plasmid (Slater et al., 2009). Chromosome 1 has the gene Arad_0755, whose ID in NCBI is 7368963, which grouped with phylogenetically related organisms (Figure 2). On the other hand, in chromosome 2, there are the genes Arad_8392 and Arad_8402, whose ID in NCBI are respectively 7366822 and 7366831, which clustered with phylogenetically unrelated organisms (Figure 3) and (Figure 4), indicating that there was probably a horizontal transfer of chromosome 2.

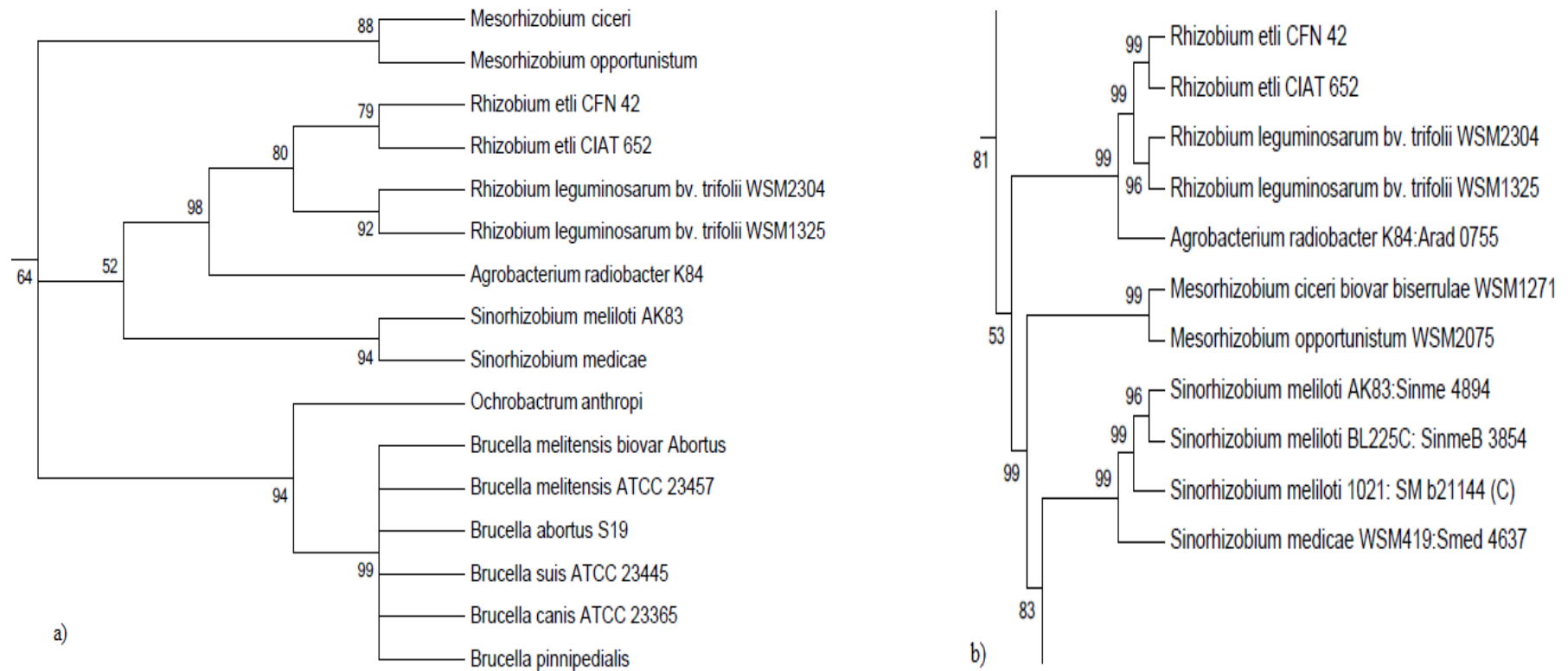


Figure 2: a) phylogeny based on RNAr 16S; b) grouping based on sharing gene Arad_0755 present in chromosome 1 of *Agrobacterium radiobacter* K84.

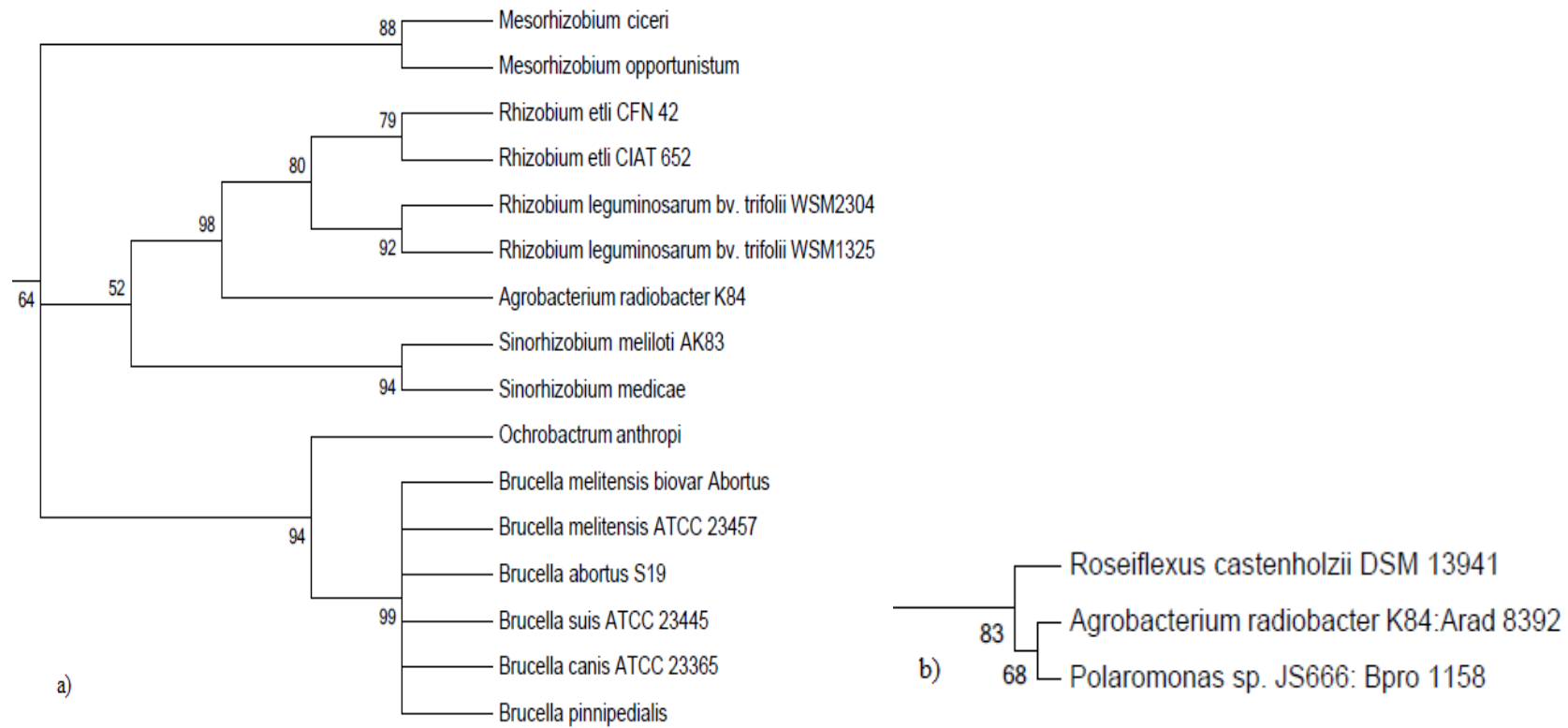


Figure 3: a) phylogeny based on RNAr 16S; b) grouping based on sharing gene Arad_8392 present in chromosome 2 of *Agrobacterium radiobacter* K84

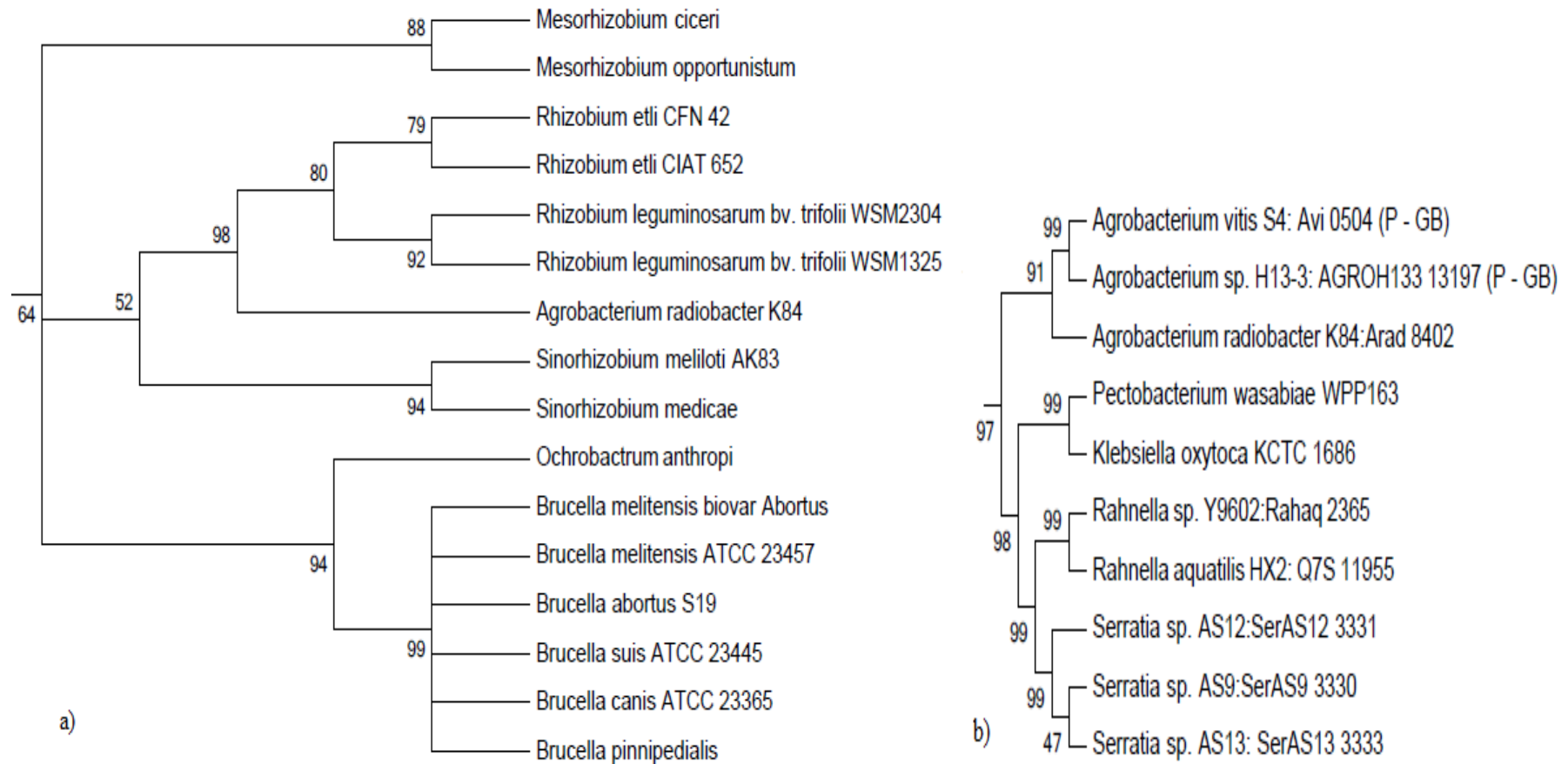


Figure 4: a) phylogeny based on RNAr 16S; b) grouping based on sharing gene Arad_8402 present in chromosome 2 of *Agrobacterium radiobacter* K84.

Selection test

There was no significant p value (<0.05), suggesting that any type of difference or meaning seen in this data set is due to chance, although, it was perceived that there is a tendency for purifying selection (Table 1).

Table 1: Codon-based Z-test of selection

Alternative hypothesis	Valores de p
$d_N \neq d_S$ (test for neutrality)	0.271
$d_N > d_S$ (positive selection)	1.000
$d_N < d_S$ (purifying selection)	0.129

Ancestral sequences

Two ancestral sequences were generated derived from the first cladogenesis that probably originated all current SBP sequences and that were identified as Ancestral_1 and Ancestral_2 (SUPPLEMENTAL MATERIAL). Data analysis using the tool BLASTN showed that Ancestral_1 was similar to the periplasmic subunit that binds to glycine betaine and choline of *Desulfosporosinus orientis* DSM 765 (Table 2), whereas the amino acid sequence for the same ancestral showed similarity with trimethylamine transporters, especially permeases (Table 3) with domains of OpuBB and OpuBC conserved and that are characteristic domains of choline transporters (Marchler-Bauer et al., 2011; Pittelkow et al., 2011) (Figure 5). As for Ancestral_2, the nucleotide sequence showed no similarity with any transporter; however, the amino acid sequence showed similarity to permeases (Table 4) and conserved domains (Figure 6) similar to Ancestral_1.

Three-dimensional models

In accordance with the Swiss-Model, two possible models were generated for Ancestral_1, of which only model 1 showed similarity with ABC transporters of compatible solutes, more specifically with choline - glycine betaine - carnitine transporters (Figure 7). As for Ancestral_2, five possible models were generated, of which only Ancestral_5 was compatible with ABC transporters of compatible solutes that, similar to Ancestral_2, showed similarity with choline - glycine betaine – carnitine transporters (Figure 8).

Codon usage

According to the analysis, it was observed that the codon usage of SBPs corresponds to the genomes of the organisms in which they are inserted, suggesting that this system is important for cell physiology, and because of this, its sequences changed little over time (Table 5).

Table 2: BLASTN of Ancestral_1 – sequences significant alignments

<i>Acession</i>	<i>Description</i>	<i>Max. score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query coverage</i>	<i>E value</i>	<i>Max. ident</i>
CP003108.1	<i>Desulfosporosinus orientis DSM 765, complete genome</i>	152	152	18%	1e-32	75%

Table 3: BLASTP of Ancestral_1 – sequences significant alignments

<i>Acession</i>	<i>Description</i>	<i>Max. score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query coverage</i>	<i>E value</i>	<i>Max. ident</i>
YP_003967851.1	<i>binding-protein-dependent transport system inner membrane</i>	96.7	96.7	28%	2e-19	31%
YP_001425237.1	glycine betaine transport system permease [Coxiella burnetii Dugway 5J108-111]	98.6	98.6	30%	1e-18	35%
ZP_01946271.2	<i>ABC transporter, quaternary amine uptake transporter (QAT)</i>	98.6	98.6	30%	1e-18	35%
YP_001596136.1	quaternary amine ABC transporter substrate-binding protein [Coxiella burnetii RSA 331]	95.5	95.5	30%	9e-18	35%
YP_002304237.1	glycine betaine transport system permease protein [Coxiella burnetii CbuG_Q212]	95.1	95.1	30%	1e-17	35%

Table 4: BLASTP of Ancestral_2 – sequences significant alignments

<i>Acession</i>	<i>Description</i>	<i>Max. score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query coverage</i>	<i>E value</i>	<i>Max. ident</i>
YP_003967851.1	binding-protein-dependent transport system inner membrane protein [Ilyobacter polytropus DSM 2926]	108	108	30%	3e-23	31%
ZP_01946271.2	ABC transporter, quaternary amine uptake transporter (QAT)	105	105	30%	8e-21	34%
YP_001425237.1	glycine betaine transport system permease [Coxiella burnetii Dugway 5J108-111]	104	104	30%	1e-20	34%
YP_002507602.1	glycine betaine ABC transporter substrate-binding protein [Clostridium cellulolyticum H10]	103	103	59%	3e-20	28%
ZP_08192210.1	Substrate-binding region of ABC-type glycine betaine transport system [Clostridium papyrosolvens DSM 2782]	103	103	34%	3e-20	34%

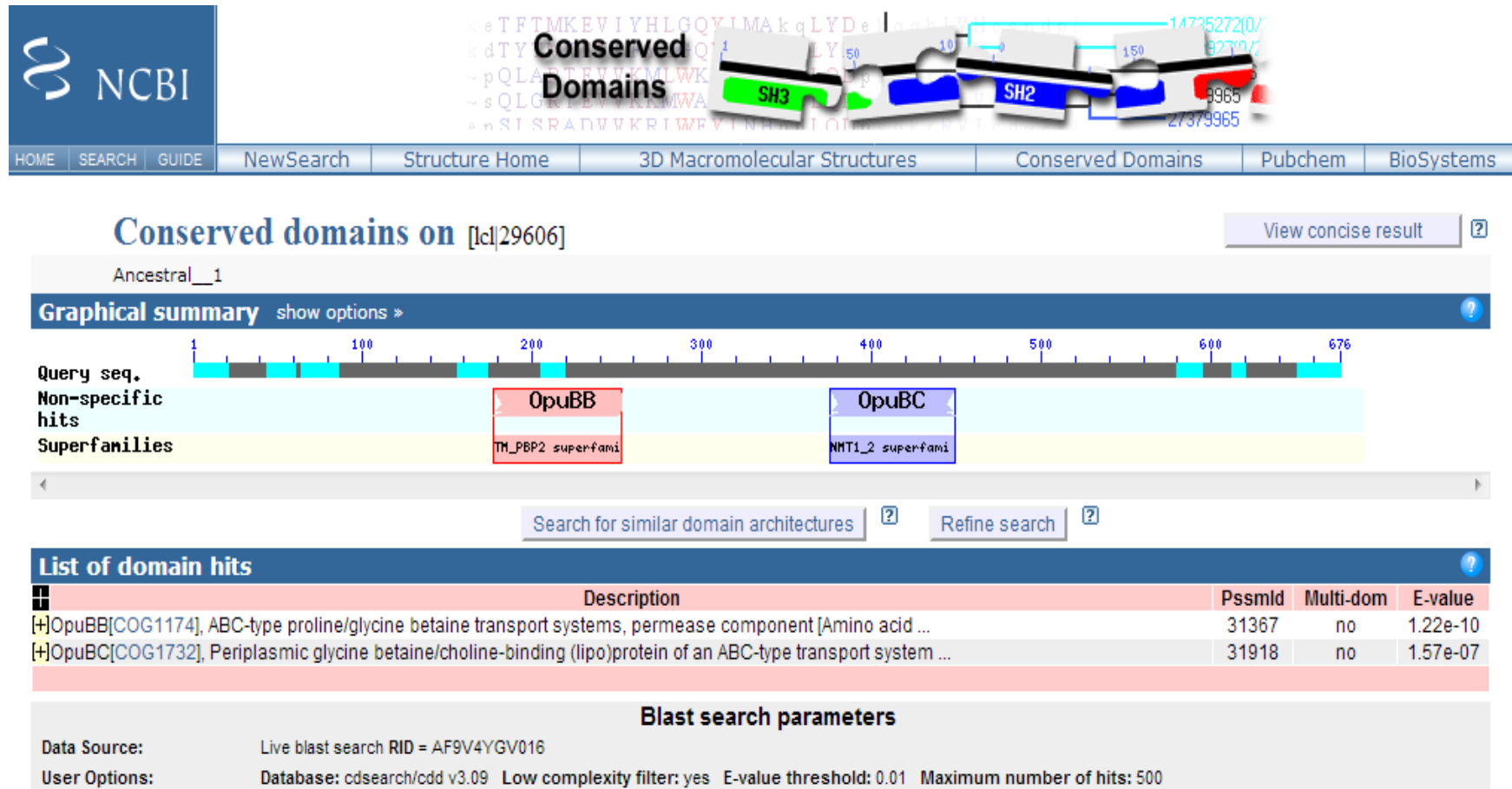


Figure 5: Conserved Domains in Ancestral__1.

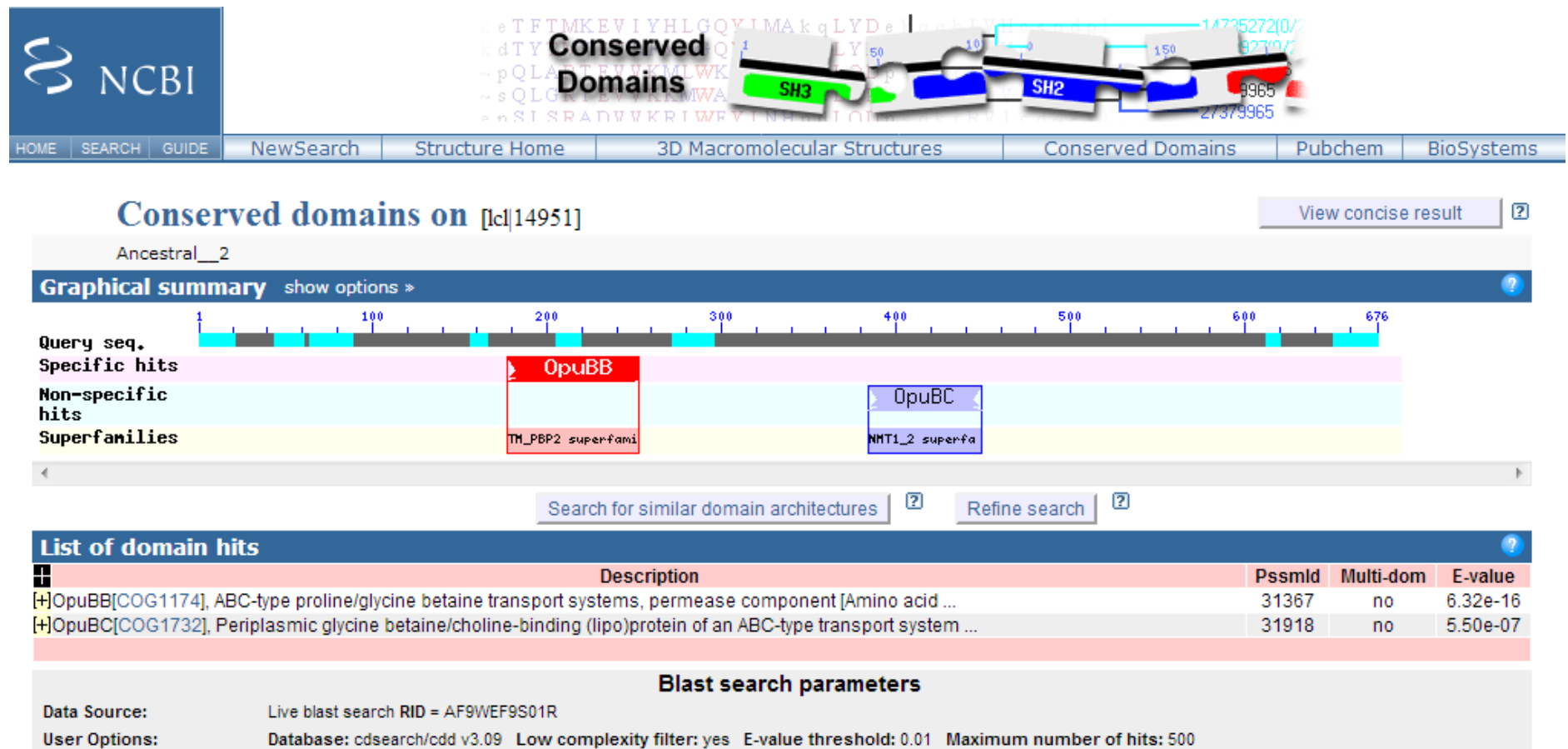


Figure 6: Conserved Domains in Ancestral_2.

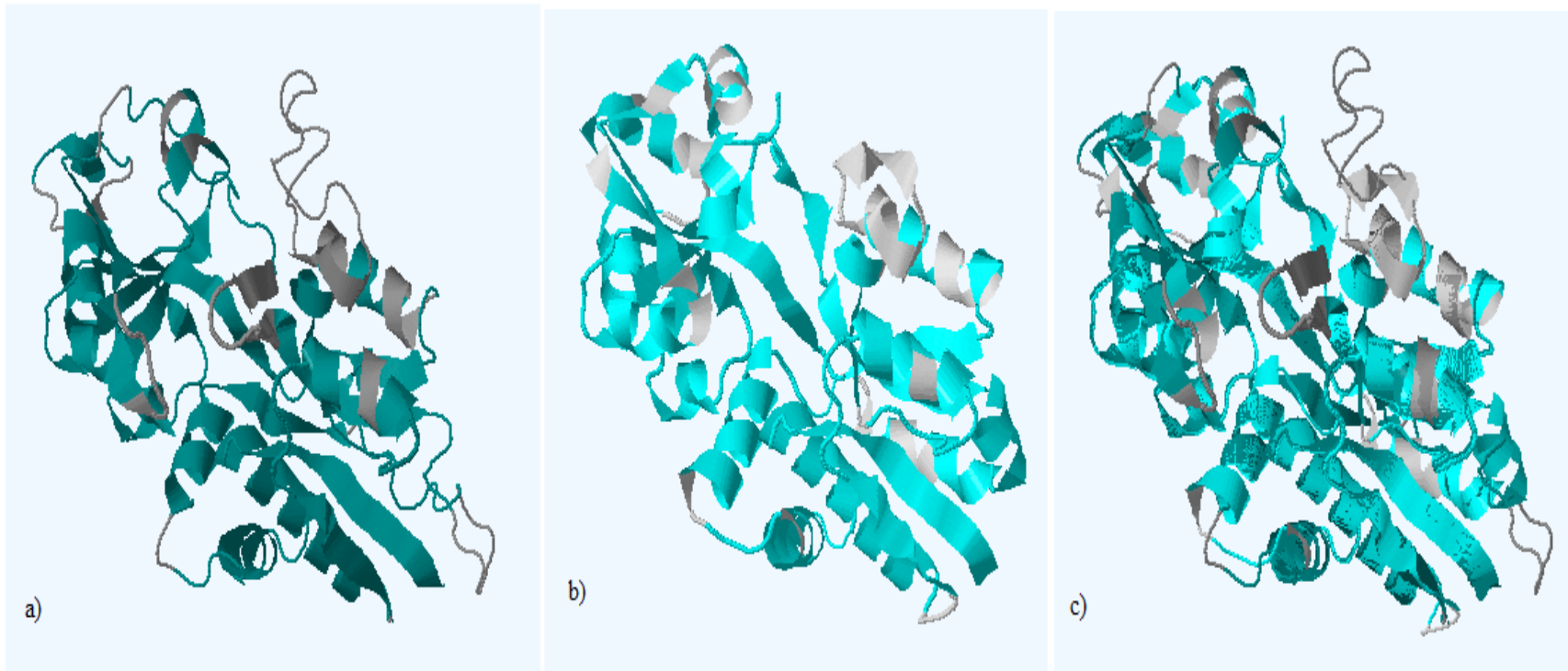


Figura 7: a) three-dimensional model of Ancestral_1; b) crystal structure of glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter; c) overlay of Ancestral_1 with crystal structure of glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter.

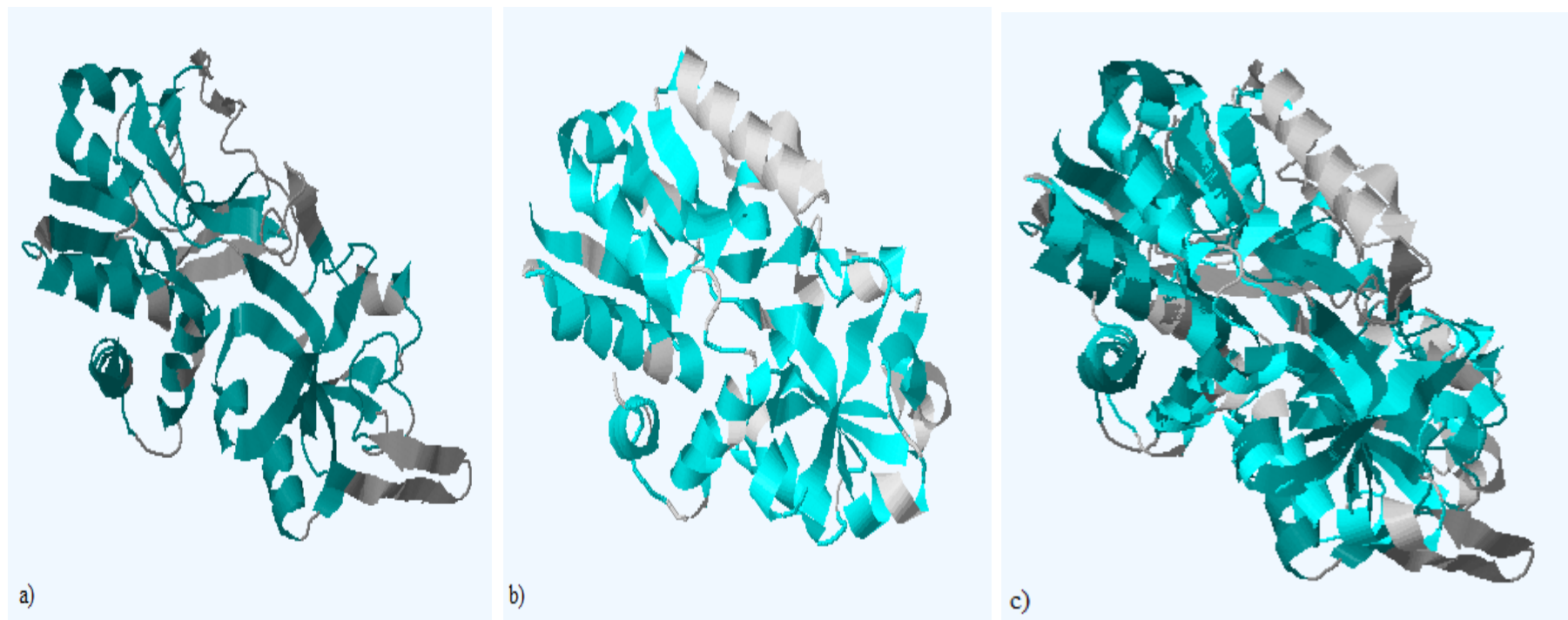


Figure 8: a) three-dimensional model of Ancestral_2; b) Structure of the substrate-binding protein provides insights into the multiple compatible solute-binding specificities of *B. subtilis* ABC transporter OpuC; c) overlay of Ancestral_2 with the structure of the substrate-binding protein that provides insights into the multiple compatible solute-binding specificities of *B. subtilis* ABC transporter OpuC.

Table 5: Codon usage

Organism	Genome codon usage		SBP codon usage	
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	UUC	UAU	UUC	UAU
	CUG	CAG	CUG	CAG
	AUC	AAG	AUC	AAG
	GUC	GAC	GUC	GAC
	UCG	UGG	UCG	UGG
	CCG	CGC	CCG	CGC
	ACC	AGC	ACC	AGC
	GCC	GGC	GCC	GGC
<i>Bacillus subtilis</i>	UUU	UAU	UUU	UAU
	CUG	CAA	CUG	CAA
	AUU	AAA	AUU	AAA
	GUU	GAA	GUU	GAA
	UCA	UGG	UCA	UGG
	CCG	CGC	CCG	CGC
	ACA	AGC	ACA	AGC
	GCA	GGC	GCG	GGC
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	UUC	UAU	UUC	UAU
	CUG	CAG	CUG	CAG
	AUC	AAG	AUC	AAG
	GUC	GAA	GUC	GAA
	UCG	UGC	UCG	UGC
	CCG	CGC	CCG	CGC
	ACC	AGC	ACC	AGA
	GCC	GGC	GCC	GGC
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	UUC	UAC	UUC	UAC
	CUC	CAG	CUC	CAG
	AUC	AAG	AUC	AAG
	GUC	GAG	GUC	GAG
	UCC	UGG	UCC	UGG
	CCG	CGC	CCG	CGC
	ACC	AGC	ACC	AGC
	GCC	GGC	GCC	GGC
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 32953	UUU	UAU	UUU	UAU
	CUG	CAG	CUG	CAG
	AUU	AAA	AUU	AAA
	GUG	GAU	GUG	GAU
	UCA	UGG	UCU	UGG
	CCG	CGU	CCG	CGU
	ACC	AGC	ACC	AGC
	GCC	GGU	GCU	GGU
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> Il 1403	UUU	UAU	UUU	UAU
	CUU	CAA	CUU	CAA
	AUU	AAA	AUU	AAA
	GUU	GAA	GUU	GAA
	UCA	UGG	UCA	UGG
	CCA	CGU	CCA	CGU
	ACA	AGU	ACA	AGU
	GCU	GGA	GCU	GGA

DISCUSSION

By analyzing the tree generated from the SBP sequences, it was noted that the trimethylamine and proline import system, formed by members of the ABC family of proteins, is well distributed in the prokaryotic world, since these subunits are present in organisms that live in very different environments that are not necessarily subjected to adverse salt conditions.

This analysis allows us to infer other possible physiological interactions of the osmoprotectant system, since it seems that this system, well distributed by different environments, could be related to other mechanisms besides being responsible for the osmotic response.

When subjected to osmotic stress, prokaryotic organisms activate a particular transcription factor known as σ^B that is responsible for the physiological response to stress. This factor triggers the transcription of approximately 150 genes, some directly and others indirectly. Under such conditions, the transcription levels of osmoprotectant uptake (OpuA - OpuE) are changed, rapidly increasing protein synthesis of this system in the first moments of the response to osmotic stress (Hahne et al., 2010).

However, there is no consensus on the primary activation of the osmoprotectant system by the σ^B transcription factor (Höper et al., 2005). There are inclusive studies that indicate that the osmoprotectant system, or at least members of this system, is activated by other transcription factors (Petersohn et al., 2001; Hecker et al., 2007).

Another factor that contributes to a better understanding of the possible physiological roles that the osmoprotectant system plays is the fact that this system has a tendency to purifying selection. This type of selection plays an important role in maintaining the long-term stability of biological structures by removing deleterious mutations, thereby allowing the system to be improved and not run the risk of losing this improvement (Loewe, 2008). This is to say, in the case of the osmoprotectant system, in our view, because of its tendency to this type of selection, to be in organisms present in different habitats and apparently not be directly controlled by the σ^B transcription factor, it must have been fixed with a different function of the osmoprotector, but that actually works for osmoprotection.

As for the codon usage analysis, it was noticed that the SBP sequences accompany their respective genomes, since the codon usage coincides. This information allows us to infer that the system comprises genes native to the genome or that were horizontally transferred a long time before, and therefore tend to have a codon usage similar to the genome (Davis and Olsen, 2011).

From the analysis of the hypothetical ancestral sequences, the osmoprotectant system must have arisen in prokaryotic organisms as a permease - choline transporter due to the similarity to current permeases and conservation of characteristic protein domains of choline transporters. As for the three-dimensional models generated from these same sequences, there was an observed similarity with trimethylamine transporters, suggesting that the diversification process of transported solutes must have started with the choline, and later,

small structural changes allowed other solutes to be transported; however, these changes did not affect the basic characteristics of the system.

The osmoprotectant system, according to our studies, consists of a system that has arisen with the function of nutrient uptake, the principle of choline, which is an important molecule for the biosynthesis of membrane phospholipids (Aktas et al., 2010) that acts as a precursor of glycine betaine (Burkhardt et al., 2009) and that participates in metabolic pathways for the synthesis of amino acids such as methionine (Barra et al., 2006). This system over time has been modified, allowing not only transport of a variety of molecules, but also structurally modified so that it now has a morphological diversity, making it very interesting with regard to its SBPs.

The transport of trimethylamines seems to be the hallmark of this system that, even after suffering some changes along the evolutionary process, did not lose the specificity for these molecules, but on the contrary, was enhanced, and among the trimethylamines transported by this system, choline and glycine betaine have a prominent role.

This transport system is currently much more related to glycine betaine than to choline, especially when characterized as a cellular osmoprotection system. However, as suggested, the osmoprotection was not responsible for fixing the system, but for the need to capture nutrients, though, at the beginning of the diversification of this and other systems, organisms that had the possibility of direct capture of glycine betaine showed an advantage over those that captured choline for the synthesis of glycine betaine.

This advantage can be explained by the fact that transporting glycine betaine is more energetically advantageous, since for the organism it is no longer necessary to synthesize two enzymes and to perform two chemical reactions responsible for the catabolism of choline and glycine betaine (Burkhardt et al., 2009) (Figure 9). This gain in terms of energy must have been fundamental to successful glycine betaine transport and sharing of this transport system among various prokaryotes.

There are at least three membrane proteins associated with the transport of glycine betaine: OpuA (osmoprotectant system), OpuC (osmoprotectant system) and OpuD (Pittelkow et al., 2011). However, the only one that is consensually synthesized from the activation of σ^B is OpuD (Hahne et al., 2010; Hecker et al., 2007), suggesting a direct action of OpuD in response to osmotic stress, whereas members of the osmoprotectant system act in a complementary manner.

This complimentary action can be fully understood by the fact that under salt stress conditions, especially if hyperosmotic, the organism will use all available metabolic mechanisms for maintaining its homeostasis. Thus, the osmoprotectant

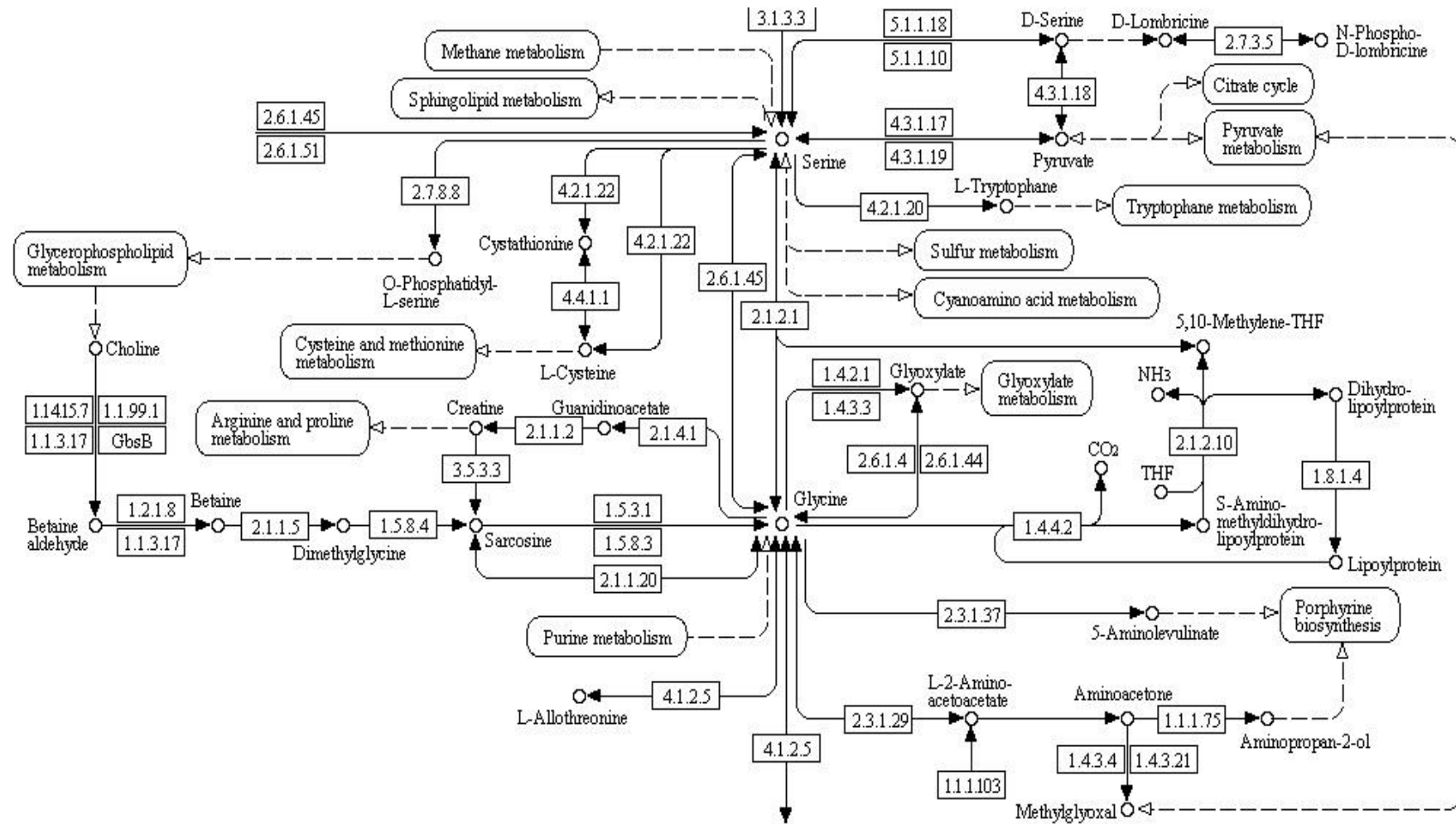


Figure 9: Metabolic map of the glycine betaine synthesis pathway from choline. Adapted from KEGG.

system must act, when required, as a secondary osmoprotection system due to the fact that glycine betaine, in particular, has physico-chemical properties for this type of physiological response, besides also acting as raw material in the metabolic pathway of amino acid synthesis, because under stress protein synthesis is increased to maintain cell physiology, i.e. in one way or another, there is the involvement of the osmoprotectant system in the response to osmotic stress, but not as the main agent of this response (Figure 10).

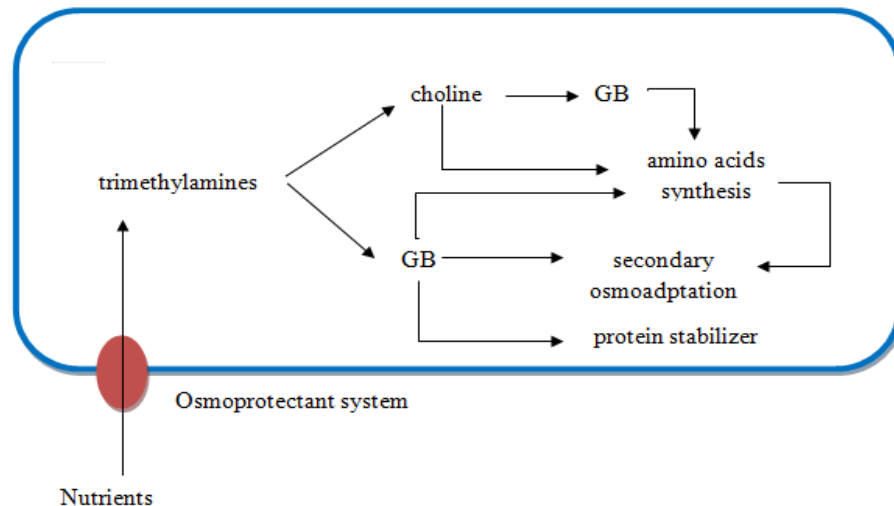


Figure 10: Physiological diversity of choline and glycine betaine. GB absorption became more energetically advantageous due to multiple activities.

CONCLUSION

Therefore, according to our understanding, the osmoprotectant system was fixed from natural selection due to the fact it plays a fundamental physiological function, which is to capture nutrients. Structural changes, among other things, allowed the system to transport different types of molecules without loss of function.

This system probably arose and was horizontally transferred before prokaryotic elicitation to diverse habitats, and because of this, its codon usage pattern coincides with the genome and is currently present in organisms inhabiting different environments.

As for the property of osmoprotection, it must have arisen secondarily, as the σ^B transcription factor seems to have no direct effect on the transcription of the system, but in environments with varying salinity, this system has proven important for maintaining organism homeostasis.

REFERENCES

Aktas M, Wessel M, Hacker S, Klusener S, et al. (2010). Phosphatidylcholine biosynthesis and its significance in bacteria interacting with eukaryotic cells. *Eur J Cell Biol.* 89:888–894.

- Barra L, Fontenelle C, Ermel G, Trautwetter A, et al. (2006). Interrelations between glycine betaine catabolism and methionine biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* strain 102F34. *J Bacteriol.* 188:7195–7204.
- Biemans-Oldehinkel E, Doeven MK, Poolman B (2006). ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett.* 580: 1023–1035.
- Burkhardt J, Sewald X, Bauer B, Saum SH et al. (2009) Synthesis of glycine betaine from choline in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: co-regulation of two divergent, polycistronic operons. *Environ Microbiol Rep.* 1: 38–43.
- Das Gupta B, He X, Jiang T, Li M, et al. (2000). On Computing the Nearest Neighbor Interchange Distance. In: Proceedings of the DIMACS Workshop on Discrete Problems with Medical Applications, DIMACS Series in Discrete Mathematics and Theoretical Computer Science. *Am. Math. Soc.* 55:125–143.
- Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 72:317–364.
- Davis JJ and Olsen GJ (2011). Characterizing the native codon usages of a genome: an axis projection approach. *Mol Biol Evol.* 28(1):211–221.
- Du Y, Shi WW, He YX, Yang YH, et al. (2011). Structures of the substrate-binding protein provide insights into the multiple compatible solute binding specificities of the *Bacillus subtilis* ABC transporter OpuC. *Biochem J.* 436(2):283–289.
- Empadinhas N and da Costa MS (2008). Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *International Microbiology* 11(3):151–161.
- Hahne H, Mader U, Otto A, Bonn F, et al. (2010) A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation. *J Bacteriol.* 192: 870–882.
- Hecker M, Pane-Farre J, Völker U (2007). SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:215–236.
- Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, et al. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
- Höper D, Völker U, Hecker M (2005). Comprehensive characterization of the contribution of individual SigB-dependent general stress genes to stress resistance of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 187:2810–2826.

- Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, et al. (2012). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular datasets. *Nucleic Acids Res.* 40 (1):D109-D114.
- Kanehisa M and Goto S (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 28: 27–30.
- Loewe L. (2008). Negative selection. *Nature Education* 1(1).
- Moses S, Sinner T, Zapras A, Stöveken N, et al. (2012). Proline utilization by *Bacillus subtilis*: uptake and catabolism. *J. Bacteriol.* 194:745-758.
- Oldham ML, Davidson AL, Chen J (2008). Structural insights into ABC transporter mechanism. *Curr Opin Struct Biol.* 18(6):726-733.
- Petersohn A, Brigulla M, Haas S, Hoheisel JD, et al. (2001) Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 183: 5617–5631.
- Pittelkow M, Tschapek B, Smits SH, Schmitt L, et al. (2011). The Crystal Structure of the Substrate-Binding Protein OpuBC from *Bacillus subtilis* in Complex with Choline. *J Mol Biol.* 411: 53-67.
- Roberts MF (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Syst.* 1:5.
- Saitou N and Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution.* 4:406-425.
- Slater SC, Goldman BS, Goodner B, Setubal JC, et al. (2009). Genome Sequences of Three *Agrobacterium Biovars* Help Elucidate the Evolution of Multi-Chromosome Genomes in Bacteria. *J. Bacteriol.* 191:2501 – 2511.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, et al. (2011). MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution.* 28(10):2731–2739.
- Thomas GH (2010). Homes for the orphans: utilization of multiple substrate-binding proteins by ABC transporters. *Mol Microbiol.* 75:6-9.
- Yancey PH (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* 208:2819-2830

Ziegler C, Bremer E, Krämer R (2010). The BCCT-family of carriers: from physiology to crystal structure. *Mol Microbiol.* 78: 13-34.

CONCLUSÃO

4. CONCLUSÃO

Pelo fato de desempenhar uma atividade fisiológica fundamental, que é a captura de nutrientes, o sistema de osmoproteção, de acordo com nosso entendimento foi fixado nos mais diversos procariotos e as mudanças estruturais, dentre outros aspectos, permitiram que o sistemas transportasse tipos diferentes de moléculas sem que ocorresse perda de função. Este sistema provavelmente surgiu e foi transferido horizontalmente antes da irradiação procariótica para habitats diversos, por isso seu padrão de códons preferenciais coincide com o genoma estando atualmente presente em organismos que vivem em ambientes tão diferentes.

Uma vez que o fator de transcrição σ^B parece não exercer efeito direto sobre a transcrição do sistema, a característica de osmoproteção deve ter surgido secundariamente, contribuindo para a adaptação destes organismos a ambientes que apresentam variação de salinidade.

REFERÊNCIAS

5. REFERÊNCIAS

- ABBY, S; DAUBIN, V. Comparative Genomics and the Evolution of Prokaryotes. CHEN, T.H.; MURATA, N. Glycine betaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. **Trends in Plant Science**. v.13, p. 499-505, 2008. v. 15, p.135-141, 2007.
- BARRA, L.; FONTENELLE, C.; ERMEL, G. TRAUTWETTER, A. et al. Interrelations between glycine betaine catabolism and methionine biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* strain 102F34. **Journal of Bacteriology**. v.188, p. 7195–7204, 2006.
- BERNTSSON, R. P.; SMITS, S. H.; SGIMITT, L.; SLOTBOOM, D. J.; POOLMAN, B. A Structural Classification of Substrate-binding Proteins. **FEBS Letters**. v. 12, p. 2606-2617, 2010.
- BIEMANS-OLDEHINHEKI, E.; DOEVEN, M.K.; POOLMAN, B.. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. **FEBS Letters**. v. 580, p. 1023–1035, 2006.
- BOLEN, D.W.; BASKAKOV, I. V. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. **Journal of Molecular Biology**. v. 310, p. 955 – 963, 2001.
- BRATLIE, M. S.; JOHANSEN, J.; SHERMAN, B. T.; HUANG, D. W.; LEMPICKI, R. A.; DRABLOS, F. Gene Duplications in Prokaryotes can be Associated with Environmental Adaptation. **BMC Genomics**. v. 11: 588, 2010.
- CÁNOVAS, D.; VARGAS, C.; KNEIP, S.; MORÓN, M.J.; VENTOSA, A.; BREMER, E.; NIETO, J.J. Genes for the Synthesis of the Osmoprotectant Glycine Betaine from Choline in the Moderately Halophilic Bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. **Microbiology**. v. 146, p. 455 – 463, 2000.
- CHEN, C; BEATTIE, G. A. Characterization of the Osmoprotectant Transporter OpuC from *Pseudomonas syringae* and Demonstration that Cystathionine- β -Synthase Domains Are Required for Its Osmoregulatory Function. **Journal of Bacteriology**. v. 189, p. 6901-6912, 2007.
- CHEN, T.H.; MURATA, N. Glycine betaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. **Trends in Plant Science**. V.13, p. 499-505, 2008.

DAVIDSON, A. L.; CHEN, J.. ATP-Binding Cassette Transporters in Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**. v.73, p. 241-268, 2004.

DAVIDSON, A.L.; DASSA, E.; ORELLE, C. CHEN, J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 72, p. 317–364, 2008.

DAWSON, R. J.; HOLLENSTEIN, K.; LOCHER, K. P. Uptake or Extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism. **Molecular Microbiology**. v. 65, p. 250-257, 2007.

DU, Y.; SHI, W.W.; HE, Y.X.; YANG, Y.H. et al.. Structures of the substrate-binding protein provide insights into the multiple compatible solute binding specificities of the *Bacillus subtilis* ABC transporter OpuC. **Biochemistry Journal**. v. 436, p. 283-289, 2011.

EMPADINHAS, N.; DA COSTA, M.S. Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. **International Microbiology**. v.11, p. 151-161, 2008.

GIULIANI, S. E.; FRANK, A.M.; CORGLIANO, D. M.; SEITERT, C.; HAUSER, L.; COLLART, F. Environment sensing and response mediated by ABC transporters. **BMC Genomics**. v. 12 (Suppl 1):S8, 2011.

HURLES, M. Gene Duplication: The Genomic Trade in Spare Parts. **PLoS Biology** 2(7): 206, 2004.

JEBBAR, M; SOHN-BÖSSER, L.; BREMER, E.; BERNARD, T.; BLANCO, C. Ectoine-Induced Proteins in *Sinorhizobium meliloti* Include an Ectoine ABC-Type Transporter Involved in Osmoprotection and Ectoine Catabolism. **Journal of Bacteriology**. v. 187, p.1293-1304, 2005.

KAPPES, R. M.; KEMP, B.; KNEIP, S.; BOCH, J.; GADE, J.; MEIRE-WAGNER, J.; BREMER, E. Two Evolutionarily Closely Related ABC Transporters Mediate the Uptake of Choline for Synthesis of the Osmoprotectant Glycine Betaine in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**. v. 32, p. 203 -216, 1999.

KIMURA, Y.; KAWASAKI, S.; YOSHIMOTOL, H.; TAKEGAWA, K. Glycine Betaine Biosynthesized from Glycine Provides an Osmolyte for Cell Growth and Spore Germination

during Osmotic Stress in *Myxococcus Xanthus*. **Journal of Bacteriology**. v. 192, p. 1467-1470, 2010.

LINTON, K. J. Structure and function of ABC transporters. **Physiology**. v.22, p. 122-130, 2007.

MA, Y.; GALINSKI, E.A.; GRANT, W.D.; OREN, A.; VENTOSA, A. Halophiles 2010: Life in Saline Environment. **Applied and Environmental Microbiology**. v.76, p. 6971–6981, 2010.

MARAKOVA, K. S.; SOROKIM, A. V.; NOVICHKOV, P. S.; WOLF, Y. I.; KOONIM, E. V. Clusters of Orthologous Genes for 41 Archaeal Genomes and Implications for Evolutionary Genomics of Archaea. **Biology Direct**. v. 2:33, 2007.

MILTON, H.; SAIER, J. R.. A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64, p. 354-411, 2000.

NAU-WAGNER, G.; OPPER, D.; ROLBETZKI, A.; BOCH, J.; KEMP, B.; HOFFMANN, T.; BREMER, E. Genetic control of Osmoadaptive Glycine Betaine Synthesis in *Bacillus subtilis* through the Choline-sensing and Glycine Betaine-Responsive GbsR Repressor. **Journal of Bacteriology**. v.194, p. 2703 – 2714, 2012.

NEVO, E. Evolution Under Environmental Stress at Macro and Microscales. **Genome Biology and Evolution**. V. 3, p. 1039 – 1052, 2011.

OCHMAN, H; DAVALOS, L. M. The Nature and Dynamics of Bacterial Genomes. **Science**. v.311, p. 1730-1733, 2006.

PAUL, S.; BAG, S.H.; DAS, S.; HARVILL, E.T.; DUTTA, C. Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. **Genome Biology**. v.9, R70, 2008.

PARSONS, P.A. Environments and evolution: interactions between stress, resource inadequacy and energetic efficiency. **Biological Reviews**. v. 80, p. 589–610, 2005.

REMM, M.; STORM, C.E.; SONNHAMMER, E. L. Automatic Clustering of Orthologs and in Paralogs from Pairwise Species Comparisons. **Journal of Molecular Biology.** v. 314, p. 1041-1052, 2001.

REES, D.C.; JOHNSON, E.; LEWINSON, O. ABC Transporters: the power to change. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** v. 10, p. 218-227, 2009.

ROBERTS, M.F.. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. **Saline System.** v.1:5, 2005.

RÖSGEN, J.; PETTITT, B.M.; BOLEN, D.W. An Analysis of the Molecular Origin of Osmolyte-dependent Protein Stability. **Protein Science.** v.16, p. 733-743, 2007.

SHAPIRO, B.J.; ALM, E.J. Comparing Patterns of Natural Selection across Species Using Selective Signatures. **PLoS Genetics.** v. 4 e23, 2008.

SMITS, S.H.; HÖING, M.; LECHER, J. JEBBAR, M.; SCHIDTT, L.; BREMER, E. The compatible-solute-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis*: ligand binding, site-directed mutagenesis, and crystallographic studies. **Journal of Bacteriology.** v.190, p. 5663-5971, 2008.

SPANHEIMER, R.; MULLER, V. The molecular Basis of Salt Adaptation in *Methanosarcina mazei* Go1. **Archives of Microbiology.** v. 190 p. 271–279, 2008.

TADEO, X.; LÓPEZ-MÉNDEZ, B.; TRIGUERO, T.; LAÍN, A.; CASTAÑO, D.; MILLET, O. Structural Basis for the Aminoacid Composition of Proteins from Halophilic Archea. **PLoS Biology.** v. 7:e1000257, 2009.

VAN DER DOES, C.; TAMPÉ, R. How do ABC Transporters Drive Transport? **Biological Chemistry.** v.385, p. 927 – 933, 2004.

VENTOSA, A.; NIETO, J.J. Biotechnological Applications and Potentialities of Halophilic Microorganisms. **World Journal of Microbiology & Biotechnology.** v.11, p. 85-94, 2005.

WOOD, J.M. Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. **Annual Review of Microbiology.** v. 65, p. 215-238, 2011.

YANCEY, P.H.. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. **Journal of Experimental Biology**. v. 208, p. 2819-2830, 2005.

ZIEGLER, C.; BREME, E.; KRÄMER, R.. The BCCT-family of carriers: from physiology to crystal structure. **Molecular Microbiology**.v 78, p. 13-34, 2010.

ZHANG, J. Evolution by Gene Duplication: an Update. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 18, p. 292–298, 2003.

ANEXOS

E – mail comunicando a aceitação do artigo para a publicação

Date: Tue, 4 Dec 2012 15:53:22 -0200
From: gmr@geneticsmr.com
To: coutinho8178@hotmail.com; stfarias@yahoo.com
Subject: GMR 2729

Prezado Autor,

GMR 2729 – “Phylogenetic analysis of substrate-binding subunits in an osmoprotectant system”

Como parte da nova política da Genetics and Molecular Research (GMR), solicitamos o pagamento da taxa de publicação para que possamos avançar mais uma etapa no processo do artigo de vossa autoria, **aceito por nosso conselho editorial**.

O processo de análise da redação científica e revisão do inglês faz parte da política editorial da GMR. Muitos artigos submetidos à publicação com certificado de revisão de agências especializadas são rejeitados pela fraca qualidade do inglês. Assim, a GMR tem trabalhado intensamente para manter sua alta qualidade.

Ratificamos que a revista não recebe auxílio de qualquer natureza de órgãos públicos ou privados, por isso, solicitamos aos autores que colaborem conosco e com a manutenção da GMR.

Concluindo: para que possamos dar continuidade ao processo do artigo, pedimos que verifique o arquivo anexado com **instruções de pagamento da taxa de publicação**.

Contando com sua compreensão.

Atenciosamente,

--

Francine Muniz

Editorial coordinato

www.geneticsmr.com

[MSN:gmr@geneticsmr.com](mailto:gmr@geneticsmr.com)

Enjoy our page on Facebook

Add us on LinkedIn

APÊNDICES

PROVÁVEIS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS ANCESTRAIS

[illegible]

[illegible]

**PROVÁVEIS SEQUÊNCIAS
PRIMÁRIAS DAS PROTEÍNAS
ANCESTRAIS**

ÁRVORE FILOGENÉTICA 16S

**ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS
SEQUENCIAS NUCLEOTÍDICAS
DAS SUBUNIDADES
LIGADORAS DE SUBSTRATO**

