

ANDRÉA TARZIA

SENSORIAMENTO POPULACIONAL EM
Herbaspirillum spp

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Berenice R. Steffens

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Roseli Wassen

CURITIBA
2004

ANDRÉA TARZIA

SENSORIAMENTO POPULACIONAL EM
Herbaspirillum spp

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Berenice R. Steffens

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Roseli Wassen

CURITIBA
2004

ANDRÉA TARZIA

SENSORIAMENTO POPULACIONAL EM *Herbaspirillum* spp

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências – Área Bioquímica – do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Berenice R. Steffens
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Prof^º. Dr. Fabio de Oliveira Pedrosa
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Prof^º. Dr. Leonardo
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Prof^ª. Dr^ª. Cyntia
Departamento de Patologia Médica – UFPR

Curitiba, 31 de março de 2004.

Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Maria Berenice R. Steffens
Prof^a. Dr^a. Roseli Wassen

“A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio”.

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

A coordenação deste curso de pós-graduação e ao apoio financeiro da CAPES, FINET-MCT-PRONEX;

BERE, com certeza nunca vou conseguir expressar meus agradecimentos. Só quero lhe dizer que você é responsável por eu ter realizado este sonho. Obrigada por ter acreditado em mim;

A você Roseli, não só pelas dicas de biologia molecular (faz PCR do cromossomal, purifica assim ou assado), elas ajudaram muito, não tenha dúvida. Mas eu quero te agradecer é por ter acreditado em mim, por tentar me acalmar nos *momentos de desespero* e pela sua amizade;

Ao Emanuel, em especial, gostaria de agradecer à sugestão deste projeto e a todo apoio para o seu desenvolvimento;

Ao Prof^o Fábio, pela oportunidade de trabalhar neste laboratório;

Leda, não esqueceria de você: obrigada!

A todos os Professores do Núcleo de Fixação de Nitrogênio pela disponibilidade, cooperação e ensinamentos oferecidos durante todos esses anos de convivência;

A você Ronaldo, pela sua amizade. Sem você eu nunca teria alcançado esta vitória.
Àqueles que sempre acreditaram em mim - MÃE, Irineu e André: Amo vocês.
As amigas: Drizinha, Eli e Nena, ao apoio, amizade e por tudo que passamos juntas
Que saudade!
Ao meu tio Zé e a minha tia Zezé pelo apoio e confiança que depositaram em mim.

A oportunidade de morar na CEUC e conhecer vocês: Roseane, Mara, Miriam, Cristiane, Glória, Roseli, Michella e Andréa. Choramos, rimos, brincamos, brigamos, estudamos, bebemos, comemos, dormimos, trabalhamos... enfim as amigas “ceuquianas” que dividiram tantos momentos comigo: muito obrigada.

A Carol que me abriu os braços há 7 anos: nunca vou conseguir retribuir o que fizeste por mim. Você mora no meu coração!

André Luis: Obrigada, acima de tudo, pelo seu companheirismo;

Roseli P., Dona Jú e Valtinho: vocês são muito especiais...

Aos amigos(as) do Labs: Fabiane, Jú Inaba, Lauren, Adriana T., Stefan, Luciano, Luiza, Patilene, Humberto, Juliana, Juliana S., Rafael, Leonardo, Roseadele, Liliam, Eduardo, Darlene, Marco, Lys, Helisson,...

Ana Paula e Dani,: Valeu!

Ana Claudia e Taninha: muito abrigada por dividirem tantos momentos comigo.

Ao Daniel, pelo seu amor e por eu poder amá-lo,

A Gabriela, pela sua pureza,

A dona Isabel pelas orações, amizade e carinho materno que tem me oferecido.

E agradeço a Deus, por ter permitido que tudo que relatei acontecesse em minha vida.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE QUADROS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 INTERAÇÕES PLANTA-MICROGANISMO	17
2.2 SENSORIAMENTO POPULACIONAL EM BACTÉRIAS	18
2.2.1 Sensoriamento populacional em <i>Vibrio fischeri</i>	20
2.2.2 Sensoriamento populacional em <i>Vibrio harvey</i>	24
2.2.3 Sensoriamento populacional em <i>Rhizobium leguminosarum</i>	27
2.2.4 Sensoriamento populacional em <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
2.2.5 Sensoriamento populacional em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
2.2.6 Sensoriamento populacional em <i>Herbaspirillum</i> sp	34
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Bactérias e Plasmídeos	36
4.2 Meios de Cultura	37
4.3 Antibióticos	38
4.4 Condições de cultivo dos microrganismos	39
4.5 Manutenção das estirpes bacterianas	40
4.6 Minipreparação de plasmídeos	40

4.7 Clivagem do DNA com enzimas de restrição	40
4.8 Transformação bacteriana	41
4.8.1 Preparo de células eletrocompetentes	41
4.8.1.1 <i>Escherichia coli</i>	41
4.8.1.2 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	41
4.8.2 Eletroporação	42
4.8.2.1 <i>Escherichia coli</i>	42
4.8.2.2 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	42
4.9 Detecção de AHLs	42
4.9.1 Detecção por microscopia de fluorescência	43
4.9.2 Detecção por medidas de atividade de β -galactosidase em meio sólido	43
4.9.3 Detecção por medidas de atividade de β -galactosidase em meio líquido	43
4.9.4 Detecção de AHLs por Cromatografia em Camada Delgada (TLC)	44
4.9.4.1 Extração de AHLs	44
4.9.4.2 Cromatografia em Camada Delgada (TLC)	44
4.9.5 Detecção de AHLs no prováveis mutantes	45
4.10 Curva de crescimento	45
4.11 Determinação da concentração de proteínas	45
4.12 Busca de genes envolvidos na síntese de AHLs em <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	46
4.13 Análise da seqüência de nucleotídeos do provável gene envolvido na síntese de AHL em <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	47
4.14 Análise topológica de proteínas	47
4.15 Seleção de clones contendo genes envolvidos na síntese de AHLs para construção de mutantes	47

4.16 Sequenciamento de DNA	48
4.17 Mutagênese	48
4.18 Purificação de DNA cromossomal de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	48
4.19 Hibridização de DNA	49
4.19.1 Transferência de DNA	49
4.19.2 Pré-hibridização	50
4.19.3 Marcação da sonda	50
4.19.4 Hibridização	50
4.20 Amplificação do DNA cromossomal dos prováveis mutantes	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Perfil de AHLs produzidas por <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	56
5.2 Influência no meio de cultura na produção de AHLs por <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	60
5.3 Detecção de AHLs em diferentes estirpes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	62
5.4 Identificação de genes envolvidos na síntese de AHLs em <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	64
5.5 Análise da seqüência de nucleotídeos do provável gene <i>hdtS</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e seus adjacentes	66
5.6 Análise topológica da provável proteína HdtS de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	73
5.7 Caracterização do provável gene <i>hdtS</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	78
6. CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

ÍNDICE DE FIGURAS

01	ESTRUTURA DAS MOLÉCULAS DE <i>N</i> -ACIL HOMOSERINA LACTONAS	18
02	MODELO PROPOSTO PARA A SÍNTESE DE AHLs	19
03	ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>lux</i> EM <i>Vibrio fischeri</i>	21
04	REGULAÇÃO DA BIOLUMINESCÊNCIA EM <i>Vibrio fischeri</i>	23
05	SENSORIAMENTO POPULACIONAL EM <i>Vibrio harveyi</i>	25
06	SENSORIAMENTO POPULACIONAL EM <i>Rhizobium leguminosarum</i>	28
07	SENSORIAMENTO POPULACIONAL EM <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
08	SENSORIAMENTO POPULACIONAL EM <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
09	DETECÇÃO DE AHL EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> pelo sensor <i>rail-lacZ</i>	54
10	EXPRESSÃO DO PROMOTOR <i>rail</i> DE <i>Rhizobium leguminosarum</i> EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	55
11	EXPRESSÃO DE <i>rail-lacZ</i> EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	56
12	DETECÇÃO DE AHLs POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	58
13	DETECÇÃO DE AHLs PRODUZIDAS POR <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	58
14	CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	59
15	DETECÇÃO DE AHLs PRODUZIDAS POR <i>Herbaspirillum seropedicae</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA	61
16	DETECÇÃO DE AHLs EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> E <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	63
17	ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS PROVÁVEIS PROTEÍNAS HdtS DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> E <i>Pseudomonas fluorescens</i>	65
18	IDENTIFICAÇÃO DAS PROVÁVEIS REGIÕES CODIFICADORAS DE PROTEÍNAS	66

19	MAPA DA REGIÃO DO PROVÁVEL GENE <i>hdtS</i> DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	67
20	ANÁLISE DA SEQUENCIA DE NUCLEOTÍDEOS CONTENDO O PROVÁVEL GENE <i>hdtS</i> DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	69
21	ALINHAMENTO DAS PROVÁVEIS PROTEÍNAS HdtS DE <i>Pseudomonas fluorescens</i> E <i>Herbaspirillum seropedicae</i> COM A PROTEÍNA PlsC DE <i>Escherichia coli</i>	72
22	PERFIL DE HIDROFOBICIDADE DAS PROVÁVEIS PROTEÍNAS HdtS DE <i>Pseudomonas fluorescens</i> E <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	76
23	MODELO TOPOLÓGICO PREDITO PARA AS PROVÁVEIS PROTEÍNAS HdtS DE <i>Pseudomonas fluorescens</i> E <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	77
24	PERFIL DE HIBRIDIZAÇÃO DAS ESTIRPES SMR1 (SELVAGEM), <i>Atmut1</i> (PROVÁVEL MUTANTE) DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> COM O PLASMÍDEO pG09.B6 MARCADO COM [³² P]	80
25	ESQUEMA DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON EZ::TN TM <TET-1> NO GENE <i>hdtS</i> CROMOSSOMAL DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	82
26	CONFIRMAÇÃO DA FORMA DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA DOS PROVÁVEIS MUTANTES	83
27	DETECÇÃO DE AHLs NOS PROVÁVEIS MUTANTES	83

ÍNDICE DE QUADROS

01	LISTA DE MICRORGANISMOS QUE CONTÉM GENES HOMÓLOGOS A <i>luxI</i> E <i>luxR</i> DE <i>V. fischeri</i>	26
02	ESTIRPES DE BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	36
03	CONCENTRAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS UTILIZADAS NOS MEIOS DE CULTIVO	39
04	COMPARAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUZIDA DAS ORFs IDENTIFICADAS COM SEQÜÊNCIAS DEPOSITADAS NO BANCO DE DADOS GenBank.	65
05	IDENTIFICAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE AHLs NO BANCO DE DADOS DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AHL	Acil homoserina lactona
Amp	Ampicilina
D.O.	Densidade óptica
Gm	Gentamicina
kb	kilobases
Nal	Ácido nalidixico
ONPG	<i>o</i> -nitrofenol- β -D-galactosídeo
ORF	Do inglês “Open Reading Frame” – Fase aberta de leitura
PCR	Reação em cadeia da polimerase
R _F	Taxa de migração
rpm	Rotações por minuto
Sm	Estreptomicina
[³² P]dCTP	α [³² P]5'-trifosfato de 2'-desoxicitidina
HSL	Homoserina Lactona
TLC	Cromatografia em Camada Delgada

RESUMO

Bactérias do gênero *Herbaspirillum* fixam nitrogênio, endofíticas, microaerófilas e gram-negativas. Acredita-se que neste organismo, a expressão de genes envolvidos nos processos de interação planta-microrganismo possa ser controlada por um sistema de sensoriamento populacional modulado por *N*-acil homoserina lactonas (AHLs), como ocorre em outras bactérias gram negativas que interagem com plantas. Este sistema regulatório envolve duas proteínas, uma AHL sintase, normalmente membro da família LuxI de proteínas, e uma proteína receptora de AHL, pertencente a família LuxR de reguladores de transcrição. Neste trabalho a produção de AHLs por *H. seropedicae* foi investigada através da análise funcional de plasmídeos sensores baseados em sistemas homólogos a *luxRI* de diferentes microrganismos. O perfil de AHLs produzidas foi analisado por TLC em diferentes meios e condições de cultura. Os resultados mostraram que *Herbaspirillum* spp são capazes de produzir dois tipos de AHLs em alta densidade populacional. Análises do banco de dados de *H. seropedicae* SMR1 permitiram a identificação de uma provável AHL sintase a qual apresentou 41% de identidade com a proteína HdtS de *P. fluorescens* F113. Estes resultados sugerem que a síntese destas moléculas pode ser dirigida por uma proteína do tipo HdtS.

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos apresentam diferentes graus de dependência durante a interação com os tecidos e células das plantas, o que pode levar a interações benéficas (simbióticas ou não) ou patogênicas. Até o momento, nenhuma das numerosas interações planta-microrganismo está completamente compreendida. Sabe-se que, para interagirem com as plantas, diferentes microrganismos muitas vezes utilizam os mesmos mecanismos embora em combinações e para propósitos distintos (BARON & ZAMBRYSKI, 1995).

Estudos recentes têm demonstrado que a expressão de genes envolvidos nos mecanismos de interação planta-microrganismo pode ser controlada por um sistema regulatório denominado sensoriamento populacional (do inglês, *quorum sensing*) (SCHRIPEMA *et al.*, 1995; ANDERSEN *et al.*, 2000; DANIELS *et al.*, 2001; STEIDLE *et al.*, 2001; WISNIEWSKI-DIÉ *et al.*, 2001). Através deste sistema, as bactérias controlam uma ampla classe de características como: inibição do crescimento, nodulação, transferência de plasmídeos, secreção de enzimas envolvidas na patogenicidade, produção de antibióticos e produção de vários metabólitos secundários, tais como piocianina e pioverdina (BRELLE-MARIÑO & BEDMAR, 2001). Assim, a competição e a sobrevivência da bactéria no solo e na planta pode ser influenciada pela expressão de genes controlados pelo sensoriamento populacional.

Em bactérias gram negativas, o sensoriamento populacional envolve geralmente duas proteínas: uma proteína tipo **LuxI** e uma proteína regulatória, membro da família **LuxR**. As proteínas homólogas a LuxI são AHL sintases que utilizam *S*-adenosilmetionina e proteínas carreadoras de grupos acil (acil-ACP) para sintetizar moléculas de *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) (HANSELKA & GREENBERG, 1996; MORÉ *et al.*, 1996; SCHAEFER *et al.*, 1996; SWIFT *et al.*, 1996). Estas AHLs difundem através da membrana celular e acumulam-se no ambiente local (KAPLAN & GREENBERG, 1985). Em alta densidade populacional, uma concentração intracelular crítica é alcançada e cada AHL interage com sua proteína LuxR específica,

modificando-a para permitir sua ligação à promotores alvo e modular sua transcrição (FUQUA *et al.*, 1994; KLEEREBEZEM *et al.*, 1997; PEREGO & HOCH, 1996).

Apesar de todos os avanços no conhecimento da comunicação bacteriana mediada por AHLs, nossa compreensão destes mecanismos ainda é limitada. Atualmente, a lista de bactérias que utilizam este sistema é grande mas ainda está incompleta. Por exemplo, entre as espécies bacterianas capazes de associar-se com plantas encontra-se *Herbaspirillum seropedicae*. Até o momento, a existência de um sistema de controle da expressão gênica mediada por AHLs em *H. seropedicae* não foi investigada permanecendo, portanto, desconhecida.

O gênero *Herbaspirillum* foi primeiramente descrito como um grupo de bactérias possuindo uma única espécie, *Herbaspirillum seropedicae*. Esta bactéria é fixadora de nitrogênio, endofítica, microaerófila, gram-negativa e coloniza os tecidos de diversas espécies de plantas, predominantemente membros da família de gramíneas, sem produzir sintomas de doença nas plantas associadas (BODDEY *et al.*, 1995; BALDANI *et al.*, 1986; OLIVARES *et al.*, 1996). Tem sido proposto que a fixação de nitrogênio realizada por *H. seropedicae* pode contribuir para a nutrição em sistemas de gramíneas, sendo esta bactéria benéfica para o crescimento da planta (BODDEY *et al.*, 1995; BALDANI *et al.*, 1997).

Após estudos moleculares (análises de hibridização DNA-DNA e DNA-rRNA), o fitopatógeno *Pseudomonas rubrisubalbicans* foi transferido para o gênero *Herbaspirillum* (BALDANI *et al.*, 1996) quando então passou a ser identificado como *H. rubrisubalbicans*. Esta bactéria foi descrita como agente causador da doença estria mosqueada ('mottled stripe') em alguns cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (CRISTOPHER & EDGERTON, 1932) e mais tarde como causador da estria vermelha ("red stripe") em sorgo (*Sorghum bicolor*) (HALE & WILKIE, 1972).

No Brasil, estudos comparativos para avaliar a reação de variedades de cana-de-açúcar com graus contrastantes de sensibilidade à estria mosqueada inoculadas com diferentes estirpes de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* foram realizados por Olivares e colaboradores (1996). Os autores revelaram um padrão bem distinto de colonização em função da espécie de *Herbaspirillum* e do cultivar da planta. Quanto a

patogenicidade, apenas *H. rubrisubalbicans* foi capaz de provocar sintomas de doença na planta. A maior ou menor expressão das respostas de defesa dos cultivares sensíveis a *H. rubrisubalbicans* foram decorrentes da densidade de colonização, com as bactérias colonizando completamente o lúmen dos vasos em fases mais avançadas da doença. Os autores também sugerem que uma maior produção de exopolissacarídeos (EPS) e a formação de microcolônias encapsuladas em regiões de transição entre tecido com e sem sintomas podem estar envolvidas com o estabelecimento da interação patológica.

Aspectos como a infecção, colonização e o estabelecimento destas bactérias dentro da planta podem envolver um sistema de sensoriamento populacional modulado por AHLs e ainda não identificado no gênero *Herbaspirillum*. A detecção e caracterização de um sistema deste tipo em *H. seropedicae* seria de grande interesse para o conhecimento da ecologia microbiana visando aplicações biotecnológicas. Com este objetivo, neste trabalho são apresentados e discutidos os resultados obtidos na detecção de moléculas de *N*-acil homoserina lactona e na identificação e caracterização de genes envolvidos na síntese destas moléculas em *H. seropedicae*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Interação planta-microrganismo

Interações entre plantas e microrganismos têm causado grande efeito no desenvolvimento das civilizações desde que a humanidade começou a depender extensivamente de colheitas cultivadas para sua alimentação. Diversos microrganismos interagem com os tecidos e células das plantas com diferentes graus de dependência, podendo desenvolver interações patogênicas (STACEY *et al.*, 1992; SMITH & READ, 1996) ou benéficas (simbióticas ou não) (WELLER, 1988; KLOEPPER *et al.*, 1991; SMITH, 1992). No entanto, nenhuma das numerosas interações planta-microrganismo está completamente compreendida.

Entre as interações planta-microrganismo benéficas que têm sido estudadas em detalhes estão aquelas onde as bactérias estabelecem simbiose com a planta (STACEY *et al.*, 1992; SMITH & READ, 1996). Nas relações simbióticas os microrganismos fornecem nutrientes às plantas ou contribuem com atividades bioquímicas que faltam a planta. A planta, por sua vez, contribui com nutrientes gerados pelo processo fotossintético (GLENN & DILWORTH, 1985). Simbioses, da mesma forma que a maioria das interações patogênicas, são caracterizadas pela sua complexidade e especificidade (SMITH, 1992). Esses processos são de enorme importância para a produtividade global na agricultura e fornecem modelos para estudos fundamentais dos sistemas da planta e do microrganismo, tais como percepção do sinal e transdução, controle do ciclo celular e diferenciação celular.

O exemplo mais bem estudado de simbiose é a interação de rizóbio-leguminosas. O início da interação se dá pela troca de sinais e do reconhecimento da bactéria pela planta. Em seguida, o microrganismo adere aos pêlos radiculares que sofrem deformação, permitindo a invasão da planta pela bactéria (CALLAHAM & TORREY, 1981). Neste processo, a planta elabora uma nova estrutura morfo genética: o nódulo radicular. Um conjunto de genes localizados na planta hospedeira e na bactéria simbiote determina os vários estágios de desenvolvimento do nódulo (VAN

KAMMEN, 1984; SCHOLER *et al.*, 1997). No estágio final, a bactéria se diferencia em uma forma endossimbiótica denominada bacteróide (SCHLOTTER *et al.*, 1997). No interior do nódulo, ambiente rico em nutrientes e com tensão de oxigênio controlada, o bacterióide é capaz de reduzir o dinitrogênio atmosférico em amônia. Assim, as bactérias ao fornecerem amônia à planta, aumentam sua capacidade de crescer em solos pobres neste nutriente, e, em troca, recebem carboidratos (GLENN & DILWORTH, 1985). Espécies de rizóbios têm sido aplicadas comercialmente há muitos anos como biofertilizantes (KLOEPPER & BEAUCHAMP, 1992). Por alterar o balanço da microflora na rizosfera, associações simbióticas também podem ajudar a proteger as plantas de microrganismos patogênicos (WELLER, 1988).

Em contraste às leguminosas, gramíneas não formam estruturas simbióticas especializadas, tais como os nódulos de raízes formados pelas plantas e estimulados pelas rizobactérias. Entretanto, outras espécies de bactérias diazotróficas têm sido encontradas dentro dos tecidos de algumas gramíneas e algumas dessas plantas, como certas variedades de cana-de-açúcar, podem obter uma percentagem substancial dos seus requerimentos de nitrogênio a partir do dinitrogênio fixado pela bactéria (BODDEY, 1995).

Entre os organismos capazes de colonizar tecidos de diversas gramíneas de interesse econômico, dentre elas arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*), encontra-se o gênero *Herbaspirillum* (BALDANI *et al.*, 1996). Estes microrganismos possuem a habilidade de colonizar estas plantas, sendo isoladas do interior de raízes, hastes e folhas (OLIVARES *et al.*, 1996). A colonização de gramíneas por *Herbaspirillum* sp. ocorre através da adesão da bactéria à superfície da planta, seguida de proliferação preferencialmente nas raízes secundárias e ferimentos. Uma vez no interior da planta, os microrganismos podem espalhar-se e alcançar os tecidos aéreos, provavelmente via vasos do xilema (HUREK *et al.*, 1994; JAMES & OLIVARES, 1998; RONCATTO-MACCARI *et al.*, 2003).

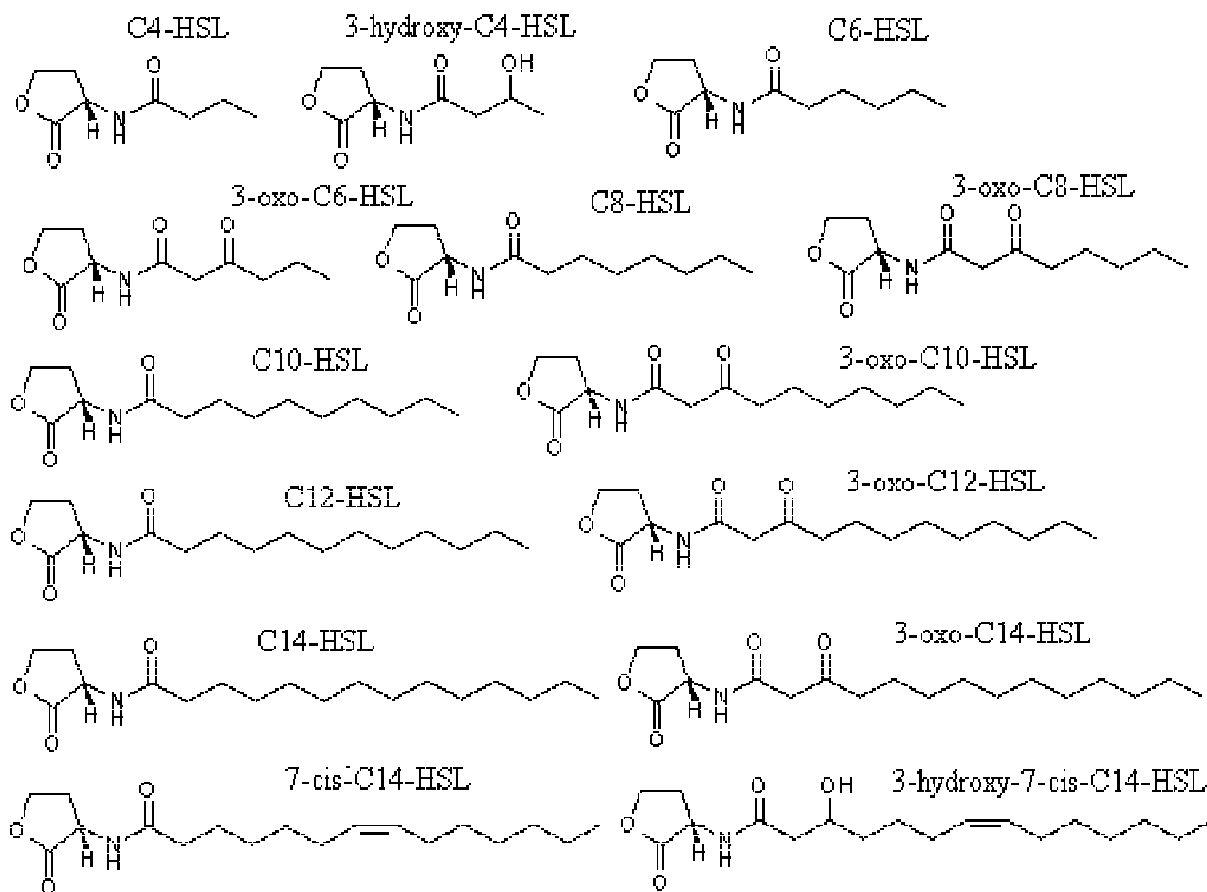
2.2. Sensoriamento populacional em bactérias

A expressão de genes responsáveis pelos mecanismos de infecção, competição e sobrevivência da bactéria no solo e na planta pode ser controlada por um sistema de comunicação bacteriana denominado sensoriamento populacional, autoindução ou regulação gênica em resposta à densidade populacional (NEALSON *et al.*, 1970; EBERHARD, 1972; FUQUA *et al.*, 1994; BRELLES-MARIÑO & BEDMAR, 2001). A comunicação ocorre através da produção, pela própria bactéria, de pequenas moléculas sinais capazes de atuar como autoindutores. Através do acúmulo de AHLs, a bactéria monitora sua própria população e também a população de outras bactérias em um dado ambiente.

Enquanto as bactérias gram positivas utilizam peptídeos modificados como moléculas sinalizadoras (SHAUDER *et al.*, 2001), a grande maioria de bactérias gram negativas utilizam *N*-acil homoserina lactonas (AHLs). As AHLs diferem no tamanho e composição da sua cadeia acil lateral *N*-ligada, o que fornece a especificidade do sinal. As cadeias acil variam de 4 a 14 átomos de carbono, podendo conter uma ou mais duplas ligações e um grupo carbonila ou hidroxila no terceiro carbono (Figura 1) (CÂMARA *et al.*, 1998).

As moléculas de AHLs são geralmente sintetizadas por proteínas homólogas a LuxI de *Vibrio fischeri*, foi a primeira enzima envolvida no sensoriamento populacional a ser identificada (EBERHARD *et al.*, 1991). As maiorias das enzimas posteriormente identificadas são homólogas a ela. Estas novas enzimas geram AHLs a partir de S-adenosilmetionina (SAM) (EBERHARD *et al.*, 1991; PARSEK *et al.*, 1999; VAL e CRONAN, 1998) e grupos acil derivados, preferencialmente, a partir da proteína carreadora de grupos acil (acil-ACP) (SCHAEFER *et al.*, 1996; MORÉ *et al.*, 1996) ou, da acil-coenzima A (acil-CoA) (PARSEK *et al.*, 1999). Assim, muitas delas podem produzir mais de uma AHL por utilizarem precursores alternativos das suas cadeias laterais.

FIGURA 1 – ESTRUTURAS DAS MOLÉCULAS DE N-ACIL HOMOSERINA LACTONAS



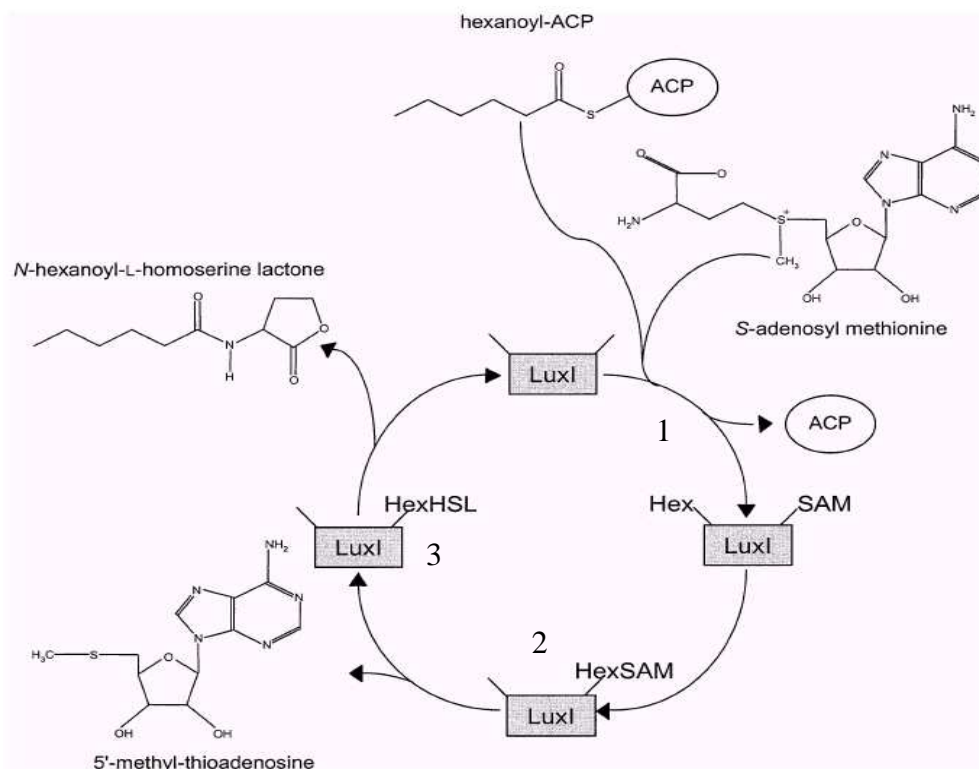
As moléculas de N-ácil homoserina lactonas contém um grupo acil, que pode variar de 4 a 14 átomos de carbono, ligado a um anel de lactona. O carbono 3 pode conter uma dupla ligação, um grupo hidroxila ou um grupo carbonila.

HSL: Homoserina lactona

FONTE: : www.nottingham.ac.uk/quorum/tabletis.htm

Após a elucidação dos substratos necessários à síntese biológica de AHLs (EBERHARD *et al.*, 1991; MORÉ *et al.*, 1996; SCHAUFER *et al.*, 1996), um modelo seqüencial para a síntese de AHLs pelos homólogos de LuxI foi proposto por Schaefer e colaboradores (1996). O modelo propõe que SAM liga-se ao sítio ativo da enzima e que o grupo acil é transferido para este complexo a partir da ACP. O grupo acil então forma uma ligação amida com o grupo amino da SAM, e em seguida ocorre a lactonização que resulta na síntese de AHL e do subproduto, 5'-metiltioadenosina. (Figura 2).

FIGURA 2 - MODELO PROPOSTO PARA SÍNTESE DE AHLs



SAM liga ao sítio ativo de LuxI, e o grupo hexanoil é transferido da ACP para o complexo LuxI-SAM. O grupo hexanoil forma uma ligação amida com o grupo amina da SAM. 5'-Metiltioadenosina é liberado, e a reação de lactonização resulta na síntese de AHL.

FONTE: SCHAEFER *et al.*, 1996.

Posteriormente, foram identificadas AHL sintases não relacionadas as seqüência das enzimas tipo LuxI, embora seja proposto que elas catalizem reações idênticas. Entre estas se incluem AinS (em *Vibrio fischeri*) (GILSON *et al.*, 1995) e LuxLM (em *Vibrio anguillarum*) (MILTON *et al.*, 2001). Recentemente, em *Pseudomonas fluorescens* F113 foi identificada a proteína HdtS, que apesar de não estar relacionada a membros das famílias LuxI, LuxLM e AinS, também é capaz de sintetizar AHLs (LAUE *et al.*, 2000).

AHLs atingem concentrações que permitem interações efetivas com reguladores transcricionais específicos, homólogos à proteína LuxR de *V. fischeri*. LuxR é um proteína de 250 aminoácidos pertencente a superfamília de fatores transcricionais que

contém o motivo hélice-volta-hélice nas suas regiões de ligação ao DNA (KAPLAN & GREENBERG, 1987).

O mapeamento das regiões funcionais de LuxR baseou-se originalmente numa série de experimentos que envolveram a deleção ou substituição de amino ácidos (SLOCK *et al.*, 1990). Tais estudos demonstraram que LuxR é um polipeptídeo modular, que consiste de dois domínios. A região N-terminal compreende o domínio de ligação de AHLs e o domínio regulatório, que na ausência de AHL interfere na atividade do domínio C-terminal. A região C-terminal contém o domínio de ligação ao DNA, responsável pela ativação da transcrição do *operon* da luminescência em *V. fischeri*. O alinhamento da seqüência de aminoácidos de LuxR com seus homólogos revelou baixa identidade (18-25%), sendo que, entre todos os homólogos de LuxR com dados de seqüências disponíveis, somente cinco resíduos são completamente conservados (Y80, D89, G134, E209 e G220) (WHITEHEAD *et al.*, 2001).

2.2.1. Sensoriamento populacional em *Vibrio fischeri*

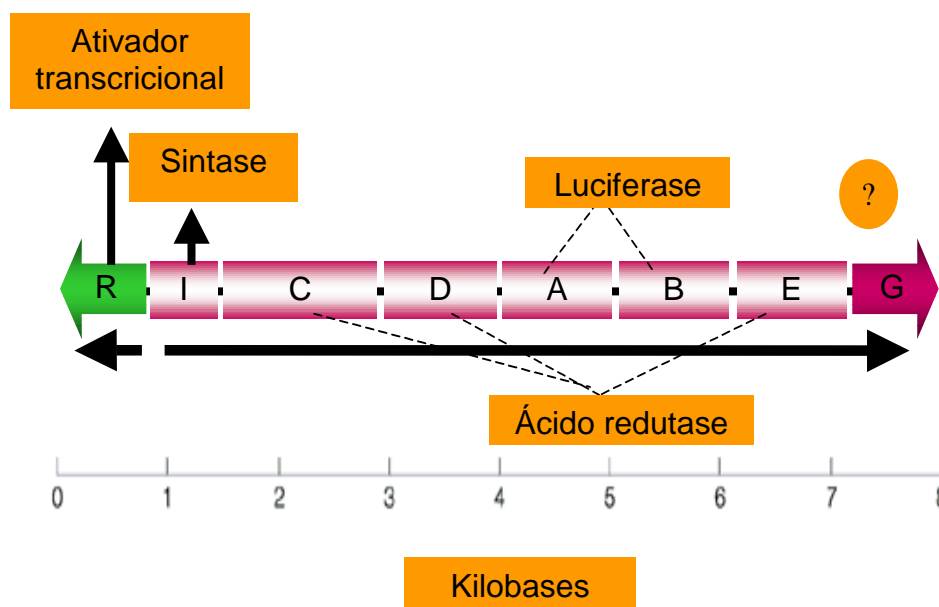
O primeiro sistema de sensoriamento populacional em bactérias gram-negativas foi descrito em *Vibrio (Photobacterium) fischeri*, por Nealson e colaboradores (1970), e é responsável pelo controle do fenótipo de bioluminescência deste microrganismo (EBERHARD *et al.*, 1981, CAO & MEIGHEN, 1989).

Esta bactéria estabelece relações simbióticas com algumas espécies de peixes marinhos e cefalópodes, ao colonizar uma cavidade especializada chamada de órgão de luz, localizado na parte inferior do animal. O resultado desta simbiose é a bioluminescência, característica utilizada por estas espécies para atrair suas presas ou para sua camuflagem. Em contrapartida, a população de *V. fischeri* recebe nutrientes do hospedeiro (GRAF & RUBY, 1998; VISICK & MCFALL-NGAI, 2000).

O conjunto de genes para bioluminescência de *V. fischeri* está composto por oito genes *lux* (*luxABCDE*, *luxG*, *luxI* e *luxR*) (Figura 3) (SWARTZMAN *et al.*, 1990). O gene *luxR* codifica um ativador transcricional dependente de AHL, que estimula a transcrição do *operon luxICDABEG*. O produto do gene *luxI* é uma AHL sintase. Os

produtos codificados pelos genes *luxC*, *D* e *E* formam um complexo multienzimático, responsável pela síntese do substrato para a reação da luciferase, um aldeído de cadeia longa (BOYLAN *et al.*, 1985). Os genes *luxA* e *B* codificam as duas subunidades da enzima luciferase, que tem como substrato riboflavina mononucleotídeo reduzida (FMNH₂) e, no decorrer da reação, oxigênio molecular. Os produtos da reação são longas cadeias de ácidos graxos, flavina mononucleotídeo (FMN) e água. A liberação simultânea do excesso de energia livre, evidente como luz verde-azulada, resulta no fenótipo associado com o microrganismo. O gene *luxG*, o último do operon, codifica uma provável flavina redutase (ZENNO & SAIGO, 1994) e é seguido por um sítio de terminação transcricional (SWARTZMAN *et al.*, 1990).

FIGURA 3 - ORGANIZAÇÃO DOS GENES *lux* EM *Vibrio fischeri*.



O operon *lux* contém *luxI* seguido de 5 genes que são necessários para a produção de luz (*luxCDABE*) (BOYLAN *et al.*, 1985) e um gene adicional, *luxG*, que codifica uma provável flavina redutase (ZENNO & SAIGO, 1994). O gene *luxR*, codifica o ativador de transcrição em sentido oposto aos operon *lux*.

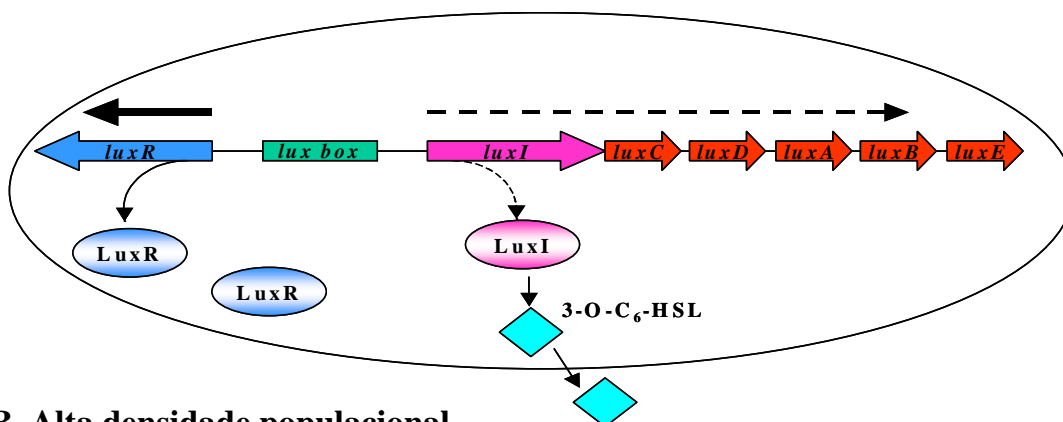
FONTE: FUQUA & GREENBERG, 2002.

A AHL sinalizadora que controla este fenótipo é *N*-(3-oxohexanoil)-*L*-homoserina lactona (OHHL), e é o produto da reação catalisada por LuxI

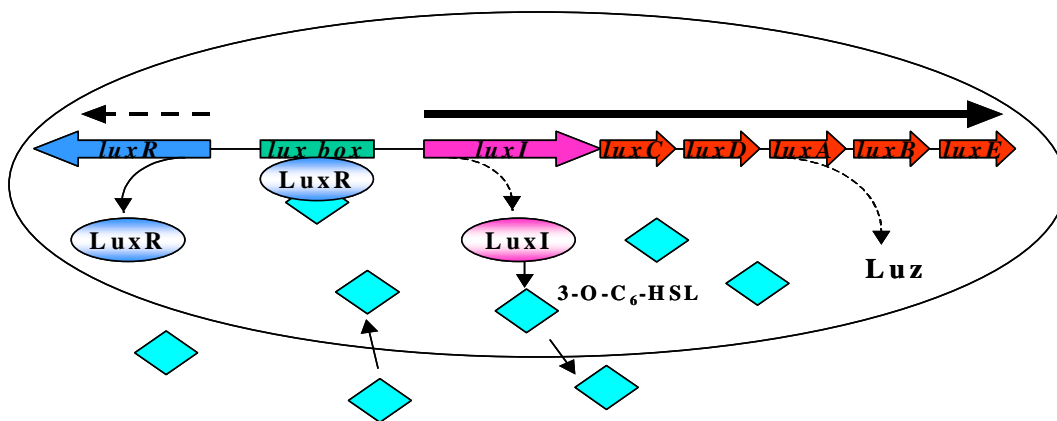
(EBERHARD *et al.*, 1981). Células de *V. fischeri* em baixas densidades populacionais expressam *luxICDABE* em níveis basais, e uma pequena quantidade de OHHL difunde para fora da célula (Figura 4A). Conforme a densidade populacional aumenta no confinamento do órgão do hospedeiro, a concentração de OHHL no ambiente e no interior da célula também aumenta. Ao atingir uma concentração crítica (10 nmol), indicativa de elevada densidade populacional da bactéria, OHHL liga-se a proteína LuxR, ativando-a (Figura 4B). Esta ativação é provavelmente decorrente de uma mudança conformacional induzida por OHHL (ENGEBRECHT & SILVERMAN, 1984). A transcrição dos genes *luxICDABE* é aumentada pela ligação do complexo LuxR-OHHL a uma região do DNA conhecida como *lux box*. Esta seqüência é composta por uma seqüência palindrômica de 20 pares de bases localizada 40 pares de base a montante do sítio de início de transcrição dos genes regulados por LuxR (EGLAND & GRENBERG, 1999). Entretanto, nem todos os genes regulados por LuxR-AHLs são precedidos por seqüências tipo *lux box* (WAGNER *et al.*, 2002).

FIGURA 4. REGULAÇÃO DA BIOLUMINESCÊNCIA EM *Vibrio fischeri*.

A. Baixa densidade populacional



B. Alta densidade populacional



A: Em baixa densidade populacional, a transcrição dos genes para bioluminescência é fraca e insuficiente para emissão de luz devido aos baixos níveis de OHHL. **B:** Em altas densidades populacionais, uma concentração crítica de OHHL é alcançada. OHHL liga a LuxR e estimula a transcrição de *luxICDABEG*, levando a uma rápida amplificação.

FONTE: Adaptado de WHITEHEAD *et al.*, 2001

2.2.2. Sensoriamento populacional em *Vibrio harveyi*

Bactérias da espécie *Vibrio harveyi* apresentam um sistema de sensoriamento populacional diferente daquele observado em *V. fischeri* e portanto, alternativo para bactérias gram-negativas. Neste microrganismo, existem dois sistemas de sensoriamento populacional independentes, cada qual sintetiza, detecta e responde a moléculas sinais específicas para controlar a bioluminescência. Um destes sinais, AI-1 (4-OH-C₄-HSL), é sintetizado por dois genes *luxL* e *luxM*, nenhum deles similar a *luxI* de *V. fischeri* (CAO & MEIGHEN, 1989; BASSLER *et al.*, 1993). O segundo autoindutor, AI-2, é um furanosil borato diéster, sintetizado pela proteína LuxS (BASSLER *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 2002). AI-1 e AI-2 são detectados pelas proteínas sensoras LuxN e LuxPQ, respectivamente (BASSLER *et al.*, 1993; FREEMAN *et al.*, 2000).

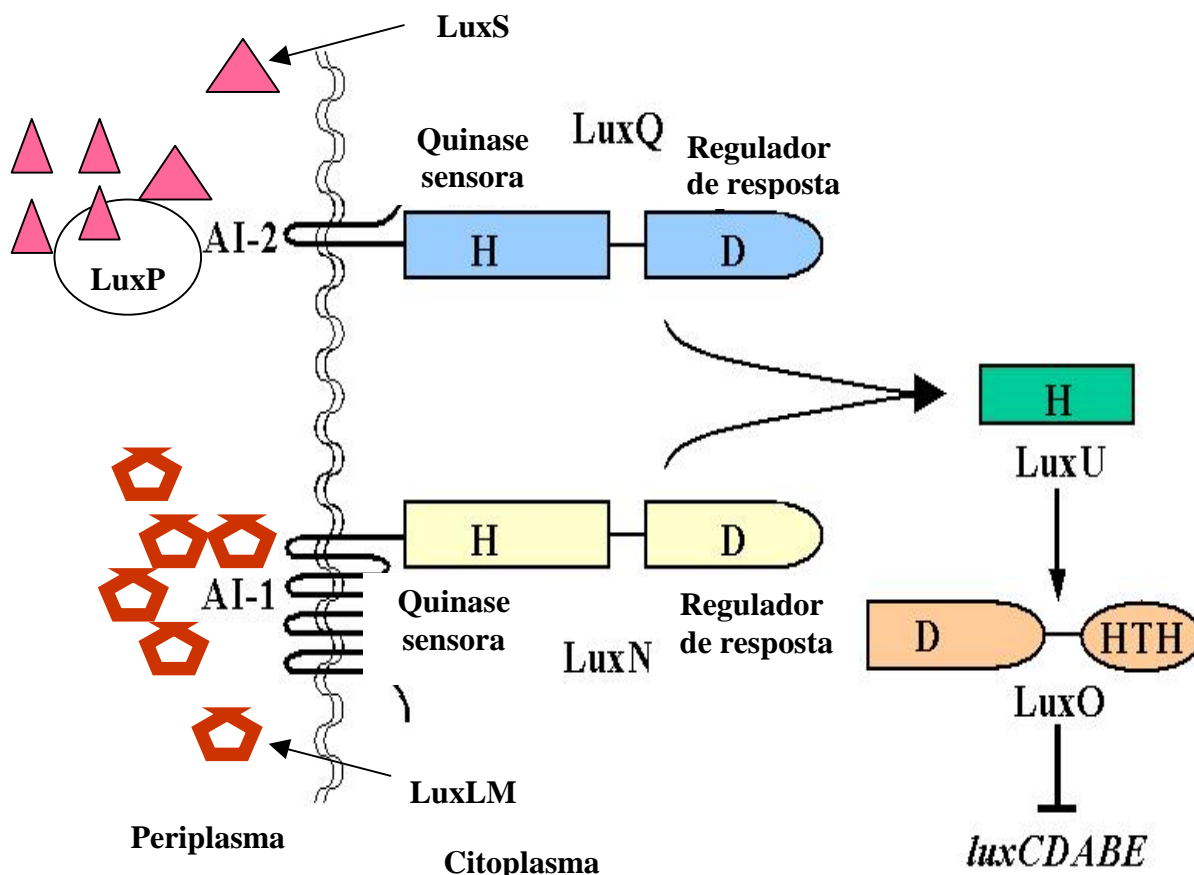
Ao contrário de *V. fischeri*, a transdução de sinal via AI-1 e AI-2 envolvem uma cascata de fosforilação (Figura 5) (BASSLER *et al.*, 1993). LuxP liga AI-2 no periplasma, o complexo LuxP-AI-2 interage com LuxQ para transdução do sinal (CHEN *et al.*, 2002). AI-1 interage diretamente com LuxN, que assim como LuxQ é uma proteína de membrana transdutora de sinal. LuxN e LuxQ são proteínas quinases sensoras híbridas do sistema regulatório de dois componentes, contendo domínios sensores periplasmáticos, histidina quinases citoplasmáticas e domínios regulatórios de resposta.

Em baixa densidade populacional, onde a concentração de AI-1 e AI-2 é baixa, as proteínas LuxN e LuxQ atuam como quinases e transferem fosfato a proteína LuxU (FREEMAN & BRASSLER, 1999). A proteína LuxU transfere o fosfato para a proteína reguladora de resposta LuxO (BASSLER *et al.*, 1994). Juntamente com o fator sigma σ^{54} , LuxO fosforilada ativa a expressão de um repressor “X”, ainda não identificado. Este repressor regula negativamente a expressão dos genes *luxCDABE*, impedindo a produção de luz em *V. harveyi* (LILLEY & BASSLER, 2000).

Em alta densidade populacional, os sensores LuxN e LuxPQ detectam seus respectivos indutores, AI-1 e AI-2, que convertem LuxN e LuxQ para fosfatases

(FREEMAN *et al.*, 2000). Conseqüentemente, a defosforilação de LuxO resulta na sua inativação. Inativo LuxO é incapaz de induzir a expressão do repressor “X”. Um ativador transcrricional, LuxR (não similar a outras proteína tipo LuxR) ativa a transcrição do promotor *luxCDABE*, e luz é produzida (MARTIN *et al.*, 1989).

FIGURA 5 - SENSORIAMENTO POPULACIONAL EM *Vibrio harvey*



O círculo aberto representa a proteína LuxP ligada a AI-2. Histidina (H) e Aspartato (D) são os resíduos fosforilados nas proteínas sinalizadoras. HTH representa a motivo hélice-volta-hélice.
 FONTE: Adaptado de BASSLER *et al.*, 2002.

A capacidade de monitorar o próprio aumento populacional, observada no gênero *Vibrio*, foi considerada por muitos anos exclusiva de poucos vibrios marinhos. No entanto, no início da década de 90 foram identificados sistemas regulatórios homólogos aos sistemas LuxRI de *V. fischeri*, em mais de 50 espécies de bactérias gram-negativas. Estes sistemas têm-se mostrado complexos e estão envolvidos na regulação de ampla variedade de funções celulares. A natureza de algumas das moléculas de AHLs já identificadas e o fenótipo dependente da densidade populacional que elas controlam estão apresentados no quadro 1.

QUADRO 1 – LISTA DE MICRORGANISMOS QUE CONTÉM GENES HOMÓLOGOS A *luxI* E *luxR* DE *V. fischeri*

BACTÉRIA	AHL	FENÓTIPO	REFERÊNCIA
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3-O-C8-HSL	Conjugação	FUQUA <i>et al.</i> , 1994; PIPER <i>et al.</i> , 1999
<i>Burkholderia cepacia</i>	C8-HSL	Protease, sideróforo	LEWENZA <i>et al.</i> 1999
<i>Chromobacterium violaceum</i>	C6-HSL	Antibióticos, violaceína, exoenzimas, cianida	MCCLEAN <i>et al.</i> , 1997; CHERNIN <i>et al.</i> , 1998
<i>Erwinia carotovora</i>	3-O-C6-HSL	Antibiótico, exoenzimas	BAINTON <i>et al.</i> , 1992; SWIFT <i>et al.</i> , 1993;
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	3-O-C6-HSL	Pectinases	NASSER <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3-O-C12-HSL	Exoenzimas, Xcp, formação de biofilme,	PASSADOR <i>et al.</i> , 1993; GLESSNER <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas aerofaciens</i>	C6-HSL	Antibiótico fenazina	PIERSON <i>et al.</i> , 1994; WOOD <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhizobium etli</i>	Desconhecida	Restrição do número de nódulos	GRAY <i>et al.</i> , 1996; ROSEMAYER <i>et al.</i> , 1999
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	3-OH-7- <i>cis</i> -C14-HSL	Nodulação, bacteriocina, sobrevivência na fase estacionária	GRAY 1997; RODELAS <i>et al.</i> , 1999; THORNE & WILLIAMS, 1999
<i>Vibrio anguillarum</i>	3-O-C10-HSL	Desconhecido	MILTON <i>et al.</i> , 1997
<i>Vibrio fischeri</i>	3-O-C6-HSL	Bioluminescência	NEALSON, 1970
<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	3-OH-C4-HSL ou um agonista	Virulência, lipase bacteriana	DUNPHY <i>et al.</i> , 1997
<i>Yersina enterocolitica</i>	C6-HSL	Desconhecido	THROUP <i>et al.</i> , 1995

A natureza de algumas das moléculas de AHLs já identificadas e o fenótipo que elas controlam em diferentes microrganismos são citados.

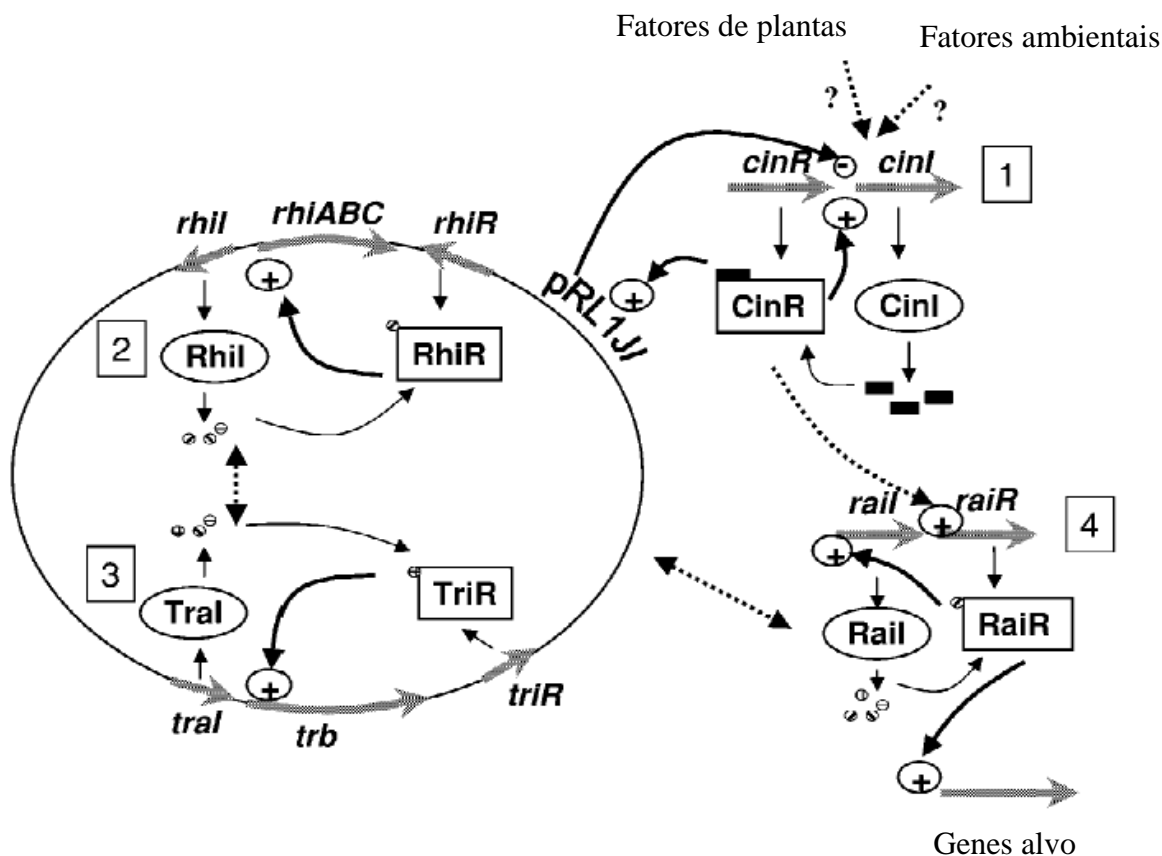
FONTE: www.nottingham.ac.uk/quorum/tabletis.htm

2.2.3. Sensoriamento populacional em *Rhizobium leguminosarum*

Em *Rhizobium leguminosarum*, diferentes AHLs são produzidas a partir de pelo menos quatro loci: *traI*, *rhiI*, *cinI*, *rail* (Figura 6) (CHA *et al.*, 1998). Dois destes loci, *traI* e *rhiI*, estão presentes no plasmídeo simbiótico pRL1JI. A proteína TraI produz diferentes AHLs que estão envolvidas no processo de transferência de plasmídeos (LITHGOW *et al.*, 2000), enquanto RhiI está envolvida na produção de AHLs que induzem a expressão de genes *rhiABC*, através da associação com o regulador RhiR (RODELAS *et al.*, 1999). Os genes *rhiABC* são importantes na nodulação das raízes, uma vez que mutações nestes genes diminuem o número de nódulos formados (CUBO *et al.*, 1992). A expressão de *rhiI* é dependente de *rhiR* e regulada positivamente por *N*-hexanoil-*L*-homoserina lactona (C₆-HSL), *N*-heptanoil-*L*-homoserina lactona (C₇-HSL) e *N*-octanoil-*L*-homoserina lactona (C₈-HSL), todas produzidas por RhiI (RODELAS *et al.*, 1999).

O gene *cinI* está presente no cromossomo e a sua expressão é regulada pelo produto do gene adjacente *cinR* (LITHGOW *et al.*, 2000). O produto do gene *cinI* é responsável pela síntese de *N*-(3-hidroxi-7-*cis*-tetradecenoil)-*L*-homoserina lactona (3-OH-7-*cis*-C₁₄-HSL). Esta AHL contém 14 átomos de carbono na sua cadeia acil lateral, e foi identificada originalmente como sendo uma bacteriocina (GRAY *et al.*, 1996). Acredita-se que esta AHL está envolvida na manutenção da viabilidade e adaptação celular bacteriana durante a fase estacionária de crescimento (GRAY *et al.*, 1996; SCHRIPSEMA *et al.*, 1996). O gene *rail* está localizado em um grande plasmídeo nativo e é responsável pela síntese de C₆-HSL, C₇-HSL, C₈-HSL e 3-OH-C₈-HSL (WISNIEWSKI-DYÉ & DOWNIE, 2002).

FIGURA 6 - SENSORIAMENTO POPULACIONAL EM *Rhizobium leguminosarum*.



(1) A proteína CinR induz a expressão do gene *cinI*, permitindo a síntese de 3-OH-C_{14:1}-HSL. Esta molécula junto com CinR ativa *cinI*. (2) 3-OH-C_{14:1}-HSL influencia a expressão do gene plasmidial *rhil*, que codifica uma AHL sintase. (3) A expressão de *tral*, também induzida por 3-OH-C_{14:1}-HSL, leva a produção de diferentes AHLs que juntas com o produto do gene *traR* permitem a expressão dos genes *tra*. (4) A proteína RaiI produz diferentes moléculas de AHLs. Os genes regulados por RaiR ainda não foram identificados.

○ ○ Indicam moléculas de AHLs

■ Indicam 3-OH-C₁₄-HSL

→ Indicam uma regulação já demonstrada.

◄.....► Indicam uma provável regulação.

.....► Indicam uma possível comunicação cruzada entre os sistemas regulatórios.

FONTE: WISNIEWSKI-DYÉ & DOWNIE, 2002.

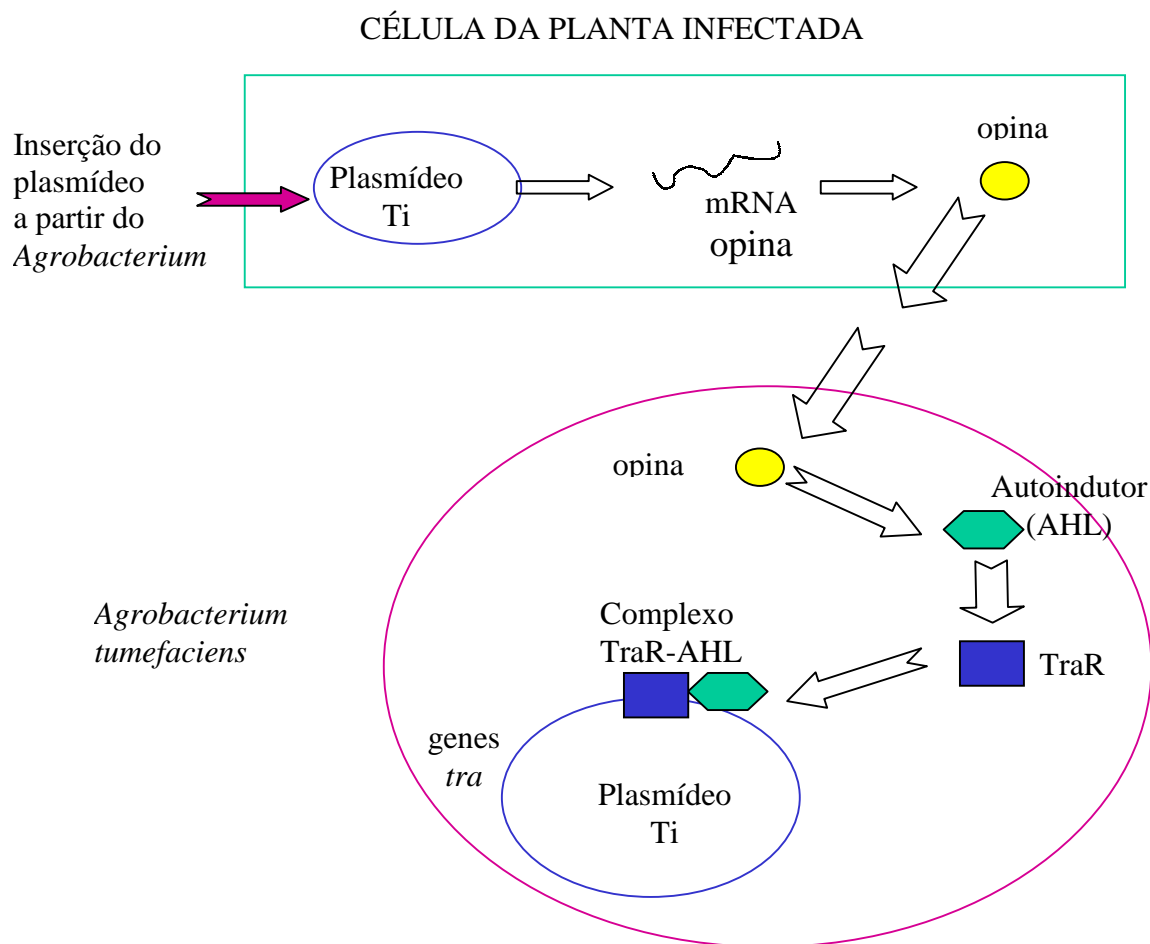
2.2.4. Sensoriamento populacional em *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens é um patógeno que induz a formação de galhas em plantas através da transferência de DNA para o núcleo do seu hospedeiro (JOOS *et al.*, 1983). O fragmento de DNA, conhecido como T-DNA (DNA-transferido), é parte de um plasmídeo Ti (indutor de galha) de *Agrobacterium* sp. Genes localizados no T-DNA são expressos nas células transformadas. Seus produtos são responsáveis pelo fenótipo da galha que consiste da proliferação celular descontrolada da planta e síntese de opinas. As opinas são moléculas análogas a aminoácidos que servem como fonte de carbono e nitrogênio para *Agrobacterium* (LIPPINCOTT *et al.*, 1973; NESTER & KOSUGE, 1981). Além disso, essas moléculas são sinais químicos que induzem a transferência conjugal de plasmídeos Ti para células de *Agrobacterium* que não contém este plasmídeo (HOOYAKAS & SCHILPEROORT, 1992). Os genes *vir* são necessários para transformação da planta e um grupo de genes *tra* facilitam a transferência interbacteriana do plasmídeo Ti (ALT-MÖRBE *et al.*, 1996; FARRAND *et al.*, 1996).

A transferência conjugal de plasmídeos Ti de células doadoras para células receptoras é controlada por dois tipos de mecanismos, um deles é produzido pela planta e o outro está associado com a bactéria (Figura 7). Em resumo, a regulação da conjugação de *Agrobacterium tumefaciens* é mediada da seguinte maneira: inicialmente, a bactéria infecta as células das plantas injetando o plasmídeo Ti e as células passam a produzir uma molécula conhecida como opina (PIPER *et al.*, 1993). A produção de opina e as enzimas requeridas para o seu transporte e metabolismo, são direcionadas pelo plasmídeo Ti. As moléculas de opina difundem-se ao redor das células e induzem estirpes de *A. tumefaciens* que são doadoras de plasmídeos Ti a produzirem um segundo sinal difusível, o fator de conjugação, que é uma OHHL sintetizada pelo produto do gene *traI* (HWANG *et al.*, 1994). OHHL liga-se ao regulador TraR que ativa os genes *tra* (PIPER *et al.*, 1993), assim como a expressão de genes *traI*, criando uma retroalimentação positiva. Existe um gene adicional, *traM*,

regulado positivamente por OHHL-TraR. A proteína TraM pode interagir com TraR para atuar como um antagonista do regulon *tra* (FUQUA *et al.*, 1995).

FIGURA 7. SENSORIAMENTO POPULACIONAL EM *Agrobacterium tumefaciens*



A bactéria infecta as células da planta injetando o plasmídeo Ti. As células da planta então produzem as moléculas de opina, que se difunde e, ao atingir *Agrobacterium*, induz a expressão do autoindutor (AHLs). O autoindutor liga-se a proteína ativadora TraR, alterando sua conformação e permitindo sua ligação a promotores presentes no regulon *tra*. Os genes *tra* são requeridos para a transferência conjugal do plasmídeo Ti.

Fonte: www.bio.cmu.edu

2.2.5. Sensoriamento populacional em *Pseudomonas aeruginosa*

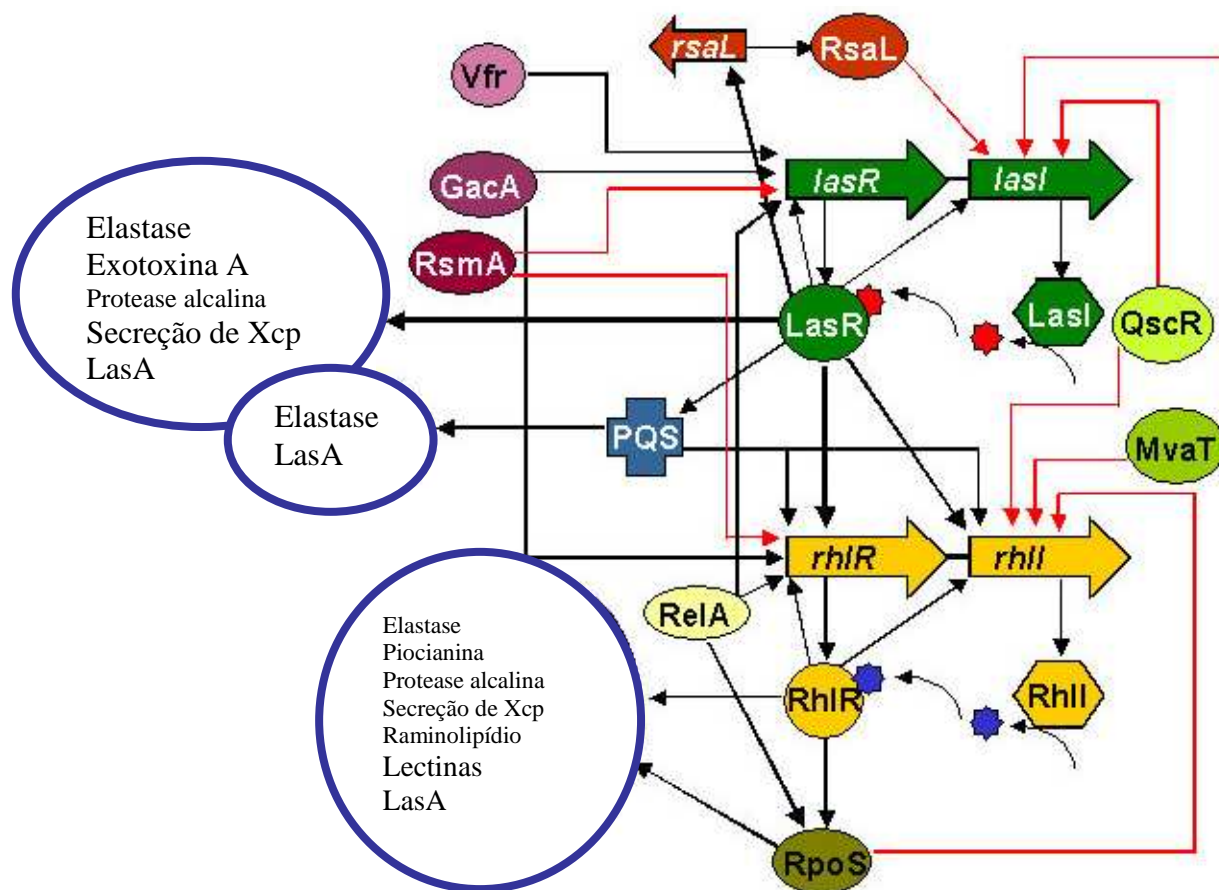
Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria altamente adaptável que pode colonizar o solo, águas, plantas e animais, incluindo humanos (DE KIEVIT & IGLEWSKI, 2000). A patogenicidade de *P. aeruginosa* baseia-se na sua habilidade de produzir e secretar diversos fatores de virulência extracelulares como proteases, hemolisinas, exotoxina A, exoenzima S e piocianina. Estes fatores são capazes de causar extensivo dano aos tecidos do hospedeiro (NECAS & IGLEWSKI, 1985; VAN DELDEN & IGLEWSKI, 1998). A regulação dos genes codificadores destes produtos depende de um sistema de sinalização que engloba pelo menos dois grupos de homólogos LuxRI, *las* e *rhl* (também referido como VsmRI). Estes sistemas estão interligados de maneira hierárquica, e o sistema *las* controla o sistema *rhl* em ambos os níveis: transcricional (PESCI *et al.*, 1997; LATIFI *et al.*, 1996) e traducional (PESCI *et al.*, 1997) (Figura 8).

O sistema *las* consiste de um regulador de transcrição, LasR, e sua molécula sinalizadora, *N*-(3-oxododecanoil) homoserina lactona (3O-C₁₂-HSL), sintetizada por uma AHL sintase, codificada pelo gene *lasI* (GAMBELLO & IGLEWSKI, 1991; PEARSON *et al.*, 1994). O sistema LasRI regula a expressão da elastase LasA, elastase LasB, exotoxina A e protease alcalina (PASSADOR *et al.*, 1993; TODER *et al.*, 1991).

O sistema *rhl* consiste da proteína RhlR e uma AHL sintase (RhlI), que está envolvida na produção de *N*-butiril homoserina lactona (C₄-HSL) (PEARSON *et al.*, 1994; WINSON *et al.*, 1995). Esta AHL interage com RhlR para ativar a expressão de *rhlAB*, um operon que codifica uma ramnosil-transferase necessária para a produção de ramnolipídeos surfactantes (OCHSNER *et al.*, 1994). A presença destes componentes reduz a tensão superficial que permite às células de *P. aeruginosa* deslizarem sobre superfícies semi-sólidas (KÖHLER *et al.*, 2000). Diversos resultados mostram que o sistema RhlRI é também necessário para indução da expressão de outros fatores, incluindo protease alcalina, piocianina, cianeto de hidrogênio, lectina e elastase (BRINT & OHMAN, 1995; PESSI & HAAS, 2000).

Latifi e colaboradores (1996) sugeriram que RhlR ativado pode ser capaz de ativar a transcrição de *rpoS* (codificador de σ^S , o fator sigma da fase estacionária).

FIGURA 8 - SENSORIAMENTO POPULACIONAL EM *P. aeruginosa*



O sensoriamento populacional em *P. aeruginosa* engloba pelo menos dois grupos de homólogos LuxRI, *las* e *rhl* (também referido como VsmRI). Estes sistemas estão interligados de maneira hierárquica, e o sistema *las* controla o sistema *rhl* em ambos os níveis: transcricional e traducional.

- ★ 3-O-C₁₂-HSL
- ★ C₄-HSL
- Regulação positiva
- (seta vermelha) Regulação negativa

FONTE: www.nottingham.ac.uk/quorum/tabletis.htm

Os sistemas Las e Rhl também são requeridos para a expressão de dois genes (*xcpP* e *xcpR*) que codificam componentes do sistema secretor Xcp de *P. aeruginosa* (CHAPON-HERVÉ *et al.*, 1997). O sistema secretor Xcp media a passagem de exoproteínas (tais como exotoxina A, elastase e fosfolipase) através da membrana do microrganismo (TOMMASSEN *et al.*, 1992). A vantagem deste sistema regulatório pe que as células de *P. aeruginosa* controlam a produção dos fatores virulentos para que este seja expresso somente em alta densidade populacional. isto impede que a bactéria alerte o hospedeiro da sua presença, impedindo a ativação de sistemas de defesa específicos.

Outros níveis de controle para estes sistemas também foram descritos. A proteína Vfr é homóloga a proteína de repressão catabólica (CRP) e capaz de ativar a expressão do gene *lasR* (ALBUS *et al.*, 1997). CHANCEY e colaboradores (1999) demonstraram que Vfr liga a uma seqüência consenso para CRP localizada a montante de *lasR*. Um sistema de dois componentes *gacA/gacS* também parece interagir com o sistema de sensoriamento populacional *rhlI/rhlR* (CHIN-A-WOENG *et al.*, 2001).

Pesci e colaboradores (1999) identificaram outra molécula sinalizadora no sobrenadante de culturas de *P. aeruginosa*. A síntese desta molécula, identificada como 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS), é dependente de LasR. A adição de PQS exógena induziu a expressão de *lasB* e *rhlI* e, em menor extensão, de *lasR* e *rhlR*, sugerindo portanto outra ligação entre os sistemas Las e Rhl (PESCI *et al.*, 1999; MCKNIGHT *et al.*, 2000). Populações de *P. aeruginosa* sintetizam PQS na fase estacionária de crescimento (MCKNIGHT *et al.*, 2000). MCKNIGHT e colaboradores (2000) têm sugerido que *P. aeruginosa* poderia usar PQS para regular a expressão de *rhlI* e, como consequência, os genes regulados pelo sistema *rhl* durante a fase estacionária de crescimento, como um meio de obter nutrientes pelo hospedeiro.

2.2.6. Sensoriamento populacional em *Herbaspirillum* sp

Bactérias do gênero *Herbaspirillum* pertencem à subdivisão β da classe das proteobactérias (YOUNG, 1992). O gênero compreende organismos endofíticos (BALDANI *et al.*, 1986) diazotróficos, ou seja, capazes de reduzir nitrogênio atmosférico à amônia, microaerófilo e gram-negativo. É proposto que *Herbaspirillum* contribui para a nutrição da planta através da fixação de nitrogênio e da liberação de fitohormônios (BODDEY *et al.*, 1995). Entre as espécies pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* encontram-se *H. seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986) e *H. rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1996).

H. seropedicae coloniza os tecidos de diversas espécies de plantas, predominantemente membros da família de gramíneas, sem produzir sintomas de doença nas plantas associadas (BALDANI *et al.*, 1986; BODDEY *et al.*, 1995; OLIVARES *et al.*, 1997). Porém, *H. rubrisubalbicans*, é causador da doença estria mosqueada (“mottled stripe”) em alguns cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (CRISTOPHER & EDGERTON, 1932) e da doença estria vermelha (“red stripe”) em alguns cultivares de sorgo (HALE & WILKIE, 1972). Até o momento, as bases moleculares para estas diferenças fenotípicas ainda não foram estabelecidas. Entretanto, similar a outras bactérias gram negativas que interagem com plantas, é possível que *Herbaspirillum* possa fazer uso de um sistema de sensoriamento populacional modulado por AHLs no controle destas características.

Resultados positivos na detecção e caracterização deste sistema regulatório em *Herbaspirillum* gerariam novas perspectivas para o conhecimento de estratégias que influenciam na competição e sobrevivência do organismo na planta, sendo de grande interesse na ecologia microbiana e em aplicações biotecnológicas.

3. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo detectar a produção de *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs), em *Herbaspirillum* spp identificar e caracterizar genes envolvidos na síntese destas moléculas em *Herbaspirillum seropedicae*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.1.1. detectar a produção de AHLs em *H. seropedicae*, *in vivo*, utilizando plasmídeos sensores de AHLs;
- 3.1.2. detectar a produção de AHLs em *H. seropedicae in vitro*;
- 3.1.3. identificar genes envolvidos na síntese de AHLs;
- 3.1.4. analisar os genes identificados e seus produtos;
- 3.1.5. mutagenizar o (s) gene(s) envolvido(s) na síntese de AHLs em *H. seropedicae*;
- 3.1.6. caracterizar o fenótipo dos mutantes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Bactérias e Plasmídeos

As estirpes de bactérias e plasmídeos utilizadas estão listados no quadro 2.

QUADRO 2. ESTIRPES DE BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	GENÓTIPO / FENÓTIPOS RELEVANTES	FONTE/REFERÊNCIA
<i>E. coli</i>		
DH10B	F <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15Δ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL nupG</i>	GRANT <i>et al.</i> , 1990
<i>H. seropedicae</i>		
SMR1	Sm ^R Nif+	SOUZA <i>et al.</i> , 1995
HRC54	Nal ^R Nif+	OLIVARES, F. L.
<i>H. rubrisubalbicans</i>		
HCC103	Nal ^R Nif+	OLIVARES, F. L.
M1	Nal ^R Nif+	OLIVARES, F. L.
M4	Nal ^R Nif+	OLIVARES, F. L.
<i>R. leguminosarum</i>		
8401	Sm ^R ; Estirpe selvagem, plasmídeo simbiótico ausente	pRL1J1 LAMB <i>et al.</i> , 1982
<i>A. tumefaciens</i>		
NT1(pNTLR4)	AHL negativo contendo fusão plasmidial <i>traG-lacZ</i>	CHA <i>et al.</i> , 1998
Plasmídeos		
pMP220	Tc ^R ; <i>lacZ</i> sem promotor	SPAINK <i>et al.</i> , 1987
pJBA-132	Tc ^R ; pME6031- <i>luxR</i> -P _{luxI} -RBSII- <i>gfp</i> (ASV)-T ₀ -T ₁	STEIDLE <i>et al.</i> , 2001
pAS-C8	Gm ^R ; pBBR1MCS-5-P _{cepI} - <i>gfp</i> (ASV)- <i>Plac-cepR</i> ;	STEIDLE <i>et al.</i> , 2001
pKR-C12	Gm ^R ; pBBR1MCS-5-P _{lasB} - <i>gfp</i> (ASV)- <i>Plac-lasR</i>	STEIDLE <i>et al.</i> , 2001
pIJ9280	<i>rail-lacZ</i> em pMP220	WISNIEWSKI-DYÉ <i>et al.</i> , 2001
pG09	Amp ^R , Fragmento de 1,3 kb de <i>H. seropedicae</i> clonado no sítio <i>SmaI</i> do plasmídeo vetor pUC18	Projeto GENOPAR
pG09.B6	Amp ^R , pG09(<i>hdtS</i> ::Tn)	Este trabalho

4.2. Meios de cultura

- O meio LB (SAMBROOK *et al.*, 1989) apresenta a seguinte composição:

Extrato de levedura	5,0 g/L
NaCl	10,0 g/L
Triptona	10,0 g/L

O pH foi corrigido para 7,0 com NaOH 1mol/L. O meio sólido foi obtido a partir da adição de ágar na concentração de 12g/L ao meio líquido e denominado LA.

- O meio Terrific Broth (SAMBROOK *et al.*, 1989) apresenta a seguinte composição:

Extrato de levedura	24,0 g/L
Glicerol	4,0 mL/L
Triptona	12,0 g/L

- O meio NFb (KLASSEN *et al.*, 1997) apresenta a seguinte composição:

	gramas/Litro
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻¹
NaCl	1,0 x 10 ⁻¹
CaCl ₂	2,0 x 10 ⁻²
Ácido nitrilo triacético	5,6 x 10 ⁻²
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻²
Malato	5,0
Biotina	1,0 x 10 ⁻⁴

Oligoelementos	gramas/Litro
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \times 10^{-3}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,35 \times 10^{-3}$
H_3BO_3	$2,8 \times 10^{-3}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$8,0 \times 10^{-5}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,4 \times 10^{-4}$

O meio foi esterilizado a 125 °C, 1,5 atmosfera por 20 minutos. No momento do uso, foram adicionados ao meio NFb, 20 mmol/L de NH_4Cl e 50 mL de solução estéril de fosfatos (159,7 g/L de KH_2PO_4 e 17,8 g/L de K_2HPO_4). Quando completo, o meio apresentou pH 6,8 e foi denominado de NFbHPN. O meios sólidos e semi-sólido foram obtidos pela adição de ágar 15 g/L e 1,75 g/L respectivamente, ao meio líquido

- O meio TY (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994) apresenta a seguinte composição:

Triptona	5,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,87 g
H_2O deionizada	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 6.8-7.2, e autoclavado a 125 °C e 1,5 atmosfera por 20 minutos. Para TY sólido, acrescentou-se 12 g de ágar por litro antes de autoclavar.

4.3. Antibióticos

Os antibióticos utilizados nos meios de cultivo foram: estreptomicina (Sm), tetraciclina (Tc), ácido nalidíxico (Nal), ampicilina (Amp) e gentamicina (Gm). As soluções estoque foram preparadas conforme descrito em Sambrook e colaboradores (1989). Os antibióticos foram adicionados aos meios de cultura nas concentrações necessárias para cada estirpe (Quadro 3).

QUADRO 3. CONCENTRAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS UTILIZADAS DURANTE O CULTIVO DOS MICRORGANISMOS

Estirpe	Antibiótico e Concentração final (µg/mL)
<i>H. seropedicae</i> SMR1	Sm ⁸⁰
<i>H. seropedicae</i> SMR1 (pIJ9280)	Sm ⁸⁰ e Tc ¹⁰
<i>H. seropedicae</i> SMR1 (pMP220)	Sm ⁸⁰ e Tc ¹⁰
<i>H. seropedicae</i> SMR1 (pJBA-132)	Sm ⁸⁰ e Gm ⁵⁰⁰
<i>H. seropedicae</i> SMR19 (pKR-C12)	Sm ⁸⁰ e Gm ⁵⁰⁰
<i>H. seropedicae</i> SMR1 (pAS-C8)	Sm ⁸⁰ e Gm ⁵⁰⁰
<i>H. rubrisubalbicans</i> HCC103	Nal ¹⁰
<i>H. rubrisubalbicans</i> M1	Nal ¹⁰
<i>H. rubrisubalbicans</i> M4	Nal ¹⁰
<i>R. leguminosarum</i> 8401	Sm ⁴⁰⁰
<i>A. tumefaciens</i> NT1 (pNTLR4)	Gm ⁴⁰
<i>E. coli</i> (pG09)	Amp ²⁵⁰
<i>E. coli</i> (pG09.B6)	Amp ²⁵⁰ e Tc ¹⁰

4.4. Condições de cultivo dos microrganismos

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB ou Terrific Broth a 37°C, sob agitação constante de 130 rpm, num período de 12 -24 horas. *H. seropedicae* foi cultivado em meio NFbHPN a 30° C, sob agitação constante de 130 rpm, num período de 16-24 horas. Para o estudo da influência da composição do meio de cultura na produção de AHLs por *H. seropedicae*, esta bactéria também foi cultivada em meio NFbHPN suplementado com 10% de LB ou em meio TY, a 30° C, sob agitação constante de 130 rpm, num período de 16-24 horas. As estirpes de *Rhizobium leguminosarum* e *Agrobacterium* sp foram cultivadas em meio TY a 28° C, sob agitação constante de 130 rpm, num período de 24-36 horas.

Em todos os cultivos foi mantida a relação de 1/5 entre o volume do meio e o volume total do frasco empregado, visando assim, garantir uma aeração ideal. O crescimento bacteriano foi monitorado a 600 nm usando um espectrofotômetro Pharmacia LKB- Ultrospec III.

4.5. Manutenção das estirpes bacterianas

As estirpes de *E. coli* foram mantidas viáveis a temperatura de -20°C em solução de glicerol 50%. Para o preparo dos pré-inóculos, alíquotas de 50-100 μL destas suspensões foram transferidas para meio líquido contendo antibióticos adequados e incubadas a 37°C durante 12-24 horas. As estirpes de *H. seropedicae* foram mantidas sob mesma condição ou em meio NFbHPN semi-sólido ou sólido à temperatura ambiente. As estirpes de *Rhizobium* e *Agrobacterium* foram mantidas em meio TY sólido à temperatura ambiente.

4.6. Minipreparação de plasmídeos

O isolamento de plasmídios de *E. coli* foi realizado pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). O isolamento de plasmídios de *H. seropedicae* foi realizado pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989) ou segundo método descrito por KADO & LIU, 1981.

4.7. Clivagem do DNA com enzimas de restrição

Amostras de DNA foram clivadas com 1-2 unidades de enzima de restrição em um volume final de reação de 25-100 μL , por 2-3 h a 37°C , utilizando-se o tampão mais adequado para a atividade da enzima, conforme indicado pelo fabricante. Ao sistema de restrição foi adicionado 1,0 μL de RNase (10 mg/mL). Após restrição, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese, corados com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e visualizados sob luz ultra violeta (SAMBROOK *et al.*, 1989).

4.8. Transformação bacteriana

A transformação bacteriana foi realizada por eletroporação.

4.8.1. Preparo de células eletrocompetentes

4.8.1.1. *Escherichia coli*

Um pré-inóculo foi preparado a partir da inoculação de uma colônia isolada de células de *E. coli* estirpe DH10B em 5 mL de meio LB. A incubação foi realizada a 37° C sob agitação de 130 rpm até a saturação da cultura. Após esta etapa, 500 µL do pré-inóculo foram utilizados como inóculo em 40 mL de meio LB, contidos em erlenmeyer estéril de 250 mL. Este inóculo foi incubado a 37° C sob agitação constante de 130 rpm até atingir $D.O_{600} \cong 0,5$. Em seguida, a cultura foi transferida para tubos plásticos de 40 mL, previamente resfriados em gelo, e centrifugada a 5.000 rpm a 4° C por 5 minutos em rotor Hitachi nº 23. As células foram lavadas duas vezes, por ressuspensão em 40 mL de água MilliQ estéril gelada (0° a 4° C) e posterior centrifugação. Uma terceira lavagem foi realizada pela ressuspensão do precipitado em 30 mL de glicerol 10% gelado (0° a 4° C) e centrifugação a 5.000 rpm a 4° C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão no glicerol remanescente (± 1 mL). As células aliqüotadas em volumes de 20 µL foram armazenadas a -70° C.

4.8.1.2. *Herbaspirillum seropedicae*

O preparo de células eletrocompetentes de *H. seropedicae* foi igual ao descrito para *E. coli*, exceto que:

1. o meio de cultivo utilizado em todas as etapas foi NFbHPN,
2. a incubação foi realizada a 30° C sob agitação de 130 rpm até a saturação da cultura ou até atingir $D.O_{600} \cong 0,8$
3. As células foram utilizadas no momento do preparo.

4.8.2. Eletroporação

4.8.2.1. *Escherichia coli*

Uma alíquota contendo 0,5-2 μL do DNA plasmidial de interesse foi adicionada a 20-40 μL da suspensão de células eletrocompetentes de *E. coli* (item 4.8.1.1). Essas células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação e submetidas a um campo elétrico de 4kV, 200 Ω , 330 μF a fim de permitir a entrada do plasmídeo na célula. Após a eletroporação, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio LB, transferidas para frascos de cultura de 10 mL e incubadas em estufa a 37° C durante 30 minutos. Alíquotas de 50-100 μL deste material foram plaqueadas em meio LA contendo antibióticos requeridos para seleção dos transformantes.

4.8.2.2. *Herbaspirillum seropedicae*

Uma alíquota contendo 0,5-2 μL do DNA plasmidial de interesse foi adicionada a 20-40 μL da suspensão de células eletrocompetentes de *H. seropedicae* (item 4.8.1.2). Essas células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação e submetidas a um campo elétrico de 2,8kV, 200 Ω , 330 μF , a fim de permitir a entrada do plasmídeo na célula. Após a eletroporação, as células foram ressuspensas em 2 mL de meio NFbHPN líquido, transferidas para frascos de cultura de 10 mL e incubadas em estufa a 30° C durante 12 horas. Alíquotas de 50-100 μL deste material foram plaqueadas em meio NFbHPN sólido contendo os antibióticos requeridos para seleção dos transformantes.

4.9. Detecção de AHLs

A produção de moléculas de AHLs em *H. seropedicae* foi detectada com a ajuda de 4 plasmídeos sensores. Esses plasmídeos contêm promotores de diferentes microrganismos, todos sensíveis a uma ampla faixa de AHLs, fusionados aos genes da proteína verde-fluorescente (*gfp*) ou da β -galactosidase (*lacZ*) (quadro 2).

4.9.1. Detecção por Microscopia de fluorescência

A emissão da fluorescência da proteína GFP de culturas da fase estacionária (após 24-30 horas de crescimento) de *H. seropedicae* carregando os plasmídeos sensores pASC-8, pKRC-12 ou pJBA132 (quadro 2) foi monitorada em microscópio ZEISS Axiophot. O grupo de filtros utilizado para microscopia fluorescente consistiu de uma banda de excitação de 450-490 nm e um filtro supressor a 520 nm.

4.9.2. Detecção por medidas da atividade de β -galactosidase em meio sólido

A atividade de β -galactosidase foi monitorada em meio sólido. Células de *H. seropedicae* SMR1 carregando os plasmídeos (1) pMP220 ou (2) pIJ9280 foram crescidas em meio TY sólido contendo 30 $\mu\text{g/mL}$ de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal). Após 24 horas em estufa a 30° C, a atividade de β -galactosidase foi detectada pela presença da coloração azul no meio.

4.9.3. Detecção por medidas da atividade de β -galactosidase em meio líquido

A atividade de β -galactosidase foi monitorada em meio líquido. Alíquotas de 100 μL de culturas de *H. seropedicae* SMR1 carregando os plasmídeos pMP220 (controle) ou pIJ9280 foram coletadas após diferentes tempos de incubação e transferidas para tubos de plástico de 2 mL. A cada tubo foram adicionados 900 μL de tampão Z (60 mmol/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 40 mmol/L de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 mmol/L de KCl, 1 mmol/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 50 mmol/L de β -mercaptoetanol e 0,0027% (p/v) de SDS. Após a adição de 20 μL de clorofórmio, o sistema foi homogenizado e incubado a 30° C por 5 minutos. As reações foram iniciadas pela adição escalonada de 200 μL de solução de *o*-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) (4 mg/mL) seguida de incubação a 30° C até o aparecimento da coloração amarela (20-30 minutos). As reações foram interrompidas pela adição de 500 μL de Na_2CO_3 (1

mol/L). A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 13.0000 rpm e a leitura foi realizada em 420 nm em espectrofotômetro (Pharmacia LKB-Ultrospec III).

A atividade de β -galactosidase foi expressa em nmol de ONPG produzido por minuto por miligrama de proteína total calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Atividade específica} = (\text{D.O.}_{420} \times 428) / T \times V \times [\text{proteína}]$$

Sendo, D.O._{420} a absorvância da mistura de reação a 420 nm. O valor de 428 é um fator obtido a partir o coeficiente de absorvância para o *o*-nitrofenol ($3973 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (BEMILLER et al., 1993), do volume da reação de 1,7 mL e o caminho óptico de 1 cm. T corresponde ao tempo da reação em minutos e V, ao volume de cultura utilizado no ensaio (0,1 mL). [proteína] é a concentração de proteína determinada em mg/ mL.

4.9.4. Detecção de AHLs por Cromatografia em camada delgada (TLC)

4.9.4.1. Extração de AHLs

As moléculas de AHLs foram extraídas segundo Steidle e colaboradores (2001). Células de *R. leguminosarum* estirpes 8401 e A789 foram cultivadas em 100 mL de meio TY até uma densidade óptica a 600 nm de 0,7-1,0. Células de *H. seropedicae* SMR1 foram cultivadas em 200 mL de meio NFbHP até uma densidade óptica a 600 nm de 1,2. As células foram removidas por centrifugação (5000 g durante 10 minutos) e as moléculas de AHLs presentes no sobrenadante foram extraídas com clorofórmio:metanol (97,5:2,5 v/v) na proporção de solvente:sobrenadante de 10:100 v/v. Após três etapas consecutivas de extração, o solvente foi evaporado sob fluxo contínuo de ar em capela. Os extratos foram ressuspensos em 100 μL de acetato de etila e utilizados nas análises por TLC.

4.9.4.2. Cromatografia em camada delgada (TLC)

AHLs foram analisadas por TLC segundo Shaw e colaboradores (1996) usando *A. tumefaciens* NT1/pNTLR4 (CHA *et al.*,1998) como estirpe sensora. Extratos do sobrenadante das culturas foram aplicados em placas de TLC de Fase Reversa (RP18) (Merck). O volume de aplicação variou de 3-10 μL para os extratos de *R. leguminosarum* e de 10-30 μL para os extratos de *H. seropedicae*. As amostras foram separadas utilizando 60% (v/v) de metanol em água como fase móvel. A placa foi removida do tanque cromatográfico no momento em que o solvente atingiu 2 cm do topo e seca sob fluxo contínuo de ar em capela por 15 minutos. A visualização das AHLs foi realizada pela sobreposição das placas de TLC com uma fina camada de meio sólido TY contendo 40 $\mu\text{g/mL}$ de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo (X-Gal) e semeado com a estirpe sensora *A. tumefaciens* NT1/pNTLR4 (CHA *et al.*,1998).

4.9.5. Detecção de AHLs nos prováveis mutantes

A detecção de AHLs nos prováveis mutantes ATmut1 a ATmut15 foi realizada através de cromatografia em camada delgada como descrito acima (item 4.9.2).

4.10. Curva de crescimento

O crescimento populacional de *H. seropedicae* SMR1 foi acompanhado pela medida da densidade óptica em 600 nm. Inicialmente, 1 mL de um pré-inóculo, preparado como descrito em 4.8.1.1, foi utilizado como inóculo em 100 mL de meio NFbHP contidos em erlenmeyer estéril. A cultura resultante foi subdividido em 20 alíquotas de 4 mL, adicionados a frascos de vidro de 20 mL devidamente identificados e incubados a 30° C sob agitação constante de 130 rpm. A cada duas horas dois frascos eram removidos e tinham a densidade óptica da cultura determinada em

espectrofotômetro (Pharmacia LKB-Ultrospec III), os quais eram descartados após a leitura. O crescimento populacional foi acompanhado durante 13 horas.

4.11. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas das amostras de *H. seropedicae* foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). Células foram lisadas pela adição de 100 μ L de NaOH 1 mol/L a 100 μ L de cultura. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, adicionou-se 1 mL de solução contendo: 1 mL de sulfato de cobre 2% (p/v), 1 mL de tartarato de potássio 4% (p/v) e 98 mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L dissolvido em bicarbonato de sódio 2% (p/v). A mistura foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 μ L do reagente de Folin (Laborclin) 1 mol/L sob agitação constante em vortex e a leitura foi realizada após 15 minutos em espectrofotômetro a 660 nm. Uma curva padrão foi construída a partir de uma solução estoque de albumina de soro bovino 1 mg/mL.

4.12. Busca de genes envolvidos na síntese de AHLs em *Herbaspirillum seropedicae*

A busca de genes envolvidos na síntese de AHLs foi realizada através de pesquisa em um banco de dados desenvolvido pelo projeto genoma de *H. seropedicae* estirpe SMR1 (nfn.genopar.org). Para a construção deste banco de dados, as seqüências de nucleotídeos obtidas a partir de uma biblioteca genômica de *H. seropedicae* são traduzidas e analisadas pelo programa BlastX quanto ao grau de similaridade com seqüências de proteínas de diferentes microrganismos depositadas no banco de dados GenBank.

Atualmente, são conhecidas quatro famílias de proteínas com capacidade de dirigir a síntese de moléculas de AHLs em bactérias gram negativas. A mais comum e utilizada pela maioria das bactérias que sintetizam AHLs é uma enzima do tipo LuxI. Porém, algumas bactérias possuem AHLs sintases que não estão relacionadas com a seqüência das enzimas tipo LuxI. Estas incluem LuxLM, AinS e HdtS. Assim, na

busca de genes que possam dirigir a síntese de AHLs em *H. seropedicae*, as palavras chave utilizadas foram:

- *luxI* e seus homólogos: *ahyI*, *asaI*, *traI*, *cepI*, *cviI*, *eagI*, *expI*, *echI*, *sdiA*, *oprI*, *esaI*, *lasI*, *rhlI*, *phzI*, *pzyI*, *soll*, *rail*, *cerI*, *swrI*, *vanI*, *yenI*, *ypeI*, *ypsI*, *ytbI*, *yukI*;
- *luxLM*;
- *ainS*;
- *hdts* e
- homoserina lactona.

4.13. Análise das seqüências de nucleotídeos do provável gene envolvido na síntese de AHLs em *Herbaspirillum seropedicae*

As seqüências de nucleotídeos selecionadas do banco de seqüências do projeto genoma de *H. seropedicae*, foram analisadas quanto à presença de prováveis regiões codificadoras de proteínas (ORFs) pelo programa ORF finder (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi). As seqüências de nucleotídeos foram traduzidas e alinhadas com a seqüência de aminoácidos de proteínas similares depositadas no banco de dados GenBank pelo programa BlastP (ALTSCHUL *et al.*, 1997). As seqüências de interesse foram alinhadas pelo programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1997). A presença de prováveis regiões codificadoras de proteínas (ORFs) foi analisada pelo programa FramePlot 2.3.2 (ISHIKAWA & HOTTA, 1999). Prováveis promotores, sítios de ligação de ribossomo, sítios operadores e terminadores de transcrição foram identificados visualmente, utilizando seqüências consenso descritas na literatura.

4.14. Análise topológica de proteínas

A seqüência de aminoácidos das proteínas de interesse foram analisadas pelo programa ORF finder quanto à presença de domínios conservados (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi). O perfil de hidrofobicidade destas proteínas foi analisado pelo programa TMPRED (HOFMANN & STOFFEL, 1993). As estruturas secundárias de regiões transmembrana foram previstas pelos programas TMpred, TMHMM (SONNHAMMER *et al.*, 1998) e SOSUI (HIROKAWA *et al.*, 1998). A presença de peptídeo sinal foi analisada pelos programas TMpred e SOSUI e SignalP V 1.1 (NIELSEN *et al.*, 1997).

4.15. Seleção de clones contendo genes envolvidos na síntese de AHLs para construção de mutantes

Baseados nos resultados de similaridade apontados na pesquisa acima (4.12) e análise dos clones presentes no banco de genes do projeto genoma de *H. seropedicae*, o clone HS05-HM-019.G09 foi selecionado para construção de uma estirpe mutante. Este clone contém um inserto de aproximadamente 1,2 kb do DNA cromossomal de *H. seropedicae* clonado no plasmídeo vetor pUC18. Neste trabalho, o plasmídeo HS05-HM-019.G09 foi denominado pG09.

4.16. Sequenciamento de DNA

O seqüenciamento de DNA foi utilizado para confirmação: 1) da presença dos genes de interesse nos plasmídeos selecionados no banco de genes de *H. seropedicae* e 2) das regiões de inserção do transposon no DNA alvo. As amostras de DNA plasmidial foram sequenciadas pelo método de terminação de cadeia por didesoxiribonucleotídeos (SANGER *et al.*, 1977), em Sequenciador Automático de DNA Modelo 377 da ABI PRISM utilizando-se o kit DYEnamic ET (Amersham Biosciences).

4.17. Mutagênese

O DNA plasmidial pG09 foi isolado (4.6.1) e submetido à inserção aleatória *in vitro* de um transposon resistente a tetraciclina através do kit de mutagênese EZ::TNTM<TET-1>, segundo orientações do fabricante (EPICENTRE reagents & Kits for Genomics, Proteomics and RNA Research). A seleção dos plasmídeos contendo o transposon foi realizada em células de *E. coli* DH10B cultivadas em meio sólido LA contendo 10 µg/mL de tetraciclina.

A mutagênese foi realizada por inativação, através de recombinação homóloga com do DNA cromossomal de *H. seropedicae* com o plasmídeo pG09.B6 (*hdtS*::Tn). Para tal, este plasmídeo foi transferido para *H. seropedicae* SMR1 através de eletroporação (item 4.8.2.2), e a seleção dos clones de interesse foi realizada pela resistência à tetraciclina conferida pelo transposon inserido no cromossoma de *H. seropedicae* SMR1, em meio NFbHPN contendo 10µg/mL do antibiótico.

4.18. Purificação de DNA cromossomal de *Herbaspirillum seropedicae*

Alíquotas de 3,0 mL de uma cultura saturada de células de *H. seropedicae* foram centrifugadas por 1 minuto a 13.000 rpm em centrífuga. Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 500 µL de tampão TES (50 mmol/L de

Tris-HCl pH 8,0; 20 mmol/L de EDTA pH 8,0 e 200 mmol/L de NaCl). Em seguida, as células foram tratadas com 100 µg/mL de lisozima durante 1 hora a 30° C. Após este período, foram adicionados 50 µL de SDS 10% e incubados a 60° C por 30 minutos. Ao lisado celular, foram acrescentados 200 µg/mL de pronase E, seguido de incubação a 37° C durante 24 horas. A desproteínização foi realizada pela adição de 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico em 3 etapas subsequentes. O DNA foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol 95% e incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação a 13.000 rpm por 20 minutos, o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80%. O precipitado foi seco em bomba de vácuo e ressuspenso em água ultrapura suficiente para a sua solubilização (aproximadamente 200 µL).

4.19. Hibridização de DNA

A confirmação da inserção e da localização do transposon no DNA cromossomal de *H. seropedicae* foi realizada por hibridização. O DNA total das prováveis estirpes mutantes foi isolado como descrito acima, digerido com enzimas de restrição e submetido a ensaios de hibridização. O DNA-sonda utilizado foi o plasmídeo pG09.B6. Esta análise permitiu verificar se a inserção no DNA cromossomal ocorreu por simples ou dupla permuta.

4.19.1. Transferência de DNA

Amostras do DNA cromossomal da estirpe selvagem SMR1, dos prováveis mutantes e o DNA do plasmídeo pG09.B6 foram digeridas com a endonuclease de restrição *NruI* e submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,7%) em tampão TBE. Os fragmentos de DNA foram transferidos por capilaridade ou a vácuo (utilizando o sistema VacuGeneTMXL da Amersham Pharmacia Biotech) para uma membrana de nylon HybondTM-N+ (Amersham Pharmacia Biotech). O gel foi tratado sucessivamente com a solução de depurinização (0,25 mol/L de HCl) por 10 minutos,

com a solução de desnaturação (1,5 mol/L de NaCl e 0,5 mol/L de NaOH) por 15 minutos, com a solução de neutralização (1 mol/L de Tris pH 7,5 e 1,5 mol/L de NaCl) por 15 minutos e finalmente com a solução de transferência SSC 20X (3 mol/L de NaCl e 0,3 mol/L de citrato trissódico pH 7,2) por 20 minutos. O DNA foi fixado à membrana por exposição à luz ultravioleta (312 nm) por 5 minutos.

4.19.2. Pré-hibridização

Visando impedir a adsorção inespecífica da sonda à membrana, esta foi submetida a uma pré-hibridização por 15 minutos à 65°C com solução bloqueadora contendo SDS 5% de tampão fosfato 0,5 M e 200 ng/mL de DNA de esperma de salmão (Sigma Chemical Company) sonificado e desnaturado por 4 horas a 60° C.

4.19.3. Marcação da sonda

O DNA sonda utilizado para confirmar a inserção do *hdtS::Tn* no cromossoma da estirpe SMR1 de *H. seropedicae* foi o plasmídeo pG09.B6 clivado com a enzima de restrição *NruI* e marcado radioativamente com [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP. A marcação foi realizada como descrita por Sambrook e colaboradores (1989). Cerca de 40 ng do DNA sonda foi desnaturado em banho de água a 100° C durante 5 minutos e mantido em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 5 μL de tampão OLB (250 nmol/L de Tris-HCl – pH 8,0; 25 mmol/L de MgCl_2 , 5 mmol/L de β -mercaptoetanol, 1 mol/L de HEPES, 2 mmol/L dos dNTPs: dATP, dGTP, dTTP e dCTP e 1 mg/mL de oligonucleotídeos), 1 μL de BSA 10 mg/mL, 2 μL de [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$) e 2,5U de fragmento Klenow da DNA polimerase num volume final de 25 μL . O sistema foi incubado por 12 horas a 30° C.

4.19.4. Hibridização

O DNA-sonda marcado com $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ foi desnaturado por aquecimento (95-100°C por 5 minutos), imediatamente resfriado em banho de gelo e adicionado à membrana pré-hibridizada. A mistura de hibridização foi então incubada durante 24 horas a 65°C, com agitação contínua (0,5-1 rpm). Passado este período, a membrana foi lavada em condição de alta estringência [SSC 0,1 X, SDS 0,1% (p/v) a 65°C por 30 minutos] e visualizada com Molecular Dynamics PhosphoImager (Amersham Biosciences).

4.20. Amplificação do DNA cromossomal dos prováveis mutantes

A amplificação do DNA foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (KOCHER & WILSON, 1991). Para tal, o sistema de reação continha aproximadamente 10 ng de DNA cromossomal da série de mutantes (item 4.18), tampão de PCR 1 x (20 mmol/L de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mmol de KCl), 0,2 mmol/L de dNTPS, 10 pmol de cada primer “Forward” e “Reverso” (EPICENTRE reagents & Kits for Genomics, Proteomics and RNA Research), 1,5 mmol/L de MgCl_2 , 1,0 μL de *Taq* DNA polimerase (purificada no Laboratório de Fixação de Nitrogênio - UFPR) e água ultrapura q.s.p. para 25 μL . Este sistema foi submetido a uma reação de PCR que consistia dos seguintes passos: 1 ciclo de 94° C por 2 minutos e 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos e 72° C por 1,5 minuto.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A detecção de AHL em diversos organismos é frequentemente realizada através da utilização de plasmídeos que contêm promotores sensores de AHL fusionados aos genes repórter *gfp* ou *lacZ* (SHAW *et al.*, 1997; MCCLEAN *et al.*, 1997; ANDERSEN *et al.*, 2001). Por responderem a uma ampla faixa de AHLs e permitirem a rápida triagem dos microrganismos, quatro destes sensores, pKR-C12, pAS-C8, pJBA132 e pIJ9280 (Quadro 2), foram utilizados na detecção de AHLs em *H. seropedicae*. O uso de vários sensores é indicado por permitir a detecção de moléculas com diferentes tamanhos e características estruturais.

O plasmídeo sensor pKR-C12 contém uma fusão traducional do gene *lasB* de *Pseudomonas aeruginosa* com o gene *gfp*(ASV), que codifica a proteína Gfpmut3* (RIEDEL *et al.*, 2001). Esta forma mutante da proteína GFP emite fluorescência numa intensidade 21 vezes maior e é degradada mais rapidamente que a do tipo selvagem, o que confere vantagens em ensaios de detecção. Este plasmídeo contém o gene *lasR*, que codifica a proteína receptora de 3-O-C₁₂-HSL, sob controle do promotor *lac*. Este sistema sensor é mais sensível a 3-O-C₁₂-HSL e, com menor sensibilidade a AHLs de cadeia longa (3-O-C₁₀-HSL, C₁₀-HSL e C₁₂-HSL). O sensor pAS-C8, é baseado no sistema CepRI de *Burkholderia cepacia*. O gene *gfp*(ASV) está sob controle do promotor *cepI*, enquanto o ativador de transcrição *cepR* é controlado pelo promotor *lac*. Este sensor é bastante sensível a 3-O-C₈-HSL, sendo também, com menor eficiência, estimulado por C₁₀-HSL, 3-O-C₁₀-HSL, C₆-HSL, C₁₂-HSL E 3-O-C₁₂-HSL (RIEDEL *et al.*, 2001). O plasmídeo pJBA132, contém o gene *luxR* de *V. fischeri* expresso constitutivamente e os promotores dos genes *luxR* e *luxI* fusionados ao gene *gfp*(ASV) (STEIDLE *et al.*, 2001). Este plasmídeo sensor apresenta alta sensibilidade a 3-O-C₆-HSL. mas também responde a várias outras moléculas de AHLs correlacionadas (ANDERSEN *et al.*, 2001).

Células de *H. seropedicae* SMR1 foram transformadas com os plasmídeos sensores pKR-C12, pAS-C8 ou pJBA132 e analisadas por microscopia de fluorescência (item 4.9.1). Apesar destes sensores responderem com variado grau de

sensibilidade a uma ampla variedade de moléculas de AHLs (RIEDEL *et al.*, 2001, STEIDLE *et al.*, 2001), nenhum sinal positivo da expressão da proteína GFP foi detectado.

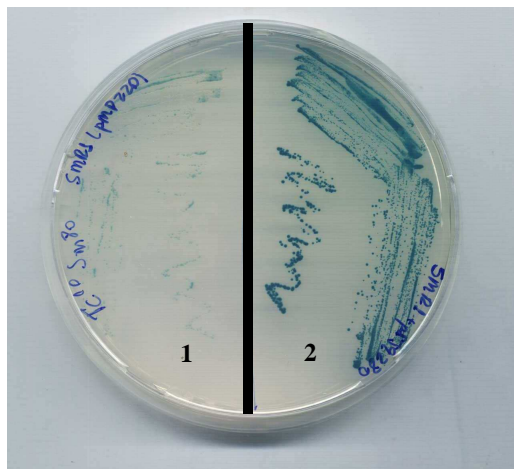
Análises funcionais utilizando estes plasmídeos como sensores têm sido amplamente utilizadas na detecção de moléculas de AHLs produzidas em diferentes microrganismos. Entretanto, Riedel e colaboradores (2001) ao testarem a sensibilidade de pKR-C12 e pAS-C8 a diferentes moléculas de AHLs, em estirpes AHL negativas de *P.aeruginosa* e *B. cepacia*, mostraram que o perfil na emissão da fluorescência é estirpe dependente. Em *B. cepacia* H111-I, pKR-C12 exibiu menor sensibilidade por 3-OH-C₁₂-HSL que em *P. aeruginosa* PAO1-JP2. Quando testada com C₁₂-HSL a estirpe H111-I foi sensível, enquanto PAO1-JP2 foi insensível, mesmo em altas concentrações desta AHL. Além disso, alguns microrganismos podem produzir sinais que não são detectáveis pelo sensor ou podem produzir moléculas em concentrações abaixo dos níveis de detecção do sensor (SHAW *et al.*, 1997). A modulação da produção de AHL por outros circuitos regulatórios e também pelo meio e condições de cultivo da bactéria, podem influenciar na quantidade de moléculas produzidas necessárias para a detecção pelo sensor (CHA *et al.*, 1998; PEARSON *et al.*, 1994; SHAW *et al.*, 1997).

Desta maneira, as ausências de sinal obtidas com estes plasmídeos não permitem concluir se *H. seropedicae* SMR1 produz ou não moléculas de AHLs, pois o resultado negativo poderia ser consequência de limitações inerentes à técnica.

A produção de AHL em *H. seropedicae* foi então investigada através do monitoramento da atividade de β -galactosidase do plasmídeo pIJ9280. Este plasmídeo contém o promotor do gene *rail* de *R. leguminosarum* fusionado ao gene *lacZ*. O gene *rail* é responsável pela síntese de C₆-HSL, C₇-HSL, C₈-HSL e 3-OH-C₈-HSL. Wisniewski-Dyé e colaboradores (2001) testaram a expressão de *rail-lacZ* mediante adição de várias moléculas de AHLs em *A. tumefaciens* C58(pIJ9280) e observaram maior indução com 3-OH-C₈-HSL. Menores níveis de expressão foram obtidos com 3-O-C₈-HSL e 3-OH-C_{14:1}-HSL e nenhuma indução foi obtida com C₆-HSL, C₇-HSL, C₈-HSL ou 3-O-C₆-HSL.

Durante os testes de indução de culturas saturadas de células de *H. seropedicae* SMR1 transformadas com o plasmídeo pIJ9280 (item 4.8.2.2), foi possível detectar a expressão de *rail-lacZ* através da coloração azul, decorrente da hidrólise da X-gal presente no meio de cultivo (Figura 9).

FIGURA 9. DETECÇÃO DE AHL EM *Herbaspirillum seropedicae* PELO SENSOR *rail-lacZ*.



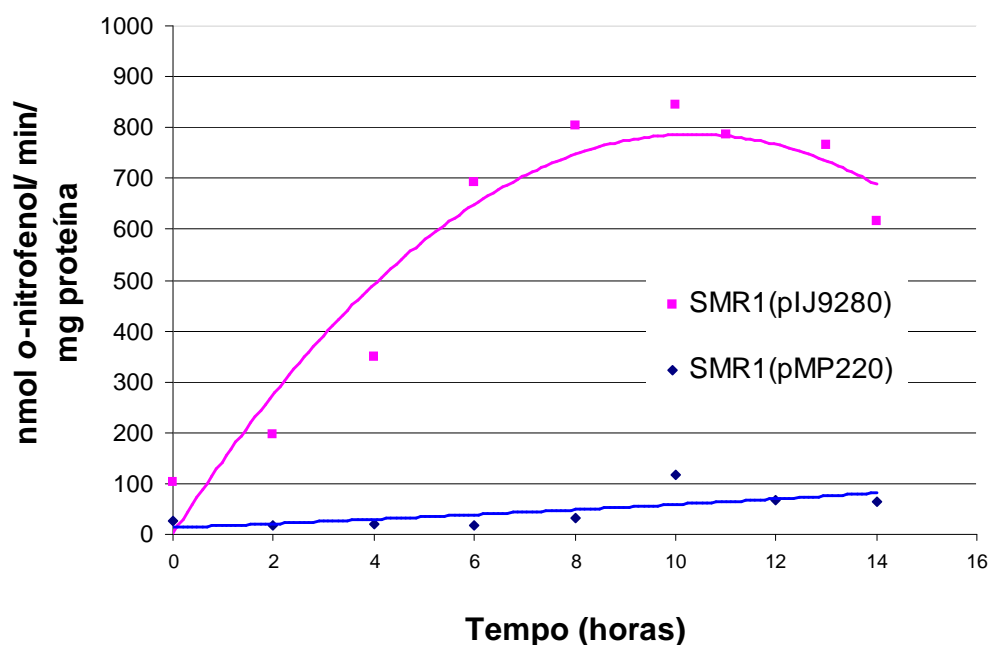
Células de *H. seropedicae* SMR1 carregando os plasmídeos (1) pMP220 ou (2) pIJ9280 foram semeadas em meio NFbHP sólido contendo 30 $\mu\text{g/mL}$ de X-gal (item 4.9.2). Após 24 horas de incubação a 30° C, *H. seropedicae* SMR1(pIJ9280) desenvolveu coloração azul.

A expressão do promotor *rail* em *H. seropedicae* também foi acompanhada pela medida dos níveis de atividade de β -galactosidase em meio NFbHP líquido, em diferentes tempos de incubação (item 4.9.3). A atividade de β -galactosidase em *H. seropedicae*(pIJ9280) foi crescente, alcançando o valor máximo de 845 nmol de o-nitrofenol/minuto/miligrama de proteína após 10 horas de crescimento (densidade óptica a 600 nm de 1,7) (Figura 10). Esta atividade foi aproximadamente 7 vezes maior que no sistema controle, contendo apenas o vetor pMP220. O crescimento populacional de *H. seropedicae* foi acompanhado pela medida da densidade óptica em 600 nm. A figura 11 apresenta a análise simultânea da expressão da fusão *rail:lacZ* em *H. seropedicae* e sua curva de crescimento.

Estes resultados sugerem:

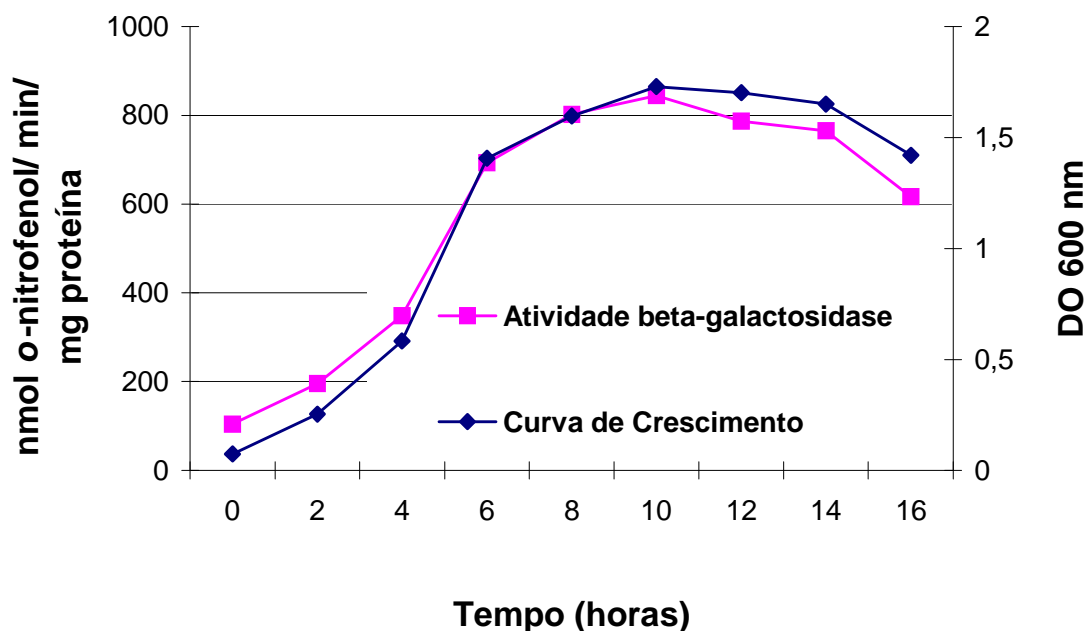
1. a produção de AHLs capazes de ativar o promotor *raiI* de *R. leguminosarum* em *H. seropedicae*.
2. a existência de um ativador de transcrição sensível a AHLs em *H. seropedicae* capaz de interagir com o promotor *raiI* de *R. leguminosarum*;
3. entre as AHLs candidatas encontram-se 3-OH-C8-HSL, 3-O-C8-HSL e 3-OH-C14-HSL.

FIGURA 10. ATIVAÇÃO DO PROMOTOR *raiI* de *Rhizobium leguminosarum* EM *Herbaspirillum seropedicae*



A expressão de *raiI-lacZ* foi monitorada pela medida dos níveis da atividade da enzima β -galactosidase (item 4.9.3). O plasmídeo vetor pMP220 foi empregado como controle.

FIGURA 11. EXPRESSÃO DE *raiI-lacZ* EM *Herbaspirillum seropedicae*



A expressão de *raiI-lacZ* foi analisada pela medida dos níveis da atividade de β -galactosidase durante do cultivo da estirpe SMR1 de *H. seropedicae* carregando o plasmídeo pIJ9280 (item 4.9.3). A curva de aumento populacional foi monitorada a 600 nm (item 4.10).

5.1. Perfil de AHLs produzidas por *H. seropedicae*

Entre muitas bactérias gram-negativas que utilizam sistemas de sensoriamento populacional modulados por AHLs, é comum a produção de múltiplas moléculas de AHLs (WINSON *et al.*, 1995; ROSEMEYER *et al.*, 1998). Para o estudo do perfil de AHLs produzidas por um determinado organismo, estas moléculas podem ser separadas por Cromatografia em Camada Delgada (TLC) e detectadas com o auxílio de plasmídeos sensores.

Em *H. seropedicae* SMR1, moléculas de AHLs foram separadas através de TLC e visualizadas utilizando *A. tumefaciens* NT1(pNTLR4) (CHA *et al.*, 1998) como sistema de detecção, conforme descrito no item 4.9.4. O plasmídeo pNTLR4 contém uma fusão *traG::lacZ*, cuja expressão requer o ativador transcricional TraR e uma AHL. A estirpe NT1 não produz sua própria molécula de AHL, mas o repórter *traG::lacZ* pode ser induzido pela suplementação com AHL exógena. Nos locais

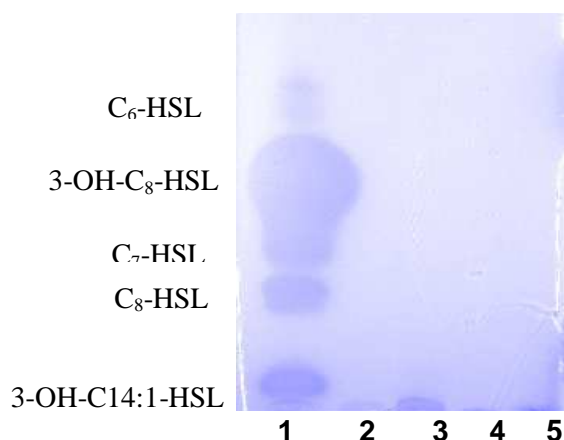
contendo o composto ativo que migrou na placa de TLC são visualizadas bandas azuis resultantes da hidrólise do cromóforo X-Gal, catalisada pela enzima β -galactosidase expressa a partir da fusão repórter *traG::lacZ*.

A estirpe 8401 de *R. leguminosarum* foi utilizada como controle positivo nas análises por TLC. Esta estirpe não contém o plasmídeo simbiótico pRL1J1, que carrega os genes *traI* e *rhiI* responsáveis pela produção de moléculas de AHLs. Porém, esta estirpe produz pelo menos cinco diferentes AHLs sintetizadas por outras duas sintases, RaiI e CinI, localizadas em outras regiões do genoma, fora do plasmídeo pRL1J1 (LITHGOW *et al.*, 2000). O gene *rail*, localizado em um grande plasmídeo nativo, codifica a proteína RaiI que é responsável pela síntese de C₆-HSL, C₇-HSL, C₈-HSL e 3-OH-C₈-HSL. O produto do gene *cinI*, localizado no cromossoma desta bactéria, sintetiza 3-OH-C_{14:1}-HSL.

Um extrato contendo, possíveis moléculas de AHLs produzidas por *H. seropedicae* foi obtido a partir do sobrenadante de culturas em meio mínimo NFbHP e com D.O._{600nm} 1,2 (item 4.9.4). As moléculas de AHLs produzidas por *R. leguminosarum* 8401 foram extraídas e utilizadas como referência. Os extratos foram separados em placas de TLC e reveladas com o sistema de detecção *A. tumefaciens* NT1(pNTLR4) (item 4.9.4.2). Nestas condições, o sistema de detecção *traG-lacZ* de *A. tumefaciens* revelou apenas o padrão de moléculas produzidas pela amostra controle, *R. leguminosarum* 8401. Nenhum composto capaz de estimular a atividade de β -galactosidase do sensor foi detectado no extrato de *H. seropedicae* SMR1 mesmo utilizando-se 30 μ L de extrato (Figura 12).

Por apresentar uma maior produção de AHLs (Fig. 11), optou-se pela utilização de extratos de culturas de *H. seropedicae* SMR1 com D.O. _{600 nm} de 1,6 para extração dessas moléculas. Após a TLC, foi detectado um composto com R_F de migração igual a 0,375, capaz de induzir a expressão da fusão *traG-lacZ* de *A. tumefaciens*. Este composto foi denominado AHL-I e comigrou com 3-OH-C₈-HSL de *R. leguminosarum*. Nenhum sinal foi detectado no extrato obtido a partir do meio NFbHP estéril (controle negativo) (Figura 13).

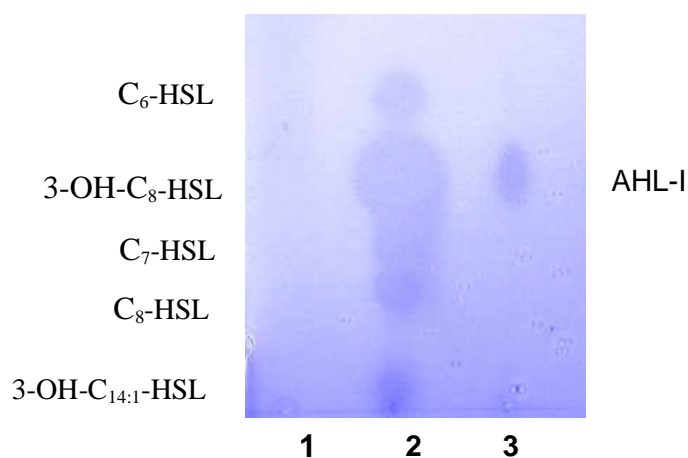
FIGURA 12. DETECÇÃO DE AHLs POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA



R. leguminosarum 8401 foi cultivado em meio TY até D. O._{600 nm} de 0,8. *H. seropedicae* SMR1 foi cultivado em meio NFbHP até D. O._{600 nm} de 1,2 (item 4.4). AHLs extraídas a partir do sobrenadante destas culturas (item 4.9.4.1) foram separadas por TLC e reveladas pelo sistema de detecção *A. tumefaciens* NT1(pNTLR4) (item 4.9.4.2).

- 1- 10 µL de extrato de *R. leguminosarum* 8401 (controle positivo);
- 2, 3 e 4 - 10, 20 e 30 µL de extrato de *H. seropedicae* SMR1, respectivamente;
- 5- 30 µL de extrato equivalente a 100 mL de meio NFbHP estéril (controle negativo).

FIGURA 13. DETECÇÃO DE AHLs PRODUZIDAS POR *Herbaspirillum seropedicae*

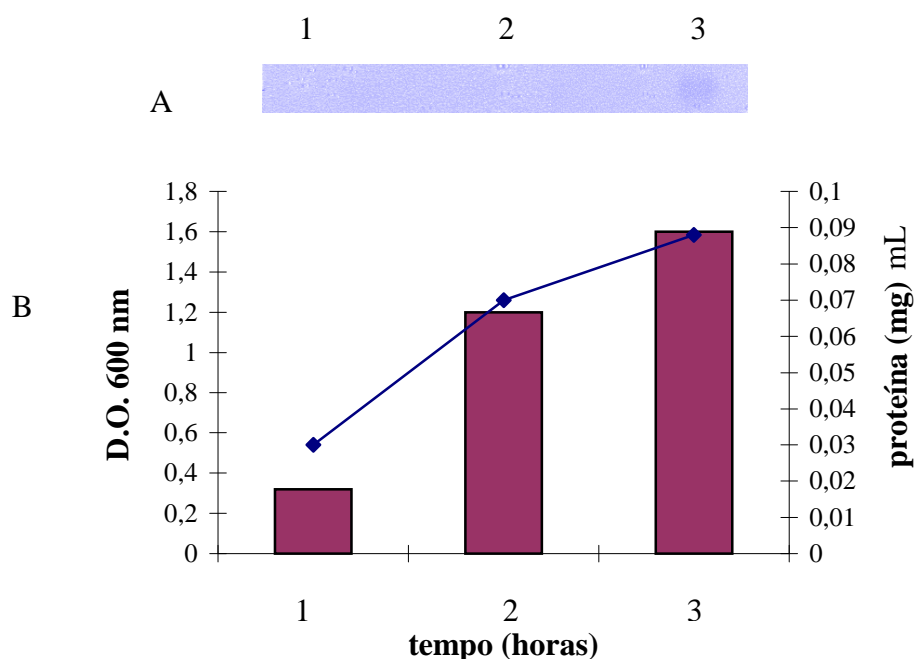


R. leguminosarum 8401 foi cultivado em meio TY até D. O._{600 nm} de 0,8. *H. seropedicae* SMR1 foi cultivado em meio NFbHP até D. O._{600 nm} de 1,6 (item 4.4). AHLs extraídas a partir do sobrenadante destas culturas (item 4.9.4.1) foram separadas por TLC e reveladas pelo sistema de detecção *A. tumefaciens* NT1(pNTLR4) (item 4.9.4.2).

- 1- 30 µL de extrato equivalente a 100 mL de meio NFbHP estéril (controle negativo);
- 2- 3 µL de extrato de *R. leguminosarum* 8401 (controle positivo);
- 3- 30 µL de extrato de *H. seropedicae* SMR1.

Com o objetivo de monitorar a produção de AHL através de TLC foram utilizadas culturas de *H. seropedicae* SMR1 cultivadas em meio NFbHPN e com diferentes densidades ópticas (item 4.4). Somente extratos obtidos a partir de culturas em alta densidade populacional (D.O. ₆₀₀ de 1,6) continham moléculas de AHL capazes de ativar o sistema sensor *A. tumefaciens*(pNTLR4) (Figura 14). O crescimento populacional de *H. seropedicae* foi acompanhado pela medida da densidade óptica em 600 nm (item 4.10) e pela dosagem de proteína total (item 4.11) das amostras (Figura 14). Da mesma forma que o observado com a fusão *rail-lacZ*(pIJ9280), estes resultados também sugerem que a produção de AHL por *H. seropedicae* está relacionada com sua densidade populacional.

FIGURA 14. CURVA DE CRESCIMENTO DE *Herbaspirillum seropedicae*



A. *H. seropedicae* SMR1 foi cultivado em meio NFbHP até D. O._{600 nm} de 1,6 (item 4.4). AHLs extraídas a partir do sobrenadante destas culturas (item 4.9.4.1) foram separadas por TLC e reveladas pelo sistema de detecção *A. tumefaciens* NT1(pNTLR4) (item 4.9.4.2).

1- 30 μ L de extrato de *H. seropedicae* SMR1 cultivado em meio NFbHP até D.O.₆₀₀ de 0,32

2- 30 μ L de extrato de *H. seropedicae* SMR1 crescido em meio NFbHP até D.O.₆₀₀ de 1,2

3- 30 μ L de extrato de *H. seropedicae* SMR1 crescido em meio NFbHP até D.O.₆₀₀ de 1,6

B. *H. seropedicae* foi cultivado em meio NFbHP (item 4.4). A densidade óptica em 600 nm (barras vermelhas) (item 4.17) e da dosagem de proteína total (linha azul) (item 4.11) foram determinadas em diferentes tempos de crescimento do microrganismo.

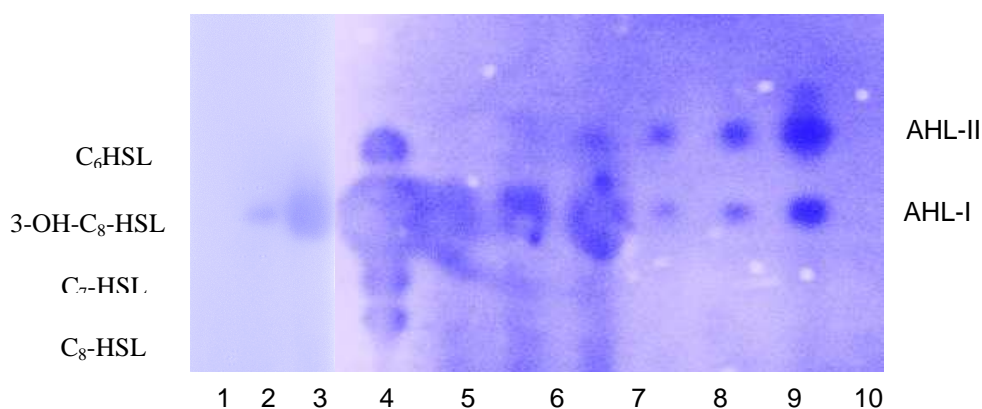
5.2. Influência do meio de cultura na produção de AHLs por *Herbaspirillum seropedicae*

Como a produção de AHLs é um processo altamente dependente da composição do meio de cultura (CHA *et al.*, 1998; PEARSON *et al.*, 1994; SHAW *et al.*, 1997), o perfil de AHLs produzidas por *H. seropedicae* foi também analisado em outros meios de cultura. Para tal, células de *H. seropedicae* SMR1 foram cultivadas em meio TY ou NFbHP suplementado com 10% de LB (item 4.4). Nos extratos obtidos a partir dessas culturas, foi revelado um novo composto com migração mais rápida que a de AHL-I, e este composto foi denominado AHL-II (Figura 15). No entanto, um sinal inespecífico foi detectado nos extratos 2 e 3 (controles), obtidos a partir de NFbHP suplementado com 10% de meio LB e em meio TY, respectivamente. Este sinal, sobreposto ao sinal para AHL-I e não detectado em extratos obtidos em meio NFbHP, é provavelmente decorrente de compostos (AHLs ou não) com capacidade de ativar o sistema sensor presentes no próprio meio de cultura. Wisniewski-Dyé e colaboradores (2001) também relatam a presença de sinais inespecíficos nos extratos de *R. leguminosarum* cultivados em meio TY.

Diferentes autores têm usado meio mínimo para produção de moléculas de sensoriamento populacional e a extração é freqüentemente realizada na fase exponencial de crescimento ou início da fase estacionária (CHA *et al.*, 1998; PEARSON *et al.*, 1994; SHAW *et al.*, 1997). Os resultados têm demonstrado que privação nutricional e a densidade populacional são monitoradas pelas células e determinam o momento de início da fase estacionária. Em *P. aeruginosa*, a produção de um autoindutor é detectada em meio mínimo contendo células no final da fase exponencial (PEARSON *et al.*, 1994). Foi também relatado que a concentração deste autoindutor é muito maior na fase logarítmica de crescimento do que na fase estacionária (PEARSON *et al.*, 1994). As razões para esta diferença no estágio de crescimento são desconhecidas. Eberhard (1972) detectou a presença de um inibidor da produção de AHLs quando *V. fischeri* foi cultivado em meio complexo e que nunca foi detectado em culturas em meio mínimo.

Pode-se então supor que em *H. seropedicae*, meios de culturas complexos como TY e LB influenciam a produção de AHLs através do favorecimento do aumento da sua densidade populacional. Entretanto, o padrão de AHLs diferenciado pode ser consequência da presença de algum composto presente nos meios de cultura capaz de influenciar a sua produção. Os resultados sugerem que *H. seropedicae* produz pelo menos duas moléculas distintas de AHLs. A presença de múltiplos sinais pode ser devido à existência de múltiplos sistemas de sensoriamento populacional ou produzidos por uma única AHL sintase.

FIGURA 15. DETECÇÃO DE AHLs PRODUZIDAS POR *Herbaspirillum seropedicae* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.



R. leguminosarum 8401 foi cultivado em meio TY até D.O._{600 nm} de 0,8 (item 4.4). *H. seropedicae* SMR1 foi cultivado em meio NFbHP, em meio TY e em meio NFbHP suplementado com 10% de meio LB até D.O._{600 nm} 1,6 (item 4.4). AHLs extraídas a partir do sobrenadante destas culturas (item 4.9.4.1) foram separadas por TLC (item) e reveladas pelo sistema de detecção *A. tumefaciens* NT1(pNTLR4) (item 4.9.4.2).

1- 30 µL de extrato equivalente a 100 mL de meio NFbHP estéril (controle negativo);

2- 30 µL de extrato equivalente a 100 mL de meio NFbHP suplementado com 10% de meio LB (controle negativo);

3- 30 µL de extrato equivalente a 100 mL de meio TY estéril (controle negativo);

4- 3 µL de extrato de *R. leguminosarum* 8401 (controle positivo);

5, 6 e 7- aplicado 5, 10 e 20 µL de extrato de *H. seropedicae* SMR1 cultivado em meio TY, respectivamente;

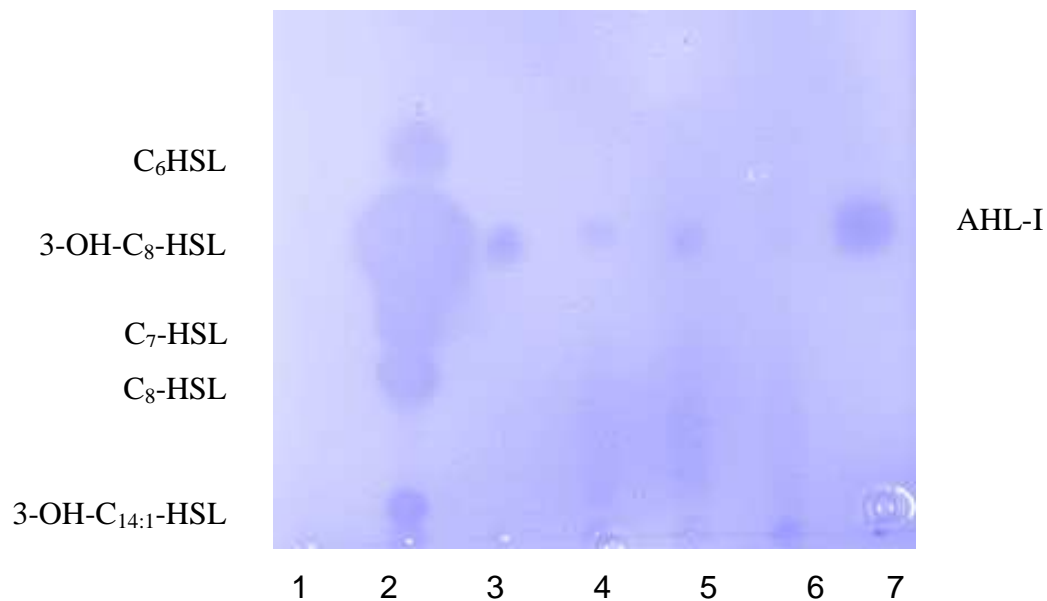
8, 9 e 10 - aplicado 5, 10 e 20 µL de extrato de *H. seropedicae* SMR1 cultivado em meio NFbHP suplementado com 10% de meio LB, respectivamente.

5.3. Detecção de AHLs em diferentes estirpes de *H. seropedicae* e *H. rubrisulbalbicans*

O tipo de moléculas de AHLs produzidas por uma determinada espécie pode ser estirpe dependente, por refletir os diferentes ambientes que as estirpes individuais colonizam (EBERL, 1999). Desta forma, diferenças no padrão de moléculas de AHLs produzidas por estirpes de *H. seropedicae* e *H. rubrisulbalbicans* foram investigadas. Extratos obtidos a partir dos sobrenadantes das estirpes SMR1 e HRC54 de *H. seropedicae* e HCC103, M1 e M4 de *H. rubrisulbalbicans* cultivadas em meio NFbHP (item 4.4) foram separados em TLC e reveladas com o sistema de detecção *A. tumefaciens*(pNTLR4) (item 4.9.4.2). Um único sinal com migração similar a AHL-I foi detectado em todas as amostras analisadas (Figura 16). Nenhum sinal adicional foi detectado nas estirpes analisadas.

Embora se tenha observado o mesmo perfil cromatográfico para todas as estirpes analisadas, não se pode deixar de considerar a influência do meio de cultura na produção de AHLs pelas estirpes HRC54, HCC103, M1 e M4. Portanto, ensaios com outros meios e condições de cultivo devem ser realizados com estas estirpes para permitir a obtenção do seu perfil de AHLs. Além disso, vale ressaltar que diversas espécies bacterianas produzem a mesma AHL, mas cada uma delas pode estar envolvida na regulação de diferentes processos biológicos. Por exemplo, LuxI sintetiza *N*-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona e regula o fenótipo de bioluminescência em *V. fischeri* (BAINTON *et al.*, 1992), enquanto que a mesma molécula produzida por CarI, é responsável pela indução da síntese de exoenzimas e antibiótico em *Erwinia carotovora* (JONES *et al.*, 1993). A ocorrência de fenômeno similar deve ser considerada para as diferentes espécies e estirpes do gênero *Herbaspirillum*.

FIGURA 16. DETECÇÃO DE AHLs EM DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae* E *Herbaspirillum rubrisulbicans*



R. leguminosarum 8401 foi cultivado em meio TY até D.O._{600 nm} de 0,8 (item 4.4). As estirpes SMR1 e HRC54 de *H. seropedicae* e as estirpes HCC103, M4 e M1 de *H. rubrisulbicans* foram cultivadas em meio NFbHP até D.O._{600 nm} 1,6 (item 4.4). AHLs extraídas a partir do sobrenadante destas culturas (item 4.9.4.1) foram separadas por TLC e reveladas pelo sistema de detecção *A. tumefaciens* NT1(pNTLR4) (item 4.9.4.2).

- 1 - 30 µL de extrato equivalente a 100 mL de meio NFbHP estéril (controle negativo)
- 2 - 3 µL de extrato de *R. leguminosarum* 8401 (controle positivo)
- 3 - 30 µL de extrato de *H. seropedicae* SMR1
- 4 - 30 µL de extrato de *H. seropedicae* HRC54
- 5 - 30 µL de extrato de *H. rubrisulbicans* M1
- 6 - 30 µL de extrato de *H. rubrisulbicans* HCC103
- 7 - 30 µL de extrato de *H. rubrisulbicans* M4

5.4. Identificação de genes envolvidos na síntese de AHLs em *H. seropedicae*

A identificação de genes envolvidos na síntese de AHL foi realizada através de pesquisa em um banco de dados desenvolvido recentemente pelo Projeto Genoma de *H. seropedicae* estirpe SMR1(nfn.genopar.org). Para a construção deste banco de dados, as seqüências de nucleotídeos obtidas a partir de uma biblioteca genômica de *H. seropedicae* são traduzidas e analisadas, pelo programa BlastX (ALTSCHUL *et al.*, 1997), quanto ao grau de similaridade com seqüências de proteínas de diferentes organismos depositadas no banco de dados GenBank. Os resultados produzidos podem ser consultados através do uso de palavras chave, e permitem a identificação de genes e proteínas de interesse no genoma do microrganismo em estudo.

A utilização de diversas palavras chave (item 4.12), entre elas “homoserine lactone”, possibilitou a identificação de uma provável *N*-acil-homoserina lactona sintase no genoma de *H. seropedicae*. Esta proteína apresentou 41% de identidade (60% de similaridade) com a proteína HdtS de *Pseudomonas fluorescens* F113 (Código de acesso no GenBank AF286536 3). Por este motivo o gene identificado em *H. seropedicae* passou a ser considerado um provável gene *hdtS*. As seqüências de aminoácidos deduzidas para as prováveis proteínas HdtS de *P. fluorescens* F113 (259 aminoácidos) e *H. seropedicae* SMR1 (262 aminoácidos) foram alinhadas pelo programa ClustalW (item 4.13) e apresentaram 39,62% de identidade (Figura 17).

FIGURA 17. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS HdtS DE *Herbaspirillum seropedicae* E *Pseudomonas fluorescens*.

```

P.F      1  MSILQAIRAFLFYLLLGTSLLWCSSLFFIAPFLPFKARYRFINVYWCHCALWLSKVFLG 60
H.S      1  LRLVLILRSVVFMALMAVATIISFACLLSAPF-PYAQRYWWTSR-WNVFVIWTARVICG 58
        1  :  ::  :*:.*  *:.:.*:.*.  .::  ***  *:  **  :  .  *  .:*  :::*  *  33

P.F      61  IRYEVKGAENVPDRPCVIQSNHQSTWETFFLSAYF-EPLSQVLKRELLFVPPFFGWAMAML 119
H.S      59  IRYEIRGAENLPDAPVILLSKHQSAWETIFYVINMPRPLVVFVKKELTYVPPFFGWGIALL 118
        34  *****:*  *  ::  *:*:*:*:*  :  .**  *:*:*  :*****.:*  *  80

P.F      120  RPIAIDRDNPKAALKQVAKKGDELLKDNVWVLIFFEGTRVPYGTVGKFSRSGSALAVNAD 179
H.S      119  RMIPIIDRKKGRDAFAQVLEHGTRRLRDGQWIMMFEGTRTTVGSQGYKAGGSRLAVETN 178
        81  *  *.***.:  :  *:  **  ::*  .  *:*  *:.:*****.  *  :  **:.  .**  *****:  120

P.F      180  LPVLPPIAHNAGKFWPKAGWIRKPGVITVVIQAPMYAEGTGPRAIAELNDRVQAWNEQTQR 239
H.S      179  TLVVPIAMNSGQCWPKGSFIKKPGLITVSIQKPISEGLNP---QELNERVENWIESEMR 235
        120  *:*:*  *:*  *:.:.*:***:*  *  *  :  .**  .  *  *  *:*:*  *  *  .  *  159

P.F      240  EMG-----SLPPTPTTPTTDDQLAV- 259
H.S      236  VISPDVYKNSAPRPAASAATSSDAARS 262
        159  :.  *  *  .:.*:***.:  *  169

```

As sequências de aminoácidos foram alinhadas pelo programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1997). Asteriscos indicam aminoácidos idênticos e pontos, substituições conservadas. Os traços nas sequências indicam intervalos gerados pelo programa ClustalW a fim de fornecer o melhor alinhamento entre as sequências.

A proteína HdtS de *P. fluorescens* F113 foi identificada recentemente por Laue e colaboradores (2000) e pertence a uma nova família de AHL sintases, não homóloga aos membros das famílias LuxI e nem LuxLM/AinS. A transcrição e tradução *in vitro* do gene *hdtS* de *P. fluorescens* F113, forneceu uma proteína de aproximadamente 33 kDa. Em *E. coli*, a proteína HdtS de *P. fluorescens* foi capaz de dirigir a síntese de três moléculas de AHLs: 3OH,C_{14:1}-HSL, C₁₀-HSL e C₆-HSL (LAUE *et al.*, 2000).

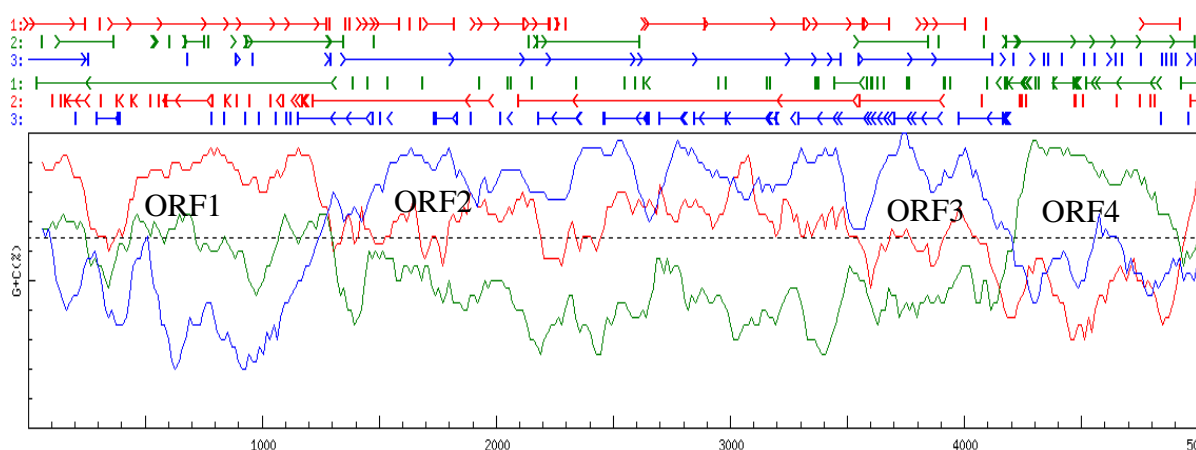
Laue e colaboradores (2000) também identificaram, a montante do gene *hdtS* de *P. fluorescens* F113, duas prováveis regiões codificadoras de proteínas (ORFs). A ORF1 que apresentou similaridade com a proteína GlyS de *E. coli* K-12 (AE000433) e a ORF2 que é similar ao gene *hisB* encontrado em *Synechocystis* (D64004), *Haemophilus influenzae* (U32744) e *E. coli* (*hisB*, AE000293 e *yaeD*, AE000129). Em *E. coli* as proteínas GlyQ e GlyS são responsáveis, respectivamente, pela síntese das subunidade α e β da glicil-tRNA sintetase (WEBSTER *et al.*, 1983). Esta enzima é formada por duas subunidades heterólogas organizadas em uma estrutura quaternária $\alpha_2\beta_2$. As duas regiões codificadoras são contíguas e suas proteínas são

sintetizadas a partir de um único RNA mensageiro, com a subunidade α a montante da β .

5.5. Análise da seqüência de nucleotídeos do provável gene *hdtS* de *Herbaspirillum seropedicae* e seus adjacentes

A seqüência de nucleotídeos referente ao provável gene *hdtS* de *H. seropedicae* está presente numa região contínua de 92,4 kb do genoma de *H. seropedicae* (*contig* 279, setembro 2003/ Projeto GENOPAR). Um fragmento de 5,0 kb selecionado deste *contig* foi analisado quanto a presença de prováveis regiões codificadoras de proteínas (ORFs) pelo programa FramePlot 2.3.2 (item 4.13) (Figura 18). As ORFs identificadas nas seis fases de leitura foram analisadas pelo programa BlastP (ALTSCHUL *et al.*, 1997) quanto ao grau de similaridade com proteínas de outros microrganismos depositadas no banco de dados GenBank (item 4.2) (Quadro 4). Quatro ORFs foram consideradas válidas e o mapa deduzido com base na similaridade do alinhamento (Figura 19), indica que a organização estrutural da região contendo o provável gene *hdtS* de *H. seropedicae* é similar a de *P. fluorescens* F113, determinado anteriormente por Laue e colaboradores (2000).

FIGURA 18. IDENTIFICAÇÃO DE PROVÁVEIS REGIÕES CODIFICADORAS DE PROTEÍNAS (ORFs).



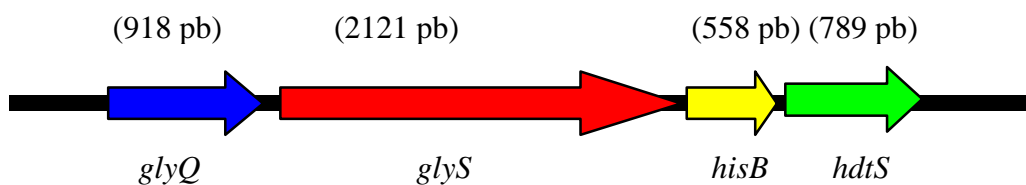
Um fragmento de 5,0 kb do genoma de *H. seropedicae* foi analisado quanto à presença de ORFs pelo programa FramePlot 2.3.2 (item 4.13). Acima do gráfico, os números 1, 2 e 3 superiores representam as 3 fases positivas de leitura e os números inferiores representam as 3 fases negativas de leitura. As barras horizontais assinalam a presença de códons de início (ponta da seta) e término de tradução (linha vertical). Os locais onde os picos ultrapassam a linha tracejada delimitam regiões codificadoras de proteína estatisticamente significativas.

QUADRO 4. COMPARAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUZIDA DAS ORFs IDENTIFICADAS COM SEQÜÊNCIAS DEPOSITADAS NO BANCO DE DADOS GenBank.

ORF	(pb)	Proteína homóloga	Espécie	Identidade (%)	Similaridade (%)	Nº acesso GenBank
1	918	GlyQ	<i>R. sol.</i>	82	87	NP 518647.1
			<i>B. fung.</i>	85	91	ZP 00029062.1
			<i>R. metal.</i>	82	88	ZP 00023664.1
2	2121	GlyS	<i>R. sol.</i>	66	79	NP 518645.1
			<i>B. fung.</i>	67	78	ZP 00029063-1
			<i>R. metal.</i>	64	77	ZP 00023666-1
3	558	<i>hisB</i> -like	<i>R. metal.</i>			ZP 00023667.1
			<i>R. sol.</i>			NP 518644.1
			<i>C. viol.</i>			NP 901327.1
4	804	Provável aciltransferase	<i>B. pert.</i>	55	72	NP 878950
		glicerol 3-fosfato aciltransferase	<i>B. fung.</i>	51	69	ZP 00029066.1
		NlaB	<i>N. men.</i>	50	69	AAD 38301
		HdtS	<i>P. fluor.</i>	41	60	AAG 30826.1

As ORFs identificadas foram analisadas pelo programa BlastP (ALTSCHUL *et al.*, 1997) quanto ao grau de similaridade com proteínas de outros microrganismos depositadas no banco de dados GenBank (item 4.20). Somente aquelas seqüências com maior homologia com a seqüência submetida são indicadas. *B. pert.* = *Bordetella pertussis*; *B. fung.* = *Burkholderia fungorum*; *C. viol.* = *Chromobacterium violaceum*; *N. men.* = *Neisseria meningitidis*; *P. fluor.* = *Pseudomonas fluorescens*.

FIGURA 19 . MAPA DA REGIÃO DO GENE *hdtS* DE *Herbaspirillum seropedicae*



As prováveis regiões codificadoras de proteínas similares aos genes *glyQ*, *glyS*, *hisB*, e *hdtS*. O tamanho de cada gene é mostrado acima das setas.

A seqüência correspondente ao fragmento de 5 kb está mostrada na figura 20. Em *H. seropedicae* a organização estrutural dos prováveis genes *glyQ* e *glyS* é semelhante a de *E. coli* determinada por Keng e colaboradores (1982). A análise da seqüência de nucleotídeos (item 4.13) sugere que estes genes formam um *operon*, sendo sua transcrição dependente da subunidade σ^{70} da RNA polimerase a partir de um provável promotor do tipo -35/-10 presente na região promotora do gene *glyQ*. A ausência de prováveis seqüências promotoras a montante do provável gene *hisB* (*hisB-like*) e o pequeno espaçamento existente entre este gene e *glyS* também sugerem que *hisB-like* faça parte do *operon glyQS*. No modelo proposto, as seqüências palindrômicas, potenciais formadoras de grampos identificadas a jusante aos genes *glyQ* e *glyS* funcionariam como atenuadores e não como um terminador de transcrição. Entretanto, apesar de seqüências promotoras não terem sido identificadas entre estes genes, não é possível descartar outros modelos de transcrição. A aparente ausência de seqüência terminadora a jusante do gene *hisB-like* sugere que o provável gene *hdtS* também possa ser transcrito junto neste operon.

A análise da região promotora do provável gene *hdtS* de *H. seropedicae* (item 4.13) sugere este seja monocistrônico. A presença de uma provável seqüência promotora do tipo -35/-10 indica transcrição constitutiva, dependente da subunidade σ^{70} da RNA polimerase. A região promotora do gene *hdtS* de *H. seropedicae* também foi analisada quanto à presença de seqüências operadoras tipo *lux box*. Estas seqüências são compostas por uma seqüência palindrômica de 20 pares de bases localizada aproximadamente 40 pares de base a montante do sítio de início de transcrição dos genes regulados por LuxR em diferentes microrganismos (EGLAND & GRENBORG, 1999). A seqüência consenso deduzida a partir do alinhamento de *lux box* regulados pelo complexo LuxR-3-OH-C₆-HSL em *V. fischeri* é ACCTGTAGGATNGTACAGGT. Os nucleotídeos sublinhados são idênticos nesta posição em 7 ou mais entre as 9 seqüências alinhadas (CALLAHAN & DUNLAP, 2000). Com base neste consenso, a seqüência TCCTGAAACAACCGGTGGTC centrada a exatamente 40 pares de bases a montante do provável sítio de transcrição do gene *hdtS* de *H. seropedicae*, poderia ser apontada como um provável sítio *lux box*.

Apesar de não constituir um palíndromo, esta seqüência possui 7 dos 12 nucleotídeos mais conservados em *V. fischeri*. Como descrito para o promotor do *operon lux* de *V. fischeri*, este provável *lux box* também se encontra sobreposto a região -35 do promotor σ^{70} (EGLAND & GREENBERG, 1999). Entretanto, assim como em *P. fluorescens* F113, nenhuma região codificadora similar a LuxR foi encontrada nas regiões próximas ao gene *hdtS* de *H. seropedicae*. A identificação de um provável operador *lux box* também sugere que a transcrição possa ser modulada por um complexo LuxR-AHL.

FIGURA 20 - ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO CONTENDO O PROVÁVEL GENE *hdtS* DE *Herbaspirillum seropedicae*

CGCCATTGATGCCAGACGCTGAGACGCCGACCCGGCAAACC**GGGTCAA**ACGCCCA
AAAGGCGC**TAAAAT**CCAAGGTTTTCGCAATTCCTCCGCCGTTTCGCC**AGGCA**ACCACA
CACG**ATG**CTGACATTTCAACAAATCATCCTCAAGTTGCAAGAATATTGGGACGCCAG
GGCTGTGCACTGCTGCAACCCTACGACATGGAAGTCGGTGC**CGGCACCTCGCACACCG**
CGACCTTCCTGCGCGGATCGGCCCGAACCCTGGCGCGCCGCCTACGTCCAGCCGTC
GCGCCGTCCCAAGGATGGCCGCTATGGCGAGAATCCCAACC**GCATGCAGCACTACTAC**
CAGTACCAGGTGGTGTGAAGCCGGCGCCGGAAAACATCCTGGACCTGTACCTGGGT
CGCTGGAAGCGCTGGGCCTGGACCTGAAGCAGAATGACGTGCGCTTCGTTCGAGGACGA
CTGGGAAAACCCACCCTGGGCGCCTGGGGCCTGGGCTGGGAAGTGTGGTTGAACGGC
ATGGAAGTGACCCAGTTCACCTACTTCCAGCAGGTTCGGCGGCCTGGACTGCAAGCCGG
TGCTGGGCGAGATCACCTACGGCATCGAGCGTCTGGCGATGTACCTGCAGGGCGTGGA
AAACGTCTATGACCTGGTCTGGACCGAATGGATGGAGAACGGCGTCAAGAAGCACCTG
ACCTATGGCGACGTGTTCCACCAGAATGAAGTGGAGCAATCCACCTTCAACTTCGAGT
ATCCAACACCGAGTTCCTGTTCTCGTGTTCCTCAACTACGAAGCCGAAGCCAAGCG
CCTCATGGAAGTGCCGCTGGCGCTGCCGGCCTACGAACAGGTCCTCAAGGCCGCCAC
ACCTTCAACATGCTCGACGCCCGTGGCGCCATCTCGGTACCGAGCGCGCGCCCTACA
TCGGCCGCATCCGCAATCTCTCGCGGGCGGTGGCGCAGGCC**TACTTCGAATCGCGCGA**
GCGCCTGGGCTTCCCGATGCTGGGCCAGGGTCCGGCCAAGGCTGCGGCC**TGA**AGCGCA
ACGCCATGACATGATGCGG**CGCCGGCCC**CTGCGT**GGGCGGGCG**TCCCGAGCAAGACAG
C**AAGA**CTGAC**CAAC****ATG**AACCAGACACTCCTCGTAGAACTCGTCACCGAAGAACTGCCT
CCCAAGGCTCTGGCCAAGCTGGGCGATGCCCTTCGCCACGGGCATCTTCAATGGCCTGC
AAAGCCGCGGCTATCTCGACGCTGATGCCACCGCCACCGCCTATGCGACCCCGCGCCG
CCTGGCCGTTTCCATCACCCAGGTGTGCGCCGCCTCGCCGGACAAGTCGATCCGCGAA
AAAGTGCTGCCGGTGAGCGTCGCCCTGGACGCCGAAGGCCGCCCGTCGGCGCCGCTGG
TGAAGAAGCTGGCCGCCCTGGCCGCCTCCACGGGCGCCACCGTGATCACGCCGGACCA
GTTGGAACCGCCAGGATGGCAAGGCCGAGAGCTTCTTCTACACCTATAACGCCAAG
GGTTCGGCCCTGGCCGTGGCCCTGCAGGCGGCACTCGACGAGAGCCTGTCCAAGCTGC
CCATCCCAAGGTGATGAGCTACCAGCGCCAGTTCGGCCGCGCCGCCGGCGAGACGGT
GCATTTTCGTTTCGTCCAGCCACTATCTGGTGGCGCTGCTGGGCAACGATGTGGTGCCG

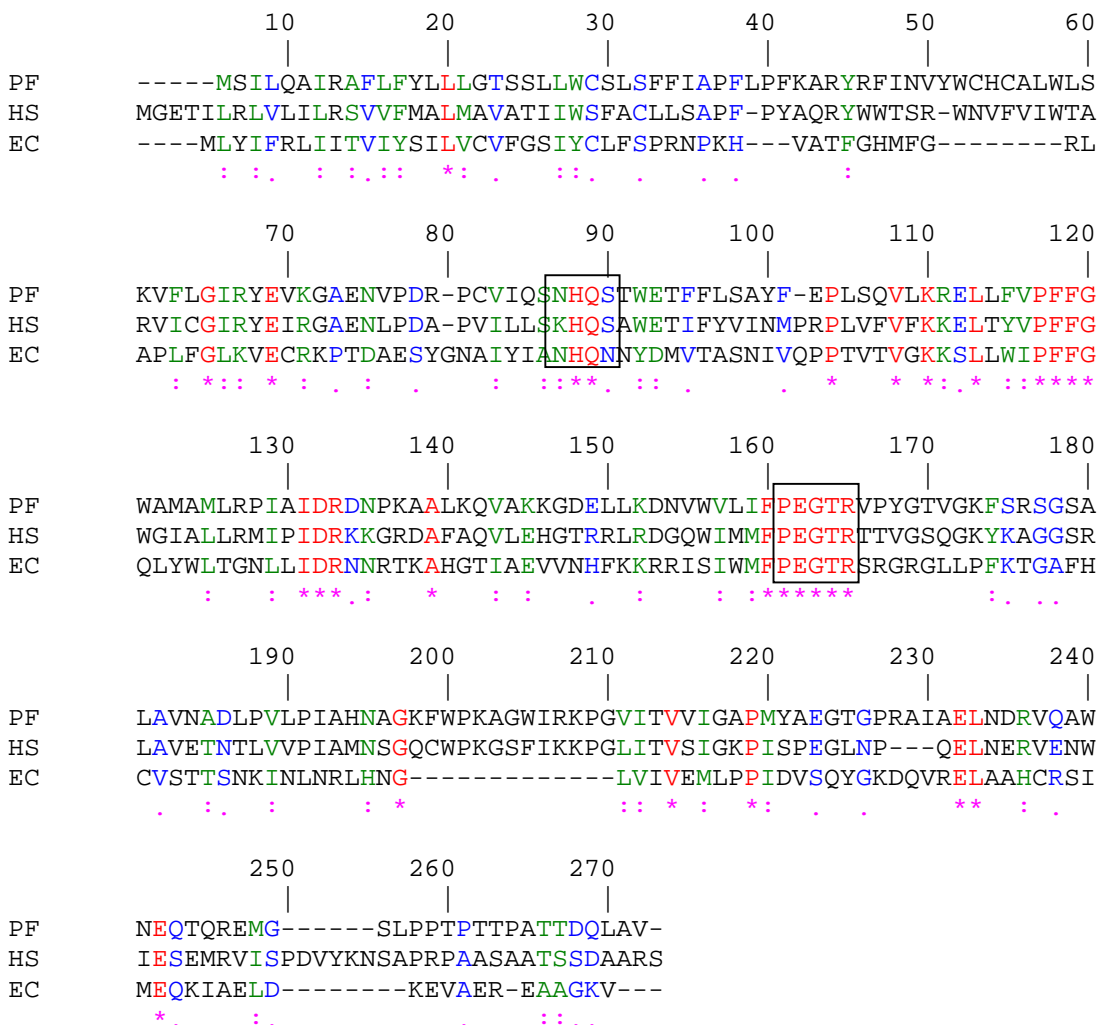
ATCAATACGCTGGGCCTGGATGCGGGCCGCACCACGCTGGGCCATCGCTTCCTGTCTG
CCGGCGCGCTGCAGATCGCTGCGCCGACGCCTATGTGGAATCCCTGGCCCAGCAAGG
CAACGTCATCGCCAGCTTCACCGAGCGCCGCGAGAAGATCCGCGCCGCGCTACTGGCC
AAGGCCGGCGCCGACCAGGTGCTGATGCCCGAAGCGCTGCTGGATGAAGTCACTGCGC
TGGTGGAGTGGCCGGTGGTCTATGAATGCAAGTTCGAGGACGAATTCCTGGCCGTGCC
GCAGGAATGCCTGATCCTGACCATGCAGACCAACCAGAAATATTTTGCCTGACCGAT
GCCAACGGCCGTCTGCGTTCGCGCTTCCTGATCGTCTCCAATCTGGAGACCGCGCATC
CCGAACACATCATCGGCGGCAACGAGCGCGTGGTGCGCCCGCGCCTGTCCGGACGCCAA
GTTCTTCTTCGAGCAGGACAAGAAGAAGACCTTGCCGAGCGCGTGCCGCAACTGGCC
AACGTGGTCTATCACAACAAGCTGGGCAACCAGCTGCAGCGCACCGAGCGCGTGCAGG
CGCTGGCCGGCAAGATTGCCAGCCTGCTGGGCGGCGACGTCAAGCTGGCCGAGCGCGG
CGCGCTGCTGGCCAAGGCCGACCTGCTACCGACATGGTGGGCGAGTTCCTGAGCTG
CAAGGCATCATGGGCACATACTATGCGCGTCACGATGGCGAAGCCGACGAAGTCGCAC
TGGCCGCCTCCGAACACTACCAACCGCGCTTTGCCGGCGACGCCCTGCCGACCACCGC
CACCGGCACCGCCGTGGCCCTGGCCGACAAGCTGGAAACCCTGGTCCGCATCTGGGGC
ATCGGCCTGCAGCCCACCGGCGACAAGGACCCCTTCGCCCTGCGCCGTACGCCCTGG
GCGTGCTGCGCATGCTGGTGGAAAAGCGCCTGCCGCTGTCGCTGACGGCCTTGCTGGA
TGCGGCCACCGGACTGTTCCCGGCAACGCCAACTTCAAGGATCCGCGCGCCGACGTG
CAAGCCTTCATCTACGATCGCCTGCGCGGCCTGCTGCGCGAGCGCGGCTTTGCGCAGA
ACGAAGTGGAAGCCGTGGTGGCGCAGCAACCCGAGGTGCTGGACAACGTGGTGGAACG
TCTGCAAGCCGTGCAAGCCTTCGCCGCCCTGCCCGAAGCCGAGGCGCTGGCTGCGGCC
AACAAGCGCATCACCAACATCCTCAAGAAGATCGAGGGCGTGGCCATCGACGCTCATG
GCGCTGTGCAGGAAAGCCTGTTGCAGGAAGCGGCCGAGCAAGGTCTCTTCGCGGCCAT
GCAGACCACCCGCCCGCAGGTGAGGCGGCCTACGCCAAGGGCGACTTTGCCGGGGCC
TTGAAGGCGTTGGCGCAGCTGCGCCAGAATGTGACGCTTCTTCAACGACGTCATGG
TCAATGCCGAGGACGAGCAACTGCGCAAGAACCGCCAGGCCTTGCTGGCGGCGCTGCA
CGGCATGCTCAACCAGGTGCGCGACATCTCAAGCTGGCGGCGTAA GACCTGCGCCAC
CAGCCGTTTTTGCAGTACCGCTCCGCCGCGCATGGGCCTGTTCCCTGCGCGGCGGTGTT
CATGAAGGGAA GCCGCAGGCATGAAATTGATCATCCTCGATCGCGATGGCGTCATCAA
CCAGGATTCGGACGCCTTCATCAAGTCGCCCGACGAGTGGATCCCCATCAAGGGATCG
CTGGAAGCCATTGCGCGCCTGAACCAGGCCGGCTACCGGGTGGTGGTGGCGACCAACC
AGTCGGGCGTGGCGCGCGGCCTGTTGACATCAAGACCCTCAACGCCATCCACCAGAA
GATGCACACCGCCGCCAGCAGGCCGGGCGCGGACATCGATGCAGTGTCTTCTGCCCG
CACTCGGCCGATGACAATTGCGATTGCCGCAAGCCCAAGCCGGGCATGTTCCATGAGA
TCGCCAAGCGTTTCAATATCAGCCTGCGCGGCGGCGTGGTACGGTGGGCGATTTCGCT
GCGCGACCTGCAGGCCGGCTACGTGGCCGGTTGCGCACCCCTGCCTGGTGTGACCGGC
AAGGGCGAGAAGACCAGGCCAAGGGCGGCTTGCCGCCGGGCACGCTGGTCTTCCCGG
ATTTATCGGCCGTGGTTGATTTATC CCGGTGGTCGGCGTTTCGG TAGTG
CGGGCCATCCGCTTGGCTGCGGAGCCTGTCCATTACAACATCAACATGCCTAAGGCA
TGCGAGAAACGATTTCGCGCCTTGTCTGATTCTTCGTTCCGTGGTCTTTCATGGCCCT
CATGGCCGTGGCCACCATCATCTGGTCCTTCGCCTGCCTGCTGTGCGCGCCCTTCCCC
TATGCCAGCGCTACTGGTGGACCTCGCGCTGGAACGTCTTCGTGATCTGGACGGCGC
GCGTGATCTGCGGCATCCGTTACGAGATCCGCGGCGCCGAAAACCTCCCGGACGCCCC
GGTGATCCTGCTCTCCAAGCACCAGTCGGCCTGGGAGACCATCTTCTACGTCATCAAC
ATGCCGCGTCCGCTGGTGTTCGTGTTCAAGAAGGAACTGACCTACGTTCCCTTCTTCG
GCTGGGGCATCGCCCTGCTGCGCATGATCCCGATCGACCGCAAGAAGGGTCGCGACGC

CTTTGCCAGGTGCTGGAGCACGGCACGCGTCGTCTGCGCGATGGCCAGTGGATCATG
 ATGTTCCCCGAAGGCACGCGCACCAACCGTAGGCTCGCAGGGCAAGTACAAGGCCGGCG
 GTTCGCGCCTGGCGGTGGAAACCAACACGCTGGTTCGTGCCTATCGCGATGAACTCCGG
 CCAATGCTGGCCCAAGGGCAGCTTCATCAAGAAACCGGGGCTTATCACGGTATCCATC
 GGCAAGCCGATTTACCGGAAGGCTTGAATCCCCAGGAGTTGAACGAGCGCGTCGAAA
 ATTGGATAGAATCCGAGATGCGCGTGATTTCCGCCGACGTCTATAAAAACAGCGCGCC
 CCGGCCAGCCGCTTCAGCCGCTACTTCCAGCGATGCTGCACGGTCTTSAATCCTTAGCC
 AACAGCAACACAGGACGCCGCACTGCCCAATCCGGTGGTCCACGCCGCGCCGCTGCC
 CACGCCCTGATCCCCGACGTACCGGCGCCCGCCAGCCCGCTGCTGGCGCC

A sequência em azul representa o gene *glyQ*, seguida pelos genes *glyS* em rosa, *hisB* em laranja, *hdtS* em verde. Os códons de início de tradução estão destacados caixa verde e os códons de parada em caixa vermelho. Os prováveis sítios para ligação de ribossomo estão destacados em azul claro. Sequência promotoras -35/-10 estão destacadas em amarelo. Prováveis sequências atenuadoras e terminadoras de transcrição estão destacadas em rosa. A possível sequência operadora (*lux box*) está sublinhada na região promotora do provável gene *hdtS*.

As prováveis proteínas HdtS de *H. seropedicae* e de *P. fluorescens* estão relacionadas a família de aciltransferases do ácido lisofosfatídico, a qual inclui a proteína PlsC de *E. coli*. O motivo PlsC conservado foi identificado pelo programa ORF finder (item 4.20) em ambas as proteínas. O alinhamento das prováveis proteínas HdtS de *H. seropedicae* e *P. fluorescens* com o motivo PlsC presente na proteína de *E. coli* (COG0204) está mostrado na figura 21.

FIGURA 21. ALINHAMENTO DAS PROVÁVEIS PROTEÍNAS HdtS DE *Herbaspirillum seropedicae* E DE *Pseudomonas fluorescens* COM A PROTEÍNA PlsC DE *Escherichia coli* (COG0204)



HS: *H. seropedicae*; PF: *P. fluorescens*; EC: *E. coli*.

As seqüências de aminoácidos foram alinhadas pelo programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1997). Os traços nas seqüências indicam intervalos criados pelo programa ClustalW a fim de fornecer o melhor alinhamento entre as seqüências. Em destaque (caixa preta) os motivos conservados, os quais podem estar envolvidos na ligação do acil-CoA ou acil-ACP nestas proteínas.

Ácido lisofosfatídico (LPA) e ácido fosfatídico (PA) são fosfolípidos intermediários na biossíntese de membranas celulares. Em *E. coli*, o primeiro passo na via para a síntese de fosfolípido de membrana é catalisada pela glicerol-3-fosfato (G3P) aciltransferase (*plsB*). *PlsB* catalisa a transferência de uma cadeia acil a partir da acil-ACP ou acil-CoA, para a posição sn-1 do G3P para produzir LPA. A segunda enzima, LPA aciltransferase (*plsC*), catalisa a transferência de uma cadeia acil a partir

da acil-ACP ou acil-CoA para a posição sn-2 do LPA para produzir PA (COLEMAN, 1990; 1992). Withers e colaboradores (2001) propõem que HdtS de *P. fluorescens* transfira cadeias acil a partir de acil-ACP ou acil-CoA para um substrato tal como S-adenosilmetionina para gerar AHLs.

Em *E.coli*, PlsC é a única proteína conhecida com atividade LPA aciltransferase (ROCK *et al.*, 1981). Entretanto, em *Neisseria meningitidis*, pelo menos dois genes, *nlaA* (*neisserial LPA acyltransferase A*) e *nlaB* (*neisserial LPA acyltransferase B*) são homólogos ao gene *plsC* de *E. coli* e codificam enzimas com atividade LPA aciltransferase específica (SWARTLEY *et al.*, 1995). Os genes *nlaA* e *nlaB* são distintos um do outro, localizados em regiões cromossômicas diferentes.

Shih e colaboradores (1999) propõem que os dois motivos altamente conservados (N₈₀H₈₁Q₈₂S₈₃ e P₁₅₅E₁₅₆G₁₅₇T₁₅₈R₁₅₉) presentes nas proteínas LPA aciltransferases de diferentes microrganismos (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Borrelia burgdorferi* e *Saccharomyces cerevisiae*), podem representar um consenso cuja função é a ligação a acil-CoA ou acil-ACP nestas proteínas (Figura 21). Entretanto, os autores destacam as divergências presentes em NlaA e NlaB. Enquanto a proteína NlaA contém a seqüência NHVS e PEART a NlaB contém a seqüência KHGS e PEGTR (SHIH *et al.*, 1999) e mesmo assim exibem a mesma função. A provável proteína HdtS de *H. seropedicae* e a proteína NlaB de *N. meningitidis* apresentam a mesma seqüência conservada, KHGS e PEGTR.

5.6. Análise topológica da proteína HdtS de *H. seropedicae*

A localização celular das proteínas está diretamente relacionada à sua função, e a classificação destas em função de sua localização é um pré-requisito para maiores detalhes na predição estrutural (MITAKU & HIROKAWA, 1999; GARDY *et al.*, 2003). Desde o início dos anos 90, diversos programas para predição da localização celular de proteínas têm sido desenvolvidos e estão disponíveis na rede mundial de computadores (HOFMANN & STOFFEL, 1993; HIROKAWA *et al.*, 1998; SONNHAMMER *et al.*, 1998; GARDY *et al.*, 2003). Entretanto, estes programas

variam consideravelmente, podendo se basear em um ou múltiplos sinais de localização. Devido ao grupo de dados utilizados para instrução apresentarem diferentes tamanhos (a partir de 13 a mais de 1000 proteínas) e muitos conterem proteínas com sítios de localização anotados incorretamente, a acurácia destes programas é variável (GARDY *et al.*, 2003).

Seqüências sinais para exportação celular (peptídeos sinais) controlam a entrada de todas as proteínas nas vias secretoras tanto em eucariotos como em procariotos (VON HEIJNE, 1990; RAPOPORT, 1992). Se a seqüência de aminoácidos possui um peptídeo sinal, a proteína é translocada pela membrana e a presença de segmentos hidrofóbicos permite que a proteína se ancore na membrana ou não. Em geral, os peptídeos sinais compreendem de 18 a 35 resíduos de aminoácidos da região N-terminal da cadeia polipeptídica e são clivados enquanto a proteína é translocada através da membrana. A estrutura comum do peptídeo sinal de várias proteínas é descrita como uma região N-terminal carregada positivamente, seguida por uma região central hidrofóbica rica em resíduos como Phe, Ile, Leu, Met, Val e Trp e uma região C-terminal neutra mas polar, onde se localiza o sítio de clivagem (VON HEIJNE, 1983, 1985). KROGH e colaboradores (2001) salientam que a região hidrofóbica presente no peptídeo sinal pode ser facilmente confundida com uma região transmembrana pelos programas de predição de estrutura.

Para a determinação da localização celular das prováveis proteínas HdtS de *H. seropedicae* e *P. fluorescens*, suas seqüências de aminoácidos foram analisadas através de diferentes programas quanto a presença de peptídeo sinal (item 4.14). Segundo os programas TMpred e SOSUI, estas cadeias polipeptídicas não contém peptídeo sinal. Entretanto, o programa SignalP V 1.1, apontou peptídeo sinal em ambas as proteínas. A região da provável proteína Hdts de *H. seropedicae* predita neste programa compreende os 36 aminoácidos iniciais e seu sítio de clivagem sugerido é PYA-QR. Para a proteína HdtS de *P. fluorescens*, esta região inicia na posição 1 e seria clivada entre os aminoácidos 30 e 31: FFI-AP. Em virtude do baixo *escore* apontado pelo programa, estes dados não foram validados. Além disso, a análise das proteínas

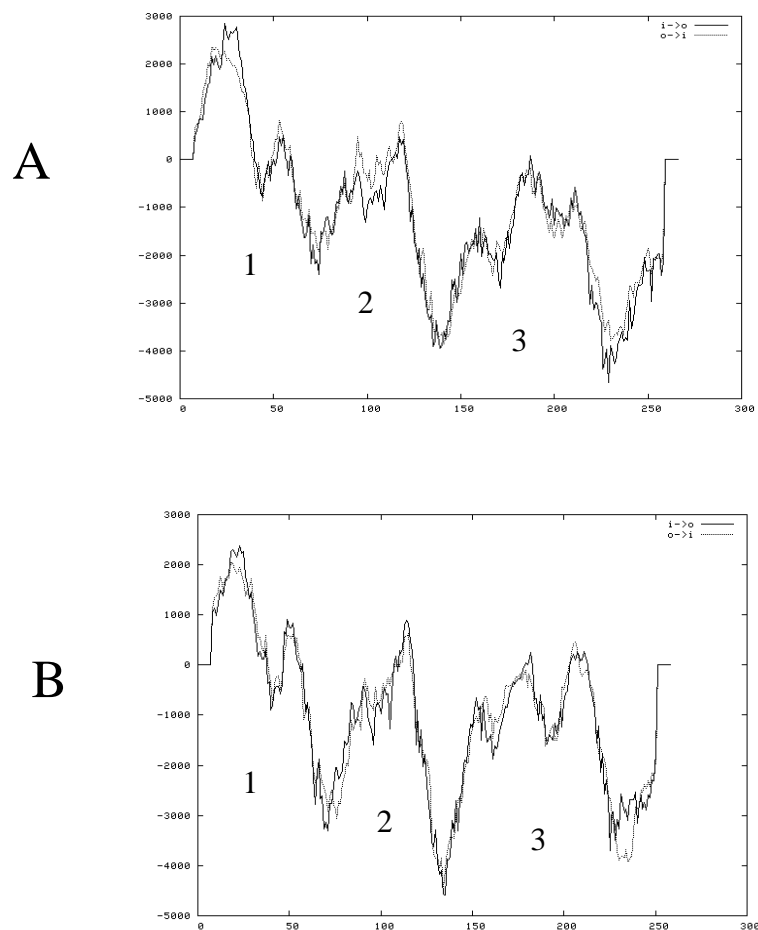
maduras, ou seja, após a clivagem do peptídeo sinal predito, classificou ambas as proteínas como citoplasmáticas.

A discriminação entre proteínas de membrana e proteínas solúveis pode ser realizada através de diferentes programas para predição de hélices transmembrana. Os métodos mais eficientes predizem não só as hélices transmembrana individuais, mas também a topologia da proteína, como por exemplo, o número de hélices transmembrana e a orientação destas em relação à membrana (VON HEIJNE, 1999). A hidrofobicidade de um segmento polipeptídico é considerado o fator mais importante na formação de hélices transmembrana. Entretanto, somente algumas hélices podem ser localizadas com segurança a partir da hidrofobicidade. Outro sinal associado com hélices transmembrana é a abundância de resíduos positivamente carregados na parte citoplasmática da seqüência, “o domínio citoplasmático positivo” (VON HEIJNE, 1986). Pela combinação das análises da tendência de cargas e da hidrofobicidade, melhores predições podem ser obtidas (ANDERSSON *et al.*, 1992).

O perfil de hidrofobicidade para as prováveis proteínas HdtS de *H. seropedicae* e *P. fluorescens* foi investigado pelo programa TMpred (item 4.14) e apresentou 3 regiões altamente hidrofóbicas em ambas as proteínas (Figura 22). A similaridade estrutural entre estas proteínas também pode ser vista no modelo topológico predito pelo programa TMHMM (Figura 23). Entretanto, este programa aponta ambas as proteínas como periplasmáticas. Este resultado é contraditório com a reação catalisada por esta proteína, pois o seu substrato – acil-ACP – é encontrado somente no citoplasma da célula (ROCK *et al.*, 1985).

A fim de solucionar este problema, as análises das estruturas secundárias de regiões transmembrana também foram realizadas através de diferentes programas computacionais (item 4.21). Contudo, os resultados encontrados foram divergentes, tanto no número de hélices quanto nas suas orientações, impedindo sua validação.

FIGURA 22. PERFIL DE HIDROFOBICIDADE DAS PROVÁVEIS PROTEÍNAS HdtS DE *Pseudomonas fluorescens* E *Herbaspirillum seropedicae*



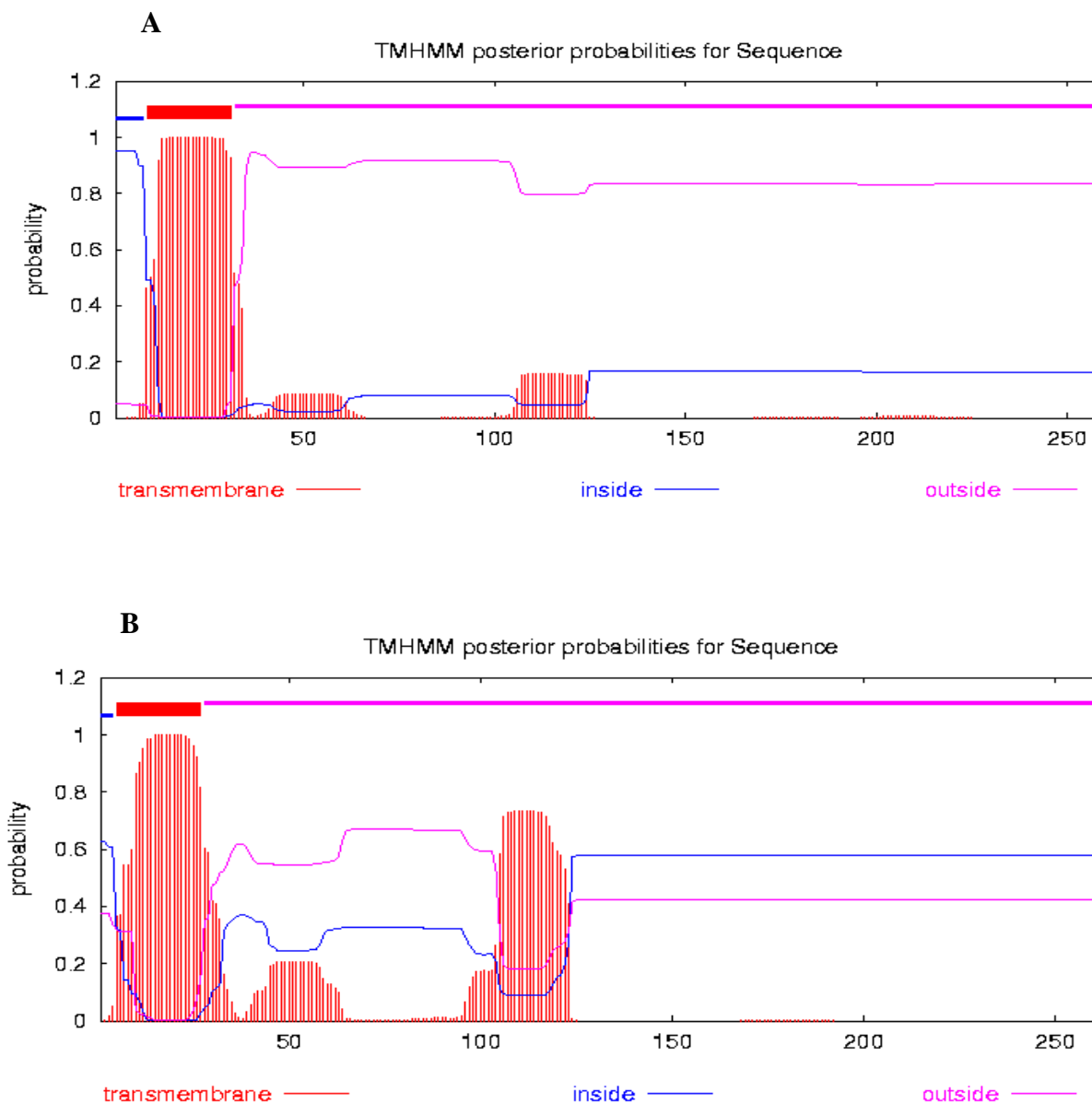
O perfil de hidrofobicidade das proteínas foi analisado pelo programa TMpred (item 4.14).

A. Provável proteína HdtS de *H. seropedicae*.

B. Provável proteína HdtS de *P. fluorescens*.

1; 2 e 3 correspondem a regiões hidrofóbicas

FIGURA 23. MODELO TOPOLÓGICO PREDITO PARA AS PROTEÍNAS HdtS DE *Pseudomonas fluorescens* e *Herbaspirillum seropedicae*



O modelo topológico foi obtido através do programa TMHMM (v. 2.0) (item 4.14)

A. Estruturas secundárias previstas na proteína HdtS de *P. fluorescens*

B. Estruturas secundárias previstas na proteína HdtS de *H. seropedicae*.

Transmembrane: regiões transmembrana; Inside: região citoplasmática; Outside: espaço periplasmático.

Quando se prediz a topologia de uma proteína de membrana através de programas computacionais, diferentes tipos de erros podem ocorrer (KROG *et al.*, 2001). Os erros mais simples são a predição de região transmembrana onde ela não está presente ou a omissão de região transmembrana verdadeira. Outro tipo de erro é a união de duas regiões transmembrana adjacentes, conseqüentemente sendo preditas como uma única e longa região transmembrana, chamada de “falsa união”. Similarmente, a longa região transmembrana pode ser falsamente predita como sendo duas pequenas regiões, então chamada de “falsa divisão”. A topologia global também pode ser predita como o inverso da topologia real, por exemplo, uma topologia invertida.

Considerando-se o perfil hidrofóbico e o modelo topológico predito pelo programa TMHMM, a estrutura das prováveis proteínas HdtS de *P. fluorescens* e *H. seropedicae* são muito similares. Entretanto, a localização celular destas proteínas não pode ser precisamente determinada através das análises computacionais empregadas.

5.7. Caracterização do provável gene *hdtS* de *Herbaspirillum seropedicae*

Pela análise dos resultados de similaridades entre o produto da ORF4 e a proteína HdtS de *P. fluorescens* F113, sugere-se que estas proteínas possam apresentar similaridade funcional. Assim, visando isolar a seqüência correspondente a ORF4, 8 clones da biblioteca genômica de *H. seropedicae* contendo seqüências homólogas à proteína HdtS de *P. fluorescens* F113 foram analisados (Quadro 5). Dentre estes, o clone HS05-HM-019-G09, com DNA inserto de 1,2 kb e contendo o provável gene *hdtS* de *H. seropedicae*, foi selecionado e passou a ser identificado como pG09. Este plasmídeo foi utilizado para mutagenizar o provável gene *hdtS* de *H. seropedicae* por inserção do transposon EZ::TNTM<TET-1>. O transposon EZ::TNTM<TET-1> consiste de um fragmento de 1,674 pb contendo o gene para resistência à tetraciclina (Tc^R) e sítios iniciadores nas extremidades que permitem a identificação de seu local de inserção através de seqüenciamento (EPICENTRE reagents & Kits for Genomics, Proteomics and RNA Research).

QUADRO 5. IDENTIFICAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE AHLs NO BANCO DE DADOS DE *Herbaspirillum seropedicae*.

IDENTIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA	DESCRIÇÃO	ORGANISMO	VALOR E	CONTIG
HS05-HM-00-000-019-G09.g	<i>N</i> -acilhomoserina lactona sintase	<i>P. fluorescens</i>	4e-48	279
HS05-MP-00-000-063-H07.g	<i>N</i> -acilhomoserina lactona sintase	<i>P. fluorescens</i>	2e-45	279
HS03-MH-00-000-064-H09.g	<i>N</i> -acilhomoserina lactona sintase	<i>P. fluorescens</i>	8e-23	279
HS17-NC-00-000-075-B02.g	<i>N</i> -acilhomoserina lactona sintase	<i>P. fluorescens</i>	8e-21	279
HS14-FP-00-000-030-H09.b	<i>N</i> -acilhomoserina lactona sintase	<i>P. fluorescens</i>	7e-18	279
HS03-RA-00-000-042-B03.g	<i>N</i> -acilhomoserina lactona sintase	<i>P. fluorescens</i>	9e-15	279
HS05-AF-00-000-065-C06.g	<i>N</i> -acilhomoserina lactona sintase	<i>P. fluorescens</i>	3e-09	279
HS18-HM-00-000-015-E09.B	<i>N</i> -acilhomoserina lactona sintase	<i>P. fluorescens</i>	4e-09	279

As seqüências de aminoácidos deduzidas dos clones identificados foram analisadas pelo programa BlastP (ALTSCHUL *et al.*, 1997) quanto ao grau de similaridade com proteínas de outros microrganismos depositadas no banco de dados GenBank.

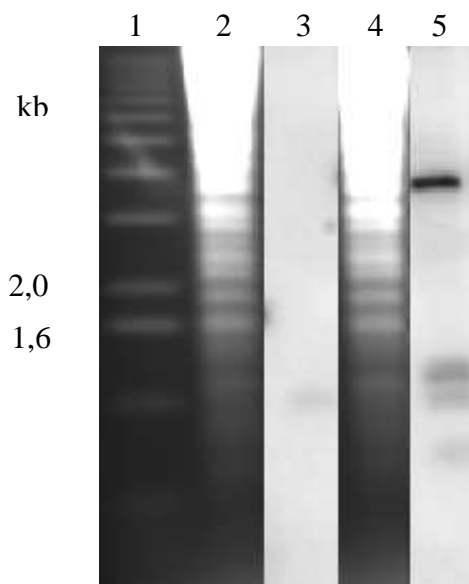
Após o ensaio de mutagênese (item 4.17) duzentas colônias de *E. coli*(pG09) resistentes a tetraciclina foram isoladas. Destas, oito colônias tiveram seus plasmídeos purificados e identificados: pG09.B1 a pG09.B8. A posição do transposon no gene *hdtS* foi determinada por seqüenciamento e análises do perfil de restrição (item 4.16). O plasmídeo identificado como pG09.B6 (*hdtS*::Tn), que contém o transposon inserido entre os nucleotídeos G₅₁₈ e G₅₁₉, foi inserido por eletroporação em células de *H. seropedicae* SMR1 (item 4.8.2.2). Quinze colônias de *H. seropedicae* SMR1 resistentes à tetraciclina foram selecionadas. Estas colônias possivelmente adquiriram, através de recombinação homóloga, o gene *hdtS*::Tn. Estes prováveis mutantes constituem a série ATmut1 a ATmut15.

A confirmação da inserção e da localização do *hdtS*::Tn no DNA cromossomal de *H. seropedicae* foi obtida por hibridização. O DNA cromossomal de quatro prováveis mutantes foi isolado (item 4.18), digerido com a enzima de restrição *Nru*I (item 4.7) e hibridizado com o DNA do plasmídeo pG09.B6 (*hdtS*::Tn) digerido e marcado radioativamente com P³² (item 4.19.3). A escolha da enzima de restrição *Nru*I para clivagem do DNA cromossomal baseou-se no mapa de restrição da região

contendo o gene *hdtS* (obtido no sítio eletrônico [www. arabidopsis.org/tools](http://www.arabidopsis.org/tools)) e do transposon (EPICENTRE reagents & Kits for Genomics, Proteomics and RNA Research).

O padrão diferenciado de hibridização do DNA cromossomal da estirpe selvagem e dos mutantes confirmou a inserção do transposon no gene *hdtS* de *H. seropedicae* (Figura 24). O fragmento previsto de 0,965 kb *NruI/NruI* contendo a região N-terminal do gene *hdtS* é visualizado na coluna correspondente ao DNA cromossomal da estirpe selvagem. Todos os mutantes apresentaram o mesmo perfil de hibridização, exibindo uma banda de 0,965 kb similar ao selvagem e outras três bandas diferenciais. O conhecimento do tamanho dos fragmentos hibridizados nos mutantes permitiu concluir que a inserção ocorreu por simples recombinação.

FIGURA 24. PERFIL DE HIBRIDIZAÇÃO DAS ESTIRPES SMR1 (SELVAGEM), ATmut1 (PROVÁVEL MUTANTE) DE *Herbaspirillum seropedicae* COM O PLASMÍDEO pG09.B6 MARCADO COM [³²P].



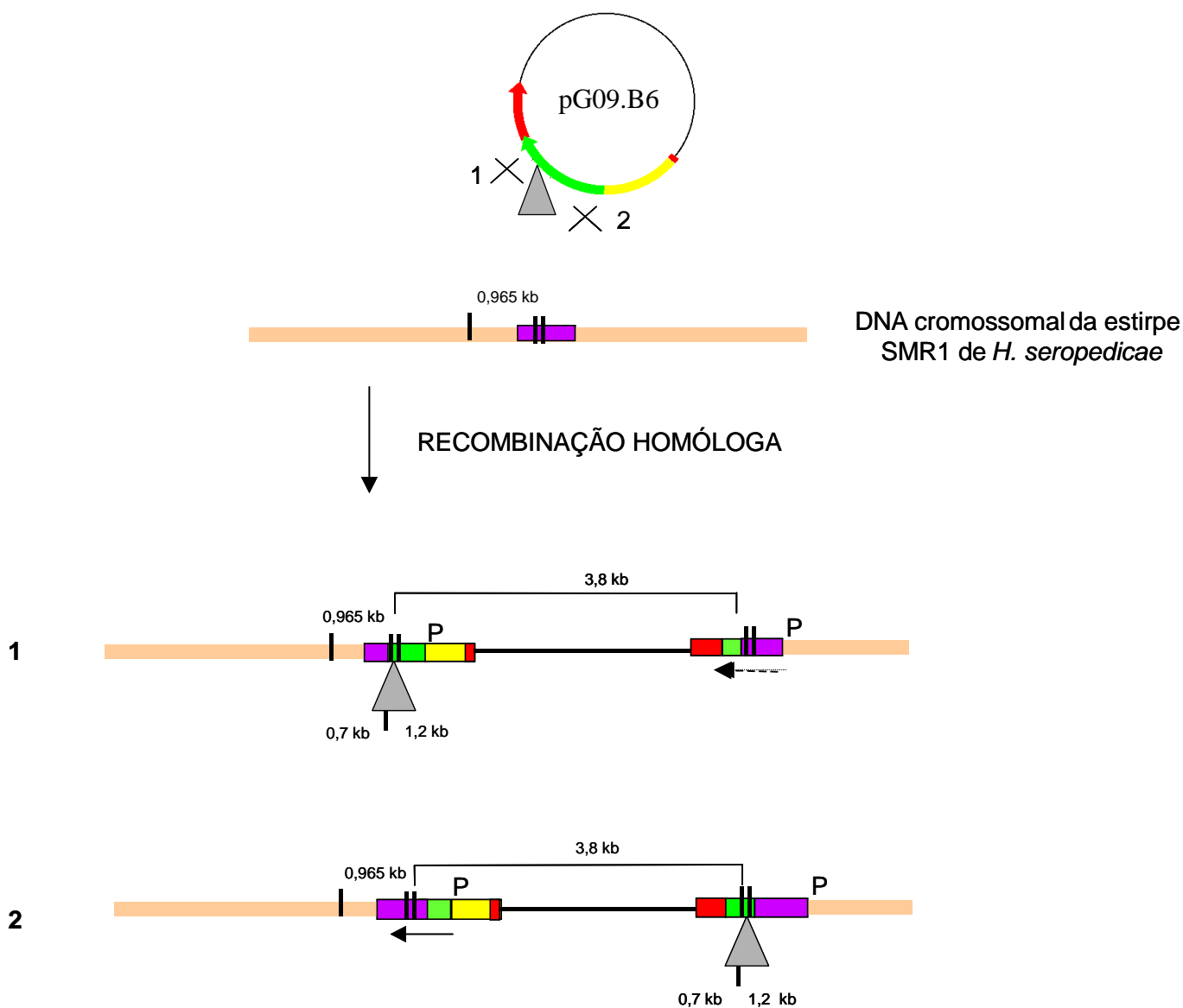
O DNA cromossomal de quatro prováveis mutantes foi isolado (item 4.6), digerido com a enzima de restrição *NruI* (item 4.7) e hibridizado com o DNA do plasmídeo pG09.B6 (*hdtS::Tn*) digerido e marcado radioativamente com P³² (item 4.14.3). Todos os mutantes apresentaram o mesmo perfil de hibridização, exibindo uma banda de 0,965 kb similar ao selvagem e outras três bandas diferenciais.

- 1-Padrão de peso molecular 1 kb ladder ,
- 2-DNA cromossomal da estirpe SMR1 de *H. seropedicae* clivado com *NruI*,
- 3- Autoradiografia do 2,
- 4- DNA cromossomal da estirpe ATmut1 de *H. seropedicae* clivado com *NruI*,
- 5-Autoradiografia do 4

Na figura 25 estão apresentadas as duas formas possíveis de recombinação homóloga entre o plasmídeo pG09.B6 e o DNA cromossomal da estirpe SMR1 de *H. seropedicae*. Como pode ser visto, a inativação do provável gene *hdtS* seria possível somente na situação 1, a qual geraria uma cópia *hdtS*:Tn e uma segunda cópia com o gene *hdtS* incompleto. Ambas as cópias estariam inativas. A simples recombinação decorrente da situação 2 geraria uma cópia funcional do gene *hdtS* e provavelmente, nenhuma modificação no seu fenótipo. A clivagem com *NruI* não permitiu a diferenciação entre as duas possibilidades de recombinação, pois em ambos os casos os fragmentos produzidos e visualizados na hibridização são idênticos. A confirmação da forma de recombinação homóloga ocorrida na série Atmut1 a Atmut15 foi realizada através da amplificação do DNA cromossomal com os primers que alinham nas extremidades do transposon (item 4.20). Um fragmento de aproximadamente 200 pb foi detectado em todas as amostras analisadas (Figura 26) o que mostra que a recombinação aconteceu após simples permuta conforme o esquema 2 da figura 25.

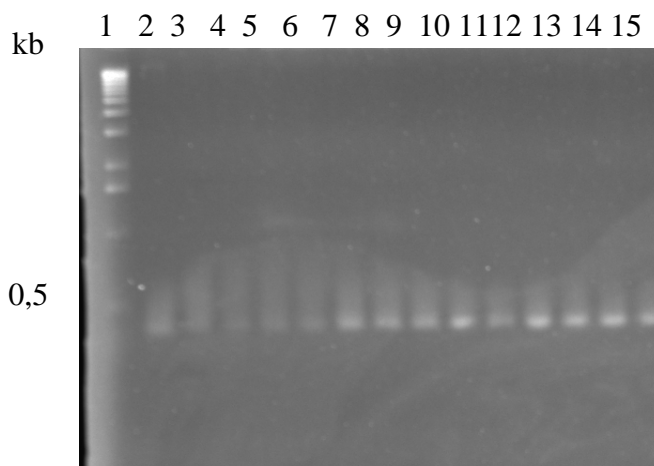
Portanto, a série de prováveis mutantes analisados (ATmut1 a ATmut15) apresenta uma cópia funcional do gene *hdtS*. Desta forma espera-se que, se esta enzima estiver envolvida na síntese de AHLs, nenhuma modificação no fenótipo seja detectada em ensaios envolvendo estes mutantes. Isto foi confirmado pelos resultados obtidos das análises dos extratos das culturas da série de mutantes *hdtS*::Tn por TLC. A AHL-I continuou sendo detectada pelo sistema de detecção *A. tumefaciens* NT1(pNTLR4) (Figura 27). Assim, são necessários novos ensaios de mutagênese para se obter mutantes que permitam confirmar a participação deste gene na síntese de AHLs em *H. seropedicae*.

FIGURA 25. ESQUEMA DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON EZ::TNTM<TET-1> NO GENE *hdtS* CROMOSSOMAL DE *H. seropedicae*.



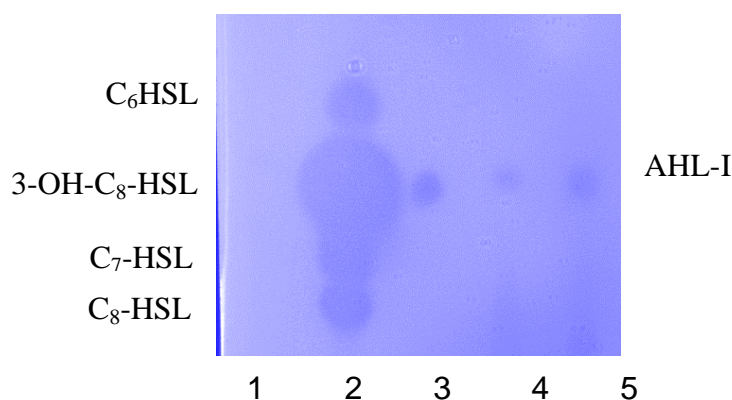
A inserção do transposon ocorreu por simples recombinação. As barras em verde e roxo representam o gene *hdtS* presente no DNA inserto do plasmídeo pG09.B6 e no DNA cromossomal de *H. seropedicae*, respectivamente. A barra amarela presente no plasmídeo pG09.B6 representa o DNA inserto e a barra vermelha indica o gene *lacZ*. O triângulo representa o transposon. Linhas pretas, sítio de restrição para *NruI*. P, região promotora do gene *hdtS*. A flecha inteira indica a posição e a orientação do gene *hdtS* e a flecha tracejada indica que somente parte do gene *hdtS* está presente.

FIGURA 26. CONFIRMAÇÃO DA FORMA DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA DOS PROVÁVEIS MUTANTES



O DNA cromossomal da série de prováveis mutantes Atmut1 a Atmut15 foi amplificado pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (KOCHER & WILSON, 1991) com os primers “Forward” e “Reverso” (EPICENTRE reagents & Kits for Genomics, Proteomics and RNA Research) (item 4.20). Um fragmento de aproximadamente 200 pb foi detectado em todas as amostras analisadas.

FIGURA 27 - DETECÇÃO DE AHLs NOS PROVÁVEIS MUTANTES



R. leguminosarum 8401 foi cultivado em meio TY até D.O._{600 nm} de 0,8 (item 4.4). As estirpes ATmut1, ATmut2 e ATmut3 de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHP até D.O._{600 nm} 1,6 (item 4.4). AHLs extraídas a partir do sobrenadante destas culturas (item 4.9.4.1) foram separadas por TLC e reveladas pelo sistema de detecção *A. tumefaciens* NT1(pNTLR4) (item 4.9.4.2).

1- 30 µL de extrato equivalente a 100 mL de meio NFbHP estéril (controle negativo)

2 - 3 µL de extrato de *R. leguminosarum* 8401 (controle positivo)

3 - 30 µL de extrato de *H. seropedicae* ATmu1

4 - 30 µL de extrato de *H. seropedicae* ATmu2

5 - 30 µL de extrato de *H. seropedicae* ATmut3

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho sugerem:

1. a produção de duas moléculas sinais, as quais foram denominadas AHL-I e AHL-II, que ativam o sistema sensor *A. tumefaciens* NT1 (pNTLR4), e provavelmente envolvendo um ativador de transcrição sensível a 3-OH-C8-HSL, 3-O-C8-HSL e 3-OH-C14-HSL em *H. seropedicae*;
2. a existência de um provável sistema de sensoriamento populacional em *H. seropedicae* modulado por AHLs;
3. a produção de AHL em *H. seropedicae* é fortemente influenciada pelo meio de cultivo, como em outros organismos;
4. a síntese de AHL em *H. seropedicae* é provavelmente catalisada por uma proteína homóloga a proteína HdtS de *P. fluorescens*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUS, A.M.; PESCI, E.C.; RUNYEN-JANECKY, L.J.; WEST, S.E.H.; IGLEWSKI, B.H. Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*, **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 3928-3935, 1997.

ALT-MORBE, J.; STRYKER, J.L.; FUQUA, C.; FARRAND, S.K.; WINANS, S.C. The conjugal transfer system of *A. tumefaciens* octopine-type Ti-plasmids is closely related to the transfer system of an IncP plasmid and distantly related to Ti plasmid *vir* genes, **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 4248-4257, 1996.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANDERSEN, J.B.; HEYDORN, A.; HENTZER, M.; EBERL, L.; GEISENBERGER, O.; CHRISTENSEN, B.B.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. *gfp*-based *N*-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication, **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 575-585, 2000.

ANDERSSON, H.; BAKKER, E.; VON HEIJNE, G. Different positively charged amino acids have similar effects on the topology of a polytopic transmembrane protein in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** v.. 267,n. 3, p. 1491-1495, 1992.

BAINTON, N.J.; BYCROFT, B.W.; CHHABRA, S.R.; SSTEAD, P.; GLEDHILL, L.; HILL, P.J.; REES, C.E.D.; WINSON, M.K. SALMOND, G.P.C.; STEWART, G.S.A.B.; WILLIAMS, P. A general role for the *lux* autoinducer in bacterial cell signalling control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*, **Gene**, v. 116, p. 87-91, 1992.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium, **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, ^a; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum* comb. Nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, p. 802-810, 1996.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. D. L.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry.**, v. 29, p. 911-92, 1997.

BARON, C.; ZAMBRYSKI, P.C. The plant response in pathogenesis, symbiosis and wounding: variations on a common theme? **Annual Review of Genetics**. v. 29, p. 107-129, 1995.

BASSLER, B.L.; WRIGHT, M.; SHOWALTER, R. E.; SILVERMAN, M. R. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence, **Mol. Microbiol.**, v. 9, n. 4, p. 773-86, 1993.

BASSLER, B.L. Small talk: Cell-to-cell communication in bacteria,. **Cell**, v. 109, p. 421-424, 2002.

BEMILLER JN, GILSON RJ, MYERS RW, SANTORO MM. Suicide-substrate inactivation of beta-galactosidase by diazomethyl beta-D-galactopyranosyl ketone. **Carbohydr Res**. v. 250, n 1, p.101-112,1993.

BODDEY, R. M.; MORAES SÁ, J. C.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. **In: International Symposium - Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation**. Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil, 1995. p. 787-799,

BOYLAN, M.; GRAHAM, A.F.; MEIGHEN, E.A. Functional identification of the fatty acid reductase components encoded in the luminescence operon of *Vibrio fischeri*, **J. Bacteriol.**, v. 163, p. 1186-1190, 1985.

BRELLES-MARIÑO, G.; BEDMAR, E. J. *Bradyrhizobium japonicum* produces sensorial population signal molecules, **Abstract S7-P8**. 4th. European Nitrogen Fixation Conference, Seville, Spain, 2001.

BRINT, J.M.; OHMAN, D.E. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family, **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 7155-7163, 1995.

CAO, J.G.; MEIGHEN, E. A. Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*, **J. Biol Chem.**, v. 25; p. 21670-6, 1989.

CALLAHAM, D. A.; TORREY, J.G. The structural basis of infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*, **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 1647-1664, 1981.

CÂMARA, M.; DAYKIN, M.; CHHABRA, S.R. Detection, purification, and synthesis of *N*-acyl-homoserine lactone quorum sensing signal molecules, **Methods Microbiol.**, v. 27, p. 319-330, 1998.

CALLAHAN, S. M.; DUNLAP, P. V. LuxR- and acyl-homoserine-lactone-controlled non-lux genes define a quorum-sensing regulon in *Vibrio fischeri*. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 10, p. 2811-2822, 2000.

CHA, C.; GAO, P.; CHEN, Y.C.; SHAW, P.D.; FARRAND, S.K. Production of acyl-homoserine lactone sensorial and populational signals by gram-negative plant-associated bacteria, **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 11, p. 1119-1129, 1998.

CHANCEY, S.T.; WOOD, D.W.; PIERSON, L.S. Two-component transcriptional regulation of *N*-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*, **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 6, p. 2294-9, 1999.

CHAPON-HERVÉ, V.; ARKIM, M.; LATIFI, A.; WILLIAMS, P.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M. Regulation of the *xcp* secretion pathway by multiple quorum sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Microbiol.**, v. 24, p. 1169-1178, 1997.

COLEMAN, J. Characterization of *Escherichia coli* cells deficient in 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 17215-17221, 1990.

COLEMAN, J. Characterization of the *Escherichia coli* gene for 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase. **Mol. Gen. Genet.**, v. 232, p. 295-303, 1992..

CRISTOPHER, W. N.; EDGERTON, C.W. Bacterial stripe diseases of sugar cane in Louisiana, **Journal of Agriculture Research**, v. 41, p. 259, 1932.

CUBO, M.T.; ECONOMON, A.; MURPHY, G.; JOHNSTON, A.W.B.; DOWNIE, J.A. Molecular characterisation and regulation of the rhizosphere-expressed genes *rhiABCR* that can influence nodulation by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 4026-4035, 1992.

DANIELS, R.; DE VOS, D.E.; DESAIR, J.; RAEDSCHELDERST, G.; LUYTEN, E.; ROSEMEYER, V.; VERRETH, C.; SCHOETERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; MICHELS, J. The *cin* quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 462-468, 2001.

EBERHARD, A. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis, **J. Bacteriol.**, v. 109, p. 1101-1105, 1972.

EBERHARD, A.; BURLINGAME, A.L., EBERHARD, C., KENYON, G.L., NEALSON, K.H., OPPENHEIMER, N.J. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase, **Biochemistry**, v. 20, p. 2444-2449, 1981.

EBERHARD, A, LOGIN, T.; WIDRIG, C.A.; STRANICK, S.J. Synthesis of the *lux* gene autoinducer in *Vibrio fischeri* is positively autoregulated, **Arch. Microbiol.**, v. 155, p. 294-297, 1991.

EBERL, L. *N*-Acyl homoserine lactone-mediated gene regulation in Gram-negative bacteria, **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 22, p. 493-506, 1999.

ENGBRECHT, J.; SILVERMAN, M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 4154-4158, 1984.

EGLAND, K.A.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter, **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 1197-1204, 1999.

FARRAND, S.K.; HWANG, I.; COOK, D.M. The *tra* region of the nopaline-type Ti plasmid is a chimera with elements related to the transfer systems of RSF1010, RP4 and F. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 7089-7097m, 1996.

FREEMAN, J. A.; LILLEY, B. N.; BASSLER, B. L. A genetic analysis of the functions of LuxN: a two-component hybrid sensor kinase that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. **Mol Microbiol.** v. 35, n.1, p.139-149, 2000.

FREEMAN JA, BASSLER BL. A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. **Mol Microbiol.**, v.31, n. 2, p. 665-677, 1999.

FUQUA, W.C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators, **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 269-275, 1994.

FUQUA, C.; BURBEA, M.; WINANAS, S.C. Activity of the *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer regulator TraR is inhibited by the product of the *traM* gene, **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 1367-1373, 1995.

FUQUA, C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E. P. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators, **Annu. Rev. Microbiol.**, v.50, p.727-51, 1996.

FUQUA, C.; GREENBERG, E.P. Listening in on Bacteria: Acyl-homoserine lactone signalling, **Nature Reviews Molecular Cell Biology.**, v. 3, p. 685-695, 2002.

GAMBELLO, M.J. & IGLEWSKI, B.H. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 3000-3009, 1991.

GILSON, L.; KUO, A.; DENLAP, P.V. AinS and a new family of autoinducer synthase proteins. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 375-382, 1995.

GLENN, A. R.; DILWORTH, M.J. Ammonia movements in rhizobia. *Microbiological Sciences*, v. 2, p. 161-167, 1985.

GRAF, J.; RUBY, E.G. Host-derived amino acids support the proliferation of symbiotic bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 95, p. 1818-1822, 1998.

GRAY, K.M.; PEARSON, J.P.; DOWNIE, J.A.; BOBYE, B.E.A.; GREENBERG, E.P. Cell-to-cell signaling in the symbiotic nitroge-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarium*: autoinduction of a stationary phase and rhizosphere-expressed genes. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 372-376, 1996.

HALE, C.N.; WILKIE, J.P. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. **New Zeland Journal of Agricultural Research**, v. 15, p. 448-456, 1972.

HANSELKA, B.L.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing in *Vivrio fischeri*: evidende que *S*-adenolsylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis, **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 5291-5294, 1996.

HIROKAWA T, BOON-CHIENG S, MITAKU S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. **Bioinformatics**, v. 14, n. 4, p.378-379, 1998.

HOFMANN, K.; STOFFEL, W. PROFILEGRAPH: an interactive graphical tool for protein sequence analysis, **Comput. Appl. Biosci.**, v. 8, n. 4, p. 331-7, 1993.

HOOYAKAS, P.J.; SCHILPEROORT, R.A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering, **Plant. Mol. Biol.**, v. 19, p. 15-38, 1992.

HUREK T, REINHOLD-HUREK B, VAN MONTAGU M, KELLENBERGER E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses, **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 7, p. 1913-23, 1994.

HWANG, I.; LI, P. L.; ZHANG, L., PIPER, K. R.; COOK, D. M.; TATE, M. E.; FARRAND, S.K. TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A.** , v. 91, n. 11, p. 4639-4643, 1994.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs, **Critical Review in Plant Sciences.**, v. 17, p. 77-119, 1998.

JONES, S.; YU, B.; BAINTON, N.J.; BIRDSALL, M.; BYCROFT, B.W.; CHHABRA, S.R.; COX, A.J.R.; GOLBY, P.; REEVES, P.J.; STEPHENS, S.; WINSON, M.K.; SALMOND, G.P.C.; STEWART, G.S.A.B.; WILLIAMS, P. The *lux* autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*, **EMBO J.**, v. 12, p. 2477-2482, 1993.

JOOS, H.; INZE, D.; CAPLAN, A.; SORMANN, M.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls, **Cell**, v. 32, n. 4, p. 1057-67, 1983

KADO, C. I.; LIU, S. T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids, **J. Bacteriol.**, Washington, v. 145, n. 3, p. 1365-73, 1981.

KAPLAN, H.B.; GREENBERG, E.P. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system, **J. Bacteriol.**, v. 163, p. 1210-1214, 1985.

KAPLAN, H.B.; GREENBERG, E.P. Overproduction and purification of the *lux* gene product: transcriptional activator of the *Vibrio fischeri* luminescence system, **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v. 84, p. 6639-6643, 1987.

KENG, T., WEBSTER, T. A., SAUER, R. T., SCHIMMEL, P. Gene for *Escherichia coli* glycyl-tRNA synthetase has tandem subunit coding regions in the same reading frame. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 21, p. 12503-12508, 1982.

KLASSEN, G. **Análise genética e funcional dos genes *nifENXorf1orf2*, *nifQmodABCfixXC* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2000. 148 f. Tese de doutorado em Ciências Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

KLEEREBEZEM, M.; QUADRI, L.E.N.; KUIPERS, O. P.; de VOS, W.M. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction system in Gram-positive bacteria, **Mol. Microbiol.**, v. 24, p. 895-904, 1997.

KLOEPPER, J.W.; MAHAFFEE, W.; McINROY, J. A.; BACKMAN, P. A. Comparative analysis of methods for recovering plant growth-promoting rhizobacteria from roots, **Canadian Journal of Microbiology.**, v. 37, p. 953-957, 1991.

KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP, C. J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria, **Canadian Journal of Microbiology.**, v. 38, p. 1219-1232, 1992.

KÖHLER, T.; CURTY, L.K.; BARJA, F.; VAN DELDEN, C.; PECHERE, J.C. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili, **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 5990-5996, 2000.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G., SONNHAMMER, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **J. Mol. Biol.** v. 305, n. 3, p.567-80, 2001

LATIFI, A.; FOGLINO, M.; TANAKA, K.; WILLIAMS, P.; LAZDENSKI, A. A hierarchical quorum sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary phase sigma factor RpoS, **Mol. Microbiol.**, v. 21, p. 1137-1146, 1996.

LAUE, B.E.; JIANG, Y.; CHHABRA, S.R.; JACOB,S.; STEWART, G.S.A.B.; HARDMAN, A.; DOWNIE, J.A.; O'GARA, F.; WILLIAMS, P. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium small* bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-*cis*-tetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acyl-homoserine lactone synthase, **Microbiology**, v. 143, p. 3703-3711, 2000.

LILLEY, B. N.; BASSLER, B. L. Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. **Mol Microbiol.**,v. 36, n. 4, p. 940-954, 2000.

LIPPINCOTT, J. A.; BEIDERBECK, R.; LIPPINCOTT, B. B. Utilization of Octopine and Nopaline by *Agrobacterium*, **J. Bacteriol.**, v. 116, n. 1, p. 378–383,1973.

LITHGOW, J.K.; WILKINSON, A.; HARDMAN, A.; RODELAS, B.; WISNIEWSKI- DYÉ, F.; WILLIAMS, P.; DOWNIE, J.A. The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of sensorial and populational loci, **Mol. Microbiol.**, v. 37, p. 81-97, 2000.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 1951 Nov;193(1):265-75.

MARTIN M, SHOWALTER R, SILVERMAN M. Identification of a locus controlling expression of luminescence genes in *Vibrio harveyi*. **J Bacteriol.**, v. 171, n. 5, p. 2406-2414, 1989.

MCCLEAN, K.H.; WINSON, M.K.; FISH, L.; TAYLOR, A.; CHHABRA, S.R.; CAMARA, M.; DAYKIN, M.; LAMB, J.H.; SWIFT, S.; BYCROFT, B.W.; STEWART, G.S.A.B.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. **Microbiology**, v.143, p. 3703-3711, 1997.

MCKNIGHT SL, IGLEWSKI BH, PESCI EC. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*, **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 10, p. 2702-8, 2000.

MILTON, D.C.; CHALKER, V.J.; KIRKE, D.; HARDMAN, A.; CAMARA, M.; WILLIAMS, P. The LuxM homologue VanM from *Vibrio anguillarum* direct the synthesis of *N*-(3-hydroxyhexanoyl)homoserine lactone and *N*-hexanoylhomoserine lactone. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 3537-3547, 2001.

MITAKU, S.; HIROKAWA, T. Physicochemical factors for discriminating between soluble and membrane proteins: hydrophobicity of helical segments and protein length, **Protein Eng.**, v. 12, n. 11, p. 953-7, 1999.

MORÉ, M.I.; FINGER, D.; STRYKER, J. L.; FUQUA, C.; EBERHARD, A.; WINANS, S.C. Enzymatic synthesis of a sensoriumo populacional autoinducer through use of defined substrates, **Science**, v., 272, p. 1655-1658, 1996.

NEALSON, K.H.; PLATT, T.; HASTINGS, J.W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system, **J. Bacteriol.**, v. 104, p. 313-322, 1970.

NECAS, T.I. & IGLEWSKI, B.H. The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, **J. Microbiol.**, v. 31, p. 387-392, 1985.

NESTER, E. W.; KOSUGE, T. Plasmids specifying plant hyperplasias. **Annu Rev Microbiol.** , v. 35, p. 531-65, 1981.

NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S., VON HEIJNE, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein Engineering**, v. 10, p. 1-6, 1997.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. In roots, stems and leaves predomiantly of Graminea, **Biology and Fertility of Soils.**, v. 21, p. 197-200, 1996.

OCSHNER, U.A.; KOCH, A.K.; FIECHTER, A.; REISER, J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactatne synthesis in *Pseusomonas aeruginosa*, **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 2044-2054, 1994.

PARSEK, M.R.; VAL, D.L.; HANZELKA B.L.; CRONAN, J. E. JR.; GREENBERG, E. P. Acylhhomoserine-lactone quorum sensing signal generation, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v.96, p. 4360-4365, 1999.

PASSADOR, L.; COOK, J.M.; GAMBELLO, M.T.; RUST, L.; IGLEWSKI, B.H. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication, **Science**, v. 260, p. 1127-1133, 1993.

PEARSON, J.P.; GRAY, K.M.; PASSADOR, L.; TUCKER, K.D.; EBERHARD, A.; IGLEWSKI, B.H.; GREENBERG, E.P. Struture of the autoinducer required for

expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Usa, v. 91, p. 197-201, 1994.

PEREGO, M.; HOCH, J. A. Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, U S A, v. 20, p. 1549-53, 1996.

PESCI, E.C.; PEARSON, J.P.; SEED, P.C.; IGLEWSKI, B.H. Regulation of *las* e *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*, **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 3127-3132, 1997.

PESCI EC, MILBANK JB, PEARSON JP, MCKNIGHT S, KENDE AS, GREENBERG EP, IGLEWSKI BH. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, U S A, v. 28, n. 20, p.11229-34, 1999.

PESSI, G.; HAAS, D. Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum sensing regulators LasR and RhIR in *Pseudomonas aeruginosa*, **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 6940-6949, 2000.

PIPER, K.R.; BECK von BODMAN, S.; FARRAND, S.K. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinducer, **Nature**, v. 362, p. 448-450, 1993.

RAPOPORT TA. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. **Science**. v. 258, n. 5084, p. 931-936, 1992.

RIEDEL, K.; HENTZER, M.; GEISENBERGER, O.; HUBER, B.; STEIDLE, A.; WU, H.; HØIBY, N.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; EBERL L. *N*-Acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms, **Microbiology**, v. 147, p. 3249-3262, 2001.

ROCK CO, CRONAN JE JR, ARMITAGE IM. Molecular properties of acyl carrier protein derivatives. **J. Biol. Chem.**, v. 256, n. 6, p. 2669-2674, 1981.

RODELAS, B.; LITHGOW, J.K.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; HARDMAN, A.; WILKINSON, A.; ECONOMON, A.; WILLIAMS, P.; DOWNIE, J.A. Analysis of sensoriumo populacional dependent control of rhizosphere-expressed (*rhi*) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 3816-3823, 1999.

RONCATO-MACCARI, L. D. B. **Colonização de Gramíneas por *Herbaspirillum seropedicae* e expressão de genes *nif* ‘in planta’**. Curitiba, 2003. 93 f. Tese de doutorado em Ciências Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ROSEMEYER, V.; MICHIELS, J.; VERRETH, C.; VANDERLEYDEN, J. *luxI*- and *luxR*-homologues genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*, **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 815-821, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, D.C., v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHAEFER, A.L.; VAL, D.L.; HANZELKA, B.L.; CRONAN JR, J.E.; GREENBERG, E.P. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein, **Proc. Natl. Acad. Sci., USA.**, v.93, p. 9505-9509, 1996.

SCHLOTTER, M.; WIEHE, W.; ASSMUS, B.; STEINDL, H.; BECKE, H.; HÖFLICH, G.; HARTMANN, A. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studie with monospecific polyclonal antisera, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2038-2046, 1997.

SCHRIPSEMA, J.; de RUDDER, K.E.E.; van VLIET, T.B.; LANKHORST, P.P.; de VROOM, E.; KIJNE, J.W.; van BRUSSEL, A.A.N. Bacteriocin *small* of *Rhizobium leguminosarum* belongs to the class of *N*-acyl-*L*-homoserine lactone molecules, known as autoinducers and as quorum sensing co-transcription factors, **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 366-371, 1995.

SHAW, P.D.; PING, G.; DALY, S.L.; CHA, C.; CRONAN JR., J.E.; RINEHART, K.L.; FARRAND, S.K. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, D.C., v. 94, p. 6036-6041, 1997.

SHIH, G. C.; KAHLER, C. M.; SWARTLEY, J. S.; RAHMAN, M. M.; COLEMAN, J.; CARLSON, R. W.; STEPHENS, D. S. Multiple lysophosphatidic acid acyltransferase in *Neisseria meningitidis*. **Mol. Microb.**, v. 32, n. 5, p. 942-952, 1999.

SLOCK J, VANRIET D, KOLIBACHUK D, GREENBERG EP. Critical regions of the *Vibrio fischeri luxR* protein defined by mutational analysis, **J. Bacteriol.** v. 172, n. 7, p. 3974-9, 1990.

SMITH, R. S. Legume inoculant formulation and application, **Canadian Journal of Microbiology.**, v. 38, p. 485-492, 1992.

SOMASEGARAN, P., HOBEN, H. J. **Handbook for Rhizobia: methods in Legume-Rhizobium Technology**. Springer-Verlag New York, Inc., 1994

SONNHAMMER, E. L.; EDDY, S. R.; BIRNEY, E.; BATEMAN, A.; DURBIN, R. Pfam: multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains. **Nucleic Acids Res.** v. 26, n. 1, p. 320-322, 1998.

SOUZA, E.M.; MACHADO, H.B.; YATES, M.G. Deletions analysis of the promoter region of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae*. In: TIKHONOVICH, I.A.; PROVAROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E. (eds), Nitrogen Fixation: Fundamentals and applications. X International Congress on Nitrogen fixation. **Resumo**. St. Petesburg. 1995, p. 260.

SPAINK, H.P.; OKKER, R.J.H.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E.; LUGTENBERG, B.J.J. Promoters in the nodulation region of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI, **Plant. Molec. Biol.**, v. 9, p. 27-39, 1987.

STEIDLE, A.; SIGL, K.; SCHUHEGGER, R.; IHRING, A.; SCHMID, M.; GANTNER, S.; STOFFELS, M.; RIEDEL, K.; GIVSKOV, M.; HARTMANN, A.; LANGEBARTELS, C.; EBERL, L. Visualization of *N*-Acylhomoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere, **Applied and Envir. Microbiol.**, v. 67, p. 5761-5770, 2001.

SWARTLEY, J. S.; BALTHAZAR, J. T.; COLEMAN, J.; SHAFER, W. M.; STEPHENS, D. S. Membrane glycerophospholipid biosynthesis in *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: identification, characterization, and mutagenesis of a lysophosphatidic acid acyltransferase. **Mol. Microbiol.**, v. 18, n. 3, p.401-412, 1995.

SWARTZMAN, E.; KAPOOR, S.; GRAHAM, A.F.; MEIGHEN, E.A. A new *Vibrio fischeri lux* gene precedes a bidirectional termination site for the *lux* operon, **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 6797-6802, 1990.

SWIFT, S.; THROUP, J.P.; WILLIAMS, P.; SALMOND, G.P.C.; STEWART, G.S.A.B. Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype, **Trends Biochemi. Sci.**, v. 21, p. 214-219, 1996.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

TODER, D.S.; GAMBELLO, M.J.; IGLEWSKI, B.H. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of *lasR*, **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 2003-2010, 1991.

TOMMASSEN, J.; FILLOUX, A.; BALLY, M.; LAZDUNSKI, A. Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*, **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 103, p. 73-90, 1992.

VAL, D.L.; CRONAN JR, J.E. *In vivo* evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases, **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 2644-2651, 1998.

VAN DELDEN, C. & IGLEWSKI, B.H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections, **Emerging Infect. Dis.**, v. 4, p. 551-560, 1998.

VAN KAMMEN, A. Suggested nomenclature for plant genes evolved in nodulation and symbiosis, **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 2, p. 43-45, 1984.

VISICK, K.L.; McFALL-NGAI, M.J. An exclusive contract: specificity in the *Vibrio fischeri-Euprymna scolopes* partnership, **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 1779-1787, 2000.

VON HEIJNE, G. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. **Eur. J. Biochem.** v. 133, n. 1, p. 17-21, 1983.

VON HEIJNE, G. Signal sequences. The limits of variation. **J. Mol. Biol.** v. 184, n. 1, p. 99-105, 1985.

VON HEIJNE, G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. **Nucleic Acids Res.** v. 14, n. 11, p. 4683-90, 1986a.

VON HEIJNE, G. Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. **J. Mol. Biol.** v. 192, n. 2, p. 287-90, 1986b.

VON HEIJNE, G. Membrane proteins: from sequence to structure. **Protein Eng.**, v.4, n. 2, p. 109-112, 1990.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STALEY, G.; BURRIS, R. M.; EVANS, H. J. (Eds.) **Biological Nitrogen Fixation** New York: Chapman and Hall, p. 399-431, 1992.

WAGNER VE, BUSHNELL D, PASSADOR L, BROOKS AI, IGLEWSKI BH. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment, **J. Bacteriol.**, v. 185, n. 7, p. 2061-2065, 2003.

WEBSTER, T. ^a; GIBSON, B. W.; KENG, T.; BIEMNN, K.; SCHIMMEL, P. Primary structures of both subunits of *Escherichia coli* Glycyl-tRNA Synthetase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 17, p. 10637-10641, 1983.

WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria, **Annual Review of Phytopathology.**, v. 26, p. 379-407, 1988.

WHITEHEAD, N.A.; BARNARD, A.M.L.; SLATER, H.; SIMPSON, N.J.L.; SALMOND, G.P.C. Quorum sensing in Gram-negative bacteria, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 365-404, 2001.

WINSON, M.K.; CAMARA, M.; LATIFI, A.; FOGLINO, M.; CHHABRA, S.R.; DAYKIN, M.; BALLY, M.; CHAPON, V.; SALMOND, G.P.C.; BYCROFT, B.W.; LAZDUNSKI, A.; STEWART, G.S.A.B; WILLIAMS, P. Multiple *N*-acyl-*L*-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinantes and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 9427-9431, 1995.

WISNIEWSKI-DYÉ, JOENS, J.; CHHABRA, S.R.; DOWNIE, J.A. *railR* Genes Are Part of a Quorum Sensing Network Controlled by *cinI* and *cinR* in *Rhizobium leguminosarum*, **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 1597-1606, 2001.

WISNIEWSKI-DYÉ, F.; DOWNIE, A. Quorum-sensing in *Rhizobium*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 397-407, 2002.

WITHERS, H.; SWIFT, S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, n. 2, p. 186-193, 2001.

ZENNO, S.; SAIGO, K. Identification of the genes encoding NAD(P)H-flavin oxidoreductases that are similar in sequence to *Escherichia coli* Fre in four species of luminous bacteria: *Photorhabdus luminescens*, *Vibrio harvey*, and *Vibrio orientalis*. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 3544-3551, 1994.

