

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**FRANCIELE CABRAL PINHEIRO**

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS ATIVADORES DE TRANSCRIÇÃO SyrM1,  
SyrM2, NodD1, NodD2 e TtsI DE *Rhizobium* sp. NGR234**

**Curitiba**

**2009**

**FRANCIELE CABRAL PINHEIRO**

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS ATIVADORES DE TRANSCRIÇÃO SyrM1,  
SyrM2, NodD1, NodD2 e TtsI DE *Rhizobium* sp. NGR234**

**Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas, área de  
concentração Genética, Setor de  
Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Roseli Wassem**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rose Adele  
Monteiro**

**Curitiba**

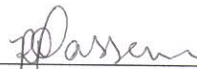
**2009**

## PARECER

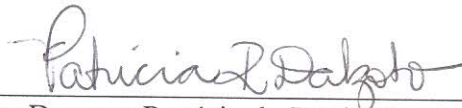
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **FRANCIELE CABRAL PINHEIRO** para fins de adquirir o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 27 de fevereiro de 2009.



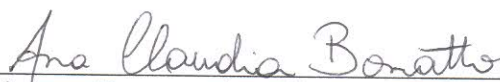
Professora Doutora Roseli Wassem - UFPR  
Presidente da banca Examinadora e Orientadora



Professora Doutora Patrícia do Rocio Dalzoto – Dep. Patologia Básica, UFPR.  
Membro Titular

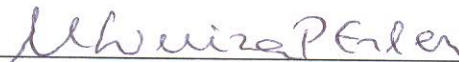


Professora Doutora Cyntia Telles Fadel Picheth – Dep. Patologia Médica, UFPR.  
Membro Titular



Professora Doutora Ana Claudia Bonato – Dep. Genética, UFPR.  
Membro Titular

Visto:



Profª Drª Maria Luiza Petzl-Erler  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

Aos meus pais Mário e Laura e as  
minhas irmãs Franciane, Josiane e Janine.  
Por serem meu Norte, meu porto seguro.  
Por todo o amor que me tornou o que sou.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a oportunidade de realizar algo que sempre sonhei. A meus pais que nunca mediram esforços para que eu alcançasse meu objetivo e que me transmitiram energia, força e amor suficientes para que eu não desistisse.

A minha Mestre, minha orientadora Dr<sup>a</sup> Roseli Wassem, pela bondade em dividir seu conhecimento e pela paciência como transferiu seus ensinamentos.

A toda equipe do Núcleo de Fixação de Nitrogênio do departamento de Bioquímica, em especial a minha co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Rose Adele Monteiro, ao Dr. Emanuel Maltempi de Souza , ao Walter Baura, a Michele e a Anelis por todo apoio.

A minha banca de avaliação que foi essencial para o melhor desenvolvimento do trabalho escrito, o meu muito obrigaga.

As amigas queridas, Josiane Figueiredo, Juliana Fabris, Rosana Nishimura, Caroline Andrade, Daniele Jackowski e Larice Armstrong, por todo o apoio, companheirismo, paciência e preocupação, pelos momentos de descontração, o meu muito obrigada.

A Daiane de Luccas e Josiele Polzin, obrigada pela amizade, pelo acolhimento, por todos os momentos maravilhosos que a nossa convivência como família proporcionou.

Aos meus queridos colegas e amigos, André Testoni, Francisco Rosa, Ivan, Juliane Mercer, obrigada pelos momentos de descontração e desabafos divididos.

Aos amigos do LabGeM, Eduardo Goldin, Douglas Adamoski, Lisandra e Douglas Montenegro, meu obrigada pelas risadas compartilhadas e paciência.

A querida amiga Paloma Bonato, que foi essencial para o desenvolvimento da pesquisa no laboratório, obrigada por toda a ajuda e amizade. Agradeço também ao Diogo e a Carol que muito me ajudaram na etapa final deste trabalho, obrigada.

As minhas queridas madrinhas emprestadas, Lenir, Stela, Claudete e a vó Sônia, por todo o apoio, torcida e orações, os quais me deram força para tolerar a distância que nos separou durante estes dois anos.

Aos meus afilhados amados: Matheus, Gabriele e Tiago, por toda a doçura e carinho.

A minha vizinha e amiga Marlúcia, por toda preocupação, pelos conselhos e amizade, o meu muito obrigada.

## RESUMO

*Rhizobium* sp. NGR234 é um microrganismo fixador de nitrogênio que estabelece uma relação simbiótica com plantas da família Fabaceae e induz a formação de nódulos radiculares onde ocorre a fixação de nitrogênio. Essa relação de simbiose é determinada e controlada por ambos os organismos simbiontes através da produção de moléculas sinalizadoras, o que depende de um controle fino de regulação da expressão gênica. O NGR234 possui capacidade de estabelecer uma relação simbiótica com 112 gêneros de legumes, o que o torna alvo de vários estudos na busca de se compreender quais os mecanismos envolvidos nesta promiscuidade simbiótica. Já se sabe que genes envolvidos com nodulação, secreção de proteínas através do sistema de secreção do tipo III e modificação de moléculas sinalizadoras (exopolissacarídeos, lipopolissacarídeos) da superfície celular são regulados, em NGR234, pelos ativadores transcricionais NodD1, NodD2, SyrM1, SyrM2 e TtsI. A função destes reguladores, exceto SyrM1, está bem estabelecida e permitiu a proposição de uma cascata regulatória. Entretanto a regulação da expressão dos genes codificadores destes reguladores ainda não está completamente estabelecida. Para analisar o perfil de expressão destes genes, as suas regiões promotoras foram clonadas a montante do gene que codifica para a proteína fluorescente verde (GFP) e as fusões transcricionais resultantes foram testadas em diferentes condições e estirpes. Os resultados obtidos mostram que a expressão de *syrM1* é, aparentemente, constitutiva e seu produto, SyrM1, reprime a expressão de *ttsI* e *nodD1*, especialmente na ausência de flavonóides. A expressão do gene *syrM2* é dependente de flavonóides e NodD1 e é reprimido pelo seu próprio produto. A ação de SyrM1 e SyrM2 deverão ser melhor investigadas, uma vez que agem potencialmente através da ligação à mesma seqüência regulatória, *syrM-box*. Ainda não se pode confirmar a ligação de SyrM1 ao *syrM-box* presente na região intergênica entre *ttsI* e *nodD2*. A presença de moléculas indutoras contaminantes durante os experimentos de expressão *in vivo*, utilizando *gfp*, compromete a análise precisa da regulação dos genes em estudo.

Palavras-chave: NGR234. Reguladores transcricionais. Genes de nodulação.

## ABSTRACT

*Rhizobium* sp. NGR234 is a nitrogen fixing microorganism that develops a symbiotic relation with the Fabaceae plant family, providing them with nitrogen in the form of ammonium. This symbiotic relationship is settled and controlled by both organisms through a gene expression regulation fine control. This microorganism is able to establish a symbiotic relationship with 112 vegetable genera, which makes it subject to several studies that aim to understand the mechanisms involved in this symbiotic promiscuity. It is known that genes involved with nodulation, protein secretion through the type 3 secretion system and modification of cellular surface signaling molecules (exopolysaccharides and lipopolysaccharides) are regulated, in NGR234, by transcriptional activators NodD1, NodD2, SyrM1, SyrM2 and TtsI. The function of these regulators is well established, except for SyrM1, and allowed the proposition of a regulatory cascade. The expression regulation of these activators has been studied but is not completely elucidated. Thus, it is aimed to contribute to the disclosure of the regulatory cascade that controls the nodulation and secretion of proteins through the type III secretion system (T3SS) in *Rhizobium* sp. NGR234. In order to do so, these genes promoter regions were cloned flanking the gene that codes for green fluorescent protein. These transcriptional fusions were tested in different conditions and strains to evaluate their regulation. *syrM1* expression is apparently constitutive and its product, SyrM1, inhibits the expression of *ttsI* and *nodD1*, especially in the absence of flavonoids. Gene *syrM2* expression is NodD1 and flavonoid-dependent and is inhibited by its own product. SyrM1 and SyrM2 functions shall be better investigated, since they bind potentially to the same regulatory sequence, *SyrM-box*. A double mutant of these two genes has not yet been obtained, neither the binding of SyrM1 to the *syrM-box* present in the intergenic region between *ttsI* and *nodD2* confirmed. Contaminant inducer molecules during *in vivo* gene expression experiments, using *gfp*, compromises the precise analysis of the regulation of the genes been studied.

Keywords: NGR234. Transcriptional regulators. Nodulation genes.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$  – micrograma

$\mu\text{L}$  – microlitro

Amp – ampicilina

DNA – ácido desoxirribonucleotídeo

DTT - ditioneitol

EDTA – ácido etileno-diamino-tetra-acético

Fix – fixação

g/L – gramas/litro

GFP – proteína fluorescente verde

Gm – gentamicina

IPTG -  $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

kDa – Quilo Dalton

Km – canamicina

LPS – lipopolissacarídeos

M – Molar (mol/L)

mL – mililitro

mRNA – ácido ribonucléico mensageiro

NaL– ácido nalidíxico

NB – *nod-box*

Nod – nodulação

ONPG – o-nitrofenol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

ORF – seqüência codificadora de proteína (“**O**pen **R**eadin**F**rame”)

pb – pares de base

PCR – reação da polimerase em cadeia

PMSF –  $\alpha$ -toluenosulfonil floreto

Rif – rifampicina

rpm– rotação por minuto

SDS – Dodecilsulfato de sódio

Sm – estreptomina

Spm – spectinomina

Syr – regulador simbiótico



T3SS – sistema de secreção do tipo III

TAE – Tampão Tris-acetato-EDTA

TB – *tts* box

Tc - tetraciclina

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - MODELO PROPOSTO PARA A CASCATA REGULATÓRIA DEPENDENTE DE FLAVONÓIDES EM <i>Rhizobium</i> sp. NGR234 .....	34
FIGURA 2 - LOCALIZAÇÃO GENÔMICA DO PROMOTOR DE <i>nodD1</i> E MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pGT'-pnodD1. ....	52
FIGURA 3 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE <i>nodD1</i> ATRAVÉS DE FUSÃO COM O GENE <i>gfp</i> SOB INDUÇÃO DE APIGENINA.....	54
FIGURA 4 - LOCALIZAÇÃO GENÔMICA DO PROMOTOR DO GENE <i>syrM1</i> E MAPA FÍSICO DOS PLASMÍDEOS pGEMT-T-pSyrM1 e pGT'-pSyrM1. ....	56
FIGURA 5 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE <i>syrM1</i> ATRAVÉS DE FUSÃO COM O GENE <i>gfp</i> SOB INDUÇÃO DE APIGENINA.....	58
FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO GENÔMICA DA REGIÃO INTERGÊNICA ENTRE <i>ttsI</i> E <i>nodD2</i> E MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pGEM-T-pttsI/nodD2.....	59
FIGURA 7 - MAPA FÍSICO E DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS pGT-pttsI e pGT'-pnodD2II.....	60
FIGURA 8 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE <i>nodD2</i> ATRAVÉS DE FUSÃO COM O GENE <i>gfp</i> SOB INDUÇÃO DE APIGENINA.....	62
FIGURA 9 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE <i>nodD2</i> ATRAVÉS DE FUSÃO COM O GENE <i>gfp</i> PRESENTE NO PLASMÍDEO pGT'-pnodD2II SOB INDUÇÃO DE APIGENINA.....	64
FIGURA 10 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE <i>ttsI</i> ATRAVÉS DE FUSÃO COM O GENE <i>gfp</i> SOB INDUÇÃO DE APIGENINA.....	67

**FIGURA 11 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE *ttsI* ATRAVÉS DE FUSÃO COM O GENE *gfp* PRESENTE NO PLASMÍDEO pGT-pttsI SOB INDUÇÃO DE APIGENINA.....69**

**FIGURA 12 - NÍVEL DE EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE *syrM2* ATRAVÉS DE FUSÃO COM O GENE *gfp* SOB INDUÇÃO DE CRISINA.....71**

**FIGURA 13 - MAPA FÍSICO E DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS pET-29-syrM1 e pET-29-syrM2.....72**

**FIGURA 14 - TESTE DE INDUÇÃO COM OS PLASMÍDEOS DE SUPEREXPRESSÃO pET-Blue-SyrM1 e pET-29-SyrM2. ....73**

**FIGURA 15 - TESTE DE INDUÇÃO ENTRE DIFERENTES ESTIRPES PARA VERIFICAR SUPEREXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO HIS-SYRM2.....74**

**FIGURA 16 - PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL SDS-PAGE DE FRAÇÕES DAS PROTEÍNAS HIS-SYRM1 E HIS-SYRM2 OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE. ....75**

**FIGURA 17 - ENSAIO DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO HIS-SYRM1 E HIS-SYRM2 AO SYRM-BOX PRESENTE NA REGIÃO PROMOTORA DE *nodD2*. .....76**

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1. GERAL .....	16
2.2. ESPECÍFICOS .....	16
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
3.1. INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA .....	17
3.2. ASPECTOS GENÉTICOS DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO.....	20
3.2.1 Genes <i>nod</i> .....	20
3.2.2. Fatores Nod.....	22
3.2.3. Regulação dos genes <i>nod</i> .....	23
3.2.4. Sistema de secreção do tipo III .....	27
3.3. <i>Rhizobium</i> sp. NGR234.....	28
3.3.1. Os genes <i>nodD</i> de NGR234.....	28
3.3.2. Os genes <i>nodVW</i> de NGR234 .....	30
3.3.3. Os genes <i>syrM</i> de NGR234 .....	30
3.3.3. Sistema de secreção do tipo III em NGR234 .....	31
3.3.5. Regulação temporal da nodulação em NGR234 .....	32
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
4.1. ESTRATÉGIA GERAL.....	36
4.2. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS .....	36
4.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	39
4.4. MEIOS DE CULTIVO .....	39
4.5. MANIPULAÇÃO DE DNA.....	40
4.5.1. Extração de DNA plasmidial.....	41
4.5.2. Rapid-prep.....	41
4.5.3. Purificação de fragmentos de DNA em gel agarose.....	42
4.5.4. Extração de DNA genômico de <i>Rhizobium</i> sp. NGR234.....	42
4.5.5. Condições de eletroforese.....	43
4.6. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	43
4.6.1. Preparo de células de <i>E. coli</i> eletro competentes .....	43
4.6.2. Transformação por eletroporação .....	44

4.6.3. Preparo de células de <i>E. coli</i> termo competentes .....	44
4.6.4. Transformação por choque térmico.....	44
4.6.5. Transformação por conjugação.....	45
4.7. CONDIÇÕES DE PCR E REAÇÕES DE SEQÜENCIAMENTO .....	45
4.8. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES EM ESTUDO.....	47
4.9. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS HIS-SYRM1 E HIS-SYRM2 DE <i>Rhizobium</i> NGR234 EM <i>E. coli</i> .....	48
4.10. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS HIS-SYRM1 E HIS-SYRM2 DE <i>Rhizobium</i> NGR234 EXPRESSAS EM <i>E. coli</i> .....	49
4.11. ELETROFORESE SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE).....	49
4.12. ENSAIO DE ALTERAÇÃO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA) ...	50
4.13. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	50
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES DE INTERESSE.....	51
5.1.1. Análise de expressão do gene <i>nodD1</i> .....	52
5.1.2. Análise de expressão do gene <i>syrM1</i> .....	55
5.1.3. Análise de expressão do gene <i>nodD2</i> .....	59
5.1.4. Análise de expressão do gene <i>ttsI</i> .....	65
5.1.5. Análise de expressão do gene <i>syrM2</i> .....	70
5.2. ENSAIO DE ALTERAÇÃO DE MOBILIDADE COM HIS-SYRM1 E HIS-SYRM2 .....	72
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>87</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Em solos pobres em fontes de nitrogênio, as bactérias gram-negativas dos gêneros *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium* (coletivamente rizóbios), formam nódulos simbióticos, para fixação de nitrogênio, com plantas da família Fabaceae (VIPREY *et al.*, 2000). Estes microssimbiontes transformam-se em bacteróides dentro do nódulo, fornecem nitrogênio fixado à planta e, em troca, recebem nutrientes da hospedeira. A especificidade simbiótica varia desde rizóbios com estreito espectro de legumes hospedeiros até situações como a de *Rhizobium* sp. NGR234, que nodula em torno de 112 gêneros de legumes e mesmo o não-legume, *Parasponia* (PUEPPKE; BROUGHTON, 1999).

Nas etapas iniciais da interação, as plantas hospedeiras secretam flavonóides que induzem, na bactéria, a síntese de lipo-quito-oligossacarídeos chamados Fatores Nod. Estes são secretados e desencadeiam uma via específica de sinais de transdução na planta, os quais culminam na expressão de genes simbióticos planta-específicos para o desenvolvimento nodular (DÉNARIÉ; DEBELLÉ; ROSENBERG, 1992). Desta forma, esta interação envolve uma sequência de eventos complexos que resultam na formação de nódulos simbióticos de fixação de nitrogênio. Os primeiros eventos para a formação do nódulo são governados por genes *nod* (genes de nodulação), que são regulados pelo produto do gene *nodD*. O produto deste gene, NodD, atua como ativador transcricional de genes *nod* na presença de flavonóides indutores (XIAO; SHEN; ZHU, 1998).

A regulação da expressão dos genes *nod* pode ser bastante complexa, como é o caso em *Rhizobium* sp. NGR234. No plasmídeo simbiótico pNGR234a de *Rhizobium* sp. NGR234, estão presentes duas cópias de *nodD* (*nodD1* e *nodD2*), além de outros dois genes regulatórios de genes *nod*, *syrM1* e *syrM2*. A regulação de genes *nod* tem sido amplamente estudada em NGR234 e uma cascata regulatória envolvendo *nodD1*, *nodD2*, *syrM1* e *syrM2* foi descrita por Kobayashi *et al.* (2004), na qual NodD1 é o principal regulador flavonóide induzível e NodD2 atua na repressão de genes *nod* e na otimização da ativação de alguns *nod box*. O nível de expressão do gene *nodD1* apresenta pouca variação, mas tanto NodD1 quanto NodD2 parecem atuar na sua repressão, apesar de tal efeito ser pouco pronunciado

(KOBAYASHI *et al.*, 2004).

O gene *nodD2*, entretanto, é expresso de maneira dependente da proteína NodD1 e da presença de flavonóides, e requer ainda SyrM2, que é intermediário entre NodD1 e o gene *nodD2*. Na região promotora do gene *syrM2* foi localizada uma seqüência *nod box* e a montante do gene *nodD2*, uma seqüência candidata para ligação de SyrM2, denominada SyrM-*box*. Tais seqüências sinalizadoras reforçam o modelo de regulação proposto, juntamente com evidências fisiológicas. Em NGR234 está presente ainda um sistema de secreção de tipo III que é completo e simbioticamente ativo. Este sistema é regulado por TtsI, um ativador transcricional, que por sua vez é regulado por um *nod-box*. O gene *ttsI* é expresso tardiamente de forma dependente de NodD1 e de flavonóide (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Por outro lado, a função, a regulação e os alvos de SyrM1 ainda não estão determinados em NGR234.

As evidências sugerem que, em NGR234, estes quatro reguladores transcricionais (NodD1, NodD2, SyrM1 e SyrM2) estão envolvidos na interação planta-bactéria, modulando a expressão de genes de nodulação, secreção de proteínas importantes na nodulação e síntese de moléculas sinalizadoras, como lipopolissacarídeos. A mutagênese de cada um destes genes individualmente e sua análise fenotípica mostraram que *nodD1* é essencial para a nodulação de todas as plantas testadas, enquanto a inativação de *nodD2*, *syrM1* e *syrM2* altera a nodulação em apenas algumas das plantas testadas. Isto sugere que a interação entre NGR234 e suas plantas hospedeiras depende de um controle fino que envolve os quatro reguladores descritos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL:

Contribuir para a elucidação da cascata regulatória que controla os processos de nodulação e secreção de proteínas através do sistema de secreção do tipo III (T3SS) em *Rhizobium* sp NGR234.

### 2.2. ESPECÍFICOS:

- Avaliar a expressão dos genes *nodD1*, *nodD2*, *syrM1*, *syrM2* e *ttsI* *in vivo*.
- Investigar a função do ativador transcricional SyrM1 no processo de nodulação através da análise de expressão de potenciais alvos.
- Purificar as proteínas de fusão His-SyrM1 e His-SyrM2 e avaliar sua capacidade de ligação ao potencial *syrM-box* presente na região promotora do gene *nodD2*.



### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

O nitrogênio é um componente essencial para a manutenção da vida no planeta Terra e é encontrado em sua maioria na forma gasosa (dinitrogênio,  $N_2$ ). A atmosfera é composta por 80% de dinitrogênio, sendo uma fonte praticamente inesgotável desta molécula. Entretanto, este só é metabolizado pela maioria dos seres vivos quando reduzido, através de processos denominados fixação de nitrogênio. A fixação de nitrogênio pode se dar por diversos processos naturais abióticos, como combustão, descargas elétricas e ação vulcânica. Alternativamente, o nitrogênio pode ser fixado por processos industriais, principalmente para produzir fertilizantes nitrogenados. Juntos, esses processos são responsáveis pela fixação de, aproximadamente, 35% do total de nitrogênio fixado anualmente. O restante do nitrogênio reduzido é gerado via fixação biológica, realizada por procariotos (POSTGATE, 1982).

A fixação biológica de nitrogênio é responsável pela redução de 120 milhões de toneladas de dinitrogênio a amônio por ano, tendo importância em diversas áreas, como a ambiental, a econômica, a energética e a social. Em termos ambientais, esse processo é extremamente importante, já que substitui o uso de fertilizantes nitrogenados na agricultura, reduzindo a poluição de lençóis freáticos e a liberação de óxido nitroso na atmosfera. Neste sentido, pesquisas vêm sendo realizadas para esclarecer os mecanismos envolvidos neste processo, para que este seja amplamente usado nas culturas em larga escala (GRAHAM; VANCE, 2000).

Os microrganismos fixadores de nitrogênio ou diazotróficos podem ser de vida livre ou endofíticos. Os diazotróficos de vida livre são capazes de reduzir o dinitrogênio gasoso independentemente do contato com um organismo superior. Por outro lado, os diazotróficos endofíticos necessitam estabelecer uma forte relação com o hospedeiro e esta pode ser simbiótica ou associativa. Na simbiótica, uma intensa troca de sinais ocorre entre os organismos envolvidos, o que culmina na

formação de nódulos fixadores de nitrogênio. Na associativa, os microrganismos ocupam os espaços intercelulares do tecido vegetal e não induzem a formação de nenhuma estrutura morfológica visível (PAWLOWSKI; BISSELING, 1996).

Bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, e *Bradyrhizobium*, coletivamente chamados rizóbios, têm a habilidade de infectar plantas da família Fabaceae (leguminosas) e induzir a formação de nódulos (DÉNARIÉ; DEBELLÉ; ROSENBERG, 1992). O estabelecimento da relação simbiótica envolve vários passos, os quais têm início na rizosfera. Inicialmente, os rizóbios aproximam-se das raízes das plantas em uma resposta quimiotáxica positiva a exudatos liberados pelo macrossimbionte. Dentre as substâncias que induzem estas respostas estão aminoácidos, ácidos dicarboxílicos e compostos fenólicos de baixo valor nutricional, tais como os flavonóides. Mesmo em baixíssimas concentrações, estes últimos são moléculas imprescindíveis ao desenvolvimento nodular (PIETERNEL; VANDERLEYDEN, 1995). Os flavonóides interagem com proteínas regulatórias da família LysR, nos rizóbios chamadas de NodD, que atuam como sensores ambientais e reguladores transcricionais de genes envolvidos na nodulação. Os produtos destes genes estão envolvidos na síntese de lipo-quito-oligossacarídeos denominados Fatores Nod (BROUGHTON; JABBOURI; PERRET, 2000).

Os Fatores Nod e exopolissacarídeos produzidos pelos rizóbios são reconhecidos por receptores extracelulares da planta. Essa interação induz modificações na fisiologia da mesma, permitindo a sua infecção pelo microrganismo. A primeira resposta do macrossimbionte a estes compostos é o aumento dos níveis intracelulares de cálcio na raiz, desencadeando alterações no citoesqueleto que promovem o enrolamento dos pêlos radiculares. Simultaneamente, as células do córtex são estimuladas a entrar em mitose, iniciando a formação do nódulo primordial que dará sustentação aos microssimbiontes. Para que as bactérias atinjam regiões mais internas nos tecidos radiculares da planta, forma-se uma estrutura tubular que penetra os tecidos do hospedeiro, o cordão de infecção. Enquanto se processa a formação do cordão de infecção, as bactérias no seu interior proliferam continuamente, até que o cordão atinja o córtex radicular (JONES *et al.*, 2007).

Quando liberadas no córtex radicular, as bactérias são envoltas por uma membrana que é produzida pela planta. Essa membrana protege o microrganismo

do restante do citoplasma das células do macrossimbionte. A estrutura resultante da bactéria e seu envoltório é denominada de simbiossomo. Neste microambiente, a bactéria tem condições de se diferenciar em bacteróide, que é a forma na qual os rizóbios conseguem fixar nitrogênio. Um intercâmbio de nutrientes é estabelecido entre a membrana do simbiossomo e a membrana externa do bacteróide para que se dê a manutenção ideal deste órgão. A partir disso, o nódulo primordial diferencia-se em nódulo fixador de nitrogênio, onde as concentrações de oxigênio são baixas, garantindo um ambiente apropriado para fixação eficiente do nitrogênio. Assim, se forma uma interface entre os simbiossomos, que possibilita o intercâmbio de sinais e de metabólitos entre estes (MYLONA; PAWLOWSKI; BISSELING, 1995; JONES *et al.*, 2007).

O bacteróide aumenta a expressão de genes envolvidos na fixação de nitrogênio e na respiração. As condições fisiológicas do bacteróide induzem alterações na expressão gênica dos rizóbios, como por exemplo, os genes *nod*, que deixam de ser transcritos (PIETERNEL; VANDERLEYDEN, 1995). Em *R. meliloti*, todas estas mudanças são controladas por reguladores transcricionais bacterianos, incluindo FixL, FixJ, NifA,  $\sigma^{54}$  e FixK. Em baixas concentrações de oxigênio, FixL, uma proteína transmembrana, que atua como sensor dos níveis de oxigênio, é ativada. FixL é um membro da família dos ativadores de dois componentes e induz a atividade de FixJ, um ativador transcricional. Este regulador, por conseguinte, modula a expressão de *nifA* e de *fixK*. Por sua vez, os produtos destes genes, NifA e FixK, respectivamente, ativam a transcrição de genes envolvidos na formação do complexo da nitrogenase. No rizóbios, este complexo consiste de dois componentes, a proteína homodimérica Ferro codificada por *nifH* e a proteína tetramérica Ferro-Molibdênio (MoFe), produto dos genes *nifD* e *nifK*. O complexo nitrogenase contém ainda o co-fator MoFe, que torna o complexo da nitrogenase altamente sensível à presença de oxigênio, pois é irreversivelmente degradado em condição aeróbica prolongada. Uma cascata regulatória controla a expressão deste complexo e das enzimas respiratórias necessárias à produção de energia para atividade da nitrogenase. Estima-se que o gasto energético para se reduzir uma molécula de dinitrogênio gasoso a duas moléculas de amônio seja igual a 16 moléculas de ATP e 8 elétrons. No final do processo, o amônio é exportado pelo microssimbionte como primeiro produto da fixação de nitrogênio e assimilado no citoplasma das células do nódulo pela ação da glutamina sintetase (produzida pela planta). Parte do amônio

produzido pela nitrogenase é exportado através de canais na membrana do bacteróide, garantindo um complexo sistema de intercâmbio de aminoácidos entre a bactéria e a planta. Assim, é imprescindível um constante suprimento de carbono ao simbiossomo, a fim de garantir os metabólitos e a energia necessários à diferenciação a bacteróide e a fixação de nitrogênio (FISHER, 1994; MYLONA; PAWLOWSKI; BISSELING, 1995; JONES *et al.*, 2007).

### 3.2. ASPECTOS GENÉTICOS DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

Para o estabelecimento de uma simbiose eficiente, os rizóbios apresentam muitos genes cujos produtos estão diretamente envolvidos com a infecção e nodulação da planta. Estes genes podem ser divididos em dois grandes grupos. Um grupo contém genes envolvidos na síntese de exopolissacarídeos (genes *exo*), de lipopolissacarídeos (genes *lps*), polissacarídeos capsulares ou antígenos K (genes *kps*) e  $\beta$ -1,2-glicanos (genes *ndv*). Mutações nestes genes desencadeiam a formação de nódulos ineficientes, pois não ocorre a formação do cordão de infecção e, conseqüentemente, a bactéria não consegue penetrar nos tecidos da planta, resultando em um fenótipo normal de nodulação, mas inábil para fixação. Um segundo grupo inclui genes envolvidos no processo de nodulação. Alterações nestes genes promovem vários efeitos no fenótipo da simbiose, dentre estes: ausência de nódulos, atraso na formação de nódulos efetivos e mudanças na cadeia de hospedeiros (PIETERNEL; VANDERLEYDEN, 1995).

#### 3.2.1 Genes *nod*

Já foram descritos mais de 50 genes de nodulação em diferentes rizóbios. Cada estirpe apresenta um conjunto próprio de genes e alelos que define o genótipo *nod*. Na maioria dos rizóbios, os genes *nod* localizam-se em grandes plasmídeos (pSym), que também carregam genes com outras funções simbióticas. Já em *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *R. loti* estes genes são cromossomais (MERGAERT; MONTAGU; HOLSTERS, 1997).

Os genes *nod* podem ser classificados em genes *nod* comuns e genes *nod*

específicos. Os primeiros são altamente conservados entre as diferentes espécies, em razão da função executada por seus produtos. Os genes *nodABC*, são genes *nod* comuns organizados em um único operon, sendo encontrados em todas as espécies de *Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* analisadas. Os produtos dos genes *nodABC* são responsáveis pela formação da cadeia central tetramérica dos Fatores Nod. Através da ação de seus produtos, estes genes são essenciais para o enrolamento dos pêlos radiculares, na formação do cordão de infecção, na divisão de células corticais e na formação do nódulo. Conseqüentemente, mutações nos genes *nodABC* impedem totalmente a nodulação. Os genes *nodIJ*, são também comuns e localizam-se no mesmo operon que os genes *nodABC*. Seus produtos, as proteínas NodI e NodJ, estão envolvidos com o transporte dos fatores Nod pela membrana interna da bactéria (WANG; STACEY, 1991; PIETERNEL; VANDERLEYDEN, 1995; LONG, 1996).

Em se tratando de genes *nod* específicos, mutações não levam ao impedimento da nodulação de todos os hospedeiros, podendo resultar apenas em atrasos na formação ou diminuição do número de nódulos. Inúmeros são os exemplos de genes *nod* específicos e muitas são as vias em que estas moléculas atuam. Os produtos dos genes *nod* específicos são responsáveis pela especificidade da interação rizóbio-planta, pois são estes os responsáveis por alterações na cadeia dos Fatores Nod. Os genes *nodVW*, em *B. japonicum*, são exemplos desta classe de genes *nod*. Mutações nestes genes acarretam a perda da habilidade desta espécie em nodular *Macroptilium atropurpureum*, *Vigna radiata* e *Vigna unguiculata*, enquanto que apenas levam a um atraso na nodulação de *Glycine max*. Nesta mesma espécie, mutações no gene *nodZ* acarretam falhas na nodulação de *Macroptilium atropurpureum* e alterações na nodulação de algumas variedades de soja (GÖTTFERT; GROB; HENNECKE, 1990). Além destes, pode-se citar NodE e NodF em *R. leguminosarum*, os quais atuam na biossíntese de ácidos graxos, que são utilizados na formação da estrutura básica dos Fatores Nod, enquanto NodO tem como função facilitar a interação dos receptores da planta com outros Fatores Nod, na superfície da raiz (revisado por DÉNARIÉ; DEBELLÉ; ROSENBERG, 1992). Em *Rhizobium* sp. NGR234, *R. tropici* CIAT899 e *A. caulinodans*, mutantes no gene *nodS* impedem a nodulação de *Leucaena leucocephala* e *Phaseolus vulgaris* (PIETERNEL; VANDERLEYDEN, 1995).

### 3.2.2. Fatores Nod

Os Fatores Nod são moléculas que pertencem à mesma família química, sendo formados por uma cadeia central tetramérica ou pentamérica de N-acetilglucosamina, que possui um radical acil na extremidade não redutora. O centro oligomérico quitínico pode ter diversas substituições nas extremidades da molécula e estas variam de acordo com cada espécie (ROCHE *et al.*, 1996). Além disso, estas substituições são um importante determinante da especificidade dos hospedeiros com os quais a bactéria é capaz de interagir (SNOECK *et al.*, 2001).

Os rizóbios não produzem um único Fator Nod, mas um conjunto de moléculas com diferentes estruturas químicas característico de cada espécie (LONG, 1996). Em *Rhizobium tropici*, estudos recentes detectaram a presença de 52 Fatores Nod diferentes (MÓRON *et al.*, 2005). A síntese dos Fatores Nod, suas modificações e secreção são resultado da ação dos produtos protéicos dos genes *nod* (DÉNARIÉ; DEBELLÉ; ROSENBERG, 1992).

A estrutura básica dos Fatores Nod é produto da ação dos genes *nodABC*. NodC é uma N-acetilglucosaminotransferase envolvida na formação do centro oligomérico quitínico, sendo o determinante do tamanho deste centro (tri, tetra ou pentamérico). NodB desacetila o resíduo de N-acetilglucosamina, enquanto que NodA atua na N-acilação da extremidade não reduzida desacetilada, resultando na formação da estrutura básica do lipopolissacarídeo (PIETERNEL; VANDERLEYDEN, 1995). O transporte dos Fatores Nod é realizado pelas proteínas NodIJ (SPAINK; WIJFJES; LUGTENBERG, 1995; CARDENAS *et al.*, 1996)

A conformação definitiva de cada Fator Nod é dada em resposta a alterações químicas promovidas pela ação dos produtos dos genes *nod* específicos. Estas alterações resultam de saturações e insaturações de ácidos graxos (*nodEF*), de fucosilação (*nodZ*, *nolK*, *noeC*), sulfatação (*nodH*, *noeE*) ou, ainda, acetilação (*nodL*, *nodX*, *nolL*) da estrutura básica dos Fatores Nod. Essas especializações estão envolvidas no estabelecimento da simbiose com hospedeiros específicos, garantindo a eficiência no processo de fixação em alguns organismos, e tendo efeito contrário em outros (DÉNARIÉ; DEBELLÉ; ROSENBERG, 1992; LONG, 1996; MERGAERT; MONTAGU; HOLSTERS, 1997; PERRET; STAEHELIN;

BROUGHTON, 2000).

Uma nodulação eficiente depende também do reconhecimento dos fatores Nod por receptores da planta. Estirpes bacterianas produzindo Fatores Nod iguais apresentam uma cadeia de hospedeiros diferentes, e rizóbios que nodulam a mesma planta expressam uma cadeia de Fatores Nod diferentes, demonstrando que as diferentes combinações e níveis destas moléculas na rizosfera do potencial hospedeiro são um determinante no processo. Estudos demonstraram que enzimas da planta, como quitinases e hidrolases, degradam os Fatores Nod auxiliando a manutenção dos níveis apropriados destes na rizosfera (PERRET; STAEHELIN; BROUGHTON, 2000).

Os Fatores Nod são os principais responsáveis pelo início do processo de nodulação (enrolamento do pêlo radicular e divisão das células corticais). Entretanto, um conjunto de outras moléculas é necessário no desenvolvimento nodular. Exopolissacarídeos também denominados polissacarídeos extracelulares (EPS), lipopolissacarídeo (LPS), polissacarídeos capsulares (CPS) e  $\beta$ -glicanos cíclicos são componentes de membrana de rizóbios com papel simbioticamente relevante. Fenótipos defectivos são observados em mutantes de genes envolvidos na síntese desses compostos, indicando que estes componentes de superfície estão envolvidos em diferentes etapas da nodulação (PERRET; STAEHELIN; BROUGHTON, 2000).

### 3.2.3. Regulação dos genes *nod*

Os genes *nod* são expressos em resposta a flavonóides produzidos pela planta. Contudo, uma nodulação eficiente ocorre apenas quando estes genes são expressos de forma quantitativa, temporal e espacialmente apropriada (KNIGHT *et al.*, 1986). Pesquisas têm demonstrado que uma forte expressão constitutiva dos genes de nodulação pode resultar em fenótipos de nodulação reduzidos e defeituosos. Estes dados sugerem que os genes *nod* estão sujeitos à ativação e também a uma regulação negativa, que mantém os níveis adequados (LOH; STACEY, 2003).

Grande parte dos genes *nod* são precedidos por seqüências regulatórias conservadas, chamadas *nod-box*, localizadas nas suas regiões promotoras. As

sequências *nod box* contêm aproximadamente 50pb e localizam-se cerca de 42pb a montante da posição +1 da região codificadora. A regulação central destes genes é feita pela proteína NodD, que ativa a transcrição de genes *nod* apenas na presença de flavonóides indutores (SWANSON; MULLIGAN; LONG, 1993). A transcrição do gene *nodD* é constitutiva na maioria dos rizóbios, com exceção de *B. japonicum*, no qual o gene *nodD1* é auto regulado e induzido por genisteína e daidizeína (LOH; STACEY, 2003).

A proteína NodD pertence à família LysR de ativadores transcricionais bacterianos (SWANSON; MULLIGAN; LONG, 1993). Esta é a maior família de ativadores transcricionais e seus membros regulam diversos genes e cascatas de regulação na maioria dos gêneros de procariotos. A ativação de genes alvo depende da interação do ativador com um co-indutor, que sinaliza uma condição fisiológica na qual os genes alvo necessitam ser expressos. Estudos demonstraram que estes vários reguladores apresentam algumas características estruturais em comum: (a) um domínio hélice-volta-hélice que permite sua ligação diretamente ao DNA; (b) um domínio envolvendo o reconhecimento e resposta ao co-indutor e (c) um domínio necessário para ambas as funções (SCHELL, 1993).

Em rizóbios, os flavonóides liberados pela planta hospedeira interagem com NodD, promovendo alterações conformacionais que a convertem numa forma ativa que estimula a transcrição de operons *nod* (LONG, 1996). Múltiplas isoformas de NodD têm sido descritas em rizóbios, cujo número varia entre as espécies. Em *S. meliloti* e *R. tropici* há três e cinco cópias de NodD, respectivamente. Em *S. meliloti* as três proteínas NodD respondem a diferentes grupos de flavonóides, sugerindo que a redundância de NodD permite que a bactéria infecte múltiplas hospedeiras, pois promove respostas a uma ampla cadeia de flavonóides (MACHADO *et al.*, 1998; LOH; STACEY, 2003). Apesar de a maioria das NodDs ativar a transcrição em resposta a um dado conjunto de flavonóides, algumas NodDs apresentam atividade sem um co-indutor (SCHELL, 1993). Exemplo disso são NodDs de *R. leguminosarum* bv. *viciae* e de *R. meliloti* (PIETERNEL; VANDERLEYDEN, 1995).

Em *R. meliloti*, os diferentes genes regulatórios *nodD* (*nodD1*, *nodD2* e *nodD3*) afetam a taxa de nodulação em diferentes plantas hospedeiras. NodD1 e NodD2 são constitutivamente expressos e têm sua atividade modulada por flavonóides específicos, enquanto que NodD3 tem a sua expressão sujeita a uma complexa regulação, envolvendo a proteína regulatória SyrM. Entretanto, apenas um



dos três genes é necessário para nodulação de alfafa, sendo que somente quando os três genes estão mutados a nodulação é eliminada neste hospedeiro. Deste modo, tem-se demonstrado que organismos que apresentam cópias extras dos genes *nodD* exibem interações diferentes com os legumes hospedeiros (PHILLIPS; JOSEPH; MAXWELL, 1992; CAPELA; CARRERE; BATUT, 2005).

NodD1 de *S. meliloti* apresenta capacidade de reconhecer flavonóides específicos em virtude de características em sua estrutura terciária. A extremidade C-terminal desta proteína está envolvida na determinação da especificidade da resposta ao flavonóide e é nesta região que se dá a ligação com o indutor. Quando ativa, a proteína NodD1 reconhece as seqüências *nod box* e atua como ativador transcricional de genes *nod* (revisado por DÉNARIÉ; DEBELLÉ; ROSENBERG, 1992).

Além de ativar a transcrição dos genes envolvidos na biossíntese e transporte de Fatores Nod, a proteína NodD também atua no controle de outras funções em rizóbios. Em *Rhizobium* sp NGR234, *S. fredii*, e *B. japonicum*, NodD1 ativa a transcrição de TtsI, um regulador transcricional do sistema de secreção do tipo III (T3SS), que contribui para a determinação dos hospedeiros. NodD1 também controla genes de biossíntese de exopolissacarídeos e modificações de lipopolissacarídeos através do controle de genes de biossíntese de ramnose, em *S. fredii* e NGR234 (CAPELA; CARRERE; BATUT, 2005; BROUGHTON *et al.*, 2006).

Appelbaum *et al.* (1988), estudaram um mutante no gene *nodD1* da estirpe *R. japonicum* USDA191, o qual produziu aproximadamente um terço dos nódulos produzidos pelo tipo selvagem em soja. Além disso, os nódulos eram menores que o normal e a taxa de fixação de nitrogênio era menor que 50% da produzida pelos controles. Ao contrário de *nodD1*, a inativação do gene *nodD2* promoveu pouco efeito sobre a nodulação, uma vez que foi observado atraso na formação de nódulo, mas a taxa final de fixação de nitrogênio não foi afetada.

Em *B. japonicum*, *Rhizobium* sp. NGR234 e *B. elkani*, NodD2 reprime a expressão de genes *nod*. Estudos demonstram que mutações neste repressor resultam em fenótipos aberrantes e atraso da nodulação. Em *B. japonicum*, além da proteína NodD2, NolA é também um componente chave na regulação negativa de genes *nod*, sendo que sob circunstâncias apropriadas, NolA induz a expressão do gene *nodD2* (LOH; STACEY, 2003).

Nos vários rizóbios, os genes *nodD* também diferem quanto à regulação de

sua expressão. O único gene *nodD* de *R. leguminosarum* é auto regulado negativamente, enquanto que em *R. meliloti*, *nodD1* é constitutivamente expresso. Já em *B. japonicum* e *R. phaseoli* a expressão de alguns genes *nodD* é especificamente ativada na presença de indutores da planta, demonstrando que moléculas liberadas pelo hospedeiro influenciam no nível de expressão dos genes *nod* de forma específica (FISCHER; LONG, 1989; DÉNARIÉ; DEBELLÉ; ROSENBERG, 1992). Em *R. meliloti* 1021, NoIR liga-se à região regulatória dos genes *nodD1* e *nodD2* e impede a transcrição destes reguladores. Consequentemente, esta proteína exerce um controle negativo sobre os genes *nod* regulados por estes dois ativadores. Mutações em NoIR levaram a um atraso no fenótipo de nodulação e a indução de expressão em níveis mais altos de genes *nod* (PIETERNEL, 1995).

Embora NodD seja o ativador central na regulação dos genes *nod*, outros reguladores também modulam a expressão destes genes. Em *R. meliloti* um segundo tipo de regulador, o SyrM, regula a expressão de genes *nod* de forma independente de flavonóides (LOH; STACEY, 2003). Assim como NodD, SyrM também pertence à família LysR de reguladores transcricionais e atua também no controle de genes que codificam a síntese de exopolissacarídeos (EPS) (HANIN *et al.*, 1998).

Os genes alvo de SyrM apresentam uma seqüência altamente conservada em sua região promotora, localizada cerca de 30pb à montante da posição +1 da região codificadora, a qual foi denominada SyrM-*box* (BARNETT *et al.*, 1996; KOBAYASHI *et al.*, 2004). Em *R. meliloti*, SyrM controla a expressão de *syrA* e *nodD3*, dentre outros genes de nodulação, e tem sua expressão regulada pela proteína NodD3, formando um circuito de auto regulação. Em consequência disso, a indução de genes *nod* por SyrM não acontece de forma direta, sendo mediada por NodD3 (SWANSON; MULLIGAN; LONG, 1993; BARNETT *et al.*, 1996).

Conforme descrito por Smith e Long (1998), em *R. meliloti*, SyrM atua como gene regulatório essencial para a nodulação em alguns hospedeiros, como no caso de *Medicago sativa* (alfafa) e *M. truncatula*. O mesmo estudo demonstra que para a nodulação de *M. truncatula*, a proteína NodD3 atua otimizando a nodulação e que NodD2 não induz à nodulação na ausência de NodD3 ou de SyrM. Tais pesquisadores concluem que SyrM é necessário para otimizar a nodulação, mas que apenas a presença deste não é suficiente para uma nodulação eficiente de *R.*

*meliloti* neste hospedeiro.

Em algumas espécies de *Bradyrhizobium* foi identificado um outro par regulatório, envolvendo os produtos dos genes *nodVW*. As proteínas NodVW são membros da família do sistema regulatório de dois componentes, onde NodV atua como sensor ambiental e desencadeia uma série de sinais de transdução que levam NodW a induzir a expressão de genes envolvidos no processo de nodulação. Estudos com mutantes nestes genes revelaram um fenótipo de perda da habilidade em nodular *M. atropurpureum*, *Vigna radiata*, e *V. unguiculata*. Também já se sabe que a associação entre as proteínas NodW e NodD1 é essencial para uma indução máxima de genes *nod* comuns assim como do gene *nodD1* (PIETERNEL; VANDERLEYDEN, 1995).

#### 3.2.4. Sistema de secreção do tipo III

Algumas espécies de rizóbios apresentam um sistema de secreção do tipo III (T3SS) completo e simbioticamente ativo. Este sistema foi primeiramente descrito em microrganismos patógenos de plantas e animais, estando envolvido na secreção de fatores de virulência. Em microrganismos simbiotes este sistema está envolvido na secreção de proteínas para o meio extra-celular ou no citoplasma de células eucarióticas, onde alteram o funcionamento das células, facilitando o processo de infecção. Tal sistema passou a ser conhecido entre os rizóbios a partir do sequenciamento do pNGR234a (plasmídeo simbiótico de NGR234). A partir de então, a presença deste sistema foi descoberta em *Mesorhizobium loti* MAF303099, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 e em *Rhizobium fredii* estirpes USDA 257 e HH103 (MARIE *et al.*, 2003; AUSMEES *et al.*, 2004).

As proteínas secretadas por rizóbios através deste aparato são denominadas Nops (proteínas externas de nodulação) e atuam modulando a formação e o número de nódulos em algumas espécies hospedeiras, atuando assim, na eficiência da nodulação destas (MARIE *et al.*, 2003). Em alguns hospedeiros, este sistema apresenta efeitos positivos, como o aumento do número de nódulos e, conseqüentemente, da eficiência da nodulação. É o caso da infecção de *Flemingia congesta* por NGR234 e de *G. max* por *R. fredii* HH103. Em outros organismos, sua

presença tem efeito negativo, e provocam a indução de resposta de defesa na planta, impedindo a nodulação, como ocorre na infecção de *Phaseolus vulgaris* por NGR234 e de *G. max* cv. Peking por *B. japonicum* USDA257 (MARIE; BROUGHTON; DEAKIN, 2001).

### 3.3. *Rhizobium* sp. NGR234

O bacilo gram-negativo *Rhizobium* sp. NGR234 (New Guinea Rhizobium 234) pertence à família Rhizobiaceae (TRINICK, 1980). Este microrganismo tem a capacidade de estabelecer uma relação simbiótica com mais de 110 gêneros de diferentes leguminosas, além de *Parasponia*, gênero de uma planta não pertencente à família Fabaceae, sendo, por isso, considerado um simbiote promíscuo (RELIC *et al.*, 1993). O genoma de NGR234 é fracionado em três replicons: um cromossomo de aproximadamente 3,5 Mb, um megaplasmídeo de mais de 2 Mb (pNGR234b) e pNGR234a, um plasmídeo simbiótico de 536 Kb (FREIBERG *et al.*, 1997).

Em NGR234 os genes envolvidos na nodulação localizam-se no plasmídeo simbiótico, com exceção de *nodE*, *nodG* e *nodPQ*, os quais são cromossômicos. Os processos de infecção e de fixação de nitrogênio em NGR234 resultam da expressão de genes *nod*, *noe* e *fix*, os quais são controlados por quatro reguladores transcricionais da família LysR: NodD1, NodD2, SyrM1 e SyrM2, produtos dos genes *nodD1*, *nodD2*, *syrM1* e *syrM2*, respectivamente, anteriormente conhecidos como *y4aL*, *y4xH*, *y4pN* e *y4zF*, respectivamente (FREIBERG *et al.*, 1997).

#### 3.3.1. Os genes *nodD* de NGR234

Estudos demonstram que parte da promiscuidade de NGR234 pode ser explicada pela capacidade da proteína NodD1 interagir com uma grande variedade de flavonóides e compostos relacionados, incluindo substâncias fenólicas simples (como vanilina) e compostos que podem ser inibitórios em outros rizóbios (RELIC *et al.*, 1993).

Análises fenotípicas do mutante no gene *nodD1*, NGR $\Omega$ *nodD1*, demonstraram que este é incapaz de nodular todas as plantas testadas (RELIC *et al.*, 1993). Além de outros genes *nod*, o operon *nodABC* não é transcrito no mutante NGR $\Omega$ *nodD1*,

conseqüentemente este não produz Fatores Nod. A transcrição do gene *nodD2*, que é dependente de *nodD1*, também é afetada neste mutante e o regulador NodD2, que é necessário para a formação de nódulos fixadores de nitrogênio em raízes de alguns hospedeiros de NGR234, tem sua expressão alterada (HANIN *et al.*, 1998).

Estudos evidenciam que em NGR234, a proteína NodD2 tem um papel importante na repressão do operon *nodABC/JnoI/OnoI*. Mutantes no gene *nodD2* apresentam cinco vezes mais Fatores Nod que estirpes selvagens. Além disso, a produção de Fatores Nod é contínua, bem como seu acúmulo em nódulos de *V. unguiculata* infectados por este mutante, comprovando o papel repressor de NodD2 sobre este operon na estirpe selvagem. Fellay e seus colaboradores (1998) afirmam que há a possibilidade dessa atividade repressora de NodD2 sobre o operon *nodABC* ser resultado de uma interação entre este ativador e NoIR, já que outros estudos demonstraram o papel repressor de NoIR, em *R. meliloti*, sobre este mesmo operon. Logo, mutações no gene *nodD2* podem levar a um fenótipo pleiotrópico. Estes estudos concluem que NodD2 está envolvida na especificidade do hospedeiro e que sua atividade está relacionada em fases intermediárias da simbiose, onde a produção de Fatores Nod é reprimida e dá-se o estabelecimento do bacteróide (FELLAY *et al.*, 1998). Entretanto, estudos recentes demonstram que NodD2 atua também como regulador positivo de alguns genes como *y4wE*, *y4wF* e *y4wG* (KOBAYASHI *et al.*, 2004), cujos produtos ainda não têm função conhecida (FREIBERG *et al.*, 1997).

A expressão do gene *nodD1* tem sido analisada e foi observado que este é constitutivamente expresso e independente de flavonóide. Durante o processo de infecção da planta, o gene *nodD1* tem sua expressão inibida pela proteína NodD2 (KOBAYASHI *et al.*, 2004). O gene *nodD2* é expresso de forma dependente de NodD1. Entretanto, na região promotora de *nodD2* não há a presença de um *nod-box*, o que indica a presença de intermediário na regulação que NodD1 exerce sobre esta região (FELLAY *et al.*, 1998). A análise da seqüência do promotor do gene *nodD2* demonstra a existência de um provável *SyrM-box* nesta região. Ensaio *in vivo* utilizando fusões transcricionais com o gene *lacZ* nos mutantes nos genes *syrM1* (NGR $\Omega$ *syrM1*) e *syrM2* (NGR $\Omega$ *syrM2*) descartaram o regulador SyrM1 como o intermediário entre a proteína NodD1 e o gene *nodD2*. Estes estudos determinaram que a transcrição do gene *nodD2* requer a presença do ativador SyrM2 como intermediário de NodD1. Assim, o gene *nodD2* é expresso tardiamente e

dependente da atividade flavonóide induzível dos reguladores NodD1 e SyrM2 (KOBAYASHI *et al.*, 2004).

### 3.3.2. Os genes *nodVW* de NGR234

As proteínas NodV e NodW fazem parte da família de sistemas de dois componentes. Como os demais membros desta família, estas duas moléculas atuam em conjunto sendo que uma, no caso NodV, age como um sensor ambiental que em condições favoráveis ativa o regulador transcricional NodW. Os produtos dos genes *nodVW* já foram estudados em outros organismos e foi demonstrado que estes modulam a expressão de genes *nod* em *B. japonicum*. Neste organismo, o ativador NodW modula a expressão de genes do sistema de secreção de tipo III, através da regulação do gene *ttsI*, cujo produto é o principal regulador do cluster T3SS (KRAUSE; DOERFEL; GÖTTFERT, 2002). Em NGR234, duas ORFs codificam possíveis homólogos de NodVW de *B. japonicum* (STREIT *et al.*, 2004). Entretanto, ainda não está elucidado o papel destas proteínas na regulação de genes *nod* neste organismo.

### 3.3.3. Os genes *syrM* de NGR234

Os genes *syrM1* e *syrM2* de *Rhizobium* sp. NGR234 apresentam cerca de 60% de identidade entre si. Além disso, estas seqüências são também altamente similares às seqüências dos genes *syrM1* e *syrM2* de outros organismos, como *Rhizobium meliloti* e *R. leguminosarum* (HANIN *et al.*, 1998).

Em NGR234, o produto do gene *syrM1* está envolvido tanto no início da simbiose quanto durante a infecção, sugerindo que este é continuamente expresso durante estes estágios. Estudos demonstraram que a proteína SyrM1 regula os genes *nopB* e *rhcC1* (anteriormente denominados *noIB* e *noIW*, respectivamente) e que a expressão do promotor de *nopW* é completamente abolida no mutante no gene *syrM1*, NGR234 $\Delta$ *syrM1*. Além disso, análises fenotípicas de mutantes NGR234 $\Delta$ *syrM1* demonstraram que estes produzem 10 vezes menos Fatores Nod

sulfatados que a estirpe selvagem e que formam menos nódulos que o tipo selvagem em alguns hospedeiros. Estes dados sugerem a participação de SyrM1 na regulação de genes simbióticos, dentre eles os genes *nodPQ*, que auxiliam na manutenção do nível de Fatores Nod sulfatados. Estes estudos relatam a presença de *nod-boxes* nos promotores dos genes regulados por SyrM1, sugerindo que este pode atuar direta ou indiretamente sobre aqueles promotores, por intermédio de outro regulador (HANIN *et al.*, 1998).

Em *Flemingia congesta* e *Robinia pseudoacacia* os nódulos formados pelo mutante no gene *syrM1* são menos eficientes na fixação de nitrogênio. Mutações no gene *syrM1* de NGR234 (HANIN *et al.*, 1998) e de *R. meliloti* (BARNETT; LONG; 1997) resultam em pequenos prejuízos na nodulação. Uma explicação é que *syrM1* pode assegurar uma rede de regulação cujo papel biológico é otimizar os fatores que controlam uma nodulação eficiente e o reconhecimento específico entre os simbiontes (HANIN *et al.*, 1998). Em outros microrganismos, como *R. meliloti*, SyrM é essencial para uma nodulação eficiente (SMITH; LONG, 1998).

Fusões transcricionais com o gene repórter *lacZ* contendo o *nod-box* 19 (promotor do gene *syrM2*) foram mobilizadas para NGR234, NGR $\Omega$ *nodD1* e NGR $\Omega$ *nodD2*, para análise da regulação da expressão do gene *syrM2*. Estes estudos verificaram que a expressão do gene *syrM2* é dependente da proteína NodD1 e parece ser, ainda, influenciada por NodD2, sendo flavonóide induzida. O gene *syrM2* é expresso em níveis basais, o que indica que genes regulados por seu produto necessitam de mais tempo para uma completa expressão. Isso demonstra que o ativador transcricional SyrM2 regula a transcrição de genes envolvidos nos processos tardios da relação simbiótica (KOBAYASHI *et al.*, 2004).

### 3.3.3. Sistema de secreção do tipo III em NGR234

O sequenciamento do plasmídeo simbiótico pNGR234a confirmou a presença de um completo e ativo sistema de secreção do tipo III (T3SS) em NGR234. Estes genes estão organizados em oito unidades transcricionais, em um cluster de 30Kb entre o regulador transcricional *ttsI* (anteriormente *y4xI*) e o gene *y4yS* (FREIBERG *et al.*, 1997), os quais são também encontrados em *Rhizobium fredii* estirpe

USDA257. Dependendo da planta hospedeira, mutantes de NGR234 que não apresentam um aparato de secreção de tipo III funcional, exibem diferentes fenótipos de nodulação, em virtude da atividade de secreção de proteínas de nodulação deste sistema (BARTSEV *et al.*, 2004; AUSMEES *et al.*, 2004).

O aparato T3SS tem sua expressão modulada pelo ativador transcricional, TtsI, que é membro da família de sistemas de dois componentes (VIPREY *et al.*, 1998). Entretanto, TtsI apresenta atividade independente da presença de um sensor ambiental (MARIE *et al.*, 2004). O gene *ttsI* é regulado de forma flavonóide induzível através da ativação do *nod-box* 18 pelo regulador NodD1. A expressão gênica de *ttsI* é tardia, iniciando após 24 horas de indução com flavonóides compatíveis (KOBAYASHI *et al.*, 2004).

Estudos demonstram que genes controlados por TtsI apresentam uma seqüência consenso em suas regiões promotoras, a qual foi denominada *tts* box (KRAUSE; DOERFELL; GÖTTFERT, 2002; MARIE *et al.*, 2004). Foram identificados onze *tts* box no plasmídeo pNGR234a, os quais regulam a expressão de genes envolvidos diretamente na formação do aparato de secreção e de genes que codificam Nops e LPS ricos em ramnose, além do operon *y4mFE* cujo produto está diretamente ligado a estabilidade do plasmídeo simbiótico (homologo a *y4dLM* de *R. etli*) (MARIE *et al.*, 2004).

A expressão de genes do aparato T3SS se dá em períodos intermediários da simbiose, após os genes *nod* e antes dos genes *fix* e *nif* serem ativados, sugerindo que este sistema de secreção participa no desenvolvimento do nódulo e que pode ainda atuar como determinante na especificidade rizóbio-hospedeiro (VIPREY *et al.*, 1998). O rompimento na síntese de polissacarídeos ricos em ramnose em NGR234 provoca impactos na formação do nódulo, assim como na fixação de nitrogênio em muitos hospedeiros. Em outros organismos, como *A. caulinodans*, já foi demonstrado que estas moléculas estão envolvidas na liberação da bactéria do cordão de infecção e na proteção do microsimbionte de reações de defesa da planta (MARIE *et al.*, 2004).

### 3.3.5. Regulação temporal da nodulação em NGR234

Estudos confirmam que a proteína NodD1 é a chave da ativação de loci



flavonóide induzíveis em *Rhizobium* sp. NGR234, enquanto que o regulador NodD2 está envolvido na repressão posterior de vários genes *nod*, mas é especificamente necessário para estimular a expressão a partir de alguns *nod box*. Uma vez que a expressão do gene *nodD2* requer a proteína SyrM2, cuja transcrição é dependente de NodD1, estes três reguladores formam uma cascata regulatória que coordena a expressão de aproximadamente 75 genes de modo flavonóide específicos (KOBAYASHI *et al.*, 2004).

Uma cascata regulatória dependente de flavonóide e da proteína NodD1 em NGR234 (Figura 1) foi proposta por Kobayashi e seus colaboradores (2004). De acordo com este modelo, os flavonóides compatíveis interagem com NodD1 e induzem uma via regulatória que conduz à ativação de pelo menos 75 *loci* de pNGR234a. Como exemplos de processos biológicos sob controle desta rede de regulação estão a síntese de Fatores Nod, a secreção de proteínas do sistema T3SS e a produção de LPS (lipopolissacarídeos) ricos em ramnose. A proteína NodD1 é o regulador primário da cascata, ativando diretamente operons responsáveis pela síntese dos Fatores Nod através de cinco *nod boxes*, o que permite que NGR234 inicie a nodulação. Além disso, NodD1 ativa a expressão do gene *ttsI* cujo produto age como intermediário na transcrição dos genes codificadores do sistema T3SS. Finalmente, a proteína NodD1 ativa a transcrição do gene *syrM2*, o produto deste ativa a transcrição de *nodD2*, e a proteína NodD2 induz *loci*, como o *fixF*, o qual está envolvido na síntese de LPS ricos em ramnose. Concomitantemente, o regulador NodD2 reprime a expressão do gene *nodD1*. A ativação de cada um dos passos da cascata não ocorre simultaneamente e promove uma regulação temporal que parece ser essencial para o desencadeamento de cada uma das etapas do estabelecimento da simbiose.

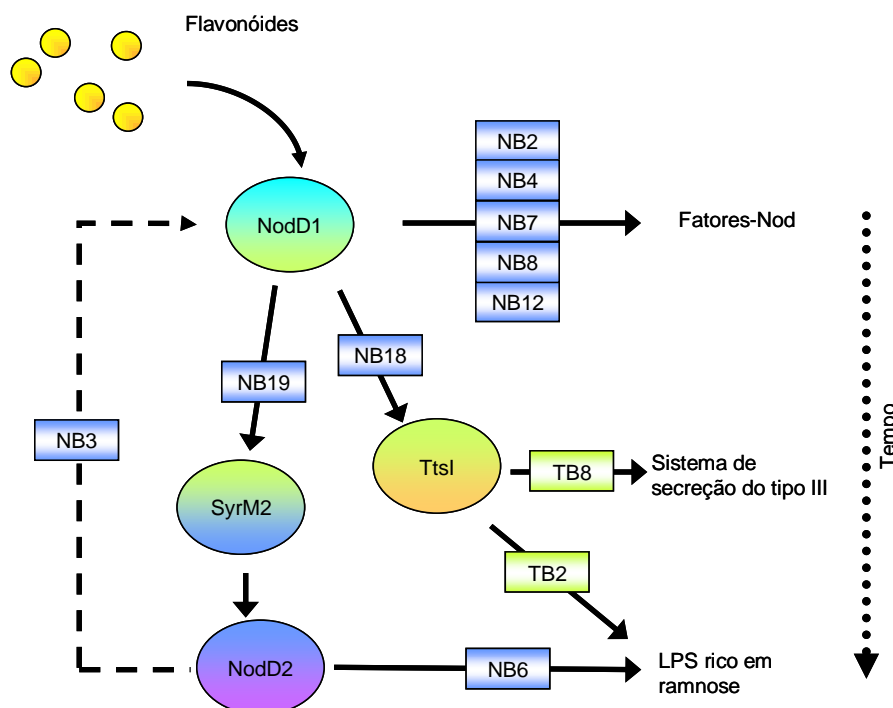


FIGURA 1 - MODELO PROPOSTO PARA A CASCATA REGULATÓRIA DEPENDENTE DE FLAVONÓIDES EM *Rhizobium* sp. NGR234

FONTE: KOBAYASHI *et al.* (2004)

Legenda: as linhas contínuas indicam uma atividade indutora, as linhas tracejadas indicam uma atividade repressora, NB = *nod*-box e TB = *tts*-box.

A ativação de genes envolvidos na síntese e secreção de Fatores Nod dá-se poucos minutos após a indução inicial pelos flavonóides, enquanto a expressão dos genes do sistema T3SS ocorre algumas horas depois (MARIE; BROUGHTON; DEAKIN, 2001). De maneira semelhante, os genes envolvidos com a síntese de LPS ricos em ramnose têm níveis máximos de expressão 24 horas após a indução por flavonóides. A expressão dos genes *fixF* e do operon *rmlB-wbgA*, essenciais para a síntese de ramnose, ocorre da seguinte maneira: a proteína NodD1 ativa a expressão do gene *syrM2*, o produto deste gene ativa *nodD2* e a proteína NodD2 ativa *fixF*; simultaneamente o ativador NodD1 ativa a expressão do gene *ttsI* e seu produto, a proteína TtsI, ativa o operon *rmlB-wbgA*, sendo esta seqüência de regulação iniciada após a indução por flavonóides (BROUGHTON *et al.*, 2006)

Desta forma, a resposta de *Rhizobium* sp. NGR234 a flavonóides de plantas hospedeiras envolve um conjunto de genes e uma complexa cascata de regulação. Esta cascata é coordenada por regiões altamente conservadas nestes genes denominadas *nod*, *tts* e *syrM* box, e também modula a expressão de genes

envolvidos na nodulação e na fixação de nitrogênio, de forma que estes sejam expressos de maneira temporal apropriada, a fim de garantir uma simbiose eficiente (KOBAYASHI *et al.*, 2004).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. ESTRATÉGIA GERAL:

Em NGR234, os reguladores transcricionais NodD1, NodD2, SyrM1, SyrM2 e TtsI modulam a expressão de genes envolvidos em várias etapas da relação simbiótica, como nodulação, infecção e fixação de nitrogênio. Estudos têm demonstrado a função destes reguladores, e foi proposto que estes fazem parte de uma cascata regulatória temporalmente modulada. Porém, o modo como estes reguladores são expressos ainda não está totalmente elucidado. Para auxiliar o esclarecimento dos fatores que controlam a expressão destes reguladores, foram construídas fusões transcricionais com os genes que codificam as proteínas fluorescente verde (GFP) ou  $\beta$ -galactosidase, a jusante das regiões promotoras destes genes. As fusões transcricionais foram testadas em diferentes condições e estirpes para avaliar sua regulação.

### 4.2. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS:

As bactérias e plasmídeos que foram utilizados neste trabalho estão listados nos quadros 1 e 2, respectivamente:

<i>Escherichia coli</i>	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referência
BL21 ( $\lambda$ DE3)	Estirpe produtora da RNA polimerase do fago T7. Esta estirpe não expressa as proteases lon e OmpT e é indicada para a expressão de proteínas recombinantes.	NOVAGEN
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>deoR recA endA1 hsdR17</i> ( $r_K$ , $m_K^+$ ) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ <i>thi-1gyrA96 relA1</i>	INVITROGEN
DH10B	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 <math>\Delta</math>(<i>ara leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i></i>	INVITROGEN

Continua

Conclusão

<i>Escherichia coli</i>	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referência
Origami	Spm <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> Estirpe mutante <i>trxB/gor</i> que facilita a formação de pontes dissulfeto citoplasmática	NOVAGEN
S17.1	Sm <sup>R</sup> Spm <sup>R</sup> Tra <sup>+</sup> <i>pro his recA hsdR</i> (RP4-2 kan::Tn7 tet;Mu, integrado no cromossomo)	SIMON; PRIEGER; PUHLER, 1983
Tuner	Contém uma mutação no gene para Lac permease, o que faz com que os níveis de expressão sejam uniformes entre as células da cultura.	NOVAGEN
<i>Rhizobium</i>		
NGR234	Rif <sup>R</sup> derivado do tipo selvagem de NGR234	TRINICK, M. J. (1980)
NGR $\Omega$ <i>nodD1</i>	NGR234 com um cassete $\Omega$ Spm no sítio <i>Bam</i> HI de <i>nodD1</i> , Spm <sup>R</sup> .	RELIĆ <i>et al.</i> , (1993)
NGR $\Omega$ <i>nodD2</i>	NGR234 com um cassete $\Omega$ Km no sítio <i>Bam</i> HI de <i>nodD2</i> , Km <sup>R</sup> .	FELLAY <i>et al.</i> , (1995)
NGR $\Omega$ <i>nodVW</i>	NGR234 com um cassete $\Omega$ Spm no sítio <i>Bam</i> HI de <i>nodVW</i> , Spm <sup>R</sup>	KAMBARA, K. (dados não publicados)
NGR $\Delta$ <i>syrM1</i>	Mutante de NGR234 onde um cassete $\Omega$ Spm substituiu um fragmento de <i>syrM1</i> , Spm <sup>R</sup> .	HANIN <i>et al.</i> , (1998)
NGR <i>syrM2::uidA</i>	NGR234 derivado, contendo o cassete <i>uid-aph</i> no sítio <i>syrM2</i> , Km <sup>R</sup> .	KOBAYASHI <i>et al.</i> , (2004)

QUADRO 1 – ESTIRPES DE *E. coli* E *Rhizobium* UTILIZADAS NO TRABALHO

FONTE: O autor (2009)

Plasmídeos	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referência
pET-29a (+)	Vetor de expressão/ promotor T7. Utilizado para gerar a proteína de fusão His-Tag. Km <sup>R</sup> .	NOVAGEN
pET-29-syrM1	Contém o gene <i>syrM1</i> clonado no vetor pET-29 a(+), 1052pb. ( <i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> RV)	ESTE TRABALHO
pET-29-syrM2	Contém o gene <i>syrM2</i> clonado no vetor pET-29 a(+), 1091pb. ( <i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> RV)	ESTE TRABALHO
pET-syrM1	Contém o gene <i>syrM1</i> clonado nos sítios <i>Eco</i> RV/ <i>Pvu</i> II do vetor pETBlue-2, 1137pb.	WASSEM, R.
pET-syrM2	Contém o gene <i>syrM2</i> clonado nos sítios <i>Eco</i> RV/ <i>Pvu</i> II do vetor pETBlue-2, 1178pb.	WASSEM, R.
pGEM-T-Easy	Vetor de clonagem/ promotor <i>lacZ</i> . Amp <sup>R</sup> .	PROMEGA

Continua

Conclusão		
Plasmídeos	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referência
pGEM-T-psyrM1	Região promotora do gene <i>syrM1</i> clonado no vetor pGEM-T-Easy, 991pb.	ESTE TRABALHO
pGEM-T-ttsI/nodD2	Região intergênica entre <i>ttsI/nodD2</i> clonada no pGEM-T-Easy. 1932pb	ESTE TRABALHO
pGT'-pnodD1	Promotor do gene <i>nodD1</i> clonado no sítio <i>PstI</i> do vetor pPROBE-GT'. 650pb	ESTE TRABALHO
pGT'-psyrM1	Promotor do gene <i>syrM1</i> clonado no sítio <i>PstI</i> do vetor pPROBE-GT'. 750pb	ESTE TRABALHO
pGT-NB3	Contém a região do <i>nod-box 3</i> clonado no sítio <i>PstI</i> do vetor pPROBE-GT. 650pb	WASSEM, R.
pGT-NB8	Contém a região do <i>nod-box 8</i> clonado no sítio <i>EcoRI</i> do vetor pPROBE-GT. 275pb	WASSEM, R.
pGT-NB18	Contém a região do <i>nod-box 18</i> clonado no sítio <i>EcoRI</i> do vetor pPROBE-GT. 666pb	WASSEM, R.
pGT-pnodD2	Região promotora do gene <i>nodD2</i> clonada no sítio <i>EcoRI/BamHI</i> do vetor pPROBE-GT. 1,3 kb	WASSEM, R.
pGT'-pnodD2II	Região intergênica entre os genes <i>ttsI</i> e <i>nodD2</i> , na direção de <i>nodD2</i> clonada no vetor pPROBE-GT', 2594pb. ( <i>BamHI/EcoRI</i> )	ESTE TRABALHO
pGT-pttsI	Região intergênica entre os genes <i>ttsI</i> e <i>nodD2</i> , na direção de <i>ttsI</i> clonada no vetor pPROBE-GT, 2594pb. ( <i>BamHI/EcoRI</i> )	ESTE TRABALHO
pMP-NB19	Contém a região do <i>nod-box 19</i> clonado no vetor pMP220 750pb. ( <i>SacI</i> )	KOBAYASHI <i>et al.</i> , 2004.
pPROBE - GT	Vetor de clonagem contém o gene <i>gfp</i> sem promotor. Gm <sup>R</sup> .	MILLER; LEVEAU; LINDOW, 2000.
pPROBE - GT'	Vetor de clonagem contém o gene <i>gfp</i> sem promotor. Gm <sup>R</sup> .	MILLER; LEVEAU; LINDOW, 2000.
pRAF115	Contém a região promotora de <i>nodD2</i> clonada no vetor pMP220. ( <i>PstI/BamHI</i> ) 1300pb	FELLAY <i>et al.</i> , 1998.
pTE-NB3	Contém a região do <i>nod-box 3</i> clonado no sítio <i>PstI</i> do vetor pTE103. 650pb	WASSEM, R.

## QUADRO 2 – PLASMÍDEOS UTILIZADOS NO TRABALHO

FONTE: O autor (2009)

#### 4.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO:

As estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas a 37°C ou a 30°C em meio Luria Bertani (LB) ou Luria Bertani Agar (LA) (SAMBROOK *et al.*, 1989). Os meios de cultivo foram suplementados com as seguintes concentrações de antibióticos: ampicilina (Amp) 250 µg/mL; tetraciclina (Tc) 10 µg/mL; estreptomicina (Sm) 10 µg/mL; espectinomicina (Spm) 50 µg/mL; canamicina (Km) 50 µg/mL; ácido nalidíxico (Nal) 10 µg/mL; gentamicina (Gm) 15 µg/mL. O cultivo em meio líquido foi feito sob agitação contínua a 150 rpm. Quando necessário, foram adicionados X-gal 30 µg/mL e IPTG 100 µM.

Os meios TY (*tryptone-yeast*) e RMS foram utilizados para o cultivo das estirpes de *Rhizobium*. Estes foram acrescidos das seguintes concentrações de antibióticos: rifampicina (Rif) 100 µg/mL; gentamicina (Gm) 15 µg/mL; espectinomicina (Spm) 50 µg/mL; canamicina (Km) 50 µg/mL. O cultivo destas estirpes foi realizado a 28°C ou a 25°C, para cultivos em meio líquido as culturas foram mantidas sob agitação contínua de 150 rpm.

As estirpes de *E. coli* e *Rhizobium* sp. NGR234 foram estocadas em glicerol 50% a -20°C.

#### 4.4. MEIOS DE CULTIVO:

Segue a composição dos meios utilizados.

##### **Meio LB (Luria Bertani Broth):**

Componente	Gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

O pH do meio de cultura foi ajustado para 7,0 com NaOH 1M. A esterilização foi realizada em autoclave a 121°C por 20 minutos. Para o meio LA foi acrescido 1,5% de agar ao emio LB.

**Meio TY (*triptone-yeast*):**

Componente	Gramas/litro
Extrato de levedura	3,0
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,87
Triptona	5,0

O pH do meio de cultura foi corrigido para 6,8 com NaOH 1 M. A esterilização foi realizada em autoclave a 121°C por 20 minutos. Para o meio TY sólido foi acrescido 1,5% de ágar.

**RMS**

O meio RMS foi preparado a partir de soluções estoque individuais.

Soluções estoque:

Solução I-A: 205 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/145 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/15 g/L NaCl

Solução I-B: 50 g/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>

Solução II: 50 g/L MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O

Solução III: 2,5 g/L CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O

Solução IV (para 100mL): 123 g/L MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O/87 g/L K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/0,34 g/L MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O/0,25 g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/0,29 g/L ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/0,1 g/L CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O/0,06g/L CoSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/0,05 g/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O

Solução de vitaminas de Gamborg 1000X (Sigma)

Succinato de sódio: 324 g/L

As soluções I-A, I-B, II, III e IV foram autoclavadas, enquanto a de succinato foi filtrada.

Preparação do RMS:

Para o preparo de 1 litro de meio RMS foram adicionados 10 mL das soluções I-A, I-B e II e 1 mL das soluções III, IV e de vitaminas. Como fonte de carbono foram adicionados 10 mL de solução de succinato de sódio.

**4.5. MANIPULAÇÃO DE DNA**

As reações de ligação, restrição e defosforilação de DNA foram realizadas



nas condições especificadas pelo fabricante.

#### 4.5.1. Extração de DNA plasmidial

A purificação e extração plasmidial foram realizadas por meio da técnica de lise alcalina (“Mini-prep”) (SAMBROOK *et al.*, 1989). Assim, alíquotas de 1,5 mL de cultura foram centrifugadas a 13000rpm por 60 segundos. O *pellet* de células foi então ressuspensão em 150 µL de GET (Glicose - 50,0 mM, Tris HCl pH 8,0 - 25,0 mM, EDTA pH 8,0 - 10,0 mM) e estas lisadas com 150 µL de solução de lise (NaOH 0,2M e SDS 1%). Em seguida foram adicionados 150 µL de Kacf (acetato de Potássio – 3M; ácido fórmico – 1,8M) e a solução foi agitada para homogeneização. Após incubação em gelo por 5 minutos foram adicionados 50 µL de uma mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e esta foi vigorosamente homogeneizada e então centrifugada a 13000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o DNA plasmidial precipitado com 2,5 volumes de etanol, lavado com etanol 80% e ressuspensão em água ultra pura esterilizada.

#### 4.5.2. Rapid-prep

A extração de plasmídeos por “Rapid-Prep” foi utilizada para a análise de colônias de *Escherichia coli* contendo plasmídeos recombinantes. Para esta análise, as colônias foram inoculadas em frasco de crescimento contendo 1 ml de meio LB e mantidas sob agitação a 37°C de 16-18 horas. Foram então transferidos 200 µL destas culturas para tubos plásticos de 1,5mL e estes foram centrifugados a 13000rpm por um minuto. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspensão em 40 µL de solução RL (10% glicerol, 5 µg/mL RNase, 0,05% azul de bromofenol). Em seguida foram adicionados à reação 10 µL de SDS 10% e esta foi homogeneizada por inversão. Após incubação em temperatura ambiente por um minuto, foram adicionados 5 µL de KCl 3 M seguidos de homogeneização por inversão. Em seguida, a mistura foi incubada em gelo por três a cinco minutos e centrifugada a 13000 rpm por dois minutos. Foram aplicados 15 µL da fase aquosa em gel de agarose a 0,7% para análise eletroforética dos plasmídeos extraídos, pela

taxa de migração relativa (MONTEIRO *et al.*, 2001).

#### 4.5.3. Purificação de fragmentos de DNA em gel agarose

Fragmentos de DNA de interesse foram isolados dos géis de agarose de baixo ponto de fusão após separação eletroforética em tampão de corrida TAE (Tris base 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio e o fragmento de interesse foi identificado por comparação com o padrão de massa molecular (1 Kb Ladder Peqlab - Alemanha) e a banda recortada. A fatia de gel foi colocada em tubo plástico de 1,5 mL e incubada a 65°C até fusão completa da agarose. Durante a incubação, foram adicionados 10 mM de EDTA, 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 200 mM de NaCl. Após incubação, foi adicionado a mistura 1 volume de fenol equilibrado e esta foi homogeneizada sob forte agitação em vortex. Após incubação por 5 minutos sob constante agitação, a solução foi centrifugada a 13000rpm durante 7 minutos e o sobrenadante foi transferido para novo tubo plástico. A esse tubo foram adicionados 50 µL de clorofórmio e a solução foi bem homogeneizada antes de ser centrifugada a 13000 rpm por 7 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo tubo plástico e o DNA foi precipitado com um volume de isopropanol, e o sedimento foi lavado uma vez com etanol 80% e secado. O precipitado foi ressuspensão em água ultra pura autoclavada.

#### 4.5.4. Extração de DNA genômico de *Rhizobium* sp. NGR234

Para obtenção de DNA cromossômico total de *Rhizobium* NGR234, 1,5 a 5 mL de culturas crescidas em meio TY líquido a 25°C foram centrifugadas a 13000rpm por dois minutos. O precipitado de células formado foi ressuspensão em 100 µL de GET (Glicose - 50,0 mM, Tris HCl pH 8,0 - 25,0 mM, EDTA pH 8,0 – 10 mM) por agitação no vortex, então foram adicionados 10 µL de lisozima (10 mg/mL) e a mistura foi incubada por trinta minutos a 37°C. Foram adicionados a solução 400 µL de tampão de lise (40 mM Tris-acetato pH 7,8, 20 mM acetato de Na, 1 mM EDTA e 1% SDS) e a mistura foi homogeneizada por “pipetagem” vigorosa, em

seguida foram adicionados 165  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M e a solução foi bem homogeneizada, então foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Esta solução foi bem homogeneizada antes de centrifugação por dez minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novo tubo plástico e repetiu-se o tratamento com 50  $\mu\text{L}$  fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Para obtenção de um DNA mais puro, após os tratamentos com fenol realizou-se um tratamento com 50  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. O DNA foi então precipitado com 2/3 de volume de acetato de amônia 7,5M e 2,5 volumes de etanol e lavado com etanol 80% e seco. O precipitado foi ressuspensão em água ultra pura autoclavada.

#### 4.5.5. Condições de eletroforese

Plasmídeos íntegros, fragmentos de restrição e produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose em concentrações entre 0,6 e 1,5%. As corridas foram realizadas em uma voltagem variável de 60-110 V, de acordo com a cuba utilizada, sempre obedecendo a proporção de 3-5 V por centímetro de cuba de um eletrodo ao outro, em tampão de corrida TBE 1X (90 mM Tris; 89 mM Ácido Bórico; 2 mM EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

#### 4.6. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA:

A transferência de plasmídeos para *E. coli* foi realizada por eletroporação ou choque térmico e para NGR234 por conjugação.

##### 4.6.1. Preparo de células de *E. coli* eletro competentes

Para o preparo de *E. coli* eletro competente as células foram cultivadas em meio SOB até D.O.<sub>600</sub> (densidade óptica de 600nm) de 0,4 - 0,6 e coletadas após centrifugação a 4500 rpm/5 minutos a 4°C. O *pellet* resultante foi lavado três vezes com água ultra pura esterilizada gelada e ressuspensão em solução gelada de glicerol 15%. As alíquotas de células foram distribuídas (200  $\mu\text{L}$ ) em tubos plásticos

de 1,5 mL gelados e mantidas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6.2. Transformação por eletroporação

Para a eletroporação, as células eletro competentes foram descongeladas em banho de gelo e combinadas a alíquotas de DNA a ser eletroporado. A mistura foi colocada em uma cubeta de eletroporação (Bio-Rad), colocada na câmara de eletroporação e submetida a um campo elétrico de 12500 Volts/cm. As células de *E. coli* foram recuperadas em 900  $\mu\text{L}$  de meio LB, e então incubadas sob agitação (130 rpm) por 45 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Células transformadas foram selecionadas em meio LA acrescido dos antibióticos apropriados, seguida de incubação por 16-20 h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6.3. Preparo de células de *E. coli* termo competentes

Para o preparo de *E. coli* termo competentes, as células foram cultivadas em meio SOB até D.O.<sub>600</sub> de 0,4 - 0,6 e coletadas após centrifugação a 4500 rpm/5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O *pellet* resultante após ressuspensão foi lavado duas vezes com tampão TB (10 mM Pipes, 55 mM  $\text{MnCl}_2$ , 15 mM  $\text{CaCl}_2$ , 250 mM KCl pH 6,7) gelado. Na segunda lavada acrescentou-se 0,7% de DMSO. As alíquotas de células foram distribuídas (200  $\mu\text{L}$ ) em tubos plásticos de 1,5 mL gelados e mantidas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6.4. Transformação por choque térmico

Para o choque térmico as células termo competentes foram descongeladas em banho de gelo e combinadas a alíquotas de DNA a ser transferido. Após incubar essa combinação por trinta minutos em banho de gelo, as células foram submetidas a um choque térmico de  $42^{\circ}\text{C}$  durante trinta segundos. Após incubá-las em gelo por quinze minutos as células de *E. coli* foram recuperadas em 900  $\mu\text{L}$  de meio LB, e então incubadas sob agitação (130 rpm) por 45 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Células transformadas foram selecionadas em meio LA, acrescido dos antibióticos apropriados, seguida de incubação por 16-20 h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.7. CONJUGAÇÃO

A conjugação inter-específica entre estirpes de *E. coli* e NGR234 foi realizada utilizando-se o método bi-parental (DITTA *et al.*, 1980). A transferência dos plasmídeos mobilizáveis para NGR234 por este sistema foi possível porque estes foram mantidos em *E. coli* estirpe S17.1 (SIMON; PRIEGER; PUHLER, 1983). Para conjugação bacteriana, células de estirpes de NGR234 (receptor) e *E. coli* (doador) foram cultivadas em meio TY e LB, respectivamente, e então co-inoculadas em meio TY sólido e incubadas por 16 horas. A massa de células resultante foi coletada com alça esterilizada e transferida para o meio TY sólido contendo os antibióticos seletivos. Após 4 - 5 dias as colônias resistentes foram coletadas e armazenadas em glicerol para experimentos posteriores.

#### 4.8. CONDIÇÕES DE PCR E REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO:

As reações em cadeia da DNA polimerase (PCR; *polymerase chain reaction*) foram realizadas em termocicladores Mastercycler Eppendorf. O quadro 3 mostra a seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e as suas respectivas temperaturas de anelamento.

Par de oligonucleotídeos iniciadores	Temperatura anelamento	Aplicação no trabalho
NB3rev/NB3for (5'-GCCGTGAGTTTGCCTTCGGT-3'/ 5'-ACAAAGCCTGTTCTTCAGGA-3')	58°C	Verificar presença de inserto em colônias transformantes pGT'-NB3.
SyrM2N/Syrm2C (5'-AATGGATCAGCCCGCTTGGA-3'/ 5'-ACTATCGTTCTGCCGCCTCG-3')	60°C	Verificar presença de inserto em colônias transformantes pET-29-syrM2.
SrM1N/ SyrM1C (5'-CGTGGATGAGCCCGCTTGTA-3'/ 5'-TTGCCTGGACGCAGCATCG-3')	60°C	Verificar presença de inserto em colônias transformantes pET-29-syrM1.
SyrM1 up /SyrM1 down (5'-GTGCACTGCAGCAATCAG-3'/ 5'-GTGCACTGCAGCAATCAG-3')	55°C	Amplificação da região promotora do gene <i>syrM1</i> .

Continua

## Conclusão

Par de oligonucleotídeos iniciadores	Temperatura anelamento	Aplicação no trabalho
ttsI down /nodD2 up (5'-CCAACG <u>AA</u> TTCAACGGCAA-3') 5'-GAGGT <u>GA</u> ATTCTGCGAGCA-3')	50°C	Amplificação da região intergênica entre <i>ttsI</i> e <i>nodD2</i> .
GFP5'R1 (5'-CAAGAATGGGGACAA CTCC-3')	58°C	Usado em combinação com outros oligonucleotídeos iniciadores para verificar direção de insertos no vetor pPROBE-GT'.
M13 reverse/M13 forward (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3') 5'-GCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3')	60°C	Usado para o seqüenciamento de fragmentos no vetor pGEM-T-Easy.
NB19+/NB19- (5'-ATAGAGATCTGCAACGAGCACACG-3') 5'-CCAAGAGATCTGATCCATTGATGTC-3')	64°C	Análise da presença do NB19 como inserto no vetor pPROBE-GT'.
pET-28 promotor/pET-28 terminador	60°C	Usado pra verificar presença de inserto no vetor pET-29a(+).
syrM box forward/syrM box reverse 5'-CTGCGAAAGTGAGAGGTCGGT-3') 5'-TCCTGAGGCATCAATGGCA-3'	60°C	Usado para verificar presença da região intergênica entre <i>ttsI/nodD2</i> e para o sequenciamento deste fragmento.

### QUADRO 3 – SEQÜÊNCIA E TEMPERATURA DE ANELAMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NO TRABALHO

FONTE: O autor

O seqüenciamento foi realizado utilizando o método de terminação de cadeia (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) em seqüenciador automático ABI 377 (Perkin Elmer), utilizando-se didesoxirribonucleotídeos fluorescentes. As reações foram realizadas utilizando-se ET terminator (GE Healthcare), onde os parâmetros de amplificação foram definidos de acordo com os iniciadores utilizados. Como DNA molde para as reações de seqüenciamento foram utilizados plasmídeos purificados.

Para obtenção de plasmídeos a serem seqüenciados, estes foram purificados através de lise alcalina e então tratados por três horas com RNase 10 µg/mL a 37°C. Em seguida, foi adicionado 2/3 do volume de acetato de amônio 7,5 M e esta mistura foi homogeneizada antes de serem adicionados 2,5 volumes de etanol para precipitação do DNA. Após a centrifugação a 13000rpm por dez minutos, a amostra

foi lavada com etanol 80% e seca, para então ser ressuspensa em água ultra pura autoclavada. Cerca de 200 a 500 ng de DNA plasmidial foram utilizados nas reações de seqüenciamento.

#### 4.9. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES EM ESTUDO

As regiões promotoras de interesse foram clonadas a montante do gene *gfp* presente no vetor pPROBE-GT. Estes plasmídeos recombinantes foram inseridos nas estirpes mutantes e selvagem de NGR234 através de conjugação bi-parental. Assim, a expressão destas regiões pôde ser analisada através da mensuração do nível de expressão da proteína verde fluorescente (GFP) nestas estirpes.

Para tanto, 3 mL de meio TY acrescido de Rifampicina/Gentamicina (Rif/Gm) foram inoculados com as estirpes de *Rhizobium* e cultivados a 28°C 150rpm. Após 48 horas de crescimento, foram inoculados 200 µL desta cultura em 3 mL de RMS acrescido de Gm, e esta cultura serviu de pré-inóculo para nova cultura em 3 mL de RMS. Após 24 horas a 28°C, a D.O.<sub>600</sub> de todas as culturas foi determinada e inoculou-se 10 mL de RMS de forma que a D.O.<sub>600</sub> de todas as culturas ficasse igual a 0,1. Para cada estirpe foram feitas duas culturas, uma contendo apenas o RMS acrescido de Gm e outra contendo também o flavonóide indutor apigenina ( $2 \times 10^{-7}$  M). Estas culturas foram mantidas a 28°C e foram retiradas alíquotas para a leitura no ponto zero, após 6, 24, 48, 72 e 96 horas. As culturas foram analisadas quanto à expressão de GFP através de leitura da fluorescência emitida no espectrofluorímetro (SHIMADZU RF5301PC). Foram usadas as seguintes condições: 450 nm para excitação, 510 para emissão e 1,5 nm de abertura em ambos os filtros. Para manter a cultura em condições adequadas, em cada ponto de leitura quando se retirou uma alíquota da cultura para ser analisada, foi adicionado à cultura o mesmo volume de RMS acrescido de Gm, e de indutor para as culturas induzidas. Para a comparação dos valores de GFP entre as culturas, o valor de fluorescência emitida foi dividido pela D.O.<sub>600</sub> da cultura, o resultado foi expresso em unidades arbitrárias.

Quando a região de interesse não estava clonada a montante de *gfp* a análise da expressão dessas regiões foi feita a partir de ensaios para determinar a atividade da β-galactosidase, posto que estes fragmentos já estavam disponíveis no vetor pMP220. Para tanto, fez-se uso do protocolo descrito por Miller (1990). Alíquotas (100 µL) de culturas foram coletadas e a estas foram adicionados 900 µL de tampão

Z (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O; 10 mM KCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O; 50 mM B-mercaptoetanol; 0,0025% SDS; pH 7,0). As células foram permeabilizadas pela adição de 25 µL de clorofórmio e homogeneização em agitador Vortex por 10 segundos. A reação foi iniciada pela adição de 200 µL de o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG) (4 mg/mL) e incubação a 30°C, sendo interrompida quando atingiu a cor amarela, através da adição de 500 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M, seguida pela determinação da absorvância do cromóforo o-nitrofenol, a turbidez da mistura e da densidade da cultura.

O cálculo desta atividade foi feito através da seguinte fórmula:

$$\text{Unidade Miller} = \frac{1000 \times (A_1 - 1,75 \times A_2)}{T \times V \times \text{DO}}$$

Onde:

A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> absorvâncias determinadas na mistura da reação em 420 e 550 nm.

DO é a densidade da cultura determinada a 600nm.

T é o tempo da reação.

V é o volume da cultura utilizado no ensaio, em mL.

#### 4.10. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS HIS-SYRM1 E HIS-SYRM2 DE *Rhizobium* NGR234 EM *E. coli*

Primeiramente, *E. coli* estirpes BL21 (DE3), Tuner ou Origami foram transformadas com os plasmídeos pET-29-syrM1 e pET-29-syrM2. As colônias transformantes foram inoculadas em 3 mL de LB acrescido de Km e incubadas a 37°C sob agitação constante de 150 rpm até atingir a D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 0,5. Neste ponto, retirou-se uma alíquota de 200 µL da cultura como controle pré indução e em seguida acrescentou-se 200 µM de IPTG à cultura e esta foi mantida a 20°C, durante 5-6 horas. Após a indução, as células foram coletadas por centrifugação a 13000rpm durante 1 minuto. Para confirmar a expressão das proteínas recombinantes, uma alíquota do extrato de células foi submetida à separação eletroforética em géis de poliacrilamida, na presença de SDS (SDS-PAGE), conforme preconizado por Laemmli (1970).



#### 4.11. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS HIS-SYRM1 E HIS-SYRM2 DE *Rhizobium* NGR234 EXPRESSAS EM *E. coli*

Os plasmídeos pET-29-syrM1 e pET-29-syrM2 foram utilizados para superexpressão das proteínas de fusão His-SyrM1 e His-SyrM2, respectivamente, com uma seqüência de aminoácidos contendo 6 resíduos de histidina (seqüência His Tag).

Para a purificação das referidas proteínas, 300 mL de cultura de *E.coli* Origami transformada com os plasmídeos pET-29-syrM1 ou pET-29-syrM2 foram induzidos com IPTG, conforme descrito anteriormente (item 4.9), porém com um tempo maior de indução (6-8 horas). Após a indução, as células foram coletadas por centrifugação a 6000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente e ressuspensas em de tampão A gelado (100 mM glicina; 50 mM Tris; 300 mM NaCl; 0,1% Triton X-100; 20 mM Imidazol; 5% glicerol) e adicionados 100 µL de lisozima e 30 µL de PMSF 0,1 mM. Após incubação por 30 minutos em gelo, as células foram lisadas por pressão através de passagem em prensa de French por cinco ciclos, e o lisado centrifugado a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante livre de células foi aplicado em uma coluna (5 mL) HiTrap-Chelating-Ni<sup>2+</sup> (GE Healthcare) acoplada a sistema de purificação Akta (GE Healthcare). Em seguida, as proteínas não adsorvidas à resina foram removidas através de lavagem com 3 volumes de tampão A. A eluição das proteínas de fusão foi feita através de lavagem da coluna com gradiente contínuo de tampão B (tampão A acrescido de 1 M Imidazol). A purificação foi analisada por eletroforese em SDS-PAGE conforme Laemmli (1970) e as frações contendo as proteínas His-SyrM1 ou His-SyrM2 foram dialisadas contra tampão de armazenamento (50 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl; 50% glicerol; DTT 1 mM; 0,1 mM EDTA) e armazenadas a -20°C.

#### 4.12. ELETROFORESE SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE):

A eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes foi realizada em gel de poliacrilamida conforme Laemmli (1970) preconizou. A concentração do gel de corrida foi de 10%. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical Miniprotean, seguindo recomendações do fabricante (BioRad). As corridas foram realizadas a 60-150V em tampão de corrida 1X durante 1 a 2 horas. Após a corrida o

gel foi corado com Coomassie Blue (BLUM; BEIER; GROSS, 1987).

#### 4.13. ENSAIO DE ALTERAÇÃO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA)

Fragmentos de PCR foram incubados por 30 minutos em tampão TAP (50 mM Tris-acetato; 100 mM acetato de potássio; 8 mM acetato de Magnésio; 3,5% glicol polietileno 8000; 1 mM DTT pH 7,9) com concentrações crescentes de His-SyrM1 ou His-SyrM2. As reações foram resolvidas em gel de poliacrilamida nativo 4% em tampão 1X (Tris 50 mM; 400 mM glicina; 2 mM EDTA; 8 mM MgSO<sub>4</sub>). Os géis foram corados com Sybr Green e visualizados sob luz ultravioleta.

#### 4.14. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento foi delineado como fatorial (3X3), sendo considerados três fatores: a presença ou ausência de indutor, a estirpe e os intervalos de leitura em experimentos com no mínimo três repetições. Foi realizada ANOVA e para testar se as diferenças observadas entre as médias eram estatisticamente significativas aplicou-se o Teste de Tukey com um  $p < 0.01$ . As análises foram executadas no software ASSISTAT 7.5 beta (SILVA; AZEVEDO, 2002).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES DE INTERESSE

Estudos de análise de expressão geralmente são realizados através de fusões transcricionais em plasmídeos de ampla faixa hospedeira. O vetor pPROBE-GT é mantido em médio número de cópias em várias espécies bacterianas, o que é vantajoso no estudo de promotores fracos (MILLER; LEVEAU; LINDOW, 2000), sendo amplamente aplicado nesses estudos. O referido vetor carrega como repórter o gene *gfp*, que codifica para a proteína fluorescente verde (GFP), e o gene de resistência à gentamicina (Gm), que é aplicável a inúmeros gêneros bacterianos. Dessa forma, foram construídas fusões transcricionais com as regiões de interesse clonadas a montante de *gfp* e estas foram transferidas para as estirpes: NGR234, NGR $\Omega$ *nodD1*, NGR $\Omega$ *nodD2*, NGR $\Omega$ *syrM1*, NGR $\Omega$ *syrM2* e NGR $\Omega$ *nodVW* através de conjugação bi-parental. Através destas construções foi analisada a expressão dos genes *ttsI*, *nodD2*, *nodD1* e *syrM1*.

A expressão do gene *syrM2* foi analisada através de ensaios de  $\beta$ -galactosidase, fazendo uso do plasmídeo pMP-NB19, que contém a região regulatória do gene *syrM2*, clonada por Kobayashi e colaboradores (2004) no vetor pMP220 a montante de *lacZ*. Para as análises de expressão do gene *syrM2*, o pMP-NB19 foi transferido por conjugação bi-parental para as estirpes em análise.

As análises foram processadas em cinco intervalos de leitura: 06, 24, 48, 72 e 96 horas. Cada região foi analisada sob indução com flavonóide e não induzida. O nível de atividade de GFP foi calculado dividindo o valor da fluorescência emitida pela  $DO_{600}$  da cultura. Para as análises foram calculadas as médias de no mínimo três experimentos e o desvio padrão. Para determinar se as diferenças observadas eram estatisticamente significativas realizou-se uma ANOVA, para verificar se existia diferenças entre as estirpes, seguida do Teste de Tukey para verificar quais estirpes apresentaram diferenças. As análises estatísticas foram desenvolvidas no software ASSISTAT.

### 5.1.1. Análise de expressão do gene *nodD1*

A região promotora do gene *nodD1* contém uma seqüência conservada *nod-box* que foi designada por Kobayashi e seus colaboradores (2004) como NB3. Esta região foi clonada no sítio *Pst*I do vetor pTE103, resultando no plasmídeo pTE-NB3. Este plasmídeo foi então clivado com a endonuclease de restrição *Pst*I liberando um fragmento de 673pb, correspondente a parte da região promotora e incluindo o NB3, o qual foi ligado ao vetor pPROBE-GT' também clivado com a mesma enzima, originando a construção pGT'-pnodD1 (FIGURA 2).

Para confirmar a direção do inserto no plasmídeo construído realizou-se uma reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores GFP5'R1/NB3REV gerando um produto de aproximadamente 700pb, confirmando que o inserto está na orientação de *pnodD1*.

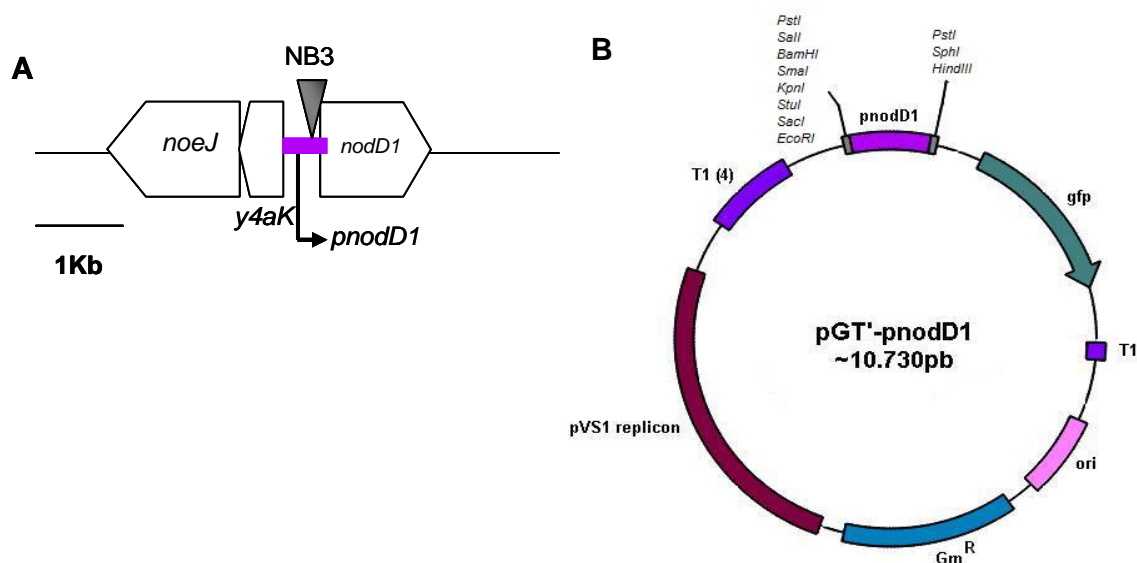


FIGURA 2 - LOCALIZAÇÃO GENÔMICA DO PROMOTOR DE *nodD1* E MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pGT'-pnodD1.

FONTE: O Autor.

NOTA: Localização genômica do promotor do gene *nodD1* e mapa físico do plasmídeo pGT'-pnodD1, onde A, representa a região genômica onde o fragmento clonado está inserido, as setas indicam a direção do sítio reconhecido por reguladores de *nodD1* e a flecha cinza indica a posição do NB3 e B é o mapa físico e sítios de restrição do plasmídeo pGT'-pnodD1.

O estudo da atividade do promotor que controla *nodD1* foi realizado através da construção pGT'-pnodD1 (FIGURA 2), que foi mobilizada em NGR234, NGRΩ*nodD1*, NGRΩ*nodD2*, NGRΩ*syrM1*, NGRΩ*syrM2* e NGRΩ*nodVW*. A figura 3

apresenta o gráfico representativo da atividade de GFP resultante da análise de expressão de *nodD1*. Nesta figura é possível observar que os ativadores de transcrição NodD1, NodD2, SyrM1 e NodW não parecem ter atividade sobre a expressão do gene *nodD1* nas primeiras 24 horas, sendo estatisticamente iguais a estirpe selvagem ( $p < 0,05$ ). A partir de 48 horas, nota-se um comportamento diferente da estirpe selvagem NGR234 em relação às estirpes NGR $\Omega$ *nodD1*, NGR $\Omega$ *syrM1* e NGR $\Omega$ *nodVW* ( $p < 0,05$ ). Enquanto a estirpe selvagem aumenta seus níveis de expressão gradativamente atingindo uma atividade em torno de 6 unidades arbitrárias após 96 horas de indução com apigenina, as outras três estirpes mantêm os níveis de expressão de GFP baixos e contínuos em torno de 2 unidades arbitrárias, desde o início até 96 horas de indução. Estes dados sugerem que NodD1, SyrM1 e NodW apresentam uma atividade indutora sobre este promotor. Menos pronunciada, mas estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), é a diferença nos níveis de expressão de GFP pelas estirpes NGR $\Omega$ *nodD2* e NGR $\Omega$ *syrM2* quando comparadas à estirpe selvagem, sendo que estes dados indicam NodD2 e SyrM2 parecem agir inibindo a expressão do gene *nodD1*.

Esta região foi anteriormente estudada por Kobayashi e seus colaboradores (2004), porém estes fizeram análises de atividade de  $\beta$ -galactosidase em seus experimentos. Estes autores viram que este gene é constitutivamente expresso, e que tem sua expressão inibida após 24 horas, tempo suficiente para a infecção do tecido da planta hospedeira. Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que este gene não é inibido a partir de 24 horas de indução, atingindo os níveis mais altos de expressão após 96 horas de indução.

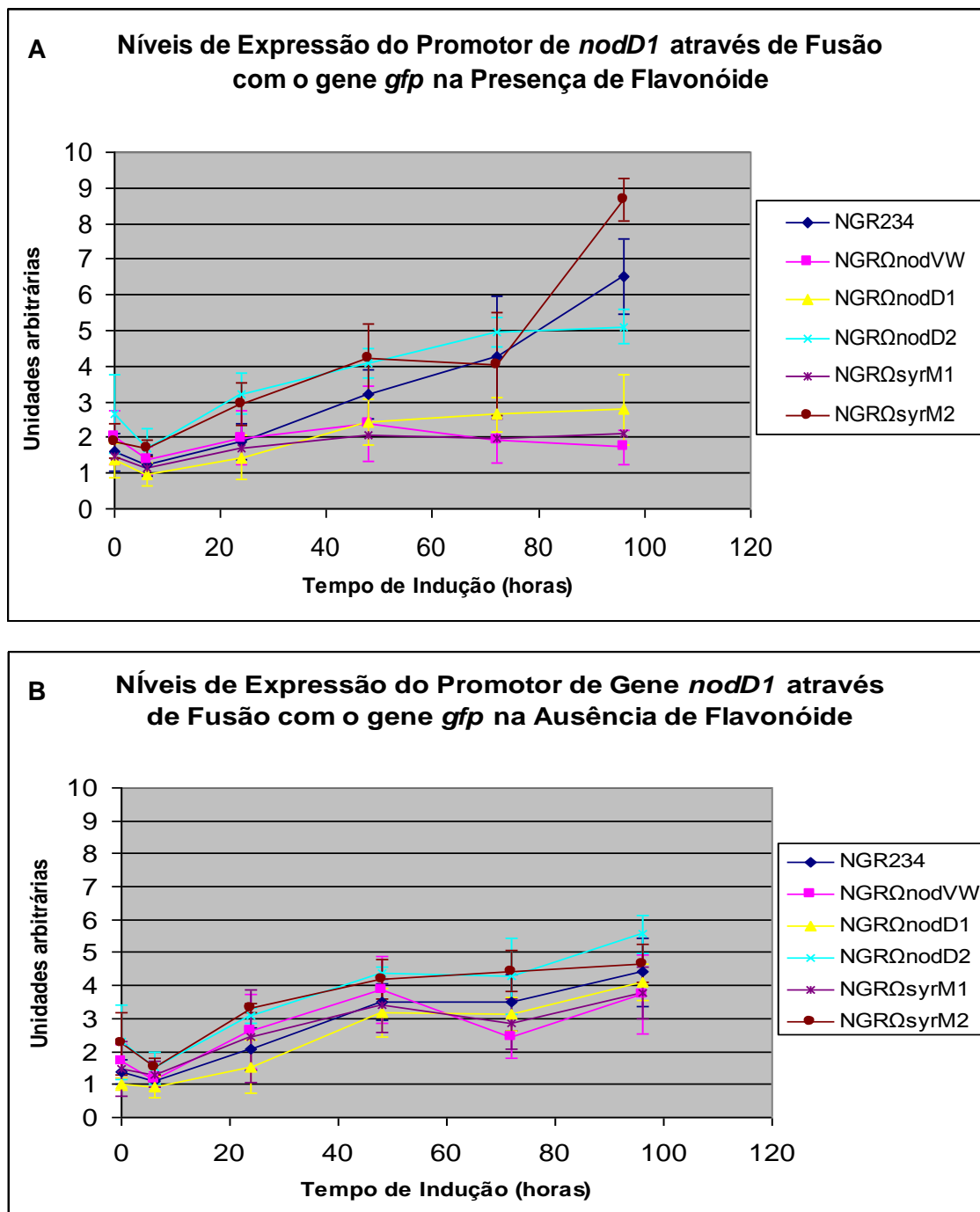


FIGURA 3 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE *nodD1* ATRAVÉS DE FUSÃO COM O GENE *gfp* SOB INDUÇÃO DE APIGENINA.

FONTE: O Autor.

NOTA: A, é o gráfico representativo da atividade de GFP pela construção pGT-pnodD1 sob indução de apigenina, enquanto B, é a representação dessa mesma atividade em condições não-induzidas. Os ensaios foram realizados com 0, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após indução com  $2 \times 10^{-7}$  M de apigenina. Os valores reportados representam a média de três experimentos independentes. As barras de erro são representadas em cada intervalo de leitura. Valores obtidos com os tranconjugantes estão representados pelo seguinte código de cores: estirpe selvagem NGR234 (azul marinho); NGR234 $\Omega$ nodVW (rosa); NGR234 $\Omega$ nodD1 (amarelo); NGR234 $\Omega$ nodD2 (turquesa); NGR234 $\Omega$ syrM1 (roxo) NGR234 $\Omega$ syrM2 (vermelho). Unidades arbitrárias=fluorescência emitida/D.O.<sub>600</sub>.

### 5.1.2. Análise de expressão do gene *syrM1*

Para avaliar o perfil de expressão do gene *syrM1*, foram sintetizados os oligonucleotídeos iniciadores SyrM1up, complementar a transposase *upstream* ao promotor do gene *syrM1*, e SyrM1down que é complementar a região codificadora de *syrM1*. Uma reação de PCR, utilizando estes iniciadores tendo como DNA molde o DNA genômico de NGR234, gerou um produto de aproximadamente 1Kb, contendo a região promotora do gene *syrM1*, o qual foi clonado no vetor pGEM-T-Easy, resultando no plasmídeo pGEM-T-psyrM1. Após confirmação da presença de inserto no plasmídeo este foi clivado com a endonuclease de restrição *Pst*I para liberar o fragmento referente ao psyrM1 (promotor do gene *syrM1*). Este segmento foi então clonado no sítio *Pst*I do vetor pPROBE-GT', formando o plasmídeo pGT'-psyrM1 (FIGURA 4). Para confirmar que a direção do inserto correspondia ao desejado foi realizada uma PCR com os iniciadores GFP5'R1/SyrM1up.

Após essa clonagem, foi realizado o seqüenciamento do plasmídeo pGEM-T-psyrM1 para determinar a identidade e integridade do inserto clonado. Esse procedimento confirmou que o inserto continha a seqüência de nucleotídeos do promotor de *syrM1* e que este apresentava uma mutação em uma base próxima ao sítio do oligonucleotídeo iniciador SyrM1up. A base mutada localizava-se na extremidade distal ao gene *syrM1* e entre dois sítios de restrição de *Bam*HI. Assim, foi realizada uma reação com a endonuclease de restrição *Bam*HI liberando um fragmento de 234pb contendo a mutação. Em seguida, foi realizada uma reação de ligação do plasmídeo pGT'-psyrM1 clivado com *Bam*HI que restaurou a fusão transcricional e eliminou a região contendo a mutação, mantendo-se um fragmento de 757 pb contendo a região regulatória de *syrM1*.

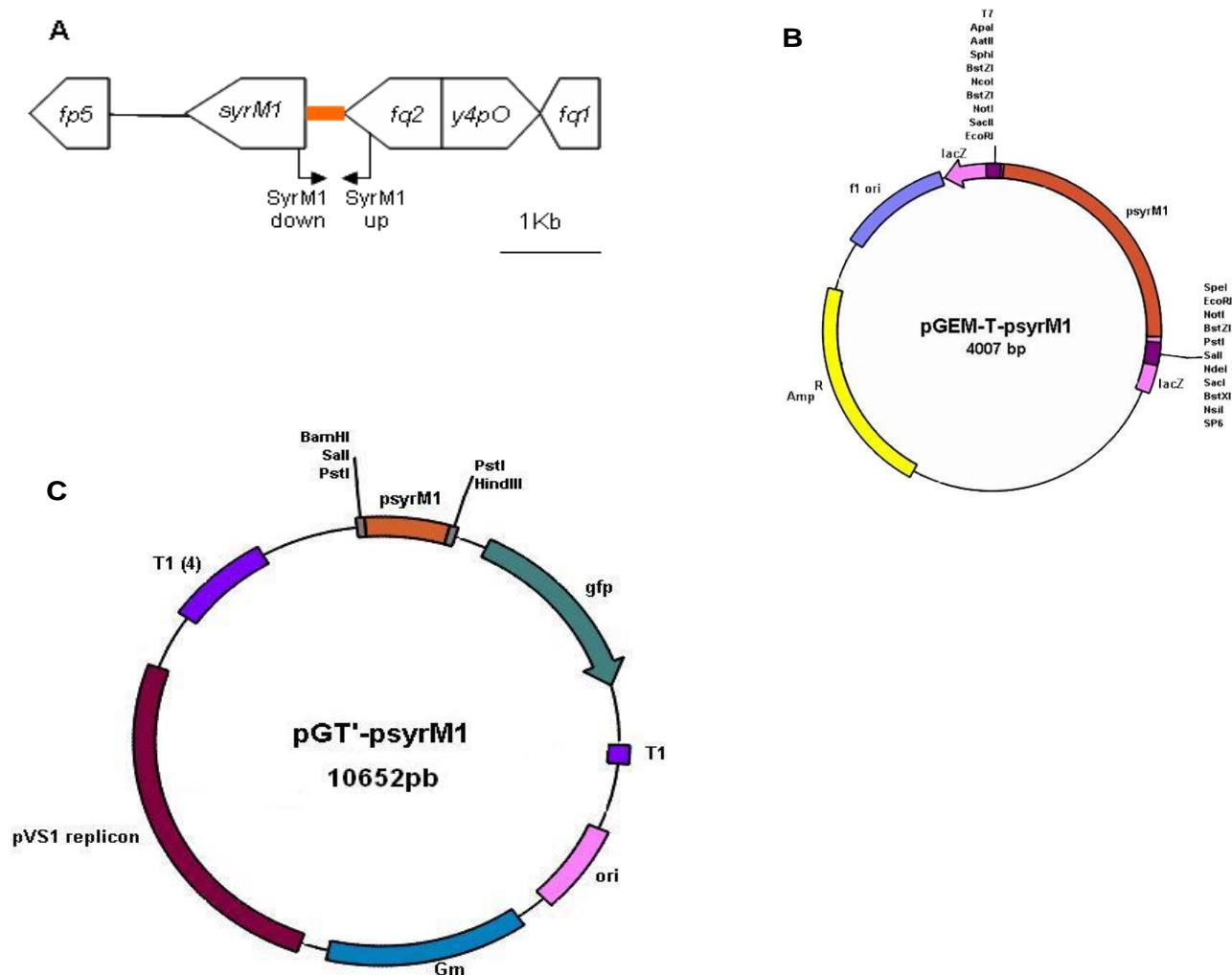


FIGURA 4 - LOCALIZAÇÃO GENÔMICA DO PROMOTOR DO GENE *syrM1* E MAPA FÍSICO DOS PLASMÍDEOS pGEM-T-pSyrM1 e pGT'-pSyrM1.

FONTE: O Autor.

NOTA: A, representa a região genômica do promotor do gene *syrM1*, B, é a representação da construção pGEM-T-pSyrM1 e C, é o mapa do plasmídeo pGT'-pSyrM1.

Uma vez que o efeito de SyrM1 sobre os genes envolvidos com nodulação ou secreção de proteínas não é conhecido em NGR234, sua região promotora também foi analisada com o objetivo de detectar alterações no seu perfil de expressão durante indução com flavonóides. A análise da expressão do gene *syrM1* foi realizada através da transferência do plasmídeo pGT'-psyrM1 (FIGURA 4) para as estirpes NGR234, NGR $\Omega$ *nodD1*, NGR $\Omega$ *nodD2*, NGR $\Omega$ *syrM1*, NGR $\Omega$ *syrM2* e NGR $\Omega$ *nodVW*. O gráfico da figura 5 representa a atividade de GFP sob regulação do promotor do *syrM1*. Nesta figura é possível notar que os reguladores NodD1, NodD2, NodW, SyrM1 e SyrM2 não apresentam nenhuma atividade sobre este



promotor, pois não há diferença estatística entre os níveis de expressão observados nas diferentes estirpes. Além disso, ao comparar a atividade de GFP na ausência e presença de flavonóide indutor não se observa nenhuma diferença estatisticamente significativa nesta atividade. Estes dados sugerem que este promotor é constitutivamente expresso e independente de flavonóide. Porém, os níveis de expressão observados são muito baixos o que dificulta a análise de efeitos menos pronunciados. Alternativamente, este gene pode ser expresso em uma condição diferente das testadas no presente trabalho.

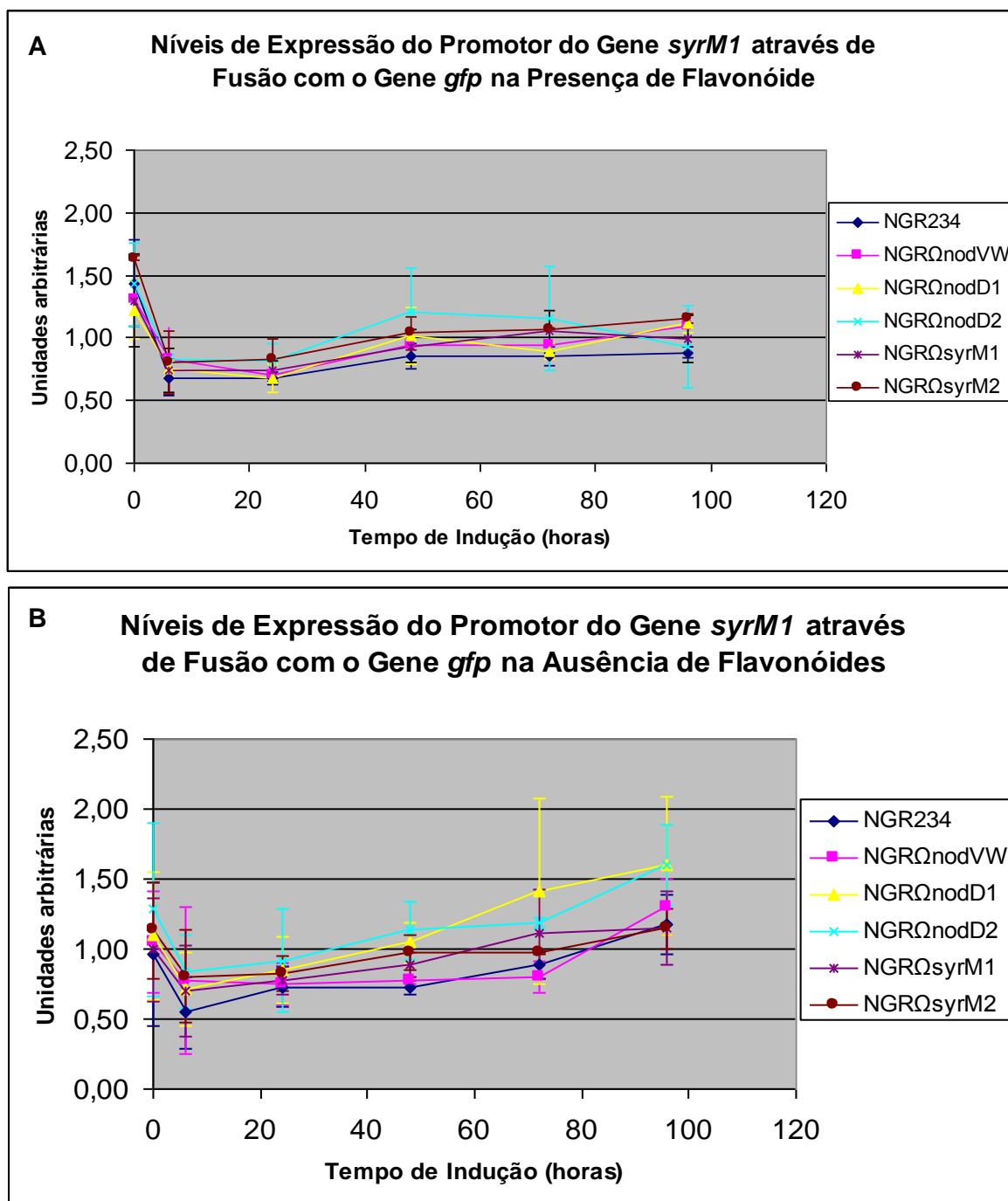


FIGURA 5 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE *syrM1* ATRAVÉS DE FUSÃO COM O GENE *gfp* SOB INDUÇÃO DE APIGENINA.

FONTE: O Autor.

NOTA: A, é o gráfico representativo da atividade de GFP pela construção pGT-psyrM1 sob indução de apigenina, enquanto B, é a representação dessa mesma atividade em condições não-induzidas. Os ensaios foram realizados com 0, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após indução com  $2 \times 10^{-7}$  M de apigenina. Os valores reportados representam a média de três experimentos independentes. As barras de erro são representadas em cada intervalo de leitura. Valores obtidos com os tranconjugantes estão representados pelo seguinte código de cores: estirpe selvagem NGR234 (azul marinho); NGR234 $\Omega$ nodVW (rosa); NGR234 $\Omega$ nodD1 (amarelo); NGR234 $\Omega$ nodD2 (turquesa); NGR234 $\Omega$ syrM1 (roxo) NGR234 $\Omega$ syrM2 (vermelho). Unidades arbitrárias=fluorescência emitida/D.O.<sub>600</sub>.

### 5.1.3. Análise de expressão do gene *nodD2*

Os genes *ttsI* e *nodD2*, estão situados muito próximos no genoma de NGR234, são transcritos divergentemente, compartilhando a mesma região regulatória de aproximadamente 2 Kb. Para contribuir para a elucidação de como se dá a regulação destes genes foram projetados os oligonucleotídeos iniciadores NodD2 up e TtsI down. Ao realizar uma reação de PCR com estes iniciadores obteve-se um produto de aproximadamente 1,9Kb que foi clonado no vetor pGEM-T-Easy, resultando no pGEM-T-*ttsI/nodD2* (FIGURA 6). O inserto foi seqüenciado e permitiu a detecção de uma mutação entre dois sítios da endonuclease de restrição *PstI* (sendo um destes do vetor). A região onde a mutação se encontrava já havia sido estudada por outros pesquisadores que a clonaram no plasmídeo pMP220 formando a construção pRAF115. Assim, o plasmídeo pGEM-T-*ttsI/nodD2* foi clivado com a endonuclease de restrição *PstI* liberando o fragmento que continha a mutação. Este segmento foi substituído por um fragmento de 1.2 Kb, o qual foi retirado do plasmídeo pRAF115. Desta forma, foi obtido o plasmídeo pGEM-T-*ttsI/nodD2*+RAF que apresenta toda a região intergênica entre *ttsI* e *nodD2* intacta.

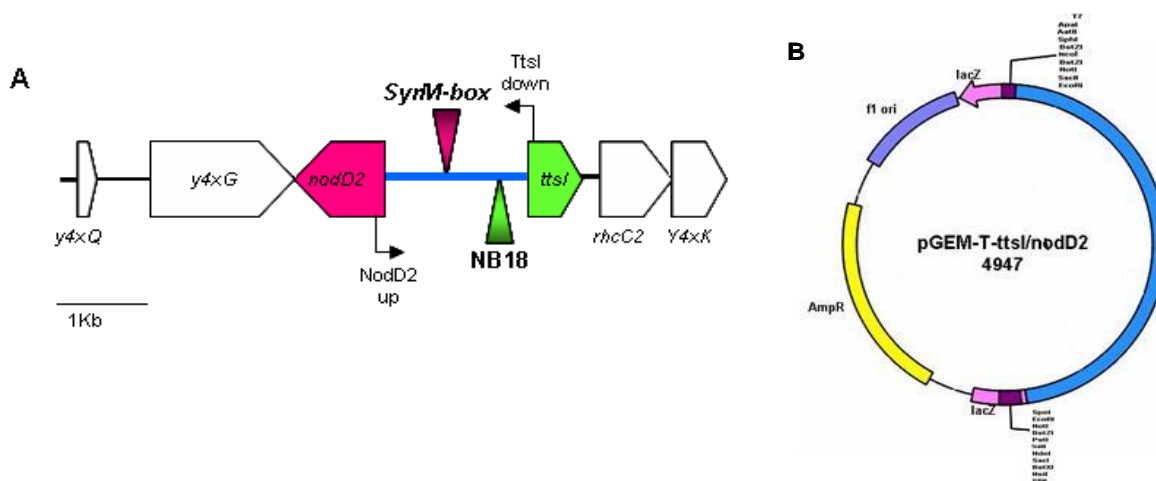


FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO GENÔMICA DA REGIÃO INTERGÊNICA ENTRE *ttsI* E *nodD2* E MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pGEM-T-*ttsI/nodD2*.

FONTE: O Autor.

NOTA: Mapa físico do plasmídeo pGEM-T-*ttsI/nodD2*, onde A representa a localização genômica da região intergênica entre *ttsI* e *nodD2* clonada no vetor pGEM-T-Easy, sendo que a seta rosa representa a posição do *SyrM*-box e a verde do *nod*-box NB18 presentes nesta região. B, representa o plasmídeo pGEM-T-*ttsI/nodD2*.

Uma vez removida a mutação, prosseguiu-se com a clonagem no vetor pPROBE-GT. Para realizar a clonagem em ambas as direções, utilizou-se os vetores pPROBE-GT e pPROBE-GT', os quais diferem apenas na direção do sítio de policlonagem. Assim, o plasmídeo pGEM-T-ttsI/nodD2+RAF foi clivado com as endonucleases de restrição *EcoRI/BamHI* liberando um fragmento de aproximadamente 2 Kb contendo a região intergênica entre *ttsI/nodD2*, o qual foi ligado nos vetores também clivados com as mesmas endonucleases de restrição. Logo após transformação, as colônias candidatas foram testadas por meio de reação de PCR e reação de restrição permitindo a identificação de colônias contendo os plasmídeos pGT'-pnodD2II e pGT-pttsI (FIGURA 7), onde o primeiro contém toda a região intergênica na direção de *nodD2* e o segundo tem a mesma região clonada na direção oposta.

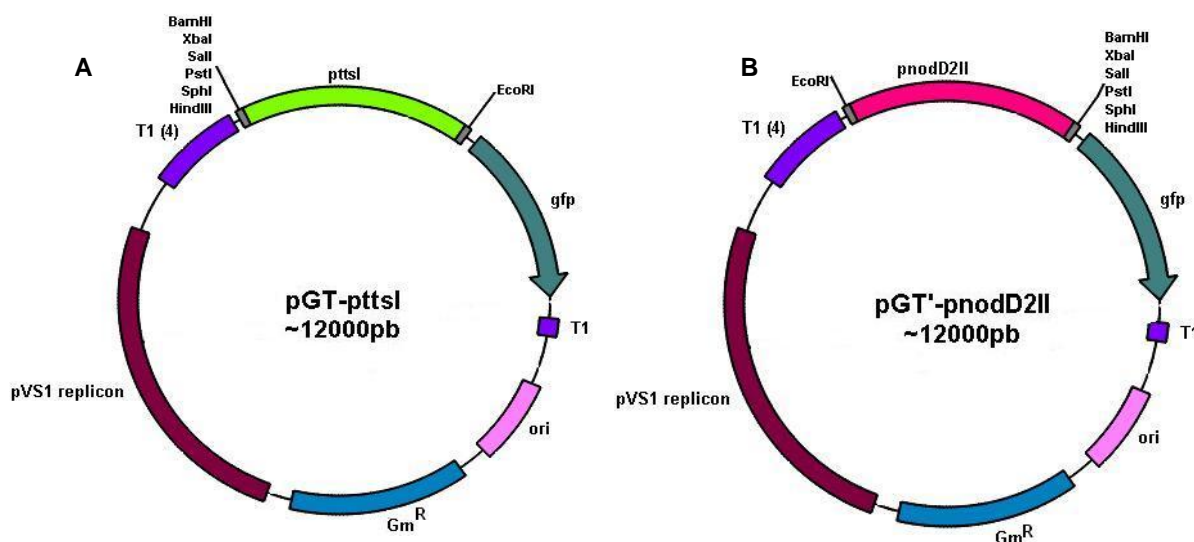


FIGURA 7 - MAPA FÍSICO E DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS pGT-pttsI e pGT'-pnodD2II.

FONTE: O Autor.

NOTA: Mapa físico e de restrição do plasmídeo pGT-pttsI (A) e do plasmídeo pGT'-pnodD2II (B).

A análise da região promotora que regula a expressão de *nodD2* foi realizada com os plasmídeos pGT-pnodD2 e pGT'-pnodD2II (FIGURA 7). Assim como as demais construções, estas foram transferidas para as estirpes NGR234, NGR $\Omega$ *nodD1*, NGR $\Omega$ *nodD2*, NGR $\Omega$ *syrM1*, NGR $\Omega$ *syrM2* e NGR $\Omega$ *nodVW*. O plasmídeo pGT-pnodD2 contém apenas a região conhecida como promotora do gene *nodD2*. A figura 8 representa os gráficos resultantes da atividade de GFP pelo

promotor do gene *nodD2*. Assim, é possível observar que NodD1 apresenta uma atividade indutora sobre este promotor. Além disso, nota-se que SyrM2 também atua induzindo a expressão do gene *nodD2*, entretanto tal efeito é muito pouco pronunciado. Os dados representados na figura sugerem que os reguladores NodD2, NodW, SyrM1 e SyrM2 não parecem exercer nenhuma atividade sobre a expressão do gene *nodD2*, ao passo que os níveis de expressão das estirpes mutantes nesses reguladores não diferem estatisticamente dos níveis atingidos pela estirpe selvagem. Ao comparar a atividade de GFP na ausência e presença de flavonóide indutor não foi possível diagnosticar nenhuma diferença estatisticamente significativa na expressão de GFP. Contudo, os baixos níveis de expressão deste gene, obtidos através da fusão com o gene *gfp*, dificultam a detecção de efeitos mais moderados sobre sua expressão.

Esta região já foi anteriormente estudada através de fusões transcricionais com o gene repórter *lacZ* por Fellay *et al.* (1998) e Kobayashi *et al.* (2004). O primeiro trabalho demonstrou que o gene *nodD2* é tardiamente expresso (a partir de 24 horas) e que é indiretamente ativado por NodD1. O trabalho de Kobayashi *et al.* (2004) demonstrou que essa atividade de NodD1 é flavonóide dependente tendo como intermediário SyrM2.

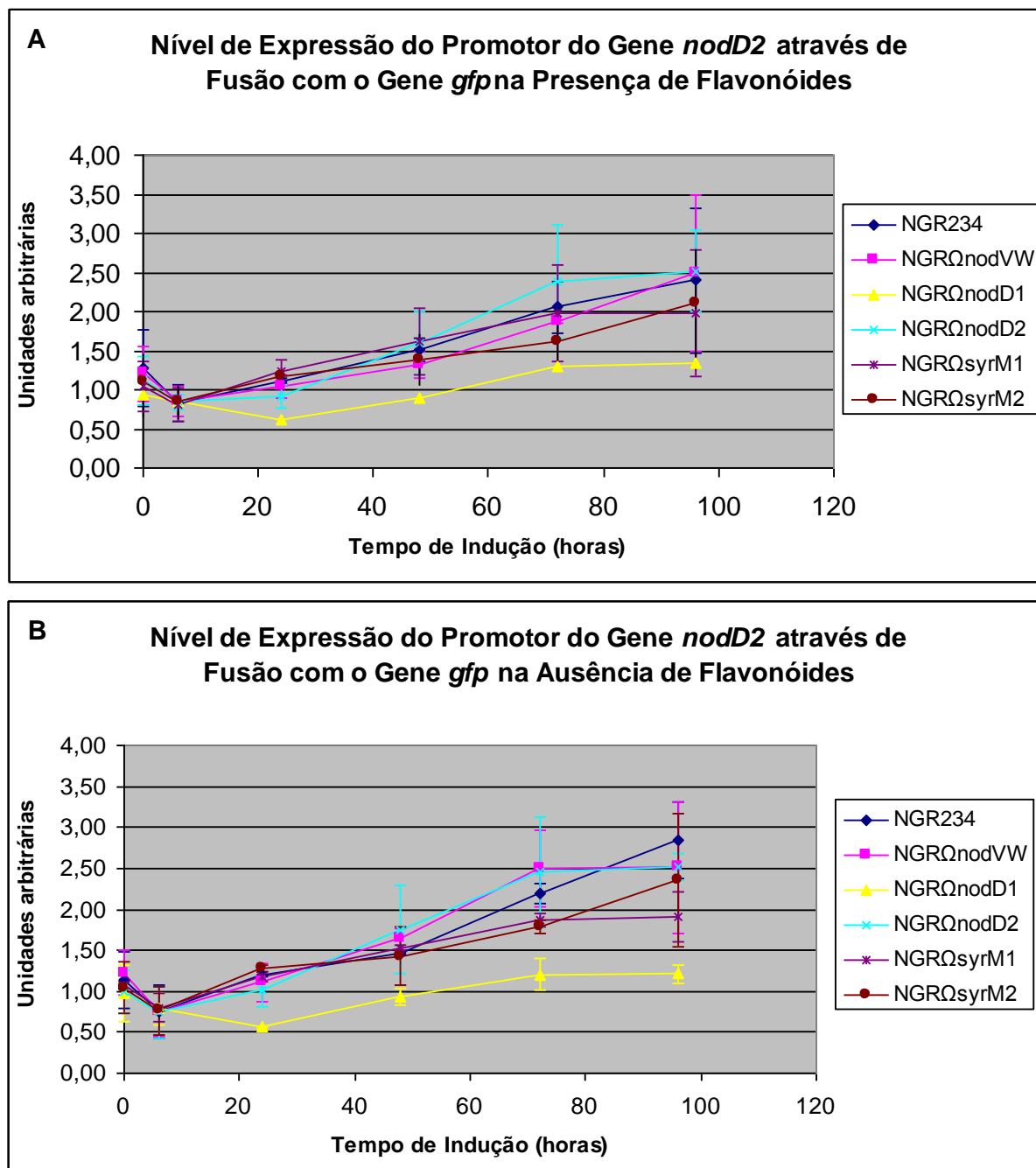


FIGURA 8 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE *nodD2* ATRAVÉS DE FUSÃO COM O GENE *gfp* SOB INDUÇÃO DE APIGENINA.

FONTE: O Autor.

NOTA: A, é o gráfico representativo da atividade de GFP pela construção pGT-pnodD2 sob indução de apigenina, enquanto B, é a representação dessa mesma atividade em condições não-induzidas. Os ensaios foram realizados com 0, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após indução com  $2 \times 10^{-7}$  M de apigenina. Os valores reportados representam a média de três experimentos independentes. As barras de erro são representadas em cada intervalo de leitura. Valores obtidos com os tranconjugantes estão representados pelo seguinte código de cores: estirpe selvagem NGR234 (azul marinho); NGR234 $\Omega$ nodVW (rosa); NGR234 $\Omega$ nodD1 (amarelo); NGR234 $\Omega$ nodD2 (turquesa); NGR234 $\Omega$ syrM1 (roxo) NGR234 $\Omega$ syrM2 (vermelho). Unidades arbitrárias=fluorescência emitida/D.O.<sub>600</sub>.

O gráfico representado na figura 9 apresenta os resultados obtidos com a análise da região intergênica entre *ttsI* e *nodD2* com o plasmídeo pGT'-pnodD2II. A análise da atividade de GFP por esta construção indica que os reguladores transcricionais NodD1 e SyrM2 atuam ativando a expressão do gene *nodD2* ( $p < 0,05$ ), sendo que NodW também demonstra esta atividade ( $p < 0,05$ ), embora os dados apresentados sejam menos pronunciados para este regulador. Na ausência de flavonóide indutor o regulador SyrM1 parece inibir a expressão gênica de *nodD2*, sendo um efeito não observado na presença de flavonóides. O produto do gene *nodD2*, o regulador NodD2 parece reprimir sua própria transcrição. Além disso, os níveis de expressão de *nodD2*, quando se analisa a região intergênica *ttsI/nodD2*, são em torno de cinco vezes maiores do que quando se estuda apenas a região conhecida como promotora de *nodD2*.

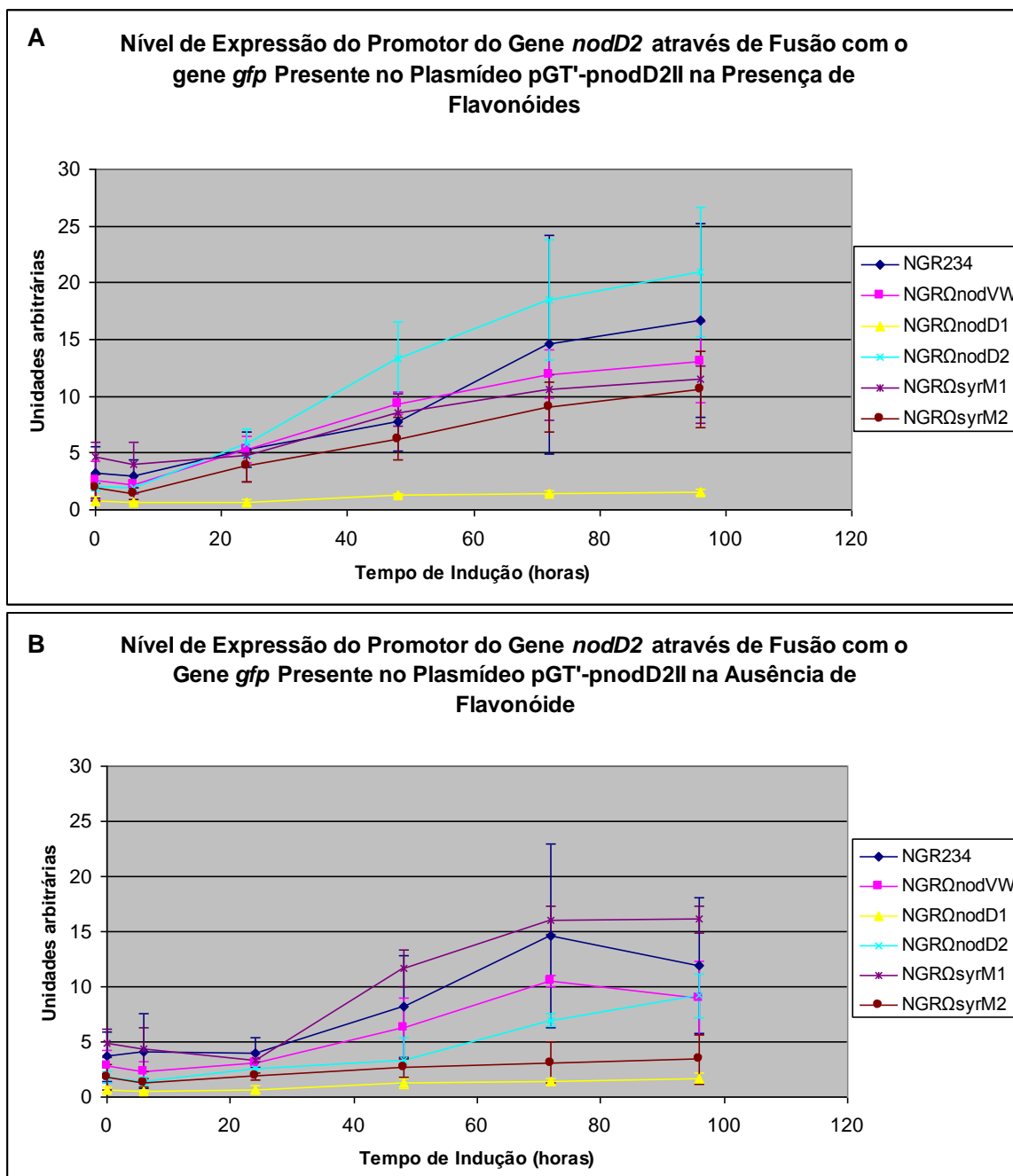


FIGURA 9 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE *nodD2* ATRAVÉS DE FUSÃO COM O GENE *gfp* PRESENTE NO PLASMÍDEO pGT'-pnodD2II SOB INDUÇÃO DE APIGENINA.

FONTE: O Autor.

NOTA: A, é o gráfico representativo da atividade de GFP pela construção pGT'-pnodD2II sob indução de apigenina, enquanto B, é a representação dessa mesma atividade em condições não-induzidas. Os ensaios foram realizados com 0, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após indução com  $2 \times 10^{-7}$  M de apigenina. Os valores reportados representam a média de três experimentos independentes. As barras de erro são representadas em cada intervalo de leitura. Valores obtidos com os tranconjugantes estão representados pelo seguinte código de cores: estirpe selvagem NGR234 (azul marinho); NGR234 $\Omega$ nodVW (rosa); NGR234 $\Omega$ nodD1 (amarelo); NGR234 $\Omega$ nodD2 (turquesa); NGR234 $\Omega$ syrM1 (roxo) NGR234 $\Omega$ syrM2 (vermelho). Unidades arbitrárias=fluorescência emitida/D.O.<sub>600</sub>.



#### 5.1.4. Análise de expressão do gene *ttsI*

A análise da expressão do gene *ttsI* foi realizada através das construções pGT-NB18 e pGT-pttsI. A região regulatória de *ttsI* contém uma seqüência *nod-box*, denominada NB18. O plasmídeo pGT-NB18 contém um fragmento da região promotora do gene *ttsI* no qual está presente o NB18, já o plasmídeo pGT-pttsI contém um fragmento com toda a região intergênica entre *ttsI/nodD2*, conforme descrito anteriormente. O NB18 foi estudado por Kobayashi e seus colaboradores (2004), através de análises de ensaio de  $\beta$ -galactosidase, na presença e ausência de flavonóides, num intervalo de 24 horas e demonstrou a expressão tardia desse gene. O segmento referente ao NB18 foi clonado no vetor pPROBE-GT e esta construção foi transferida para as estirpes NGR234, NGR $\Omega$ *nodD1*, NGR $\Omega$ *nodD2*, NGR $\Omega$ *syrM1*, NGR $\Omega$ *syrM2* e NGR $\Omega$ *nodVW*. Neste trabalho, a análise foi realizada em um intervalo de 6, 24, 48, 72 e 96 horas para avaliar possíveis alterações de expressão em períodos mais longos.

As análises do pGT-NB18 (FIGURA 10) mostraram que o gene *ttsI* passou a ser expresso a partir de 24 horas e que os níveis mais altos de expressão foram alcançados com 96 horas de indução. As diferenças no nível de expressão entre induzidos e não induzidos é estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ), confirmando sua dependência de flavonóides, conforme observado anteriormente (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Entretanto, os altos níveis de expressão na condição não induzida, indicam que alguma molécula ativadora deve estar presente nas culturas analisadas. A indução por flavonóides é decorrente da atividade da proteína ativadora de transcrição NodD1, que é ativa somente na presença de flavonóides. Portanto, os níveis de expressão esperados na ausência de flavonóide indutor são semelhantes aos produzidos pela estirpe mutante no gene *nodD1*, NGR $\Omega$ *nodD1*. A baixa expressão do gene *ttsI*, observada no mutante *nodD1*, confirma que a proteína NodD1 é seu ativador primário. Entretanto, a diferença entre NGR $\Omega$ *nodD1* e as outras estirpes, observada na condição não induzida, sugere novamente a presença de um indutor contaminante nas culturas utilizadas.

Além do efeito do ativador NodD1, a proteína NodD2 parece exercer um leve efeito ativador sobre este gene ( $p < 0.05$ ). Os resultados demonstrados pelos reguladores NodW e SyrM2 sugerem que estas proteínas não desempenham

nenhuma atividade na expressão do gene *ttsI*. Além disso, quando comparados os níveis de expressão de GFP pelo mutante  $NGR\Omega_{syrM1}$  é observado que na ausência de flavonóides indutores esta estirpe apresenta níveis de expressão crescentes em todo o período analisado, atingindo valores próximos a 20 na leitura de 96 horas. Entretanto, os níveis alcançados por esta mesma estirpe na presença de flavonóides atingem um valor em torno de 13, no mesmo intervalo de leitura. Estes dados sugerem que o regulador SyrM1 inibe a expressão do gene *ttsI*, sendo que este efeito é mais pronunciado na ausência de flavonóide.

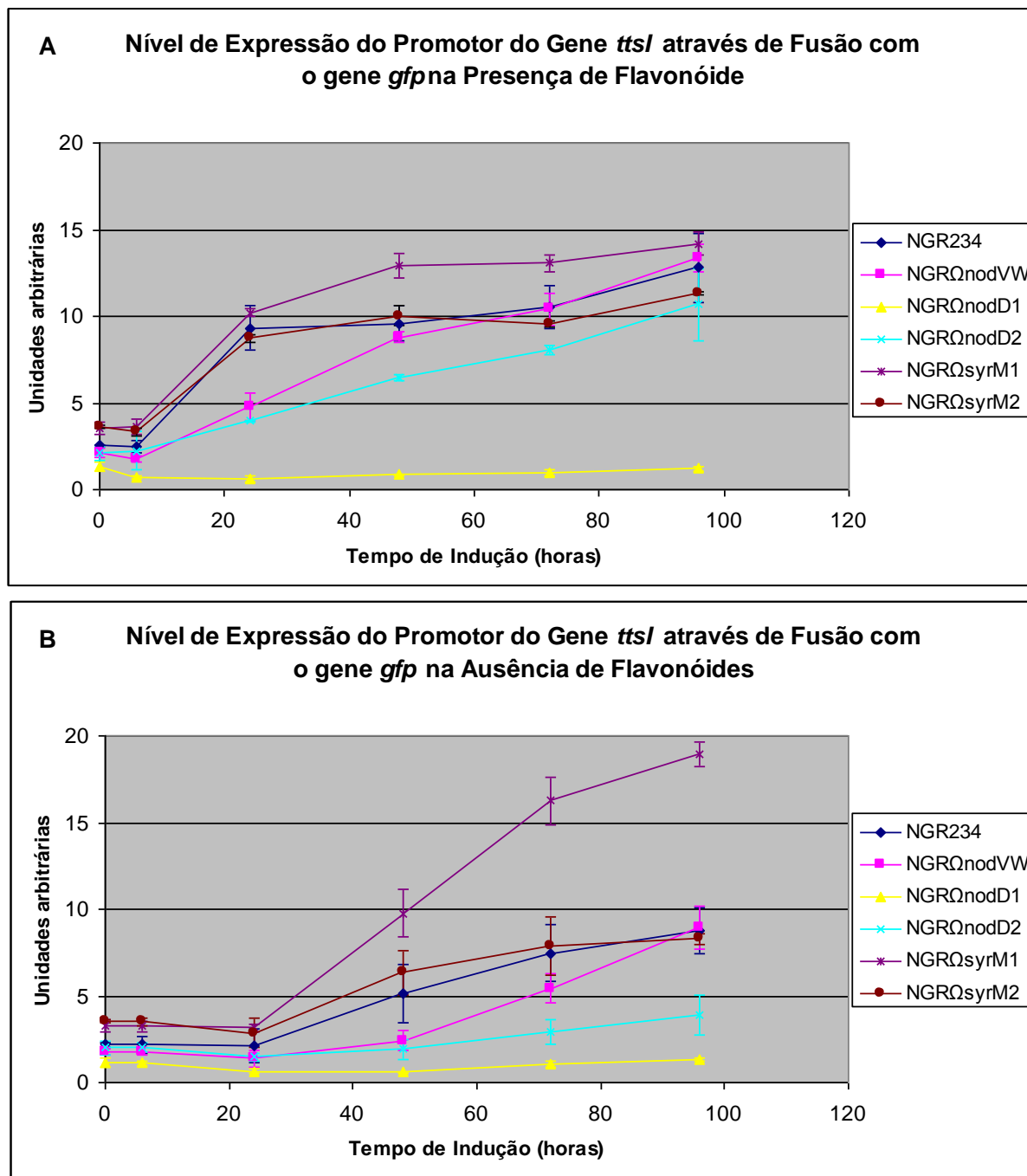


FIGURA 10 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE *ttsI* ATRAVÉS DE FUSÃO COM O GENE *gfp* SOB INDUÇÃO DE APIGENINA.

FONTE: O Autor.

NOTA: A, é o gráfico representativo da atividade de GFP pela construção pGT-NB18 sob indução de apigenina, enquanto B, é a representação dessa mesma atividade em condições não-induzidas. Os ensaios foram realizados com 0, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após indução com  $2 \times 10^{-7}$  M de apigenina. Os valores reportados representam a média de três experimentos independentes. As barras de erro são representadas em cada intervalo de leitura. Valores obtidos com os tranconjugantes estão representados pelo seguinte código de cores: estirpe selvagem NGR234 (azul marinho); NGR234 $\Omega$ nodVW (rosa); NGR234 $\Omega$ nodD1 (amarelo); NGR234 $\Omega$ nodD2 (turquesa); NGR234 $\Omega$ syrM1 (roxo) NGR234 $\Omega$ syrM2 (vermelho). Unidades arbitrárias=fluorescência emitida/D.O.<sub>600</sub>.

A expressão de *ttsI* foi também avaliada através da análise dos níveis de transcrição de GFP a partir da fusão de toda a região intergênica entre *ttsI* e *nodD2* presente no plasmídeo pGT-pttsI. Diferente de pGT-NB18, o plasmídeo pGT-ttsI contém todas as possíveis seqüências regulatórias que podem modular a expressão deste gene. Nas mesmas condições utilizadas para o pGT-NB18, os resultados obtidos com a construção pGT-pttsI são sumarizados no gráfico da figura 11. A partir da observação deste, é possível reafirmar que NodD1 é o principal ativador de *ttsI* e que este gene é mesmo induzível por flavonóides. Entretanto, diferente do observado com a construção pGT-NB18, onde nota-se uma ativação do gene *ttsI* pela proteína NodD2. Quando se analisa a região intergênica total o regulador NodD2 parece inibir a expressão de *ttsI*. Além disso, o efeito observado de SyrM1 sobre o NB18 não é tão aparente quando toda a seqüência é avaliada, o que pode ser um indício de que há mais seqüências ativas nesta região intergênica modulando a expressão de *ttsI* e não apenas o *nod-box* 18. A análise da seqüência intergênica também demonstrou que NodW e SyrM2 não apresentam atividade sobre o promotor do gene *ttsI*.

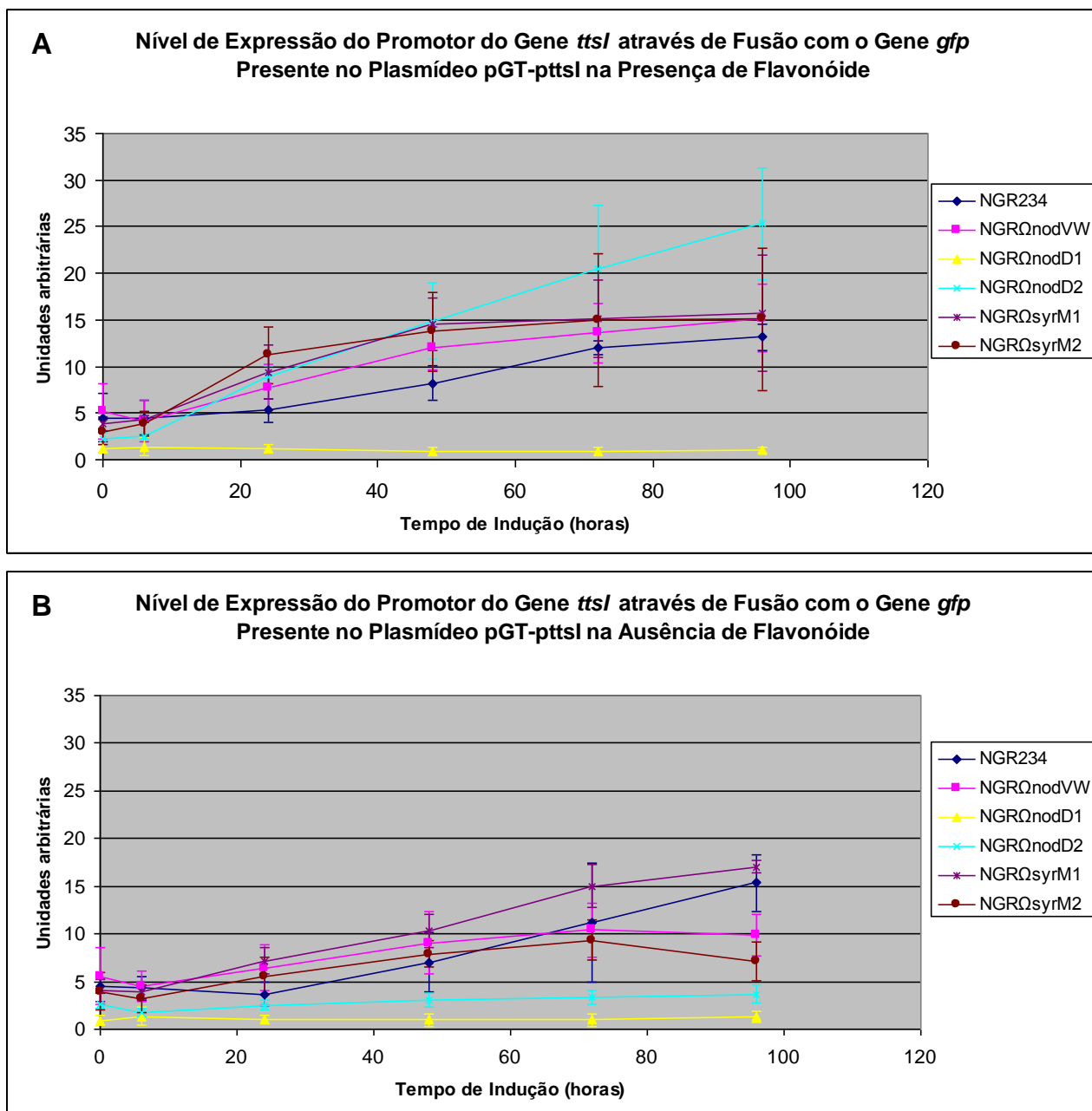


FIGURA 11 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE *ttsI* ATRAVÉS DE FUSÃO COM O GENE *gfp* PRESENTE NO PLASMÍDEO pGT-pttSI SOB INDUÇÃO DE APIGENINA.

FONTE: O Autor.

NOTA: A, é o gráfico representativo da atividade de GFP pela construção pGT-pttSI sob indução de apigenina, enquanto B, é a representação dessa mesma atividade em condições não-induzidas. Os ensaios foram realizados com 0, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após indução com  $2 \times 10^{-7}$  M de apigenina. Os valores reportados representam a média de três experimentos independentes. As barras de erro são representadas em cada intervalo de leitura. Valores obtidos com os tranconjugantes estão representados pelo seguinte código de cores: estirpe selvagem NGR234 (azul marinho); NGR234 $\Omega$ nodVW (rosa); NGR234 $\Omega$ nodD1 (amarelo); NGR234 $\Omega$ nodD2 (turquesa); NGR234 $\Omega$ syrM1 (roxo) NGR234 $\Omega$ syrM2 (vermelho). Unidades arbitrárias=fluorescência emitida/D.O.<sub>600</sub>.

#### 5.1.5. Análise de expressão do gene *syrM2*

O gene *syrM2* é regulado por um *nod-box* presente em sua região promotora, o NB19. A análise da expressão de *syrM2* foi realizada através da mobilização do plasmídeo pMP-NB19, o qual contém o NB19 clonado a montante do gene *lacZ* no vetor pMP220. Esta construção foi transferida para as estirpes NGR234, NGR $\Omega$ *nodD1*, NGR $\Omega$ *nodD2*, NGR $\Omega$ *syrM1*, NGR $\Omega$ *syrM2* e NGR $\Omega$ *nodVW*. Assim, a atividade de NB19 foi avaliada através de ensaios de  $\beta$ -galactosidase. Esta mesma construção foi estudada por Kobayashi e seus colaboradores (2004), onde estes autores analisaram apenas o efeito das proteínas NodD1 e NodD2 sobre este promotor, e concluíram que NodD1 é o principal ativador desta região, mas que NodD2 é necessário para a expressão máxima deste.

Os dados obtidos no presente estudo estão sumarizados nos gráficos presentes na figura 12. A análise desta figura sugere que a proteína NodD1 atua ativando a expressão do gene *syrM2* ( $p < 0,05$ ). Os resultados sugerem, ainda, que NodD2 e NodW não apresentam atividade sobre o promotor deste gene. Além disso, na figura 12 A observa-se ainda que o produto do gene *syrM2*, a proteína SyrM2, é inibidor de sua própria transcrição ( $p < 0,05$ ), sendo que este efeito é bastante pronunciado na presença de flavonóide. Na ausência de flavonóide (FIGURA 12, B), no intervalo de 48 horas, nota-se uma diferença pronunciada entre as estirpes NGR $\Omega$ *syrM1*, NGR $\Omega$ *syrM2* e a estirpe selvagem. Estes dados sugerem que neste intervalo de leitura, os reguladores SyrM2 e SyrM1 inibem a expressão do gene *syrM2* ( $p < 0,05$ ) independentemente de flavonóide. Nas demais estirpes testadas, não é observada nenhuma diferença significativa entre elas, na ausência de flavonóides. Enquanto os demais ensaios foram realizados fazendo-se uso de apigenina como indutor, no ensaio da atividade do promotor NB19 foi utilizado crisina como indutor.

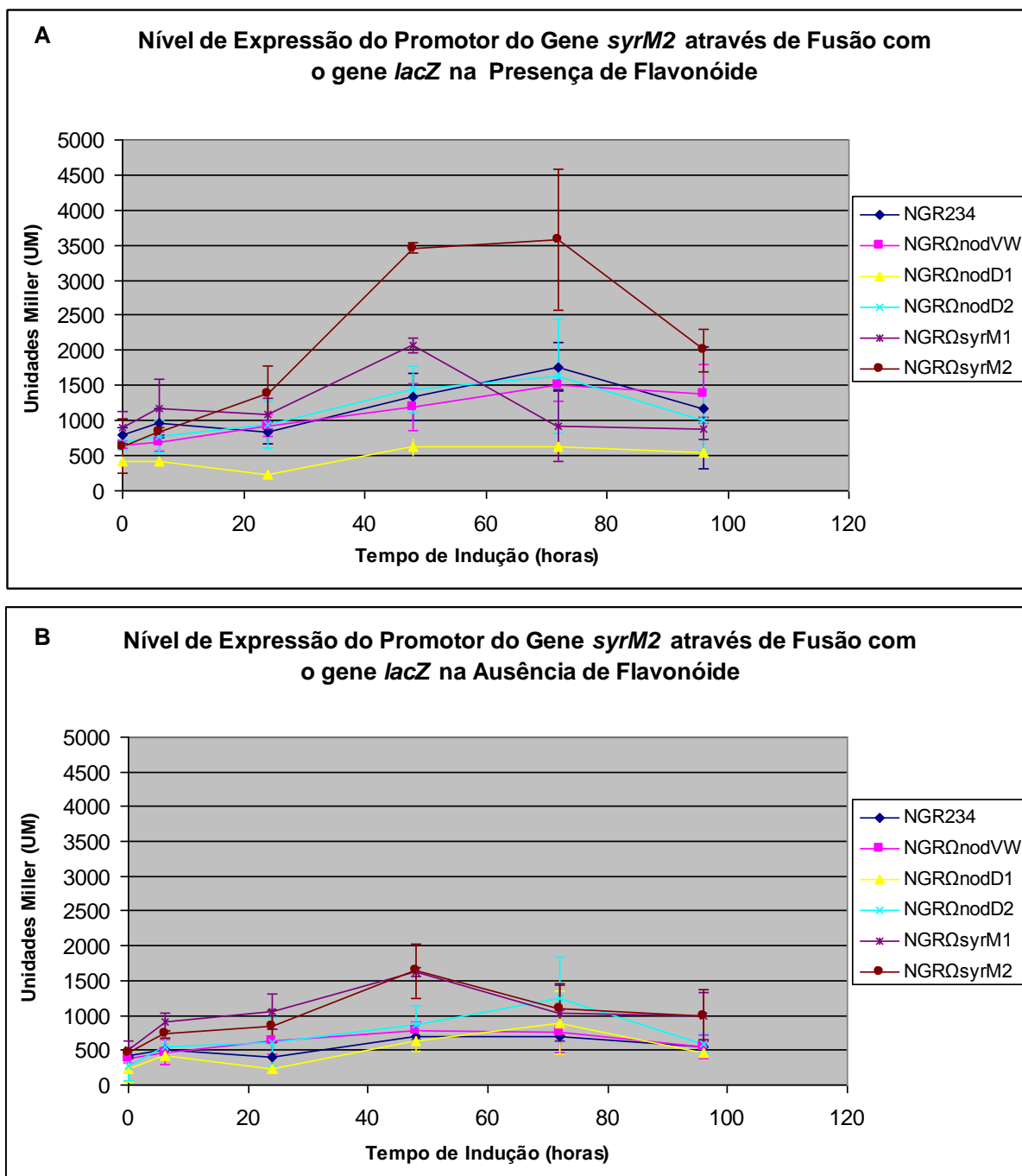


FIGURA 12 - NÍVEL DE EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE *syrM2* ATRAVÉS DE FUSÃO COM O GENE *gfp* SOB INDUÇÃO DE CRISINA.

FONTE: O Autor.

NOTA: A, é o gráfico representativo da atividade de  $\beta$ -galactosidase pela construção pMP-NB19 sob indução de crisina, enquanto B, é a representação dessa mesma atividade em condições não-induzidas. Os ensaios foram realizados com 0, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após indução com  $2 \times 10^{-7}$  M de crisina. Os valores reportados representam a média de três experimentos independentes. As barras de erro são representadas em cada intervalo de leitura. Valores obtidos com os tranconjugantes estão representados pelo seguinte código de cores: estirpe selvagem NGR234 (azul marinho); NGR234 $\Omega$ nodVW (rosa); NGR234 $\Omega$ nodD1 (amarelo); NGR234 $\Omega$ nodD2 (turquesa); NGR234 $\Omega$ syrM1 (roxo) NGR234 $\Omega$ syrM2 (vermelho). Unidades arbitrárias=fluorescência emitida/D.O.<sub>600</sub>.

## 5.2. ENSAIO DE ALTERAÇÃO DE MOBILIDADE COM HIS-SYRM1 E HIS-SYRM2

Em NGR234, estão presentes duas cópias de SyrM. O gene *syrM1* tem 1014pb, codificando um produto de 338 aminoácidos, que apresenta uma massa de 37,5 KDa. SyrM2, o produto do gene *syrM2*, um gene com 1020pb, tem 340 aminoácidos e uma massa molecular semelhante à SyrM1. Estes genes apresentam uma homologia em torno de 60%, e ambos são homólogos às NodDs, mas suas funções e atividades são menos estudadas que as de NodD.

Para a superexpressão das proteínas de fusão His-syrM1 e His-syrM2 optou-se pela utilização do sistema pET. Assim, as regiões codificadoras de *syrM1* e de *syrM2*, as quais foram clonadas no vetor pET-Blue2 por Wassem, R. (dados não publicados), foram transferidas para o vetor pET-29 a (+) com o objetivo de facilitar a purificação, uma vez que os níveis de expressão neste vetor são mais altos que em pET-Blue2. Os plasmídeos pET-29-SyrM1 e pET-29-SyrM2 (FIGURA 13) foram obtidos e as construções confirmadas por PCR e análise de restrição.

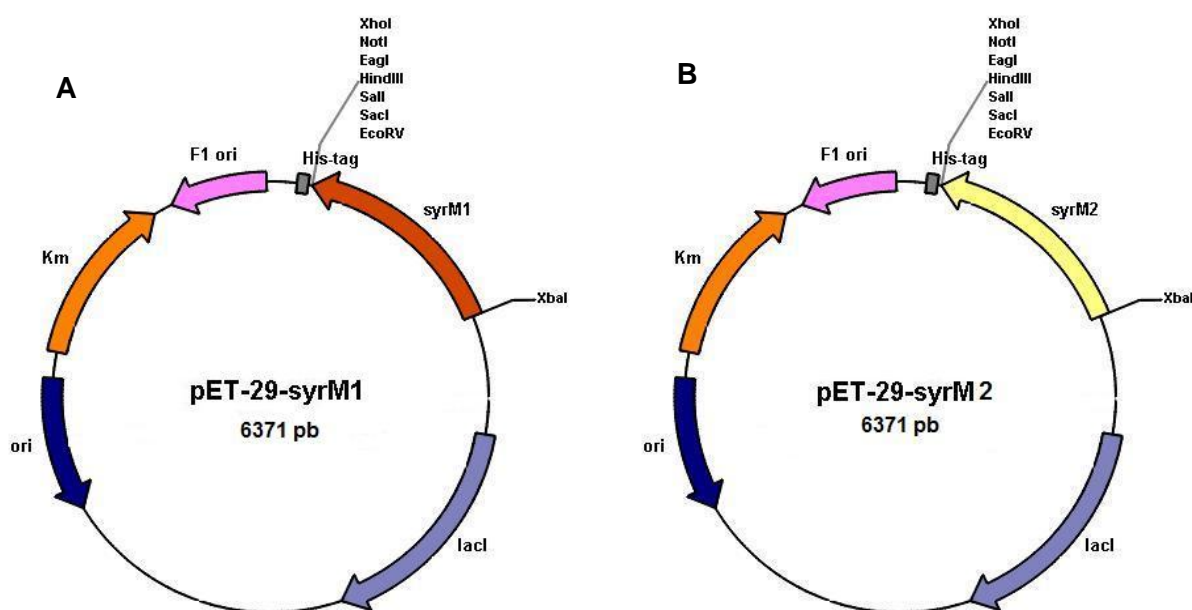


FIGURA 13 - MAPA FÍSICO E DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS pET-29-syrM1 e pET-29-syrM2.

FONTE: O Autor.

Para a purificação da His-SyrM1 e da His-SyrM2 testaram-se algumas condições para determinar qual a condição ideal para obtenção de uma proteína na concentração desejada com grau de pureza necessário para analisar sua atividade



*in vitro*. O nível de expressão de ambas as proteínas foi menor quando expressas a partir do vetor pET-Blue2, sendo que o pET-29 mostrou-se um vetor mais adequado para esse processo (FIGURA 14).

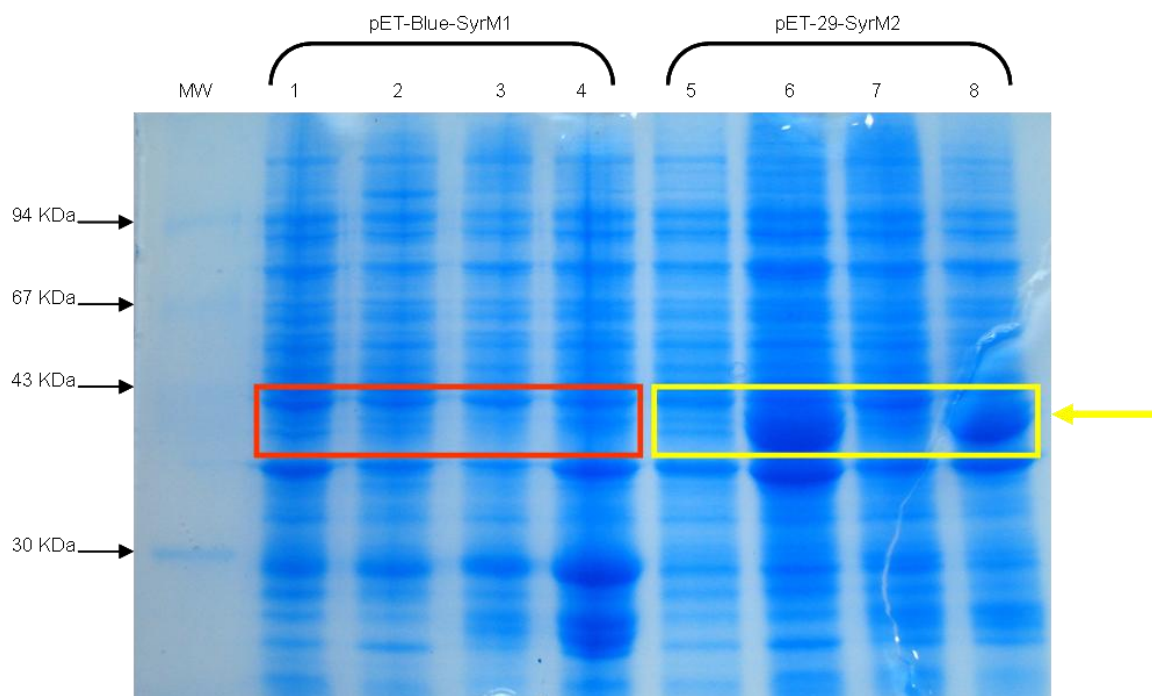


FIGURA 14 - TESTE DE INDUÇÃO COM OS PLASMÍDEOS DE SUPEREXPRESSÃO pET-Blue-SyrM1 e pET-29-SyrM2.

FONTE: O Autor.

NOTA: Eletroforese SDS-PAGE 10% de ensaio de indução para comparação entre os plasmídeos pET-Blue e pET-29 a(+). Linha 1, corresponde a estirpe BL21 (DE3) transformada com o plasmídeo pET-Blue-SyrM1 sem indução; linha 2, é a estirpe BL21 (DE3) transformada com o plasmídeo pET-Blue-SyrM1 sob indução com 200 $\mu$ M de IPTG; Linha 3, é a estirpe Tuner transformada com o plasmídeo pET-Blue-SyrM1 sem indução; linha 4, Tuner transformada com o plasmídeo pET-Blue-SyrM1 sob indução com 200 $\mu$ M de IPTG, Linha 5, corresponde a estirpe BL21 (DE3) transformada com o plasmídeo pET-29-SyrM2 sem indução; linha 6, BL21 (DE3) transformada com o plasmídeo pET-29-SyrM2 sob indução com 200 $\mu$ M de IPTG; Linha 7, é a estirpe Tuner transformada com o plasmídeo pET-29-SyrM2 sem indução; linha 8, Tuner transformada com o plasmídeo pET-29-SyrM2 sob indução com 200 $\mu$ M de IPTG, As setas pretas destacam o tamanho das bandas do marcador de massa molecular, a seta amarela sinaliza a banda referente a His-SyrM2. O quadro laranja em destaque sinaliza a altura do gel em que deveria estar a proteína de fusão His-SyrM1, que não foi superexpressa, enquanto que o quadro amarelo se refere a proteína de fusão His-SyrM2 sendo expressa na sexta e oitava linhas após o marcador de massa molecular (Amersham).

No processo de purificação das proteínas de fusão His-SyrM1 e His-SyrM2 observou-se que a estirpe de *E. coli* usada para a superexpressão interfere na qualidade da proteína obtida. Para verificar qual a melhor condição para o procedimento de purificação foram testadas duas estirpes: Tuner e Origami (FIGURA 15). Dentre as condições testadas, observou-se que na estirpe Origami a solubilidade das proteínas de fusão era melhor que na estirpe Tuner.

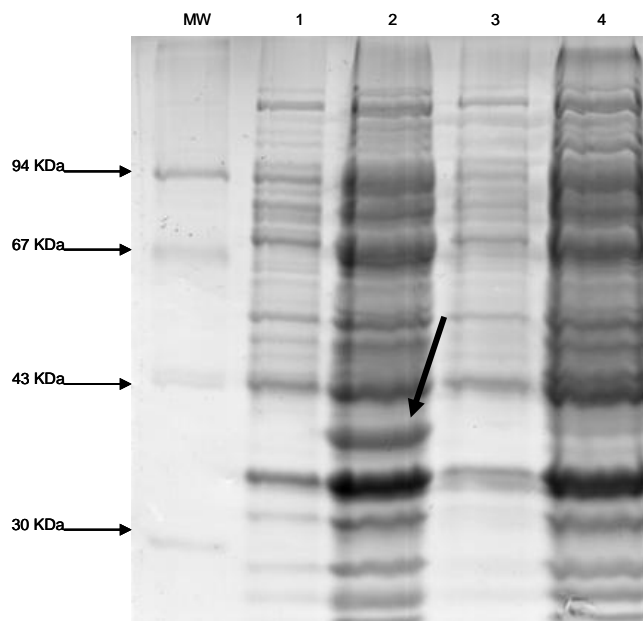


FIGURA 15 - TESTE DE INDUÇÃO ENTRE DIFERENTES ESTIRPES PARA VERIFICAR SUPEREXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO HIS-SYRM2.

FONTE: O Autor.

NOTA: Teste de indução entre *E. coli* estirpes Origami e Turner para superexpressão da proteína de fusão His-syrM2. MW é o marcador de massa molecular (Amersham), as linhas 1 e 2 são frações da estirpe Origami, não induzida e induzida com 200 $\mu$ M de IPTG, respectivamente; as linhas 3 e 4 são frações da estirpe Turner, não induzida e induzida com 200 $\mu$ M de IPTG, respectivamente. A seta indica a banda que representa a superexpressão da proteína de fusão His-SyrM2.

Uma variável importante na purificação de proteínas é a sua solubilidade, uma vez que, em tal condição, estas geralmente se encontram ativas. Diferentes tampões e condições de purificação foram testados e concluiu-se que a presença de imidazol mantinha tais proteínas mais solúveis. Em razão disso, estas foram purificadas e armazenadas em tampões contendo 100mM de glicina, um aminoácido que nesta concentração não interfere no processo de purificação. As proteínas SyrM1 e SyrM2 foram purificadas, mas o grau de pureza obtido e a concentração estão aquém do desejado (FIGURA 16).

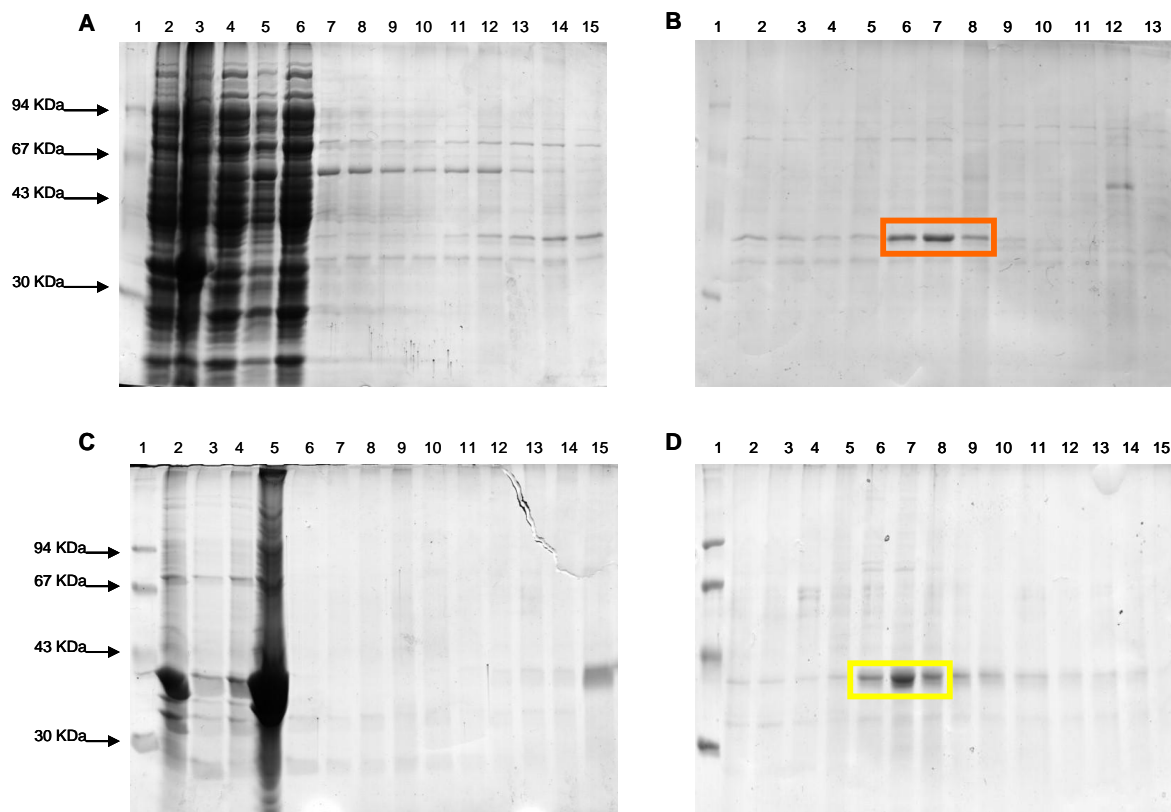


FIGURA 16 - PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL SDS-PAGE DE FRAÇÕES DAS PROTEÍNAS HIS-SYRM1 E HIS-SYRM2 OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO POR CROMATOLOGRAFIA DE AFINIDADE.

FONTE: O Autor.

NOTA: Painéis A, B, C e D: Eletroforese em gel de SDS-PAGE 10% com o perfil das proteínas de fusão His-Syrm1 e His-Syrm2 obtidas no processo de purificação por cromatografia de afinidade. Painéis A e B, purificação da proteína de fusão His-Syrm1, painéis C e D, purificação da proteína de fusão His-Syrm2. Painéis A e B: Linha 1A e 1B, marcador de massa molecular; linha 2A porção não-induzida; linha 3A fração insolúvel; linha 4A fração solúvel; linha 5A injeção; linha 6A lavagem; linha 7-15A e 2-13B correspondem às frações de proteínas purificadas. O retângulo laranja destaca as frações correspondentes a His-Syrm1 que foram dialisadas contra tampão de armazenamento. Painéis C e D: Linha 1C e 1D, marcador de massa molecular; linha 2C fração solúvel; linha 3C lavagem; linha 4C injeção; linha 5C fração insolúvel; linha 6-15C e 2-15D correspondem às frações de proteínas purificadas. O retângulo amarelo destaca as frações correspondentes a His-Syrm2 que foram dialisadas contra tampão de armazenamento.

A atividade desses reguladores foi analisada através de um ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA). O EMSA é uma técnica bastante robusta que permite observar se uma proteína com atividade sobre o DNA reconhece uma determinada seqüência ou não. Assim, quando a seqüência reconhecida por uma proteína já é conhecida, esta técnica permite concluir sobre a condição ativa desta proteína. Quando há a ligação da proteína ao DNA usado como molde, nota-se a presença de uma banda atrasada em relação ao molde, indicando que a proteína está ativa e que esta reconhece a seqüência analisada.

O EMSA foi realizado utilizando parte da região promotora do gene *nodD2* como DNA molde. Esta região foi identificada por Kobayashi *et al.* (2004), como sendo o sítio candidato à ligação de SyrM2, e foi denominada SyrM-box. Na figura 16 estão representados os resultados obtidos. Na análise da figura observa-se que SyrM2 liga-se ao fragmento contendo o SyrM-box resultando numa alteração no perfil de mobilidade deste fragmento. Este dado sugere que a proteína SyrM2 atua sobre este fragmento de DNA, indicando que a atividade deste regulador sobre o promotor do gene *nodD2* se dá pelo reconhecimento do SyrM-box. Este resultado confirma o efeito de SyrM2 sobre a expressão de *nodD2* observado “*in vivo*” por Kobayashi *et al.* (2004).

Os sítios SyrM-box são seqüências consenso presentes em promotores de genes possivelmente modulados por uma proteína homóloga a SyrM. Ao investigar a interação entre SyrM1 e este fragmento observou-se a presença de uma banda muito fraca, demonstrando uma fraca interação de SyrM1 com esta região. Este resultado precisa ser melhor investigado, uma vez que a concentração de SyrM1 obtida pode ser insuficiente para a detecção de sua atividade, nas condições utilizadas.

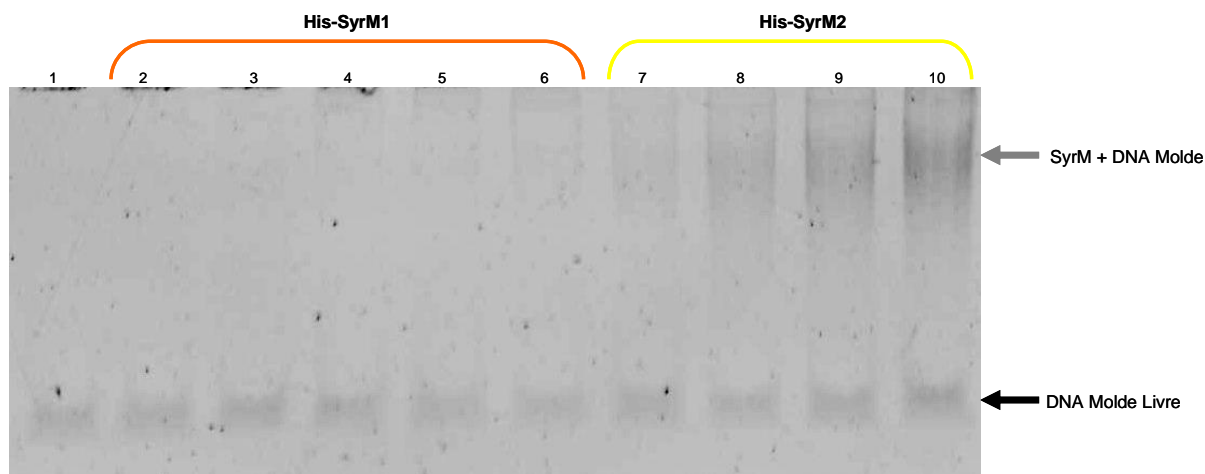


FIGURA 17 - ENSAIO DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO HIS-SYRM1 E HIS-SYRM2 AO SYRM-BOX PRESENTE NA REGIÃO PROMOTORA DE *nodD2*.

FONTE: O Autor.

NOTA: Ensaio de alteração de mobilidade usando o SyrM-box presente na região promotora de *nodD2* como DNA alvo. His-SyrM1 e His-SyrM2 purificadas foram misturadas ao DNA em concentrações crescentes, incubadas por 30 minutos e sujeitas a eletroforese em condições nativas, e coradas com Syber Green.

## 6. DISCUSSÃO

Em *Rhizobium* sp. NGR234 estão presentes pelo menos quatro reguladores transcricionais de genes diretamente envolvidos no processo de nodulação: NodD1, NodD2, SyrM1 e SyrM2. Estes ativadores fazem parte de uma cascata regulatória que envolve ainda a regulação de um quinto ativador transcricional, TtsI, que regula genes do sistema de secreção do tipo III, que também é importante no processo de nodulação e de fixação de nitrogênio.

NodD1, NodD2, SyrM1 e SyrM2 são membros da família LysR de reguladores transcricionais, cuja atividade é modulada por contato direto com pequenas moléculas sinalizadoras. Tal interação resulta numa mudança conformacional ou oligomerização dessas proteínas, que estimula a atividade de ativador transcricional destas. Na forma ativa, as proteínas do tipo LysR interagem diretamente com seqüências presentes na região regulatória de seus genes alvo. A capacidade de ativar a transcrição é, às vezes, dependente do contato direto entre proteínas LysR e outras proteínas envolvidas na regulação transcricional (CHEN, *et al.*, 2005). GroEL, uma chaperona, tem sua expressão dependente de NodD1 e luteolina em *S. meliloti*, e atua modulando a conformação de NodD, constituindo outro mecanismo importante envolvido na atividade destes reguladores (CAPELA, CARRERE e BATUT, 2005). Dessa forma, as proteínas NodD1, NodD2, SyrM1 e SyrM2 podem agir diretamente sobre um promotor, como podem ter sua atividade modulada por outra proteína regulatória integrante da família LysR ou não.

Em *R. meliloti*, as proteínas NodD formam dímeros para então se ligarem a seus promotores alvo. Além disso, diferentes NodDs expressas por este organismo regulam a expressão dos genes *nod* e foi sugerido que estas podem formar heterodímeros que resultam em diferentes atividades, que exercem um controle fino da expressão de sinais moleculares, no curso da relação simbiótica (DERMONT, *et al.*, 1994). Em *R. leguminosarum* as NodD formam tetrâmeros que se ancoram aos sítios de genes *nod* induzíveis na ausência ou presença de indutores e causam o dobramento do DNA (CHEN *et al.*, 2005). Entretanto, na ausência de um flavonóide indutor não ocorre transcrição, em razão da presença de uma proteína repressora. Estes autores propõem que, quando o indutor compatível está presente, a curvatura do DNA atinge o ângulo adequado e isso promove o desligamento do repressor e

permite que a RNA polimerase forme um complexo que conduz à transcrição de genes *nod*. Entretanto, nenhuma proteína repressora candidata foi identificada como sendo responsável por este efeito (CHEN *et al.*, 2005).

Em *Rhizobium* sp. NGR234 demonstrou-se que NodD1 é o principal regulador de uma cascata regulatória temporalmente modulada e responsável pela expressão de 75 *loci* envolvidos no processo simbiótico através de 19 *nod-boxes*. Após contato com flavonóides liberados por plantas ou adicionados a culturas em vida livre no laboratório, a proteína NodD1 torna-se ativa e passa a ativar genes contendo tais *nod-boxes*. Nem todos os genes são simultaneamente ativados, o que produz um padrão temporal de expressão que é importante na evolução das diferentes etapas do processo de formação dos nódulos. Kobayashi *et al.* (2004), mostraram que o gene *nodD1* é expresso em baixos níveis e que estes são menores após 24 horas de indução, sendo esta repressão dependente de NodD2.

Os resultados aqui obtidos demonstram uma expressão contínua do gene *nodD1* em baixos níveis, com aumento progressivo até 48 horas, diferentemente do observado por Kobayashi *et al.* (2004), que relatou a queda na expressão de *nodD1* após 24 horas. Além disso, o gene *nodD1* é expresso independentemente da presença de moléculas indutoras (Figura 3). A independência da presença de flavonóides foi também observada por Bassam *et al.* (1988), mas contrapõe os resultados obtidos por Perret *et al.* (1999), que observaram um aumento na expressão de *nodD1* na presença de flavonóides indutores. Essa expressão constitutiva de *nodD1* em NGR234 é diferente do que ocorre em outros rizóbios como *S. meliloti*, por exemplo, onde o gene *nodD1* é reprimido pelo seu próprio produto, NodD1, na ausência do indutor luteolina, enquanto que é desreprimido na presença deste indutor (CAPELA; CARRERE; BATUT, 2005). Este efeito auto-inibitório foi também descrito para NodD de *R. leguminosarum* e é observado em outros representantes das LysR (Hu *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos mostram que o gene *nodD1* tem sua expressão reprimida pela proteína NodD2 (FIGURA 3), corroborando com Kobayashi *et al.* (2004). Em estudos anteriores, a superexpressão de NodD2 aboliu completamente a atividade basal do promotor de *nodD1*, comprovando a atividade repressora de NodD2 sobre a expressão de *nodD1* (THEUNIS *et al.*, 2004). Além de NodD2, a proteína SyrM2 também parece envolvida nessa repressão. Esta atividade de SyrM2 pode ser indireta, uma vez que este induz a expressão do gene *nodD2*. Portanto,

quando a proteína SyrM2 está ausente, o gene *nodD2* não está sendo expresso e por isso não ocorre repressão de *nodD1* elevando os níveis de expressão de GFP na estirpe NGR $\Omega$ *syrM2*.

A análise da expressão do gene *nodD1* revelou ainda que as proteínas NodD1, SyrM1 e NodW parecem induzir a expressão deste gene. Esta indução pode se dar através de uma interação entre estes reguladores, pois os níveis de expressão entre as estirpes mutantes para estes genes são muito semelhantes. Em *B. japonicum*, já foi descrita a interação entre NodD1 e NodW na ativação de genes simbióticos. Por exemplo, o gene *ttsI* tem como principal ativador a proteína NodD1, mas para sua máxima expressão é necessária a presença de NodW (KRAUSE; DOERFEL; GÖTTFERT, 2002).

A região regulatória do gene *nodD1* apresenta uma seqüência *nod-box* no sentido inverso a *nodD1*, a qual pode ser reconhecida tanto por NodD1 quanto por NodD2. Entretanto sua localização próxima ao início de tradução de NodD1 sugere que estes ativadores podem modular a expressão deste gene através de ligação a este sítio, produzindo um efeito fortemente repressor. A possível participação de SyrM1 e NodW na regulação de *nodD1* pode tornar difícil a detecção de efeitos menos pronunciados e mascarar a identificação de seus reguladores, como por exemplo, a própria regulação por NodD1 e NodD2. Além disso, ainda não se conhece os sítios de ligação de SyrM1 e nem de NodW, e nem tampouco se estes interagem diretamente com regiões promotoras de seus alvos ou se é necessária a presença de um intermediário. Os resultados demonstram ainda que nas primeiras 24 horas a expressão de *nodD1* é praticamente igual em todas as estirpes e que a partir de então, os níveis são crescentemente menores nas estirpes NGR $\Omega$ *nodD1*, NGR $\Omega$ *syrM1* e NGR $\Omega$ *nodVW* quando comparados com os níveis apresentados pela selvagem. Assim, a interação entre NodD1, NodW e SyrM1 é necessária para uma expressão máxima do gene *nodD1* a partir de 24 horas. Os dados sugerem que nas primeiras 6 horas nenhum dos reguladores testados parece agir sobre o promotor do gene *nodD1*, o que demonstra a elevada importância do produto deste gene nos primeiros passos no estabelecimento da relação simbiótica, sendo que a expressão deste gene só passa a ser modulada por ativadores e repressores após 24 horas.

No presente trabalho, a análise da expressão de *nodD2* foi realizada através dos plasmídeos pGT-pnodD2, o qual contém a região conhecida como *pnodD2* e pGT'-pnodD2II (FIGURA 7B), que tem toda a região intergênica *ttsI/nodD2* clonada a

montante do gene repórter *gfp*. Os níveis de expressão observados nas análises de expressão deste gene foram bastante diferentes entre as duas construções. Quando se observa os níveis alcançados pela região intergênica total, vê-se que estes são quase cinco vezes maiores que os alcançados apenas com a região promotora de *nodD2*. A região conhecida como *pnodD2* foi anteriormente analisada através de ensaios de  $\beta$ -galactosidase e estas demonstraram que este é um promotor fraco (FELLAY *et al.* 1998; KOBAYASHI *et al.*, 2004), o que foi corroborado no presente estudo. Porém os altos níveis de expressão apresentados pela região intergênica total podem indicar que existem outras seqüências regulatórias modulando a expressão do gene *nodD2*.

A regulação de *nodD2* foi analisada primeiramente por Fellay e seus colaboradores (1998) e estes demonstraram que *nodD2* tem sua expressão dirigida pelo ativador NodD1 e dependente de flavonóide. Estes autores sugeriram que esta atividade de NodD1 era intermediada por outro regulador, em razão da ausência de um *nod-box* no promotor de *nodD2*. Mais tarde, Kobayashi *et al.* (2004), reafirmou as conclusões de Fellay *et al.* (1998) e demonstrou que SyrM2 é o intermediário entre NodD1 e o gene *nodD2*. Os resultados aqui apresentados demonstram que a expressão de *nodD2* é dirigida pela proteína NodD1 de forma flavonóide induzível, através do intermédio de SyrM2, conforme demonstrado anteriormente. A atividade de SyrM2 foi mais pronunciada quando se analisou toda a região intergênica entre *ttsI* e *nodD2* (pGT'-*pnodD2II*) (FIGURA 9), do que quando analisou-se apenas a região conhecida por *pnodD2* (pGT-*pnodD2*) (FIGURA 8).

Para confirmar essa atividade de SyrM2, realizou-se um ensaio de alteração de mobilidade eletroforética (FIGURA 17) com este ativador. Demonstrou-se a sua ligação ao SyrM-box presente na região promotora de *nodD2*, confirmando que SyrM2 é realmente intermediário de NodD1 na regulação do gene *nodD2* e que este atua através do reconhecimento deste sítio. Entretanto, a exata seqüência reconhecida por este regulador não foi determinada, sendo necessário a execução de ensaios de *footprinting* para determinar mais precisamente o sítio reconhecido por SyrM2.

O regulador NodD2 é uma proteína bifuncional, pois através do reconhecimento de seqüências *nod-box*, atua ativando ou reprimindo alguns genes, cujos produtos estão envolvidos na síntese ou modificação de polissacarídeos, ou ainda, na fixação de nitrogênio. Estudos de superexpressão da proteína NodD2



resultaram na expressão constitutiva do NB15, promotor do gene *fixF*, cujo produto está envolvido na síntese do fito-hormônio ácido indol acético (AIA). Estes dados demonstraram que este sítio é induzido por NodD2 de forma independente de flavonóide (THEUNIUS, *et al.*, 2004). O regulador transcricional NodD2 também pode agir inibindo a expressão de outros genes pelo mesmo mecanismo, como é o caso de sua atividade sobre o gene *nodD1* (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Assim, NodD2 regula a expressão de genes envolvidos em estágios intermediários da nodulação, inibindo a síntese de Fatores Nod e, por conseguinte, permitindo o estabelecimento do bacteróide. Estudos sugerem que o efeito inibitório de NodD2 sobre o operon *nodABC*, cujos produtos formam a cadeia principal dos Fatores Nod, é provavelmente resultado de uma interação entre este regulador e o *nod-box* presente na região promotora deste operon, mas pode ainda envolver a participação de NoIR (FELLAY, *et al.*, 1998; KOBAYASHI, *et al.*, 2004).

A análise da expressão de *nodD2* revelou também que o produto deste gene, o regulador NodD2, parece inibir a própria transcrição. Este efeito observado é mais pronunciado quando se analisa os níveis de expressão de GFP produzidos por toda a região intergênica *ttsI/nodD2* se comparado com os níveis de expressão da região conhecida como promotora de *nodD2*. A seqüência da região intergênica apresenta dois sítios alvo dos reguladores analisados neste estudo, um *nod-box* (NB18) e um SyrM-box, enquanto que a região conhecida como promotora do gene *nodD2* compreende apenas o sítio SyrM-box. Assim, a potencial atividade de NodD2 sobre seu promotor pode ser resultado do reconhecimento do *nod-box* presente nesta região, de forma que esses resultados reforçam a idéia de que toda a região regulatória está envolvida no controle da expressão do gene *nodD2*.

Em *S. meliloti* foi descrita a presença de NoIR ligando-se a genes *nod* reprimindo a expressão destes. Análises da seqüência de *noIR* demonstraram 78% de homologia entre o gene presente em *S. meliloti* e *R. leguminosarum* (KONDOROSI, *et al.*, 1989; CHEN, *et al.*, 2005). Em *S. fredii* foi encontrada uma seqüência reconhecida por NoIR na região promotora dos genes *nodD1* e *ttsI*, as quais demonstraram ser ativas na repressão destes genes (LÓPEZ-BAENA *et al.*, 2008). Em NGR234 foi identificada uma cópia cromossomal de *noIR* e foi visto que no promotor de *ttsI* existem sítios reconhecidos por NoIR. Assim, a região intergênica *ttsI/nodD2* apresenta, pelo menos, três potenciais sítios regulatórios, os quais são reconhecidos pelas SyrMs, NodDs e por NoIR. A presença de um sítio regulatório

modulado por NodR representa uma alternativa para a atividade de NodD2, como repressor de sua própria transcrição. Isso pode explicar a diferença nos níveis de expressão observada entre as duas fusões transcricionais analisadas evidenciando que este repressor pode agir sobre diversos genes envolvidos na nodulação deste organismo, através de NodD2.

Em *R. meliloti*, estão presentes três cópias de NodD e uma SyrM, sendo que estes respondem a diferentes sinais do ambiente resultando na síntese de diferentes estruturas de Fatores Nod. SyrM é um regulador simbiótico que modula a expressão de genes *nod* via NodD3, mas que atua também na síntese de exopolissacarídeos via SyrA controlando a maioria dos sinais necessários no processo de infecção (MULLIGAN; LONG, 1989). A proteína NodD3 de *R. meliloti* tem apresentado atividade sobre *syrM* mesmo na ausência de um *nod-box*, enquanto que SyrM ativa a transcrição de genes regulados por *nod-box* através do intermédio de NodD3 (SWANSON, *et al.*, 1993). Assim, SyrM modula a expressão de *nodD3* e este por sua vez regula a expressão de *syrM*, formando um circuito auto-regulatório que controla vários *loci* simbióticos independente de flavonóide (DERMONT *et al.*, 1994; BARNETT *et al.*, 1996; XIAO; SHEN; ZHU, 1998).

Em NGR234, estão presentes dois alelos *syrM*, sendo *syrM1* e *syrM2*. Hanin *et al.* (1998) mostrou a atividade de SyrM1 na regulação positiva de genes cujos produtos estão envolvidos na sulfatação de Fatores Nod, sendo que análises fenotípicas de mutantes no gene *syrM1* demonstraram que este tem pequenos efeitos na nodulação. No presente estudo, as análises de expressão do gene *syrM1* (FIGURA 5) demonstram que este é constitutivamente expresso em baixos níveis durante todo o período analisado (96 horas). Tais dados são condizentes com a seqüência da região promotora de *syrM1*, pois esta não apresenta nenhum sítio regulatório conhecido, como *nod-box* ou SyrM-box, demonstrando que esta não é sujeita a atividade de nenhum dos reguladores testados neste trabalho. Os níveis de expressão de GFP apresentados pelo promotor do gene *syrM1* foram muito baixos sendo difícil à detecção de atividades menos pronunciadas. Esta dificuldade de analisar a expressão desta região já foi descrita por Hanin e seus colaboradores (1998), que também não encontraram nenhuma atividade regulatória sobre este promotor.

O segundo alelo SyrM presente em NGR234, *syrM2*, tem sua função melhor estudada em NGR234, mas pode agir mascarando a atividade de *syrM1*, sobre

genes simbióticos (HANIN, *et al.*, 1998). Diferentemente de *syrM1*, o gene *syrM2* é precedido por um *nod-box*, o NB19, o qual foi analisado por Kobayashi *et al.* (2004), e estes observaram que o NB19 é um promotor fraco e tardio, sendo expresso de forma dependente de NodD1 e induzido por flavonóide. Os resultados do presente estudo confirmam a dependência de NodD1 e de flavonóides para a expressão de *syrM2*, e demonstram também a atividade de SyrM2 na regulação de NB19, atuando como repressor da própria transcrição. O efeito auto-inibidor observado provavelmente é decorrente da ação de NodD2 sobre NB19, ou seja, quando SyrM2 está ausente os níveis de NodD2 são menores e conseqüentemente o efeito inibidor deste sobre NB19 é diminuído, aumentando os níveis de expressão de *syrM2*. Essa é uma característica de algumas proteínas da família LysR, que foi relatada por Schell (1993). Em *R. leguminosarum* foi demonstrada a auto-repressão de NodD, independentemente de indutores apropriados, através de sua ligação ao *nod-box* presente nesta região, impedindo o acesso da RNA polimerase ao promotor localizado parcialmente sobreposto ao *nod-box*. Este mecanismo auto-regulatório parece ser essencial no estabelecimento de uma simbiose eficiente, sendo que os níveis apropriados de NodD são mantidos na célula garantindo a transcrição de outros genes *nod* (HU *et al.*, 2000).

Os níveis de expressão de *syrM2* atingem valores máximos em 72 horas de indução, decaindo logo em seguida, o que demonstra que genes regulados por SyrM2 são também expressos de forma tardia e devem atuar nos estágios finais do estabelecimento da simbiose.

A análise do genoma de NGR234 revelou a existência de 19 *nod-boxes* (PERRET, *et al.*; 1999), dentre estes NB18 o qual modula a expressão de *ttsI*. Para análise de expressão do gene *ttsI*, o presente estudo avaliou a atividade de GFP pelos plasmídeos pGT-NB18 e pGT-pttsI. A atividade da região denominada NB18 (FIGURA 10) demonstrou que esta contém um promotor de expressão tardia, dependente de NodD1 e induzido por flavonóide. Estes resultados confirmam os dados encontrados por Kobayashi *et al.* (2004) e Wassem *et al.* (2008). *TtsI* ativa a transcrição de genes através da ligação a onze *tts-box* presentes nos promotores de genes envolvidos na síntese de LPS ricos em ramnose e de proteínas do aparato T3SS, os quais são importantes na formação de nódulos eficientes na fixação de nitrogênio sendo necessários durante a infecção dos tecidos vegetais e por isso são tardiamente expressos (MARIE, *et al.*, 2004; WASSEM, *et al.*, 2008).

Em *B. japonicum* a expressão de *ttsI* é modulada por um *nod-box*, induzível por flavonóide e dependente da atividade de NodW, em conjunto com uma proteína NodD. A atividade de NodW foi descrita para outros loci nesse mesmo organismo e todos esses são controlados por *nod-boxes*, o que demonstra que este ativador age modulando a atividade de NodD (KRAUSE; DORFEL; GÖTTFFERT; 2002). Em NGR234, a função de NodW na regulação de genes simbióticos não foi ainda elucidada e o presente estudo verificou que este regulador não demonstra atividade sobre esta região.

O estudo da regulação de *ttsI* demonstrou a inibição da expressão deste gene por SyrM1, independentemente de flavonóide. Porém, nas condições experimentais testadas, os ensaios de alteração da mobilidade eletroforética, tendo o SyrM-box, presente na região intergênica entre *ttsI* e *nodD2* como molde, não demonstraram a ligação de SyrM1 nesta região. Os níveis de expressão de NB18 na estirpe NGR234 $\Delta$ *syrM1* induzido foram quase duas vezes menores do que o não induzido, sendo que tais valores não se repetiram quando se avaliou a região promotora total de *ttsI*. Assim, ou esses níveis alterados na expressão desta estirpe não condizem com a realidade, sendo, portanto um dado irrelevante e espúrio, ou SyrM1 reprime a atividade de *ttsI* através da ligação a um sítio diferente nesta região e não ao SyrM-box. Alternativamente, o efeito de SyrM1 pode ser indireto, como por exemplo, agir sobre a atividade de NodD. Nota-se ainda que os níveis de expressão na ausência de flavonóide adicionado são quase tão altos quanto na sua presença. Dados anteriores mostram que na estirpe selvagem e ausência de indutor, o nível de expressão de *ttsI* é semelhante ao obtido para a estirpe mutante no gene *nodD1*. As diferenças observadas devem ser decorrentes da presença de alguma molécula indutora contaminante. Diversas moléculas, geralmente flavonóides, já foram mostrados como sendo indutores de genes *nod*, potencialmente através da interação com NodD. Em NGR234, uma gama ainda maior de moléculas agem como indutoras, uma vez que este interage com um grande número de leguminosas, onde cada uma produz um conjunto específico de flavonóides (PUEPPKE; BROUGHTON, 1999). A baixíssima concentração de flavonóides necessária para estimular a expressão de genes *nod*, entre  $10^{-7}$  e  $10^{-12}$  molar, dificulta sua eliminação.

Um estudo com diferentes flavonóides indutores demonstrou que o perfil de expressão dos genes dependentes destas moléculas não é alterado, mas são

observadas diferenças nos níveis de expressão destes genes na presença de flavonóides diferentes (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Assim, os altos níveis de expressão do gene *syrM2*, diferente do observado por Kobayashi *et al.* (2004) podem ser resultado de diferenças nas condições experimentais.

Os resultados obtidos com a análise da região intergênica entre *ttsI/nodD2* revelaram que os reguladores transcricionais SyrM1 e NodD2 atuam inibindo a expressão em ambas as direções. A atividade de SyrM1 destaca-se na ausência de flavonóides indutores, sendo que os níveis de expressão de NB18 alcançados pelo mutante neste gene são bastante alterados. Este resultado associado atividade indutora deste regulador sobre o promotor do gene *nodD1* sugerem que a proteína SyrM1 atua modulando a expressão de genes regulados por *nod-box* através da ação de um intermediário. Além disso, a proteína NodD2 atua reprimindo a expressão de genes em ambas as direções nesta região. Porém, este efeito não é observado sobre o sítio *nod-box* evidenciando que este regulador reconhece outras seqüências nesta região. Provavelmente, esta atividade é modulada por NodR sendo necessário que se investigue melhor esta atividade.

Assim, os resultados apresentados demonstram que a regulação de genes envolvidos na síntese dos ativadores de transcrição NodD1, NodD2, SyrM1, SyrM2 e TtsI envolve uma complexa rede regulatória que envolve a transcrição de genes induzíveis e constitutivos.

## 7. CONCLUSÃO

Verificou-se que *syrM1* é constitutivamente expresso, enquanto *nodD1*, *nodD2*, *syrM2* e *ttsI* sofrem regulação por flavonóide e NodD1.

SyrM1 reprime a expressão de *ttsI* na ausência de flavonóides, enquanto na presença de flavonóides NodD2 exerce tal efeito repressor.

SyrM2 induz *nodD2* e inibe a própria transcrição.

O gene *nodD1* é reprimido por NodD2 e SyrM2 e parece ser estimulado por NodD1, SyrM1 e NodW.

As proteínas de fusão His-SyrM1 e His-SyrM2 foram purificadas e foi demonstrada a ligação da His-SyrM2 no SyrM-box presente no promotor de *nodD2*, enquanto que a His-SyrM1 não demonstrou nenhuma ligação a este sítio.

## REFERÊNCIAS

- APPELBAUM, E. R.; THOMPSON, D. V.; IDLER, K.; CHARTRAIN, N. ***Rhizobium japonicum* USDA191 Has Two *nodD* Genes That Differ in Primary Structure and Function.** Journal of Bacteriology, v. 170, n. 1, p. 12-20, jan. 1988.
- AUSMEES, N.; KOBAYASHI, H.; DEAKIN, W. J.; MARIE, C.; KRISHNAN, H. B.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X. **Characterization of NopP, a Type III Secreted Effector of *Rhizobium* sp. Strain NGR234.** Journal of Bacteriology, v. 186, n. 14, p. 4774-4780, jul. 2004.
- BARNETT, M.J.; RUSHING, B. G.; FISHER, R. F.; LONG, S. R. **Transcription Start Sites for *syrM* and *nodD3* Flank Insertion Sequence Relic in *Rhizobium meliloti*.** Journal of Bacteriology, v. 178, n. 7, p. 1782-1787, abr. 1996.
- BARNETT, M. J.; LONG, S. R. **Identification and Characterization of a Gene on *Rhizobium meliloti* pSyma, *syrB*, That Negatively Affects *syrM* Expression.** Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 10, n. 5, p. 550-559, 1997.
- BARTSEV, A. V.; DEAKIN, J. W.; BOUKLI, N. M.; MCALVIN, C. B.; STACEY, G. **NopL, an Effector Protein of *Rhizobium* sp. NGR234, Thwarts Activation of Plant Defense Reactions.** Plant Physiology, v. 134, p. 871-879, fev. 2004.
- BASSAM, B. J.; DJORDJEVIC, M. A.; REDMOND, J. W.; BATLEY, M.; ROLFE, B. G. **Identification of a *nodD*-Dependent Locus in the *Rhizobium* Strain NGR234 Activated by Phenolic Factors Secreted by Soybeans and Other Legumes.** Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 1, n. 4, p.161-168, 1988.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. **Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA polyacrylamide gels.** Eletrophoresis, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BROUGHTON, W. J.; HANIN, M.; RELIC', B.; KOPCIŃSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; SIMSEK, S.; OJANEN-REUHS, T.; REUHS, B.; MARIE, C.; KOBAYASHI, H.; BORDOGNA, B.; LE QUÉRÉ, A.; JABBOURI, S.; FELLAY, R.; PERRET, X.; DEAKING, W. J. **Flavonoid-Inducible Modifications to Rhamnan O Antigens Are Necessary for *Rhizobium* sp. Strain NGR234-Legume Symbioses.** Journal of Bacteriology, v. 188, n. 10, p. 3654-3663, mai. 2006.
- BROUGHTON, W. J.; JABBOURI, S.; PERRET, X. **Keys to Symbiotic Harmony.** Journal of Bacteriology, v. 182, n.20, p. 5641-5652, out. 2000.

CAPELA, D.; CARRERE, S.; BATUT, J. **Transcriptome-Based Identification of the *Sinorhizobium meliloti* NodD1 Regulon**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 8, p. 4910-4913, ago. 2005.

CARDENAS, L.; DOMINGUES, J.; SANTANA, O.; QUINTO, C. **The role of *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolites in *Rhizobium etli***. *Gene*, v. 173, p. 183-187, 1996.

CHEN, X. C.; FENG, J.; HOU, B. H.; LI, F. Q.; LI, Q.; HONG, G. F. **Modulation DNA bending affect NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum***. *Nucleic Acids Research*, v. 38, n. 8, p. 2540-2548, 2005.

DÉNARIÉ, J.; DEBELLÉ, F.; ROSENBERG, C. **Signaling and Host Range Variation in Nodulation**. *Annual Review of Microbiology*, v. 46, p. 497-531, out. 1992.

DERMONT, N.; ARDOUREL, M.; MAILLET, F.; PROMÉ, D.; FERRO, M.; PROMÉ, J.C.; DÉNARIÉ, J. **The *Rhizobium meliloti* regulatory *nodD3* and *syrM* gene control the syntesis of a particular class of nodulation factor N-acylated by ( $\omega$ -1)-hydroxylated fatty acids**. *The EMBO Journal*, v. 13, n<sup>o</sup>9, p. 2139-2149, 1994.

DITTA, G.; STANFIELD, S.; CORBIN, D.; HELINNSK, D. **Broad host-range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti***. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 77, p. 7347-7351, 1980.

FELLAY, R.; HANIN, M.; MONTORZI, G.; FREY, J.; FREIBERG, C.; GOLLINOWSKI, W.; STACHELIN, C.; BROUGHTON, W. J.; JABBOURI, S. ***nodD2* of *Rhizobium* sp. NGR234 is involved in the repression of *nodABC* operon**. *Molecular Microbiology*, v. 27, n. 5, p. 1039-1050, mar. 1998.

FELLAY, R.; PERRET, X.; VIPREY, V.; BROUGHTON, W. J.; BRENNER, S. **Organization of host-inducible transcripts on the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234**. *Molecular Microbiology*, v. 16, n. 4, p. 657-667, mai. 1995.

FISHER, H. M. **Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia**. *Microbiology Reviews*, v. 58, n. 3, p. 352-386, set. 1994.

FISHER, R. F.; LONG, S. **DNA Footprint Analysis of the Transcriptional Activator Proteins NodDi and NodD3 on Inducible nod Gene Promoters**. *Journal Bacteriology*, v. 171, n. 10, p. 5492-5502, out. 1989.



FREIBERG, C.; FELLAY, R.; BAIROCH, A.; BROUGHTON, W. J.; ROSENTHAL, A.; PERRET, X. **Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes.** Nature, v. 387, p. 394-401, mai. 1997.

GÖTTFERT, M.; GROB, P.; HENNECKE, H. **Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinant of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 87, p. 2680-2684, abr. 1990.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. **Nitrogen Fixation in perspective: an overview of research and extension needs.** Field Crops Research, v. 65, 93 - 106, 2000.

HANIN, M.; JABBOURI, S.; BROUGHTON, W. J.; FELLAY, R. **SyrM1 of *Rhizobium* sp. NGR234 Activates Transcription of Symbiotic Loci and Controls the Level of Sulfated Nod Factors.** Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 11, n. 5, p. 343-350, mai. 1998.

HU, H.; LIU, S.; YANG, Y.; CHANG, W.; HONG, G. **In *Rhizobium leguminosarum*, NodD represses its own transcription by competing with RNA polymerase for binding sites.** Nucleic Acids Research, v. 28, n. 14, p. 2784-2793, 2000.

JONES, K. M.; KOBAYASHI, H.; DAVIES, B. W.; TAGA, M. E. WALKER, G. C. **How rhizobial symbionts invade plants: the *Shinorhizobium-Medicago* model.** Nature Reviews Microbiology, v. 5, p. 619-633, ago. 2007.

KNIGHT, C. D.; ROSSEN, L.; ROBERTSON, J. G.; WELLS, B.; DOWNIE, J. A. **Nodulation Inhibition by *Rhizobium leguminosarum* Multicopy *nodABC* Genes and Analysis of Early Stages of Plant Infection.** Journal of Bacteriology, v. 166, n. 2, p. 552-558, mai. 1986.

KOBAYASHI, H.; NACIRI-GRAVEN, Y.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X. **Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod-box* controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234.** Molecular Microbiology, v. 51, n. 2; p. 335-347, jan. 2004.

KONDOROSI, E., GYURIS, J.; SHMIDT, J.; JOHN, M.; DUDA, E.; HOFFMAN, B.; SCHELL, J.; KONDOROSI, A. **Positive and negative control of *nod* genes expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation.** The EMBO journal, v. 8, n° 5, p. 1331-1340, 1989.

KRAUSE, A.; DOERFEL, A.; GÖTTFERT, M. **Mutational and Transcriptional Analysis of the Type III Secretion System of *Bradyrhizobium japonicum***. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 15, n. 12, p. 1228-1235, dez. 2002.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7**. *Nature*, v. 277, p. 680-685, 1970.

LOH, J.; STACEY, G. **Nodulation Gene Regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a Unique Integration of Global Regulatory Circuits**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 1, p. 10-17, jan. 2003.

LONG, S. R. ***Rhizobium* Symbiosis: Nod Factors in Perspective**. *The Plant Cell*, v. 8, p. 1885-1898, out. 1996.

LÓPEZ-BAENA, F. J.; VINARDELL, J. M.; PÉREZ-MONTAÑO, F.; CRESPO-RIVAS, J. C.; BELLOGÍN, R. A.; ESPUNY, M. del R.; OLLERO, F. J. **Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103**. *Microbiology*, v. 154, p. 1825-1836, 2008.

MACHADO, D.; PUEPPKE, S. G.; VINARDEL, J. M.; RUIZ-SAINZ, J. E.; KRISHNAN, H. B. **Expression of *nodD1* and *nodD2* in *Sinorhizobium fredii*, a Nitrogen-Fixing Symbiont of Soybean and Other Legumes**. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 11, n. 5, p. 375-382, mai. 1998.

MARIE, C.; BROUGHTON, W. J.; DEAKIN, W. J. ***Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers?** *Current Opinion in Plant Biology*, v. 4, n. 4, p. 336-342, ago. 2001.

MARIE, C.; DEAKIN, W. J.; VIPREY, V.; KOPCIŃSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; KRISHNAN, H. B.; PERRET, X. BROUGHTON, W. J. **Characterization of Nops, Nodulation Outer Proteins, Secreted Via Type III Secretion Systems of NGR234**. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 16, n. 9, p. 743-751, 2003.

MARIE, C.; DEAKIN, W. J.; OJANEN-REUHS, T.; DIALLO, E.; REUHS, B.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X. **TtsI, a Key Regulator of *Rhizobium* Species NGR234 Is Required for Type III-Dependent Protein Secretion and Synthesis of Rhamnose-Rich Polysaccharides**. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 17, n. 9, p. 958-966, 2004.

MERGAERT, P.; MONTAGU, M. V.; HOLSTERS, M. **Molecular mechanisms of Nod factor diversity**. *Molecular Microbiology*, v. 25, n. 5, p. 811-817, set. 1997.  
MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics**. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1990.

MILLER, W. G.; LEVEAU, J. H. J.; LINDOW, S. E. **Improved *gfp* and *inaZ* Broad-Host-Range Promoter-Probe Vector**. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 13, n. 11, p. 1243-1250, 2000.

MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. D. O.; STEFFENS, M. B. R.; CHUBATSU, L. S. **Isolation of recombinant plasmids for rapid analysis using a sodium dodecyl sulfate/potassium chloride precipitation**. *Analytical biochemistry*, v. 292, p. 169-170, mar. 2001.

MORÓN, B.; SORÍA-DIAZ, M. E.; AULT, J.; VERROIOS, G.; NOREEN, S.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; GIL-SERRANO, A.; THOMAS-OATES, J.; MEGÍAS, M.; SOUZA, C. **Low pH Changes the Profile of Nodulation Factors Produced by *Rhizobium tropici* CIAT899**. *Chemistry e Biology*, v. 12, p. 1029-1040, set. 2005.

MULLIGAN, J. T.; LONG, S. R. **A Family of Activator Genes Regulates Expression of *Rhizobium meliloti* Nodulation Genes**. *Genetics*, v. 122, p. 7-18, mai., 1989.

MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. **Symbiotic Nitrogen Fixation**. *The Plant Cell*, v. 7, p. 869-885, jul. 1995.

PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. **Rhizobial and actinorhizal symbiosis: What are the shared features?** *The Plant Cell*, v. 8, p. 1899-1913, out. 1996.

PERRET, X.; FREIBERG, C.; ROSENTHAL, A.; BROUGHTON, W. J.; FELLAY, R. **High-resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of the *Rhizobium* sp. NGR234**. *Molecular Microbiology*, v. 32, n. 2, p. 415-425, 1999.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. **Molecular Basis of Symbiotic of Promiscuity**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, n. 1, p. 180-201, mar., 2000.

PHILLIPS, D. A.; JOSEPH, C. M.; MAXWELL, C. A. **Trigonelline and Stachydrine Released from Alfalfa Seeds Activate NodD2 Protein in *Rhizobium meliloti***. *Plant Physiology*, v. 99, p. 1526-1531, mar. 1992.

PIETERNEL, V. R.; VANDERLEYDEN, J. **The *Rhizobium*-Plant Symbiosis**. Microbiological Reviews, v. 59, n. 1; p. 124-142, mar. 1995.

POSTGATE, J. R. **The Fundamentals of Nitrogen Fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 375-85, 1982.

PUEPPKE, S. G.; BROUGHTON, W. J. ***Rhizobium* sp. Strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 Share Exceptionally Broad, Nested Host Ranges**. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 12, n. 4, p. 293-318, 1999.

RELIC', B.; FELLAY, R.; LEWIN, A.; PERRET, X.; PRICE, N. P. J.; ROCHEPEAU, P.; BROUGHTON, W. J. ***nod* genes and Nod factors of *Rhizobium* species NGR234**. Em New Horizons in Nitrogen Fixation. Palacios, R.; Mora, R.; Newton, W. E. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 183-189, 1993.

ROCHE, P.; MAILLET, F.; PLAZANET, F. D.; FERRO, M.; YRUCHET, G.; PROMÉ, J. C.; DÉNARIÉ, J. **The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 93, p. 15305-15310, dez. 1996.

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

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain termination inhibitors**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.74p.5463-5467, 1977.

SCHELL, M. A. **Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators**. Annual Review of Microbiology, v. 47, p. 597-626, out. 1993.

SILVA, F. de A. S. e; AZEVEDO, C. A. V. **Versão do Programa Computacional Assistat para o Sistema Operacional Windows**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SIMON, R.; PRIEGER, U.; PUHLER, A. **A broad host range mobilization system for *in vitro* genetic engineering transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria**. BioTechnology, v.1, p.784-791, 1983.

SMITH, L. S.; LONG, S. R. **Requirements for *syrM* and *nodD* Genes in the Nodulation of *Medicago trunculata* by *Rhizobium meliloti* 1021.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 11, n. 9, p. 937-940, 1998.

SNOECK, C.; LUYTEN, E.; POINSOT, V.; SAVAGNAC, A.; VANDERLEYDEN, J.; PROMÉ, J. C. ***Rhizobium* sp. BR816 Produces a Complex Mixture of Known and Novel Lipochitooligosaccharide Molecules.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 14, n. 5, p. 678-684, mai. 2001.

SPAINK, H. P.; WIJFJES, H. M.; LUGTENBERG, J. J. ***Rhizobium* NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides.** *Journal bacteriology*, v. 177, p. 6276-6281, 1995.

STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A.; PERRET, X.; STAEHELIN, C.; DEAKIN, W. J.; RAASCH, C.; LIESEGANG, H.; BROUGHTON, W. J. **An Evolutionary Hot Spot: the pNGR234b Replicon of *Rhizobium* sp. Strain NGR234.** *Journal of Bacteriology*, v. 186, n. 2, p. 535-542, jan. 2004.

SWANSON, J. A.; MULLIGAN, J. T.; LONG, S. R. **Regulation of *syrM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*.** *Genetics*, v. 134, p. 435-444, jun., 1993.

THEUNIS, M.; KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W. J.; PRINSEN, E. **Flavonoids, NodD1, NodD2, and Nod-Box NB15 Modulate Expression of the y4wEFG Locus That Is Required for Indole-3-Acetic Acid Synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 17, n. 10, p. 1153-1161, out. 2004.

TRINICK, M. J. **Relationship amongst the fast-growing *Rhizobium* of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* sp., *Acacia farnesiana*, and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other *Rhizobium* groups.** *Journal Applied Bacteriology*, v. 49, p. 39-53, 1980.

VAN SLOOTEN, J. C.; CERVANTES, E.; BROUGHTON, W. J.; WONG, C. H.; STANLEY, J. **Sequence and Analysis of the *rpoN* Sigma Factor Gene of *Rizobium* sp. Strain NGR234, a Primary Coregulator of Symbiosis.** *Journal of Bacteriology*, v. 172, n. 10, p. 5563-5574, out. 1990.

VIPREY, V.; GRECO, A. D.; GOLINOWSKI, W.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X. **Simbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*.** *Molecular Microbiology*, v. 28, n. 6, p. 1381-1389, 1998.

VIPREY, V.; ROSENTHAL, A.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X. **Genetic snapshots of the *Rhizobium* species NGR234 genome.** *Genome Biology*, v. 1, n. 6, dez. 2000.

WANG, S. P.; STACEY, G. **Studies of the *Bradyrhizobium japonicum nodD1* Promoter: a Repeated Structure for the *nod* Box.** *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 11, p. 3356-3365, jun. 1991.

WASSEM, R.; KOBAYASHI, H., KAMBARA, K., LE QUERÉ, A., WALKER, G., BROUGHTON, W. J., DEAKIN, W. **TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR234 by binding to tts boxes.** *Molecular Microbiology*, v. 68, n°3, p. 736-748, 2008.

XIAO, H.; SHEN, S.; ZHU, J. **Binding of activator SyrM to the site of *nodD3* P1 region of *Rhizobium meliloti*.** *Science in China*, v. 41, n° 2, p. 157-162, 1998.