

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUÍS FILIPE STROBEL GUIMARÃES



**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DO METABOLISMO DE
NITRATO NAS ESTIRPES SmR1 E DCP286A DE *Herbaspirillum*
seropedicae POR PCR EM TEMPO REAL**



CURITIBA 2011

LUÍS FILIPE STROBEL GUIMARÃES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DO METABOLISMO DE
NITRATO NAS ESTIRPES SMR1 E DCP286A DE *Herbaspirillum*
seropedicae POR PCR EM TEMPO REAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Prof^a Liu Un Rigo

**Co-orientador: Prof^o Emanuel
Maltempi de Souza**

**CURITIBA
2011**

TERMO DE APROVAÇÃO

LUIS FILIPE STROBEL GUIMARÃES

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DO METABOLISMO DE NITRATO
NAS ESTIRPES SmR1 E DCP286A DE *Herbaspirillum seropedicae* POR PCR
EM TEMPO REAL

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof^a Dr^a Liu Um Rigo (Orientadora)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof^a. Dr^a. Rose Adele Monteiro

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof^a. Dr^a. Fabiane Rêgo

Departamento de Patologia Médica – UFPR

Curitiba, 28 de fevereiro de 2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores Liu Un Rigo e Emanuel Maltempi de Souza pela orientação, paciência e principalmente pela confiança depositada.

Ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de fazer parte do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio.

Aos demais professores do grupo pela ajuda e contribuição na minha formação acadêmica.

À Dona Roseli Prado e ao Valter Baura pela ajuda e pela eficiência com que realizam seu trabalho.

Aos colegas de grupo e de mestrado pelos momentos de descontração e pelas discussões.

Aos amigos do laboratório 279 pela amizade e ajuda.

Aos professores do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

À coordenação da pós-graduação em Ciências: Bioquímica

Ao INCT da fixação biológica de nitrogênio/MCT/CNPq e CAPES-REUNI pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
1.1 CICLO DO NITROGÊNIO	10
1.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	12
1.3 METABOLISMO DE NITRATO	13
1.3.1 NITRATO REDUTASE RESPIRATÓRIA	14
1.3.2 NITRATO REDUTASE ASSIMILATÓRIA	17
1.3.3 NITRATO REDUTASE PERIPLASMÁTICA	18
1.4 SISTEMA REGULADOR DE DOIS COMPONENTES	20
1.4.1 PROTEÍNAS NtrBC e NtrYX	21
1.5 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	22
1.5.1 METABOLISMO DE NITRATO EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	23
1.5.2 PROTEÍNAS NtrBC E NtrXY DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	26
1.6 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 JUSTIFICATIVA	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 BACTÉRIAS UTILIZADAS	33
4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO	33
4.3 ANTIBIÓTICOS	33
4.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	34
4.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	35
4.6 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)	35
4.7 DOSAGEM DE NITRITO	37
4.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS	37
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	38
5.1 ENSAIO DE EFICIÊNCIA E DE DISSOCIAÇÃO	38
5.2 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES <i>narK</i> , <i>nirD</i> e <i>nasA</i> de <i>H. seropedicae</i>	40
5.3 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE <i>nasF</i> de <i>H. seropedicae</i>	48
5.4 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES <i>narU</i> , <i>narG</i> e <i>narX</i> de <i>H. seropedicae</i>	52
5.4 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE <i>nasR</i> de <i>H. seropedicae</i>	62
5.5 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE <i>ntrY</i> de <i>H. seropedicae</i>	65
6. CONCLUSÕES	68
7 REFERÊNCIAS	69

ABSTRACT

The aim of this work is to study the regulation of nitrate metabolism genes of the diazotrophic bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. Previous work showed that the mutant strain DCP286A (*ntrC*) is unable to grow using nitrate, indicating that the *ntrC* gene is crucial for the regulation of nitrate metabolism. The expression levels of the genes *narK*, *nasA*, *nirD*, *narU*, *narG*, *nasF*, *ntrY*, *nasR* and *narX* were determined in the wild type and DCP286A (*ntrC*) strains of *H. seropedicae* grown in the presence of nitrate (10 mM) or ammonium chloride (20 mM). The expression levels were normalized by the expression of the 16S rRNA gene.

The results showed that the genes *nasF*, *narK*, *nasA*, *nirD*, *narU*, *narG* are strongly induced by nitrate in the wild type strain but not in the *ntrC* strain, confirming the role of NtrC in activating the expression of nitrate utilization genes. Sequence analysis of the promoter region of *nasFED* operon revealed an NtrC and an RpoN binding sites, and a termination hairpin, suggesting that the regulation of the *nasFED* operon in *H. seropedicae* is mediated by the NtrC and the anti-terminator NasR proteins. The expression of the *narX* was also upregulated by nitrate, but at lower extent. In contrast *nasR* seems to be self-regulated and *ntrY* expression was neither regulated by nitrate or dependent on NtrC.

Keywords: *Herbaspirillum seropedicae*, quantitative real-time PCR, nitrate metabolism.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo quantificar a expressão de genes responsáveis pelo metabolismo de nitrato em *H. seropedicae*, estirpes SmR1 e DCP286A (*ntrC*), por PCR quantitativo em tempo real. A quantificação dos níveis de expressão nas estirpes SmR1 e DCP286A demonstraram que o transportador de nitrato NasFED tem sua expressão dependente de nitrato, possivelmente controlada pela proteína NtrC e ativação dependente da proteína NasR. Os genes *narK1UnarGHJI* estão organizados em um operon e sua expressão depende de NtrC, da proteína FNR e ainda da proteína NarL. Os genes *narKnirBDCnasA* também estão organizados em um operon e sua expressão possivelmente está sob o controle de NtrC e de NasR. A expressão genes do sistema de dois componentes *narXL* parece ser dependente de NtrC, porém os sítios promotores encontrados são fracos. A expressão do gene *nasR* ainda não está clara, porém a presença de grampos terminadores de transcrição sugerem uma possível auto-regulação. A expressão do gene *ntrY* na estirpe SmR1 se demonstrou constitutiva e a diminuição da expressão na estirpe DCP286A sugere uma possível dependência da proteína NtrC para expressão de *ntrY*, porém os dados obtidos não são suficientes para elucidar o papel deste gene no metabolismo de nitrato em *H. seropedicae*.

Palavras-chave: Metabolismo de nitrato; *Herbaspirillum seropedicae*; PCR quantitativo em tempo real

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – O CICLO BIOLÓGICO DO NITROGÊNIO.....	11
FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES E DAS PROTEÍNAS DA VIA RESPIRATÓRIA DE NITRATO.....	15
FIGURA 3 - ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>nas</i> E SUAS RESPECTIVAS PROTEÍNAS EM <i>K. oxytoca</i> e <i>Synechococcus sp. PCC4972</i>	18
FIGURA 4 – ORGANIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS INTEGRANTES DA NITRATO REDUTASE PERIPLASMÁTICA.....	20
FIGURA 5 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>nar</i> EM <i>H. seropedicae</i>	25
FIGURA 6 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>nas</i> EM <i>H. seropedicae</i>	26
FIGURA 7 – CURVAS DE DISSOCIAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PRODUTOS INESPECÍFICOS.....	39
FIGURA 8 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>narK</i> NA ESTIRPE SmR1 DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i>	41
FIGURA 9 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>narK</i> NA ESTIRPE DCP286A DE <i>H. seropedicae</i>	42
FIGURA 10 – REGIÃO DO GENOMA QUE CONTÉM O GENE <i>narK</i> DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i> E SUA PROVÁVEL REGIÃO PROMOTORA.....	43
FIGURA 11 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>nirD</i> NA ESTIRPE SmR1 DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i>	44
FIGURA 12 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>nirD</i> NA ESTIRPE DCP286A DE <i>H. seropedicae</i>	45
FIGURA 13 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>nasA</i> NA ESTIRPE SmR1 DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i>	46
FIGURA 14 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>nasA</i> NA ESTIRPE DCP286A DE <i>H. seropedicae</i>	46
FIGURA 15 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>nasF</i> NA ESTIRPE SmR1 DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i>	49
FIGURA 16 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>nasF</i> NA ESTIRPE DCP286A DE <i>H. seropedicae</i>	49
FIGURA 17 – REGIÃO DO GENOMA QUE CONTÉM O GENE <i>nasF</i> DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i> E SUA PROVÁVEL REGIÃO PROMOTORA.....	51

FIGURA 18 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>narU</i> NA ESTIRPE SmR1 DE <i>H. seropedicae</i>	53
FIGURA 19 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>narU</i> NA ESTIRPE DCP286A DE <i>H. seropedicae</i>	54
FIGURA 20 – REGIÃO DO GENOMA QUE CONTÉM O GENE <i>narK1</i> DE <i>H. seropedicae</i> E SUA PROVÁVEL REGIÃO PROMOTORA.....	55
FIGURA 21 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>narG</i> NA ESTIRPE SmR1 DE <i>H. seropedicae</i>	56
FIGURA 22 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>narG</i> NA ESTIRPE DCP286A DE <i>H. seropedicae</i>	57
FIGURA 23 – REGIÃO DO GENOMA QUE CONTÉM O GENE <i>narG</i> DE <i>H. seropedicae</i> E SUA PROVÁVEL REGIÃO PROMOTORA.....	57
FIGURA 24 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>narX</i> NA ESTIRPE SmR1 DE <i>H. seropedicae</i>	58
FIGURA 25 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>narX</i> NA ESTIRPE DCP286A DE <i>H. seropedicae</i>	59
FIGURA 26 – REGIÃO DO GENOMA QUE CONTÉM O GENE <i>narX</i> DE <i>H. seropedicae</i> E SUA PROVÁVEL REGIÃO PROMOTORA.....	60
FIGURA 27 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>nasR</i> NA ESTIRPE SmR1 DE <i>H. seropedicae</i>	62
FIGURA 28 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>nasR</i> NA ESTIRPE DCP286A DE <i>H. seropedicae</i>	63
FIGURA 29 – REGIÃO DO GENOMA QUE CONTÉM O GENE <i>nasR</i> DE <i>H. seropedicae</i> E SUA PROVÁVEL REGIÃO PROMOTORA.....	64
FIGURA 30 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>ntrY</i> NA ESTIRPE SmR1 DE <i>H. seropedicae</i>	66
FIGURA 31 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>ntrY</i> NA ESTIRPE DCP286A DE <i>H. seropedicae</i>	66

LISTA DE TABELAS

Tabela1 – Bactérias Utilizadas.....	33
Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para experimentos de RT-qPCR.....	36

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 CICLO DO NITROGÊNIO

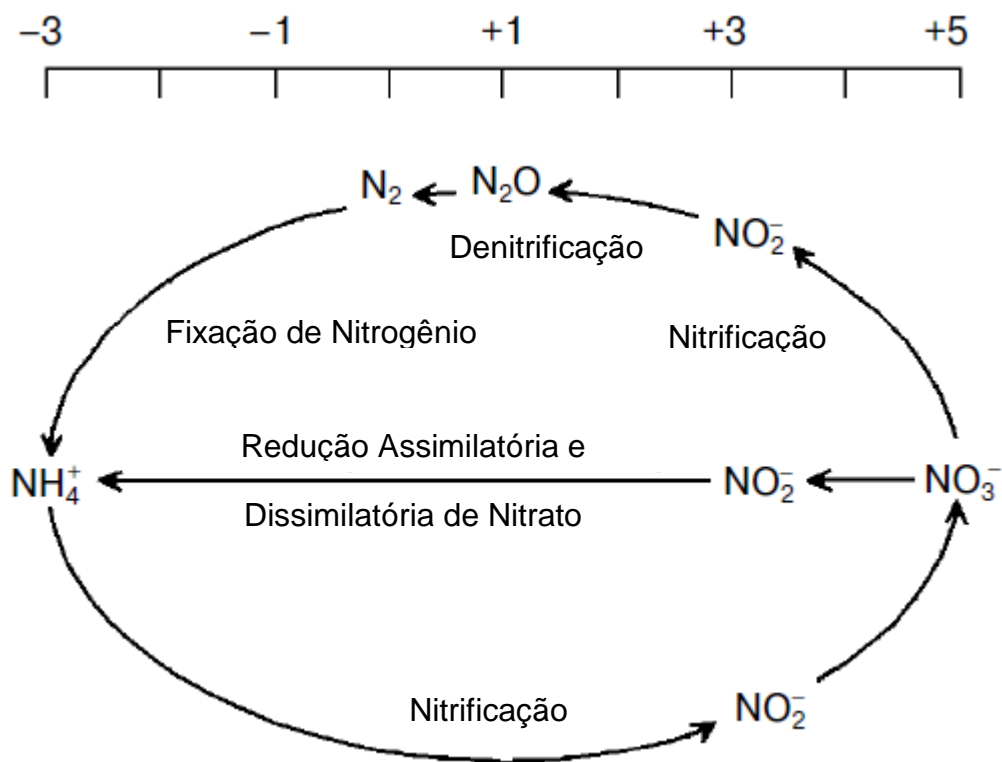
O nitrogênio é um elemento fundamental para a manutenção da vida por fazer parte da constituição de proteínas, ácidos nucleicos, peptidoglicanos, aminoácidos e outras biomoléculas (YOUNG, 1992). Cerca de setenta e oito por cento (78%) da atmosfera terrestre é composta pelo gás dinitrogênio (N_2) (YOUNG, 1992; HOWARD e REES, 1996). Existem diferentes fontes de nitrogênio na biosfera e a interconversão entre estas espécies ocorre através de processos biológicos e não biológicos, o ciclo global do nitrogênio.

Neste ciclo, o nitrogênio pode sofrer várias reações de oxidação e redução gerando diferentes compostos. Na redução assimilatória, o nitrato é reduzido via nitrito a amônio, que é utilizada para a síntese de glutamina. A glutamina é então doadora de nitrogênio para a síntese de outros aminoácidos e moléculas (BOTHE, FERGUSON e NEWTON, 2007). Os íons nitrato podem também ser incorporados pelas células e atuar como aceptores de elétrons para eliminar o excesso de poder redutor através da denitrificação ou redução dissimilatória de nitrato ou ainda respiração pelo nitrato. Através da denitrificação os íons nitrato, em condições anaeróbicas, são reduzidos a nitrito e subsequentemente em: óxido nítrico (NO), óxido nitroso (NO_2) e finalmente em dinitrogênio (N_2). Devido à excreção de gases pelos microrganismos os termos redução dissimilatória, respiração ou denitrificação tem sido usados equivalentemente na literatura para denominar esta via (BOTHE, FERGUSON e NEWTON, 2007). Um processo alternativo é o de amonificação, que pode ocorrer em algumas enterobactérias e corresponde à redução do nitrato a amônio (NH_4), que é então excretado. O amônio e o nitrito podem ser oxidados formando nitrito e nitrato respectivamente. Este processo é realizado para suprir demandas energéticas e é denominado nitrificação. Recentemente foi descoberto que alguns organismos heterotróficos como planctomicetos podem oxidar amônio e utilizar nitrito comoceptor de elétrons na respiração através de um processo chamado Anammox. Como o produto final desta via é o nitrogênio gasoso, tais organismos são importantes no tratamento de água contaminada (BOTHE,

FERGUSON e NEWTON, 2007). A conexão final do ciclo é a fixação do nitrogênio, que reduz o dinitrogênio gasoso em amônio para sua utilização biológica (BOTHE, FERGUSON e NEWTON, 2007).

A maioria dos procariotos pode utilizar diferentes fontes de nitrogênio, e regulam a assimilação deste elemento de tal modo que determinadas fontes são preferencialmente utilizadas. A fonte primária de nitrogênio é o amônio, que é convertido à glutamina, e glutamato; precursores de outros compostos nitrogenados das vias metabólicas. A utilização de fontes alternativas de nitrogênio só ocorre na ausência das fontes primárias (MERRICK E EDWARDS, 1995).

FIGURA 1 – O CICLO BIOLÓGICO DO NITROGÊNIO



FONTE: Adaptado de MOROZKINA e ZVYAGILSKAYA, 2007

Ciclo biológico do Nitrogênio, setas indicam a conversão entre as espécies de nitrogênio. A escala numérica indica o número de oxidação do átomo de nitrogênio em cada uma das espécies químicas.

1.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3) é realizada por alguns organismos procariotos que podem ser simbióticos, de vida livre ou associativa (POSTGATE, 1985; CAPONE, 2001).

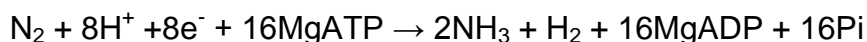
A redução do nitrogênio atmosférico (fixação de nitrogênio) é um processo importante para a manutenção do ciclo do nitrogênio, pois devolve ao solo o nitrogênio perdido durante o processo de desnitrificação, o qual libera o nitrogênio fixado para a atmosfera e não para o solo. Sendo assim a fixação de nitrogênio atua compensando, através da devolução de nitrogênio ao solo, as perdas geradas pelo processo de desnitrificação. (MARTINEZ-ARGUDO et al. 2005).

A reação de redução de nitrogênio atmosférico à amônia requer uma energia de ativação extremamente alta, o que impossibilita sua ocorrência de forma espontânea na ausência de catalisadores adequados. Na indústria o processo de fixação de nitrogênio desenvolvido por Haber-Bosch utiliza de altas temperaturas (entre $300^{\circ}C$ e $500^{\circ}C$), pressões acima de 300 atm e de catalisadores a base de ferro que combinam nitrogênio e hidrogênio para formação de compostos químicos nitrogenados, destinados a produção de fertilizantes e até mesmo explosivos (KIM e REES, 1994).

No processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), microrganismos procariotos diazotróficos, ou fixadores de nitrogênio, realizam a interconversão do nitrogênio atmosférico (N_2) à amônia (NH_3) através do complexo enzimático da nitrogenase. A amônia resultante do processo de FBN é disponibilizada para as plantas, muitas vezes por meio de associações entre a bactéria fixadora e a planta (BURRIS, 1991). O complexo de nitrogenase é formado pela proteína Ferro e pela proteína Ferro-Molibdênio (FeMo). A transferência de elétrons através do complexo da nitrogenase é iniciada pela redução da proteína Ferro pela ferredoxina ou pela flavodoxina, então os elétrons são transferidos para a proteína FeMo, processo este que é dependente da hidrólise de MgATP. Como somente um elétron é transferido para cada duas moléculas de MgATP hidrolisadas, é necessário que o ciclo se repita

para que a proteína FeMo acumule elétrons suficientes para reduzir o nitrogênio atmosférico (BURRIS,1991).

A estequiometria da reação catalisada pelo complexo da nitrogenase é representada pela reação (BURRIS, 1991):



O uso desenfreado de fertilizantes químicos nitrogenados, utilizados em lavouras, resulta em grandes níveis de poluição ambiental, eutrofização de rios, lagos e da água potável. Desta maneira o processo de fixação biológica de nitrogênio oferece uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos em lavouras, disponibilizando nitrogênio para plantas de interesse comercial através de um processo renovável e não poluente (ZAHARAN,1999).

1.3 METABOLISMO DE NITRATO

O nitrato é um composto inorgânico que, em excesso, contamina lençóis freáticos de rios e lagos o que pode resultar em sua eutrofização. Sua redução no ciclo biológico do nitrogênio é realizada por bactérias, algas, fungos e plantas superiores onde atuará como uma fonte alternativa ao nitrogênio atmosférico disponibilizando assim nitrogênio que poderá ser utilizado nas reações biossintéticas. A redução de nitrato é um processo de extrema importância visto que contabiliza toneladas de nitrogênio inorgânico (GUERRIERO, VEGA e LOSADA, 1981). Em humanos o nitrato pode ser convertido em compostos carcinogênicos pelas bactérias do trato gastrintestinal, e pode ainda causar o aparecimento de metahemoglobina em crianças. Por outro lado o nitrato possui propriedades terapêuticas em condições como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, hipertensão arterial sistêmica e pulmonar, e ulceração gástrica, e devido a sua importância biológica a redução do nitrato tem se tornado foco de diversos estudos (MORENO-VIVIÁN et al.,1999; revisado por LUNDBERG,WEITZBERG e GLADWIN, 2008).

O nitrato presente no meio pode ser metabolizado pelas bactérias através de três vias: assimilatória, dissimilatória e respiratória. Na via respiratória o nitrato é reduzido a nitrito e atua como aceptor final de elétrons em condições limitantes de oxigênio, na via dissimilatória atua no balanço redox, devido a sua capacidade redutora, e na via assimilatória o nitrato é reduzido a amônio e posteriormente utilizado como fonte alternativa de nitrogênio na síntese de biomoléculas (COLE,1996; MORENO-VIVIÁN et al., 1999).

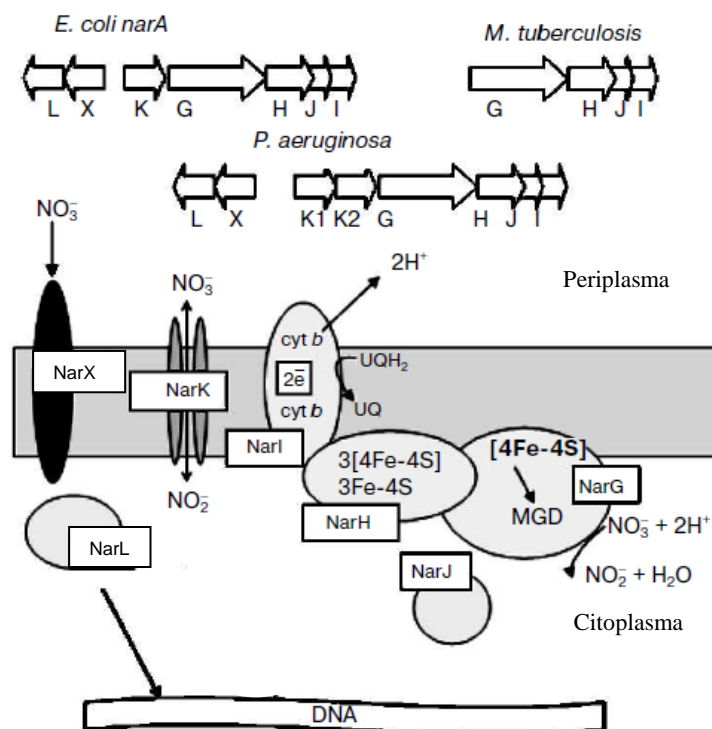
1.3.1 NITRATO REDUTASE RESPIRATÓRIA

Na via respiratória o nitrato é reduzido a nitrito através do complexo enzimático da nitrato redutase respiratória (NAR). O complexo NAR se encontra ancorado na membrana plasmática, é composto por três subunidades α , β e γ , e possui seu centro catalítico voltado para o citoplasma (FIGURA 2). A subunidade α é formada pela proteína NarG e a subunidade β pela proteína NarH, proteínas estas que estão localizadas do lado interno da membrana. Já a subunidade γ é formada pela proteína NarI que é uma proteína transmembrana que realiza a ancoragem do complexo enzimático na membrana. A montagem do complexo enzimático é dependente de uma quarta proteína denominada NarJ, e todo o complexo enzimático é codificado pelo operon *narGHJI* (MacGREGOR, SCHNAITMAN e NORMANSELL,1974; SODERGREN, HSU, DeMOSS, 1988).

Além do operon *narGHJI* outros genes, denominados genes *nar*, atuam na via respiratória como os genes *narK* e *narXL* que codificam proteínas denominadas NarK e NarXL. A proteína NarK é uma proteína transmembrana da superfamília dos facilitadores principais (MFS) que realiza transporte, de nitrato e nitrito, dependente de gradiente iônico, dispensando a hidrólise de ATP para que o processo ocorra. As proteínas NarK são divididas em duas subfamílias, tipo 1 e tipo2, as do tipo 1 são as transportadoras nitrato/próton simporte, enquanto as do tipo 2 realizam transporte de nitrato/nitrito antiporte (MARGER e SAIER, 1993; MOIR e WOOD, 2001). A proteína NarK foi primeiramente identificada em *E. coli* e se localiza a montante dos genes estruturais do complexo da nitrato redutase com os quais forma um operon. Estudos demonstraram que no mutante *narK* de *E. coli* a taxa de transporte de nitrato não foi

significativa quando comparada à estirpe selvagem, o que sugeriu o envolvimento da proteína NarK no transporte de nitrato nesta bactéria (NOJI et al., 1989). Outro transportador, denominado NarU, foi identificado posteriormente em *E. coli*. Esta proteína possui altíssimo grau de similaridade com a proteína NarK e sua função está ligada à captação de nitrato e nitrito para o meio intracelular bem como a exportação de nitrito para o meio extracelular. O mecanismo de transporte realizado pela proteína NarU ainda permanece desconhecido, porém, estudos indicam que esta proteína possivelmente atua realizando antiporte de nitrato/nitrito ou ainda simporte de nitrato/H⁺ e nitrito/H⁺ (BLASCO et al., 1990; JIA et al., 2009).

FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES E DAS PROTEÍNAS DA VIA RESPIRATÓRIA DE NITRATO



FONTE: Adaptado de MOROZKINA e ZVYAGILSKAYA, 2007.

Organização dos genes e das proteínas integrantes da via respiratória de nitrato. Representação do transportador NarK, do sistema de dois componentes NarXL e da nitrato redutase respiratória NarGHJI.

Em *Pseudomonas aeruginosa* existem duas proteínas NarK, classificadas como NarK1 e NarK2, e os respectivos genes que codificam tais proteínas se localizam a montante dos genes *narGHJI*, formando um operon. Em estudos de complementação, estirpes mutantes para os genes *nark2*⁻ e *nark1*⁻*k2*⁻, foram complementados pela proteína NarK de *E. coli* levando à conclusão de que a proteína NarK2 de *P. aeruginosa* e NarK de *E. coli* são funcionalmente similares (SHARMA, NORIEGA e ROWE, 2006).

As proteínas NarX e NarL, são codificadas pelos genes *narXL*, fazem parte de um sistema regulatório de dois componentes onde a proteína NarX atua como proteína sensora e NarL é uma proteína de resposta capaz de se ligar ao DNA. Estas proteínas respondem a presença de nitrato e nitrito, e são responsáveis pelo controle dos genes da via respiratória anaeróbica em *E. coli*, inclusive dos genes da nitrato redutase e do transportador NarK (STEWART, et al., 1989). Estudos posteriores revelaram a presença de um segundo sistema de dois componentes em *E. coli* também responsável pelo controle dos genes da via respiratória de nitrato. Este outro sistema é composto pelas proteínas NarQ e NarP, onde NarQ é a proteína sensora e NarP a proteína de resposta (STEWART, 1994; DARWIN, STEWART, 1995). Foi demonstrado, em estudo utilizando mutantes NarQ e NarX de *E. coli*, que a proteína NarQ é capaz de interagir tanto com seu par de resposta NarP quanto com a proteína NarL. Enquanto que a proteína NarX interage de maneira preferencial com seu par NarL e não possui interação significativa com a proteína NarP (NORIEGA et al. 2010).

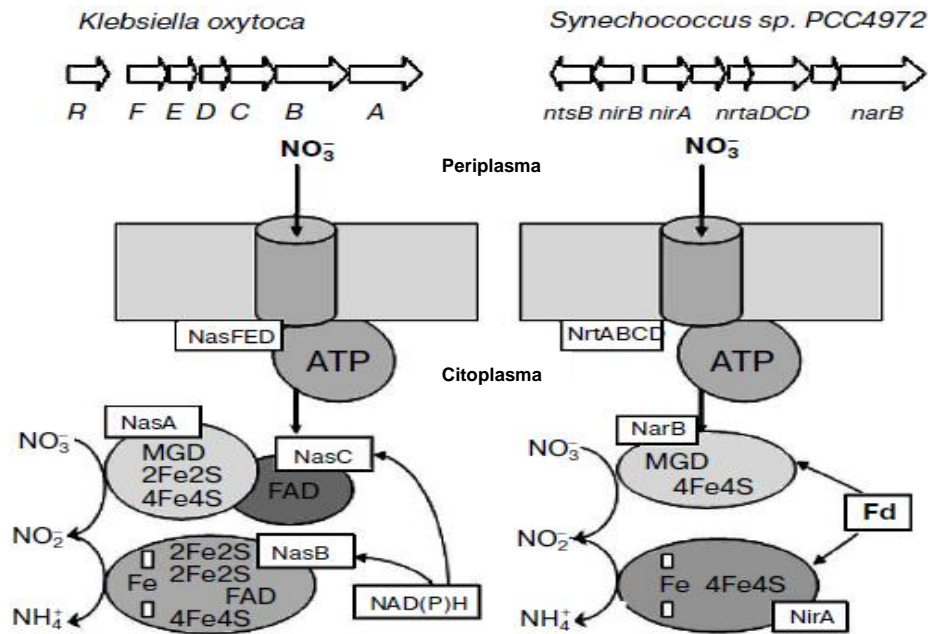
A proteína transmembrana NarX atua detectando a presença de nitrato e nitrito no periplasma, a informação é transmitida através de fosforilação para o regulador de resposta NarL que irá desencadear a resposta, ativando ou reprimindo a transcrição de genes da via anaeróbica. A presença de nitrito faz com que NarX atue como regulador negativo de NarL fosforilado (STEWART, et al., 1989; SCHRÖDER et al., 1994).

1.3.2 NITRATO REDUTASE ASSIMILATÓRIA

O complexo enzimático da nitrato redutase assimilatória (NAS), como o nome sugere, é parte integrante da via assimilatória de nitrogênio. Este complexo é responsável pela redução de nitrato a nitrito e ainda pela redução de nitrito a amônio, que será posteriormente incorporado ao metabolismo do organismo. Existem duas classes de proteínas NAS, classificadas de acordo com o doador de elétrons: a flavodoxina ou ferredoxina dependente (enzimas monoméricas), e NADH dependente (enzimas heterodiméricas). Sendo que as duas classes utilizam bis-MDG como cofator e possuem cluster ferro-enxofre (MORENO-VIVIÁN et al., 1999; RICHARDSON et al., 2001).

Em *Klebsiella oxytoca* os produtos dos genes *nasFEDCBA* são responsáveis pelo transporte e pela redução de nitrato e nitrito. Os genes *nasFED* codificam um sistema de proteínas transportadoras de nitrato e nitrito (FIGURA 4), os genes *nasCA* formam duas subunidades do complexo enzimático da NAS da classe NADH dependente, e *nasB* a nitrito redutase assimilatória. Os produtos dos genes *nasFED* de *K. oxytoca* formam um típico transportador do tipo ABC (ATP-dependente), composto pela proteína periplasmática NasF, pela proteína integral de membrana NasE, e pela proteína NasD que é uma ATPase e está voltada para o citoplasma (LIN et al., 1994). A expressão do operon *nasFEDCBA* em *K. oxytoca* está sujeita a dois níveis de controle, o primeiro via sistema *ntr* e o segundo através da proteína NasR. Sob condições limitantes de amônio a proteína NtrC fosforilada ativa a transcrição de *nasF*, o segundo nível de controle da expressão de *nasF* se dá através da proteína NasR que se liga a grampos terminadores no RNA transcrito e atuando desta maneira como um antiterminador da transcrição, possibilitando a expressão de *nasF* em *K. oxytoca* (CHAI e STEWART, 1998; WU et al., 1999).

FIGURA 3 - ORGANIZAÇÃO DOS GENES *nas* E SUAS RESPECTIVAS PROTEÍNAS EM *K. oxytoca* e *Synechococcus sp. PCC4972*.



FONTE: MOROZKINA e ZVYAGILSKAYA, 2007.

Organização dos genes da via assimilatória de nitrato e suas respectivas proteínas em *Klebsiella oxytoca* e *Synechococcus sp. PCC7942*.

Em *Bacillus subtilis* os genes *nasBC* codificam a NADH-nitrato redutase e a proteína *NasA*, que transporta nitrato, é homóloga a *NarK*, ou seja, realiza transporte independente da hidrólise de ATP (OGAWA et al, 1995). *B. subtilis* possui apenas uma nitrito redutase e duas nitrato redutases, a assimilatória (*NasBC*) e a respiratória (*NarGHI*). Este fato possibilita a atuação conjunta das enzimas *Nar* com a NADH- nitrito redutase durante o crescimento anaeróbio (NAKANO et al., 1998).

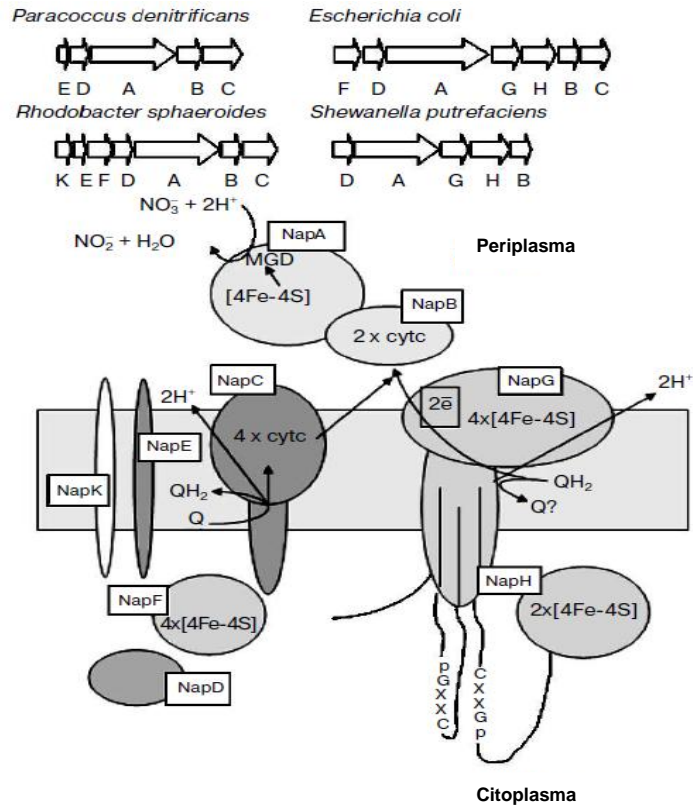
1.3.3 NITRATO REDUTASE PERIPLASMÁTICA

Verificada inicialmente na bactéria fotossintética *Rhodobacter sphaeroides*, a via dissimilatória é formada pelo complexo enzimático da nitrato redutase

periplasmática (NAP) localizado na região periplasmática. O operon *nap* possui quatro genes em comum, *napDABC* (MORENO-VIVIÁN et al., 1999).

A nitrato redutase periplasmática é encontrada em uma grande variedade de bactérias isoladas dos mais diversos ambientes, desempenhando diferentes papéis fisiológicos e sendo expressa sob diferentes condições (PHILIPPOT e HØJBERG, 1999; GAVIRA et al., 2002). Em *E. coli* o operon *napFDAGHBC* é regulado por Fnr e pela presença de nitrato. A expressão máxima do operon ocorre em baixa concentração de nitrato e sob condições anaeróbicas. A proteína NarP ativa a expressão do operon *napF* e a proteína NarL possui efeito negativo na expressão (STEWART et al., 2002). O complexo da nitrato redutase periplasmática de bactérias é composto por apenas duas subunidades, NapA e NapB (FIGURA 4). A proteína NapA forma a subunidade catalítica que possui como cofator bis-molibdopterina guanina dinucleotídeo (bis-MGD) e um cluster [4Fe-4S]. A proteína NapB é um citocromo c que recebe elétrons da proteína NapC ligada à membrana (SATO, 1981; MORENO-VIVIÁN et al., 1999). A proteína NapD é citoplasmática e provavelmente está envolvida com o processamento de NapA antes de ser exportada para o periplasma (REYES et al., 1998).

FIGURA 4 – ORGANIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS INTEGRANTES DA NITRATO REDUTASE PERIPLASMÁTICA.



FONTE: MOROZKINA e ZVYAGILSKAYA, 2009.

Organização das proteínas da via dissimilatória de nitrato codificadas por genes presentes em *E. coli*, *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides*, e *Shewanella putrefaciens*.

1.4 SISTEMA REGULADOR DE DOIS COMPONENTES

Para sobreviver a diversas variações ambientais um organismo deve possuir uma eficiente cascata de sinalização. Um sistema de monitoramento que atue como mecanismo de estímulo-resposta, o qual permita aos organismos perceber, interpretar e responder aos mais diversos estímulos, garante sua sobrevivência às variações ambientais. Este sistema de monitoramento é bastante comum em procarionotos e é conhecido como sistema de dois componentes (STOCK, ROBINSON e GOUDREAU, 2000; FOUSSARD et al., 2001; GALPERIN, 2004).

Esse sistema possui alta organização modular de seus componentes, os quais integram uma ampla variedade de circuitos de sinalização celular. Muitas proteínas transdutoras de sinal são constituídas por dois ou mais domínios, que são conservados individualmente durante a evolução, o que torna possível determinar a atividade de cada domínio de forma isolada (CHANG e STEWART, 1998; STOCK, ROBINSON e GOUDREAU, 2000; FOUSSARD et al.,2001; GALPERIN, 2004).

O sistema regulador de dois componentes é formado por duas grandes famílias de sinalizadores modulares. A proteína sensora (proteína quinase) contendo o domínio quinase conservado, e a proteína reguladora de resposta contendo o domínio regulatório conservado (CHANG, STEWART, 1998; WEST e STOCK, 2001).

A proteína sensora possui função quinase/fosfatase que comunica ao seu par regulador de resposta, através de fosforilação, a ocorrência de alguma alteração. A proteína reguladora de resposta atuará ativando ou reprimindo a transcrição de um ou mais genes, desencadeando assim uma resposta ao estímulo (STOCK, ROBINSON e GOUDREAU, 2000; WEST e STOCK, 2001).

1.4.1 PROTEÍNAS NtrBC e NtrYX

As proteínas NtrY e NtrX fazem parte de um sistema regulatório de dois componentes, no qual a proteína NtrY é a proteína sensora e NtrX é a proteína reguladora de resposta. O sistema NtrY/X foi descrito inicialmente por Pawlowski e colaboradores (1991) em *Azorhizobium caulinodans*, com o objetivo de avaliar os genes *ntrY/X* quanto a sua capacidade de utilização de nitrogênio. Os autores inocularam estirpes mutantes *ntrY/X* em meio de cultura contendo nitrato como única fonte de nitrogênio e observaram um crescimento muito reduzido das estirpes mutantes em relação à estirpe selvagem. Já a estirpe duplo mutante *nrtC/ntrY* não apresentou crescimento no meio contendo nitrato, indicando um controle parcial da expressão dos genes *ntrY/X* pela proteína NtrC. A proteína NtrX está envolvida no controle da expressão do gene *nifA* em *A. caulinodans* já que houve uma menor expressão da fusão promotor *nifA::lacZ* quando introduzida na estirpe mutante *ntrX*,

indicando que há um envolvimento do produto do gene *ntrX* no controle da expressão do gene *nifA* (PAWLOWSKI, KLOSSE e BRUIJN, 1991).

As proteínas NtrB e NtrC são membros de um sistema de dois componentes onde NtrB é a proteína histidina quinase/fosfatase (sensora) e NtrC é a proteína regulatória de resposta. Este sistema está relacionado ao metabolismo de nitrogênio e em condições limitantes de nitrogênio NtrC é ativada por fosforilação e atua como um ativador da transcrição de promotores do tipo σ^{54} . A proteína NtrC também pode atuar como repressor da transcrição de promotores do tipo σ^{70} visto que a sequência consenso de ligação de NtrC ao DNA é sobreposta aos sítios de início de transcrição de promotores σ^{70} (DIXON, 1984, REITZER e MAGASANIK, 1985).

Mutantes *ntrBC* de *Azospirillum brasilense* são incapazes de crescer na presença de nitrato. A complementação destes mutantes com os genes *ntrYX* sugere que possa existir uma substituição entre os pares *ntrYX* e *ntrBC* em relação ao crescimento na presença de nitrato. Em *A. brasilense* a proteína NtrX não teve efeito sobre a expressão da fusão do promotor *nifA::lacZ*, indicando que, ao contrário do observado em *A. caulinodans*, as proteínas NtrY/X não estão envolvidas na expressão do gene *nifA* em *A. brasilense*. (ISHIDA et al., 2002).

A proteína sensora quinase NtrB de *Rhodobacter capsulatus* pode ativar por fosforilação a proteína de resposta NtrC, a qual regula os genes envolvidos na fixação e assimilação de nitrogênio e também regula os genes responsáveis pela utilização de uréia. Já que a estirpe mutante *ntrB* apresentou crescimento na presença de uréia e N₂ como única fonte de nitrogênio, e a estirpe duplo mutante *ntrB/ntrY* não foi capaz de crescer na presença destes compostos (DREPPER et al., 2006).

1.5 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é um organismo diazotrófico gram-negativo, pertencente à classe β das Proteobactérias, geralmente vibrióide podendo apresentar formas helicoidais dependendo das condições de crescimento. Seu

tamanho varia de 1,5 a 5 µm e pode apresentar de um a três flagelos bipolares. Este organismo fixa nitrogênio atmosférico sob condições microaeróbicas e cresce bem com dinitrogênio com única fonte de nitrogênio. Utiliza ácidos orgânicos como principal fonte de carbono, embora possa utilizar alguns carboidratos como glucose, galactose e arabinose, enquanto que a sacarose não pode ser metabolizada. Seu pH de crescimento é bastante amplo (5,3 a 8,0) e sua temperatura ótima de crescimento se situa entre os 35°C (BALDANI et al., 1986; FU e BURRIS, 1989; KLASSEN et al., 1997).

H. seropedicae foi primeiramente descrito como uma nova espécie de *Azospirillum* (BALDANI et al., 1984) por formar uma película em meio semi sólido livre de nitrogênio (BALDANI et al., 1986). Entretanto estudos de hibridização rRNA/DNA revelaram apenas 9 a 22% de homologia com outras espécies de *Azospirillum* (*A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*) (FALK et al., 1986).

H. seropedicae foi isolado de raízes de cereais e gramíneas, e do interior de folhas e caules de cana-de-açúcar e arroz (BALDANI et al., 1986; 1992). Ao contrário do observado em *Azospirillum brasilense*, *H. seropedicae* não sobrevive em solos isentos de raízes, sugerindo um caráter endofítico obrigatório deste organismo (BALDANI et al., 1992). Um dos benefícios da sua associação com plantas é o favorecimento do crescimento vegetal, observado pela avaliação do peso seco de plantas de arroz, inoculadas e não inoculadas com *H. seropedicae*, onde as plantas inoculadas apresentaram maior peso seco do que as não inoculadas, evidenciando vantagens na interação da bactéria com a planta (DÖBEREINER et al., 1992; RONCATTO-MACARI et al., 2003).

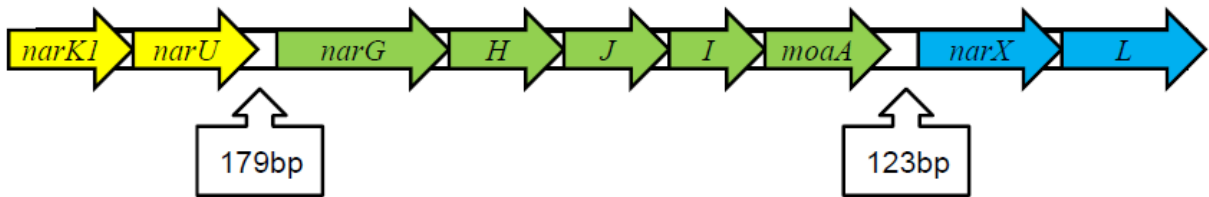
1.5.1 METABOLISMO DE NITRATO EM *Herbaspirillum seropedicae*

A estirpe parental (SmR1) de *H. seropedicae* é capaz de utilizar nitrato como única fonte de nitrogênio porém, as estirpes mutantes DCP286A (*ntrC*) e A01 (*ntrY*) não apresentam crescimento em nitrato. O que sugere a participação destes genes no metabolismo de nitrato em *H. seropedicae* (PERSUHN, 2000; ALVES, 2004).

H. seropedicae possui em seu genoma os genes *nar* que codificam as proteínas integrantes da via da nitrato redutase respiratória. Os genes que codificam para as proteínas transportadoras NarK1 e NarU se localizam a montante dos genes estruturais da enzima NarGHJI e um segundo gene *narK* se encontra a montante dos genes que codificam uma possível enzima nitrito redutase (*nirBDC*). *H. seropedicae* ainda apresenta os genes *narXL*, cujos produtos são as proteínas do sistema de dois componentes responsável pelo sensoriamento de nitrato e nitrito. A figura 5 mostra como os genes *nar* estão organizados em *H. seropedicae*. Os genes do sistema de dois componentes *narPQ* estão ausentes em *H. seropedicae* (ALVES, 2006, GENOPAR).

Em estudo utilizando as fusões *narX::lacZ* e *narK::lacZ* avaliou-se a expressão do sistema de dois componentes *narX*, e do gene que codifica para o transportador NarK. Os resultados obtidos demonstram que a expressão do gene *narX* de *H. seropedicae* foi cerca de três vezes maior na estirpe selvagem (SmR1) em relação às estirpes mutantes DCP286A (*ntrC*) e A01 (*ntrY*), e que a expressão não é dependente da presença de molibdênio e oxigênio. A expressão observada nas estirpes mutantes de *H. seropedicae* indica que, além das proteínas NtrC e NtrY uma outra proteína é requerida para total expressão do gene *narX* em *H. seropedicae* (ALVES, 2006). Na análise de expressão da fusão *narK::lacZ* os resultados obtidos indicaram uma expressão duas vezes maior da estirpe selvagem (SmR1) em relação à estirpe mutante DCP286A (*ntrC*), e ausência de expressão na estirpe mutante A01 (*ntrY*). A expressão máxima da fusão *narK::lacZ* foi observada para a estirpe SmR1, na presença de molibdênio e em condição de microaerofilia.

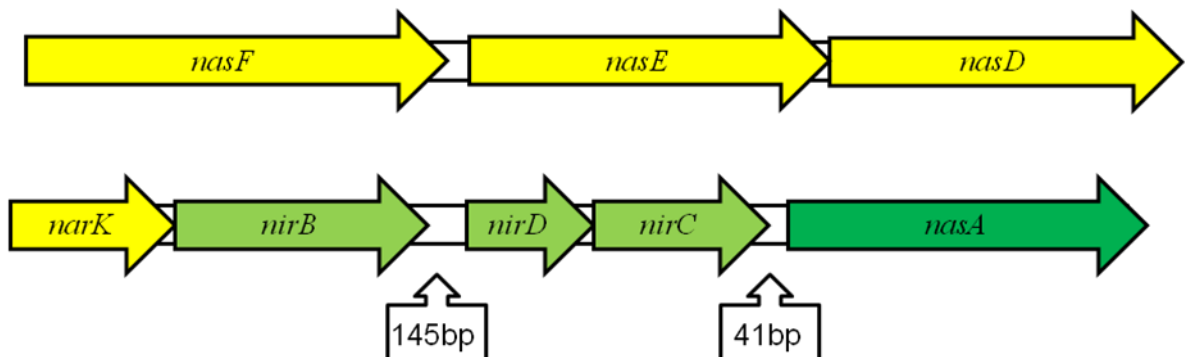
FIGURA 5 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES *nar* EM *H. seropedicae*.



Distribuição dos genes *nar* no genoma de *H. seropedicae*. Em amarelo os genes que codificam para os transportadores NarK e NarU, em verde os genes que codificam a nitrato redutase respiratória NarGHJI e em azul os genes dos sistema de dois componente *narXL*. As caixas em preto indicam quantos pares de base separam os genes.

H. seropedicae também possui os genes *nasFED*, que codificam para um transportador do tipo ABC, e o gene *nasA* que codifica para a enzima NADH-nitrato redutase assimilatória. O gene *nasA* de *H. seropedicae* se situa a jusante dos genes estruturais da nitrito redutase (*nirBDC*), formando o operon *narKnirBDCnasA* representado na figura 6. Diferentemente do observado em *K. oxytoca*, onde o gene *nasR* está próximo do operon *nasFED*, o gene *nasR* de *H. seropedicae* se encontra a uma distância de 3.741Kb a jusante do operon *nasFED* (GENOPAR).

FIGURA 6 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES *nas* EM *H. seropedicae*.



Organização dos genes *nas* em *H. seropedicae*. Em amarelo são representados os genes que codificam os transportadores NasFED e NarK, em verde claro os dois genes que codificam a nitrito redutase NirBDC, e em verde escuro nitrato redutase assimilatória NasA.

Em *H. seropedicae* os genes que codificam as proteínas pertencentes à via dissimilatória de nitrato estão ausentes (GENOPAR).

1.5.2 PROTEÍNAS NtrBC E NtrXY DE *Herbaspirillum seropedicae*

Em *H. seropedicae* a proteína NtrC controla a expressão do gene *nifA*, relacionado à fixação de nitrogênio, e também do operon *glnAntrBC*. A expressão de *glnA* está sujeita ao controle pela presença de amônio via promotor σ^{70} , e em condições limitantes de nitrogênio sua transcrição é ativada pela proteína NtrC fosforilada. Esta regulação se deve ao fato de existir uma sobreposição do sítio de ligação da proteína NtrC e do promotor σ^{70} . A enzima glutamina sintetase, produto do gene *glnA*, tem sua atividade influenciada pela proteína NtrC, dado que na estirpe mutante DCP286A foi constatada deficiência no sistema de desadenilação/adenilação desta enzima (PERSUHN, 2000 e 2001).

Em *H. seropedicae* o operon *ntrYX* foi identificado durante o projeto GENOPAR (Programa Genoma do Paraná). As análises das seqüências de DNA demonstraram que os genes *ntrYX* estão localizados a jusante do gene *sun*, que codifica uma possível RNA metil transferase, e da *orfP*, que codifica um peptídeo rico em prolina com função ainda desconhecida (ALVES, 2004). A análise das regiões promotoras do gene *sun* e da região codificadora da *orfP* revelaram uma provável região promotora dependente do fator σ^{70} da RNA polimerase a montante do gene *sun*, e três prováveis sítios de ligação para proteína NtrC e duas prováveis regiões promotoras dependentes do fator σ^{54} da RNA polimerase na região codificadora da *orfP*. Análises sugerem que o gene *sun* é expresso constitutivamente e que sua região promotora influencia na expressão dos genes *ntrYX*. No entanto, as análises utilizando a região codificadora da *orfP* no mutante DCP286A (NtrC⁻) revelaram uma expressão 2,5 vezes menor do que na estirpe selvagem (SmR1). Sugerindo que a região promotora dos genes *ntrYX* de *H. seropedicae* está na região codificadora da *orfP* (ALVES, 2006).

Ensaio de redução com acetileno demonstraram que o gene *ntrY* não está envolvido com a fixação de nitrogênio em *H. seropedicae*, pois os valores de atividade de nitrogenase na estirpe mutante A01 (*ntrY*) foram similares aos valores de atividade na estirpe selvagem (ALVES, 2006).

O mutante *ntrY* de *H. seropedicae* foi analisado quanto à capacidade de utilizar nitrato como única fonte de nitrogênio e não apresentou crescimento. O fenótipo mutante foi complementado pela cópia selvagem dos genes *ntrYX*, indicando um possível envolvimento de tais genes no metabolismo de nitrato (ALVES, 2006).

A proteína ^{his}-NtrX de *H. seropedicae* foi superexpressa, purificada e foi capaz de se ligar à região promotora dos operons *narXL*, *narK1KGHJInasA* e *narKnirBDC* de forma específica, uma vez que as concentrações crescentes de DNA de timo bovino não interferiram na formação do complexo DNA-proteína (OSAKI, 2008). A formação deste complexo DNA-proteína é independente da fosforilação de ^{his}-NtrX, o que ocorre também com a proteína NtrC de *H. seropedicae*, a qual é capaz de se ligar a região promotora do gene *glnA* independentemente de fosforilação (TWERDOCHLIB et al., 2003).

Em *E. coli* o sistema NarXL é responsável pela detecção de nitrato e nitrito no ambiente, onde NarX atua como proteína sensora e NarL como proteína de resposta. Os genes *narXL* de *H. seropedicae* se encontram a jusante dos genes que codificam para a nitrato redutase respiratória *narGHJI*. A análise da fusão *narX::lacZ* demonstrou que a expressão do gene *narX* nas estirpes mutante A01 (*ntrY*) e DCP286A (*ntrC*) de *H. seropedicae* foi três vezes menor quando comparada à estirpe selvagem (SmR1). A expressão observada nas estirpes mutantes de *H. seropedicae* sugere que a expressão do sistema *narXL* é dependente dos sistemas NtrBC e NtrYX, mas também pode estar sob influência de NarL. Sofrendo assim uma auto-regulação como a observada em *E. coli* (STEWART e PARALES, 1988; DARWIN e STEWART, 1995; ALVES, 2006).

A estirpe mutante LT78 (*narL*⁻) de *H. seropedicae* cresce de maneira similar à estirpe selvagem (SmR1) em meio contendo amônio como fonte de nitrogênio, entretanto, quando se utiliza nitrato como fonte de nitrogênio o crescimento da estirpe mutante é duas vezes menor que a estirpe SmR1, assim como a atividade de nitrato redutase. A estirpe *narL*⁻ não apresentou diferenças na atividade de nitrogenase em relação à estirpe selvagem. Este resultado indica que o gene *narL* está envolvido na regulação da expressão dos genes relacionados com o metabolismo de nitrato, mas não com os genes envolvidos na fixação de nitrogênio e na assimilação de amônio em *H. seropedicae* (OLIVEIRA, 2008).

A expressão da região promotora do operon *narKnirBDCnasA* de *H. seropedicae*, o qual codifica para a proteína transportadora de nitrato NarK e para o complexo enzimático da nitrito redutase respiratória, também foi testada no mutante *ntrY* na presença de nitrato e nitrito. Não houve expressão desta fusão *narK::lacZ*, indicando que o gene *ntrY* é essencial para expressão do operon em questão. Já na estirpe selvagem a fusão apresentou expressão máxima na presença de nitrato, molibdênio e em microaerofilia. A expressão de *narK::lacZ*, na estirpe selvagem, em presença de nitrito foi de 1,5 vezes menor em comparação com a expressão observada na presença de nitrato. Já na estirpe mutante *ntrC* a expressão da fusão *narK::lacZ* foi duas vezes menor que a observada na estirpe selvagem, indicando uma provável ligação da proteína NtrC com a regulação da expressão deste gene em *H. seropedicae* (ALVES, 2006).

A região promotora dos genes *nasFED* de *H. seropedicae*, envolvidos na via de assimilação de nitrato foi analisada e não houve a expressão da fusão do promotor *nasF::lacZ* na estirpe mutante *ntrY* na presença de nitrato e a expressão no mutante *ntrC* foi seis vezes em relação à estirpe selvagem, indicando o envolvimento de *ntrC* e de *ntrY* na regulação de *nasFED*. (ALVES, 2006).

1.6 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

O desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) por Kary Mullis e colaboradores revolucionou os estudos de ácidos nucléicos. Apesar de revolucionária, a técnica de PCR convencional possui limitações significativas. A técnica depende da amplificação de sequências de DNA e um processamento pós-PCR para análise e quantificação dos produtos gerados. Os métodos de densitometria em gel de agarose tornam a quantificação dos produtos imprecisa pelo fato de separar os produtos gerados somente baseado em seu tamanho o que pode gerar dados que não são confiáveis dada a baixa resolução dos géis de agarose (KUBISTA et al., 2006).

A técnica de PCR convencional foi aprimorada e a nova metodologia proposta se baseia na detecção dos produtos de PCR à medida que a amplificação ocorre. A técnica de PCR quantitativo em tempo real foi proposta por Higuchi e colaboradores (1990) onde uma câmera capaz de detectar a fluorescência emitida pelo intercalante brometo de etídio permitiu o acompanhamento do progresso da amplificação ciclo a ciclo (em tempo real). Esta diferença eliminou a necessidade do processamento pós-PCR, uma das maiores limitações do PCR convencional (HIGUCHI et al., 1992; KUBISTA, 2006).

Com o desenvolvimento e evolução do método de PCR quantitativo em tempo real, diversas áreas da ciência foram beneficiadas e este método vem sendo largamente utilizado para detecção de patógenos, análise de expressão gênica, polimorfismos de um único nucleotídeo, genotipagem, avaliação da eficiência terapêutica de drogas, entre outras aplicações. A técnica se baseia no monitoramento da fluorescência de um repórter conforme a amplificação ocorre. O repórter fluorescente pode ser um intercalante de duplas fita, ou sondas específicas que atuam com os oligonucleotídeos iniciadores, e sua fluorescência é proporcional à quantidade de produto de PCR na reação. O que permite o acompanhamento do acúmulo de produtos de PCR em tempo real (HEID, 1996; KUBISTA, 2006). A possibilidade de acompanhar a amplificação do DNA em tempo real na fase exponencial torna a PCR em tempo real uma técnica mais eficiente, precisa e rápida que a PCR convencional (KUBISTA, 2006).

Variações na expressão gênica de um organismo ocorrem de acordo com suas necessidades fisiológicas e estão relacionadas com sua adaptação ao ambiente, diferenciação celular e condição de crescimento. A técnica de PCR em tempo real é o que existe de mais moderno na detecção dessas variações, pois permite que pequenas diferenças na expressão sejam evidenciadas possibilitando assim a quantificação precisa do nível de transcrição de genes específicos. A metodologia de quantificação relativa é baseada na expressão de um gene constitutivo (controle endógeno) e de uma condição controle. O gene escolhido como controle endógeno tem função de normalizar a expressão gênica e é um gene que possui expressão constitutiva. A condição controle pode ser uma amostra não tratada, indivíduos saudáveis ou uma amostra do ponto zero de análise. A quantificação será relativa à expressão do gene alvo na condição controle e será normalizada pela expressão do controle endógeno, garantindo assim um resultado preciso de quantificação (PFAFFL, 2006)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho realizado foi determinar os níveis de expressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrato em *Herbaspirillum seropedicae*, em diferentes condições de crescimento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar e purificar RNA total das estirpes SmR1 (selvagem) e DCP286A (*ntrC*).

Quantificar os níveis de expressão dos genes *narK*, *narU*, *narG*, *narR*, *narX*, *nasA*, *nasF*, *nirD* e *ntrY* nas diferentes estirpes de *Herbaspirillum seropedicae*, utilizando transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia quantitativa (RT-qPCR).

Construir um modelo de regulação da expressão dos genes do metabolismo de nitrato de *Herbaspirillum seropedicae*.

3 JUSTIFICATIVA

O estudo da regulação das vias metabólicas da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* contribui para um melhor entendimento bioquímico e fisiológico deste microrganismo. Este conhecimento é essencial para utilização do seu potencial como biofertilizante. A utilização desta bactéria como inoculante para importantes culturas de interesse comercial, como milho, arroz e cana-de-açúcar, pode gerar benefícios na agricultura, dispensando parcialmente o uso de fertilizantes nitrogenados, o que resulta em economia para produtores e benefícios para o meio ambiente.

A regulação das vias do metabolismo de nitrato em *Herbaspirillum seropedicae* ainda não está completamente elucidada. O presente projeto contribuirá para esclarecer o modo de regulação de um conjunto de genes envolvidos no transporte e metabolismo de nitrato nesta bactéria. Para isto será utilizada quantificação direta de mRNA dos genes de interesse por RT-qPCR a partir de RNA total da bactéria sob diversas condições de crescimento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 BACTÉRIAS UTILIZADAS

As bactérias utilizadas durante a pesquisa estão descritas na Tabela 1.

Tabela1 – Bactérias Utilizadas

BACTÉRIA	ESTIRPE	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	SmR1	Selvagem, Nif ⁺ , Sm ^R	PEDROSA et al., 1997
	DCP286A	Sm ^R , Km ^R , NtrC ⁻	PERSUHN, 2000

4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio líquido NFbHP utilizando malato como fonte de carbono (KLASSEN et al., 1997) com 50mL/L de solução estéril de fosfatos (159,4g/L de KH₂PO₄ e 17,8g/L de K₂HPO₄), a 30°C, sob agitação de 120 rpm. Utilizando com fonte de nitrogênio cloreto de amônio (NH₄Cl) 20mM ou nitrato de potássio (KNO₃) 10mM. As soluções de fosfatos, cloreto de amônio e nitrato de potássio foram previamente autoclavadas e adicionadas ao meio de cultura no momento do uso. Os meios sólidos e semi-sólidos foram obtidos pela adição de ágar ao meio NFbHP líquido nas concentrações de 15g/L e 1,5g/L respectivamente. Os inóculos em meio sólido e semi-sólido foram incubados em estufa a 30°C.

4.3 ANTIBIÓTICOS

As soluções de antibióticos foram preparadas conforme descrito por SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989). As soluções estoque de estreptomicina (Sm) e canamicina (Km) foram preparadas em 80 e 100mg/mL respectivamente e

armazenadas a -20°C. Os antibióticos serão adicionados aos meios de cultura no momento do uso. Para seleção de *H. seropedicae* serão adicionados ao meio: estreptomicina a 80µg/mL de concentração final, e canamicina a 500µg/mL de concentração final, de acordo com a estirpe utilizada.

4.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Para extração de RNA total da estirpe selvagem (SmR1) de *H. seropedicae* foi realizada a partir de duas culturas distintas em meio NFbHP líquido utilizando malato como fonte de carbono e como fontes de nitrogênio cloreto de amônio e nitrato de potássio. As culturas foram incubadas em shaker a 30°C e 120 rpm e o crescimento foi monitorado através da leitura espectrofotométrica de sua densidade ótica (D.O.) em 600 nm. As células foram coletadas, por centrifugação a 14500 rpm por um minuto, quando as culturas atingiram D.O. de aproximadamente 0,5 e 1,0 respectivamente. O RNA total foi extraído após coleta das células da cultura líquida utilizando o RiboPure Bacteria kit (Applied Biosystems®), conforme as instruções do fabricante, e o volume de cultura utilizado foi de 4,5mL para D.O. de 0,5 e de 3,0mL para D.O. de 1,0.

Para extração de RNA total das estirpes selvagem (SmR1) e mutante (DCP286A) de *H. seropedicae* foi utilizada uma abordagem diferente visto que os mutantes são incapazes de crescer em nitrato como fonte de nitrogênio. Para esta situação as diferentes estirpes (selvagem e mutante) foram crescidas em meio NFbHP líquido, utilizando malato como fonte de carbono e cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, até uma D.O. de aproximadamente 1,0. Após o crescimento as células foram coletadas por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos e ressuspensas para uma D.O. de aproximadamente 0,3 em meio NFbHP. As novas culturas obtidas, agora em D.O. de aproximadamente 0,3 foram fracionadas em duas alíquotas diferentes utilizando cloreto de amônio e nitrato de potássio como fontes de nitrogênio, resultando em duas diferentes culturas para cada estirpe inicialmente cultivada. Todas as alíquotas obtidas foram incubadas em shaker a 30°C e 120 rpm por 06 horas e o RNA total foi extraído utilizando o RiboPure Bacteria kit conforme as instruções do fabricante.

A quantidade de RNA total de todas as extrações foi verificada através do NanoDrop 2000 THERMO Scientifics. A qualidade do RNA extraído foi avaliada através da relação de leitura espectrofotométrica fornecida pelo aparelho de 260/280nm para determinar presença de proteínas, e de 230/260nm para avaliar presença de fenol nas amostras. A qualidade do RNA total das amostras também foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose conforme o item 4.5 desta dissertação.

4.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A eletroforese foi realizada em gel de agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989).

O RNA total extraído foi visualizado após tratamento com solução de brometo de etídeo (0,5µg/mL), em transiluminador de luz ultravioleta. O perfil eletroforético foi registrado utilizando o sistema UVP.

4.6 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Primeiramente alíquotas de RNA total, previamente extraídas e quantificadas, foram submetidas à transcrição reversa utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems®) de acordo com as especificações do fabricante.

As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems®), utilizando o cDNA obtido da transcrição reversa como molde e o corante SYBR® Green para detecção de DNA dupla-fita em tempo real. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados (Tabela 2) foram desenvolvidos através do software Primer Express 3.0 de acordo com as seqüências dos genes de *H. seropedicae* obtidas através do GENOPAR.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para experimentos de RT-qPCR

		T _m (°C)	Amplicon (pb)
<i>16S</i>	Forward 5'TGTCAGGGAAGAAACGGTTTTG 3'	55,7	73
	Reverse 5'AGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCA 3'	56,3	
<i>narU</i>	Forward 5'TTTCATCTGGGTCCCCTTCA 3'	55,9	75
	Reverse 5'GTGTGCGGAGGCGATGTC 3'	59,2	
<i>narK</i>	Forward 5'CGTGTGGATGCTCTTCATTACCTA 3'	56,5	74
	Reverse 5'CGTAGTAGATGGCAGCGATGTT 3'	56,9	
<i>narG</i>	Forward 5'AAGTCGGGCGCTGTCAAC 3'	58,5	75
	Reverse 5'GGAACGCCAGACGAACAT 3'	56,5	
<i>narX</i>	Forward 5'GTCCAACATCCGCAAGCAT 3'	56,1	74
	Reverse 5'TCGTCGGACACGGTCATG 3'	57,3	
<i>nasA</i>	Forward 5'ACAATTGCTGACCGAGGACTACTA 3'	57,5	76
	Reverse 5'CGTGAATTGGTGTGCGATGTTG 3'	54,5	
<i>nasF</i>	Forward 5'CCGACAAGCGCGAATACAC 3'	56,7	74
	Reverse 5'CCAGCCAGTAATACAGCCACATC 3'	57,7	
<i>nasR</i>	Forward 5'AAGCAGGGCTTGAACGAAGA 3'	57,0	73
	Reverse 5'GGCAATACGCCGGTTCTG 3'	56,7	
<i>nirD</i>	Forward 5'TCGGCAACCTGGGTGAAC 3'	58,1	75
	Reverse 5'GTTGGCGGGCTCTTCCA 3'	58,4	
<i>ntrY</i>	Forward 5'GCGCCTTCGAACCCTATGT 3'	57,7	73
	Reverse 5'TCTTCGACGATTTTCACCAT 3'	54,4	

A metodologia de quantificação empregada foi a de quantificação relativa, onde a expressão dos genes alvo é dada em função da sua expressão em uma condição controle. Os genes *narK*, *narU*, *narG*, *narX*, *nasA*, *nasF*, *nasR*, *nirD* e *ntrY* tiveram sua expressão relativa à condição de crescimento que utilizava cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, a fim de determinar quantas vezes os genes foram expressos nas demais condições de cultivo. O rRNA 16S foi utilizado como controle endógeno, normalizando os níveis de expressão dos diferentes genes analisados.

As reações de quantificação foram realizadas em placas de 96 poços, utilizando 1µL de cDNA como template, 1µL de água Milli-Q autoclavada, 1µL de uma solução contendo 10pmol/µL de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, e 3µL de Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]).

4.7 DOSAGEM DE NITRITO

A determinação da concentração de nitrito no sobrenadante de culturas líquidas de *H. seropedicae* SmR1 em meio NFbHP contendo nitrato de sódio 10mM foi realizada segundo NEYRA et al. (1977). As culturas foram centrifugadas a 13000 rpm e alíquotas de 0,2mL do sobrenadante foram adicionadas a 2,0mL de uma solução 1:1 (v/v) de N-1-naftil-etilenodiamino dicloreto 0,02% e sulfanilamida a 1% em HCl 3N, misturados no momento do uso. As amostras foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm e a concentração de nitrito foi determinada utilizando nitrito de potássio (KNO_2) como padrão.

4.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976) usando albumina de soro bovino como padrão. As determinações de proteínas em cultura líquida de células foram feitas em densidades óticas de 0,5 e de 1,0; após a lise alcalina em NaOH 0,2 mol/L e incubação por pelo menos uma hora a temperatura ambiente.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

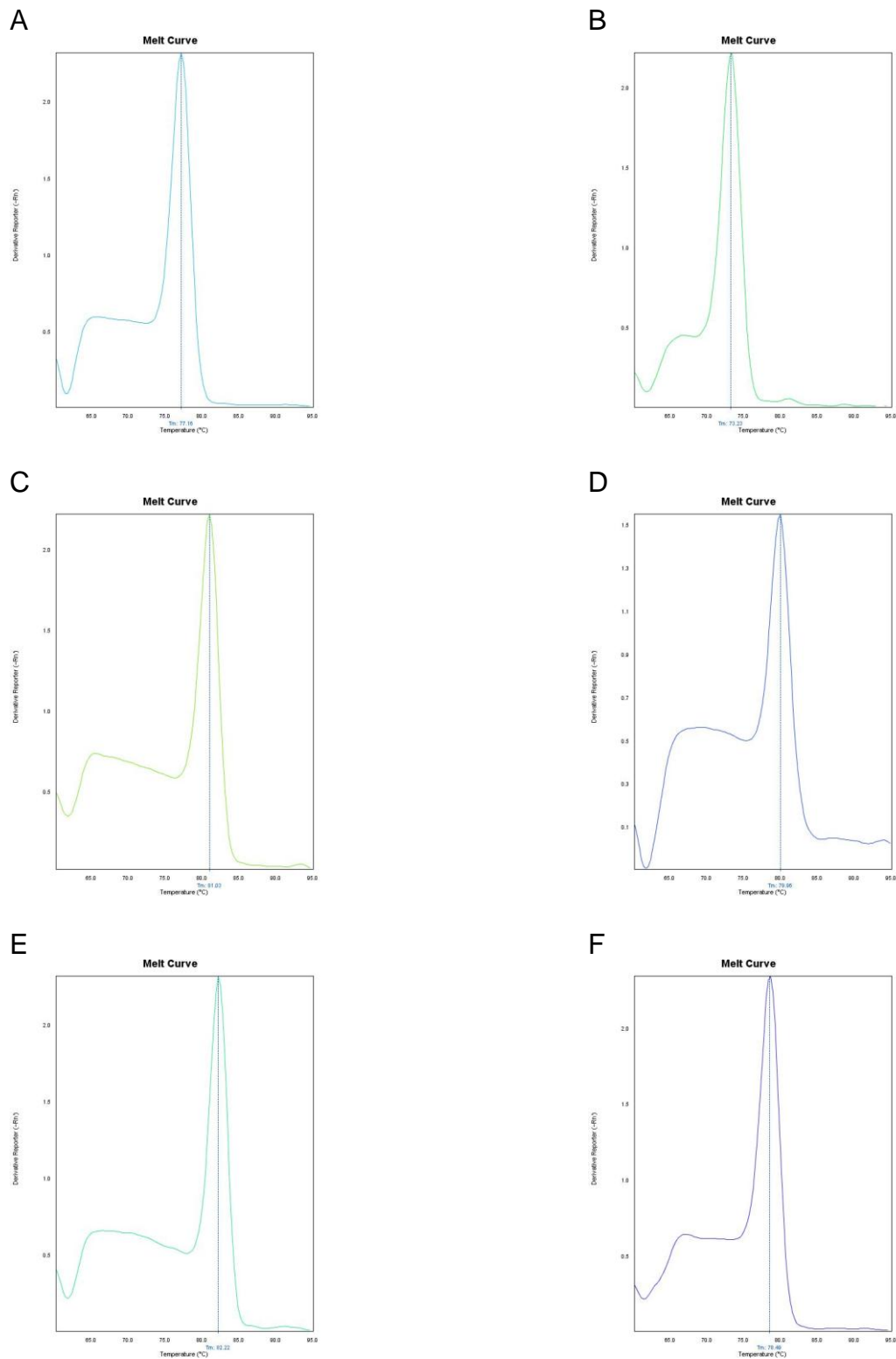
5.1 ENSAIO DE EFICIÊNCIA DE PRIMERS E DE DISSOCIAÇÃO

A quantificação da expressão dos genes alvo *narK*, *narU*, *narG*, *narR*, *narX*, *nasA*, *nasF*, *nirD* e *ntrY*, e do controle endógeno *rRNA 16S*, utilizando agente intercalante SYBR Green® para detecção da fluorescência gerada durante a amplificação, exige ensaio de eficiência da reação de PCR em tempo real. O algoritmo utilizado para quantificação gênica dos alvos ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) assume que a eficiência da reação de PCR em tempo real é de 100%, por esse motivo a eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados deve ser testada a fim de evitar que uma reação com eficiência baixa seja considerada como tendo eficiência de 100% e por consequência comprometa a qualidade dos resultados gerados pela análise.

Os ensaios de eficiência foram realizados utilizando cinco diluições seriadas de cDNA, com fator de diluição igual a 10, para determinação da fluorescência gerada durante a amplificação. Uma reação com eficiência de aproximadamente 100% deve obter resultados proporcionais a quantidade de cDNA molde utilizada. Os ensaios de eficiência de primers utilizando diluições seriadas de cDNA demonstraram um valor de aproximadamente 100% para todos os alvos utilizados, indicando que não precisam de nenhuma correção nos cálculos de expressão gerados pelo equipamento.

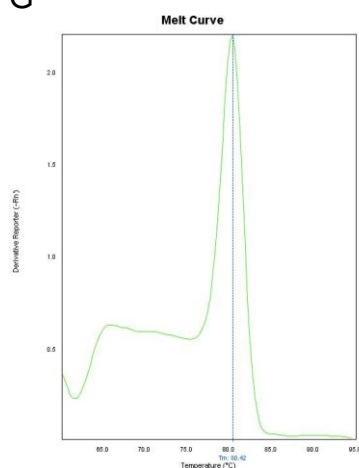
Visto que o intercalante SYBR Green emite fluorescência para todo o produto dupla-fita presente nas amostras, é necessário que se garanta a presença somente de um produto de PCR e a ausência de dímeros de oligonucleotídeos iniciadores. A presença de dímeros de iniciadores e produtos inespecíficos de PCR gera aumento na fluorescência, o que pode comprometer a confiabilidade dos resultados obtidos. Ao final dos ensaios de quantificação relativa foram produzidas curvas (FIGURA 7) de dissociação a fim de avaliar a presença de produtos inespecíficos e de dímeros de oligonucleotídeos iniciadores. O equipamento produz um aumento gradativo da temperatura enquanto monitora a diminuição da fluorescência, as curvas geradas são resultado da derivação da fluorescência conforme ocorre o aumento na temperatura.

FIGURA 7 – CURVAS DE DISSOCIAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PRODUTOS INESPECÍFICOS

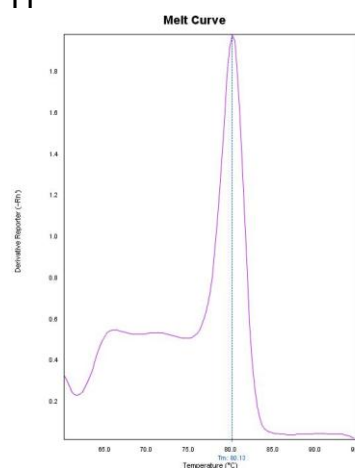


continua

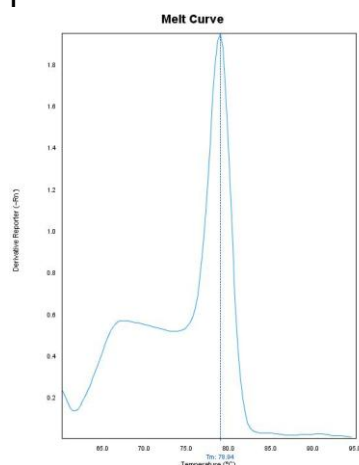
G



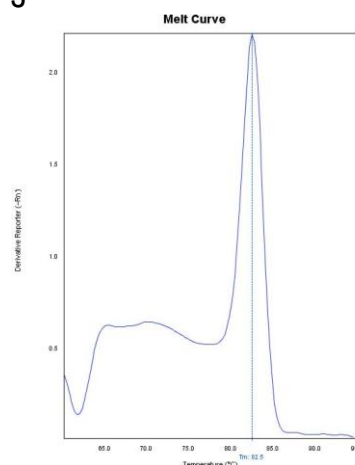
H



I



J



Curvas de dissociação geradas para verificação da presença de dímeros e produtos inespecíficos. A *16S*; B *narK*; C *narU*; D *narG*; E *nasA*; F *nirD*; G *nasF*; H *nasF*; I *narX*; J *ntrY*.

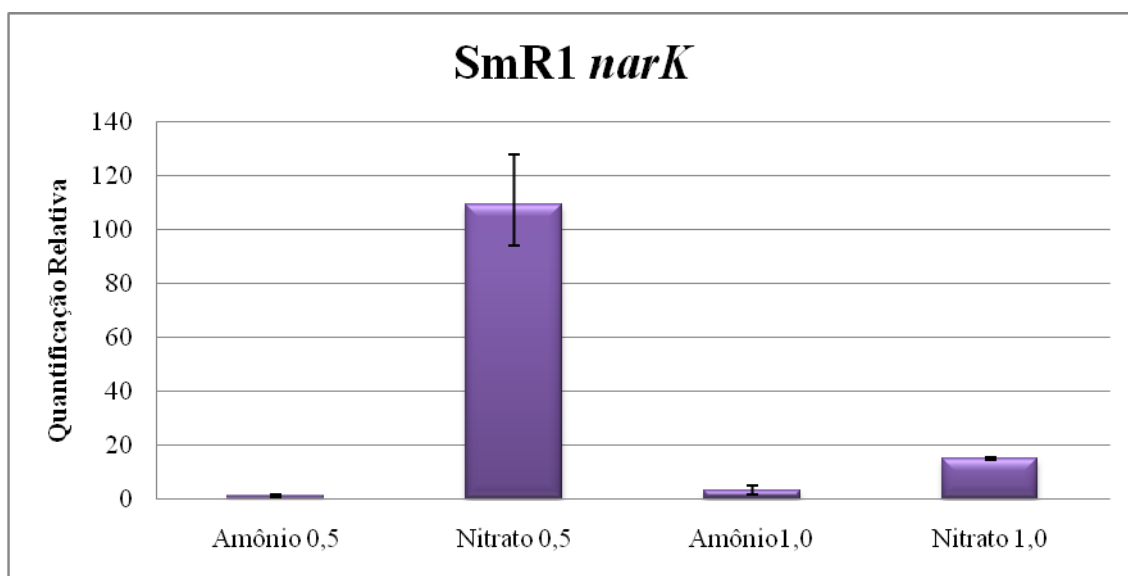
5.2 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES *narK*, *nirD* e *nasA* de *H. seropedicae*

A análise da região do genoma de *H. seropedicae* que contém os genes *narK*, *nirD* e *nasA* mostra que estes genes estão organizados na forma *narKnirBDCnasA*. A quantificação da expressão dos genes *narK*, *nirD* e *nasA* foi motivada pela presença de uma região intergênica entre a *orf 2895* e *narK*, entre *nirB* e *nirD* e entre *nirC* e *nasA*, pois é estas regiões poderiam conter os possíveis promotores para expressão de *narKnirBDCnasA*.

Os níveis de expressão obtidos para o gene *narK* (FIGURA 8) na estirpe SmR1 demonstram que sua expressão é altamente induzida por nitrato quando em

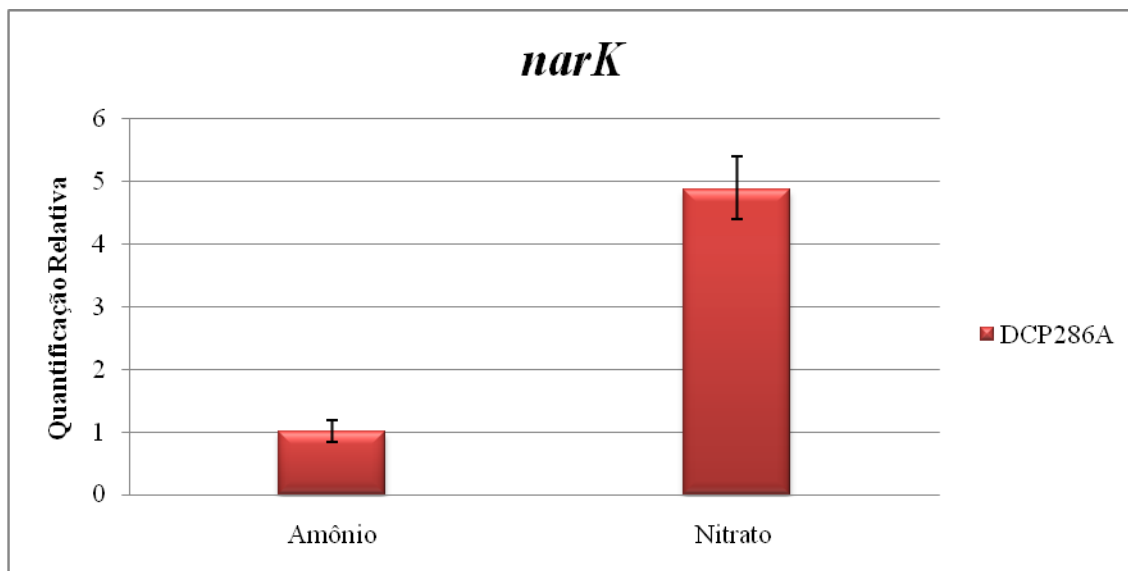
D.O. de 0,5 porém, quando em D.O. de 1,0 a expressão do gene *narK* cai drasticamente. Na estirpe DCP286A verificou-se uma expressão diminuída do gene *narK* (FIGURA 9) quando as células foram induzidas com nitrato de potássio.

FIGURA 8 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *narK* NA ESTIRPE SmR1 DE *H. seropedicae*.



Expressão relativa do gene *narK* da estirpe SmR1 *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia em D.O. de 0,5. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

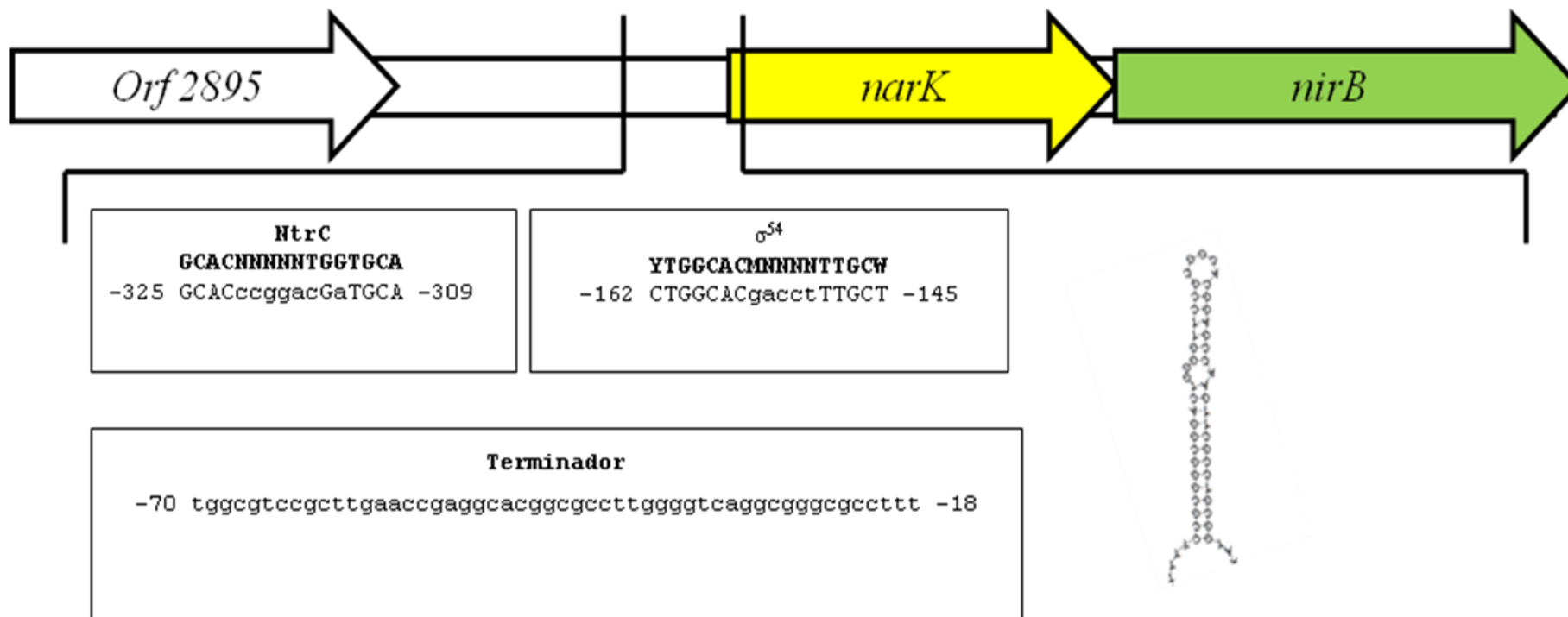
FIGURA 9 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *narK* NA ESTIRPE DCP286A DE *H. seropedicae*.



Expressão relativa do gene *narK* da estirpe DCP286A de *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia na estirpe SmR1 e normalizando os níveis de expressão em amônio para 1,0. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

A busca por possíveis promotores foi realizada na região que compreende os 150pb finais da *Orf 2895* e os 348pb da região intergênica entre a *Orf 2895* e *narK*. A análise revelou, na região intergênica, a presença de um provável sítio de ligação para a proteína NtrC, um provável sítio promotor dependente de σ^{54} e de um possível grampo terminador (FIGURA 10).

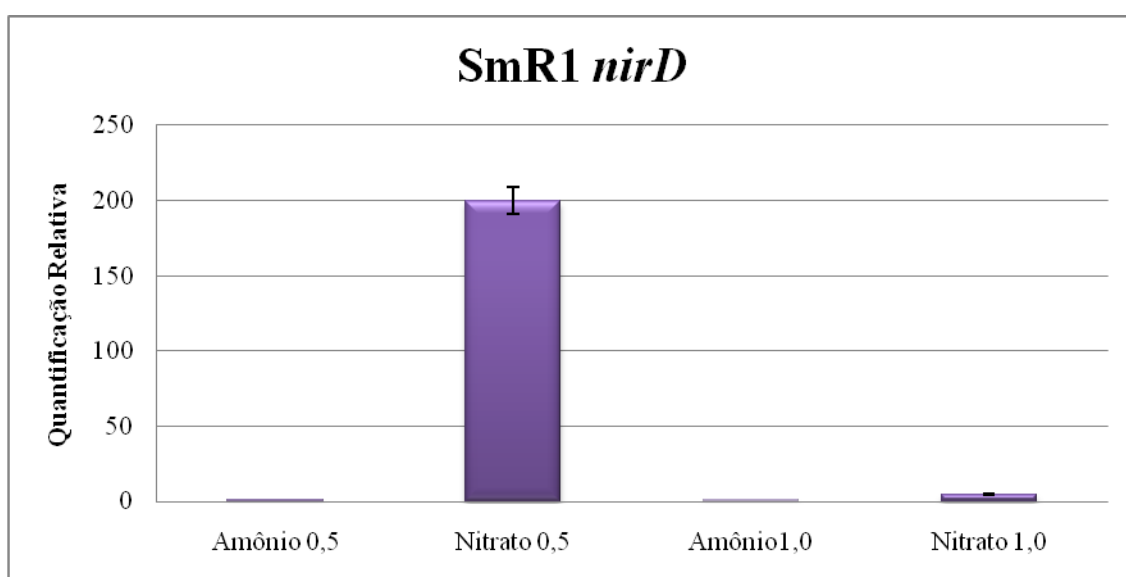
FIGURA 10 – REGIÃO DO GENOMA QUE CONTÉM O GENE *narK* DE *H. seropedicae* E SUA PROVÁVEL REGIÃO PROMOTORA.



Análise da região promotora do gene *narK*. As caixas de texto indicam os sítios encontrados e suas posições em relação ao códon de início de transcrição ATG do gene *narK*. Em negrito são indicadas as sequências consenso e os nucleotídeos marcados com letras maiúsculas representam bases idênticas às da sequência consenso.

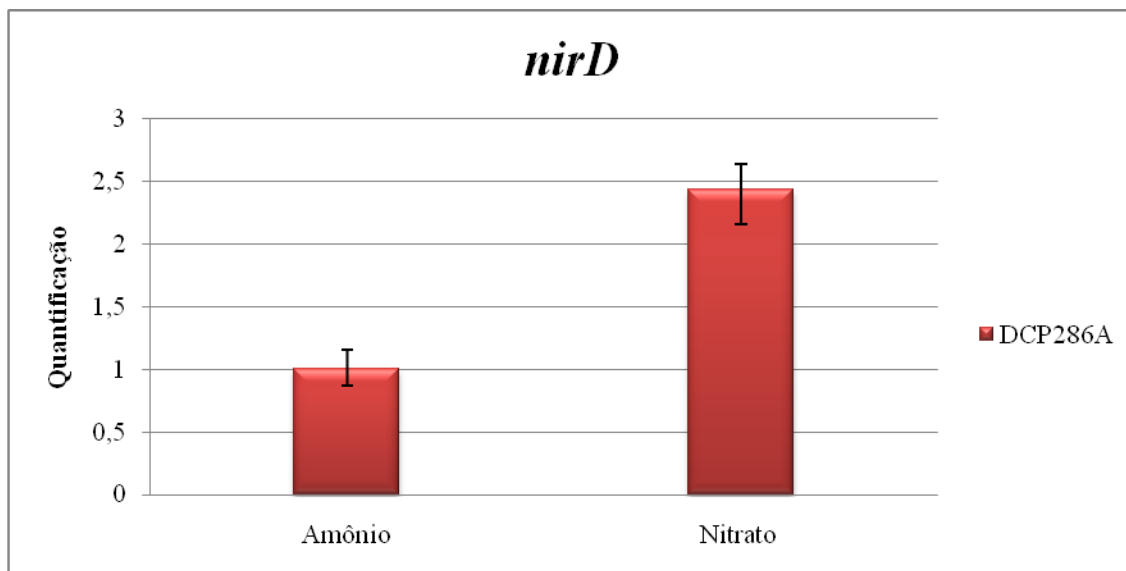
A expressão relativa do gene *nirD* na estirpe SmR1 de *H. seropedicae* demonstrou que existe alta expressão na presença de nitrato quando em D.O. de 0,5 no entanto, quando em D.O. de 1,0 se observa uma queda drástica na expressão deste gene (FIGURA 11). Os níveis de expressão do gene *nirD* na estirpe DCP286A se mostraram diminuídos quando na presença de nitrato (FIGURA 12).

FIGURA 11 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *nirD* NA ESTIRPE SmR1 DE *H. seropedicae*.



Expressão relativa do gene *nirD* da estirpe SmR1 *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia em D.O. de 0,5. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

FIGURA 12 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *nirD* NA ESTIRPE DCP286A DE *H. seropedicae*.

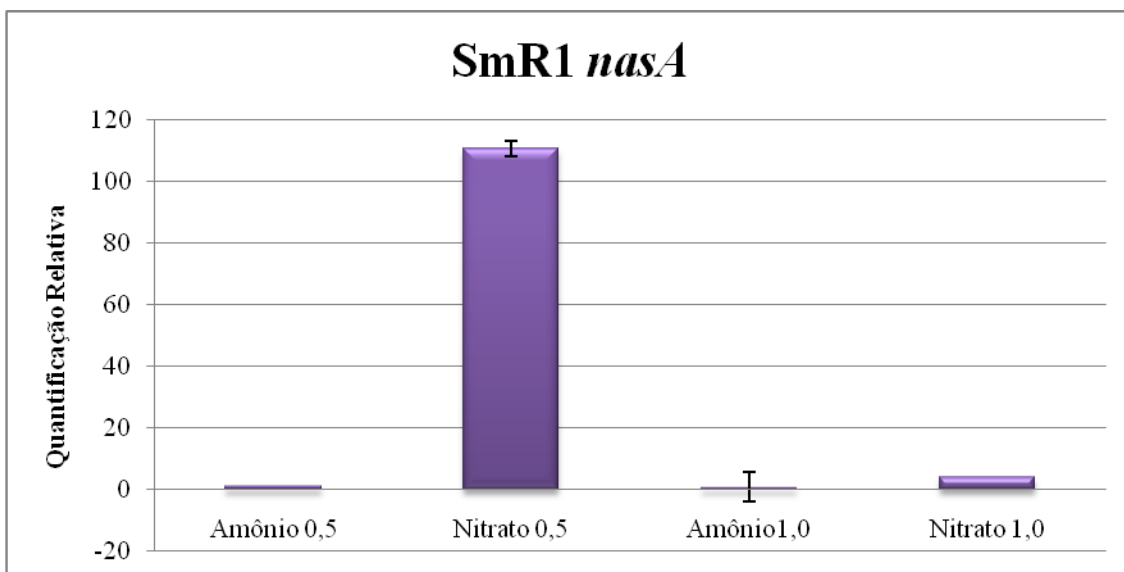


Expressão relativa do gene *nirD* da estirpe DCP286A de *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia na estirpe SmR1 e normalizando os níveis de expressão em amônio para 1,0. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

A região que compreende os 280pb finais do gene *nirB*, e a região de 146pb entre os genes *nirB* e *nirD*, foi analisada a fim de determinar a presença de possíveis promotores. Não foram encontrados possíveis sítios para ligação de promotores na região analisada.

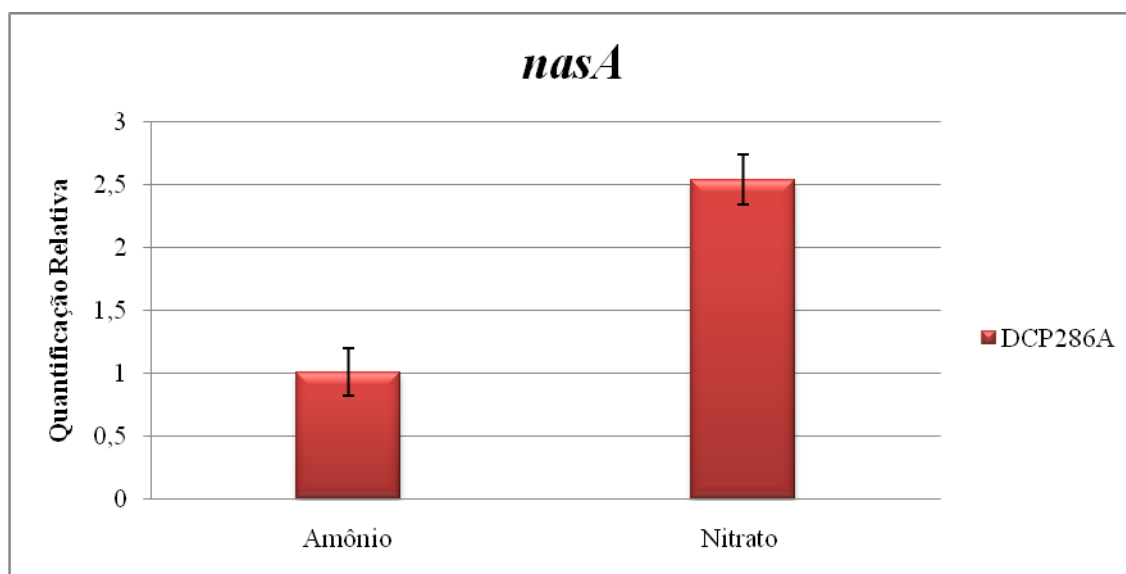
Os níveis de expressão do gene *nasA* na estirpe SmR1 de *H. seropedicae* mostram que há uma forte indução da transcrição na presença de nitrato em D.O. de 0,5 (FIGURA 13). Semelhantemente ao observado nos genes *narK* e *nirD*, a expressão do gene *nasA* cai de maneira significativa em D.O. de 1,0 e também na estirpe DCP286A (FIGURA14).

FIGURA 13 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *nasA* NA ESTIRPE SmR1 DE *H. seropedicae*.



Expressão relativa do gene *nasA* da estirpe SmR1 *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia em D.O. de 0,5. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

FIGURA 14 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *nasA* NA ESTIRPE DCP286A DE *H. seropedicae*.



Expressão relativa do gene *nasA* da estirpe DCP286A de *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia na estirpe SmR1 e normalizando os níveis de expressão em amônio para 1,0. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

A busca por prováveis promotores na região intergênica a montante do gene *nasA* não revelou a presença de nenhum provável sítio de ligação de promotores. A região analisada compreendeu os 390 pb finais do gene *nirC* e a região de 41pb entre os genes *nirC* e *nasA*.

A organização dos genes *narK*, *nirBDC* e *nasA* em *H. seropedicae* demonstrou ser diferente de outros organismos que metabolizam nitrato como *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B.subtillis*. Em *E. coli* e *B. subtilis* o gene *narK* está situado juntamente com os genes que codificam para nitrato redutase respiratória *narGHJI* e em *P. aeruginosa* existem duas cópias do gene *narK* a montante dos genes da nitrato redutase respiratória. O operon *nirBDC* de *E. coli* está separado tanto do transportador *narK* quanto dos genes da via assimilatória *nasFEDCBA*. Estas diferenças tornam a organização dos genes *narKnirBDCnasA* de *H. seropedicae* particulares.

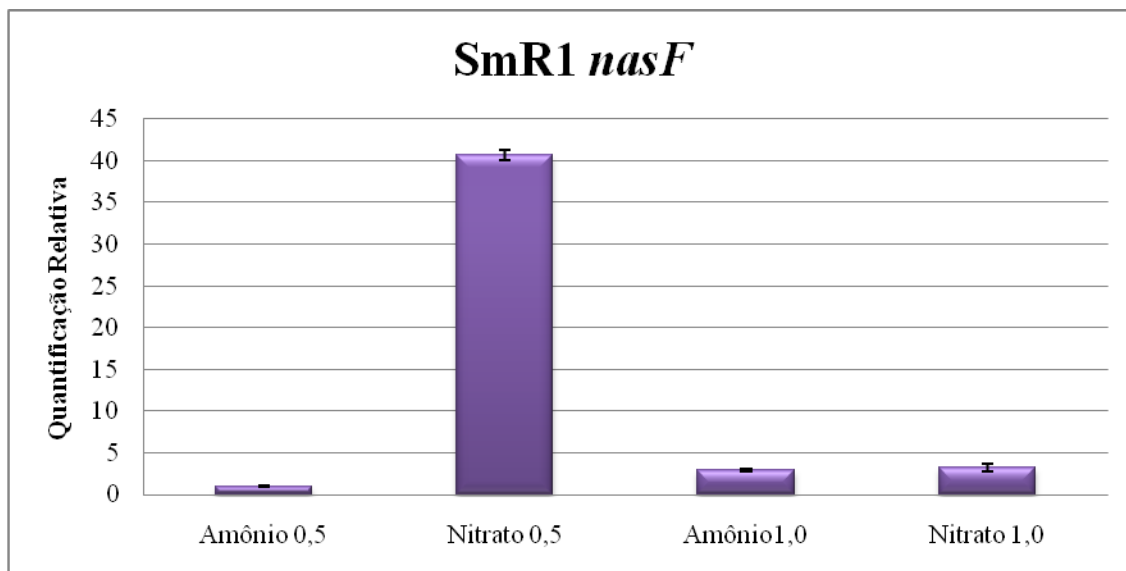
Os dados de quantificação obtidos para os genes *narK*, *nirD* e *nasA* na estirpe SmR1 demonstraram que o padrão de expressão destes genes é similar pois foi observada uma forte indução quando em D.O. de 0,5 seguida de considerável diminuição da expressão em D.O. de 1,0. O padrão observado reforça a hipótese que estes genes estão organizados em um operon. A diminuição da expressão destes genes na estirpe DCP286A (*ntrC*⁻) sugere que a proteína NtrC participa do controle da expressão destes genes e que o controle da expressão é realizado na região promotora do gene *narK*, onde foi encontrado um possível sítio de ligação para NtrC. A presença de um grampo terminador na região promotora de *narK* sugere que além do controle por NtrC, estes genes estão possivelmente sob o controle da proteína antiterminadora de transcrição NasR. Esses dados sugerem que na ausência de amônio no meio ocorre uma ativação via proteína de resposta NtrC e que o controle da expressão é realizado pela presença de nitrato no meio via

proteína NasR. A baixa expressão observada na estirpe SmR1 quando em D.O. de 1,0 está possivelmente ligada à concentração de nitrato no meio ou ainda a condição de microaerofilia estabelecida devido ao crescimento da população de células no meio de cultura quando em D.O. de 1,0. Uma baixa relação nitrato/nitrito poderia levar a repressão da expressão dos genes *narKnirBDCnasA* via sistema narXL, ou ainda a baixa tensão de O₂ na condição de microaerofilia (D.O. de 1,0) poderia levar a repressão destes genes via FNR, porém, os dados obtidos só permitem o desenvolvimento de hipóteses a respeito da diminuição da expressão observada em D.O. de 1,0 nos genes *narK nirD* e *nasA*.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE *nasF* de *H. seropedicae*

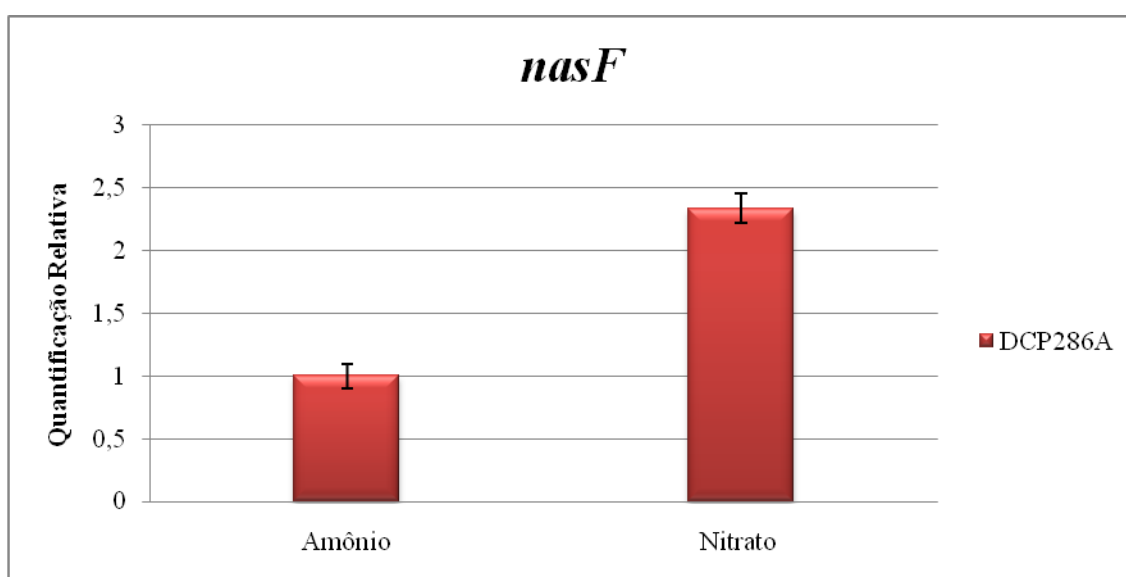
O gene *nasF* de *H. seropedicae* codifica, juntamente com os genes *nasE* e *nasD*, para um transportador de nitrato ATP dependente. Os níveis de expressão observados para o gene *nasF* na estirpe SmR1 revelaram forte indução na presença de nitrato quando em D.O. de 0,5 e um decréscimo na expressão quando em D.O. de 1,0 (FIGURA 15). Na estirpe DCP286A a expressão do gene *nasF* se mostrou diminuída em relação à expressão da estirpe selvagem (SmR1) (FIGURA 16).

FIGURA 15 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *nasF* NA ESTIRPE SmR1 DE *H. seropedicae*.



Expressão relativa do gene *nasF* da estirpe SmR1 *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia em D.O. de 0,5. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

FIGURA 16 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *nasF* NA ESTIRPE DCP286A DE *H. seropedicae*.

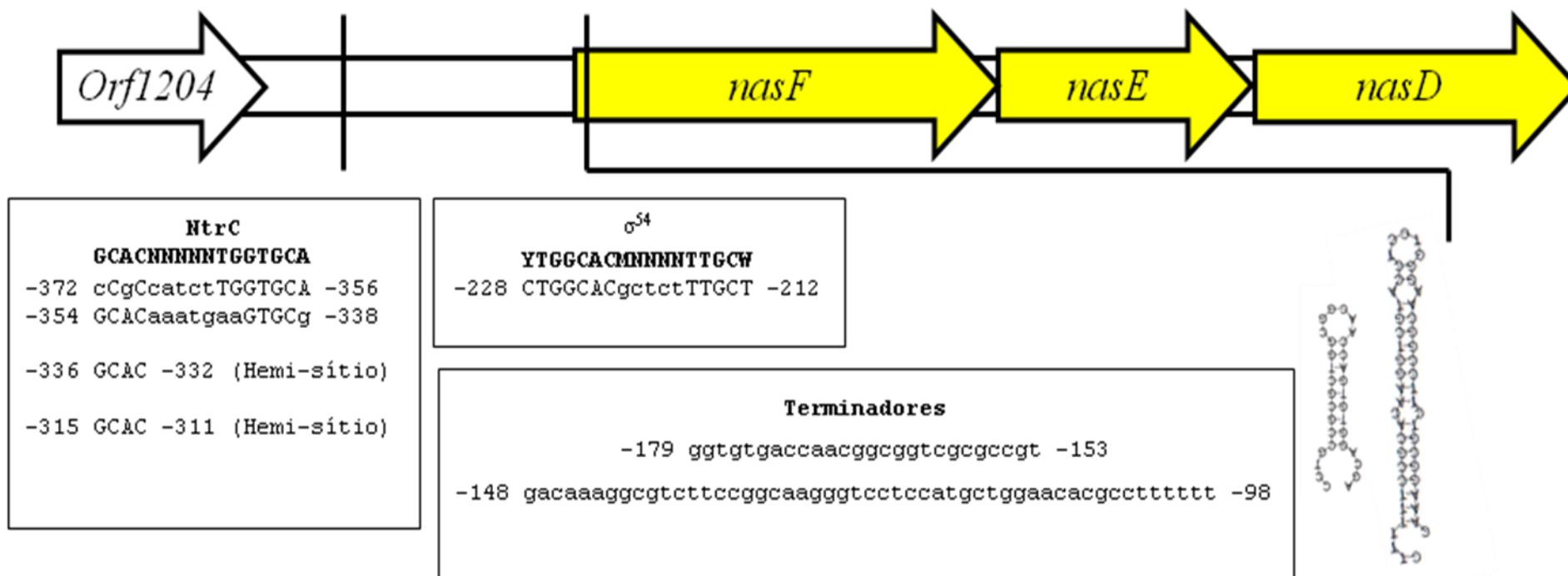


Expressão relativa do gene *nasF* da estirpe DCP286A de *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a

expressão do gene em amônia na estirpe SmR1 e normalizando os níveis de expressão em amônio para 1,0. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

A análise na região de 750pb a montante do gene *nasF* revelou a presença de dois possíveis sítios de ligação para proteína NtrC, um provável sítio promotor dependente de σ^{54} , e a presença de dois grampos terminadores (FIGURA 17).

FIGURA 17 – REGIÃO DO GENOMA QUE CONTÉM O GENE *nasF* DE *H. seropedicae* E SUA PROVÁVEL REGIÃO PROMOTORA.



Análise da região promotora do gene *nasF*. As caixas de texto indicam os sítios encontrados e suas posições em relação ao códon de início de transcrição ATG do gene *nasF*. Em negrito são indicadas as sequências consenso e os nucleotídeos marcados com letras maiúsculas representam bases idênticas às da sequência consenso.

Em *H. seropedicae* os genes que codificam para o transportador de nitrato ATP dependente NasFED encontram-se entre a *orf. 1204* e a *orf. 1210*. Esta organização difere da de outros organismos, onde os genes *nasFED* estão acompanhados da nitrato redutase assimilatória *nasA*. Em *Klebsiella oxytoca* os genes da via assimilatória do metabolismo de nitrato estão organizados na forma *nasRFEDCBA*, codificando o regulador da expressão NasR, o transportador de nitrato ATP dependente NasFED, a nitrato redutase assimilatória *nasAC*, e a nitrito redutase NasB. Em *Bacillus subtilis* os genes *nas* estão organizados na forma *nasAnasBCDEF*, onde *nasA* é transcrito em direção oposta aos demais genes. A distribuição dos genes da via assimilatória de nitrato em *H. seropedicae* se mostra heterogênea em relação à distribuição observada em *K. oxytoca* e *B. subtilis*.

A baixa expressão do gene *nasF* observada na estirpe DCP286A juntamente com os possíveis sítios de ligação para as proteínas NtrC e NasR sugerem que, apesar da diferença na organização dos genes, a regulação do operon *nasFED* de *H. seropedicae* se assemelha a observada em *K. oxytoca*. Em *K. oxytoca* a regulação de *nasF* está sujeita ao controle do sistema Ntr, via NtrC fosforilado, e ainda sob o controle de NasR que, uma vez ativada pela presença de nitrato, atuará como antiterminador de transcrição interagindo com os grampos terminadores no RNA transcrito, permitindo assim a expressão de *nasF* (CHAI e STEWART, 1998; WU et al. 1999)

Os dados de expressão obtidos foram de acordo com os dados apresentados por Alves (2006) através da fusão *nasF::lacZ*, onde a expressão de *nasF* na estirpe selvagem foi 6 vezes maior quando comparada à estirpe DCP286A. A ausência de expressão da fusão *nasF::lacZ* na estirpe A01 (*ntrY*) de *H. seropedicae* indicou que além do controle direto da expressão via NtrC e NasR, a expressão de *nasF* estava também está possivelmente sujeita ao controle por NtrY (ALVES, 2006).

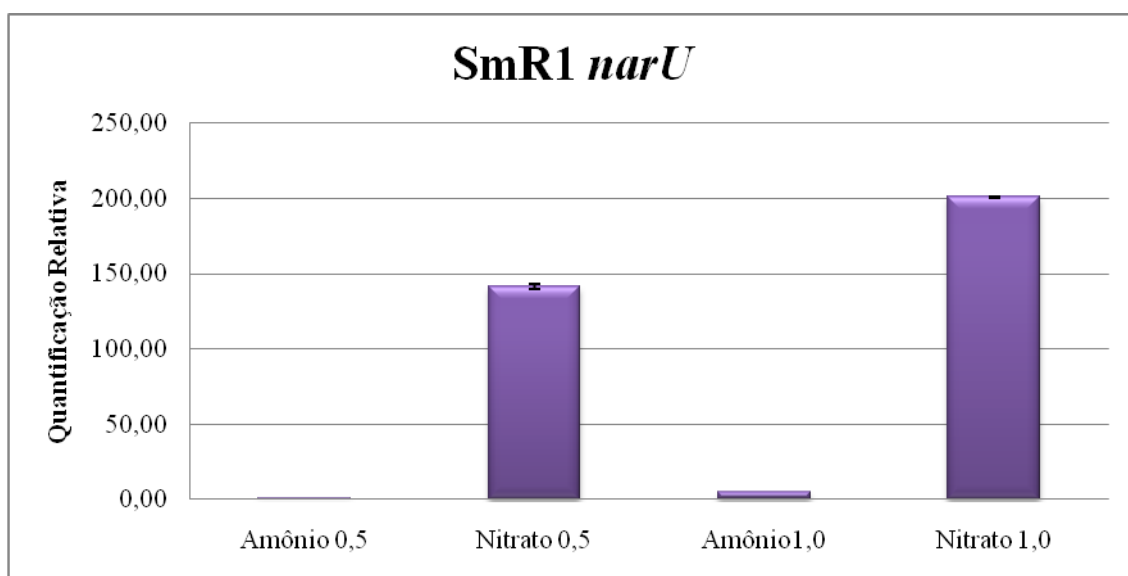
5.4 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES *narU*, *narG* e *narX* de *H. seropedicae*

O gene *narU* de *H. seropedicae* codifica para um transportador de nitrato e nitrito através de um mecanismo ainda não elucidado. Anteriormente o gene *narU* foi

nomeado como *narK* e achava-se que *H. seropedicae* possuía 3 cópias do gene *narK* em seu genoma. Com o sequenciamento do genoma de *H. seropedicae* uma das cópias do gene *narK* foi renomeada a *narU* devido a sua semelhança com o gene *narU* de *E.coli*. O gene *narU* de *H. seropedicae* encontra-se a jusante do gene *narK1* e a região intergênica que separa os dois genes é de 25pb.

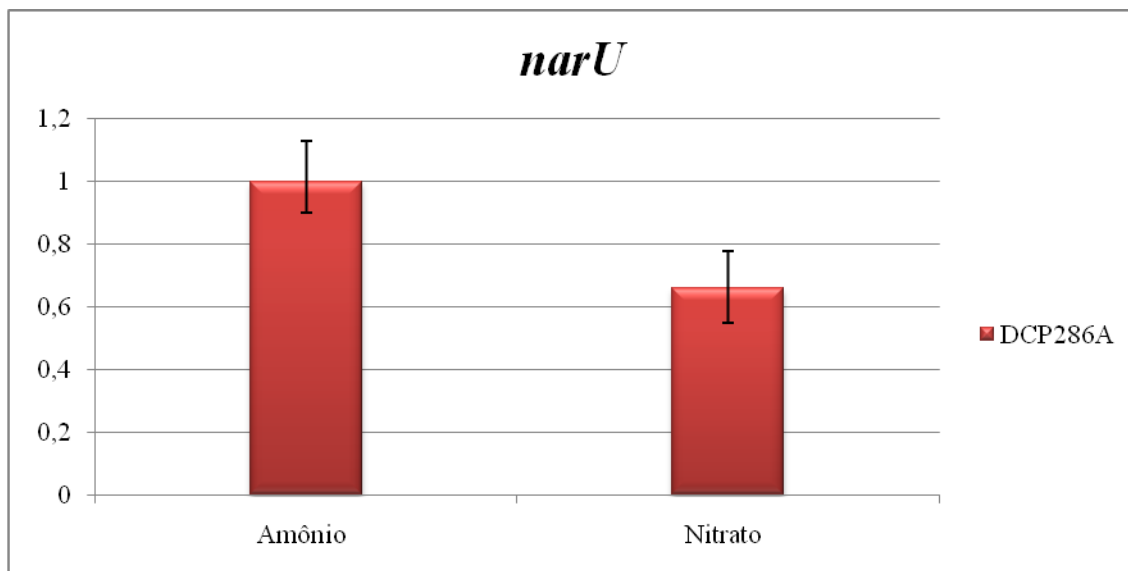
A quantificação dos níveis de expressão do gene *narU* na estirpe SmR1 de *H. seropedicae* demonstrou uma forte indução na presença de nitrato tanto em D.O. de 0,5 quanto em D.O. de 1,0 (FIGURA 18). A estirpe DCP28A apresentou a expressão de *narU* em nitrato diminuída em relação à estirpe selvagem (FIGURA 19).

FIGURA 18 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *narU* NA ESTIRPE SmR1 DE *H. seropedicae*.



Expressão relativa do gene *narU* da estirpe SmR1 *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia em D.O. de 0,5. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

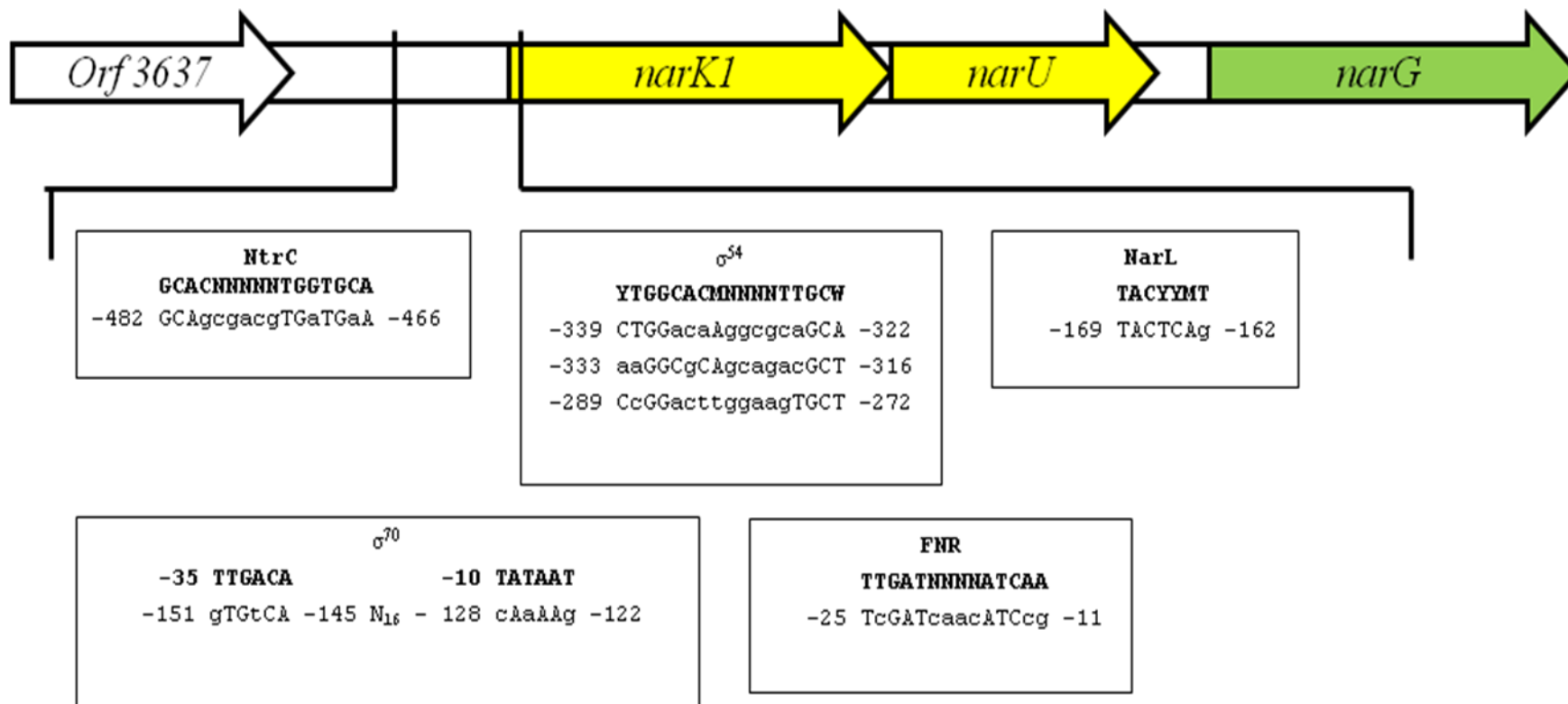
FIGURA 19 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *narU* NA ESTIRPE DCP286A DE *H. seropedicae*.



Expressão relativa do gene *narU* da estirpe DCP286A de *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia na estirpe SmR1 e normalizando os níveis de expressão em amônio para 1,0. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

A análise da região promotora do gene *narU* não revelou a presença de possíveis sítios de ligação para promotores de expressão. O fato de o gene *narU* estar separado do gene *narK1* por apenas 25pb levou a análise da região de 302pb a montante do gene *narK1*. A análise revelou a presença de um possível sítio para ligação da proteína NtrC, de três possíveis sítios para ligação do promotor dependente de σ^{54} , de um provável sítio para ligação para proteína NarL, um possível sítio para promotor dependente de σ^{70} e um provável sítio para ligação da proteína FNR (FIGURA 20).

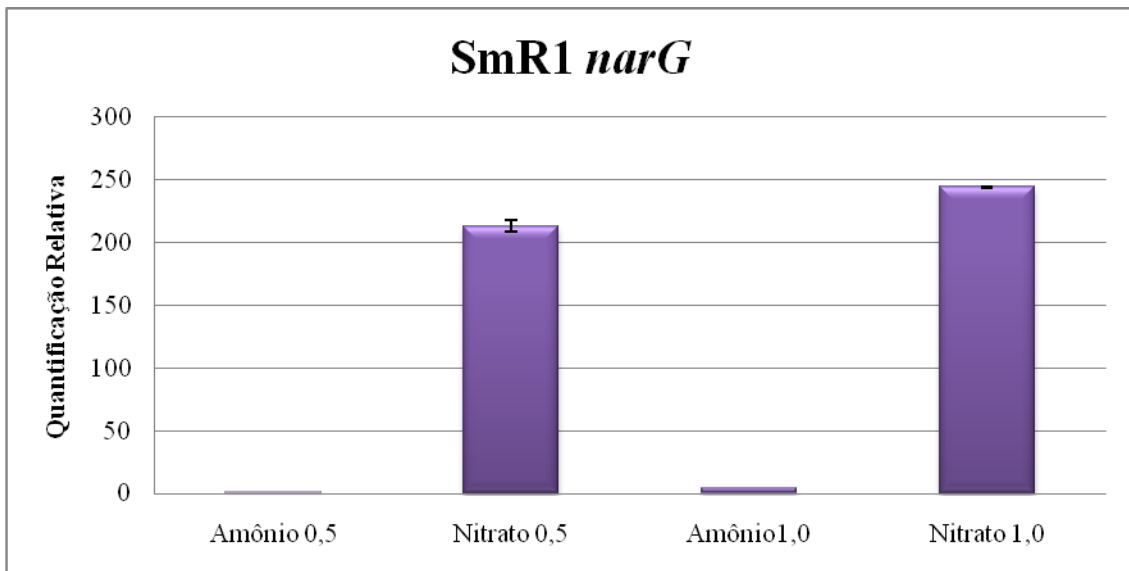
FIGURA 20 – REGIÃO DO GENOMA QUE CONTÉM O GENE *narK1* DE *H. seropedicae* E SUA PROVÁVEL REGIÃO PROMOTORA.



Análise da região promotora do gene *narK1*. As caixas de texto indicam os sítios encontrados e suas posições em relação ao códon de início de transcrição ATG do gene *narK1*. Em negrito são indicadas as sequências consenso e os nucleotídeos marcados com letras maiúsculas representam bases idênticas às da sequência consenso.

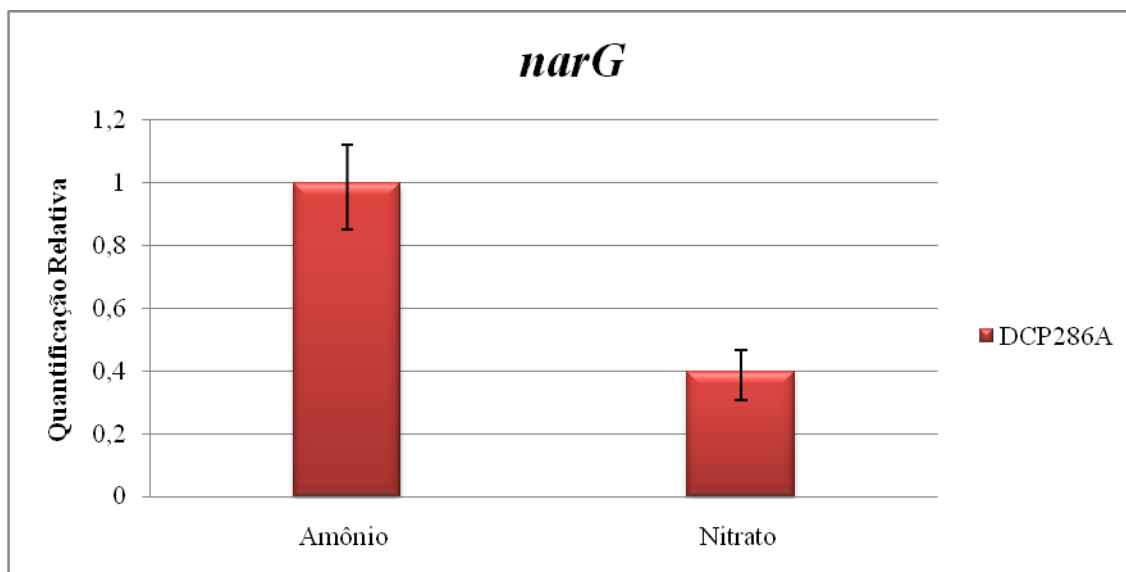
O gene *narG* de *H. seropedicae* codifica para subunidade catalítica da nitrato redutase (*narGHJ*). A quantificação dos níveis de expressão do gene *narG* na estirpe SmR1 de *H. seropedicae* mostra indução na presença de nitrato tanto em D.O. de 0,5 quanto em D.O. de 1,0 (FIGURA 21). Na estirpe DCP286A a expressão em nitrato se encontrou diminuída em relação à expressão observada em amônio (FIGURA 22).

FIGURA 21 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *narG* NA ESTIRPE SmR1 DE *H. seropedicae*.



Expressão relativa do gene *narG* da estirpe SmR1 *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia em D.O. de 0,5. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

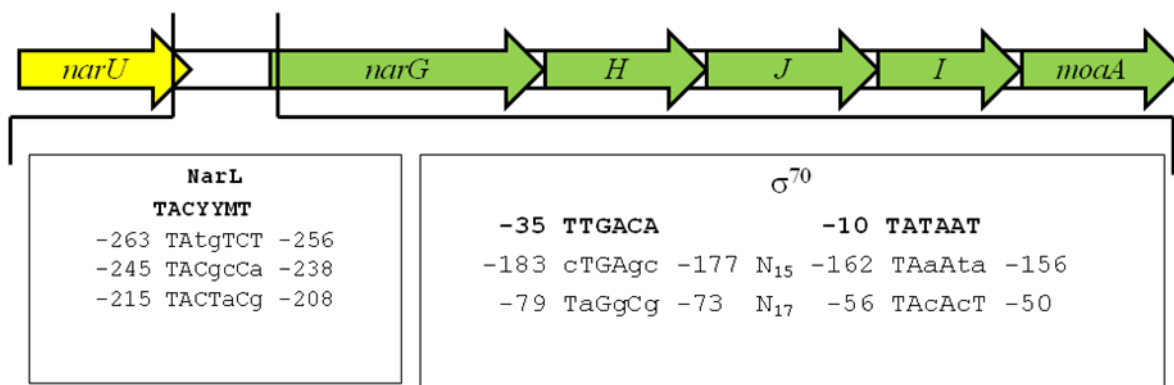
FIGURA 22 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *narG* NA ESTIRPE DCP286A DE *H. seropedicae*.



Expressão relativa do gene *narG* da estirpe DCP286A de *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia na estirpe Smr1 e normalizando os níveis de expressão em amônio para 1,0. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

A análise da região de 370pb a montante do gene *narG* indicou a presença de três possíveis sítios de ligação para proteína NarL e dois possíveis sítios para o promotor dependente de σ^{70} (FIGURA23). A análise compreendeu a região intergênica de 179pb entre *narU* e *narG* e os 191pb finais do gene *narU*.

FIGURA 23 – REGIÃO DO GENOMA QUE CONTÉM O GENE *narG* DE *H. seropedicae* E SUA PROVÁVEL REGIÃO PROMOTORA

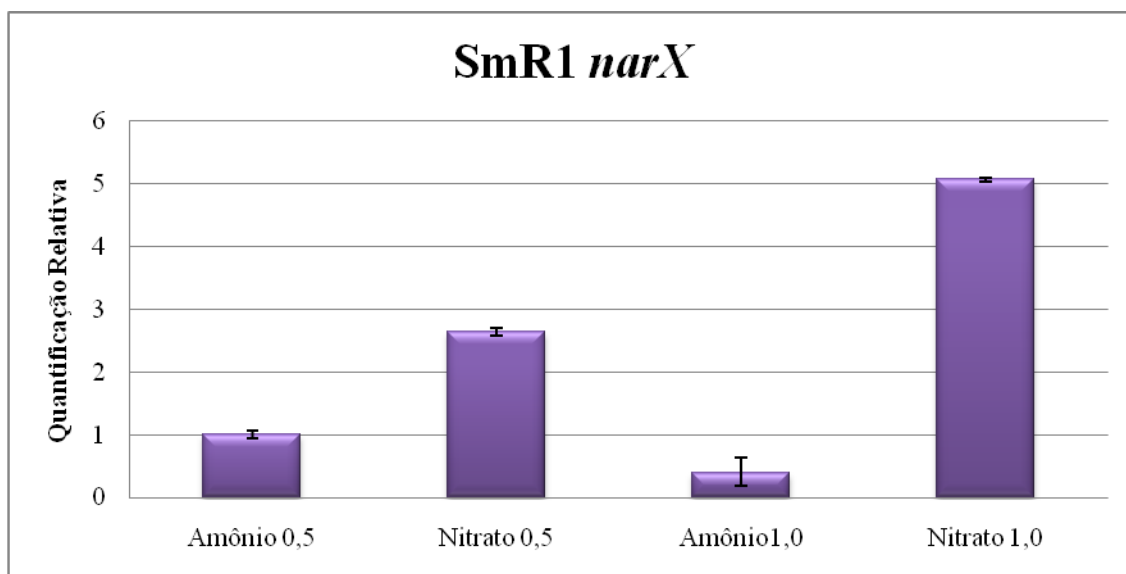


Análise da região promotora do gene *narG*. As caixas de texto indicam os sítios encontrados e suas posições em relação ao códon de início de transcrição ATG do gene *narG*. Em negrito

são indicadas as sequências consenso e os nucleotídeos marcados com letras maiúsculas representam bases idênticas às da sequência consenso.

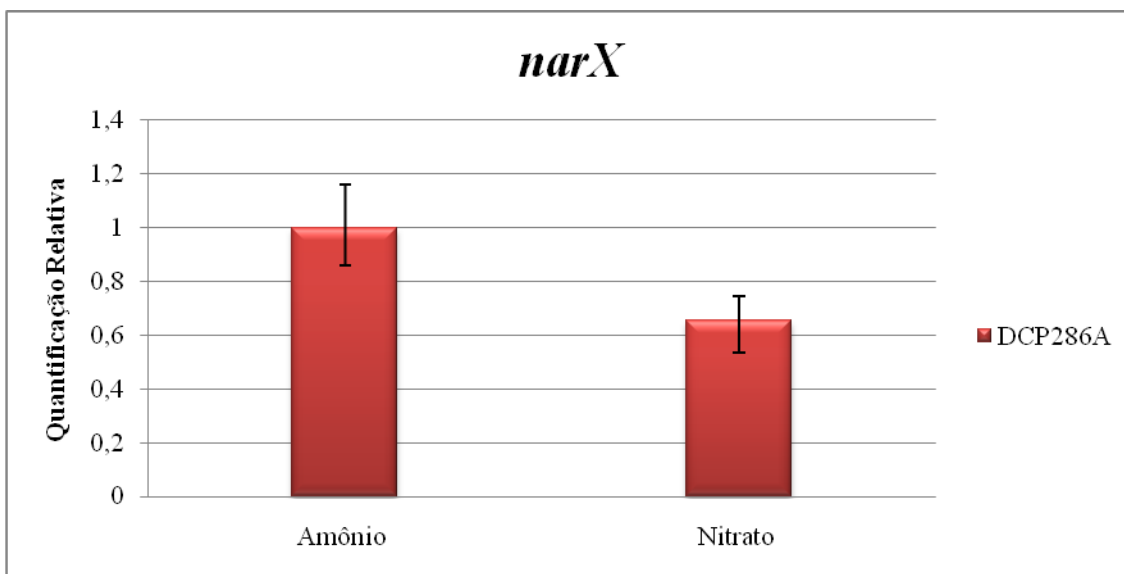
O gene *narX* faz parte do sistema de dois componentes *narXL* envolvido com o sensoriamento de nitrato e nitrito. A quantificação dos níveis de expressão do gene *narX* na estirpe SmR1 de *H. seropedicae* indicou uma indução na presença de nitrato (FIGURA 24), entretanto a indução não foi tão acentuada quando comparada a outros genes que respondem a presença de nitrato como *narU* e *narG*. Os maiores níveis de expressão foram observados quando as células cresceram na presença de nitrato em D.O. de 1,0. Na estirpe DCP286A não se observou indução na presença de nitrato (FIGURA 25).

FIGURA 24 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *narX* NA ESTIRPE SmR1 DE *H. seropedicae*.



Expressão relativa do gene *narX* da estirpe SmR1 *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia em D.O. de 0,5. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

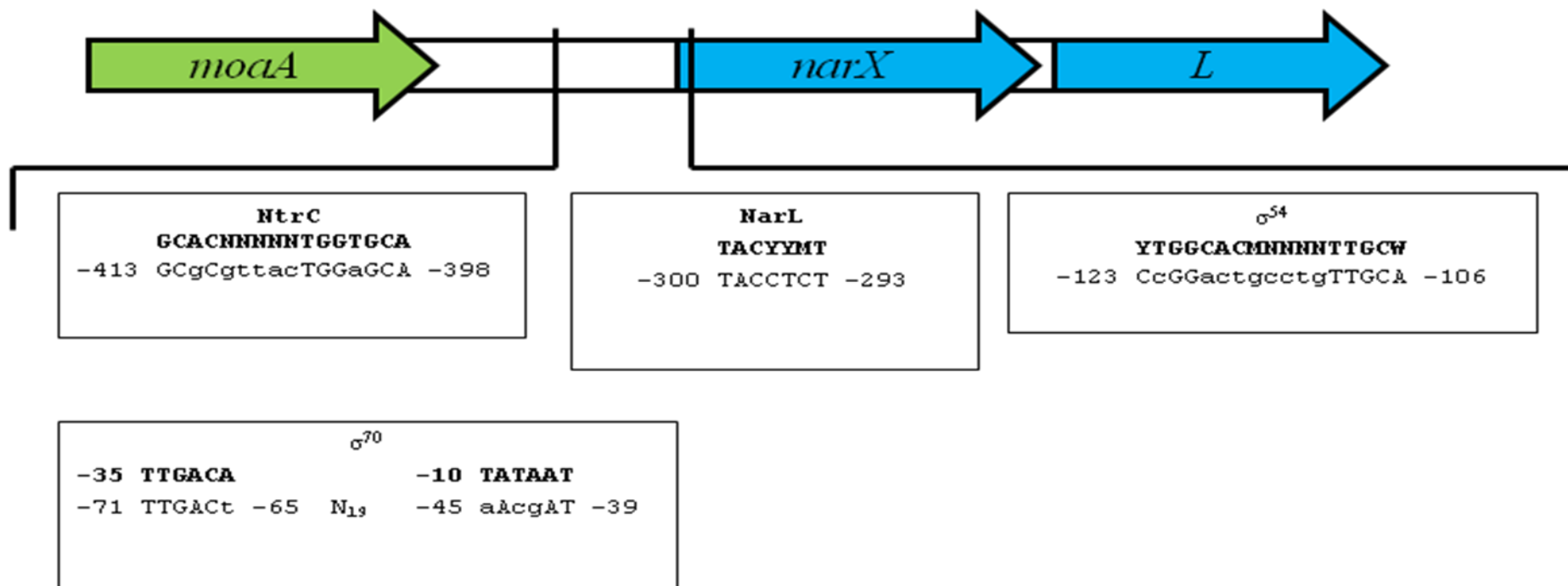
FIGURA 25 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *narX* NA ESTIRPE DCP286A DE *H. seropedicae*.



Expressão relativa do gene *narG* da estirpe DCP286A de *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia na estirpe SmR1 e normalizando os níveis de expressão em amônio para 1,0. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

A busca por possíveis promotores foi realizada nos 372pb finais do gene *moaA* e nos 123pb da região intergênica entre o gene *moaA* e *narX*. A análise revelou a presença de um possível sítio de ligação para a proteína NtrC, um possível sítio para do promotor dependente de σ^{54} , um possível sítio para ligação da proteína NarL e um possível sítio para promotor dependente de σ^{70} (FIGURA 26).

FIGURA 26 – REGIÃO DO GENOMA QUE CONTÉM O GENE *narX* DE *H. seropedicae* E SUA PROVÁVEL REGIÃO PROMOTORA.



Análise da região promotora do gene *narX*. As caixas de texto indicam os sítios encontrados e suas posições em relação ao códon de início de transcrição ATG do gene *narX*. Em negrito são indicadas as sequências consenso e os nucleotídeos marcados com letras maiúsculas representam bases idênticas às da sequência consenso.

A região do genoma de *H. seropedicae* que contém os genes *narU*, *narG* e *narX* está organizada na forma *narK1UnarGHJImoaAnarXL*. Esta organização é similar a observada em *P. aeruginosa*, onde existem duas cópias do gene *narK* a montante dos genes da nitrato redutase respiratória *narGHJI*. Os genes do sistema *narXL* estão localizados a montante de *narK1* em *P. aeruginosa*, e são transcritos em direção oposta aos genes *narK1K2narGHJI* (RICHARDSON et al., 2001).

Em *E. coli* a transcrição dos genes da via respiratória do metabolismo de nitrato é dependente de oxigênio, de molibdênio, e do sensoriamento de nitrato. Os níveis de expressão de *narK* são máximos em condições de anaerobiose e dependente da presença de nitrato. A nitrato redutase *narGHJI* também tem sua expressão aumentada na ausência de oxigênio porém em menor proporção que *narK*, sua expressão se torna aumentada na presença de nitrato indicando que a expressão de *narGHJI* depende diretamente da presença de nitrato (KOLESNIKOW et al., 1992; RICHARDSON et al., 2001).

Em *H. seropedicae* o padrão de expressão de *narU* e *narG* se mostra semelhante visto que se observa um aumento progressivo de sua expressão na presença de nitrato na estirpe SmR1. Este fato sugere que os genes *narK1UnarGHJImoaA* estão organizados em um operon e são expressos em conjunto. A presença de prováveis sítios para a proteína NarL nas regiões promotoras de *narK1* e *narG* indica que o controle da expressão está sujeito ao sensoriamento de nitrato e nitrito exercido pelo sistema *narXL*. Por outro lado a diminuição da expressão destes genes na estirpe DCP286A sugere um controle indireto de sua expressão via NtrC. O aumento da expressão em nitrato observado em D.O. 1,0 na estirpe SmR1 possivelmente está relacionado ao controle exercido por FNR onde, em baixas tensões de O₂, a proteína FNR funcionaria como um ativador da transcrição de *narK1* e *narG*.

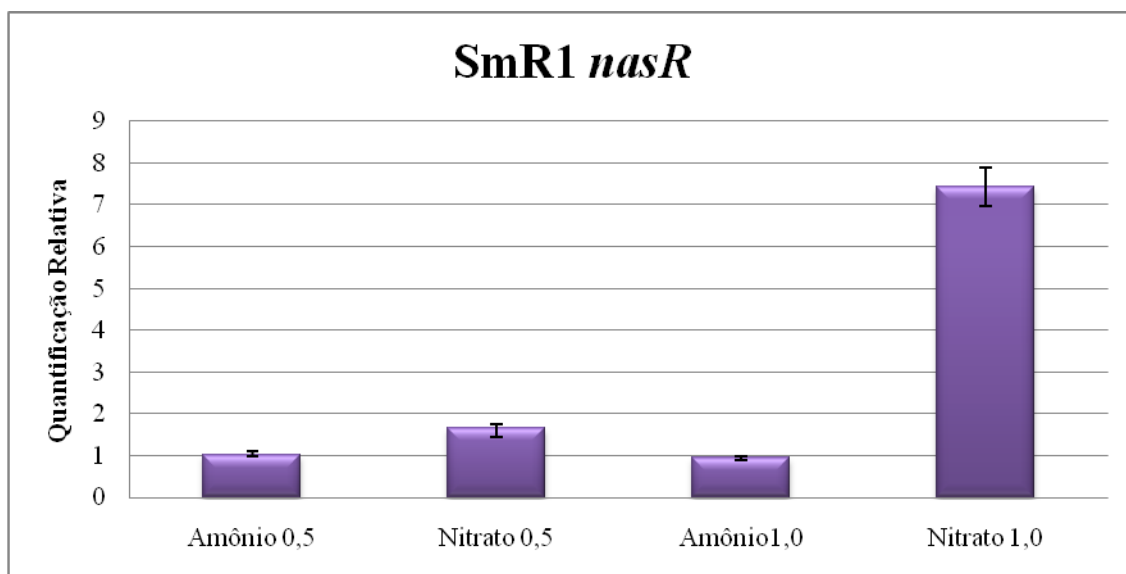
O pequeno aumento observado na expressão de *narX* em nitrato na estirpe SmR1 sugere uma ativação pela presença de nitrato. A presença de possíveis sítios de ligação para proteína NarL e para o promotor dependente de σ^{70} sugere uma auto-regulação da expressão do sistema *narXL*. A baixa expressão observada em nitrato na estirpe DCP286A sugere uma possível dependência de NtrC para expressão de *narX* porém, os possíveis sítios de ligação para NtrC e para o

promotor dependente de σ^{54} se apresentam pouco conservados, o que dificulta a elucidação do papel de NtrC na expressão de *narX*.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE *nasR* de *H. seropedicae*

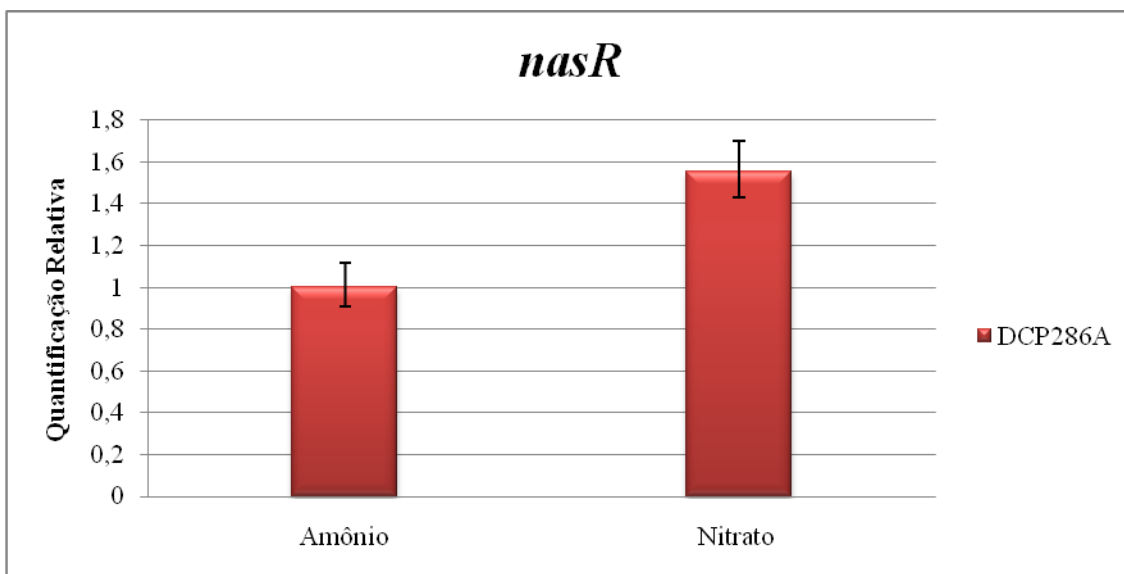
O gene *nasR* codifica para uma proteína reguladora que atua como antiterminadora da transcrição. Os níveis de expressão do gene *nasR* na estirpe SmR1 demonstram um pequeno nível de indução na presença de nitrato em D.O. de 1,0 (FIGURA 27). Na estirpe DCP286A houve diminuição da expressão em comparação com a estirpe selvagem (FIGURA 28).

FIGURA 27 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *nasR* NA ESTIRPE SmR1 DE *H. seropedicae*.



Expressão relativa do gene *nasR* da estirpe SmR1 *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia em D.O. de 0,5. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

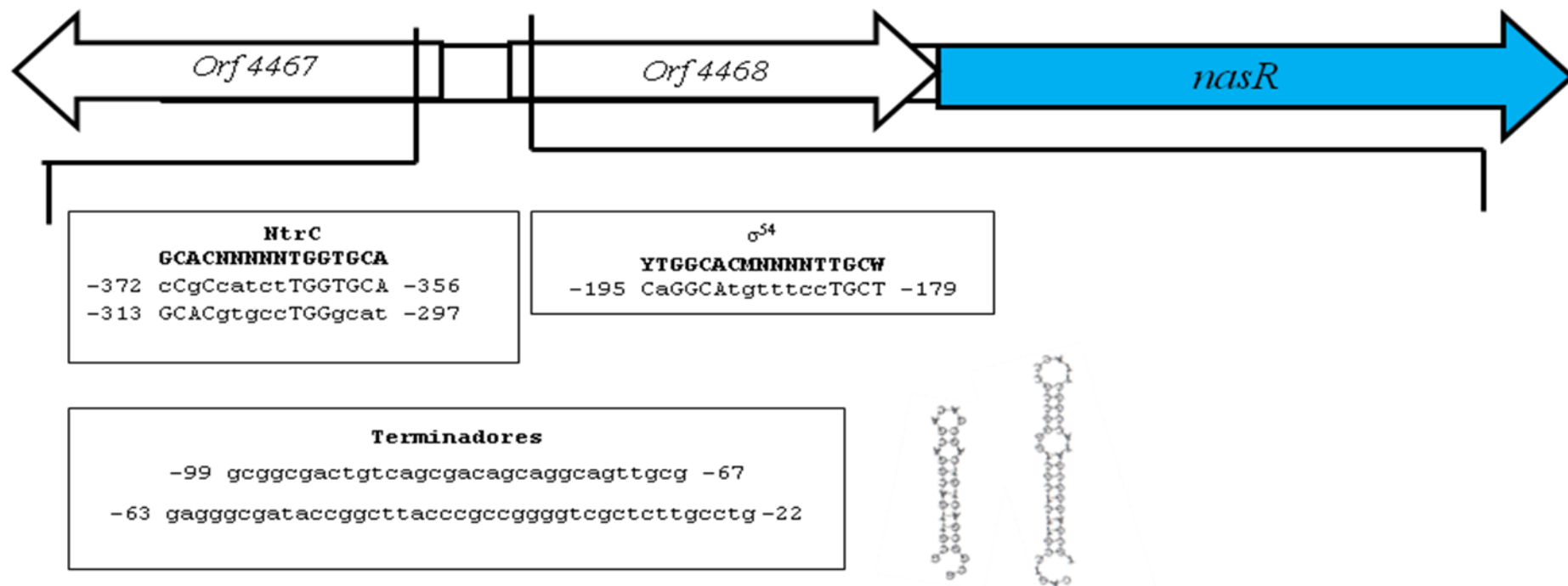
FIGURA 28 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *nasR* NA ESTIRPE DCP286A DE *H. seropedicae*.



Expressão relativa do gene *nasR* da estirpe DCP286A de *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia na estirpe SmR1. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

A análise da região dos 300pb finais da *orf 4468* e de 127pb entre a *orf 4468* e o gene *nasR* não revelou a presença de possíveis promotores nessa região. A montante da *orf 4468* existe outro gene que é transcrito no sentido contrário da *orf 4468* e de *nasR*. A busca por possíveis promotores na região intergênica de 455pb entre as *orfs 4467* e *4468* revelou a presença de um possível sítio de ligação para NtrC, um possível sítio para o promotor dependente de σ^{54} e de dois grampos terminadores (FIGURA 29).

FIGURA 29 – REGIÃO DO GENOMA QUE CONTÉM O GENE *nasR* DE *H. seropedicae* E SUA PROVÁVEL REGIÃO PROMOTORA.



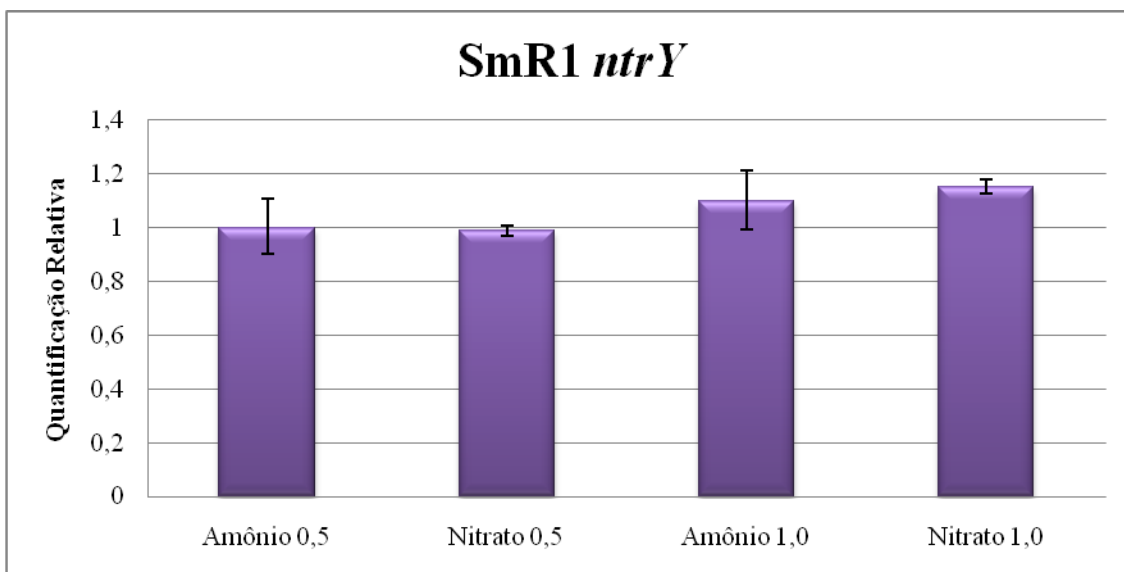
Análise da região promotora do gene *nasR*. As caixas de texto indicam os sítios encontrados e suas posições em relação ao códon de início de transcrição ATG do gene *nasR*. Em negrito são indicadas as sequências consenso e os nucleotídeos marcados com letras maiúsculas representam bases idênticas às da sequência consenso.

A distribuição dos genes *nas* em *H. seropedicae* se mostra diferente de outros organismos. Em *K. oxytoca* o gene *nasR* se encontra a montante do operon *nasFEDCBA*, e o controle de sua expressão é mediado por NtrC (WU et al. 1999). Em *H. seropedicae* os genes *nasFED* e *nasR* estão separados por 3.741Kb, e o gene *nasA* encontra-se na mesma região dos genes *narKnirBDC*. Apesar da presença de um fraco sítio de ligação para NtrC e σ^{54} , a análise dos níveis de expressão juntamente com os possíveis sítios promotores encontrados não são suficientes para elucidar a regulação deste gene em *H. seropedicae*. A presença de dois possíveis grampos terminadores sugere indica uma auto-regulação de *nasR* pelo seu produto antiterminador da transcrição.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE *ntrY* de *H. seropedicae*

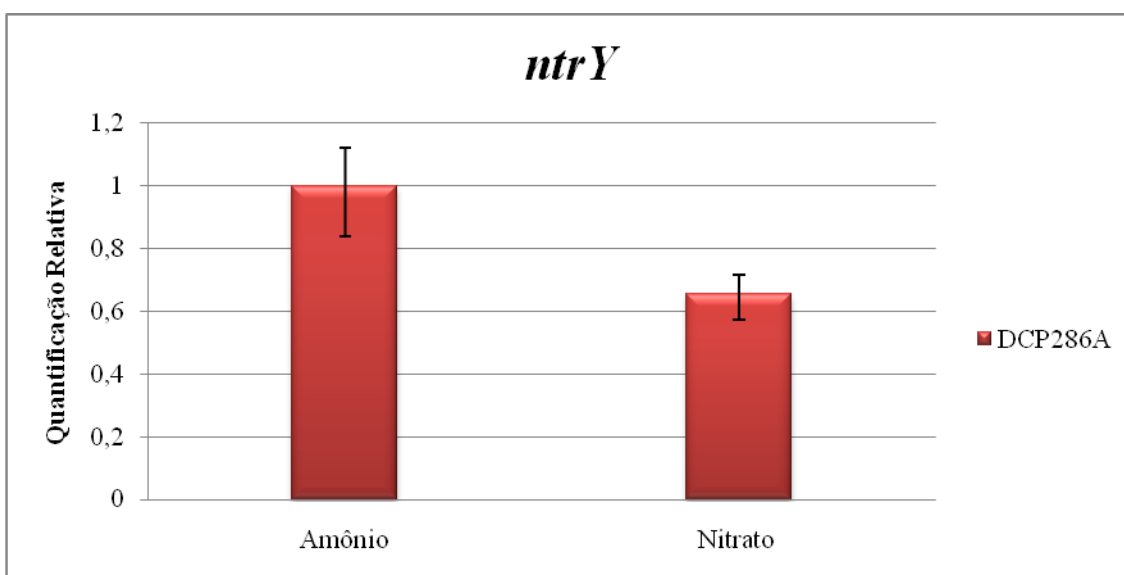
O gene *ntrY* de *H. seropedicae* está envolvido no metabolismo de nitrato já que o mutante A01 (*ntrY*) se demonstrou incapaz de crescer utilizando nitrato como única fonte de nitrogênio (ALVES, 2006). A quantificação dos níveis de expressão de *ntrY* na estirpe SmR1 de *H. seropedicae* não demonstrou indução deste gene na presença de nitrato (FIGURA 30). Na estirpe DCP286A os níveis de expressão se mostraram ligeiramente aumentados em relação aos níveis observados na estirpe selvagem (FIGURA 31). Os níveis de expressão do gene *ntrY* observados na estirpe SmR1 de *H. seropedicae* sugerem uma expressão constitutiva deste gene e a expressão diminuída na estirpe DCP286A sugere que a expressão de *ntrY* é dependente de NtrC. A função do sistema *ntrYX* ainda não está totalmente elucidada em *H. seropedicae*, apesar da clara importância deste gene para o metabolismo de nitrato os dados obtidos não permitem a elaboração de hipóteses acerca de seu papel no metabolismo de nitrato.

FIGURA 30 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *ntrY* NA ESTIRPE SmR1 DE *H. seropedicae*.



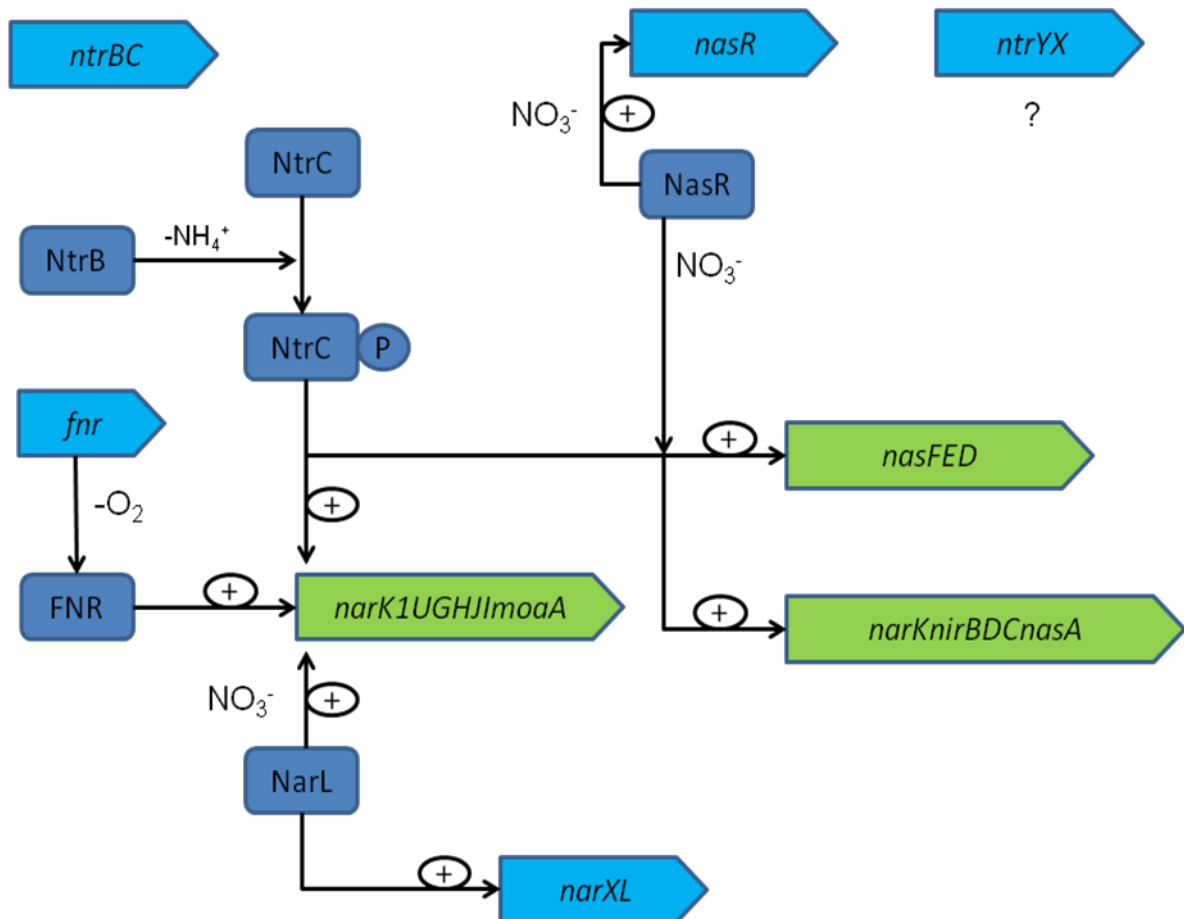
Expressão relativa do gene *ntrY* da estirpe SmR1 *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia em D.O. de 0,5. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

FIGURA 31 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *ntrY* NA ESTIRPE DCP286A DE *H. seropedicae*.



Expressão relativa do gene *ntrY* da estirpe DCP286A de *H. seropedicae*. Resultado obtido através da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, usando como condição controle a expressão do gene em amônia na estirpe SmR1. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura se refere ao experimento mais representativo de uma duplicata biológica.

MODELO DA PROVÁVEL CASCATATA REGULATÓRIA DO METABOLISMO DE NITRATO EM *H. seropedicae*



6. CONCLUSÕES

Os genes *narK*, *nirD* e *nasA* de *H. seropedicae* formam o operon *narKnirBDCnasA*, cuja expressão aparentemente é ativada por NtrC e provavelmente controlada pelo antiterminador NasR na presença de nitrato.

A regulação da expressão dos genes que codificam o transportador de nitrato NasFED de *H. seropedicae* é similar a de *K. oxytoca* sendo regulados por NtrC e pelo antiterminador de transcrição NasR.

A expressão dos genes *narK1UnarGHJImoaA* de *H. seropedicae* aparentemente é dependente do sistema de dois componentes NarXL e possivelmente responde aos níveis de nitrato e nitrito. O aumento da expressão em baixas tensões de oxigênio juntamente com a presença de um possível sítio de ligação para proteína FNR sugere ativação da transcrição gênica por FNR.

O gene *narLX* de *H. seropedicae* é levemente induzido (2-3 vezes) na presença de nitrato. A presença de sítios de ligação na região promotora sugere que sua transcrição possivelmente é dependente de NtrC e de NarL.

A regulação do gene *nasR* de *H. seropedicae* não está clara, embora um fraco sítio de ligação de NtrC e promotor dependente de sigma 54 tenham sido encontrados. A presença de grampos terminadores em sua região promotora sugere uma auto-regulação deste gene pela proteína NasR.

O gene *ntrY*, integrante do sistema de dois componentes *ntrYX*, está envolvido com o metabolismo de nitrato em *H. seropedicae*, porém os dados obtidos não permitem elucidar nem gerar hipóteses sobre o papel deste gene no metabolismo de nitrato.

7 REFERÊNCIAS

ALVES, L.R., **Caracterização dos genes *ntrY* e *ntrX* de *Herbaspirillum seropedicae***. 50p dissertação (Monografia/Especialização em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2004.

ALVES, L.R., **Análise funcional dos genes *ntrY* e *ntrX* de *Herbaspirillum seropedicae***. 80p Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DÖBEREINER, J., A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v.56, p. 365, 1984.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J., Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen Nov., sp. Nov., a new root-associated nitroge-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p.86-93, 1986.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J., Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v.13, p. 65-73, 1992.

BLASCO, F.; IOBI, F.C.; RATOUCNIAK, V.J.; BENEFFOY, V.; CHIPAUX, M., Nitrate reductase of *Escherichia coli*: sequence of the second nitrate reductase and comparison with that encoded by the *narGHJ* operon. **Mol. Gen. Genet.**, v. 222, p. 104-111, 1990.

BOTHE, H.; FERGUSON, S.J.; NEWTON, W.E., **Biology of the nitrogen cycle.**, Amsterdam, Cost, 2007.

BURRIS, R.H., Nitrogenases. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266, n° 15, p. 9339-9342, 1991.

CAPONE, D.G., Marine nitrogen fixation: what's the fuss?, **Cur. Opin. Microbiol.**, v. 4, p. 341-348, 2001.

CHAI, W.; STEWART, V., NasR, a Novel RNA-binding Protein, Mediates a Nitrate-responsive Transcription Antitermination of the *Klebsiella Oxytoca* Ma5I nasF Operon Leader *in vitro.*, **J. Mol. Biol.**, v. 283, p. 339-351, 1998.

CHANG, C.; STEWART, R.C., The two-component system: Regulation of diverse signaling pathways in Prokaryotes and Eukaryotes., **Plant Physiol.**, v.117, p. 723-731, 1998.

COLE, J., Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation?, **FEMS Microbiology Letters.**, v.136, p. 1-11, 1996.

DARWIN, A.J.; STEWART, V., Expression of the *narX*, *narL*, *narP* and *narQ* genes of *Escherichia coli* K-12: regulation of the regulator., **J. Bacteriol.**, v. 177, n° 13, p.3865-3869, 1995.

DIXON, R., Tandem promoter determine regulation of the *Klebsiella pneumoniae* glutamine synthetase (*glnA*) gene., **Nucleic. Acids. Res.**, v. 12, n. 20, p. 7811-7830, 1984

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant-bacteria interaction: endophytic N₂ fixing bacteria. **Cienc. Cult.**, v. 44, p. 310-313, 1992.

DREPPER, T.; WIETHAUS, J.; GIAOURAKIS, D.; GROB, S. SCHUBERT, B.; VOGT, M.; WIENCEK, Y.; McEWAN, A.G.; MASEPOHL, B., Cross-talk towards the response regulator NtrC controlling nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiology Letters.*, v. 258, p. 250-256, 2006.

FALK, E.C.; JOHNSON, J.L.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J.; KRIEG, N.R., Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol**, v. 36, p. 80-85, 1986.

FOUSSARD, M; CABANTOUS, S.; PÉDELACQ, J-D.; GUILLERT, V.; TRANIER, S.; MOUREY, L.; BIRCK, C. SAMAMA, J-P., The molecular puzzle of two-component signaling cascades. **Microbes and Infection**, v. 3, n° 5, p. 417-424, 2001.

FU, H.; BURRIS, R.H., Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 3198-3175, 1989.

GALPERIN, M.Y., Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. **Environ. Microbiol.**, v. 6, p. 552-567, 2004.

GAVIRA, M.; ROLDAN, M.D.; CASTILLO, F.; MORENO-VIVIAN, C. Regulation of *nap* gene expression and periplasmic nitrate reductase activity in the phototropic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* DMS158. **J. Bacteriol.** V. 184, p. 1693-1702, 2002.

GUERRERO, M.J.; VEGA, J.M.; LOSADA, M., The assimilatory nitrate reduction system and its regulation., **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v. 32, p. 169-204, 1981.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P.S.; GRIFITH, R., Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences., **Bio-Technology**, v. 10, p. 413-417, 1992.

HOWARD, J.B.; REES, D.C., Structural basis of biological nitrogen fixation., **Chem. Rev.**, v. 96, p. 2965-2982, 1996.

ISHIDA, M.L.; ASSUMPÇÃO, M.C.; MACHADO, H.B., BENELLI, E.M.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O., Identification and characterization of two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*., **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 651-661, 2002.

JIA, W.; TOVELL, N.; CLEGG, S.; TRIMMER, M.; COLE, J., A single-channel for nitrate uptake, nitrite export and nitrite uptake by *Escherichia coli* NarU and a role for NirC in nitrite export and uptake. **Biochemical Journal**, v. 417, p. 297-304, 2009.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U., Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*., **Can. J. Microbiol.**, v. 43. p. 887-891, 1997.

KIM, J.; REES, D.C., Nitrogenase and biological nitrogen fixation., **Biochemistry**, v. 33, p. 389-397, 1994.

KOLESNIKOW, T.; SCHRÖDER, I.; GUNSALUS, R.P., Regulation of *narK* Gene Expression in *Escherichia coli* in Response to Anaerobiosis, Nitrate, Iron and Molybdenium., **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 22, p. 7104-7111, 1992.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.;SENDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJORGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N., The real-time polymerase chain reaction., **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95-125, 2006.

LIN, J.T.; GOLDMANB, S.; STEWART, V., The *nasFEDCBA* operon for nitrate and nitrite assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5a1., **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 2551-2559, 1994.

LUNDBERG, J.O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M.T., The nitrite-nitrate nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 156-167, 2008.

MacGREGOR, C.H.; SCHNAITMAN, C.A. NORMANSELL, D.E., Purification and properties of nitrate reductase from *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.*, v. 249, n^o 16, p. 5321-5327, 1974.

MARGER, M.D.; SAIER, M.H., A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport., **Trends Biochem. Sci.**, v. 18, p. 13-20, 1993.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; SHEARER, N.; JOHNSON, P.; DIXON, R., Nitrogen fixation: key genetic regulatory mechanisms. **Biochemical Society Transactions.**, v.33, part 11, 2005.

MOIR, J.W.B.; WOOD, N.J., Nitrate and nitrite transport in bacteria., **CMLS Cell. Mol. Life Sci.**, v. 58, p. 215-224, 2001.

MORENO-VIVIAN, C.; CABELLO, P.; MARTINEZ-LUQUE, M.; BLASCO, R.; CASTILLO, F., Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases., **J. Bacteriol.**, v. 181, nº 21, p. 6573-6584, 1999.

MOROZKINA, E.V.; ZVYAGILSKAYA, R.A., Nitrate Reductases: Structure, Functions, and Effect of Stress Factors., **Biochemistry (Moscow)**., v. 72, nº 10, p. 1151-1160, 2007.

NAKANO, .M.M; HOFFMANN, T.; ZHU, Y.; JAHN, D., Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis* *nasDEF* encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. **J. Bacteriol.** v. 180, p. 5344-5350, 1998.

NOJI, S. NIHNO, T. SAITO, T. TANIGUSHI, S., The narK gene product participates in nitrate transport induced in *Escherichia coli* nitrate-respiring cells., **FEBS Letters**, v. 252, p. 139-143, 1989.

NORIEGA, C.E.; LIN, H.; CHEN, L.; WILLIAMS, S.B.; STEWART, V., Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX-NarL and NarP-NarQ two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12, **Molecular Microbiology**, v. 75(2), p. 394-412, 2010.

OGAWA, K.; AKAGAWA,E.; YAMANE, K.; SUN, Z.W.; LaCELLE, M.; ZUBER, P., The *nasB* operon and *nasA* gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 1409-1413, 1995.

OLIVEIRA, L.T., Construção e Caracterização da Estirpe Mutante *narL* de *Herbaspirillum seropedicae*., Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

PAWLOWSKI, K.; KLOSE, U. BRUIJN, F.J., Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, Ntry/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism., **Molecular and General Genetics**, v. 231, p. 124-138, 1991.

PERSUHN, D.C.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; YATES.M.G.; TEIXEIRA, K.R. RIGO, L.U., Cloning, sequencing and functional analysis of the *glnAntrBC* operon of *H. seropedicae*., **FEMS Microbiol Lett.**, v. 192, p. 217-221, 2000.

PERSUHN, D.C., Análise funcional do sistema NTR de *Herbaspirillum seropedicae*, Tese (Doutorado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

PFÄFFL, M.W., Relative Quantification In: DORAK, T.M., **Real-Time PCR**, New York, International University Line, p. 63-82, 2006.

PHILIPPOT, L.; HOJBERG, O. Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. **Biochimica et biophysica acta**, v.1446, p. 1-23, 1999.

POSTGATE, J., Nitrogenase., **Biologist.**, v.32, p. 43-48, 1985.

REITZER, L.J., MAGASANIK, B., Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.82, p. 1979-1983, 1985.

REYES, F.; GAVIRA, M.; CASTILLO, F.; MORENO-VIVIAN, C., Periplasmic nitrate-reducing system of the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158: transcriptional and mutational analysis of the *napKEFDABC* gene cluster. **Biochem.J.**, v. 331, p.897-904, 1998.

RICHARSON, D.J., BERKS, B.C.; RUSSEL, D.A.; SPIRO, S.; TAYLOR, C.J., Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases., **CMLS Cell. Mol. Life Sci.**, v. 58, p. 165-178, 2001.

RONCATO-MACCARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.; SOUZA, E.M., Root colonization systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling., **Symbiosis**, v. 35, p. 261-270, 2003.

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

SATOH, T. Soluble dissimilatory nitrate reductase containing cytochrome c from a photodenitrifier, *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. *Denitrificans.*, **Plant. cell. Physiol.** v. 22, p. 443-452, 1981.

SHARMA, V.; NORIEGA, C. E.; ROWE, J. J., Involvement of NarK1 and NarK2 proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1., **APPL. Environ. Microbiol.**, v. 72, no. 1, p. 659-701, 2006.

SODERGREN, E.J.; HSU, P.; DeMOSS, J.A., Roles of the *narJ* and *narI* genes products in the expression of nitrate reductase in *Escherichia coli.*, *J. Biol. Chem.*, v. 236, n^o 31, p. 16156-16162, 1988.

STEWART, V.; PARALES, J., Identification and expression of genes *narL* and *narX* the nar (Nitrate Reductase) locus in *Escherichia coli* K-12., **J. Bacteriol.**, v. 170, no.4, p. 1589-1597, 1988.

STEWART, V.; PARALES, J.; MERKEL, J.R.; MERKEL, S. M., Structure of genes *narL* and *narX* of the *nar* (Nitrate Reductase) locus in *Escherichia coli* K-12., **J. Bacteriol.**, v. 171, no.4, p. 2229-2234,1989.

STEWART, V.; LU, Y.; DARWIN A.J. Periplasmic nitrate reductase (Nap ABC enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12., **J. Bacteriol.**, v.184, p. 1314-1323, 2002.

STOCK, A.M.; ROBINSON, V.L.; GOUDRERAU, P.N., Two-component signal transduction., **Annu. Rev. Biochem.**, v.69 p.183-215, 2000.

TWERDOCHLIB, A.L.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M; PEDROSA,F.O.; STEFFENS, M.B.R.; YATES,G.; RIGO,L.U., Expression, purification, and DNA-binding activity of the solubilized NtrC protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**, v.30, p. 117-123, 2003.

WEST, A. H.; STOCK, A. M., Histidine Kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems., **TRENDS in Biochemical Sciences.**, v.26, p. 369-376, 2001.

YOUNG, J.P.W., Philogenetic classification of nitrogen-fixing organisms., In: G. Stacey, R.H. Burris and H.J. Evans (Ed)., **Biological Nitrogen Fixation.**, London: Chapman & Hall, p.43-86, 1992.

ZAHRAN, H.H., *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate., **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63,n.4, p. 986-989, 1999.