

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**NAJARA NOGARI DE MELLO**

**Obtenção de uma estirpe mutante *ntrC*<sup>-</sup> de *Rhizobium* sp. NGR234**

**CURITIBA**

**2013**

**NAJARA NOGARI DE MELLO**

**Obtenção de uma estirpe mutante *ntnC*<sup>-</sup> de *Rhizobium* sp. NGR234**

Monografia apresentada para conclusão do  
Curso de Bacharelado em Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do  
Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Claudia Bonatto

**CURITIBA**

**2013**

## RESUMO

O nitrogênio é o nutriente mais abundante na matéria viva, participando na composição de moléculas de ácidos nucleicos, proteínas e carboidratos, entre outras. Bactérias diazotróficas são capazes de converter  $N_2$  atmosférico a  $NH_3$ , através do processo de fixação biológica de nitrogênio. Na maioria das proteobactérias o metabolismo de nitrogênio é controlado pelo sistema NTR. As proteínas NtrB e NtrC, um sistema de dois componentes, fazem parte do sistema NTR, onde, NtrB é a proteína sensora controlada pelos níveis de amônio intracelular, e NtrC um ativador transcricional controlado por NtrB. Quando o nível de amônio disponível é baixo, a proteína NtrC-P ativa a transcrição de genes envolvidos em vias alternativas para a obtenção de amônio, entre estas a fixação de nitrogênio. *Rhizobium* sp. NGR234 é uma bactéria diazotrófica, gram-negativa, capaz de estabelecer simbiose com cerca de 112 gêneros de legumes. Neste organismo pouco se conhece sobre o controle do metabolismo de nitrogênio e da fixação que ocorre nos nódulos. O objetivo deste trabalho foi obter uma estirpe mutante com deleção do gene *ntrC* de *Rhizobium* sp. NGR234, para possibilitar o estudo da função da proteína NtrC no metabolismo de nitrogênio deste organismo. Para tanto, foram feitas construções para a obtenção de uma estirpe mutante *ntrC* de NGR234. As regiões inicial e final do gene *ntrC* foram amplificadas e clonadas no vetor pTZ57. Estes fragmentos foram clivados e ligados ao vetor pUC18 para construir um gene truncado sem alteração na fase de leitura. O gene *ntrC* truncado (*ntrC*-Del) foi clonado no vetor pK18mobsacB e esta construção inserida em células de *Rhizobium* sp. NGR234. As células que sofreram dupla recombinação foram selecionadas em meio contendo sacarose.

Palavras chave: *Rhizobium* sp. NGR234, gene *ntrC*, sistema NTR, Fixação de nitrogênio.

## ABSTRACT

Nitrogen is the most abundant nutrient in living matter, it participates in the composition of nucleic acid molecules, proteins and carbohydrates, among others. Diazotrophic bacteria are capable of converting atmospheric  $N_2$  to  $NH_3$ , through the process of biological nitrogen fixation. In most proteobacteria, nitrogen metabolism is controlled by the NTR system. NtrB and NtrC proteins are two component system, forming part of NTR. In organisms which were studied, NtrB is a sensor protein controlled by intracellular levels of ammonium, and NtrC is a transcriptional activator controlled by NtrB. When the ammonium level available is low, the NtrC-P protein activates transcription of genes involved in alternative routes for to obtain ammonium, including nitrogen fixation. *Rhizobium* sp. NGR234 is a gram-negative diazotrophic bacterium, which is capable of establish symbiosis with about 112 genera of vegetables. In this organism, nitrogen metabolism control and nitrogen fixation regulation are poorly known systems. The objective of this study was obtain an *ntrC* mutant strain of *Rhizobium* sp. NGR234, to study the NtrC protein functions in nitrogen metabolism of this organism. For this purpose, plasmids constructions were done to obtain a *Rhizobium* sp. NGR234 *ntrC* mutant strain. The beginning and end regions of *ntrC* gene were amplified and cloned into the vector pTZ57. These fragments were cleaved and bound to pUC18 vector to construct a truncated *ntrC* gene with the same translational frame. The truncated *ntrC* gene (*ntrC*-Del) was cloned into the vector pK18mobsacB and this construct was inserted into *Rhizobium* sp. NGR234. The double recombinant cells were selected in medium containing sucrose.

Key-words: *Rhizobium* sp. NGR234, *ntrC* gene, NTR system, Nitrogen fixation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b> - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM <i>Escherichia coli</i> .....	12
<b>QUADRO 1</b> - ESTIRPES E PLASMÍDEOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	18
<b>QUADRO 2</b> - SEQUÊNCIA DOS PRIMERS UTILIZADOS.....	21
<b>FIGURA 2</b> - ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS PRIMERS E AS REGIÕES AMPLIFICADAS.....	24
<b>FIGURA 3</b> - ELETROFORESE REPRESENTANDO A AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES INICIAL E FINAL DO GENE <i>ntrC</i> DE <i>RHIZOBIUM</i> sp. NGR 234.....	25
<b>FIGURA 4</b> - MAPA DO VETOR pTZ57R/T (FERMENTAS).....	26
<b>FIGURA 5</b> - ELETROFORESE REPRESENTANDO A CLONAGEM DAS REGIÕES INICIAL E FINAL DO GENE <i>ntrC</i> NO VETOR pTZ57R/T.....	27
<b>FIGURA 6</b> - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA REGIÃO <i>ntrC</i> -Del DE 767 PARES DE BASES .....	28
<b>FIGURA 7</b> - ELETROFORESE REPRESENTANDO A CLONAGEM DAS REGIÕES INICIAL E FINAL DO GENE <i>ntrC</i> NO VETOR pUC 18.....	28
<b>FIGURA 8</b> - MAPA DO VETOR pK18mobsacB.....	29
<b>FIGURA 9</b> - ELETROFORESE REPRESENTANDO A CLONAGEM DO GENE TRUNCADO <i>ntrC</i> -Del NO VETOR pK18.....	29

## SUMÁRIO

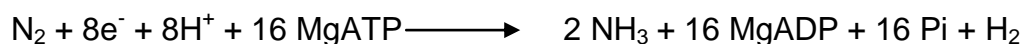
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
1.1	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO .....	6
1.2	<i>RHIZOBIUM</i> sp. NGR234.....	8
1.3	INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA.....	8
1.4	REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.....	10
1.5	SISTEMA NTR.....	12
1.6	PROTEÍNA NtrC.....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>18</b>
3.1	ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS.....	18
3.2	CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	19
3.3	PREPARO DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES.....	19
3.4	TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO.....	19
3.5	PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS EM PEQUENA ESCALA.....	20
3.6	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	20
3.7	DELINEAMENTO DOS PRIMERS PARA O GENE <i>ntrC</i> DE <i>RHIZOBIUM</i> sp. NGR234.....	21
3.8	AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES INICIAL E FINAL DO GENE <i>ntrC</i> DE <i>RHIZOBIUM</i> sp. NGR 234.....	22
3.9	CLONAGEM DAS REGIÕES INICIAL E FINAL DO GENE <i>ntrC</i> DE <i>RHIZOBIUM</i> sp. NGR234.....	22
3.10	OBTENÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE <i>ntrC</i> <sup>-</sup> DE <i>RHIZOBIUM</i> sp. NGR234.....	23
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
4.1	CONSTRUÇÃO DOS PRIMERS.....	24
4.2	AMPLIFICAÇÃO REGIÕES INICIAL E FINAL DO GENE <i>ntrC</i> DE <i>RHIZOBIUM</i> sp. NGR 234.....	24
4.3	OBTENÇÃO DO GENE <i>ntrC</i> TRUNCADO ( <i>ntrC</i> -Del).....	25
4.3.1	Clonagem das regiões inicial e final do gene <i>ntrC</i> no vetor pTZ57R/T.....	25
4.3.2	Clonagem das regiões inicial e final do gene <i>ntrC</i> no vetor pUC 18.....	27
4.3.3	Clonagem do gene truncado <i>ntrC</i> -Del no vetor pK18.....	28
4.4	OBTENÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE <i>ntrC</i> DE <i>Rhizobium</i> sp. NGR234..	30
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>32</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>33</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

O nitrogênio constitui o nutriente mais importante para o crescimento de plantas em ambiente natural (FRANCO; DOBEREINER, 1994), sendo de extrema importância para o meio ambiente e a agricultura mundial (DIXON; KAHN, 2004). Apesar da relevância para organismos vivos, a maior parte desse elemento encontra-se na natureza sob a forma de dinitrogênio (N<sub>2</sub>), indisponível para os seres vivos. O N<sub>2</sub> compõe cerca de 78% do ar atmosférico e, devido à sua tripla ligação, corresponde a uma forma de gás quimicamente muito estável em condições ambientais (SPRENT; SPRENT, 1990; EVANS; BURRIS, 1992). Por isso, antes de ser incorporado a um sistema biológico ele deve ser combinado com o hidrogênio para formar NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, em um processo denominado de fixação de nitrogênio (BRILL, 1977).

Esta conversão do nitrogênio atmosférico em amônia é realizada por bactérias diazotróficas, disponibilizando, desta forma, o nitrogênio a todos os indivíduos da cadeia alimentar. A reação de redução do N<sub>2</sub> é catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase. Esta conversão requer um mínimo de 16 mols de ATP para reduzir 1 mol de N<sub>2</sub> a 2 mols de amônia, o que representa um alto custo energético (POSTGATE, 1982):



Os organismos diazotrofos segundo Evans e Burris (1992) são caracterizados em três grupos: diazotrofos de vida livre, que fixam o nitrogênio para seu próprio uso; diazotrofos associativos, que contribuem para o crescimento da planta a qual se associam, mas não formam estruturas diferenciadas e não estabelecem uma simbiose; e os diazotrofos simbióticos, como os rizóbios, que estabelecem uma interação muito estreita com a planta infectada, quando sinais moleculares trocados entre o vegetal e a bactéria são compatíveis, podendo formar estruturas diferenciadas denominadas nódulos.

Parte do nitrogênio fixado na agricultura global provém da FBN, considerada um dos mais importantes processos biológicos do planeta, já que o nitrogênio está

presente nos aminoácidos, proteínas, DNA, RNA e em outras moléculas e estruturas celulares. Entretanto, a maior parte é derivada de fertilizantes nitrogenados produzidos quimicamente através da síntese de amônia pelo processo de Haber-Bosch (SMITH, 2002). As necessidades para essa síntese são hidrogênio (proveniente de gás de petróleo), catalisador contendo ferro, temperaturas que chegam a 600°C e pressões de até 800 atm (HUNGRIA; VARGAS; ARAÚJO, 1997). Conseqüentemente, o custo econômico para a síntese química de fertilizantes nitrogenados é muito alto (BRILL, 1977), além da necessidade de fontes de energia não renováveis, o que aumenta o consumo das reservas destes combustíveis (DILWORTH, 1974). Deve-se considerar ainda a poluição ambiental causada pelo uso indiscriminado desses insumos agrícolas, pois a lixiviação do nitrogênio resulta em acúmulo de formas nitrogenadas nas águas dos rios, lagos e lençóis subterrâneos, podendo atingir níveis tóxicos aos peixes e ao homem (HUNGRIA *et al.*, 2001).

Desta forma, a fixação biológica de nitrogênio é uma alternativa para a redução na aplicação de fertilizantes nitrogenados e para um manejo sustentável dos solos (HUNGRIA; VARGAS, 2000; GLIESSMAN, 2001), além de garantir um ecossistema em equilíbrio e o desenvolvimento de uma agricultura menos agressiva ao ambiente.

A produtividade das culturas de leguminosas está intimamente relacionada a associações simbióticas entre plantas e microrganismos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico. A taxa de fixação dos rizóbios varia conforme a espécie e as condições abióticas do solo, mas com a aplicação do inoculante adequado e a correção de outros nutrientes, é possível obter altas taxas de fixação. Em termos de quantidade de nitrogênio fixado por ano na agricultura, os diazotrofos que mais contribuem são os encontrados em raízes de plantas (ALI *et al.*, 2000). Quando a associação entre esses microrganismos e seus hospedeiros é eficiente, o N<sub>2</sub> fixado pode suprir quase todas as necessidades do vegetal, como observado em cana-de-açúcar, cultivada há décadas no Brasil sem necessidade de adição de grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados (DOBEREINER; BALDANI; REIS, 2000). Em leguminosas estima-se que a contribuição de nitrogênio fixado biologicamente represente pelo menos o dobro da fixação química (PEOPLES; CRASWELL, 1992).

Desta forma, os diazotrofos possuem um papel importante na agricultura de gramíneas e leguminosas.



## 1.2 *Rhizobium* sp. NGR234

*Rhizobium* sp. NGR234 é uma bactéria gram-negativa do solo capaz de se associar às leguminosas formando nódulos onde fixa nitrogênio atmosférico. Essa estirpe é capaz de nodular as raízes de mais de 112 gêneros de plantas da família *Fabaceae*, além do gênero *Parasponia*. Devido à larga faixa hospedeira, o NGR234 é um modelo de estudos em mecanismos moleculares que controlam a cascata regulatória da nodulação (PUEPPKE; BROUGHTON, 1999).

O genoma do *Rhizobium* sp. NGR234 é dividido em três *replicons*: um cromossomo de 3,93 Mb, que codifica a maioria das funções necessárias para o crescimento celular, um megaplasmídeo e um plasmídeo simbiótico (FREIBERG *et al.*, 1997; SCHMEISSER *et al.*, 2009). Este último, chamado de pNGR234a, possui 536 Kb e apresenta a maioria dos genes relacionados à nodulação e fixação de nitrogênio. Além disso, seu sequenciamento confirmou a existência de um sistema de secreção do tipo III (T3SS) completo e ativo. O megaplasmídeo, ou pNGR234b, contém os genes responsáveis pela síntese dos polissacarídeos de superfície (FLORES *et al.*, 1998) e possui mais de 2,43 Mb (SCHMEISSER *et al.*, 2009). Análises comparativas indicam que NGR234 pode ter incorporado grande parte do conteúdo genético do pNGR234b de outros microrganismos do solo que se associam a plantas (STREIT *et al.*, 2004).

O genoma de *Rhizobium* sp. NGR234 possui todos os genes que controlam o metabolismo de nitrogênio nas proteobactérias, chamado sistema NTR (MERRICK; EDWARDS, 1995; SCHMEISSER *et al.*, 2009). No entanto, o funcionamento deste sistema ainda não foi estudado neste organismo. Em enterobactérias, o sistema NTR é composto por sete proteínas, entre elas o sistema de dois componentes NtrB/NtrC. Em condições de baixa disponibilidade de amônia, o sistema NTR ativa vias alternativas para obtenção de nitrogênio. Uma destas vias é a fixação biológica de nitrogênio. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de uma estirpe mutante, para possibilitar o estudo da função do gene *ntrC* de *Rhizobium* sp. NGR234.

## 1.3 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

O processo de fixação de nitrogênio realizado pelas bactérias diazotróficas, entre elas os chamados rizóbios, pode otimizar a produção de leguminosas de

interesse agrícola, por meio de associações simbióticas entre as plantas e estes organismos capazes de reduzir enzimaticamente o nitrogênio atmosférico à amônia, incorporando dessa forma o nitrogênio atmosférico à biomassa.

O nome rizóbio refere-se aos microrganismos fixadores de nitrogênio que estabelecem uma relação simbiótica com a planta infectada e engloba os gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Bradyrhizobium* (DILWORTH; GLENN, 1991; PATRIARCA; TATE; LACCARINO, 2002; DIXON; KAHN, 2004). As principais plantas com quem os rizóbios interagem e realizam a fixação do nitrogênio, pertencem às leguminosas, entre elas às da família *Fabaceae*.

A interação simbiótica entre rizóbios como *Rhizobium* sp. NGR234 e plantas leguminosas é de grande importância para o desenvolvimento agrícola. A associação possibilita de maneira eficiente a transferência de nitrogênio fixado para a planta, a partir de estruturas formadas na raiz denominadas nódulos, onde as bactérias ficam restritas. A planta retribui provendo nutrientes ricos em energia e um ambiente protegido para as bactérias. O nódulo também possibilita a formação de um ambiente com baixa concentração de oxigênio ( $O_2$ ), o que é necessário para o funcionamento da nitrogenase, uma vez que esta é inativada por  $O_2$ . Entretanto, uma quantidade mínima de  $O_2$  deve estar presente para que as bactérias possam produzir energia. Para tanto, uma proteína transportadora de  $O_2$  chamada leghemoglobina controla de maneira precisa a quantidade de  $O_2$  presente no nódulo (FISHER; NEWTON, 2002).

A simbiose entre planta e bactéria começa na rizosfera, quando as bactérias são quimiotaticamente atraídas para as plantas hospedeiras em resposta a compostos como flavonoides, fenóis, açúcares, ácidos dicarboxílicos e aminoácidos, que são exsudados pelas raízes das plantas (BRENCIC; WINANS, 2005). Dentre esses compostos, os flavonoides são os de maior importância para a interação, pois desencadeiam a expressão coordenada de uma série de genes do rizóbio envolvidos na nodulação, incluindo os genes *nod / nol / noe*, referidos coletivamente como genes *nod*, que são essenciais para a infecção da raiz do hospedeiro e o estabelecimento do nódulo (MARTÍNEZ; ROMERO; PALACIOS, 1990). Estes genes estão localizados em um *cluster* e são altamente conservados tanto na sequência de DNA como na sua função (MARTÍNEZ; ROMERO; PALACIOS, 1990).

Uma vez reconhecidos, os fatores Nod induzem uma série de eventos iniciais na planta, que inclui deformação dos pêlos radiculares, despolarização das

membranas, flutuações nos níveis de cálcio intracelular das raízes, alterações no citoesqueleto das células radiculares, formação do cordão de pré-infecção, multiplicação das células corticais e desenvolvimento do nódulo (DOWNIE; WALKER, 1999; BARTSEV; KOBAYASHI; BROUGHTON, 2004; OLDROYD; DOWNIE, 2004; GEURTS; FEDOROVA; BISSELING, 2005).

#### 1.4 REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

Visto que o funcionamento da nitrogenase consome grande quantidade de energia, utilizando grande quantidade de moléculas de ATP, para reduzir o nitrogênio atmosférico, tanto a síntese quanto a atividade deste complexo enzimático são reguladas.

Em alguns diazotrofos, a atividade da nitrogenase é controlada por meio de um mecanismo de inativação reversível por ADP-ribosilação da proteína NifH (dinitrogenase redutase) (MERRICK; EDWARDS, 1995). Este controle pós-traducional já foi caracterizado em organismos como *Azospirillum brasilense*, *Rhodospirillum rubrum*, *Azospirillum lipoferum* e *Rhodobacter capsulatus* (LUDDEN; ROBERTS, 1989; ZHANG *et al.* 1997; HUERGO *et al.* 2006a, HUERGO *et al.* 2006b). Duas enzimas são responsáveis por esta reação reversível, DraT e DraG. Na presença de  $\text{NH}_4^+$ , a enzima DraT (dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase) transfere uma ADP-ribose para uma subunidade da proteína NifH, resultando na inativação desta enzima. Quando os níveis de amônia diminuem, o grupo ADP-ribose é removido da proteína NifH pela enzima DraG (glicohidrolase ativadora da dinitrogenase redutase), restaurando a atividade da nitrogenase.

A formação da estrutura da nitrogenase e sua atividade dependem da expressão dos genes *nif*. Em *Klebsiella pneumoniae* foram identificados 20 genes *nif*, dos quais 14 são essenciais para a produção da nitrogenase ativa (MERRICK; CHAMBERS, 1992). Em muitas bactérias diazotróficas, a transcrição dos genes *nif* depende da RNA polimerase contendo o fator  $\sigma^{54}$  e de um ativador transcricional específico, a proteína NifA (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). NifA se liga a uma sequência ativadora a montante, caracterizada por um motivo TGTN10ACA, que está localizada cerca de 100 pb a montante dos promotores de genes *nif* (MORETT; BUCK, 1988). A proteína NifA liga-se ao fator  $\sigma^{54}$  por meio da holoenzima RNA-polimerase a jusante do promotor através uma dobra do DNA e

catalisa a formação de complexo aberto numa reação dependente de ATP (DIXON; KAHN, 2004).

Em muitos diazotrofos, a atividade da proteína NifA é controlada pelos níveis de amônia e oxigênio, permitindo a expressão dos genes *nif* apenas quando a fixação de nitrogênio é necessária. As proteínas NifA de muitas bactérias diazotróficas são estruturalmente semelhantes, mostrando três domínios funcionais ligados por dois interdomínios (DIXON; KAHN, 2004; FISCHER; BRUDERER; HENNECKE, 1988). O domínio amino-terminal (N-terminal, GAF) é menos conservado entre os microrganismos, mostrando um número variável de aminoácidos, e em várias bactérias diazotróficas este domínio está envolvido no controle da atividade da proteína NifA em resposta ao nitrogênio (FISCHER; BRUDERER; HENNECKE, 1988; MONTEIRO *et al.*, 2001). O domínio central é altamente conservado e está envolvido na interação com o fator  $\sigma^{54}$  da RNA-polimerase, mostrando um motivo AAA envolvido na hidrólise de ATP (GONZALEZ *et al.*, 1998). O domínio carboxi-terminal (C-terminal) contém um motivo hélice-volta-hélice conservado responsável pela ligação ao DNA (DIXON; KAHN, 2004; FISCHER; BRUDERER; HENNECKE, 1988).

Embora as proteínas NifA tenham estruturas similares, o controle de sua atividade através de oxigênio e nitrogênio varia significativamente entre os organismos (REYES-RAMIREZ; LITTLE; DIXON, 2001). Nos diazotrofos da subdivisão  $\gamma$  das proteobactérias, como *K. pneumoniae* e *Azotobacter vinelandii*, a atividade da proteína NifA é controlada pela proteína NifL. Nestes organismos, sob altas concentrações de amônia e/ou oxigênio, NifL e NifA formam um complexo e NifL funciona como inibidor da atividade da proteína NifA (LITTLE *et al.*, 2000; STIPS *et al.*, 2004). Em condições limitantes de amônia e oxigênio, o complexo NifL-NifA é desfeito e NifA permanece na forma ativa. Já em outras proteobactérias como *A. brasilense*, *Rhodospirillum rubrum* e *Herbaspirillum seropedicae* um gene homólogo a NifL não foi detectado. Nestes organismos, o controle da atividade de NifA também responde aos níveis de amônia e oxigênio e envolve outras proteínas (ARSENE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996; ZHANG; CHAIT, 2000; NOINDORF *et al.*, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2008).

## 1.5 SISTEMA NTR

As bactérias podem utilizar uma série de compostos como fonte de nitrogênio, incluindo compostos inorgânicos simples como dinitrogênio ( $N_2$ ) e nitrato até aminoácidos e nucleosídeos. Em praticamente todas as células, glutamato e glutamina são os principais doadores de nitrogênio para reações biossintéticas (MERRICK; EDWARDS, 1995). Quando os níveis de amônia no meio são insuficientes para a formação de glutamato e glutamina, o sistema NTR aciona as vias alternativas do metabolismo de nitrogênio para a obtenção de amônia. A fixação biológica de nitrogênio é uma das vias alternativas reguladas pelo sistema NTR.

Em enterobactérias o sistema NTR é composto por sete proteínas: o sistema de dois componentes NtrB-NtrC (produtos dos genes *ntrB* e *ntrC*), as proteínas do tipo PII, GlnB e GlnK (produtos dos genes *glnB* e *glnK*), as enzimas bifuncionais GlnD e GlnE (produtos dos genes *glnD* e *glnE*) e a enzima glutamina sintetase (GS) (produto do gene *glnA*). A proteína AmtB (produto do gene *amtB*) também tem sido considerada como integrante do sistema NTR de *E. coli* (JAVELLE; MERRICK, 2005) (Figura 1).

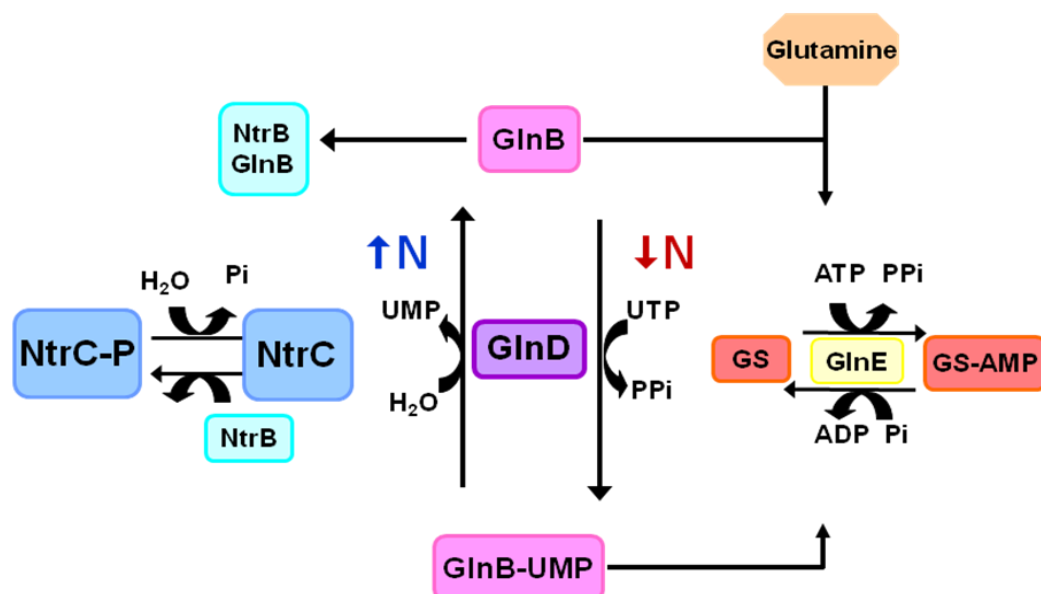


FIGURA 1: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM *Escherichia coli*

FONTE: Adaptado de JIANG; PELISKA; NINFA, 1998

O sistema de dois componentes NtrB/NtrC consiste de um sensor histidina quinase (HK), NtrB, que controla a atividade de NtrC, o regulador de resposta. A

proteína NtrC é um ativador transcricional de promotores dependentes do fator  $\sigma$ <sup>54</sup> da RNA polimerase (KUSTU *et al.*, 1989; MORETT; SEGOVIA, 1993). A atividade da proteína NtrB é controlada pela proteína GlnB, que também interage com as proteínas GlnD e GlnE (ADLER; PURICH; STADTMAN, 1975; ENGLEMAN; FRANCIS, 1978; KAMBEROV *et al.*, 1994a; KAMBEROV *et al.*, 1994b; ATKINSON *et al.* 1994).

Alguns organismos também possuem as proteínas NtrX e NtrY, que assim como NtrB e NtrC são membros de um sistema de dois componentes, onde NtrY é a proteína sensora e NtrX, a reguladora de resposta (PAWLOWSKI; KLOSSE; BRUIJN, 1991). Da mesma forma, a atividade da proteína NtrX é controlada pela proteína NtrY através de fosforilação. No entanto, estas proteínas não são amplamente distribuídas como NtrB e NtrC, mas foram identificadas em algumas bactérias fixadoras de nitrogênio, como *Azorhizobium caulinodans* (PAWLOWSKI; KLOSSE; BRUIJN, 1991), *Mesorhizobium loti* (KANEKO *et al.*, 2000), *Sinorhizobium meliloti* (CAPELA; BARLOY-HUBLER; GOUZY, 2001), *Azospirillum brasilense* (ISHIDA *et al.*, 2002), *Rhizobium* sp. NGR234 (SCHMEISSER *et al.*, 2009) e *Herbaspirillum seropedicae* (PEDROSA *et al.*, 2011).

Em *E. coli*, onde o sistema NTR é bem caracterizado, quando os níveis de amônia intracelular estão baixos, a proteína GlnD tem atividade de uridililtransferase e transfere um grupo uridilil para o resíduo Tyr 51 de um dos monômeros da proteína GlnB (reação de uridililação) (SON; RHEE, 1987). GlnB-UMP não interage com a proteína NtrB, que na forma livre tem atividade de quinase e catalisa sua autofosforilação no resíduo His 139 (WEISS; MAGASANIK, 1988). Este grupamento fosforil é transferido para o resíduo Asp 54 do domínio N-terminal da proteína NtrC (SANDERS *et al.*, 1992; KLOSE; WEISS; KUSTU, 1993). Na forma fosforilada, NtrC-P ativa a transcrição de genes envolvidos com o metabolismo de nitrogênio (MERRICK; EDWARDS, 1995). Quando os níveis de amônia sobem, a proteína GlnD desuridilila GlnB, retirando um grupo uridilil. GlnB desuridililada interage com NtrB, estimulando a desfosforilação de NtrC, que fica inativa.

A atividade de GS também responde aos níveis de amônia disponíveis. Em condições de excesso de amônia, GS é inativada por adenililação. Este processo é catalisado pela enzima GlnE e requer a presença de GlnB não modificada e glutamina (STADTMAN *et al.*, 1970; JAGGI *et al.*, 1997). Em níveis baixos de

amônia e na presença de GlnB-UMP, GlnD catalisa a desadenililação de GS, ativando-a (STADTMAN *et al.*, 1970; JAGGI *et al.*, 1997).

Em bactérias diazotróficas simbióticas, a transcrição de NifA e dos genes *fix* é predominantemente controlada em resposta ao nível de oxigênio pelo sistema de dois componentes FixL-FixJ, em conjunto com FixK e o sistema RegB-RegA (DIXON; KAHN, 2004). Na ausência de oxigênio, a proteína FixL transfere um grupo fosforil para FixJ. FixJ-P pode ativar a transcrição de genes como *nifA* e *fixK*, dependendo do organismo. A ligação reversível de oxigênio a porção heme de FixL impede a atividade de quinase (TUCKERMAN *et al.*, 2002).

O sistema de dois componentes RegB-RegA responde ao status redox da célula e controla a expressão de NifA em alguns organismos. Em *Rhodobacter capsulatus*, o regulador de resposta RegA atua em conjunto com NtrC para a ativar a transcrição de NifA (ELSEN *et al.*, 2000). Em *B. japonicum*, as proteínas RegS e RegR (homólogos de RegB e RegA) controlam a expressão de *nifA* durante a simbiose (EMMERICH *et al.*, 2000).

## 1.6 PROTEÍNA NtrC

Em enterobactérias, os genes que codificam para as proteínas glutamina sintetase (GS), NtrB e NtrC fazem parte de um único operon, *glnAntrBntrC* (PAHEL; ROTHSTEIN; MAGASANIK, 1982; ALVAREZ-MORALES *et al.*, 1984; KRAJEWSKA-GRYNKIEWICZ; KUSTU, 1984). O gene *glnA*, é expresso a partir de dois promotores em tandem *glnAp1* e *glnAp2*, enquanto que os genes *ntrBC* são expressos juntamente a partir destes promotores ou a partir de um promotor separado, *pntrBC*, situado entre e *glnA* e *ntrBC* (DIXON, 1984; MACFARLANE; MERRICK, 1985; REITZER; MAGASANIK, 1985). Sob condições suficientes de nitrogênio, *glnA* é expressa a partir de *glnAp1*, via RNA polimerase  $\sigma^{70}$ . Quando as condições de nitrogênio são limitantes, a ligação de NtrC a sítios que se sobrepõem a *glnAp1* serve para reprimir a expressão a partir de *glnAp1*, enquanto ativa a transcrição a partir de *glnAp2* via RNA polimerase  $\sigma^{54}$ . Esta transcrição ocorre a um nível elevado em comparação com a que ocorre a partir de *glnAp1*, e uma proporção destes transcritos incluem *ntrBC* (REITZER; MAGASANIK, 1983).

Esta organização transcricional de *ntrBC* não é encontrada em todas as proteobactérias. Em *Azospirillum brasilense*, o gene *glnA* é cotranscrito com *glnB* e

o gene *ntrC* encontra-se no operon *nifRntrBntrC*, seguido pelo operon *ntrYntrX* (MACHADO *et al.*, 1995; ISHIDA *et al.*, 2002). Em *Rhizobium* sp. NGR234 a sequência *nifRntrBntrC ntrYntrX* também é encontrada, com sobreposição dos genes *nifR* e *ntrB*, *ntrB* e *ntrC* e *ntrY* e *ntrX* (SCHMEISSER *et al.*, 2009). Uma sequência intergênica de 207 nucleotídeos separa os genes *ntrC* e *ntrY* (SCHMEISSER *et al.*, 2009). Análises da sequência de *Rhizobium* sp. NGR234 sugerem a presença de um promotor a montante do gene *nifR* e outro a montante do gene *ntrY*. A atividade promotora destas regiões foi avaliada através da expressão de GFP e resultados preliminares mostraram que as duas regiões, a montante de *nifRntrBntrC* e de *ntrYntrX*, são capazes de promover a transcrição gênica (dados não publicados).

As proteínas NtrB e NtrC constituem um sistema de regulação de dois componentes. Este tipo de sistema, que foi amplamente descrito em procariotos e também reconhecido em eucariotos (SWANSON; ALEX; SIMON, 1994), compreende tipicamente uma proteína sensorial histidina quinase (como NtrB) e um regulador de resposta (como NtrC), que muitas vezes é uma proteína de ligação ao DNA (STOCK; NINFA; STOCK, 1989).

O regulador de resposta NtrC é uma proteína dimérica com uma massa molecular de 55 kDa, caracterizada como uma proteína dependente do ativador transcricional  $\sigma^{54}$  e tem três domínios distintos (MORETT; SEGOVIA, 1993). O domínio N-terminal, com cerca de 12 kDa, é uma característica de reguladores de resposta, constituindo o domínio conservado do receptor, com o qual a proteína interage com um sensor, resultando na fosforilação de um resíduo aspartato conservado (Asp-54) (WEISS; MAGASANIK, 1988; SANDERS *et al.*, 1992; KLOSE; WEISS; KUSTU, 1993). O domínio central possui cerca de 240 aminoácidos e é característico da família de ativadores transcricionais dependentes de  $\sigma^{54}$ . A proteína NtrC tem atividade ATPase, que é essencial para a formação do complexo aberto pela RNAPolimerase  $\sigma^{54}$  (WEDEL; KUSTU, 1995). Esta atividade ATPase é estimulada pela ligação ao DNA e pela fosforilação do resíduo Asp-54.

Apenas a forma fosforilada da proteína é capaz de ativar a transcrição (NINFA; REITZER; MAGASANIK, 1987), e substituições por outros resíduos de Asp-54 podem prejudicar significativamente a resposta à limitação de nitrogênio (MOORE; SHIAU; REITZER, 1993). A fosforilação da proteína NtrC é necessária para induzir a oligomerização de dímeros NtrC em sequências a montante do



ativador, que são compostos de pelo menos dois sítios de ligação à NtrC (WEISS; CLAVERIE-MARTIN; MAGASANIK, 1992; METTKER; FIEDLER; WEISS, 1995).

A ligação do dímero ao DNA é mediada pelo domínio C-terminal, que contém uma típica hélice-volta-hélice (CONTRERAS; DRUMMOND, 1988). Este motivo permite o reconhecimento do ativador por NtrC, que normalmente está localizado em torno de 100 pb a montante da sequência do promotor. A função deste ativador é o de facilitar a oligomerização da proteína para formar um complexo contendo pelo menos dois dímeros que são necessários para a ativação da transcrição (KLOSE *et al.*, 1994).

Os produtos dos genes ativados por NtrC possuem três funções principais: mediar a assimilação de amônia através dos intermediários glutamato e glutamina, sintetizando estes intermediários catabolicamente ou diminuir a utilização destes. Entre os produtos gênicos ativados por NtrC encontram-se a glutamina sintetase, o transportador de amônia AmtB, a proteína GlnK, enzimas de transporte e catabolismo de aminoácidos e proteínas regulatórias como Nac (REITZER; MAGASANIK, 1985; FENG *et al.*, 1995; SOUPENE *et al.*, 1998; ZIMMER; SOUPENE; LEE, 2000). Em conjunto, os genes cuja expressão é regulada direta ou indiretamente por NtrC representam quase 2% dos genes de *E. coli* (ZIMMER; SOUPENE; LEE, 2000).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho foi obter uma estirpe mutante *ntrC* de *Rhizobium* sp. NGR234 para análise funcional do gene *ntrC*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificação de partes da sequência do gene *ntrC* a partir do DNA genômico de *Rhizobium* sp. NGR234 e clonagem em vetor de expressão;
- Mutagênese do gene *ntrC* de *Rhizobium* sp. NGR234 através de deleção em fase de parte do gene;
- Obtenção de uma estirpe mutante *ntrC* de *Rhizobium* sp. NGR234 utilizando as construções com o gene truncado.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS

As estirpes de bactérias e plasmídeos que foram utilizados neste trabalho estão listados no quadro 1.

QUADRO 1 – ESTIRPES E PLASMÍDEOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO

Estirpes/ plasmídeos	Genótipo/Fenótipo	Referência
Estirpes		
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F <sup>-</sup> <i>mrcA</i> Δ <i>φ80dlacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>endA1 recA1</i> <i>deoR</i> Δ(( <i>ara,leu</i> )7697 <i>araD139 galU galK nupG rpsL λ</i> )	INVITROGEN
<i>Escherichia coli</i> S17.1	Sm <sup>R</sup> Spm <sup>R</sup> Tra <sup>+</sup> <i>pro his recA hsdR</i> (RP4-2 kan::Tn7 tet;Mu, integrado no cromossomo)	SIMON; PRIEGER; PUHLER, 1983
<i>Rhizobium</i> NGR234	Rif <sup>R</sup> derivado do tipo selvagem de NGR234	TRINICK, 1980
Plasmídeos		
pTZ57R/T	Amp <sup>R</sup> , Vetor de clonagem método T/A	FERMENTAS
pUC18	Amp <sup>R</sup> , Vetor de clonagem	INVITROGEN
pK18mobsacB	Km <sup>R</sup> , <i>sacB</i> , <i>lacZα</i> , Vetor de clonagem que permite a seleção de duplo recombinante	SCHÄFER <i>et al.</i> , 1994
pTZntrC-início	Amp <sup>R</sup> , fragmento de 363 pb, final do gene <i>ntrB</i> e início do gene <i>ntrC</i> de <i>Rhizobium</i> sp. NGR234 no vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZntrC-final	Amp <sup>R</sup> , fragmento de 452 pb, final do gene <i>ntrC</i> e início do gene <i>ntrY</i> de <i>Rhizobium</i> sp. NGR234 no vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pUCntrC-Del	Amp <sup>R</sup> , fragmento de 767 pb, gene <i>ntrC</i> de <i>Rhizobium</i> sp. NGR234 com deleção em fase no vetor pUC18	Este trabalho
pK18ntrC-Del	Km <sup>R</sup> , fragmento de 767 pb, gene <i>ntrC</i> de <i>Rhizobium</i> sp. NGR234 com deleção em fase no vetor pK18 mobsacB	Este trabalho

FONTE: O autor (2013)

NOTA – Estirpes e plasmídeos utilizados neste trabalho

### 3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas a 37°C em meio Luria Broth (LB) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), com adição dos antibióticos necessários. As estirpes de *Rhizobium* sp. NGR234 foram cultivadas a 28°C em meio TY (meio completo) (BROUGHTON *et al.*, 1986), com adição do antibiótico Rifampicina (50 µg/mL).

### 3.3 PREPARO DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES

Um pré-inóculo foi preparado utilizando uma colônia de células de *Escherichia coli* estirpe DH10B, em 5 mL de meio SOB (SAMBROOK *et al.*, 1989) seguido de incubação a 37°C por 24 horas sob agitação constante de 120 rpm. Após esse período 200 µL do pré-inóculo foi reinoculado em 80 mL de meio LB e incubado a 37°C sob agitação constante de 120 rpm até atingir uma D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 0,6. As células foram transferidas para 2 tubos de 40 mL incubadas por 15 minutos em banho de gelo, coletadas por centrifugação (5000 rpm por 5 minutos, a 4°C) na centrífuga 5810 R (Eppendorf), e o sedimento de células foi diluído em 15 mL de uma solução de MgCl<sub>2</sub> (100 mM). Esta solução foi centrifugada novamente, o sobrenadante descartado e o sedimento diluído em 25 mL de uma solução de CaCl<sub>2</sub> (100 mM) e então incubada por 20 minutos em banho de gelo. Em seguida, as células foram coletadas também por centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C, na centrífuga 5810 R (Eppendorf), todo o sobrenadante foi descartado e as células foram dissolvidas em 600 µL de uma solução de CaCl<sub>2</sub> (100 mM) preparada em glicerol 20%. As células foram distribuídas em alíquotas de 100 µL em microtubos previamente gelados e estes armazenados a -80°C.

### 3.4 TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO

Para a transformação de células bacterianas com o DNA plasmidial, 200 ng de DNA foram misturados à uma suspensão de 100 µL de células competentes. Após a incubação por 30 minutos em banho de gelo, a mistura foi levada a banho-maria a 42°C por 45 segundos e incubada novamente em gelo por 5 minutos. Após o choque térmico, as células foram recuperadas em 400 µL de meio LB e incubadas

por uma hora em estufa a 37°C. Após a recuperação 150 µL da suspensão de células foram plaqueadas em meio LA (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) contendo os antibióticos adequados para seleção de colônias transformantes. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

### 3.5 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS EM PEQUENA ESCALA

As colônias obtidas da transformação foram cultivadas em 5 mL de meio LB (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) com antibiótico adequado e incubadas a 37°C por 24 horas sob agitação constante. A cultura bacteriana, contendo o plasmídeo de interesse, foi coletada por centrifugação em alíquotas de 1 mL. O precipitado de células foi dissolvido em 150 µL de solução de GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM) e lisado com a adição de 150 µL de solução de lise (NaOH 0,2 M e SDS 1%). A amostra foi homogeneizada por inversão e deixada por 5 minutos em repouso, até a ocorrência da lise. A neutralização da solução foi feita pela adição de 150 µL de Kacf (acetato de potássio 3 M pH 4,8 e ácido fórmico 1,8 M) e incubada por 10 minutos no gelo, seguida pela adição de 50 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e homogeneizada no vórtex. Após centrifugação por 10 minutos, em rotação máxima na centrífuga minispin plus (Eppendorf), o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo, onde o DNA plasmidial foi precipitado com a adição de 800 µL de etanol 100%. Após 10 minutos de centrifugação, em rotação máxima do mesmo aparelho, o DNA precipitado foi lavado com 800 µL de etanol 80% e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o DNA foi seco em estufa e dissolvido em 15 µL água deionizada estéril.

### 3.6 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

A reação foi feita utilizando dideoxinucleotídeos terminadores de cadeia marcados com fluoróforos (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). O sistema de reação continha 300 ng do DNA obtido a partir da purificação plasmidial contendo o fragmento de interesse, 4µL da mistura para sequenciamento Big Dye (Applied Biosystems), 0,5 µL de primer específico, tendo sistemas contendo Universal (10 pmol), Central/Início (10 pmol), Central/final (10 pmol) e Reverso (10 pmol) e água ultra pura estéril para completar um volume final de 10 µL. A reação foi feita

utilizando o termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) e o programa utilizado foi de 35 ciclos de 3 minutos a 94°C, 30 segundos a 94°C e 1 minuto e meio a 60°C. As amostras foram submetidas no sequenciador 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências foram analisadas utilizando o programa BIO EDIT e comparadas com a sequência do gene *ntrC* obtida a partir da sequência do genoma de *Rhizobium* sp. NGR234.

### 3.7 DELINEAMENTO DOS PRIMERS PARA O GENE *ntrC* de *Rhizobium* sp. NGR234

A sequência de nucleotídeos da região que contém o gene *ntrC* de *Rhizobium* sp. NGR234 foi obtida a partir da sequência do genoma deste organismo (SCHMEISSER *et al.*, 2009). Os *primers* complementares às regiões de interesse do gene *ntrC* foram planejados com base na sequência do genoma. O primer NGR mutC NtrB se sobrepõe a um sítio *EcoRI* presente na sequência de NGR234. Os primers mutC NtrC 35 e mutC NtrC 466 possuem sítios para a enzima *BamHI*, obtidos pela substituição de duas bases em relação a sequência original. O primer mutC NtrY possui um sítio para a enzima *SalI*, também obtidos por duas substituições de nucleotídeos. A análise da sequência para o delineamento dos *primers* foi feita com o auxílio dos programas *PeirPrimer* e *Netprimer*. O quadro 2 mostra os primers utilizados neste trabalho.

QUADRO 2 – SEQUÊNCIA DOS PRIMERS UTILIZADOS

1-NGR mutC NtrB	5' CCGCTGGAATTCTGCGTGCA 3'
2-NGR mutC NtrC 35	5' CGTTCGAGGGGATCCGCACAT 3'
3-NGR mutC NtrC 466	5'CGCAAGAGGATCCGGGAGCT 3'
4-NGR mutC NtrY	5'CAGGCGATGTCGACGTTTCGT 3'

FONTE: O autor (2013)

NOTA - Sequências correspondentes aos sítios para enzimas de restrição estão sublinhados

### 3.8 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES INICIAL E FINAL DO GENE *ntrC* DE *Rhizobium* sp. NGR234

As sequências do início e final do gene *ntrC* foram amplificadas a partir do DNA genômico de *Rhizobium* sp. NGR234 através de reações de PCR (Reação em cadeia da polimerase). O DNA genômico utilizado como molde foi obtido de culturas de *Rhizobium* sp. NGR234 como descrito por CHEN e KUO, 1993 (cedido por Janaína de Sena). O sistema de reação continha 10 pmol de cada *primer*, mutC NtrB e mutC NtrC 35 para a região inicial e mutC NtrC 466 e mutC NtrY para a região final, dNTP 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, Taq DNA Polimerase e DNA cromossomal de *Rhizobium* sp. NGR234. A reação foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) e o programa utilizado foi: um ciclo de 2 minutos a 94°C; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 30 segundos a 72°C e um ciclo final de 5 minutos a 72°C. As amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de ágar na concentração de 1 % em TBE. Os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados e fotografados no aparelho de fotodocumentação Alpha Imager.

### 3.9 CLONAGEM DAS REGIÕES INICIAL E FINAL DO GENE *ntrC* DE *Rhizobium* sp. NGR234

Os fragmentos amplificados a partir do DNA genômico de *Rhizobium* sp. NGR234 foram ligados ao vetor de clonagem pTZ57R/T (sistema de clonagem T/A – Fermentas). O sistema de ligação foi transformado em células de *E. coli* estirpe DH10B. As colônias transformantes foram selecionadas em meio contendo antibióticos. O DNA das colônias foi extraído, digerido com enzimas de restrição e analisados através de eletroforese em gel de agarose. Os plasmídeos obtidos foram denominados pTZNtrC início e pTZNtrC final. A integridade das sequências foi verificada pelo sequenciamento dos insertos clonados.

As sequências contendo partes do gene *ntrC* foram clonadas juntas no vetor pUC18. O plasmídeo pTZNtrC início foi clivado com as enzimas *EcoRI* e *BamHI* e o plasmídeo pTZNtrC final foi digerido com as enzimas *BamHI* e *SalI*. As reações de restrição foram aplicadas em gel de agarose 1% em TBE e os fragmentos correspondentes ao início e final do gene *ntrC* foram cortados do gel e purificados

utilizando o Kit, GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, da GE Healthcare, segundo instruções do fabricante. Os fragmentos foram então ligados ao vetor pUC18 clivado com as enzimas *EcoRI* e *SaII*, de forma que a sequência do gene truncado manteve a mesma fase de leitura do gene intacto. O sistema de ligação foi transformado em células de *E. coli* estirpe DH10B e o DNA das colônias foi extraído e digerido com enzimas de restrição. A presença do fragmento de 767 pb, correspondente as partes inicial e final do gene *ntrC* foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose. O plasmídeo obtido foi denominado pUCntrC-Del. O inserto foi sequenciado para confirmar a fase de leitura do gene *ntrC* truncado (ntrC-Del).

O plasmídeo pUCntrC-Del foi clivado com as enzimas *EcoRI* e *PstI* para liberar o fragmento contendo o gene *ntrC* truncado que foi ligado ao vetor pK18mobsacB clivado com as mesmas enzimas. A ligação foi transformada e as colônias de *E. coli* foram selecionadas em meio contendo canamicina. O DNA das colônias foi extraído e clivado para confirmar a presença do inserto. Os fragmentos com o tamanho esperado foram visualizados em gel de agarose 1% e o plasmídeo foi chamado de pK18ntrC-Del.

### 3.10 OBTENÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE *ntrC* DE *Rhizobium* sp. NGR234

O plasmídeo pK18ntrC-Del, que contém a construção ntrC-Del no vetor pK18mobsacB foi transformado em células de *E. coli* estirpe S.17. As colônias transformantes foram selecionadas em meio contendo antibiótico e conjugadas com células de *Rhizobium* sp. NGR234 como descrito (DITTA *et al.*, 1980). As colônias de *Rhizobium* sp. NGR234 transconjugantes foram selecionadas em meio TY sólido contendo antibióticos seletivos. Estas colônias foram então cultivadas em meio TY contendo sacarose 5% para selecionar os duplo recombinantes.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 CONSTRUÇÃO DOS PRIMERS

A sequência genômica da região que contém o gene *ntrC* de *Rhizobium* sp. NGR234 foi obtida a partir do genoma completo de NGR234 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/3067?project\\_id=59081](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/3067?project_id=59081)) e utilizada para a obtenção dos *primers* necessários para a amplificação das regiões de interesse.

Os primers NGR mutC NtrB e NGR mutC NtrC 35 foram utilizados para a amplificação da região rBC, que corresponde à região final do gene NtrB e início do gene NtrC, enquanto os primers NGR mutC NtrC 466 e NGR mutC NtrY foram utilizados para a amplificação da região rCY, correspondente à região final do gene NtrC e início do gene NtrY (Figura 2).

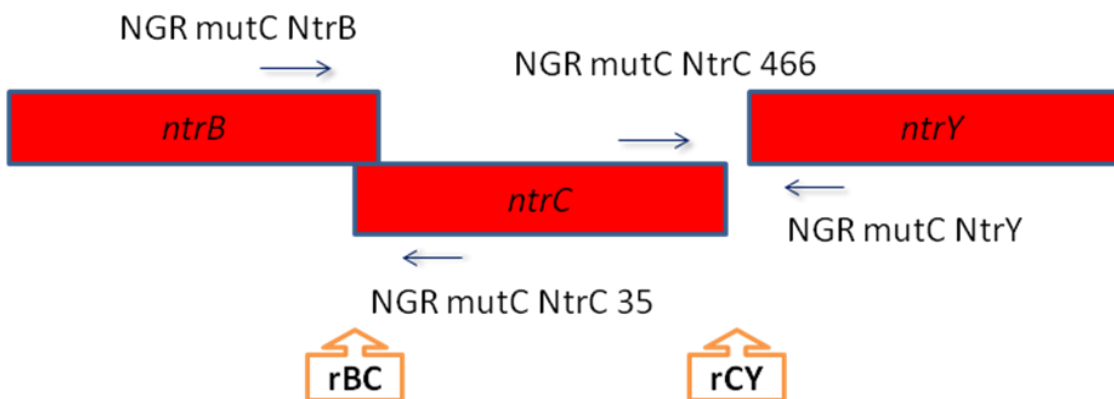


FIGURA 2 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS PRIMERS E DAS REGIÕES AMPLIFICADAS  
FONTE: O autor (2013)

### 4.2 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES INICIAL E FINAL DO GENE *ntrC* DE *Rhizobium* sp. NGR234

Embora seja possível estimar a temperatura de anelamento de primers analisando sua sequência, na prática este valor nem sempre corresponde ao ideal. Para determinar eficientemente a temperatura de anelamento dos primers construídos, realizou-se uma PCR (Reação em cadeia da polimerase) utilizando um gradiente de temperatura de 55 a 65,5 °C. A análise dos produtos de amplificação em gel de agarose indicou que a temperatura ótima foi de 56,6°C para ambos os

pares de primers (Figura 3). A partir desta análise esta temperatura foi utilizada nas PCRs seguintes.

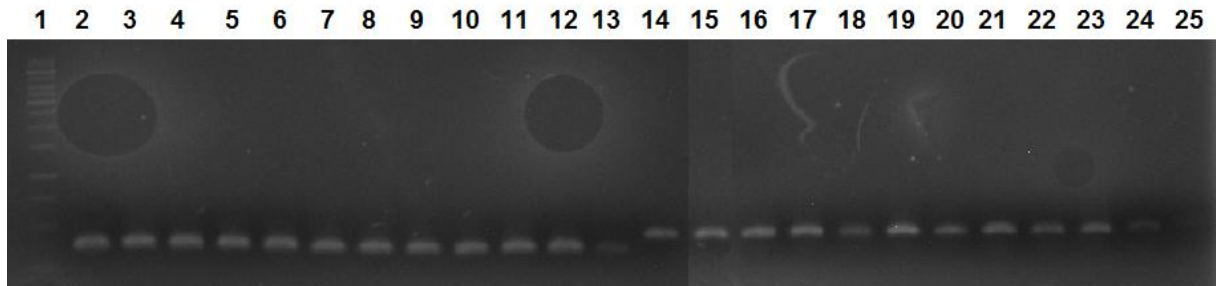


FIGURA 3 – ELETROFORESE REPRESENTANDO A AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES INICIAL E FINAL DO GENE *ntrC* DE *RHIZOBIUM* sp. NGR 234

FONTE: O autor (2013)

NOTA – Gel de ágar 1%, corado com brometo de etídio. Linha 1: marcador de massa molecular 1 Kb ladder (Invitrogen); linhas de 2 a 13 gradiente de temperatura para amplificação da região rBC (363 pb), linhas 14 a 25 gradiente de temperatura para amplificação da região rCY (452 pb)

#### 4.3 OBTENÇÃO DO GENE *ntrC* TRUNCADO (*ntrC*-Del)

Para a obtenção da estirpe mutante de NGR234 *ntrC*<sup>-</sup>, a sequência do gene *ntrC* foi mutagenizada através da deleção de parte de sua sequência. Realizou-se uma deleção de uma região interna do gene *ntrC*, correspondente a 437 aminoácidos (de um total de 484).

##### 4.3.1 Clonagem das regiões inicial e final do gene *ntrC* no vetor pTZ57R/T

Os fragmentos amplificados a partir do DNA genômico de *Rhizobium* sp. NGR234 foram ligados ao vetor pTZ57R/T (Fermentas). Este vetor possui nucleotídeos timina simples fita em suas extremidades e utiliza os nucleotídeos de adenina adicionados às pontas 3' pela Taq DNA polimerase para a ligação com o inserto (Figura 4). Os clones com inserto foram selecionados em placas de meio LA contendo ampicilina, Xgal e IPTG em concentrações adequadas. Dessa forma colônias que não apresentaram a coloração azul decorrente da expressão do gene *lacZ*, mas sim as que apresentaram a coloração branca, foram selecionados.

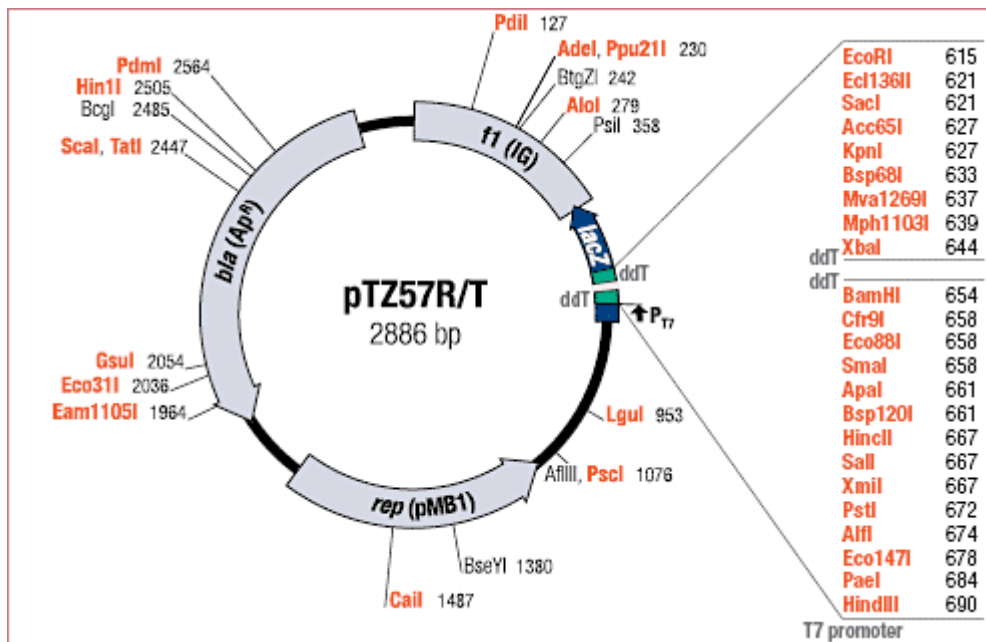


FIGURA 4 – MAPA DO VETOR pTZ57R/T

FONTE: Fermentas

Para confirmar a presença do inserto, o DNA das colônias selecionadas foi extraído, tratado com enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* para o fragmento com o início do gene *ntrC*, e *BamHI* e *SalI* para o fragmento com o final do gene *ntrC* e analisado através de eletroforese (Figuras 5). Em pelo menos um clone de cada amplicon foi confirmado pela presença dos fragmentos de tamanho esperado. Os clones obtidos foram sequenciados utilizando primers complementares ao vetor pTZ57 (Universal e Reverso). Dessa forma, confirmou-se a construção de clones pTZNtrC início, contendo a região rBC, e pTZNtrC final, contendo a região rCY sem nenhuma alteração da sequência de interesse.

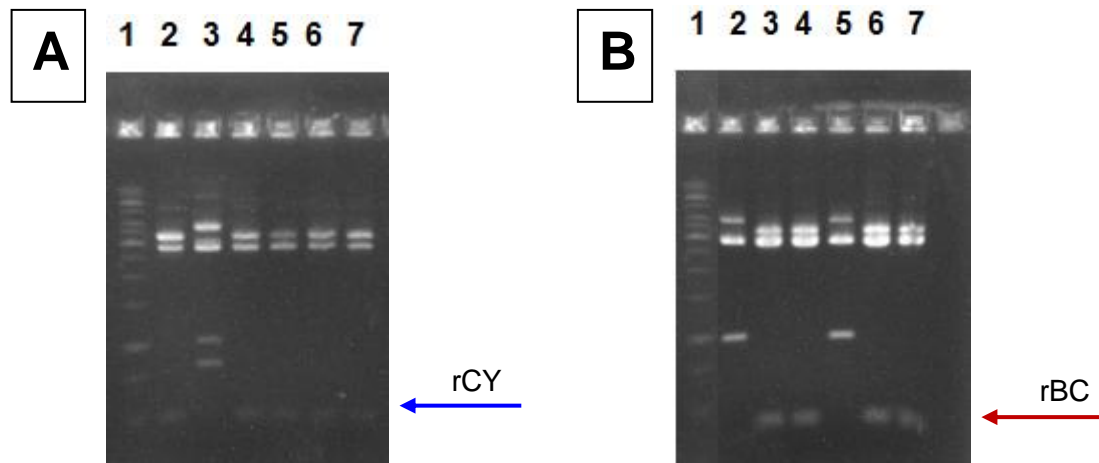


FIGURA 5 – ELETROFORESE REPRESENTANDO A CLONAGEM DAS REGIÕES INICIAL (Figura B) E FINAL (Figura A) DO GENE *ntrC* NO VETOR pTZ57R/T

FONTE: O autor (2013)

NOTA – Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. A, Linha 1: Marcador de massa molecular 1 Kb ladder (Invitrogen); Linhas 2 a 7: restrições referentes a região rCY; clones das linhas 2, 4, 5, 6 e 7 apresentaram fragmento correspondente à região rCY (seta azul). B, Linha 1: Marcador de massa molecular 1 Kb ladder (Invitrogen); Linhas 2 a 7: restrições referentes a região rBC; clones das linhas 9, 10 12 e 13 apresentaram fragmento correspondente à região rBC (seta vermelha)

#### 4.3.2 Clonagem das regiões inicial e final do gene *ntrC* no vetor pUC18

A partir da confirmação dos clones, as regiões rBC e rCY foram clivadas dos plasmídeos pTZNtrC início com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* e do pTZNtrC final com as enzimas de restrição *BamHI* e *PstI*, purificadas de um gel de agarose e ligadas ao vetor pUC18 clivado com as mesmas enzimas. A figura 6 mostra um esquema desta clonagem. As colônias transformadas com esta ligação foram analisadas pela clivagem do DNA e eletroforese em gel de agarose (Figura 7). A presença do inserto correspondente as regiões inicial e final do gene *ntrC* foi observada no gel e confirmada através de sequenciamento. O plasmídeo obtido foi denominado de pUCntrC-Del.

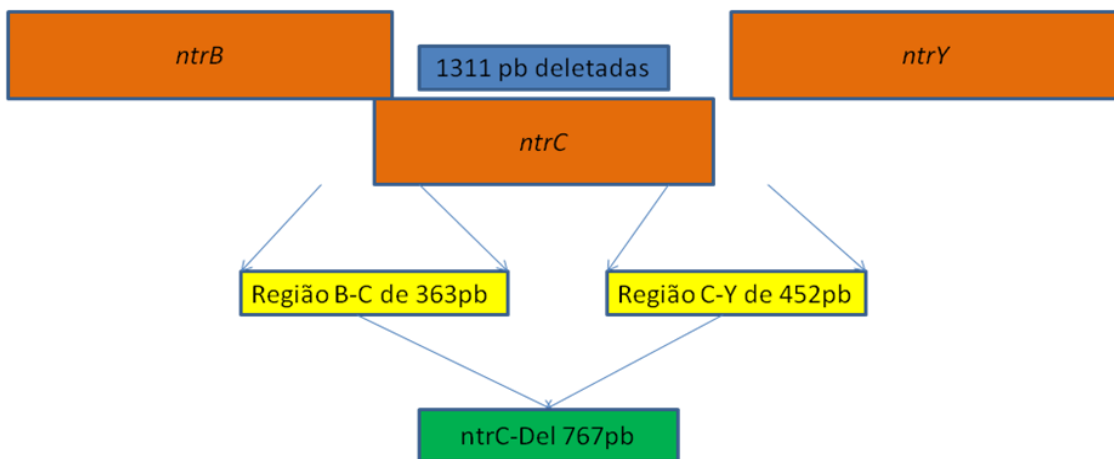


FIGURA 6 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA REGIÃO *ntrC*-Del DE 767 PARES DE BASES

FONTE: O autor (2013)

NOTA - Ligação das regiões do gene *ntrB* final e *ntrC* inicial e das regiões do gene *ntrC* final e do gene *ntrY* inicial

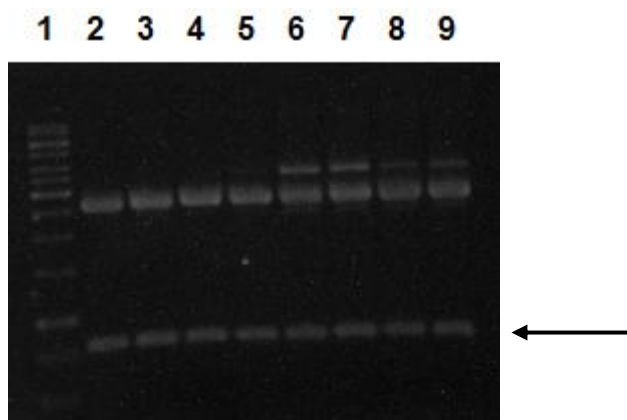


FIGURA 7 – ELETROFORESE REPRESENTANDO A CLONAGEM DAS REGIÕES INICIAL E FINAL DO GENE *ntrC* NO VETOR pUC 18

FONTE: O autor (2013)

NOTA – Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Linha 1: Marcador de massa molecular 1 Kb ladder (Invitrogen), linhas de 2 A 9: reações de restrição com o plasmídeo pUC*ntrC*-Del. O fragmento de 767 pb correspondente as regiões inicial e final do gene *ntrC* está indicado pela seta

#### 4.3.3 Clonagem do gene truncado *ntrC*-Del no vetor pK18

O fragmento *ntrC*-Del foi retirado do plasmídeo pUC*ntrC*-Del com as enzimas *EcoRI* e *PstI* e ligado ao vetor pK18*mobsacB* (Figura 8). O plasmídeo pK18*mobsacB* foi escolhido por ser um plasmídeo para seleção de duplo recombinantes, que possui os genes de resistência ao antibiótico canamicina e o gene *sacB*, responsável pela morte celular em presença de sacarose. Esta construção deu origem ao plasmídeo

pK18ntrC-Del. A figura 9 mostra a foto de um gel de agarose com os fragmentos de tamanho esperado para este plasmídeo.

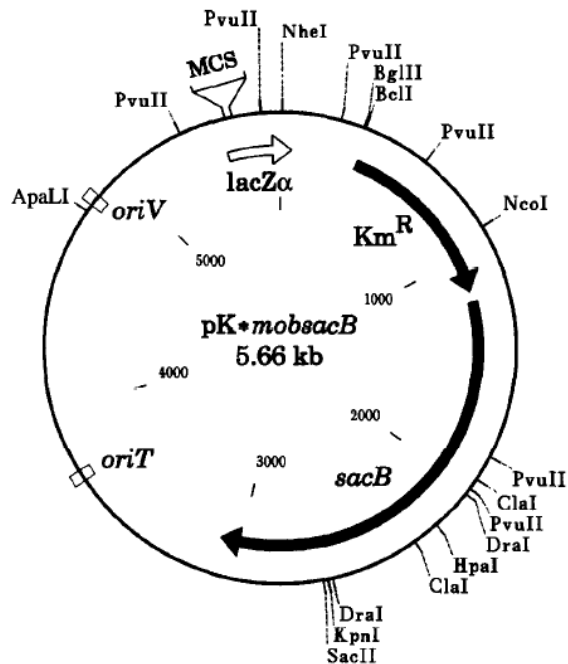


FIGURA 8: MAPA DO VETOR pK18mobsacB

FONTE: SCHÄFER *et al.*, 1994

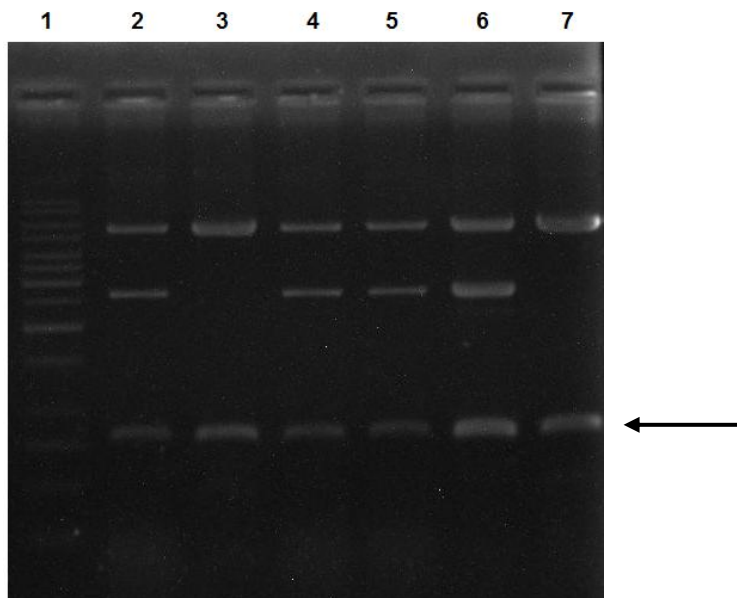


FIGURA 9 - ELETROFORESE REPRESENTANDO A CLONAGEM DO GENE TRUNCADO *ntrC*-Del NO VETOR pK18

FONTE: O autor (2013)

NOTA – Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Linha 1: Marcador de massa molecular 1 Kb ladder (Invitrogen), linhas 2 a 7: reações de restrição com o plasmídeo pK18ntrC-Del. O fragmento correspondente ao gene *ntrC* truncado está indicado pela seta. As amostras 3 e 7 apresentam o padrão esperado para o plasmídeo pK18ntrC-Del

#### 4.4 OBTENÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE *ntrC* DE *Rhizobium* sp. NGR234

O DNA do plasmídeo pK18ntrC-Del foi transformado em células termocompetentes de *E. coli* estirpe S17. O plasmídeo pK18ntrC-Del foi transferido para células de *Rhizobium* sp. NGR234 através de conjugação com a estirpe S17. Esta estirpe é capaz de transferir material genético para outra célula através da formação de *pili* de conjugação (JONATHAN; ANDERSON, 1970). As colônias de NGR234 foram selecionadas em meio TY com o antibiótico canamicina e em seguida foram cultivadas em meio contendo sacarose para a seleção de duplos recombinantes.

## 5 DISCUSSÃO

A proteína NtrC é um ativador transcricional que regula a expressão de vários genes e operons envolvidos com o metabolismo de nitrogênio em bactérias (MERRICK; EDWARDS, 1995). Em muitos destes organismos, NtrC-P regula diretamente a expressão do gene *nifA*, cujo produto, a proteína NifA, controla a expressão dos genes *nif*, necessários para a formação e atividade do complexo da nitrogenase. Em outros organismos, a expressão do gene *nifA* é regulada por outras proteínas como os sistemas FixL-FixJ e RegB-RegA (DIXON; KAHN, 2004). O objetivo deste trabalho foi a obtenção de uma estirpe mutante *ntrC* de *Rhizobium* sp. NGR234 para possibilitar o estudo das funções de NtrC neste organismo.

Em *Rhizobium* sp. NGR234, o gene *ntrC* localiza-se no cromossomo da bactéria e está inserido no operon *nifRntrBntrC*. Na mesma região do genoma, separado por apenas 207 nucleotídeos, encontra-se o operon *ntrYntrX* (SCHMEISSER *et al.*, 2009). Análises *in silico* e estudos preliminares sugerem a existência de um promotor a montante de *nifRntrBntrC* e outro na região de 207 nucleotídeos, a montante de *ntrYntrX* (dados não publicados). No entanto, a regulação destes promotores ainda não está esclarecida. Além disso, existe a possibilidade do operon a montante de *nifRntrBntrC* atuar sobre a transcrição de *ntrYntrX*. Considerando a estrutura destes genes no cromossomo, foi planejada uma deleção em fase do gene *ntrC* para a obtenção do mutante. Como resultado, uma forma truncada do gene deve ser transcrita no mutante, mas provavelmente sem função, uma vez que uma região correspondente a 437 aminoácidos foi deletada, de um total de 484 da proteína completa. Além disso, após a região deletada, a fase de leitura do gene permanece inalterada. Desta forma, caso ocorra transcrição de *ntrYntrX* a partir do promotor a montante de *nifRntrBntrC*, esta não deverá ser afetada.

A estirpe mutante *ntrC* de *Rhizobium* sp. NGR234 será utilizada em ensaios de crescimento em diferentes fontes de nitrogênio para avaliar o envolvimento da proteína NtrC com as vias de utilização destas diferentes fontes. Além disso, a atividade do operon a montante de *ntrYntrX* será avaliada neste mutante para determinar se NtrC é necessária para a expressão do sistema NtrY-NtrX.



## 6 CONCLUSÕES

Foram delineados primers para as regiões inicial e final do gene *ntrC* de *Rhizobium* sp. NGR234;

As regiões inicial e final do gene *ntrC* foram amplificadas e ligadas para a construção de um gene *ntrC* truncado;

O gene *ntrC* truncado foi inserido em *Rhizobium* sp. NGR234 para a obtenção de uma estirpe *ntrC* deste organismo.

## REFERÊNCIAS

- ADLER, S. P.; PURICH, D.; STADTMAN, E. R. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the PII regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylyl-removing enzyme. *J. Biol. Chem.*, v. 250, p. 6264-6272, 1975.
- ALI, A.; SHEIKH, S.; HUSSAIN, S.; QAMAR, I.A.; KHAN, B.R. Breeding food and forage legumes for enhancement of nitrogen fixation. *Science Vision*, v.6, p.49- 57, 2000.
- ALVAREZ-MORALES, A.; DIXON, R.; MERRICK, M. Positive and negative control of the *glnAntrBC* regulon in *Klebsiella pneumoniae*. *EMBO J.*, v. 3, p. 501-507, 1984.
- ARAÚJO, L. M.; HUERGO, L. F., INVITTI, A. L., GIMENES, C. I., BONATTO, A. C., MONTEIRO, R. A., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L. S. Different responses of the GlnB and GlnZ proteins upon in vitro uridylylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD protein. *Braz J Med Biol Res.* v. 41, p. 289-294, 2008.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. *J. Bacteriol.* 178: 4830–4838, 1996.
- ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; WEISS, R. E.; NINFA, A. J. Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 28288-28293, 1994.
- BARTSEV, A.; KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W. J. Rhizobial signals convert pathogens to symbionts at the legume interface. In: GILLINGS, M. AND HOLMES, A. *Plant Microbiology* (Ed.). Garland Science/BIOS Scientific, Abingdon, UK, p. 19–31, 2004.
- BRENCIC, A., WINANS, S.C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol.Mol.Bio.Rev.*, v. 69, p. 155-194, 2005.
- BRILL, W. J. Biological nitrogen fixation. *Sci. American*, v.236, p.68-81, 1977.
- BROUGHTON, W. J.; WONG, C.-H.; LEWIN, A.; SAMREY, U.; MYINT, H.; MEYER, H.; Z. A.; DOWLING, D. N.; SIMON, R. Identification of *Rhizobium* plasmid sequences involved in recognition of *Psophocarpus*, *Vigna*, and other legumes. *J. Cell Biol.* 102: 1173–1182, 1986.
- CAPELA, D.; BARLOY-HUBLER, F.; GOUZY, J. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, n. 98, p. 9877-9882, 2001.

- CHEN, W.; KUO, T. A simple and rapid method for the preparation of gramnegative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, Vol. 21, No. 9, 1993.
- CONTRERAS, A.; DRUMMOND M. The effect on the function of the transcriptional activator NtrC from *Klebsiella pneumoniae* of mutations in the DNA recognition helix. *Nucleic Acids Res.* 16: 4025–4039, 1988.
- DILWORTH, M. J. Dinitrogen fixation. *Ann. Rev. Plant Physiology*, v. 25, p. 81-114, 1974.
- DILWORTH, M.J.; GLENN, A.R. *Biology and biochemistry of nitrogen fixation*. Elsevier Science, Amsterdam, 1991.
- DITTA, G.; STANFIELD, S.; CORBIN, D.; HELINNSK, D. Broad host-range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 77, p. 7347-7351, 1980.
- DIXON, R. Tandem promoters determine regulation of the *Klebsiella pneumoniae* glutamine synthetase (*glnA*) gene. *Nucleic Acids Res.* 12: 7811–7830, 1984.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews, Microbiology*, v. 2, p. 621-631, 2004.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L.; REIS, V. M. *The role of biological nitrogen fixation to bio-energy programmes in the tropics*. EMBRAPA, 2000.
- DOWNIE, J.A.; WALKER, S. A. Plant responses to nodulation factors. *Curr Opin Plant Biol*, n. 2, p. 483–489, 1999.
- ELSEN, S.; DISCHERT, W.; COLBEAU, A.; BAUER, C. E. Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB–RegA two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* 182: 2831–2837, 2000.
- EMMERICH, R.; HENNECKE, H.; FISCHER, H. M. Evidence for a functional similarity between the two-component regulatory systems RegSR, ActSR, and RegBA (PrrBA) in  $\alpha$ -Proteobacteria. *Arch. Microbiol.* 174: 307–313, 2000.
- ENGLEMAN, E. G.; FRANCIS, S. H. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. II. Metabolite regulation of the enzymes in the cascade. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 191, p. 602-612, 1978.
- EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Ed.). *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and Hall, New York, p. 1-42, 1992.
- FENG, J., GOSS, T. J., BENDER, R. A., NINFA, A. J. Repression of the *Klebsiella aerogenes* nac promoter. *J. Bacteriol.*, v. 177, p. 5523–5534, 1995.

FISCHER, H. M.; BRUDERER, T.; HENNECKE, H. Essential and nonessential domains in the Bradyrhizobium japonicum NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. *Nucleic Acids Res*; 16: 2207-2224, 1988.

FISHER, K.; NEWTON, W.E. Nitrogen Fixation- A general Overview. *Nitrogen Fixation at the Millennium*, p.1-33, 2002.

FLORES, M.; MAVINGUI, P.; GIRARD, L.; PERRET, X.; BROUGHTON, W. J.; MARTÍNEZ- ROMERO, E.; DA VILA, G.; PALACIOS, R. Three replicons of *Rhizobium* sp. strain NGR234 harbor symbiotic gene sequences. *Journal of Bacteriology*, v. 180, p. 6052– 6053, 1998.

FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa Phytopathológica*, São Paulo, v.20, n.1, p.68-74, 1994.

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

GEURTS, R.; FEDOROVA, E.; BISSELING, T. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr Opin Plant Biol*, Wageningen, v. 8, n. 4, p. 346-52, jun. 2005.

GLIESSMAN, S. R.; *Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável*. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, p. 653, 2001.

GONZALEZ V.; OLVERA L.; SOBERON X.; MORETT E. In vivo studies on the positive control function of NifA: a conserved hydrophobic amino acid patch at the central domain involved in transcriptional activation. *Mol Microbiol*; 28: 55-67, 1998.

HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B. R.; MERRICK, M. Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. *FEBS Letters*, vol. 580, p. 5232-5236, 2006b.

HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; ARAUJO, M. S.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; STEFFENS, M. B. R.; MERRICK, M. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. *Mol. Microbiol.*, v. 59, p. 326-337, 2006a.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.; CHUEIRE, L.; GRANGE, L.; MEGÍAS, M. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brasil. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.33, n.5, p.387-394, 2001.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAÚJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. *Biologia dos solos dos Cerrados*. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, D.F., p.188-294, 1997.

ISHIDA, M. L.; ASSUMPÇÃO, M. C.; MACHADO, H. B.; BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 35(6), p. 651-61, 2002.

JAGGI, R.; VAN HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H. V.; OLLIS, D. L.; VASUDEVAN, S. G. The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intra molecular signal transduction. *EMBO J.*, v.16, p. 5562-5571, 1997.

JAVELLE, A.; MERRICK, M. Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 33, p. 170-172, 2005.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Reconstitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of Ntr gene transcription in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, v. 37, p. 12795-12801, 1998.

JONATHAN, T.; ANDERSON, T. F. Role of Pili in Bacterial Conjugation. *J Bacteriol.* 102(3): 648-654, 1970.

KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M.R.; FENG, J.; CHANDRAN, P.; NINFA, A. J. Sensory components controlling bacterial nitrogen assimilation. *Cell. Mol. Biol. Res.*, v. 40, p. 175-191, 1994a.

KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M.R.; FENG, J.; CHANDRAN, P.; NINFA, A. J. Effect of mutation in *Escherichia coli glnL (ntrB)*, encoding nitrogen regulator II (NRII or NtrB), on the phosphatase activity involved in bacterial nitrogen regulation. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 28294-28299, 1994b.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; ASAMIZU, E.; KATO, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; ISHIKAWA, A.; other authors Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* 7, 331–338, 2000.

KLOSE, K. E.; NORTH A. K.; STEDMAN K. M.; KUSTU S. The major dimerization determinants of the nitrogen regulatory protein NTRC from enteric bacteria lie in its carboxy-terminal domain. *J. Mol. Biol.* 241: 233–245, 1994.

KLOSE, K. E.; WEISS, D. S.; KUSTU, S. Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NtrC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. *J. Mol. Biol.*, v. 232, p. 67-78, 1993.

KRAJEWSKA-GRYNKIEWICZ, K.; KUSTU, S. Evidence that nitrogen regulatory gene, *ntrC*, of *Salmonella typhimurium* is transcribed from the *glnA* promoter as well as from a separate *ntr* promoter. *Mol. Gen. Genet.*, v. 193, p. 135, 1984.

KUSTU, S.; SANTERO, E.; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEISS, D. Expression of  $\sigma^{54}$  (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.*, v. 53, p. 367-376, 1989.

LITTLE, R.; REYES-RAMIREZ, F.; ZHANG, Y.; VAN HEESMIJK, W. C.; DIXON, R. Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NIFL–NIFA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the PII regulatory protein. *EMBO J.* 19, 6041–6050, 2000.

LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Regulation of nitrogenase activity by reversible ADP ribosylation. *Curr. Top. Cell. Regul.*, v. 30, p. 23-56, 1989.

MACFARLANE, S. A.; MERRICK, M. The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene *ntrB* and the *glnA-ntrBC* intergenic region of *Klebsiella pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 13:7591–7606, 1985.

MACHADO, H. B.; YATES, M. G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3-like-ntrB-ntrC* operon and are negatively regulated. *Can. J. Microbiol.*, v. 41, p. 674-684, 1995.

MARTÍNEZ, E.; ROMERO, D.; PALACIOS, R. The *Rhizobium* genome. *Critical Reviews in Plant Science*, Boca Raton, v.9, p.59, 1990.

MERRICK, M. J.; CHAMBERS S. The Helix-Turn-Helix Motif of  $\sigma^{54}$  Is Involved in Recognition of the -13 Promoter Region. *Journal of bacteriology*, v. 174, p. 7221-7226, 1992.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.*, vol. 59, p 604-622, 1995.

METTKER, I.; FIEDLER U.; WEISS V. Mechanism of activation of a response regulator: interaction of NtrC-P dimers induces ATPase activity. *J. Bacteriol.* 177: 5056–5061, 1995.

MONTEIRO R. A.; DE SOUZA E. M.; WASSEM R.; YATES M. G.; PEDROSA F. O.; CHUBATSU L. S. Inter-domain cross-talk controls the NifA protein activity of *Herbaspirillum seropedicae*. *FEBS Lett*; 508: 1-4, 2001.

MOORE, J., SHIAU S.-P.; REITZER L. Alterations of highly conserved residues in the regulatory domain of nitrogen regulator I (NtrC) of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 2692–2701, 1993.

MORETT, E.; BUCK, M. NifA-dependent in vivo protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 85: 9401-9405, 1988.

MORETT, E.; SEGOVIA, L. The  $\sigma^{54}$  bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.*, v. 175, p. 6067-6074, 1993.

NINFA, A. J.; REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Initiation of transcription at the bacterial *glnAp2* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers. *Cell* 50: 1039–1046, 1987.

NOINDORF, L.; REGO, F. G. M.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L. M.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. *Arch. Microbiol.*, v. 185, p. 55-62, 2006.

OLDROYD, G. E. D.; DOWNIE, J. A. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, n. 5, p. 566-576, 2004.

PAHEL, G.; ROTHSTEIN, D. M.; MAGASANIK, B. Complex *glnA-glnL-glnG* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, v.150, p. 202-213, 1982.

PATRIARCA, E.J.; TATE, R.; LACCARINO, M. Key role of bacterial NH<sub>4</sub>(p) metabolism in Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, p. 203-222, 2002.

PAWLOWSKI, K.; KLOSSE, U.; BRUIJN, F. J. Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. *Mol. Gen. Genetics*, p. 124 – 138, 1991.

PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L. M.; AYUB, R. A.; *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. *PLoS Genet.* n. 7; e. 1002064, 2011.

PEOPLES, M. B.; CRASWELL, E. T. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.141, n.1, p.13-39, 1992.

POSTGATE, J. R. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge: Cambridge University Press, 1982.

PUEPPKE, S. G.; BROUGHTON, W. J. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 12, n. 4, p. 293-318, 1999.

REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Isolation of the nitrogen assimilation regulator NRI, the product of the *glnG* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5554–5558, 1983.

REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1979–1983, 1985.

REYES-RAMIREZ, F.; LITTLE, R.; DIXON, R. Role of *Escherichia coli* nitrogen regulatory genes in the nitrogen response of the *Azobacter vinelandii* NifL-NifA complex. *J. Bacteriol.*, v.183, p. 3076-3082, 2001.

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

SANDERS, D. A.; GILLECE-CASTRO, B. L.; BURLINGAME, A. L.; KOSHLAND, D. E. Jr. Phosphorylation site of NtrC, a protein phosphatase whose covalent intermediate activates transcription. *J. Bacteriol.*, v.174, p. 5117-5122, 1992.

SANGER, F.; NICKLEN S.; COULSON A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467, 1977.

SCHÄFER, A.; TAUCH, A.; JÄGER, W.; KALINOWSKI, J.; THIERBACH, G.; PÜHLER, A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, n. 145, p. 69–73, 1994.

SCHMEISSER, C.; LIESEGANG, H.; KRYSZCIK, D.; BAKKOU, N.; LE QUÉRE, A.; WOLLHERR, A.; HEINEMEYER, I.; MORGENSTERN, B.; POMMERENING-RÖSER, A.; FLORES, M.; PALACIOS, R.; BRENNER, S.; GOTTSCHALK, G.; SCHMITZ, R.A.; BROUGHTON, W.J.; PERRET, X.; STRITTMATTER, A.W.; STREIT, W.R. *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Appl Environ Microbiol.*, v. 75, n. 12, p. 4035-45, jun. 2009.

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

SMITH, B. E. Nitrogenase reveals its inner secrets. *Science*, v.297, p.1654-1655, 2002.

SON, H. S.; RHEE, S. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. *J. Biol. Chem.*, v. 262, p. 8690-8695, 1987.

SOUPENE, E.; HE, L.; YAN, D.; KUSTU, S. Ammonia acquisition in enteric bacteria: Physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7030–7034, 1998.

SPRENT, J.I.; SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms. Chapman and Hall, 2<sup>nd</sup> ed., London, 256p, 1990.

STADTMAN, E. R.; GINSBURG, A.; CIARDI, J. E.; YEH, J.; HENNING, S. B.; SHAPIRO, B.M. Multiple molecular form of glutamine synthetase produced by enzyme catalysed adenylation and deadenylation reaction. *Adv. Enzyme Regul.*, v. 8, p. 99-118, 1970.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev*, 24: 487-506, 2000.



STIPS, J.; THUMMER, R.; NEUMANN, M.; SCHMITZ, R. A. GlnK effects complex formation between NifA and NifL in *Klebsiella pneumoniae*. Eur. J. Biochem., v. 271, p. 3379-3388, 2004.

STOCK, J. B.; NINFA A. J.; STOCK, A. M. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol. Rev. 53: 450–490, 1989.

STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A.; PERRET, X.; STAEHELIN, C.; DEAKIN, W. J.; RAASCH, C.; LIESEGANG, H.; BROUGHTON, W. J. An evolutionary hot spot: the pNGR234b replicon of *Rhizobium* sp. strain NGR234. Journal of Bacteriology, v. 186, p. 535-542, 2004.

SWANSON, R. V.; ALEX, L. A.; SIMON, M. I. Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. Trends Biochem. Sci. 19: 485–490, 1994.

TRINICK, M.J. Relationships amongst the fast growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. Journal of Applied Bacteriology. 49: 39-53, 1980.

TUCKERMAN, J. R.; GONZALEZ, G.; DIOUM, E. M.; GILLES-GONZALEZ, M. A. Ligand and oxidation-state specific regulation of the heme-based oxygen sensor FixL from *Sinorhizobium meliloti*. Biochemistry 41, 6170–6177, 2002.

WEDEL, A.; KUSTU S. The bacterial enhancer-binding protein NTRC is a molecular machine: ATP hydrolysis is coupled to transcriptional activation. Genes Dev. 9: 2042–2052, 1995.

WEISS, V.; CLAVERIE-MARTIN F.; MAGASANIK B. Phosphorylation of nitrogen regulator I of *Escherichia coli* induces strong cooperative binding to DNA essential for activation of transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5088–5092, 1992.

WEISS, V.; MAGASANIK, B. Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 85, p. 8919-8923, 1988.

ZHANG, Y., BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett., vol. 152, p. 195-204, 1997.

ZHANG, W.; CHAIT, B.T. Profound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. Analytical Chemistry, v.72, p.2482-2489, 2000.

ZIMMER, D. P.; SOUPENE, E.; LEE, H. L.; et al. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. Proc Natl Acad Sci USA 97: 14674–14679, 2000.