

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARISSA TONELLI DE OLIVEIRA

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE *narL* DE
*Herbaspirillum seropedicae***

CURITIBA

2008

LARISSA TONELLI DE OLIVEIRA

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE *narL* DE
*Herbaspirillum seropedicae***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Liu Un Rigo

Co-orientadora: Profa. Dra. Giseli Klassen

CURITIBA

2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Liu Un Rigo e a Dra. Giseli Klassen pela orientação desta tese.

À Dra. Rose Adele Monteiro e ao Dr. Emanuel de Souza pelas sugestões e acompanhamento do trabalho e leitura da tese.

À pós-graduação em Bioquímica.

Ao grupo de fixação de nitrogênio.

Aos professores do Departamento de Bioquímica, que colaboraram com sugestões e para minha formação acadêmica.

Ao Valter, Dona Jú e Rose por toda ajuda e carinho com que me trataram estes últimos anos.

A todos os amigos do mestrado, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos da 279, Gio, Lari, Marco Aurélio, Marco Antônio e Ju.

Aos amigos do laboratório.

Aos amigos que não são do laboratório.

Agradeço aos meus pais, que sempre me deram todo o apoio e carinho durante toda a minha caminhada.

Às agências financiadoras, CAPES, CNPq, Institutos do Milênio.

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae, é uma bactéria diazotrófica que pode ser encontrada em associação com gramíneas. O entendimento de seu metabolismo geral e, em especial do seu metabolismo de nitrogênio, permitirá a exploração do seu potencial como inoculante. Em *E. coli* a expressão do metabolismo de nitrato é regulada pelo regulador de transcrição FNR e por dois sistemas de dois componentes, as proteínas NarQ/NarP e NarX/NarL. Em *H. seropedicae*, a regulação do metabolismo de nitrato depende do sistema NtrB/NtrC, do sistema NtrX/NtrY e ainda da expressão do operon *narXnarL*. As proteínas NarX e NarL constituem um sistema de dois componentes, onde NarX é uma proteína sensora e NarL um regulador de resposta. Neste trabalho, o transposon EZ-Tn5™ <KAN-2> foi inserido no gene *narL* e esta construção foi utilizada para a produção de uma estirpe mutante em *H. seropedicae* por recombinação homóloga. Análises de PCR revelaram que a estirpe mutante (LT78) foi resultado de uma dupla recobinação. A estirpe LT78 cresce de maneira similar à estirpe selvagem (SMR1) em meios contendo amônio como fonte de nitrogênio, entretando, quando se utiliza nitrato como fonte de nitrogênio o crescimento da estirpe é 2 vezes menor assim como a atividade de nitrato redutase. A estirpe mutante *narL*⁻ não apresentou diferenças na atividade de nitrogenase em relação a estirpe selvagem (SMR1). Estes resultados indicam que o gene *narL* está envolvido na regulação da expressão dos genes relacionados com o metabolismo de nitrato, mas não da fixação de nitrogênio e assimilação de amônio em *H. seropedicae*.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*, Mutagênese, Nitrato, Nitrato redutase.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is an endophytic diazotroph found in association with several gramineae. Further understanding of its nitrogen metabolism may contribute to exploitation of its potential as inoculant. In *E. coli* the expression of nitrate metabolism enzymes requires the global transcription regulator FNR and the two nitrate specific pairs of regulators, the NarP/NarQ and NarX/NarL proteins. On the other hand, in *H. seropedicae* the regulation of the nitrate metabolism depends on NtrB/NtrC and on a new regulatory system called NtrY/NtrX, which seems to respond to nitrate in culture medium and activates expression of the *narXnarL* operon. The NarX and NarL proteins constitute a two-component regulatory system in which NarX is the sensory kinase and NarL is the response regulator, and presumably function in a three tier regulatory cascade to regulate nitrate metabolism in this organism. In this work, the transposon EZ-Tn5™ <KAN-2> was inserted into the *narL* gene and this construction was used to produce a *narL* strain of *H. seropedicae* by homologous recombination. PCR analysis revealed that the mutant strain (LT78) was a result of double recombination. This strain has a growth rate identical to that of the wild type when ammonium is used as nitrogen source, but when nitrate was used the growth rate decreased 2 fold, indicating the involvement of *narL* gene in nitrate metabolism. In agreement with this result, the nitrate reductase activity of strain LT78 was also reduced 2 fold, whereas nitrogenase was similar to that of the wild type.

Key words: *Herbaspirillum seropedicae*, Mutagenesis, Nitrate, Nitrate metabolism.

FIGURAS

FIGURA 1: CICLO DO NITROGÊNIO	2
FIGURA 2: ORGANIZAÇÃO DOS GENES DAS DIFERENTES NITRATOREDUTASES ASSIMILATÓRIAS E ORGANIZAÇÃO DAS RESPECTIVAS PROTEINAS EM <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Bacillus subtilis</i> E <i>Synechococcus</i> sp.....	9
FIGURA 3: ORGANIZAÇÃO DA NITRATO REDUTASES PERIPLASMÁTICA	11
FIGURA 4: ORGANIZAÇÃO DAS NITRATO REDUCTASES RESPIRATÓRIAS. ...	13
FIGURA 5: REGULAÇÃO DOS SISTEMAS DE DOIS COMPONENTES NarX/L E NarP/Q.	15
FIGURA 6: MODELO ESTRUTURAL DE NarL NA FORMA FOSFORILADA E LIGADA AO DNA.....	16
FIGURA 7: ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>nar</i> EM <i>H. seropedicae</i>	35
FIGURA 8: SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DE NarL EM <i>H. seropedicae</i> E DE SEU PRODUTO DE TRANSCRIÇÃO.	36
FIGURA 9: DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DA PROTEINA NarL EM <i>H. seropedicae</i> .	38
FIGURA 10: COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NarL DE <i>H.seropedicae</i> COM A DE PROTEÍNAS ORTÓLOGAS DE OUTROS ORGANISMOS.....	39
FIGURA 11: ÁRVORES FILOGENÉTICAS	41
FIGURA 12: MODELO ESTRUTURAL TEÓRICO DE NarL EM <i>H. Seropedicae</i>	42
FIGURA 13: ESQUEMA DO PLASMÍDEO pHS-17-FP-051-H12 QUE CONTÉM O GENE <i>narL</i> EM <i>H. seropedicae</i>	43
FIGURA 14 : MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pLT1.17	44
FIGURA 15: ESQUEMA MOSTRANDO O FRAGMENTO DO PLASMÍDEO pLT1.17 SUBCLONADO NO pSUP 202.....	46
FIGURA 16: POSIÇÃO DE ANELAMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA A CONFIRMAÇÃO DA MUTAÇÃO DO GENE <i>narL</i> EM <i>H. seropedicae</i> LT78.....	48
FIGURA 17: CONFIRMAÇÃO DA OBTENÇÃO DE ESTIRPE MUTANTE PARA O GENE <i>narL</i> EM <i>H. seropedicae</i>	49

FIGURA 18: CURVA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES SMR1 (SELVAGEM), LT78 (<i>narL</i> ⁻) E DCP28A (<i>ntrC</i> ⁻) DE <i>H.seropedicae</i> NA PRESENÇA DE CLORETO DE AMÔNIO OU NITRATO DE SÓDIO COMO FONTE DE NITROGÊNIO.....	53
FIGURA 19: CRESCIMENTO DAS ESTIRPES LT78 (<i>narL</i> ⁻) E DCP28A (<i>ntrC</i> ⁻) RELATIVO AO DA ESTIRPE SMR1 (SELVAGEM), DE <i>H.seropedicae</i> EM MEIO CONTENDO NITRATO COMO FONTE DE NITROGÊNIO	54
FIGURA 20: PRODUÇÃO DE NITRITO PELAS ESTIRPES SMR1 (SELVAGEM), LT78 (<i>narL</i> ⁻) E DCP 286A (<i>ntrC</i> ⁻) DE <i>H. seropedicae</i>	55
FIGURA 21 - EFEITO DA MUTAÇÃO EM <i>narL</i> SOBRE A FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM <i>H. seropedicae</i>	57

TABELAS

TABELA 1: BACTÉRIAS, PLASMÍDEOS E VETORES.....	20
TABELA 2: ANTIBIÓTICOS	24

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - adenosina difosfato
AMP - adenosina monofosfato
Amp - ampicilina
ATP - adenosina trifosfato
pb - pares de base nucleotídicas
DO - Densidade óptica
DNA - ácido desoxiribonucleico
EDTA - ácido etilenodiamino-tetra-acético
FAD - flavina adenina dinucleotídeo
Fd - ferredoxina
g - gravidade
GDH - glutamato desidrogenase
GOGAT - glutamato sintase
GS - glutamina sintetase
kbp - quilo pares de base (1000 pares de base)
Km - canamicina
MGD - molibdopterina
NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAR - nitrato redutase respiratória
NAS - nitrato redutase assimilatória
nm - nanômetro
Pi - fosfato inorgânico
RNA - ácido ribonucléico
rpm - rotações por minuto
SDS - dodecil sulfato de sódio
Sm - estreptomomicina
Tc – tetraciclina
UMP – uridina monofosfato
UV – ultra-violeta

SUMÁRIO

FIGURAS	II
TABELAS.....	IV
SUMÁRIO	II
INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O CICLO DO NITROGÊNIO	1
1.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	3
1.3 ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO E SISTEMA NTR	4
1.4 METABOLISMO DE NITRATO	6
1.4.1 Nitrato redutase assimilatória (NAS).....	7
1.4.2 Nitrato redutase periplasmática (NAP).....	9
1.4.3 Nitrato redutase respiratória (NAR)	11
1.5 A PROTEÍNA NARL.....	16
1.6 HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE	17
2.OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 BACTÉRIAS, PLASMÍDEOS E VETORES.....	20
3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO	21
3.3 ANTIBIÓTICOS.....	23
3.4 MANIPULAÇÃO DE DNA.....	24
3.4.1 Purificação de DNA plasmidial	24
3.4.2 Extração de DNA cromosomal	25
3.4.3 Eletroforese de DNA em gel de ágar e agarose	25
3.4.4 Clivagem do DNA com enzimas de restrição.....	26
3.4.5 Preparo dos Vetores	26
3.4.6 Ligação do Fragmento de DNA ao Vetor	26
3.4.7 Reação de amplificação	26
3.4.8 Reação de Sequenciamento.....	27

3.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO.....	28
3.5.1 Preparo de células eletrocompetentes	28
3.5.2 Eletroporação	29
3.5.3 Transferência de Plasmídeos por Conjugação	29
3.6 MUTAGÊNESE DO GENE <i>NARL</i> DE <i>H. SEROPEDICAE</i>	29
3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	30
3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE NITROGENASE DA ESTIRPE SELVAGEM E MUTANTE DE <i>H. SEROPEDICAE</i>	31
3.9 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DUPLICAÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES <i>NARL</i> E <i>NTRC</i> EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO	31
3.10 DOSAGEM DE NITRITO E ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE	32
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 ANÁLISE IN SÍLICO DOS GENES <i>NAR</i> EM <i>H. SEROPEDICAE</i>	33
4.2 ANÁLISE DA PROTEÍNA <i>NARL</i>	36
4.3 OBTENÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE <i>NARL</i> ⁻ (LT78) EM <i>H.SEROPEDICAE</i>	43
4.4 EFEITO DA MUTAÇÃO NO GENE <i>NARL</i> DE <i>H.SEROPEDICAE</i> SOBRE O CRESCIMENTO EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO	50
4.5 PRODUÇÃO DE NITRITO PELAS ESTIRPES SELVAGEM DE <i>H. SEROPEDICAE</i> , LT78 (<i>NARL</i> ⁻) E DCP286A (<i>NTRC</i> ⁻)	55
4.6 EFEITO DA MUTAÇÃO NO GENE <i>NARL</i> SOBRE A FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM <i>H.SEROPEDICAE</i>	56
5. CONCLUSÕES:.....	58
6. REFERENCIAS.....	59

INTRODUÇÃO

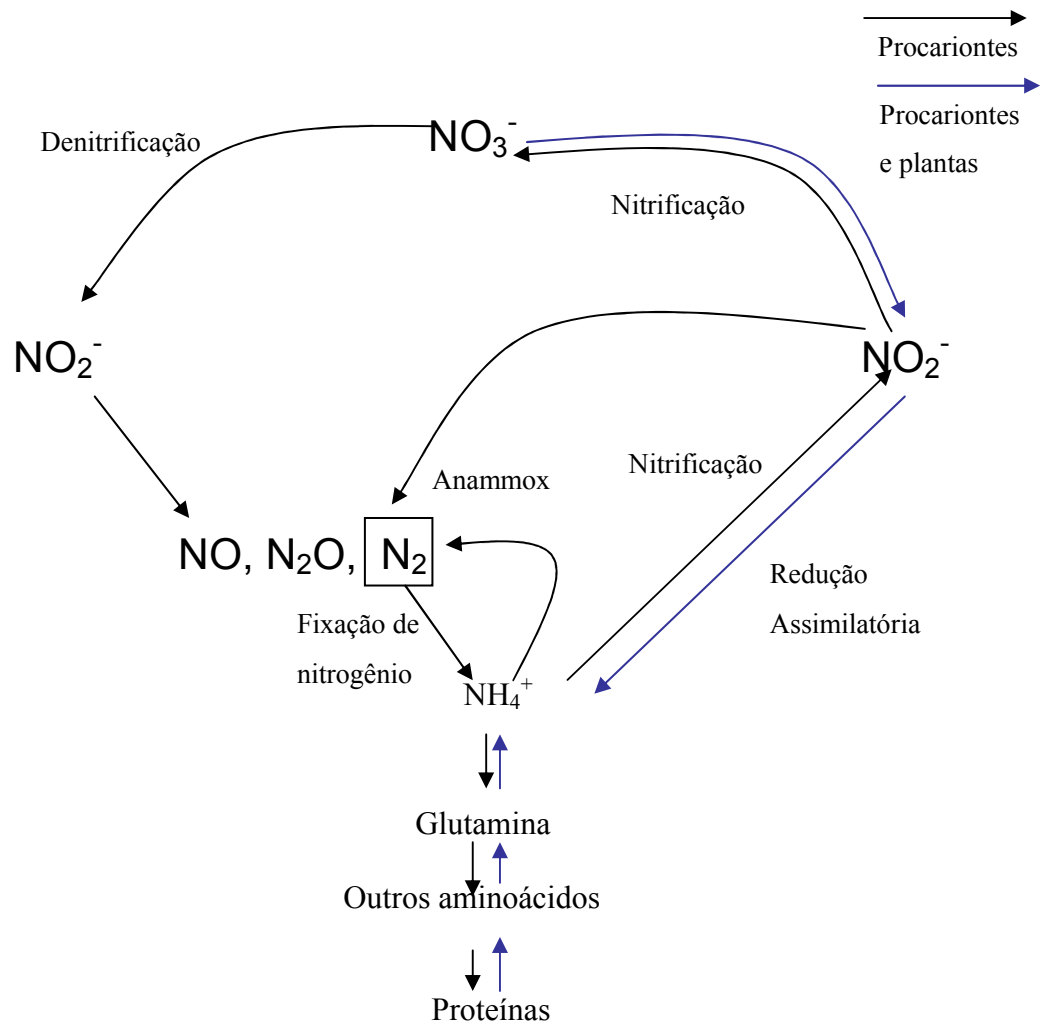
1.1 O CICLO DO NITROGÊNIO

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 da atmosfera terrestre é composta pelo gás dinitrogênio (N_2), o gás mais abundante do planeta (YOUNG, 1992; HOWARD e REES, 1996). Existem diferentes fontes de nitrogênio na biosfera e a interconversão entre estas espécies ocorre através de processos biológicos, o ciclo global do nitrogênio (FIGURA 1).

Neste ciclo, o nitrogênio pode sofrer várias reações de oxidação e redução gerando diferentes compostos. Na redução assimilatória, o nitrato é reduzido via nitrito à amônia, 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 incorporado 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. Nessa via 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 têm 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, 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 como aceptador 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) (FIGURA 1).

FIGURA 1: CICLO DO NITROGÊNIO



Reações do Ciclo do nitrogênio. (Adaptado de BOTHE FERGUSON e NEWTON, 2007). O nitrogênio molecular, N_2 torna-se biologicamente utilizável através do processo de fixação do nitrogênio (realizado por procariontes), onde é reduzido a amônia que pode então ser aproveitada para a formação de glutamina, aminoácidos e proteínas. No processos de nitrificação e redução assimilatória de nitrato, algumas bactérias reduzem a amônia à nitritos e nitratos. Essas três substâncias podem ser biologicamente utilizadas. O ciclo fecha-se a partir da atividade de certas espécies de bactérias, que efetuam a denitrificação e devolvem o nitrogênio molecular, N_2 para a atmosfera. Outra reação pode ocorrer paralelamente: no processo de anammox a amônia pode ser oxidada e o nitrito utilizado como aceitador de elétrons.

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 a glutamato, e glutamina; precursores de outros compostos nitrogenados das vias metabólicas. A utilização de fontes alternativas só ocorre na ausência de fontes primárias (MERRICK E EDWARDS, 1995).

1.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A conversão do nitrogênio atmosférico em amônia por bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre, simbióticas ou associativa é essencial para manter o balanço de nitrogênio na terra. A fixação do nitrogênio renova todo o nitrogênio contido na biosfera, compensando as perdas que ocorrem com a denitrificação e o torna disponível para ser metabolicamente utilizável (BERKUN e BOHLOOL, 1980). A fixação biológica do nitrogênio também é muito importante no ciclo do nitrogênio marinho e pode influenciar a capacidade da biota oceânica em capturar o CO₂ atmosférico (CAPONE, 2001).

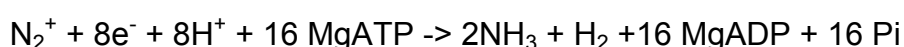
A disponibilidade de nitrogênio fixado é freqüentemente um fator limitante na produtividade agrícola. O aumento do uso de fertilizantes químicos causa a emissão de óxidos de nitrogênio, acidificação do solo e proliferação excessiva de algas e microrganismos (eutrofização) (BERKUN e BOHLOOL, 1980; DIXON e KAHN, 2004).

A fixação biológica de nitrogênio é amplamente distribuída em bactérias e arqueas, e os organismos capazes de realizar este processo são denominado diazotróficos ou seja, aqueles que têm capacidade de fixar nitrogênio e crescer utilizando N₂ como única fonte de nitrogênio (POSTGATE., 1982; YOUNG, 1992; DIXON E KAHN, 2004). Os diazotrofos são encontrados em diversos habitats e incluem organismos simbióticos e de vida livre em solos (BERKUN e BOHLOOL, 1980; BOTHE, FERGUSON e NEWTON, 2007).

O complexo enzimático denominado nitrogenase é responsável pela fixação biológica do nitrogênio (POSTGATE, 1982). Este complexo é formado por duas metaloenzimas com características estruturais diferentes (LAWSON e SMITH, 2002; DIXON e KAHN, 2004) e são denominadas de acordo com sua composição

metálica: a proteína ferro, ou dinitrogenase redutase, e a proteína ferro molibdênio ou dinitrogenase (EADY *et al.*, 1996).

A redução do N₂ pela nitrogenase envolve três etapas: redução da proteína ferro por um doador de elétrons como uma ferredoxina ou uma flavodoxina; transferência de elétrons da proteína ferro para o núcleo P da proteína ferro molibdênio; e a transferência de elétrons do núcleo P para o fator ferro-molibdênio que é responsável pela redução do substrato (EADY *et al.*, 1986). A estequiometria global da redução do dinitrogênio em condições ótimas é:



O processo de fixação de nitrogênio é altamente regulado: tanto a atividade da nitrogenase, como a expressão de seus genes em resposta a disponibilidade de nitrogênio e oxigênio do meio (POSTGATE, 1982; DIXON e KAHN, 2004).

1.3 ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO E SISTEMA NTR

O amônio é o composto nitrogenado de mais fácil utilização na maioria dos procariotos e também aquele que proporciona a maior velocidade de crescimento se comparado a outras fontes nitrogenadas (MERRICK e EDWARDS, 1995). O amônio formado pelo processo de redução do dinitrogênio atmosférico ou captado do meio externo é utilizado para a síntese de glutamina e glutamato. Na maioria das bactérias estes compostos servem como doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas. A assimilação de amônio pode ocorrer por duas vias; pela via da glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) ou pela via da glutamato desidrogenase (GDH) (MERRICK, 1992; MERRICK e EDWARDS, 1995). A via da glutamato desidrogenase é utilizada quando as células crescem na presença de excesso de amônio. A via da GS/GOGAT ocorre em condições limitantes de nitrogênio.

O sistema *ntr* controla o metabolismo geral de nitrogênio regulando a utilização de amônio e de fontes alternativas de nitrogênio como nitrato, aminoácidos e N₂. Em enterobactérias o sistema *ntr* é composto pelas proteínas NtrB (histidina quinase), NtrC (ativador de transcrição dos genes dependentes de σ^{54}), GlnD (uridil

transferase), GlnB, GlnE (adenilil transferase) e GS (glutamina sintetase) (MERRICK, 1992). Estas proteínas interagem em um mecanismo de cascata e dependem principalmente da concentração intracelular de α -cetoglutarato e de glutamina (MERRICK e EDWARDS, 1995). O sistema *ntr* controla ainda os níveis de transcrição dos genes *nif*, ativados pela proteína NifA, e dos genes envolvidos no metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio (MERRICK e EDWARDS, 1995).

A proteína NtrB é uma histidina quinase/ fosfatase que atua fosforilando ou defosforilando NtrC, dependendo dos níveis de nitrogênio e carbono (MACFARLANE e MERRICK, 1987; KEENER e KUSTU, 1988; JIANG e NINFA, 1999). A proteína NtrC quando fosforilada age como uma ativadora de transcrição dos operons *nifA*, *glnAntrBC*, *glnKamtB* e de outros operons envolvidos com a fixação e assimilação do nitrogênio em *E.coli* (HUNT e MAGAZANIK, 1985; REITZER e MAGAZANIK, 1985; MERRICK e EDWARDS, 1995). A atividade de NtrB é controlada pelo produto do gene *glnB*, uma proteína PII. Em condições de nitrogênio limitantes, as proteínas PII são uridiladas (PII-UMP) pelo produto do gene *glnD* (MERRICK e EDWARDS, 1995) e desta forma não é capaz de interagir com NtrB. Na forma livre, NtrB catalisa a fosforilação de NtrC que ativa promotores dependentes de NtrC.

A enzima glutamina sintetase (GS), produto do gene *glnA*, converte glutamato e amônio em glutamina (DIXON, 1984). A atividade enzimática de GS é regulada por adenililação reversível catalisada pela proteína GlnE. Quando o nível de nitrogênio fixado é baixo, a proteína GlnD converte PII em PII-UMP (SON e RHEE, 1987), que interage com GlnE, estimulando sua atividade de desadenililação de GS. Nesta situação, a glutamina sintetase apresenta-se ativa. Em condições de excesso de nitrogênio fixado, a atividade de remoção do grupo uridil da enzima GlnD é estimulada e PII-UMP é convertida novamente em PII. A proteína PII interage com GlnE, estimulando atividade de adenililação que converte GS em uma forma inativa reprimindo sua atividade (DIXON, 1984).

O metabolismo de nitrogênio pode ainda ser controlado pelos genes *ntrXY*, que atuam como um sistema de dois componentes onde NtrY é uma proteína quinase sensora e NtrX é uma proteína ativadora de transcrição. O sistema *ntrYX* foi inicialmente descrito por PAWLOWSKI, KLOSSE e BRUIJN (1991) em *Azorhizobium caulinodans*, neste organismo os níveis de amônio são detectados pelo sistema NtrY-NtrX, cuja expressão está parcialmente sob o controle do NtrC (PAWLOSKI, KLOSSE e BRUIJN, 1991). NtrY é uma proteína sensora

transmembrana que fosforila ou desfosforila a proteína NtrX dependendo dos níveis de nitrogênio extracelular (PAWLOSKI, KLOSSE e BRUIJN, 1991). A proteína NtrX é similar a NtrC e parece receber o grupamento fosforil da proteína NtrY, similar a NtrB, num sistema semelhante ao das proteínas NtrB/NtrC. Os mutantes *ntrYX* de *A. caulinodans* tiveram deficiência de crescimento em meio contendo glutamato, amônio, arginina, leucina ou nitrato como única fonte de nitrogênio. (PAWLOWSKI, KLOSSE e BRUIJN, 1991). Resultados obtidos por ISHIDA *et al.*, (2002) indicam que o sistema de dois componentes NtrYX também está presente em *A. brasilense*, e nesse organismo estes genes estão envolvidos com a regulação da fixação de nitrogênio e também na regulação da expressão do gene *glnA* (VITORINO *et al.*, 2001).

Em *H. seropedicae*, mutantes para o gene *ntrY* só não foram capazes de crescer em meio contendo nitrato como fonte de nitrogênio, sendo capazes de utilizar alanina, serina, uréia, asparagina, glutamato, aspartato, amônio ou glutamina como fonte de nitrogênio (ALVES, 2006).

1.4 METABOLISMO DE NITRATO

O íons nitrato constituem uma outra forma assimilável de nitrogênio e podem ser encontrados em ambientes terrestres, aquáticos e marinhos. Os procariontes utilizam enzimas específicas para metabolizar o nitrato e podem ser sub agrupadas em: nitrato redutases assimilatórias (NAS), nitrato redutase respiratória (NAR) e a nitrato redutase periplasmática (NAP) (GUERRERO, VEJA e LOSADA, 1981; RICHARDSON *et al.*, 2001; GONZÁLES *et al.*, 2006).

A redução do nitrato tem papel essencial no ciclo do nitrogênio, e é realizada por fungos, bactérias, algas e plantas superiores, podendo gerar compostos gasosos (denitrificação) ou amônia (dissimilação assimilatória do nitrato). Este é um processo biológico de extrema importância contabilizando toneladas de nitrogênio inorgânico transformado anualmente (GUERRERO, VEJA e LOSADA, 1981). Atualmente existe uma grande preocupação mundial com relação ao uso de fertilizantes nitrogenados que leva ao acúmulo de nitrato em lençóis freáticos, rios e lagos. A principal ameaça do nitrato ao meio ambiente é a eutrofização dos sistemas aquáticos, e o consumo de água potável contendo altas concentrações de nitrato tem sido associado com

doenças sanguíneas e câncer de estômago em decorrência da formação de compostos N-nitrosos por bactérias do trato gastrointestinal (VAN MAANEM *et al.*, 1996; PHILIPPOT e HOJBERG, 1999).

Muitas bactérias podem expressar mais de um tipo de nitrato redutases que são funcional e bioquimicamente diferentes. Estas enzimas têm sido classificadas de acordo com sua origem, localização celular, propriedades moleculares de seus centros catalíticos, e função. Muitas nitrato redutases têm sido identificadas em organismos eucarióticos (fungos e plantas) e procarióticos. Todas estas nitrato redutases contêm molibdênio em seu centro catalítico e pertencem a família das dimetil sulfoxido enzimas, com exceção de algumas redutases eucarióticas que pertencem à família das sulfato oxidases (GONZÁLES *et al.*, 2006). As nitrato redutases assimilatórias (NAS) estão localizadas no citoplasma, e são reprimidas pelas concentrações de amônio. Já as NAR estão relacionadas com o fluxo de elétrons na respiração, ela é formada por um complexo de subunidades ancoradas na face citoplasmática da membrana. A NAP é formada por um complexo de duas subunidades protéicas localizadas no compartimento periplasmático e acopla a oxidação do quinol via citocromo *c* (RICHARDSON *et al.*, 2001).

1.4.1 Nitrato redutase assimilatória (NAS)

A NAS é a primeira enzima envolvida na assimilação do nitrato. Esta enzima é produto dos genes *nas* e têm sido encontrada em muitas bactérias. Todas as nitrato redutase assimilatórias contêm em seu sitio ativo um cofator molibdopterina (MGD), mas diferem no seu controle de expressão, número e tipo de transferência de elétrons nos centros ativos que variam de acordo com o organismo (GONZÁLES *et al.*, 2006). Entretanto, nas bactérias elas podem ser agrupadas em três subgrupos exemplificados pelas enzimas de *Synechococcus* sp., *Klebsiella oxytoca* e *Bacillus subtilis*. (RICHARDSON *et al.*, 2001).

Análise dos genes *nas* de *Klebsiella oxytoca* indicam que estes genes estão organizados em um óperon, *nasFEDCBA*. A captação do nitrato envolve uma proteína transportadora do tipo ABC ATP-dependente (HIGGINS *et al.*, 1992) formada por três componentes: NasF, uma proteína periplasmática que se liga ao soluto; NasE que forma um poro para a passagem do soluto e NasD, uma ATPase

ligada à membrana (LIN, GOLDMAN e STEAWART, 1994). A enzima Nas é composta por duas subunidades: A subunidade catalítica (NasA) possui o cofator *bis*-MGD com quatro centros ferro-enxofre em seu domínio C-terminal e um centro ferro-enxofre no domínio N-terminal e a subunidade *nasC*, que controla a transferência de elétrons do NAD(P)H para NasA. A regulação dos genes *nas* é dependente de amônio, via sistema Ntr e por nitrato/nitrito através do antiterminador de transcrição NasR que liga diretamente ao RNAm *nasF* permitindo a expressão dos genes *nas* (LIN e STEWART, 1996; WU *et al.*, 1998; RICHARDSON *et al.*,2001).

O operon *nasABCDEF* de *Bacillus subtilis* inclui genes para nitrato redutase (*nasB*), um centro ferro-enxofre nitrito redutase (*nasD*) e uma flavoproteína (*nasC*), que pode agir como uma doadora de elétrons para NasB e NasD, um transportador de nitrato NasA e *nasF*, gene envolvido na biossíntese de cofatores (FIGURA 2) (OGAWA *et al.*,1995; RICHARDSON *et al.*,2001). A regulação em *B. subtilis* parece ser complexa pois as mesmas proteínas participam tanto do metabolismo de nitrato como nitrito (RICHARDSON *et al.*,2001).

Em *Synechococcus sp.* a organização das NAS é bem mais simples. O sistema é composto por NarB, um polipeptídeo que liga um cofator molibdopterina e um centro ferro-enxofre. O doador de elétrons é uma ferredoxina gerada durante a fotossíntese por um fotossistema. Neste sistema a luz é um regulador indireto do metabolismo de nitrato. O gene *nirA* codifica uma nitrito reductase que atua juntamente com *narB* e NtrABCD, formando um canal de transporte de nitrato dependente de ATP (LIN e STEWART, 1996; RICHARDSON *et al.*,2001).

FIGURA 2: ORGANIZAÇÃO DOS GENES DAS DIFERENTES NITRATOREDUTASES ASSIMILATÓRIAS E ORGANIZAÇÃO DAS RESPECTIVAS PROTEÍNAS EM *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus subtilis* E *Synechococcus* sp..

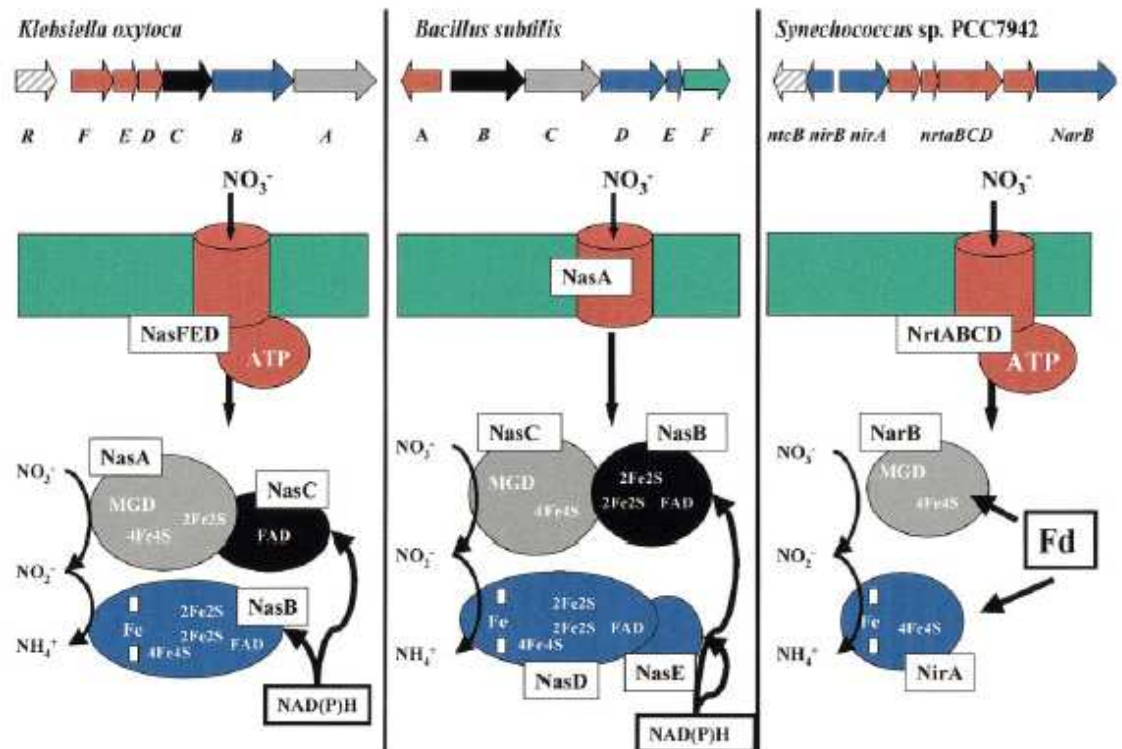


Figura obtida de Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. RICHARDSON *et al.*, 2001. MGD- cofator molibdopterina, Fd-ferridoxina.

1.4.2 Nitrato redutase periplasmática (NAP)

As enzimas Nap estão localizadas no periplasma e foram primeiramente identificadas em *R. sphaeroides*. São dímeros que consistem em uma subunidade catalítica (NapA), contendo um cofator molibdopterina e um centro ferro-enzofre que formam um complexo juntamente com NapB, um pequeno citocromo, uma proteína de membrana (NapC), envolvida na transferência de elétrons da membrana para o complexo NapAB que se localiza no periplasma e uma chaperona NapD responsável pela maturação de NapA (MORENO-VIVIA *et al.*, 1999; GAVIRA *et al.*, 2002; GONZALES *et al.*, 2006). Outros genes *nap* foram descritos em algumas bactérias tais como *napF*, *napG* e *napH*, codificando diferentes proteínas ferro-

enxofre, e *napE* e *napK* codificando para proteínas transmembranas sem função definida (FIGURA 3) (GAVIRA et al 2002).

Diferentes funções fisiológicas têm sido propostas para o sistema Nap, incluindo balanceamento redox, desnitrificação, adaptação ao crescimento anaeróbico e removedoras de nitrato. Por ter diferentes funções há diversos níveis de controle de expressão dos genes *nap* de acordo com o organismo e função fisiológica. Em geral a atividade da NAP ocorre em baixas condições aeróbicas e não é afetada por amônio (GAVIRA et al 2002). Em *E. coli*, as nitrato redutases periplasmáticas são altamente expressas em baixas concentrações de nitrato, condições anaeróbicas e são reguladas pelo produto dos genes *fnr* e *narP*. Em *Ralstonia eutropha* a máxima expressão dos genes *nap* ocorre em condições aeróbicas, na fase estacionária de crescimento e não é induzida por nitrato. Já em *Paracoccus pantotrophusa* expressão máxima de *nap* ocorre durante o crescimento aeróbico com a presença de butirato e na ausência de nitrato (GAVIRA et al., 2002). Em razão de toda esta disparidade do sistema Nap não há uma função comum sugerida (PHILIPPOT e HOJBERG, 1999; GAVIRA et al .,2002).

FIGURA 3: ORGANIZAÇÃO DA NITRATO REDUTASES PERIPLASMÁTICA

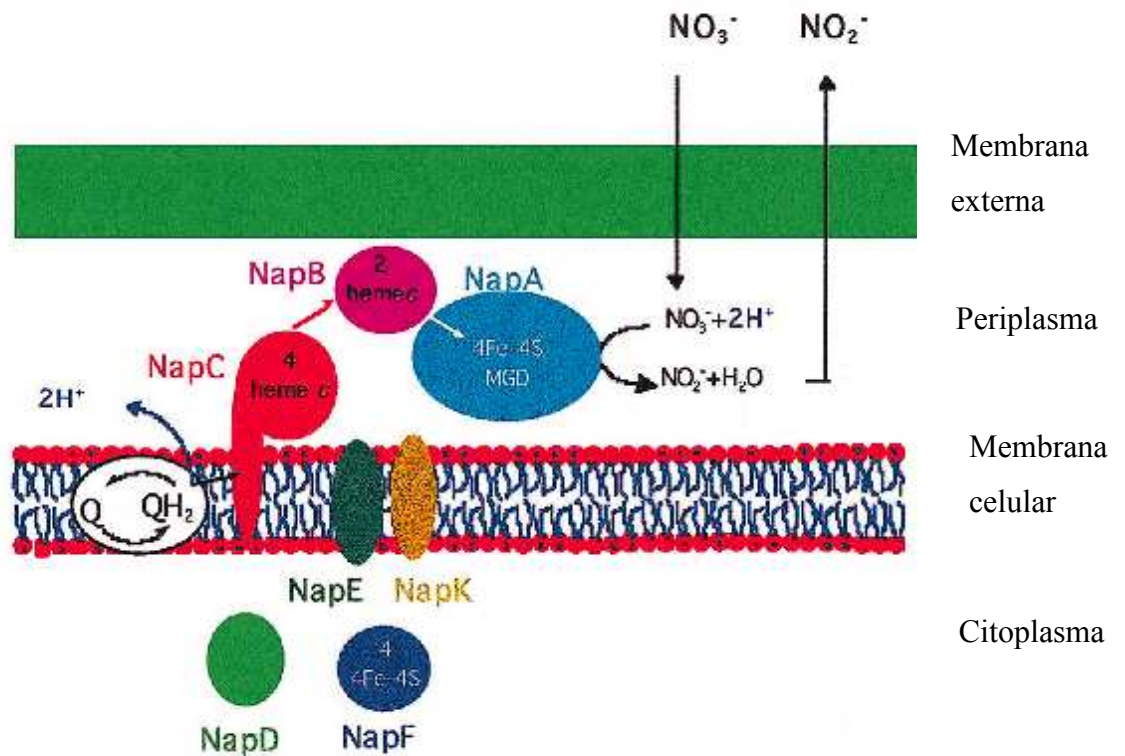


Figura adaptada de Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases. MORENO-VIVIA et al., 1999.

1.4.3 Nitrato redutase respiratória (NAR)

A via respiratória da nitrato redutase (FIGURA 4) tem sido bastante estudada (RICHARDSON *et al.*, 2001). A nitrato redutase respiratória tem sido isolada de diversas bactérias denitrificantes e respiratórias. Todas as NAR localizam-se na membrana e são compostas por três subunidades: uma subunidade catalítica (NarG), situada no citoplasma e com um fator molibdoperina; NarH, que é responsável pela transferência de elétrons e possui quatro centros ferro-enxofre e uma subunidade quinol desidrogenase, a proteína integral de membrana NarI.

A organização destes genes na forma do operon *narGHI* ocorre em todos os organismos estudados que possuem o sistema NAR. Pode ocorrer ainda a presença de uma proteína adicional, NarJ, uma chaperona envolvida na maturação e endereçamento da nitrato redutase para a membrana (BLASCO *et al.*, 1990; PHILIPPOT e HOJBERG, 1999; RICHARDSON *et al.*, 2001).

Como o sítio ativo da nitrato redutase encontra-se na região citoplasmática é necessário que o nitrato seja transportado através da membrana até o citoplasma por proteínas transportadoras específicas, NarK. O canal simporte NarK1 é ativado logo que começa a respiração de nitrato. Quando esta reação acumula nitrito, a função de NarK1 é substituída por NarK2, que age como um antiporte nitrato/nitrito para a manutenção do estado basal (PHILIPPOT e HOJBERG, 1999; GONZALEZ et al 2006). Os organismos redutores de nitrato estudados até o momento possuem pelo menos uma cópia de *narK* que se encontra geralmente a montante dos genes *narGHI* (RICHARDSON et al.,2001).

A influência do oxigênio no processo de redução de nitrato ocorre ao nível de seu transporte e também na expressão gênica dos genes *narK*, este é o primeiro nível hierárquico de controle (GOH, et. al., 2005). A montante dos genes *narK* estão presente seqüências para a ligação de reguladores de transcrição: uma para a proteína FNR e outro para a proteína NarL (PHILIPPOT e HOJBERG, 1999 RICHARDSON et al.,2001). A proteína NarL faz parte de um sistema de dois componentes junto com a proteína NarX e é responsável pela resposta em função dos níveis de nitrato e nitrito, o segundo nível de controle da síntese protéica dos genes da nitrato redutase respiratória (NOJI et al.,1989; Goh et. al., 2005). A presença destes controladores garantem que a expressão de *narK* e do operon *narGHIJ* ocorram em condições adequadas para a respiração com nitrato como acceptor de elétrons (RICHARDSON et al.,2001).

FIGURA 4: ORGANIZAÇÃO DAS NITRATO REDUTASES RESPIRATÓRIAS.

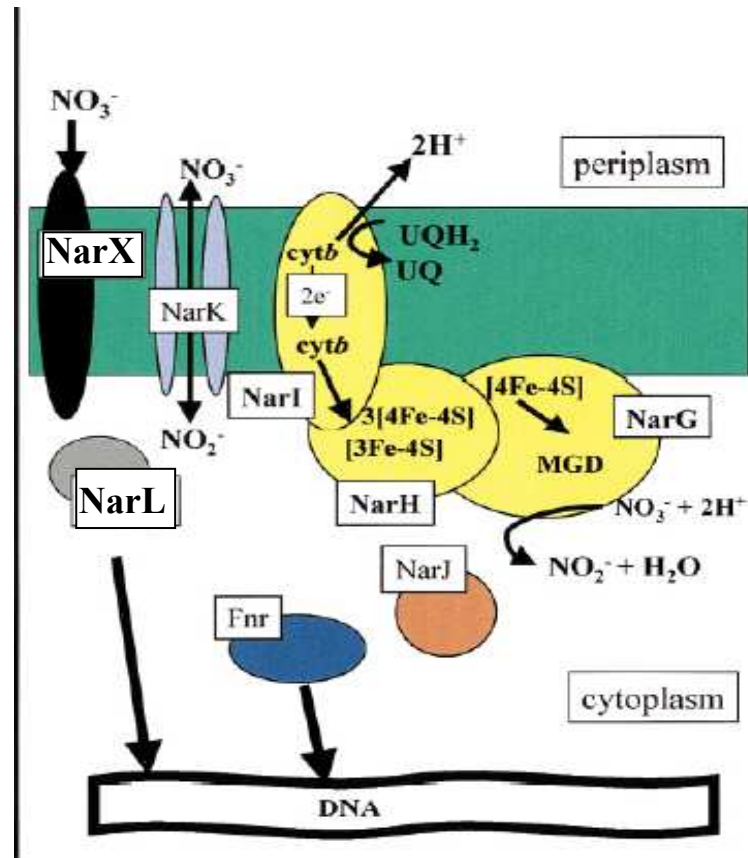


FIGURA obtida de Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. RICHARDSON *et al.*, 2001.

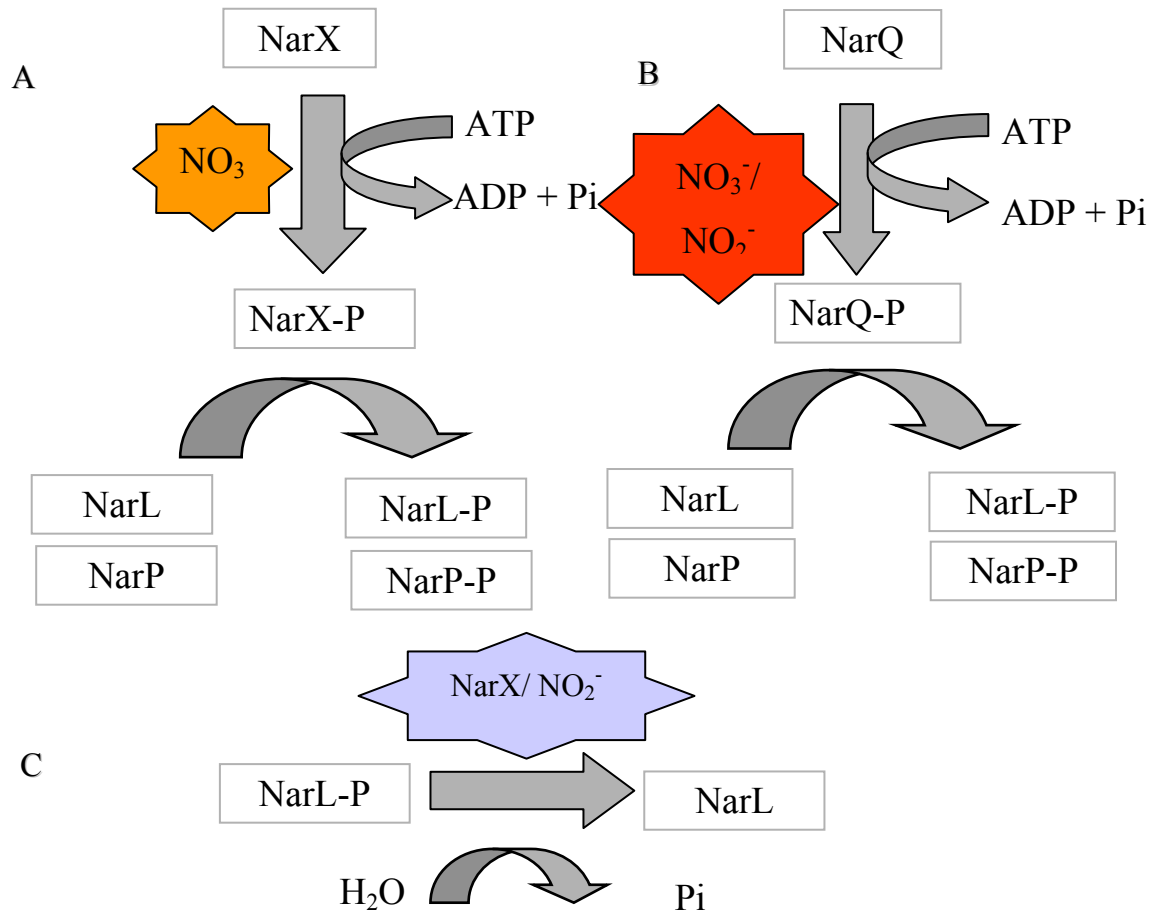
Além de serem reguladas por oxigênio, as nitrato redutases respiratórias são controladas por meio de um sistema de dois componentes. Diversos sistemas de dois componentes são encontrados em células eucariontes e procariontes. Estes sistemas são sensores extracelulares que convergem às condições ambientais em sinais moleculares e uma função intracelular específica, tais como esporulação, virulência, movimento flagelar e processos metabólicos básicos. Os sistemas de dois componentes são fundamentalmente formados uma cascata de fosforilações. Um componente sensor de membrana se autofosforila e fosforila seu correspondente regulador citosólico (MARIS, SAWAYA e GRZESKOWIAK *et al.*, 2002).

Em *E. coli.*, dois sistemas de dois componentes mediam a regulação da expressão dos genes do sistema NAR. **NarX** e **NarQ**, são as proteínas sensoras de

membrana que respondem a concentrações de nitrato e nitrito fosforilando NarL e NarP, proteínas reguladoras de resposta e ativadoras de transcrição (DARWIN e STEWART, 1995; PHILIPPOT e HOJBERG, 1999; RICHARDSON *et al.*,2001). O substrato de NarX e NarQ se liga a um domínio periplasmático destas proteínas denominado P-box, que altera a conformação da proteína e permite a autofosforilação com conseqüente fosforilação de NarL e NarP (CHIANG, CAVICCIOLI e GUNSALUS, 1997). NarL e NarP fosforiladas se ligam a sítios específicos do DNA alvo contendo a sequencia consenso TACYYMT onde, Y representa T ou C e M representa C ou A (HARTIG *et al.*,1999).

Os dois sistemas NarXL e NarPQ discriminam entre nitrato e nitrito (WILLIAMS e STEWART, 1997; PHILIPPOT e HOJBERG, 1999; RICHARDSON *et al.*,2001; GONZÁLES *et al.*, 2006). NarX serve principalmente como sensor de nitrato, enquanto NarQ reconhece melhor a presença do nitrito. Na presença de nitrato, NarX e NarQ fosforilam NarL e NarP. Na presença de nitrito, NarQ fosforila NarL e NarP, e em alguns casos, NarX assume uma atividade de desfosfatase sobre NarL-P (FIGURA 5) (WILLIAMS e STEWART, 1997; PHILIPPOT e HOJBERG, 1999; RICHARDSON *et al.*,2001; GONZÁLES *et al.*, 2006).

FIGURA 5: REGULAÇÃO DOS SISTEMAS DE DOIS COMPONENTES NarX/L E NarP/Q.



A: Regulação da atividade de NarL e NarP por NarX. B: Regulação da atividade de NarL e NarP por NarQ. C: Atividade de NarX sobre NarL-P na presença de nitrito.

1.5 A PROTEÍNA NARL

A proteína NarL de *E. coli* possui 24 kDa e dois domínios conservados C-terminal e N-terminal. Em *E. coli*, estudos de cristalografia da proteína NarL mostraram que ela é formada por uma região N-terminal com 131 aminoácidos agrupados em cinco folhas- β flanqueadas com cinco α -hélices. O domínio C-terminal é responsável pela ligação ao DNA e é formado por 62 aminoácidos agrupados em quatro α - hélices e um motivo H-T-H. As regiões C-terminal e N-terminal são unidas por uma pequena α -hélice (FIGURA 6) (PHILIPPOT, 1999; MARIS, 2002).

Quando NarL está na sua forma inativa (não fosforilada) a região de ligação ao DNA no domínio C-terminal se encontra bloqueado pela região N-terminal, impedindo que a proteína se ligue indevidamente ao DNA. A fosforilação no resíduo Asp- 59 por NarX promove a exposição de sítios antes inacessíveis para a ligação ao DNA. Interações entre o motivo H-T-H e o DNA promovem gradualmente uma curvatura de 42° na região de ligação, possibilitando a ligação de NarL e estabilizando a deformação no DNA (FIGURA 6) (MARIS, 2002).

FIGURA 6: MODELO ESTRUTURAL DE NarL NA FORMA FOSFORILADA E LIGADA AO DNA.

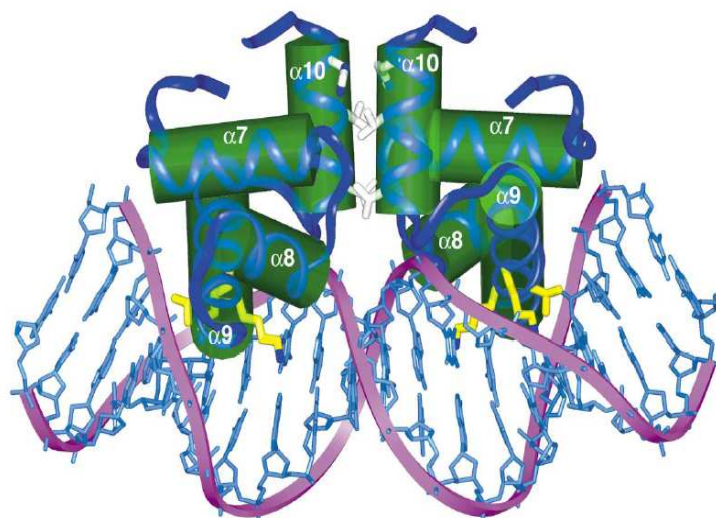


FIGURA obtida de Dimerization allows DNA target site recognition by NarL response regulator. MARIS *et al.*, 2002. NarL fosforilada liga-se ao DNA promovendo uma curvatura de 42° na dupla fita.

Mais de cinquenta e um operons podem ter sua expressão regulada por NarL positivamente e outros 41 operons reprimidos em *E. coli* (Overton, T.W. *et al.*, 2006). Alguns dos operons sob a regulação de NarL são os da nitrato redutase *narGHIJ*, das nitrito redutase *nir*, da fumarato redutase *frdABCD*, o gene *narK*, os genes da nitrato redutase periplasmática- *nap*, o gene de regulação do metabolismo anaeróbio- *Fnr*, além de regular a sua própria expressão (DARWIN e STEWART, 1995; HARTIG *et al.*, 1999; GOH *et al.*, 2005).

1.6 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é um diazotrofo endofítico, gram-negativo, vibrióide, membro da subdivisão β das Proteobacterias (BALDANI *et al.*, 1986; BODDEY *et al.*, 1995; YOUNG, 1992) Esta bactéria pode ser encontrado no interior de gramíneas como milho, arroz, sorgo e cana de açúcar (BALDANI *et al.*, 1986; BODDEY *et al.*, 1995). O *H. seropedicae* é um microrganismo capaz de fixar nitrogênio sob condições microaeróbias e em uma ampla faixa de pH (5,3 a 8,0), e a temperatura ótima de crescimento fica em torno dos 35°C (BALDANI *et al.*, 1986).

A regulação da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* requer o ativador transcricional NifA (SOUZA *et al.*, 1991a,b) e também o sistema geral de metabolismo de nitrogênio (Ntr). Tanto em *H. seropedicae* como em outros diazotrofos todos os promotores dos genes *nif* requerem o fator σ^{54} , sendo também ativados por NifA (MERRICK, 1993; PEDROSA *et al.*, 1997). Os genes *ntrB* e *ntrC* também estão envolvidos na regulação da fixação de nitrogênio neste organismo, pois mutantes para estes genes não foram capazes de fixar nitrogênio (PERSUHN *et al.*, 2000). Já a estirpe mutante para o gene *ntrY* fixa nitrogênio de maneira similar à estirpe selvagem e foi capaz de crescer em meios contendo amônio, arginina, glutamina, glutamato, aspartato, asparagina, alanina, serina e uréia como fonte de nitrogênio, mas não foi capazes de utilizar o nitrato como fonte de nitrogênio, indicando que *ntrY* pode estar envolvido com o metabolismo de nitrato (ALVES, 2006).

O *H. seropedicae* assim como outras bactérias fixadoras de nitrogênio é capaz de metabolizar o nitrato, crescendo aerobicamente em meio contendo nitrato

como única fonte de nitrogênio (BALDANI *et al.*,1986). A via respiratória do nitrato forma produtos como nitrito, oxido nítrico ou nitroso ou ainda dinitrogênio. Esses produtos, podem ser excretados ao invés de serem incorporados em compostos nitrogenados, e se acumularem no meio sob condições anaeróbicas (BALDANI *et al.*,1986).

O estudo do metabolismo do nitrato em *H.seropedicae* teve inicio com o trabalho de ALVES, 2006. Nesse trabalho o nosso objetivo foi obter um mutante no gene *narL* e assim comparar os resultados obtidos com os de outros organismos e definir a via de regulação de nitrato em *H. seropedicae*

A redução do nitrato tem um papel essencial no ciclo do nitrogênio com reflexos na agricultura, no meio ambiente e também com implicações em saúde publica. A redução assimilatória do nitrato, realizada por bactérias, fungos, algas e plantas superiores, transforma mais de 10^4 megatoneladas de nitrogênio inorgânico anualmente. Dado sua importância na biosfera e aplicações ambientais o estudo da via de redução do nitrato em procariotos tem se tornado objeto de muitos estudos genéticos, bioquímicos e fisiológicos nos últimos anos (PHILIPPOT e HOJBERG, 1999).

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo contribuir para o esclarecimento e entendimento da função do gene *narL* em *Herbaspirillum seropedicae*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudo *in silico* da proteína *NarL* de *H. seropedicae*;
- Mutagenizar o gene *narL* em *H. seropedicae* utilizando um transposon de resistência a canamicina;
 - Determinar o efeito da mutação do gene *narL* sobre a fixação de nitrogênio;
 - Investigar a função do gene *narL* no metabolismo de nitrato por meio de testes de crescimento em diferentes fontes de nitrogênio;
 - Determinar a atividade da nitrato redutase durante o crescimento em nitrato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BACTÉRIAS, PLASMÍDEOS E VETORES

As bactérias, plasmídeos e vetores utilizados neste trabalho estão listados na tabela abaixo:

TABELA 1: BACTÉRIAS, PLASMÍDEOS E VETORES

Bactéria	Característica	Referência
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
SmR1	Estirpe selvagem, Sm ^R , Nif ⁺	MACHADO <i>et al.</i> ; 1995.
LT78	Sm ^R , Km ^R , narL ⁻ Nif ⁺	Este trabalho
DGP286A	Sm ^R , Km ^R , ntrC ⁻ Nif ⁻	PERSUHN, 2000
<i>Escherichia coli</i>		
TOP 10	F ⁻ mcrA Δ(mvr – hrd RMS-mcrBC) φ 80 lacZ ΔML5 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara – leu) 7697 galU galK rpsL (SM ^R) endA1 nupG.	Invitrogen
S 17.1	Sm ^R , Tra ⁺	SIMON, PRIEFFER E PUHLER, 1983
Plasmídeos		
pHS17-051h12	Amp ^R , clone da biblioteca aleatória de DNA de <i>H. seropedicae</i> contendo o gene narL em pUC19.	GENOPAR
pLT1.17	Amp ^R , Km ^R , clone da biblioteca aleatória de DNA de <i>H. seropedicae</i> em pUC19 contendo transposon Km inserido na região codificadora do gen narL.	Este trabalho
pLT2.56	Amp ^R , Tc ^R Km ^R , pSUP contendo um fragmento do gene narL com inserção do transposon EZ::TN TM <KAN> interrompendo o gene.	Este trabalho

Vetor		
pUC19	<i>lacZ</i> , Amp ^R	SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989
pSUP202	Amp ^R , Cm ^R , Tc ^R	SIMON, PRIEFER e PUHLER, 1983

^R confere resistência ao referido antibiótico

3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37°C em meio Luria Broth (SAMBROOK, FRITSCH E MANIATIS, 1989) sob agitação de 150 rpm ou em meio sólido Luria Bertani Agar (LA) (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989). O meio sólido (LA) foi obtido pela adição de ágar (15g/L) ao meio líquido (LB). Para o preparo de células eletrocompetentes as estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio SOB (Gibco-BRL-Invitrogen) a 37°C sob agitação a 120 rpm e após eletroporação, as células de *E. coli* foram recuperadas em meio SOC (Gibco-BRL-Invitrogen) por 1 hora a 37°C sob agitação a 120 rpm.

O meio LB possui a seguinte composição:

Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de sódio	10 g/L
Triptona	10 g/L

O meio SOB possui a seguinte composição:

Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de sódio	$5,84 \times 10^{-1}$ g/L
Cloreto de potássio	$1,9 \times 10^{-1}$ g/L
Triptona	20 g/L
pH	7,0

O meio SOC possui a seguinte composição:

Extrato de levedura	5 g/L
Glucose	3,6 g/L
Cloreto de sódio	$6,0 \times 10^{-1}$ g/L
Cloreto de potássio	$1,9 \times 10^{-1}$ g/L
Cloreto de magnésio	$9,4 \times 10^{-1}$ g/L
Sulfato de magnésio	1,2 g/L
Triptona	20 g/L

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas a 30°C em meio líquido NFbHP utilizando malato como fonte de carbono (KLASSEN *et al.*, 1997) Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH_4Cl 2 mmol/L ou 20 mmol/L ou glutamato 5 mmol/L. Foi adicionado ao meio NFbHP 50 mL/L de solução de fosfatos (159,4 g/L de KH_2PO_4 e 17,8 g/L de K_2KPO_4). As soluções de fosfato, cloreto de amônio e glutamato foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio no momento do uso. Os meios sólidos e semi-sólidos foram obtidos pela adição de ágar ao meio NFbHP líquido nas concentrações de 15 g/L e 1,5 g/L respectivamente. Todos os inóculos foram, crescidos a 30°C e os inóculos em meio líquido foram crescidos sob agitação de 120 rpm.

O meio NFb malato apresenta a seguinte composição:

MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻¹ g/L
NaCl	1,0 x 10 ⁻¹ g/L
CaCl ₂	2,0 x 10 ⁻² g/L
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 ⁻² g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻² g/L
Ácido málico	5,0 g/L
Biotina	1,0 x 10 ⁻⁴ g/L
NaMoO ₄ .2H ₂ O	2,0 x 10 ⁻³ g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	2,35 x 10 ⁻³ g/L
H ₃ BO ₃	2,8 x 10 ⁻³ g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	8,0 x 10 ⁻⁵ g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,4 x 10 ⁻⁴ g/L
pH	6,5

Todos os meios foram esterilizados por autoclavação a 120°C e 1 atmosfera de pressão durante 15 minutos.

Os estoques de *E. coli* foram mantidos em glicerol 50% a -20 ou a -70°C e os estoques de *H. seropedicae* foram mantidos em glicerol 50% a -20°C ou a temperatura ambiente em meio NFbHP semi-sólido (20 mmol/L de NH₄Cl).

3.3 ANTIBIÓTICOS

As soluções de antibióticos utilizadas foram preparadas conforme descrito por SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989). As soluções estoque de tetraciclina (Tc) foram preparadas em etanol 50% na concentração de 10 mg/mL já as soluções de estreptomicina (Sm), canamicina (Km) e ampicilina (Amp), foram preparadas em água destilada nas concentrações de 80, 100 e 250 mg/mL respectivamente, e esterilizados por filtração em filtro Millipore 0,22µm. Todos os antibióticos foram

estocados a -20°C e adicionados aos meios de cultura imediatamente antes do uso. As concentrações usadas em casa estirpe estão apresentadas abaixo:

TABELA 2: ANTIBIÓTICOS

	Concentração utilizada na seleção de <i>H.</i> <i>seropedicae</i> (µg/mL)	Concentração utilizada para seleção de <i>E. coli</i> (µg/mL)
Ampicilina (Amp)	-	100
Canamicina (Km)	500	50
Estreptomicina (Sm)	80	20
Tetraciclina	10	10

3.4 MANIPULAÇÃO DE DNA

3.4.1 Purificação de DNA plasmidial

A extração de plasmídeos foi realizada segundo o método de lise alcalina modificado de SAMBROOK, FRITSCH E MANIATIS (1989). Aproximadamente 1,5 mL de uma cultura cultivada durante aproximadamente 10 horas foram centrifugadas a 13.400 rpm por 1 minuto. O sedimento de células foi ressuspenso em 150 µL de tampão GET (50 mmol/L glucose, 25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 10 mmol/L de EDTA pH 8,0). A lise celular foi então efetuada com 150 µL de solução de lise contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% e NaOH 180 mmol/L. Em seguida 150 µL de acetato de potássio (Kacf) 3 mol/L foram acrescentados e após homogeneização a mistura foi incubada 15 minutos no gelo. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 13.400 rpm por 5 minutos. O sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi separado e purificado pela adição de 150 µL de clorofórmio álcool-isoamílico, agitado vigorosamente por 1 segundo e centrifugado a 13.400 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e acrescentado 0,6 volumes de isopropanol, centrifugadas a 13.400 rpm por 5 minutos. O precipitado foi

lavado com 1 mL de etanol 70%. Após a centrifugação a 13.400 rpm por 5 minutos o DNA precipitado foi seco e dissolvido em água ultrapura.

3.4.2 Extração de DNA cromosomal

Um e meio mililitro de cultura de *H. seropedicae* em fase logarítmica de crescimento foram coletadas, por centrifugação (13.400 rpm, 1 minuto). As células foram ressuspensas em 200 µL de tampão GET (50 mmol/L de glicose, 25 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0 10 mmol/L de EDTA pH 8,0). Dois microlitros de solução de lisozima foi adicionada (10 mg/mL) e o sistema foi incubado por 5 horas a 30°C. Foi adicionado a este sistema SDS 1% seguido de incubação a 30°C por 30 minutos e adicionado proteinase K (50 µg/mL) por 16 horas a 37°C para a degradação protéica. A desproteinização foi feita pelo tratamento com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O DNA genômico presente na fase aquosa foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol 96%, lavado com etanol 80%, seco e ressuspensado em 200 µL de água ultra-pura estéril. A pureza do DNA foi determinada pela relação 260 e 280 nm e sua concentração estimada através da leitura da D.O. a 260nm.

3.4.3 Eletroforese de DNA em gel de ágar e agarose

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de ágar ou agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989). O DNA foi visualizado após tratamento com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL). O complexo DNA-Brometo de etídio foi observado em transiluminador ultravioleta (320 nm) e o perfil eletroforético foi registrado em um sistema de vídeo documentação (UVP). O tamanho molecular dos fragmentos foi estimado com base na comparação com marcador de peso molecular 1Kb ladder (Fermentas Inc.).

3.4.4 Clivagem do DNA com enzimas de restrição

As amostras de DNA foram clivadas utilizando as condições mais adequadas para a atividade da enzima de restrição, conforme indicada pelo fabricante ou por SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989).

Para a confirmação da inserção do transposon Km o plasmídeo pHS-17-FP-051-H12 foi clivado pelas enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I a 37°C por 12 horas.

Para subclonar o inserto contendo o gene *narL* do vetor pUC19 no vetor pSUP202 o plasmídeo pLT1.17 foi digerido com as enzimas *Eco*RI e *Nco*I e o fragmento de 2,4 Kb foi clonado no vetor pSUP202 cortado com as mesmas enzimas.

3.4.5 Preparo dos Vetores

Os vetores utilizados foram clivados com as enzimas de restrição adequadas e a purificação dos vetores foi segundo SAMBROOK FRITSCH e MANIATIS (1989).

3.4.6 Ligação do Fragmento de DNA ao Vetor

A reação de ligação foi feita segundo em SAMBROOK FRITSCH e MANIATIS (1989), nas condições específicas para atividade máxima da enzima T4 DNA ligase (Fermentas Inc.).

3.4.7 Reação de amplificação

Para a confirmação do mutante *narL* de *H. seropedicae* (LT78), foram realizadas reações de amplificação contendo iniciadores complementares a seqüências adjacentes ao gene *narL* (OLI1 1: 5'- GCCTGATCGCCCGCGAAAAG-3'; OLI2 2: 5'- TTTCTTGTTGCTCTGGCCG-3') usando o DNA cromossomal das estirpe selvagem e mutante *H. seropedicae* como molde. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa INVITROGEN Inc. As reações de amplificação

foram realizadas utilizando-se tampão da Taq DNA polimerase 1X (MGM), 0,5mmol/L dNTPs, 10pmol de cada oligonucleotídeo, 1,5mmol/L MgCl₂, 1-10 ng de DNA genômico purificado (molde) e 1 µL de Taq DNA polimerase (MGM) em um volume final de reação de 25µL. As condições de amplificação foram: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos e 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 2,5 minutos, seguidas de 1 ciclo a 72°C por 10 minutos. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf AG).

3.4.8 Reação de Sequenciamento

O sequenciamento do DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxirribonucleotídeos marcados com fluoróforos. As reações foram realizadas utilizando 5 pmol de oligonucleotídeo iniciador complementar à sequência de inserção do transposon Tn5 (5'-GCAAGGCGATTAAGTTGGGT-3', ou 5'-CGAACCGAACAGGCTTATGT-3') ou complementares a sequência do pUC19 (5'-GACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3', ou 5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3') e 3 µL do reagente *DYEnamic ET terminator reagent premix* (GE Healthcare), para um sistema total de 10 µL. A reação de sequenciamento foi feita em termociclador utilizando 35 ciclos com as seguintes etapas: 95 °C-1 min; 94 °C- 20 s, 55 °C-45s, 60 °C, 1,5 minutos. O produto da reação foi precipitado adicionando-se 10 µL de água ultra-pura, 2 µl de acetato de amônio 7,5 M e 60 µl de etanol 96%. A mistura foi centrifugada a 13.400 rpm por 20 minutos, desprezando depois o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 80% e centrifugado a 13.400 rpm por 5 minutos.

Após secagem a vácuo, o material resultante foi dissolvido em 4 µL de Formamide Loading Dye (Applied Biosystems), desnaturado por 2 minutos a 96°C e submetido à eletroforese em um sequenciador automático de DNA da ABI-PRISM 377 (Applied Biosystems).

3.4.10 Análise de Bioinformática

As seqüências obtidas foram comparadas com o bando de dados do Programa Genoma do Paraná (GENOPAR) e outros bancos de dados através do programa BLAST X e BLAST N (GenBank/NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov) (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

As análises da proteína NarL foram realizadas através dos programas SMART (SCHULTZ *et al.*, 2000), Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1997) e as análises filogenéticas foram realizadas segundo o programa MEGA 3.1 (KUMAR *et al.*, 2004).

3.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

3.5.1 Preparo de células eletrocompetentes

Para o preparo de células eletrocompetentes 50 mL de meio SOB foram inoculados com 500 µL de uma cultura saturada da estirpe de *E. coli* de interesse crescida em meio LB por 16 horas e incubados a 37 °C sob agitação a 120 rpm até atingir uma D.O._{600nm} entre 0,5 e 0,8. As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em 100mL de meio SOB (até a D.O._{600nm} ~ 0,8). A cultura foi resfriada em banho de gelo por 30 minutos e então foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos a 5°C e lavada duas vezes com água ultra-pura gelada. Em seguida as células foram ressuspensas em glicerol 15% gelado por duas vezes. As células foram então separadas em alíquotas de 30µL e estocadas a -70°C. Todos os procedimentos descritos foram feitos em gelo.

Para a preparação de estirpes de *H. seropedicae* eletrocompetente as células de *H. seropedicae* foram crescidas em meio NFbH-malato até uma D.O._{600nm} ~ 1,0-1,5. s e utilizado o protocolo acima.

3.5.2 Eletroporação

Alíquotas de 30 μL de células de *E. coli* ou 1000 μL de células de *H. seropedicae* eletrocompetentes foram descongeladas em banho de gelo e misturadas a alíquotas de DNA (5 ng - 0,5 μg) a ser eletroporado. A mistura foi transferida para a cuba de eletroporação que foi então submetida a um rápido choque elétrico de 12 a 16kV/cm para *E. coli* e 8 a 19 Kv/cm para *H. seropedicae*. As células de *E. coli* foram recuperadas em 1 mL de meio SOC por 30 minutos. Já as células de *H. seropedicae* foram recuperadas em meio NFbHP com 20 mmol de cloreto de amônio por 3 horas a 30°C sob agitação. Após a recuperação, 200 μL do inóculo foi plaqueado em meios de cultura contendo antibióticos para o isolamento dos transformantes.

3.5.3 Transferência de Plasmídeos por Conjugação

Os plasmídeos a serem transferidos para as estirpes de *H. seropedicae* foram mantidos em *E. coli* S17.1 (*tra*⁺). As estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas nos meios NFbHPN-malato e LB, respectivamente até uma D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,7. Em seguida, foram misturados 50 μL da cultura de *H. seropedicae* com 5 μL de *E. coli* e as células foram plaqueadas como uma gota em meio LA/NFbHPN-malato (1:3), e incubadas a 30 °C durante 20 horas. A massa de células foi raspada, suspensa em 1mL de NFbHP-malato e plaqueada em meio NFbHP-malato acrescido de 20 mmol/L de NH₄Cl. As colônias de *H. seropedicae* que receberam os plasmídeos foram selecionadas por resistência aos antibióticos conferida pelos mesmos (Sm e Km).

3.6 MUTAGÊNESE DO GENE *narL* DE *H. seropedicae*

A mutagênese do gene *narL* de *H. seropedicae* foi feita através da inserção de um transposon que confere resistência a Km inserido aleatoriamente no plasmídeo pHS17-051h12. A reação foi feita com a utilização do kit de inserção de transposon <KAN> EZ::TNTM EPICENTRE . O kit contém tampão de reação, tampão

de parada, transposon EZ::TNTM <KAN>, transposase EZ::TNTM e os primers reverso e universal. O sistema de mutagênese continha o plasmídeo pHS17-051h12, o tampão de reação, transposon e transposase e a reação foi realizada conforme instruções do fabricante.

Um microlitro do sistema foi utilizado para a eletroporação em *E. coli* estirpe TOP10 e as células foram plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos de resistência do plasmídeo (ampicilina) e do transposon (canamicina). As colônias resistentes a canamicina e ampicilina foram coletadas, os plasmídeos purificados e analisados por eletroforese em gel de ágar da digestão com enzimas de restrição. Os plasmídeos que aparentemente continham o transposon em seu inserto foram sequenciados.

O plasmídeo recombinante contendo transposon EZ::TNTM <KAN> inserido no gene *narL* foi clivado com as enzimas *EcoRI-NcoI*, liberando 2 fragmentos: um de aproximadamente 4,4Kb com parte do inserto e o plasmídeo, e outro com aproximadamente 2,3Kb contendo o gene *narL* com o transposon Km. O gene *narL* com o transposon Km foi então ligado ao vetor pSUP também cortado *EcoRI-NcoI*, gerando o plasmídeo LT2.56. Em seguida o plasmídeo LT2.56 foi conjugado em *H. seropedicae* estirpe SMR1 (selvagem). A seleção dos mutantes foi feita em meio NFbHPN contendo 500 µg/mL de canamicina.

3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) utilizando como padrão soro albumina bovino.

3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE NITROGENASE DA ESTIRPE SELVAGEM E MUTANTE DE *H. seropedicae*

A atividade de nitrogenase foi determinada em culturas crescidas em meio NFbHP semi-sólido contendo glutamato (0,5mmol/L), pela medida da redução de acetileno a etileno conforme descrito por KLASSEN (1997) para estirpes de *H. seropedicae*. As concentrações de etileno formado a partir de acetileno foram determinadas por cromatografia gasosa. A atividade específica de nitrogenase foi expressa em nmoles de etileno formado por mg de proteína total na cultura por minuto.

3.9 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DUPLICAÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES *narL* E *ntrC* EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

As estirpes de *H. seropedicae* SMRI (selvagem), LT78 (*narL*⁻) e DCP286A (*ntrC*⁻) foram cultivadas em meio NFbHP líquido contendo 5 mmol/L de glutamato até uma DO₆₀₀ de aproximadamente 1,0. As células foram então centrifugadas (1 minuto, 13000 rpm), o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio NFbHP sem fonte de nitrogênio ajustando a DO₆₀₀ para aproximadamente 1,0. Foram coletadas 200µL destas culturas e ressuspensas em 20mL de meio NFbHP contendo 10 mmol/L de nitrato ou 20 mmol/L de cloreto de amônio como fontes de nitrogênio. As densidades óptica das cultura foi medida à 600nm, monitorada a cada hora até 12 horas e novamente com 24 horas de crescimento. Os resultados foram utilizados para a obtenção de uma curva de crescimento e atividade da nitrato redutase.

Os tempos de duplicação (td) para as estirpes selvagem e mutantes LT78 (*narL*⁻) e DCP286A (*ntrC*⁻) nos diferentes fontes de nitrogenio foram determinados segundo a equação (MONOD, 1947):

$$Td = 0,31 \times (t_2 - t_1) / (\log DO_{600} N_2 - \log DO_{600} N_1)$$

Onde N₂ e N₁ correspondem a turbidez das culturas nos tempos t₂ e t₁ respectivamente.

3.10 DOSAGEM DE NITRITO E ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE

Alíquotas de 100 μL de culturas foram retiradas durante a curva de crescimento (como no item anterior) a cada hora, durante 24 horas e a quantidade de nitrito formada em cada cultura foi determinada segundo método de GRIESS (1984) adaptado para placas de ELISA (XU, XU e VERSTRAETE, 2000). A atividade da nitrato redutase foi expressa em mmol/L de nitrito por mg de proteína.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE IN SÍLICO DOS GENES *nar* EM *H. seropedicae*

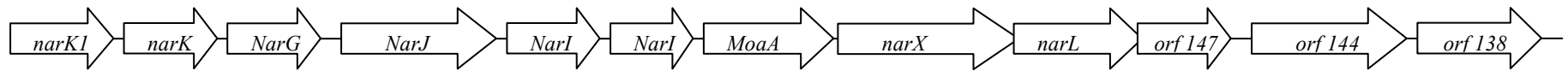
Os genes *narX* e *narL* de *H. seropedicae* foram identificados no banco de dados do Programa GENOPAR. Uma região de aproximadamente 6000 pares de base contendo os genes *narXL* foi selecionada e recuperada do banco de dados do GENOPAR. Um total de 13 genes foram identificados nesta região (FIGURA 6): *narK1*, *narK*- codificam para proteínas transportadoras de nitrato e nitrito; *narG*, *narH*, *narJ*, *narI1*, *narI*- todos os genes codificantes da nitrato redutase respiratória; o gene *moaA*, responsável pela biossíntese de molibdenio; genes *narX* e *narL*; *orf147*, uma proteína hipotética conservada; *orf144*, uma provável proteína transmembrana e a *orf 138*, uma proteína hipotética, formando possivelmente um único operon *narK1narKnarGHJImoaAnarXL* (FIGURA 7). Outros genes relacionados com o metabolismo de nitrato também foram identificados. Uma terceira cópia de *narK* foi identificada a montante do operon da nitrito redutase respiratória *nirBDC* possivelmente formando um único operon. *H. seropedicae* não apresenta os genes *narPQ*. Também não foram encontrados em *H. seropedicae* genes do sistema das nitrato redutase periplasmática (NAP) (GENOPAR).

Quanto à via de assimilação de nitrato, o *H. seropedicae* apresenta uma organização dos genes de transporte de nitrato similar a de *K. oxytoca*, onde eles formam um operon com os genes estruturais da nitrato redutase assimilatória (*nasAC*) nitrito redutase (*nasB*) e do transportador de nitrato ATP dependente (*nasDEF*), o operon *nasFEDCBA* (GENOPAR). Em *H. seropedicae*, a mutação do gene *ntrY* diminuiu drasticamente a expressão do operon *nasFEDCBA*, do operon *narKnirBDC* e *narXL*, indicando que este gene está envolvido com a expressão dos genes do metabolismo de nitrato (ALVES, 2006).

Na grande maioria das bactérias, os genes *nar* estão organizados em um operon *narGHJI* e a região a montante destes genes possui uma grande heterogeneidade (RICHARDSON *et al.*, 2001). Em *E.coli* o gene *narK* está a montante do óperon *narGHJI* juntamente com os genes *narXL* que estão situados a montante de *narK*, mas são transcritos em direção oposta (PHILIPPOT e HOJBERG, 1999; RICHARDSON *et al.*, 2001). Em *Mycobacterium tuberculosis* os genes *narK*

não estão próximos aos genes *narGHJ* e há quatro cópias deste gene em todo o seu genoma (PHILIPPOT e HOJBERG, 1999; RICHARDSON *et al.*, 2001). Em *Pseudomonas aeruginosa*, há duas cópias de *narK* a montante dos genes estruturais da nitrato redutase respiratória (PHILIPPOT e HOJBERG, 1999; RICHARDSON *et al.*, 2001)

FIGURA 7: ORGANIZAÇÃO DOS GENES *nar* EM *H. seropedicae*.



As setas indicam a posição dos genes e o seu sentido de transcrição. Os espaços entre as setas indicam prováveis regiões promotoras ou intergênicas. Toda esta sequência compreende aproximadamente 6000 pares de base do genoma de *H. seropedicae* onde se encontram os genes *narXL*. A seqüência foi obtida do banco de dados do programa GENOPAR (www.genopar.org)

4.2 Análise da proteína NarL

O gene *narL* em *H. seropedicae* possui 660 pares de base e codifica para uma proteína de 219 aminoácidos (FIGURA 8).

FIGURA 8: SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DE NarL EM *H. seropedicae* E DE SEU PRODUTO DE TRANSCRIÇÃO.

1	atg gca atc cgt att ctg ctg gtc gat gac cac acc ctc ttt cgc	45
1	Met Ala Ile Arg Ile Leu Leu Val Asp Asp His Thr Leu Phe Arg	15
46	agc ggc atc cgc ctg ctg ctg caa cgg cac ccc gac atc gac gtg	90
16	Ser Gly Ile Arg Leu Leu Leu Gln Arg His Pro Asp Ile Asp Val	30
91	gtg ggc gag gcc gtc gat ggg ctg gac ggc gtc aag cgc gcc ctg	135
31	Val Gly Glu Ala Val Asp Gly Leu Asp Gly Val Lys Arg Ala Leu	45
136	cag ctg cgt ccc gac gtg gtg ctg atg gac ctg aac atg ccc ggc	180
46	Gln Leu Arg Pro Asp Val Val Leu Met Asp Leu Asn Met Pro Gly	60
181	ctg tcg ggc ctg gaa gcc atg cag ctg atc gtg cag gac ctg ccc	225
61	Leu Ser Gly Leu Glu Ala Met Gln Leu Ile Val Gln Asp Leu Pro	75
226	gag acc gcc gtg ctg atg ctg tcg gtc tcg gaa gaa gcc gac gac	270
76	Glu Thr Ala Val Leu Met Leu Ser Val Ser Glu Glu Ala Asp Asp	90
271	ctc acc acg gcc ctg cac aat ggc gcg cgc ggc tac ctg ctc aag	315
91	Leu Thr Thr Ala Leu His Asn Gly Ala Arg Gly Tyr Leu Leu Lys	105
316	aac atc gag gcc gac tac ctg gtg caa tcc atc aag cgc gcc gcc	360
106	Asn Ile Glu Ala Asp Tyr Leu Val Gln Ser Ile Lys Arg Ala Ala	120

```

361  gcg ggc gaa ccg gtg atc tcc gaa tcc atg acc gcc aag ctg gtc 405
121  Ala Gly Glu Pro Val Ile Ser Glu Ser Met Thr Ala Lys Leu Val 135

406  atg caa ctg cgg gct ggg gcc ggc aac ccc gcc gcc agc gcc gcc 450
136  Met Gln Leu Arg Ala Gly Ala Gly Asn Pro Ala Ala Ser Ala Ala 150

451  gag ccc acc gac aag ctc acc gca cgc gaa cgc gcg acc atg gtc 495
151  Glu Pro Thr Asp Lys Leu Thr Ala Arg Glu Arg Ala Thr Met Val 165

496  tgc ata gcg cgc ggc cag agc aac aag gaa atc gcg cgc agc ctg 540
166  Cys Ile Ala Arg Gly Gln Ser Asn Lys Glu Ile Ala Arg Ser Leu 180

541  gaa gtg gcc gaa agc acc gtc aag atc cat gtg cag aac ctg ctc 585
181  Glu Val Ala Glu Ser Thr Val Lys Ile His Val Gln Asn Leu Leu 195

586  agg aag ctg cag ctc tcc agc cgg gtg cag ata gcg gtg tat gct 630
196  Arg Lys Leu Gln Leu Ser Ser Arg Val Gln Ile Ala Val Tyr Ala 210

631  gtg gaa cac ggc ctg gac aaa tcg tcc tga 660
211  Val Glu His Gly Leu Asp Lys Ser Ser End

```

A proteína NarL pertence a um sistema de dois-componentes juntamente com NarX. Em *H. seropedicae*, a proteína NarL possui dois domínios altamente conservados: um domínio fosfoceptor, na região N-terminal (*REC*; *cheY-homologous receiver domain*) que é fosforilado pela histidina quinase (NarX) e um domínio N-terminal de ligação ao DNA do tipo hélice-volta-hélice (H-T-H). A análise dos domínios da proteína foi feita através do programa SMART (SCHULTZ *et al.*, 2000) (FIGURA 9).

FIGURA 9: DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DA PROTEÍNA NarL EM *H. seropedicae*

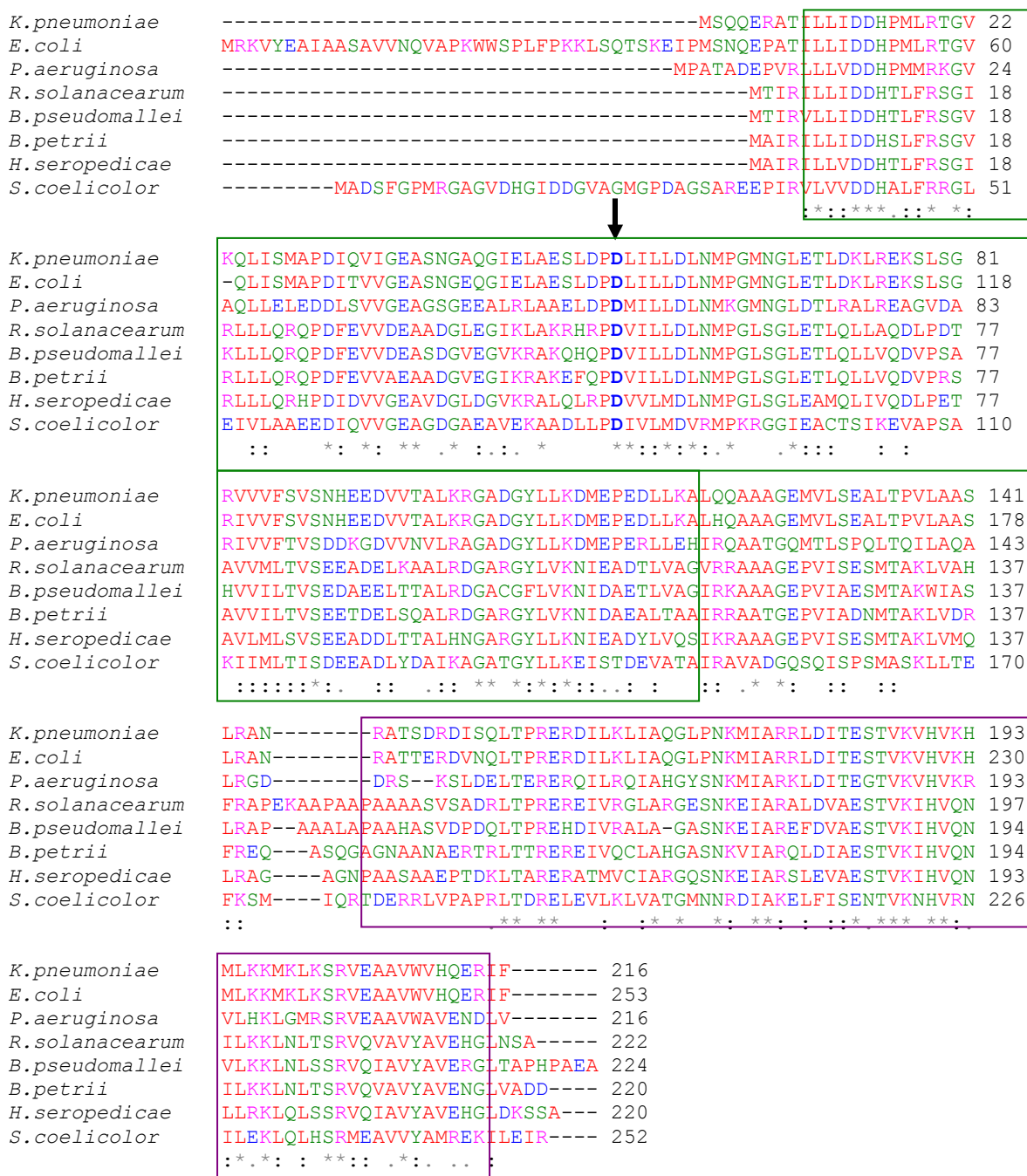


A identificação dos domínios estruturais foi feita utilizando-se o programa SMART. O losango azul está representando o domínio N-terminal REC e o hexágono amarelo o domínio C-terminal H-TH de NarL em *H. seropedicae*.

A proteína NarL de *H. seropedicae* foi comparada a proteínas NarL de outros organismos. Para esta comparação as sequências de aminoácidos de NarL de *H. seropedicae* foram inicialmente comparadas ao banco de dados do Gene Bank utilizando o programa BLAST P (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Algumas das seqüências com os maiores índices de identidade e similaridade foram escolhidas para a identificação de regiões conservadas, que foi determinada pelo alinhamento múltiplo de sequências através do programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) (FIGURA 10). Foram utilizados as seqüências de NarL dos organismos: *Klebsiella pneumoniae*, (44% de identidade 68% de similaridade); *Escherichia coli*, (44% de identidade 68 % de similaridade); *Pseudomonas aeruginosa* (44% de identidade 64% de similaridade); *Ralstonia solanacearum* (68% de identidade 81% de similaridade); *Burkholderia pseudomallei* (64% de identidade 81% de similaridade); *Bordetella petrii* (63% de identidade 82% de similaridade) e *Streptomyces coelicolor* (43% de identidade 63% de similaridade).

A partir desta análise foi possível observar a grande similaridade entre os domínios N-terminal e C-terminal de NarL nas diferentes espécies de bactérias, além do resíduo aspartato que é fosforilado por NarX. Este resultado demonstra o alto grau de conservação da proteína NarL em *H. seropedicae* e em diferentes organismos.

FIGURA 10: COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NarL DE *H.seropedicae* COM A DE PROTEÍNAS ORTÓLOGAS DE OUTROS ORGANISMOS

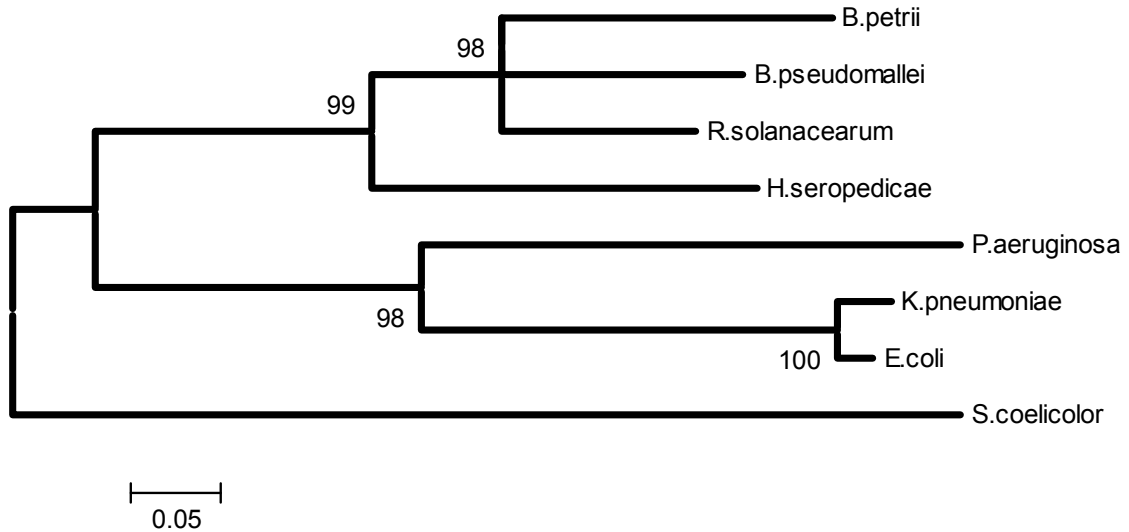


O alinhamento foi realizado através do programa ClustalW. Os asteriscos (*) representam aminoácidos iguais, os dois pontos (:) aminoácidos conservados e os pontos simples (.) aminoácidos semi-conservados. Legenda de cores: Vermelho: aminoácidos pequenos ou hidrofóbicos; Azul: aminoácidos ácidos; Magenta: aminoácidos básicos; Verde: aminoácidos que possuem grupos OH e NH₂. O quadrado em verde delimita a região N-terminal de NarL, a seta preta indica o resíduo de aspartato que é fosforilado por NarX, e o quadrado magenta está evidenciando a região C-terminal da proteína.

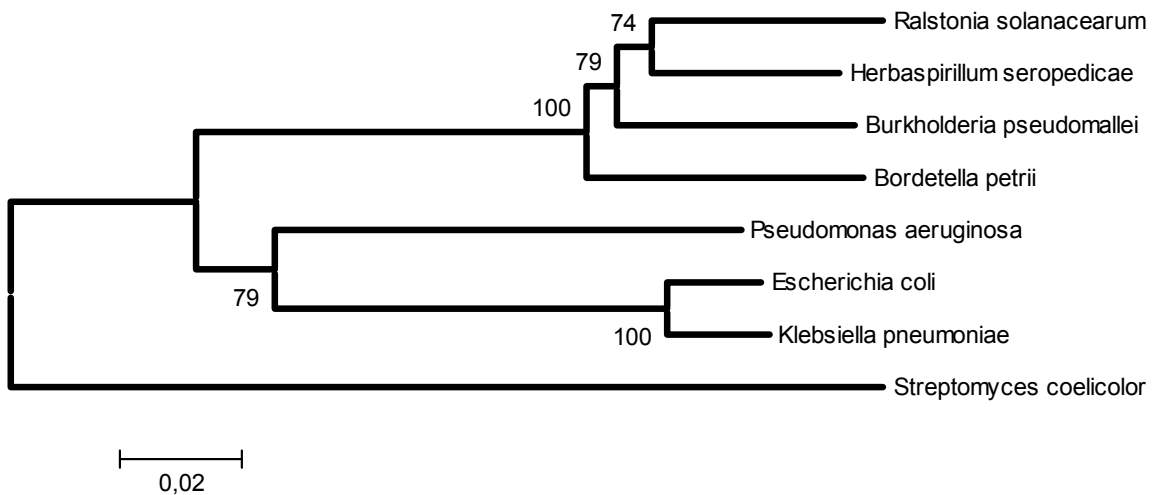
As sequências de aminoácidos das proteínas NarL das β -proteobactérias: *H.seropedicae*, *R.solanacearum*, *B.petrii*, *B.pseudomallei* e das α -proteobactérias *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* e *S. coelicolor*, foram alinhadas pelo programa ClustalW. O resultado deste alinhamento foi utilizado para construir uma árvore filogenética (FIGURA 11A), onde os três grupos: β -proteobactérias, α -proteobactérias e *S. coelicolor* foram claramente separados. Esta separação é suportada pelos valores de *bootstraps*. É importante notar que esta árvore está coerente com a filogenia do gene 16S rRNA (FIGURA 11B), indicando que o gene *narL* reflete a evolução das α e β -proteobactérias e não foi adquirido por transferência lateral.

FIGURA 11: ÁRVORES FILOGENÉTICAS

A



B

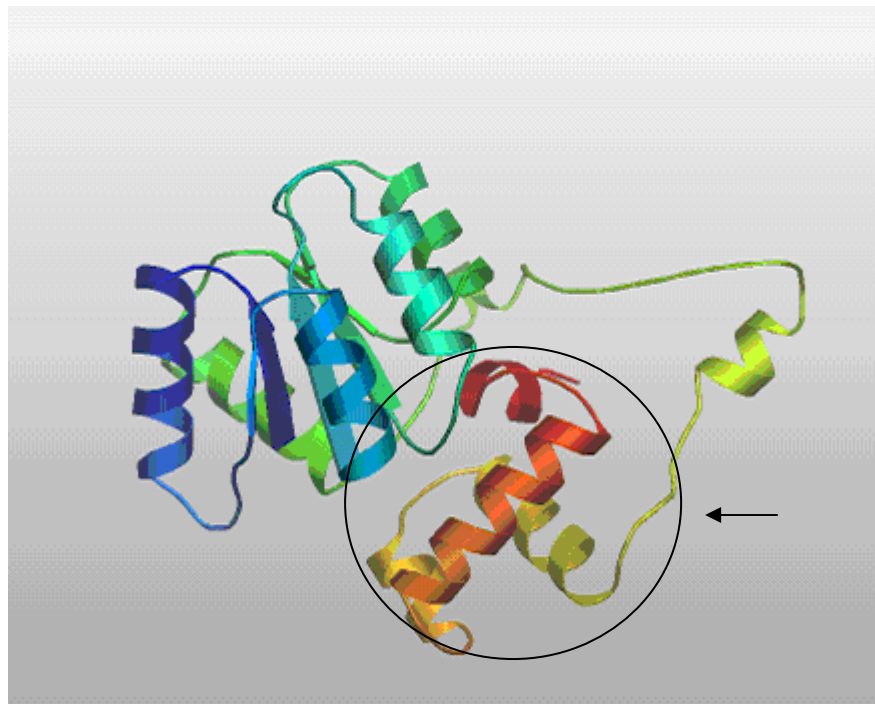


A: Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos das proteínas NarL de estirpes tipo dos organismos indicados. B: Árvore filogenética baseada no 16S rRNA das estirpes tipo dos organismos indicados. As árvores foram construídas pelo método de "Neighbor joining" por consensos de bootstraps utilizando 1000 replicações no programa MEGA 3.1.

As escalas representam o número de modificações nos aminoácidos em A. e nucleotídeos em B. a cada milhão de ano.

A partir da sequência de aminoácidos de NarL em *H. seropedicae* foi possível determinar a provável estrutura conformacional protéica como pode ser visto na FIGURA 12. O modelo estrutural teórico foi obtido utilizando o programa www.swissmodel.expasy.org e é baseado no modelo estrutural da proteína NarL de *E. coli*. Este resultado corrobora os resultados obtidos com o programa ClustalW e SMART podendo-se confirmar a presença do domínio N-terminal formado por 5 folhas- β e 5 α -hélices, e o domínio e C-terminal formado por 4 α -hélices e o motivo H-T-H. Estes dois domínios bem conservados da proteína estão unidos por meio de uma pequena α -hélice.

FIGURA 12: MODELO ESTRUTURAL TEÓRICO DE NarL EM *H. Seropedicae*



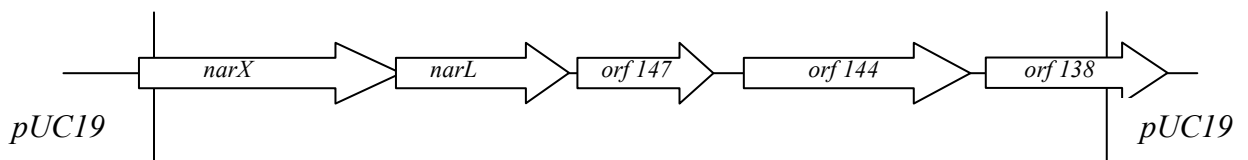
Provável estrutura secundária de NarL em *H. seropedicae* obtida pelo programa www.swissmodel.expasy.org. O domínio H-T-H foi destacado pelo círculo.

4.3 OBTENÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE *narL*⁻ (LT78) EM *H. seropedicae*

Para a obtenção da estirpe mutante *narL* de *H. seropedicae* foi utilizado o plasmídeo pHS-17-FP-051-H12 contendo o gene *narL* clonado no vetor pUC19 disponibilizado pelo programa GENOPAR.

As extremidades do inserto do plasmídeo pHS-17-FP-051-H12 foram sequenciadas com os oligonucleotídeos iniciadores reverso e universal para a confirmação da identidade. A análise da sequência de uma extremidade do inserto obtida com o iniciador universal (1035 pares de bases) revelou similaridade com o gene *narX*. A comparação com a sequência obtida com o oligonucleotídeo iniciador reverso (947 pares de base) contém similaridade com a *orf138*. O inserto de DNA no plasmídeo pHS-17-FP-051-H12 possui 2939 pares de bases e contém a sequência completa do gene *narL*. Os genes *narXL* de *H. seropedicae* possuem juntos 1664 pares de bases. A sequência presente no plasmídeo pHS-17-FP-051-H12 possui os seguintes genes: parte do gene *narX*, o gene *narL*, a *orf147*, uma proteína hipotética conservada; *orf144*, uma provável proteína transmembrana e a *orf138* (FIGURA 13).

FIGURA 13: ESQUEMA DO PLASMÍDEO pHS-17-FP-051-H12 QUE CONTÉM O GENE *narL* EM *H. seropedicae*

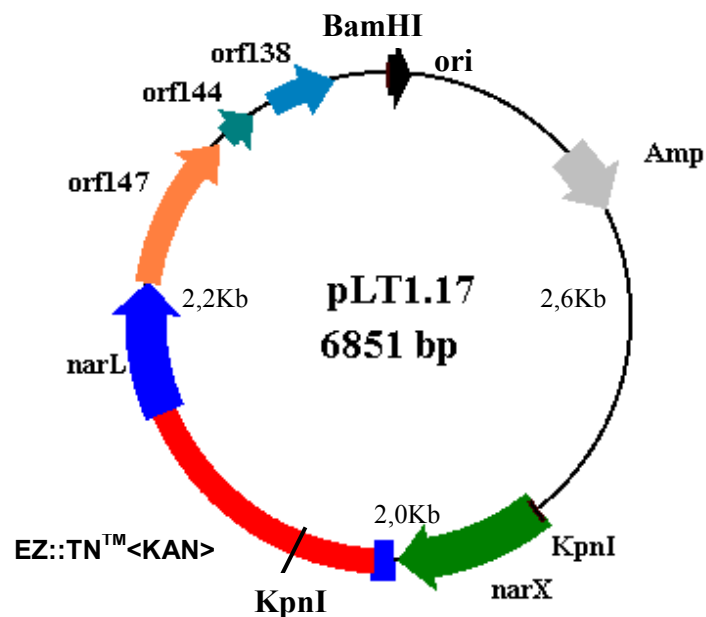


Fragmento de aproximadamente 3,0 Kb inserido no plasmídeo pHS-17-FP-051-H12

O plasmídeo pHS-17-FP-051-H12 foi obtido da biblioteca geômica de *H. seropedicae* do programa GENOPAR e confirmado por sequenciamento. As setas indicam os genes e seu sentido de transcrição, os espaços entre elas representa a região intergênica. Todo o inserto contido no plasmídeo contém aproximadamente 3,0 Kb.

Após a confirmação da presença do gene *narL* no plasmídeo pHS-17-FP-051-H12 foi realizada uma reação para inserção do transposon EZ::TNTM<KAN> *in vitro*. Como a inserção de transposon é aleatória, vários clones foram analisados para verificar a região de inserção do transposon. Para a identificação de um clone com inserção no gene *narL*, os plasmídeos das colônias selecionadas aleatoriamente foram purificados e submetidos a análise por enzimas de restrição com sítios únicos no incerto. Esta análise permitiu identificar o plasmídeo pLT 1.17 (FIGURA 14).

FIGURA 14 : MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pLT1.17



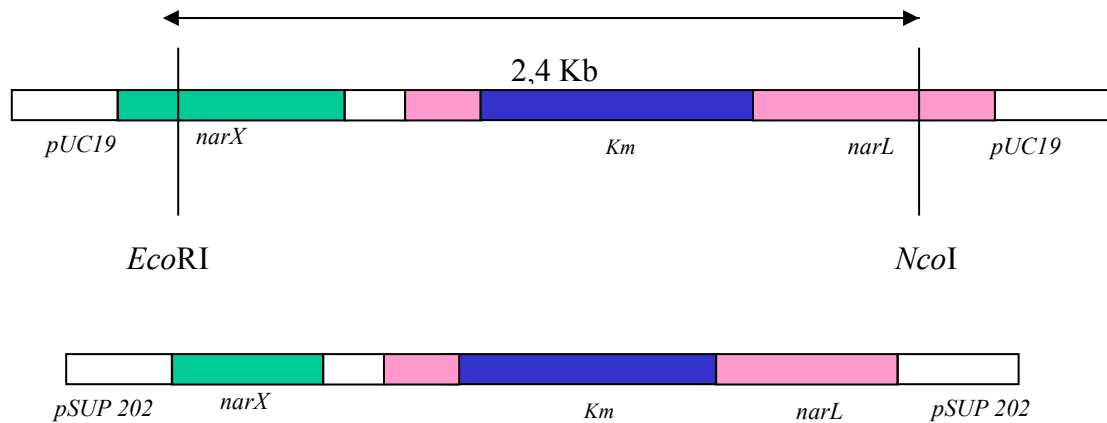
O plasmídeo pLT1.17 contém 6851 pares de base, o gene *narX* está representado em verde; o gene *narL* em azul, interrompido pelo transposon de resistência a canamicina (em vermelho); a *orf147* está representada em alaranjado; *orf144* está representada em verde escuro e a *orf138* em azul claro.

O plasmídeo mutado pLT1.17 derivado de pHS-17-FP-051-H12 contém um sítio de restrição para *Bam*HI e um sítio para *Kpn*1, já o transposon contém um sítio para *Kpn*1 gerando após a digestão três fragmentos, um de aproximadamente 2600 pares de base, correspondente ao vetor e outros dois fragmento que juntos somariam o tamanho do inserto com o transposon EZ::TNTM<KAN> (aproximadamente 4200 pares de base), de acordo com o local de inserção do transposon EZ::TNTM<KAN>. A análise dos perfis eletroforéticos (dados não mostrados) permitiu selecionar apenas os plasmídeos que continham o transposon inserido no DNA do inserto.

O plasmídeo pLT1.17 foi então sequenciado utilizando oligonucleotídeos iniciadores que se anelam nas extremidades do transposon EZ::TNTM<KAN> permitindo determinar a seqüência do ponto de inserção. A comparação da seqüência obtida com o genoma de *H. seropedicae* revelou que o transposon EZ::TNTM<KAN> foi inserido no gene *narL*.

Para facilitar a obtenção do mutante *narL* de *H.seropedicae* o plasmídeo pLT1.17 foi digerido com as enzimas *Eco*RI e *Nco*I e o fragmento liberado de 2,4Kb contendo uma porção do gene *narX*. O transposon e parte do gene *narL* foi ligado ao vetor pSUP202 cortado com as mesmas enzimas resultando no plasmídeo pLT2.56 (FIGURA 15).

FIGURA 15: ESQUEMA MOSTRANDO O FRAGMENTO DO PLASMÍDEO pLT1.17 SUBCLONADO NO pSUP 202



Esquema de restrição com *EcoRI-NcoI* de pLT1.17 gerando um fragmento de aproximadamente 2,4 Kb que foi ligado ao vetor pSUP202 gerando o plasmídeo pLT2.56.

O plasmídeo pLT2.56 foi eletroporado na estirpe de *E.coli* S17.1 e as colônias transformantes foram selecionados em meio contendo estreptomicina, (marca de resistência da estirpe S17.1), canamicina (marca de resistência do transposon) e tetraciclina (marca de resistência do vetor pSUP202).

Após a confirmação da introdução do plasmídeo pLT2.56 em *E. coli* S17.1 a estirpe foi conjugada com *H. seropedicae* para a obtenção de mutantes cromossomais. Os transconjugantes de *H.seropedicae* contendo a inserção do transposon EZ::TNTM<KAN>, resultado de recombinação homóloga, foram primeiramente selecionados em meio NFbHPN-malato sólido contendo os antibióticos estreptomicina (marca da estirpe selvagem SMR1) e canamicina (marca do transposon). Na próxima etapa, as colônias foram riscadas em placas contendo estreptomicina e canamicina e simultaneamente em placas contendo estreptomicina, canamicina e tetraciclina. As colônias que não cresceram na placa contendo também

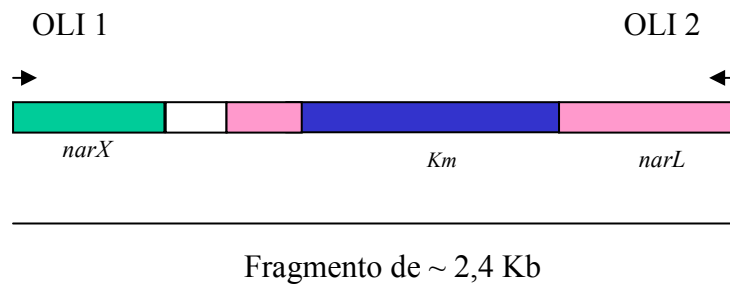
tetraciclina foram selecionadas e provavelmente foram resultados de recombinação dupla

Trinta e cinco colônias resistentes a canamicina e sensíveis a tetraciclina foram isoladas e transferidas para uma placa mestra. Uma delas foi escolhida aleatoriamente e denominada LT78. Esta nova estirpe contém o gene *narL* mutado.

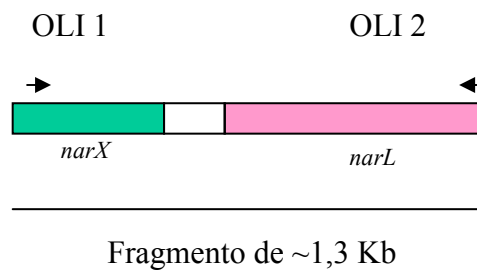
A confirmação da inserção do transposon EZ::TNTM<KAN> no genoma de *H.seropedicae* foi feita por meio da reação de amplificação utilizando oligonucleotídeos iniciadores que se anelam em regiões adjacentes ao gene *narL* (OLI 1 e OLI 2) conforme o esquema da FIGURA 16. Os iniciadores foram planejados para se anelarem em uma sequência do genoma que não está no inserto do plasmídeo pLT2.56, mas presente no plasmídeo pLT1.17, permitindo que fosse usado como controle. Assim, pelo tamanho do fragmento amplificado pode-se confirmar um mutante duplo recombinante. Quando o DNA da estirpe LT78 foi usado como molde esperava-se uma banda de 2,4 Kb correspondente ao gene *narL* com a inserção do transposon EZ::TNTM<KAN> e na estirpe selvagem uma banda de 1,3 Kb correspondente ao gene *narX* e *narL*. Através da amplificação do fragmento de interesse foi então possível determinar a mutação presente na estirpe LT78 de maneira mais rápida, simples e segura do que o método de hibridização com sondas radioativas.

FIGURA 16: POSIÇÃO DE ANELAMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA A CONFIRMAÇÃO DA MUTAÇÃO DO GENE *narL* EM *H. seropedicae* LT78

A



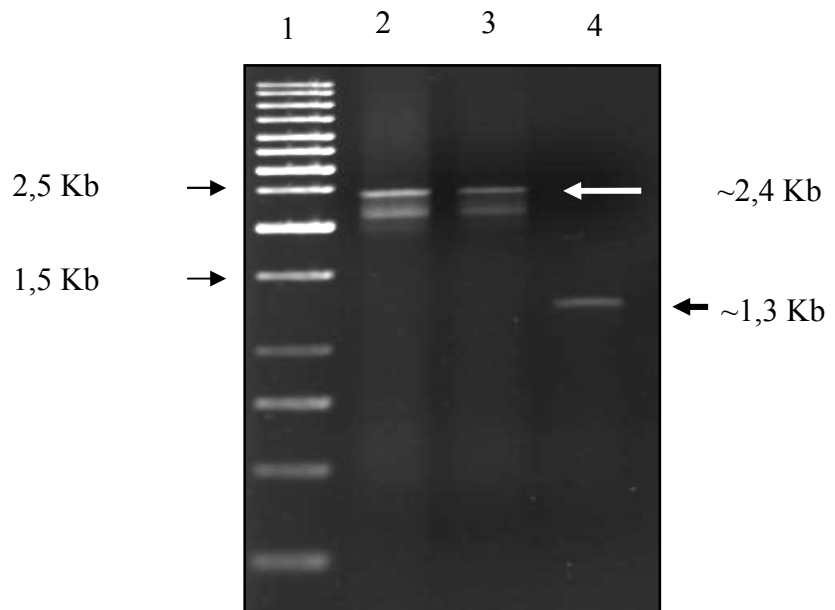
B



Esquema mostrando os locais de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores (OLI 1 e OLI 2). A: produto de amplificação da estirpe LT78 de *H. seropedicae* (2,4Kb). B: produto de amplificação da região dos genes *narXL* da estirpe selvagem de *H. seropedicae* (1,3Kb).

Uma das colônias transformantes foi utilizada para a reação de amplificação para a confirmação do mutante *narL* duplo recombinante em *H. seropedicae* como pode ser visto na FIGURA 17.

FIGURA 17: CONFIRMAÇÃO DA OBTENÇÃO DE ESTIRPE MUTANTE PARA O GENE *narL* EM *H. seropedicae*



Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR da reação de amplificação do gene *narL*. Linha 1: marcador de peso molecular. Linha 2: produto de amplificação do gene *narL* utilizando como molde o plasmídeo pLT1.17 e os oligonucleotídeos iniciadores OLI 1 e OLI2 gerando um fragmento de 2,4 Kb. Linha 3: produto de amplificação utilizando DNA cromossomal da estirpe LT78 como molde e os oligonucleotídeos iniciadores OLI 1 e OLI2, gerando um fragmento de 2,4 Kb. Linha 4: produto de amplificação utilizando como molde DNA cromossomal da estirpe selvagem de *H. seropedicae* (SMR1) e os oligonucleotídeos iniciadores OLI 1 e OLI2 gerando um fragmento de 1,3Kb.

Como pôde ser visto na FIGURA 17 além da banda esperada de 2,4Kb no produto de amplificação do gene *narL*, houve também a amplificação de um segundo produto de aproximadamente 2,1 Kb. Analisando-se as sequências do plasmídeo pLT1.17 foi encontrada uma sequência onde possivelmente o oligonucleotídeo iniciador OLI 2 estaria se anelando na região do transposon, gerando esta segunda banda de 2,1 Kb. Mesmo aumentando a temperatura de anelamento dos primers e a concentração de cloreto de magnésio não foi obtida uma amplificação em que este produto também não fosse amplificado. O tamanho de 2,1 Kb é correspondente a amplificação de uma região do transposon e mais parte do gene *narL* e *narX*.

Após a confirmação da estirpe mutante LT78 (*narL*⁻) foram iniciados os experimentos de caracterização do fenótipo do mutante.

4.4 EFEITO DA MUTAÇÃO NO GENE *narL* DE *H.seropedicae* SOBRE O CRESCIMENTO AERÓBIO

Estirpes mutantes *narL*⁻ (LT78), e *ntnC*⁻ (DCP286A) e a estirpe selvagem (SMR1) foram analisadas quanto ao crescimento em meio líquido NFbHP com nitrato de sódio e cloreto de amônio como fonte de nitrogênio (FIGURA 18A).

As estirpes SMR1 (selvagem), e DCP286A (*ntnC*⁻) apresentaram um crescimento semelhante em meio contendo cloreto de amônio como fonte de nitrogênio (FIGURA 18A). Estes dados já haviam sido mostrados anteriormente por ALVES (2006) e PERSUHN (2000). O mutante LT78 também teve um crescimento semelhante às outras estirpes testadas. Este resultado já era esperado, pois não há indicações na literatura de que o gene *narL* esteja envolvido com o metabolismo de amônio.

Quando o crescimento em meio contendo nitrato como fonte de nitrogênio é avaliado (FIGURA 18B), não se observa crescimento para a estirpe DCP286A como já havia sido demonstrado por PERSUHN (2000). A estirpe mutante LT78 teve um crescimento menor que ao da estirpe selvagem. Este resultado sugere a importância do gene *narL* na utilização de nitrato por *H. seropedicae*.

As curvas de crescimento foram obtidas como descrito no item 3.9 e a partir de então foi possível determinar os tempos de duplicação das estirpes na presença

de cloreto de amônio e nitrato de sódio. Na presença de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio todas as estirpes tiveram um tempo de duplicação de aproximadamente 51 minutos medido entre 5 e 12 horas de crescimento (correspondente a fase logarítmica de crescimento da cultura). Já em meios contendo nitrato como fonte de nitrogênio a estirpe selvagem teve um tempo de duplicação de 90 minutos medidos entre 5 e 12 horas de crescimento (correspondente a fase logarítmica de crescimento da cultura). Em contraste, os tempos de duplicação da estirpe mutante LT78 foi medido entre 8 e 12 horas foi de 131 minutos.

Uma outra forma de comparar a capacidade de crescimento em um determinado substrato é pela utilização de crescimento relativo, onde a estirpe selvagem é usada como referência. O crescimento do mutante *nrC* relativo ao da estirpe selvagem SMR1 diminuiu com o tempo de incubação alcançando um número de 10% do crescimento da estirpe selvagem (FIGURA 19). Até atingir 7 horas de incubação, o mutante *narL* teve um comportamento semelhante a hora menos pronunciada, alcançando 60% do crescimento da estirpe selvagem. Após a 8ª hora de crescimento da estirpe LT78 o crescimento em absorbância 600nm foi se aproximando ao da estirpe selvagem. Estes resultados sugerem que o gene *narL* está envolvido com o metabolismo de nitrato em *H. seropedicae*.

O fato do mutante LT78 não crescer proporcionalmente a estirpe selvagem ocorre em razão do gene *narL* embora não esteja diretamente envolvido com o crescimento aeróbio, regula a transcrição de diversos genes envolvidos na metabolização do nitrato, (DARWIN e STEWART, 1995; HARTIG *et al.*, 1999; GOH *et al.*, 2005).

Estudos realizados por KOLENSNIKOW *et al.*, (1992) mostram que mutantes *narL* de *E. coli* tiveram a expressão de *narK* 110 vezes menor com relação a estirpe selvagem quando crescidas em anaerobiose. Quando nitrato foi adicionado ao meio não houve mudança na expressão de *narK* nos mutantes, já na estirpe selvagem a expressão deste gene foi aumentada em oito vezes. Como o produto de *narK* realiza o transporte de nitrato e nitrito e encontra-se sobre a influência de *narL* (KOLENSNIKOW *et al.*, 1992; PHILIPPOT e HOJBERG, 1999) pode estar afetando desta forma o crescimento do mutante *narL* também em *H. seropedicae*.

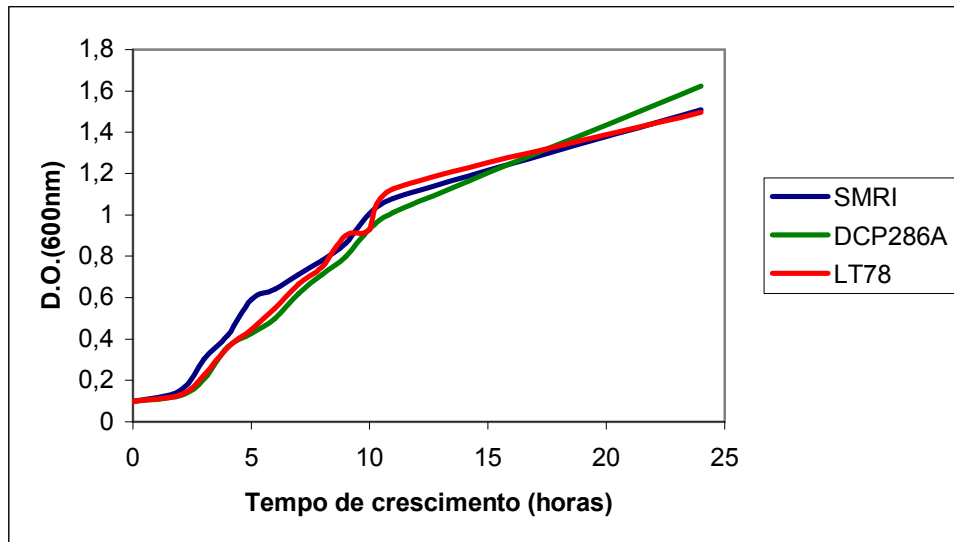
Em função do metabolismo de nitrato ser extremamente regulado, existem outros níveis de controle para os genes envolvidos. A ativação dos genes *nar* em

E.coli, por exemplo, pode ocorrer por meio da ativação por NarL ou por Fnr (PHILIPPOT e HOJBERG, 1999). Mais de 14 possíveis sítios de ligação a Fnr foram identificados no promotor dos genes *narGHJI* de *E.coli* (PHILIPPOT e HOJBERG, 1999), e a expressão de *narK* foi drasticamente diminuída nos mutantes *fnr* (KOLENSNIKOW *et al.*, 1992). Estes resultados demonstram que NarL e Fnr estão altamente envolvidas na expressão e funcionamento dos genes do metabolismo de nitrato. Em *H. seropedicae*, o metabolismo de nitrato parece ainda estar sendo regulado também por *NtrY*, já que mutantes neste gene não cresceram em meio contendo nitrato como fonte de nitrogênio (ALVES, 2006). O fato deste metabolismo estar sob influência de mais de um tipo de regulador explica o porquê da estirpe mutante LT78 crescer, mas com certa deficiência em meio contendo nitrato como fonte de nitrogênio.

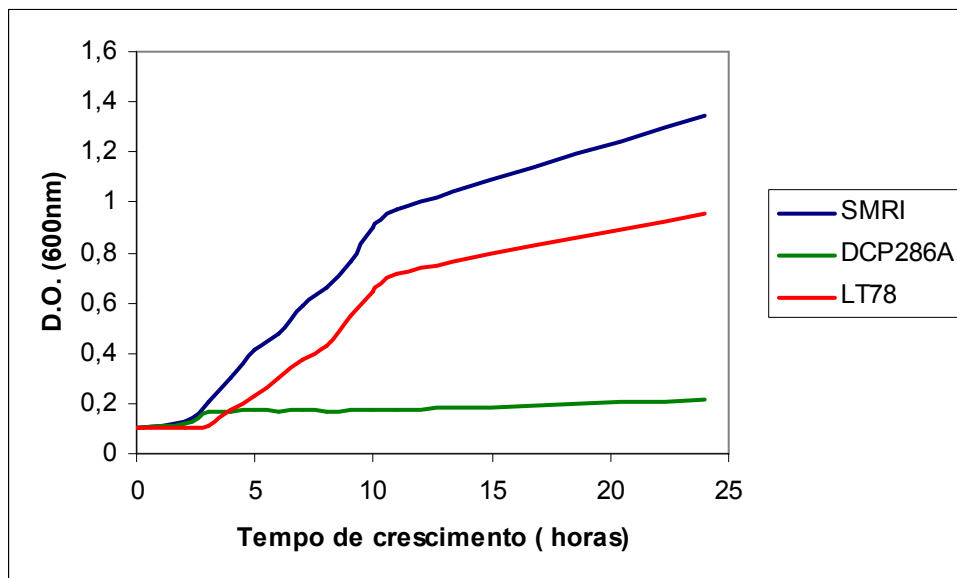
Para uma elucidação completa das vias metabólicas do nitrato em *H. seropedicae* será necessário um estudo mais completo destes genes, sua interação e regulação.

FIGURA 18: CURVA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES SMR1 (SELVAGEM), LT78 (*narL*⁻) E DCP28A (*ntrC*⁻) DE *H.seropedicae* NA PRESENÇA DE CLORETO DE AMÔNIO OU NITRATO DE POTÁSSIO COMO FONTE DE NITROGÊNIO

A

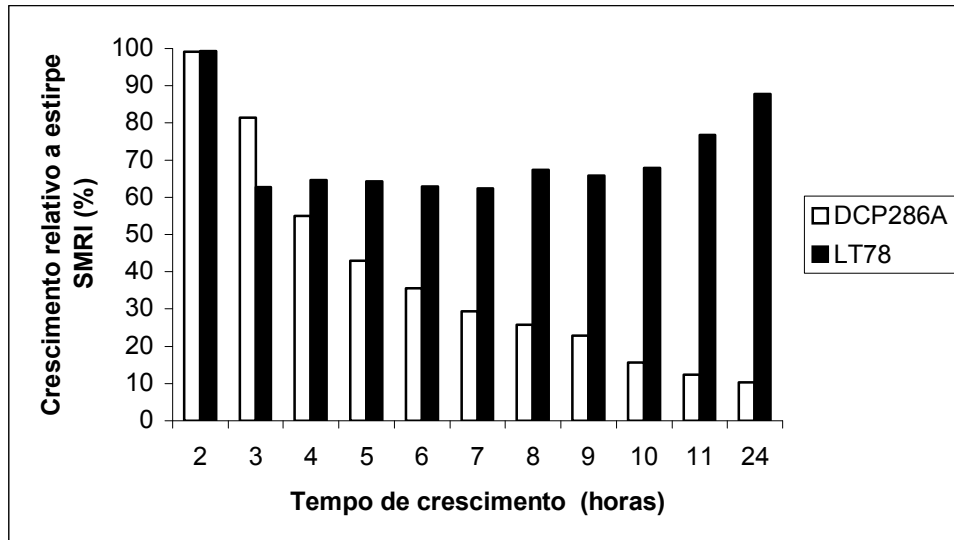


B



O ensaio foi realizado em meio líquido NFbHP-malato suplementado com cloreto de amônio 20mmol/L (A) ou nitrato de sódio 10mmol/L (B). O crescimento das culturas foi monitorado através da absorbância sob comprimento de onda de 600nm a cada hora até doze horas de crescimento e novamente medido com 24 horas de crescimento. SMR1: estirpe selvagem de *H. seropedicae*; DCP286A: mutante *ntrC*; LT78: mutante *narL*..

FIGURA 19: CRESCIMENTO DAS ESTIRPES LT78 (*narL*⁻) E DCP286A (*ntnC*⁻) RELATIVO AO DA ESTIRPE SMR1 (SELVAGEM), DE *H.seropedicae* EM MEIO CONTENDO NITRATO COMO FONTE DE NITROGÊNIO

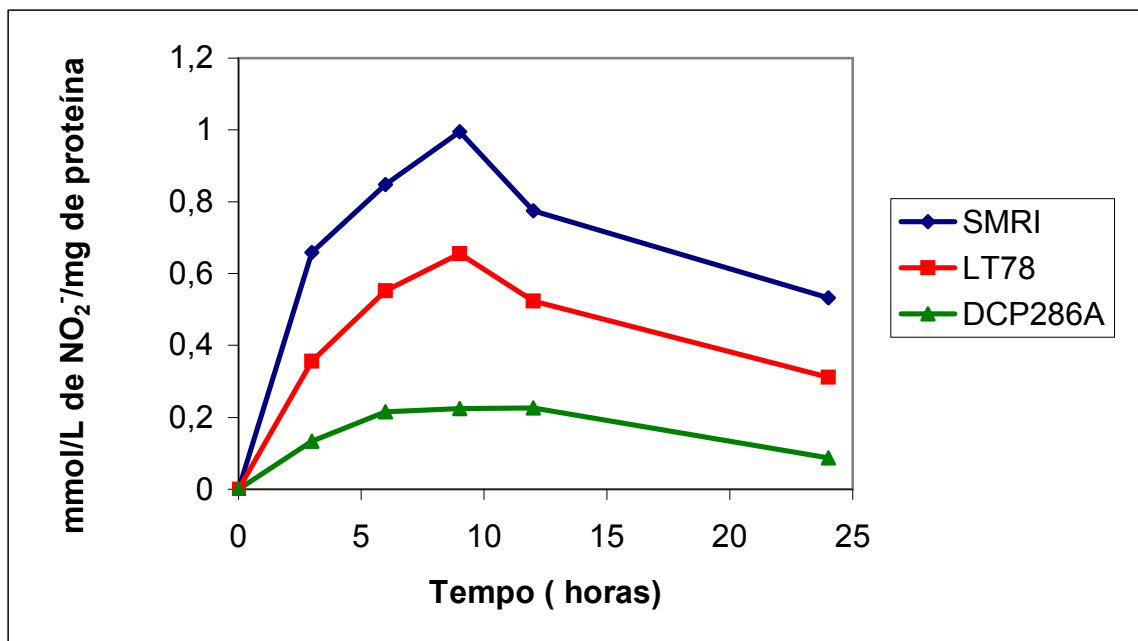


O crescimento relativo das estirpes DCP286A (*ntnC*⁻) e LT78 (*narL*⁻) foi calculado tendo a absorbância em 600nm de *H. seropedicae* como 100% de crescimento em cada tempo. As barras brancas são referentes a estirpe DCP286A (mutante *ntnC*) e as pretas a estirpe LT78 (mutante *narL*).

4.5 PRODUÇÃO DE NITRITO PELAS ESTIRPES SELVAGEM DE *H. seropedicae*, LT78 (*narL*-) E DCP286A (*ntrC*-)

As estirpes de *H. seropedicae*, SMR1 (selvagem), LT78 (*narL*⁻) e DCP 286A (*ntrC*⁻) foram analisadas quanto a produção de nitrito (FIGURA 20). O padrão das curvas obtidas foram similares às de crescimento na presença de nitrato de potássio. Uma vez que a primeira etapa da via de utilização de nitrato é sua redução a nitrito, estes resultados já eram esperados.

FIGURA 20: PRODUÇÃO DE NITRITO PELAS ESTIRPES SMR1 (SELVAGEM), LT78 (*narL*⁻) E DCP 286A (*ntrC*⁻) DE *H. seropedicae*

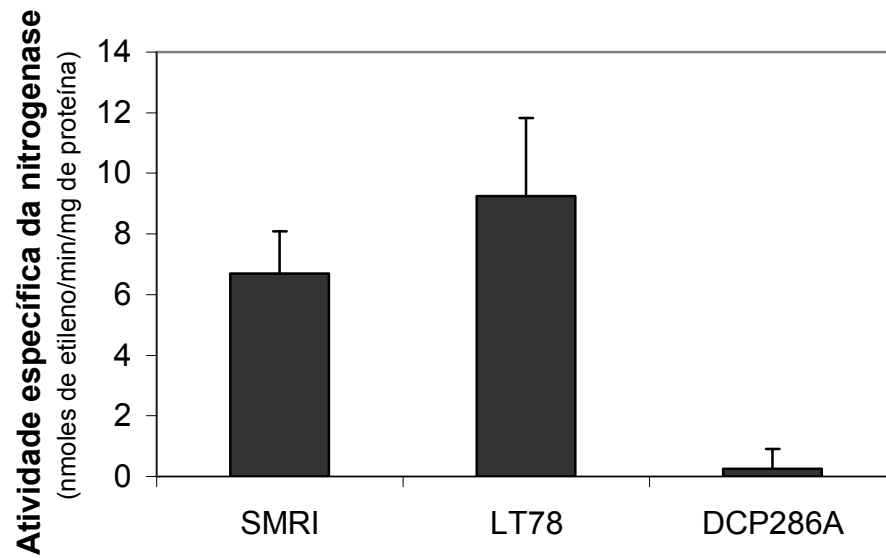


As estirpes de *H. seropedicae* SMR1 (selvagem), LT78 (*narL*⁻) e DCP286A (*ntrC*⁻) foram cultivadas por vinte e quatro horas em meio NFbHP-malato contendo 5 mmol/L glutamato. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio NFbHP sem fonte de nitrogênio. Um volume de 200 μL de células foram inoculadas em 20 mL de meio NFbHP contendo 10 mmol/L de nitrato como fonte de nitrogênio a uma densidade óptica 600nm de ~0,1. As culturas foram incubadas a 30 °C sob agitação por 24 horas, seguido da dosagem do nitrito em 3, 6, 9, 12 e 24 horas de crescimento. Os valores obtidos são referentes a um único experimento realizado em triplicata.

4.6 EFEITO DA MUTAÇÃO NO GENE *narL* SOBRE A FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM *H.seropedicae*

Para avaliar se o gene *narL* em *H. seropedicae* está envolvido na regulação da fixação de nitrogênio a atividade da nitrogenase na estirpe selvagem (SMR1) e nas estirpes mutantes LT78 (*narL*⁻) e DCP28A (*ntrC*⁻) foi determinada (FIGURA 20). A estirpe mutante LT78 apresentou uma atividade de nitrogenase similar a estirpe selvagem, a estirpe DCP286A não apresentou atividade de nitrogenase como reportado por PERSUHN (2000) e ALVES (2006). Este resultado indica que o gene *narL* não está envolvido com a fixação de nitrogênio em *H. seropedicae*. Como não há indicações em literatura de que o gene *narL* tenha influência sobre a fixação de nitrogênio, este efeito já era esperado.

FIGURA 21 - EFEITO DA MUTAÇÃO EM *narL* SOBRE A FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM *H. seropedicae*



A atividade da nitrogenase foi medida em meio NFbHP-malato semi-sólido contendo 0,5 mmol/L de glutamato. Os valores estão expressos em nmoles de etileno formado por minuto por mg de proteína são médias de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. SMR1, estirpe selvagem de *H. seropedicae*; e as estirpes mutantes: LT78 (*narL*⁻) e DCP28A (*ntrC*⁻). As barras representam o desvio padrão.

5. CONCLUSÕES:

- A Proteína NarL de *H. seropedicae* é similar às proteínas NarL de outros organismos e provavelmente não é produto de transferência lateral;
- O gene *narL* de *H. seropedicae* foi mutagenizado por inserção do transposon EZ::TNTM<KAN> que confere resistência a canamicina, resultando na estirpe LT78;
- O mutante LT78 (*narL*⁻) teve deficiência de crescimento em meio NFbHP- malato contendo nitrato como fonte de nitrogênio;
- O mutante LT78 (*narL*⁻) possui uma atividade de nitrato redutase menor que a estirpe selvagem (SMR1) em *H. seropedicae*;
- A mutação no gene *narL* não alterou a fixação de nitrogênio em *H. seropedicae*;
- O gene *narL* de *H. seropedicae* está envolvido com o metabolismo de nitrato nesse organismo.

6. REFERENCIAS

ALVES, L.R. **Análise funcional dos genes *ntrY* e *nrtX* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2006. 80 p. Dissertação (Mestrado Ciências-Bioquímica) Setor de Ciências Biológicas- Unversidade Federal do Paraná.

ALTSCHUL,S.F.; MADDEN, T.L.;SCHAFFER, *et.al.*. Gapped BLAST and PSI-BLAST: anew generationof protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, p. 3389-3402,1997

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

BERKUM, P.V.; BOHLOOL, B.B. Ecaluation of nitrogen fixation y bacteria in associotion with roots of tropical grasses. **Micribiological reviews**, v. 44, n. 3, p. 491-517, 1980.

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

BODDEY, R.M.; OLIVEIRA,O.C.; URQUIACGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; BOBEREINER,J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice contributions and prospects for improvement. **Plan and Soil**, v.174, p.195-209, 1995.

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

BRADFORD, M.M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

CHIANG, R.C.; CAVICHILOLO, R.; GUNSALUS, R.P. "Loched on" and "loched off" signal trasnduction mutations in the periplasmis domain of the Escherichia coli NarQ and NarX sensors affect nitrate and nitrite depndent regulation by NarL and NarP. **Mol. microbiol.**, v24, p 1049-1060, 1997.

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

DARWIN, A.J.; TYSON, K.L.; BUSBY, S.J.W.; STEWART, V. Differentia regulation by the homologous response regulators narL and narP of Escherichia coli k-12 depends on DNA binding site arrangement. **Mol. Microbiol.**, v. 24, n. 3, p. 583-595, 1997.

DEMOSS, J.A.; HSU, P.Y. Nark enhances nitrate uptake and nitrite excretion in *Escherichia coli*. **J. of Bacteriol.**, v. 173, n. 11, p. 3303-3310, 1991.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621-631, 2004.

EADY, R.R. (1986) Enzymology in free-living diazotrophs. In: BROUGHTON, W.J.; PUHLER, S. (eds). **Nitrogen Fixation. Clarendon Press.** V. 4. P. 1-49, 1986.

FRIAS, J.E.; FLORES , E.; HERRERO A. Nitrate assimilation gene cluster from the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 477-486, 1997.

GAVIRA, M.; ROLDAN, M.D.; CASTILLO, F. VIVIAN, C.M. Regulation of *nap* gene expression and periplasmic nitrate reductase activity in phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* DSM158. **J. of Bacteriol.**, v. 184, n. 6, p. 1693-1702, 2002.

GOH. E.B.; BLEDSOE, P.J.; CHEN, L.L.; GYANESHWAR, P, STEWART, V.; IGO, M.M. Hierarchical control of anaerobic gene expression in *Escherichia coli* K-12: the nitrate- responsive NarX-NarL Regulatory System Represses synthesis of fumarate-responsive *dcuS-ducS* regulatory system. **J. of Bacteriol.**, v. 187, n. 14, p. 4890-4899, 2005.

GONZÁLES, P.J.; CORREIA, C.; MOURA I.: *et al.* Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.100, p. 1015-1023, 2006.

GRIESS, J.P. On a new series of bodies which nitrogen is substituted for hydrogen. **Phil. Trans. Res. Soc.**, v. 154, p. 667-731, 1864.

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

HÄRTIG, E.; SCHIEK, U.; VOLLACK, C; ZUMFT, W. G. Nitrate and nitrite of respiratory reduction in denitrifying *Pseudomonas stutzeri* by a two-component regulatory system homologous to NarXL of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 3658-3665, 1999.

HIGGINS, C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annu Rev. Cell Biol.**, v. 8, p. 67-113, 1992.

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

HUNT, T.P.; MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* by a purified *Escherichia coli* components: Core RNA polymerase and the products *glnF*, *glnG* and *glnL*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 8453-8457, 1985.

ISHIDA, ML; ASSUMPCAO, MC; MACHADO, HB; BENELLI, EM; SOUZA, EM; PEDROSA, FO. Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.35, p.651-661, 2002.

JIANG, P.; NINFA, A. Regulation of autophosphorylation on *E. coli* nitrogen regulator II by PII signal transduction protein. **Journal of Bacteriology** . v.181, p. 1906-1911, 1999.

KEENER, J.; KUSTU, S. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory protein NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. **Proc. Natl. Acad. USA**, v.85, p.4976-4980, 1988.

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.**, Ottawa, v. 43, p. 887-891, 1997.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; RIGO, L.U. Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 181, p. 165-170, 1999.

KOCHER, T.D. WILSON, A.C. DNA amplification by the polymerase chain reaction . In: Brown, T.A.(Ed.). **Essential Molecular Biology : A practical Approach**, Oxford : IRL Press, 1991. P. 185-208.

KOLESNIKOW, T.; SCRODER, I.; GUNSALUS, R.P. Regulation of narK gene expression in *Escherichia coli* in response to anaerobiosis, nitrate, iron and molybdenum., **J. Bacteriology**. v. 174, n. 22, p. 7104-7111, 1992.

KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163. 2004.

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

MacFARLANE, S.A., MERRICK, M., Analysis of the *Klebsiella pneumoniae ntrB* gene by site-directed in vitro mutagenesis. *Mol. Microbiol.*, v. 1, p. 133-42, 1987.

MACHADO, I.M.P.; YATES, M.G.; MACHADO, H.B.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 29, p. 1599-1602, 1995.

MARIS, A.E.; SAWAYA, M.R.; GRZESKOWIAK, M.K.; JARVIS, M.J.; BEARSON, S.M.D.; KOPKA, M.L.; SCHRODER, I.; GUNSALUS, R.P.; DICKERSON, R.E. Dimerizatin allows DNA target site recognition by the NarI response regulator. *Nature Structural Biology*, v. 9, n. 10, p. 771-778, 2002.

MERRICK, M.J. Regulation of Nitrogen Fixation Genes in Free-living and Symbiotic Bacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H.J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman & Hall, New York, 1992. p. 835-876, 1992.

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

MORENO-VIVIAN, C., CABELLO, P. MARTINEZ-LUQUE, M., BLASCO, R. CASTILLO, F. Prokaryotic nitrate reduction: properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *Amer. Soc. Microb.*, v 181, p 6573-6584, 1999.

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

OGAWA, K.I.; AKAGAWA, E.; YAMANE, K., SUN, Z.W. LACELLE, M.; ZUBER, P.; NAKANO, M.M. The nasB operon and nasA gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 1409-1413, 1995.

OVERTON, T.W.; GRIFFITHS, L.; PATEL, M.D.; HOBMAN, J.L.; PENN, C.W.; COLE, J.A.; CONSTANTINIDOU, C. Microarray analysis of gene regulation by oxygen, nitrate, nitrite, FNR, NarL and NarP during anaerobic growth of *Escherichia coli*: new insights into microbial physiology. **Biochem Soc Trans.** p 104-7, 2006.

PAWLOWSKI, K.; KLOSSE, U.; de BRUIJN, F.J. Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-components regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. **Mol. Gen. Genet.**, v. 231, p. 124-138, 1991.

PEDROSA, F. O.; TEIXEIRA, K. R.S. MACHADO, H.B.; STEFFENS, M.B. R.; KLASSEN, G.; BENELLI, E. M. MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S. RIGO, L.U.; ISHIDA, M. L.; YATES, M.G.; SOUZA, E.M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil Biol. Biochem.**, v.29, p. 843-846, 1997.

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.

PHILIPPOT, P.; HOJBERG, O. Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. **BBA**, v.1446, p.1-23, 1999.

POSTGATE, J.R. Biological nitrogen fixation: Fundamental. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v.296, p.375-85, 1982.

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

RESS, D.C., HOWARD, J.B. Nitrogenase: strating at the crossroads. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 559-566, 2000

RICHARDSON, D.J. *et.al.* Funcional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. **CMLS**. United Kingdom, v.58, p 165-178, 2001.

RIGO, L.U., STEFFENS, M.B.R., SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O. *Herbaspirillum seropedicae glnAntrBC operon*, complete sequence. GenBank, no. acesso AF082873. 2001.

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

SCHULTZ, J.; COPLEY, R.R.;DOERKS, T.; PONTING, C.P.; BORK, P. SMART: a web- based toolfor the study of genetically mobile domains. **Nucl.Acids Res.**,v. 28(1), p.231-234, 2000

SCHWAB, S. Caracterização parcial dos elementos em *cis* responsáveis pela regulação da expressão do operon *glnAntrBC* de *Herbaspirillum seropedicae*. **Tese de dissertação de mestrado ao Curso de pós-Graduação em Bioquímica – UFPR**. P. 35-40, 2002.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vitro enetic engineerin; transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Bio. Technology**, Londres, v. 1.p 784-791, 1983.

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. Chen.**, v262, p 8690-8695, 1987.

SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **J. Gen. Microbiol.**, v. 137, p. 1511-1522, 1991a.

SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **J. Gen. Microbiol.**, v. 137, p. 1511-1522, 1991b.

STEWART, V. Requirement of Fnr and NarL functions for nitrate reductase expression in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 151, n. 3, p. 1320-1325, 1982.

STEWART, V.; CALI, B.M. Genetic evidence that NarL function is not required for nitrate regulation of nitrate assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 8, p. 4482-4488, 1990.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensivity of progressive multiple sequence alignment trough sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice . **Nucl. Acids Res.**v.22,p. 4673-4680

VAN MAANEM, J. M. S.; WELLE, I. J.; HAGEMAN, G.; DALLINGA, J. W.; MERTENS, P. L. J. M.; KLEINJANS, J. C. S. Nitrate contamination of drinking water: relationship with HPTR variant frequency in lymphocyte DNA and urinary excretion of N-nitrosamines. **Environ. Health Perspect.**, v. 104, p. 522-528, 1996

VITORINO, J. C.; STEFFENS, M. B. R.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Potential roles for the *glnB* and *ntrYX* genes in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 201, p. 199-204, 2001.

VIVIAN, C.M.; CABELLO, P.; LUQUE, M.M.; BLASCO, R.; CASTILLO, F. Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 21, p. 6573-6584, 1999.

XU, J.; XU, X.; VERSTRAETE, W. Adaption of *E. coli* cell method for micro scale nitrate measurement with the Griess reaction in culture media. **Journal of Microbiological Methods** v. 41, p 23-33, 2000.

WILLIAMS, S. B.; STEWART, V.. Discrimination between structurally related ligands nitrate and nitrite controls autokinase activity of the NarX transmembrane signal transducer of *Escherichia coli* K-12. **Mol. Microbiol.**, v.26, p. 911–925, 1997.

WU, Q.; STEWART, V. NasFED proteins mediate assimilatory nitrate and nitrite transport in *Klebsiella oxytoca (pneumoniae)* M5a1. **J. Bacteriol.** v. 180, p. 1311–1322, 1998.

WU, S. Q., WEIHANG, C., LIN, J.T., STEWART, V., General nitrogen regulation of nitrate assimilation regulatory gene *nasR* expression in *Klebsiella oxytoca*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 7274-7284, 1999.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic 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.