

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELO BUENO BATISTA

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES DE  
*Herbaspirillum seropedicae* NOS GENES *fnr<sub>1</sub>*, *fnr<sub>2</sub>* e *fnr<sub>3</sub>*

CURITIBA

2011

**MARCELO BUENO BATISTA**

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES DE  
*Herbaspirillum seropedicae* NOS GENES *fnr<sub>1</sub>*, *fnr<sub>2</sub>* e *fnr<sub>3</sub>***

Dissertação apresentada como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica) pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rose Adele Monteiro

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Berenice R. Steffens

**CURITIBA**

**2011**

## TERMO DE APROVAÇÃO

MARCELO BUENO BATISTA

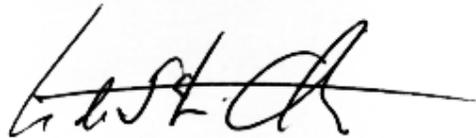
### CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES DE *Herbaspirillum seropedicae* NOS GENES *fnr<sub>1</sub>*, *fnr<sub>2</sub>* e *fnr<sub>3</sub>*

Dissertação aprovada como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica), pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Profª Drª Rose Adele Monteiro

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Profª Drª Leda Satie Chubatsu

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Profª Drª Fabiane Gomes de Moraes Rego

Departamento de Patologia Médica – UFPR

Curitiba, 15 de fevereiro de 2011.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Rose Adele Monteiro pela orientação;

A todos demais professores, técnicos e alunos do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio pelas discussões, ensinamentos e dicas;

À minha família, que mesmo sem entender os percalços da vida acadêmica me apoiou tornando possível a concretização deste trabalho;

Aos amigos, com os quais tive bons momentos de descontração, que permitiram renovação do ânimo para as jornadas de trabalho no laboratório;

Ao INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio;

Ao programa de Pós Graduação em Bioquímica – UFPR e ao CNPq pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1 INTRODUÇÃO .....	14
1.1 A Fixação Biológica de Nitrogênio.....	15
1.2 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	16
1.3 Regulação da Fixação Biológica de Nitrogênio .....	17
1.4 A Família Crp-Fnr dos Reguladores Transcricionais .....	19
1.5 Envolvimento de diferentes proteínas da família Crp-Fnr na Fixação Biológica de Nitrogênio.....	22
1.6 A Proteína FNR .....	27
1.7 Regulação dos níveis da proteína FNR em <i>Escherichia coli</i> .....	33
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA .....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Bactérias e Plasmídeos.....	39
3.2 Meios de Cultura .....	42
3.3 Antibióticos .....	44
3.4 Condições de Cultivo e Estoque dos Microorganismos.....	45
3.5 Crescimento e Determinação do Tempo de Geração e da Taxa de crescimento nas estirpes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	46
3.6 Preparo de Células Químico Competentes e Transformação Bacteriana por Choque Térmico.....	48
3.6.1 Protocolo utilizando MgCl <sub>2</sub> e CaCl <sub>2</sub> .....	48
3.6.2 Protocolo de um passo utilizando TSS “ <i>Transformation and storage soution</i> ”.....	49
3.6.3 Protocolo para Transformação Bacteriana por Choque Térmico .....	49
3.7 Transferência de Plasmídeos por Conjugação.....	50
3.8 Purificação de Plasmídeos em Pequena Escala .....	51
3.9 Eletroforese de DNA em Gel de Agarose.....	52

3.10 Clivagem de DNA com Enzimas de Restrição e Preparo dos Vetores e Insertos para a Clonagem .....	53
3.11 Ligação de Fragmentos de DNA a Vetores .....	54
3.12 Sequenciamento de DNA .....	54
3.13 Amplificação de Fragmentos de DNA por PCR.....	55
3.14 Determinação da Atividade da Nitrogenase .....	57
3.15 Determinação da Atividade de $\beta$ -Galactosidase.....	58
3.16 Dosagem de Proteínas.....	59
3.17 Estratégia para a mutagênese dos genes <i>fnr</i> de <i>H. seropedicae</i> .....	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	63
4.1 Obtenção dos plasmídeos mutagênicos pMBB1DS, pMBB2DS e pMBB3DS .....	63
4.2 Obtenção de fusões transcricionais das regiões promotoras dos genes <i>fnr</i> <sub>1</sub> , <i>fnr</i> <sub>2</sub> , <i>fnr</i> <sub>3</sub> , e do operon <i>fixNOQP</i> de <i>H. seropedicae</i> .....	70
4.3 Construção das estirpes mutantes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> nos genes <i>fnr</i> <sub>1</sub> , <i>fnr</i> <sub>2</sub> e <i>fnr</i> <sub>3</sub> .....	63
4.4 Caracterização fisiológica das estirpes mutantes simples, duplos e triplo para os genes <i>fnr</i> <sub>1</sub> , <i>fnr</i> <sub>2</sub> e <i>fnr</i> <sub>3</sub> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	77
4.4.1 Caracterização do perfil de crescimento .....	77
4.4.2 Determinação da atividade de nitrogenase.....	84
4.4.3 Determinação do padrão de expressão do promotor do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> .....	86
4.4.4 Determinação do padrão de expressão do promotor do gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> .....	90
4.4.5 Determinação do padrão de expressão do operon <i>fixNOQP</i> de <i>H. seropedicae</i> .....	94
4.4.6 Determinação do padrão de expressão dos genes <i>fnr</i> <sub>1</sub> , <i>fnr</i> <sub>2</sub> e <i>fnr</i> <sub>3</sub> de <i>H. seropedicae</i> .....	98
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	102
CONCLUSÕES .....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	105

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo esquemático dos domínios modulares da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> .....	18
Figura 2 – Visão geral dos sinais processados pelos reguladores da família de proteínas Crp-Fnr.....	20
Figura 3 – Árvore filogenética representando os principais ramos da família de proteínas Crp-Fnr.....	21
Figura 4 – Interação entre Reguladores Crp-Fnr na expressão do sistema regulatório e da m <i>R. etli.</i> ....	21
Figura 5 – Alinhamento entre as proteínas FNR <sub>1</sub> , FNR <sub>2</sub> e FNR <sub>3</sub> de <i>H. seropedicae</i> e a proteína FNR de <i>E. coli</i> .....	21
Figura 6 – Alinhamento de parte da região N-terminal contendo o motivo de cisteínas conservadas, das três proteínas FNR de <i>H.seropedicae</i> com a proteína FNR de <i>E.coli</i> .....	30
Figura 7 – Alinhamento de parte da região central onde se encontra a hélice de dimerização, das três proteínas FNR de <i>H.seropedicae</i> com a proteína FNR de <i>E.coli</i> .....	31
Figura 8 – Representação esquemática da interconversão entre as formas da proteína FNR em resposta ao oxigênio.....	32
Figura 9 – Região promotora do gene <i>fnr</i> de <i>E. coli</i> .....	36
Figura 10 – Representação esquemática dos domínios das proteínas FNR, com indicação da região deletada.....	60
Figura 11 – Representação esquemática da estratégia de substituição gênica para mutagênese dos genes <i>fnr</i> .....	62
Figura 12 – Esquema geral da região dos genes <i>fnr</i> <sub>1</sub> , <i>fnr</i> <sub>2</sub> e <i>fnr</i> <sub>3</sub> utilizadas para a construção dos plasmídeos contendo deleções nestes genes.....	63
Figura 13 – Esquema da estratégia utilizada para obtenção dos vetores contendo os genes <i>fnr</i> deletados. ....	64
Figura 14 – Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, da análise de restrição com as enzimas Xba I/Hind III para confirmação da obtenção dos plasmídeos pTZfnr1DEL, pTZfnr2DEL e pTZfnr3DEL.....	65
Figura 15 – Esquema da estratégia utilizada para transferência dos fragmentos deletados dos genes <i>fnr</i> do vetor derivado do pTZ57R para o vetor suicida pSUP202, dando origem ao vetor pMBB1D, pMBB2D e pMBB3D. ....	66

Figura 16 – Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, da restrição com as enzimas Hind III (H) e BamH I (B) para análise e confirmação da subclonagem dos fragmentos <i>fnr</i> deletados no vetor pSUP202.....	67
Figura 17 – Esquema da estratégia utilizada para transferência do cassete SacB-KmR para os vetores pMBB1D, pMBB2D e pMBB3D, dando origem aos vetores pMBB1DS, pMBB2DS e pMBB3DS.....	68
Figura 18 – Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, da restrição com as enzimas Hind III e BamH I para análise e confirmação da subclonagem do cassete SacB-KmR para os vetores pMBB1D, pMBB2D e pMBB3D, dando origem aos vetores pMBB1DS, pMBB2DS e pMBB3DS. ....	69
Figura 19 – Esquema da estratégia utilizada para a clonagem das regiões promotoras dos genes <i>fnr</i> no vetor pTZ57R/T seguido de sua subclonagem no vetor pMP220, dando origem aos plasmídeos pMP1, pMP2, pMP3, pMPFN e pMPHN.....	70
Figura 20 - Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, das reações de PCR para a confirmação da obtenção das fusões <i>pfnr<sub>1</sub>::lacZ</i> , <i>pfnr<sub>2</sub>::lacZ</i> e <i>pfnr<sub>3</sub>::lacZ</i> .....	71
Figura 21 - Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, das reações de PCR realizadas para a confirmação da obtenção da fusão <i>pfixN::lacZ</i> (A) e da fusão <i>phemN::lacZ</i> (B).....	72
Figura 22 – Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, das reações de PCR realizadas para a genotipagem dos mutantes de <i>H. seropedicae</i> SMR1 nos genes <i>fnr<sub>1</sub></i> , <i>fnr<sub>2</sub></i> e <i>fnr<sub>3</sub></i> .....	74
Figura 23 – Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, das reações de PCR realizadas para a genotipagem dos mutantes duplos de <i>H. seropedicae</i> SMR1 nos genes <i>fnr<sub>1</sub>/fnr<sub>3</sub></i> , <i>fnr<sub>2</sub>/fnr<sub>1</sub></i> e <i>fnr<sub>2</sub>/fnr<sub>3</sub></i> .....	75
Figura 24 – Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, das reações de PCR realizadas para a genotipagem dos mutantes de <i>H. seropedicae</i> SMR1 nos genes <i>fnr<sub>1</sub></i> , <i>fnr<sub>2</sub></i> e <i>fnr<sub>3</sub></i> .....	76
Figura 25 – Perfil de crescimento das diferentes estirpes de <i>H. seropedicae</i> mutantes nos genes <i>fnr</i> em comparação com a estirpe parental SMR1. ....	78
Figura 26 – Representação gráfica de dois parâmetros cinéticos do crescimento bacteriano, taxa de crescimento e do tempo geração, determinados durante a fase de crescimento exponencial das estirpes de <i>H. seropedicae</i> mutantes nos genes <i>fnr</i> em comparação com a estirpe parental SMR1. ....	78

Figura 27 – Perfil de crescimento das diferentes estirpes de <i>H. seropedicae</i> mutantes nos genes <i>fnr</i> em comparação com a estirpe parental SMR1, em meio Nfb-MalatoHPN contendo 1mM de KNO <sub>2</sub> .....	79
Figura 28 – Representação da D.O <sub>595</sub> atingida durante o crescimento das estirpes de <i>H. seropedicae</i> mutantes nos genes <i>fnr</i> e também da estirpe parental SMR1, em diferentes condições limitantes de oxigenação. ....	82
Figura 29 - Representação da concentração de proteínas após 24 horas de crescimento das estirpes de <i>H. seropedicae</i> mutantes nos genes <i>fnr</i> e também da estirpe parental SMR1, em diferentes condições limitantes de oxigenação..	83
Figura 30 – Atividade da nitrogenase nas estirpes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> mutantes nos genes <i>fnr</i> e parental SMR1.....	84
Figura 31 – Perfil de desrepressão do gene <i>nifB</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> em função da D.O <sub>595</sub> das culturas, nas estirpes mutantes para os genes <i>fnr</i> em comparação com a estirpe parental SMR1..	87
Figura 32 – Perfil de desrepressão do gene <i>nifB</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> , em função do tempo e em comparação com o perfil de crescimento, nas estirpes MBFNR2/3/1 e SMR1. ....	88
Figura 33 – Determinação da expressão do promotor do gene <i>nifA</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> em comparação com a estirpe parental SMR1...	90
Figura 34 – Região promotora do gene <i>nifA</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> incluindo parte de sua região codificadora. ....	91
Figura 35 – Alinhamento entre prováveis seqüências FNR-BOX ou anaerobox, presentes em <i>Herbaspirillum seropedicae</i> em comparação com a seqüência consenso.....	92
Figura 36 – Representação da região do operon <i>fixNOQP</i> de <i>H.seropedicae</i> ..	94
Figura 37 – Determinação da atividade do promotor do operon <i>fixNOQP</i> de <i>H.seropedicae</i> nas estirpes mutantes para os genes <i>fnr</i> em comparação com a estirpe parental SMR1.....	96
Figura 38 – Determinação da atividade do provável promotor do gene <i>fnr</i> <sub>1</sub> de <i>H.seropedicae</i> nas estirpes mutantes para os genes <i>fnr</i> em comparação com a estirpe parental SMR1.....	98
Figura 39 – Determinação da atividade do provável promotor do gene <i>fnr</i> <sub>2</sub> de <i>H.seropedicae</i> nas estirpes mutantes para os genes <i>fnr</i> em comparação com a estirpe parental SMR1.....	99
Figura 40 – Determinação da atividade do provável promotor do gene <i>fnr</i> <sub>3</sub> de <i>H.seropedicae</i> nas estirpes mutantes para os genes <i>fnr</i> em comparação com a estirpe parental SMR1.....	100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estirpes de <i>Escherichia coli</i> .....	39
Tabela 2 – Estirpes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	39
Tabela 3 – Plasmídeos.....	40
Tabela 4 – Composição do meio NFb-malato .....	42
Tabela 5 – Composição do meio LB (Luria Bertani).....	43
Tabela 6 – Composição do meio SOB .....	43
Tabela 7 – Relação dos antibióticos utilizados.....	44
Tabela 8 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	=	s 5' difosfato de adenosina
AMP	=	5' monofosfato de adenosina
Amp	=	Ampicilina
ATP	=	5' trifosfato de adenosina
BSA	=	Do inglês “bovine serum albumin”
CAP	=	Do inglês “catabolite activator protein”
Cm	=	Cloranfenicol
CRP	=	Do inglês “Cyclic AMP receptor protein”
D.O.	=	Densidade ótica
DNA	=	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	=	5' trifosfato de 2' desoxinucleotídeo
e <sup>-</sup>	=	Elétron
EDTA	=	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
F	=	Faraday
FAD	=	Flavina-adenina dinucleotídeo
FADH <sub>2</sub>	=	Flavina-adenina dinucleotídeo reduzido
FBN	=	Fixação biológica de nitrogênio
FNR	=	do inglês “fumarate and nitrate reductase
IHF	=	Fator de integração do hospedeiro
kb	=	Quilopares de base
Km	=	Canamicina
kV	=	Quilovolts
L	=	Litro
Nal	=	Ácido nalidíxico
N <sub>2</sub> ase	=	Nitrogenase
pb	=	Pares de base nucleotídeos
PCR	=	Reação em cadeia da polimerase
Pi	=	Fosfato inorgânico
RBS	=	Sítio de ligação para ribossomo
rpm	=	Rotações por minuto
SDS	=	Dodecilsulfato de sódio
Sm	=	Estreptomina
Tc	=	Tetraciclina
Tris	=	Tris(hidroximetil)-aminometano
TSS	=	Do inglês “transformation and storage solution”
U	=	Unidade enzimática
X-gal	=	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

## RESUMO

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria fixadora de nitrogênio da classe  $\beta$  das Proteobacteria, encontrada em associação com diferentes Poaceae, como trigo, arroz, sorgo e cana-de-açúcar. O genoma de *H. seropedicae* (GENOPAR) possui três genes homólogos a *fnr*. As proteínas FNR são reguladores transcricionais que agem como sensores do estado redox intracelular, regulando um grande número de genes em resposta a mudanças nos níveis de  $O_2$ . Neste trabalho, foram construídos sete mutantes por deleção, *fnr1*, *fnr2*, *fnr3*, *fnr1fnr2*, *fnr1fnr3*, *fnr2fnr3* e *fnr1fnr2fnr3*. Estes mutantes foram deficientes no crescimento sob condições limitantes de oxigênio e o triplo mutante foi menos resistente a  $NO_2^-$ . Nenhuma evidência foi encontrada a respeito do envolvimento de FNR na utilização de íons amônio ou nitrato como fonte de nitrogênio. Resultados obtidos anteriormente mostraram que a proteína NifA de *H. seropedicae*, responsável pela ativação da expressão dos genes *nif*, é inativada em uma estirpe mutante de *Escherichia coli* no gene *fnr*. Devido a esse resultado o possível envolvimento de FNR na fixação biológica de nitrogênio de *H. seropedicae* foi investigado. Os resultados obtidos mostraram que as proteínas FNR não são necessárias para a atividade da nitrogenase. Experimentos de determinação da expressão gênica mostraram que FNR reprime a expressão dos genes *nifA* e *nifB* de *H. seropedicae*, e também do operon *fixNOQP*. Experimentos realizados com fusões entre os genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3* com o gene repórter *lacZ* mostraram que a expressão do gene *fnr2* é dependente das proteínas FNR e que a expressão de *fnr3* é reprimida pelas outras proteínas FNR. Por fim, os resultados obtidos mostram que as proteínas FNR de *H. seropedicae* não são essenciais a fixação biológica de nitrogênio, mas podem estar envolvidas em um fino mecanismo de regulação da expressão de genes requeridos para fixação de nitrogênio, permitindo que estes genes sejam expressos quando as concentrações de oxigênio são ótimas para a fixação biológica de nitrogênio.

Palavras chave: *H. seropedicae*, FNR, fixação biológica de nitrogênio.

## ABSTRACT

*Herbaspirillum seropedicae* is a nitrogen fixing bacteria, belonging to  $\beta$ -class of Proteobacteria, founded in association with different Poaceae, such as wheat, rice, sorghum and sugar cane. The genome of *H. seropedicae* (GENOPAR) has three *fnr*-like genes. FNR proteins are dual transcriptional regulators that act as intracellular redox sensors regulating a wide range of genes in response to changes in the  $O_2$  levels. In this work we constructed seven deletion mutants *fnr1*, *fnr2*, *fnr3*, *fnr1fnr2*, *fnr1fnr3*, *fnr2fnr3* and *fnr1fnr2fnr3*. These mutants were defective in growth under oxygen limiting conditions, and the triple mutant was also sensitive to  $NO_2^-$ . No evidence was found about the involvement of FNR in the utilization of ammonium ions or nitrate as nitrogen source. Previous results showed that the *H. seropedicae nif* gene transcriptional activator NifA is inactive in an *fnr* mutant strain of *Escherichia coli*. This result prompted us to investigate the involvement of FNR in *H. seropedicae* nitrogen fixation. In *H. seropedicae* none of *fnr* genes are required for nitrogenase activity. Gene expression experiments in the mutant strains showed that FNR represses the expression of both *nifA* and *nifB* in *H. seropedicae* and the *fixNOQP* operon is also repressed by FNR. Experiments performed with fusions between *fnr1*, *fnr2* and *fnr3* genes with *lacZ* reporter gene showed that *fnr2* gene expression is dependent upon FNR proteins and that the expression of *fnr3* is repressed by other FNR proteins. Finally, the results showed that FNR proteins of *H. seropedicae* are not essential to biological nitrogen fixation, but may be involved in a fine-tuning regulating mechanism of the expression of genes required for nitrogen fixation, allowing these genes to be expressed only when oxygen concentrations are optimal for biological nitrogen fixation.

Key-words: *H.seropedicae*, FNR, biological nitrogen fixation.

## 1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um elemento de grande importância, pois é componente essencial das proteínas, ácidos nucleicos e outras biomoléculas fundamentais a vida. Embora esteja presente em grande abundância na atmosfera, em sua forma gasosa ( $N_2$ ) não pode ser utilizado pela maioria dos organismos (HUBBEL e KIDDER, 2003). Apenas um pequeno grupo de procariotos, denominados diazotrofos, são capazes de reduzir o  $N_2$  a  $NH_3$ , em um processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN) (BURRIS, 1991; YOUNG, 1992; BRILL, 1977), e assim disponibilizar nitrogênio em sua forma reduzida para utilização por outros organismos.

Os organismos capazes de fixar nitrogênio, em associação com plantas, podem ser benéficos a agricultura, aumentando lucros e diminuindo impactos ambientais, pois são uma alternativa à utilização dos fertilizantes nitrogenados. Estes encarecem a produção agrícola, pois além de muito caros, cerca de 50% do total aplicado é perdido pela ação de chuvas, erosão e da atividade bacteriana (PEDROSA, 1987). Os fertilizantes nitrogenados ainda podem causar diversos danos ambientais, como a emissão de óxidos nitrosos tóxicos, a eutrofização de lagos e rios e a acidificação do solo (DIXON e KAHN, 2004).

Diversas bactérias fixadoras de nitrogênio colonizam o interior da planta, podendo fixar o nitrogênio e transferi-lo diretamente para os tecidos vegetais. Em cultivos de cana de açúcar a fixação biológica de nitrogênio pode contribuir com até 150 kg de nitrogênio fixado por ano por hectare de terra cultivada. No Brasil, culturas de cana-de-açúcar têm sido cultivadas por séculos sem necessidade de adição de grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados, devido à contribuição da FBN (DOBEREINER *et al.*, 2000).

## 1.1 A Fixação Biológica de Nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio é o processo de redução do  $N_2$  a  $NH_3$  catalisado pelo complexo enzimático da nitrogenase (BURRIS, 1991). A redução de  $N_2$  a  $NH_3$  pela nitrogenase requer grande quantidade de energia obtida por hidrólise de MgATP a MgADP + Pi. A estequiometria da reação catalisada pela nitrogenase é representada como segue: (BURRIS, 1991)



O complexo enzimático da nitrogenase é formado por duas metaloproteínas: a proteína ferro ou dinitrogenase redutase e a proteína molibdênio-ferro ou dinitrogenase. A proteína ferro é um homodímero constituído de duas subunidades gama idênticas com massa molecular entre 57 e 72 kDa, que são codificadas pelo gene *nifH*, contendo um núcleo 4Fe-4S ancorado entre as duas subunidades. A proteína molibdênio-ferro é uma proteína tetramérica  $\alpha_2\beta_2$ , com massa molecular entre 200 e 250 kDa. A subunidade  $\alpha$  é codificada pelo gene *nifD* e a subunidade  $\beta$  é codificada pelo gene *nifK* (ROBERTS *et al.* 1978; KIM & REES, 1994). O tetrâmero  $\alpha_2\beta_2$ , contém contendo 2 átomos de molibdênio e aproximadamente 33 átomos de ferro. A proteína molibdênio-ferro contém dois grupamentos metalosulfúricos: o grupamento P [8Fe – 7S] e o grupamento Mo [7Fe: 9S] (SMITH, 2002). A nitrogenase além do nitrogênio reduz uma variedade de substratos que contém tripla ligação terminal carbono-carbono ou carbono-nitrogênio, como o acetileno, ácido cianídrico, óxido nitroso, cianetos e isocianetos (EADY & POSTGATE, 1974). Além dos genes estruturais *nifHDK*, a biossíntese e atividade da nitrogenase dependem de produtos codificados por outros genes *nif*, essenciais para o transporte de elétrons, regulação da transcrição e maturação dos componentes da nitrogenase (MERRICK, 1992). Os genes *nif* de *H. seropedicae* estão organizados em uma única região de aproximadamente 30 kb contendo os genes *nifA* e *nifB* contíguos (SOUZA *et al.*, 1991a) e o operon *nifHDKENX* (MACHADO *et al.*, 1996; KLASSEN *et al.*, 1999), além de outros genes envolvidos na fixação de nitrogênio. A proteína NifA é responsável pela ativação da transcrição dos genes *nif* (SOUZA *et al.*, 1991a).

## 1.2 *Herbaspirillum seropedicae*

O gênero *Herbaspirillum* spp compreende membros da subclasse das  $\beta$  proteobactérias, que inclui, além de *Herbaspirillum* spp, outros gêneros de bactérias que vivem em associação com plantas, tais como os gêneros *Azoarcus*, *Burkholderia* ou *Ralstonia*. (SCHIMID, BALDANI & HARTMANN, 2006). O gênero *Herbaspirillum* inclui espécies, que através de análises filogenéticas moleculares baseadas em 16S-rDNA, constituem um grupo bastante relacionado dentro de  $\beta$ -Proteobacteria (SCHIMID, BALDANI & HARTMANN, 2006). O gênero foi assim denominado por apresentar bactérias em forma de espiral encontradas em associação com plantas herbáceas (BALDANI *et al.*, 1986). *H. seropedicae*, isolado em 1986 por BALDANI e colaboradores na cidade de Seropédica, Rio de Janeiro, é a espécie mais estudada de seu gênero, devido ao fato de ser um diazotrofo que promove o crescimento de plantas, com grande potencial de aplicação como biofertilizante. O estudo desse organismo tem sido focado no metabolismo do nitrogênio, especialmente na organização molecular e atividade dos genes envolvidos na fixação de nitrogênio e na assimilação de amônio (SCHIMID, BALDANI & HARTMANN, 2006).

*H seropedicae* é um diazotrofo endofítico encontrado no interior de gramíneas importantes na agricultura como trigo, milho, arroz, sorgo, cana de açúcar, algumas espécies de gramíneas forrageiras e palmeiras oleaginosas (BALDANI *et al.*,1986; BODDEY *et al.*, 1995; PIMENTEL *et al.*, 1991; OLIVARES *et al.*, 1996; JAMES *et al.*, 1998). *H. seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, geralmente vibrióide, algumas vezes helicoidal e com muita mobilidade. Apresenta 0,6 a 0,7  $\mu$ m de diâmetro e 1,5 a 5  $\mu$ m de comprimento, podendo possuir de um a três flagelos em um ou ambos os pólos da célula (BALDANI *et al.*, 1986). É um microrganismo capaz de fixar nitrogênio sob condições microaeróbicas e em uma ampla faixa de pH (5,3 a 8,0) (BALDANI *et al.*, 1986).

Por meio de experimentos de inoculação em solo desprovido de raízes, demonstrou-se que *H.seropedicae* é um organismo endofítico obrigatório. Devido a essa característica, em contraste com diazotrofos da rizosfera que

competem com a microflora do solo por fontes de carbono, *H. seropedicae* vive em um ambiente mais uniforme e protegido, o interior dos tecidos da planta, o que pode explicar sua alta contribuição na fixação biológica do nitrogênio (OLIVARES *et al.*, 1996). Além de converter o nitrogênio atmosférico a amônio, *H. seropedicae* é capaz de produzir promotores do crescimento vegetal como o ácido indolacético, giberilinas e citoquininas (REIS *et al.*, 2000).

A inoculação de arroz com *H. seropedicae* leva a um aumento do peso úmido e seco das plantas (BALDANI *et al.*, 1996). Outros estudos mostraram que a estirpe de *H. seropedicae* (LR15) inoculada em arroz foi capaz de colonizar a superfície das raízes e os tecidos internos, e causar um aumento da biomassa radicular (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003).

A história de alguns cultivares de cana-de-açúcar no Brasil revela que existem áreas em que esta atividade tem sido realizada por mais de cem anos sem adubação nitrogenada. Sendo assim, uma contribuição potencial para o metabolismo nitrogenado da planta é a fixação biológica de nitrogênio por meio da associação com endófitos do gênero *Herbaspirillum spp* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (DOBERËINER, 1992).

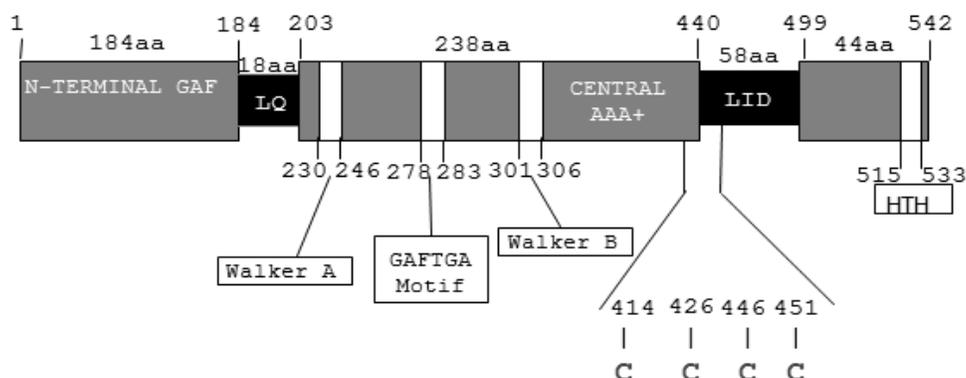
### 1.3 Regulação da Fixação Biológica de Nitrogênio

O complexo enzimático da nitrogenase pode ser controlado tanto a nível traducional quanto transcricional. A proteína NifA, sendo responsável pela ativação da transcrição dos genes *nif*, está envolvida no controle transcricional da nitrogenase. Tanto a expressão, quanto a atividade desta proteína são reguladas e o sistema de regulação geral de nitrogênio Ntr também está envolvido nesta regulação (SOUZA *et al.*, 1999). Na região promotora do gene *nifA* de *H. seropedicae* foram encontrados sítios para ligação da própria proteína NifA e para a NtrC (SOUZA *et al.*, 2000). Foram identificados ainda uma seqüência homóloga à seqüência consenso “anaerobox” localizada após o início de tradução, e um sítio de ligação para a proteína IHF, localizado a jusante do sítio de ligação para a proteína NtrC (SOUZA *et al.*, 2000).

A expressão do promotor *nifA* em *H. seropedicae*, assim como em *Klebsiella pneumoniae*, é dependente das proteínas NtrC e RpoN ( $\sigma^N$ )

(WASSEM *et al.*,2000). Através de experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstrou-se que a ativação do promotor *nifA* pela proteína NtrC é estimulada pelo fator de integração do hospedeiro (IHF). Por outro lado, este mesmo fator prejudicou a ativação do promotor *nifA* pela proteína NifA, indicando que, na ativação deste promotor, o IHF atua positivamente na ativação dependente de NtrC e negativamente na ativação por NifA (WASSEM *et al.*, 2000; WASSEM *et al.*,2002). Adicionalmente, o promotor do gene *nifA* é reprimido por nitrogênio fixado, mas não por oxigênio (SOUZA *et al.*, 2000).

A proteína NifA pode ser dividida em três domínios (Figura 1) estruturalmente e funcionalmente distintos (MORRET & SEGOVIA, 1993).



**Figura 1 - Modelo esquemático dos domínios modulares, N-terminal, central e C-terminal, da proteína NifA de *H. seropedicae*. Os motivos Walker A e Walker B, típicos de ATPases, o motivo GAFTGA, assinatura das proteínas pertencentes à superfamília AAA+, o motivo conservado de cisteínas e o motivo hélice-volta-hélice (HTH) estão assinalados no esquema. (Monteiro 2001, com modificações).**

O domínio central, típico dos membros da família AAA+, liga ATP e é flanqueado pelo C-terminal que contém um motivo hélice-volta-hélice, e pelo N-terminal, com função regulatória (DIXON & KAHN, 2004). O domínio N-terminal é o menos conservado de todos, com um baixo grau de identidade (FISCHER, 1994). Esse domínio não é essencial para a atividade da proteína, tendo em vista que a proteína NifA de *H. seropedicae* continua ativa quando este o domínio é deletado (MONTEIRO *et al.*, 1999a). Em *H. seropedicae* esse domínio parece estar envolvido no controle da atividade da proteína NifA por íons amônio, uma vez que quando deletado a NifA de *H. seropedicae* para de

ser inibida por amônia (SOUZA *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 1999a). Os domínios N-terminal e central são separados por uma pequena região interdomínios, rica em resíduos de glutamina, e por isso conhecida como Q-linker (WOOTTON & DRUMMOND, 1989). O domínio central é bastante conservado e possui em torno de 240 aminoácidos (FISCHER *et al.*, 1988). Esse domínio interage com  $\sigma^{54}$  e hidrolisa ATP para que possa ocorrer a formação do complexo aberto, sendo, portanto, o domínio da proteína NifA com atividade catalítica (DRUMMOND *et al.*, 1986; MORRET & SEGOVIA, 1993; BERGER *et al.*, 1995). O domínio C-terminal de todas as proteínas NifA conhecidas até o momento possui um motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA bastante conservado (MORETT & SEGOVIA, 1993).

Em *K. pneumoniae* e *Azotobacter vinelandii*, os domínios C-terminal e central são ligados diretamente, sem uma região interdomínios, enquanto que em outras bactérias esses domínios são ligados por um segmento contendo 30 a 50 resíduos de aminoácidos, caracterizado por um motivo de quatro cisteínas (Cys-X11-Cys-X19-Cys-X4-Cys) (FISCHER *et al.*, 1988). A ausência desse motivo na proteína NifA de *Bradyrhizobium japonicum* levou a uma proteína inativa, mostrando que esse motivo é essencial para a atividade da proteína (FISCHER *et al.*, 1988). Fischer e colaboradores também mostraram que o espaçamento entre essas cisteínas é importante para a atividade da proteína NifA (FISCHER *et al.*, 1988). Acredita-se que esse motivo ligue íons metálicos e, com isso, seja capaz de sensoriar o nível redox da célula, constituindo-se em um sensor de oxigênio da proteína, mas o exato papel dele ainda não foi elucidado (FISCHER *et al.*, 1988; SOUZA *et al.*, 1999, MONTEIRO *et al.*, 2001).

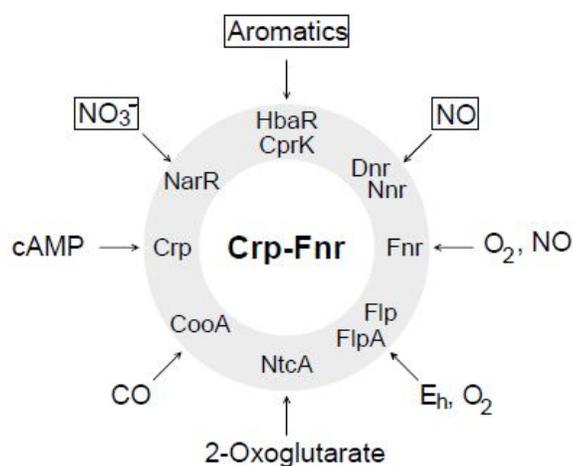
#### **1.4 A Família Crp-Fnr dos Reguladores Transcricionais**

A família Crp-Fnr é uma classe geral de reguladores transcricionais amplamente distribuída em Bacteria, cujas principais características são: possuir um motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA presente na região C-terminal e um domínio de ligação a nucleotídeo, similar ao da proteína CRP (proteína receptora de AMPc), também chamada de CAP (proteína ativadora

catabólica), localizado na região N-terminal da proteína (SHAW, RICE & GUEST, 1983) .

Devido ao sequenciamento de um grande número de genomas bacterianos, os integrantes desta família de proteínas têm aumentado muito. Sendo assim, a família Crp-Fnr vem obtendo o status de um dos maiores grupos de reguladores transcricionais, assim como as famílias LysR, AraC e LacI (KÖRNER, SOFIA e ZUMFT, 2003).

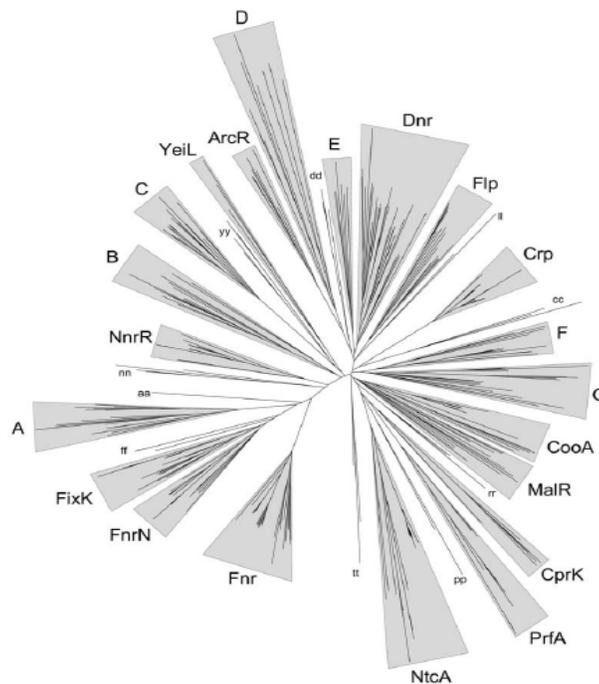
Dentre os componentes dessa família podemos encontrar proteínas que regulam a expressão de fatores de virulência, enzimas de degradação de anéis aromáticos, fatores importantes na fixação de nitrogênio, fotossíntese e também de vários tipos de respiração, entre outras. Desta forma os reguladores da família Crp-Fnr constituem um grupo de proteínas funcionalmente bastante versátil (Figura 2).



**Figura 2 – Visão geral dos sinais processados pelos reguladores da família de proteínas Crp-Fnr. Sinais destacados em caixas não possuem evidência de interação direta com o regulador indicado. Retirado de KÖRNER, SOFIA e ZUMFT, 2003.**

O primeiro membro desta família foi a proteína CRP (proteína acceptora de AMPc) também chamada de CAP (proteína ativadora catabólica). Esta proteína representa o paradigma de um regulador transcricional. A forma relativamente simples de ativação de seus genes alvo fez da CRP objeto de intenso estudo estrutural, genético e bioquímico (KOLB *et al*, 1993; SCHULTZ *et al*, 1991 e BUSBY, S. & EBRIGHT, R.H.,1999) .

De acordo com afiliações filogenéticas os reguladores da família Crp-Fnr são agrupados nos ramos ArcR, CooA, CprK, Crp, Dnr, FixK, Flp, Fnr, FnrN, MalR, NnrR, NtcA, PrfA, and YeiL (Figura 3).



**Figura 3 – Árvore filogenética representando os principais ramos da família de proteínas Crp-Fnr. Ramos representados por uma letra maiúscula são constituídos por proteínas que não foram caracterizadas fisiologicamente. Grupos representados por letras minúsculas constituem linhagens isoladas. Retirado de KÖRNER, SOFIA e ZUMFT, 2003.**

Esta árvore filogenética (Figura 3) pode representar um ponto de partida para a busca de uma função fisiológica baseando-se em homologia de seqüência. Porém é evidente que pode não haver uma uniformidade fisiológica dentro de um mesmo grupamento filogenético.

Destes grupos formados a partir de informações em nível de seqüência, muitos ainda não possuem representantes com caracterização fisiológica. De todos, considera-se que os grupos ArcR, Crp, FixK, Fnr, FnrN, NnrR, NtcA, e os grupos A e C são formados por homólogos altamente similares, e devido a isso são considerados como grupamentos bem consolidados dentro da família Crp-Fnr. Muitas proteínas da família Crp-Fnr têm nomes que não refletem propriamente o contexto filogenético em que estão. Este parece ser o caso da

proteína FixK<sub>1</sub> de *B. japonicum*, que a despeito de seu nome não está no grupamento FixK, mas sim no FnrN (KÖRNER, SOFIA e ZUMFT, 2003).

### **1.5 Envolvimento de proteínas da família Crp-Fnr na Fixação Biológica de Nitrogênio**

Em 2003, Monteiro e colaboradores obtiveram resultados que indicaram que a sensibilidade da proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae*, ao oxigênio, está relacionada com a proteína FNR de *E. coli*. Na estirpe de *E. coli* mutante para o gene *fnr*, a proteína NifA N-truncada não foi capaz de ativar a transcrição do promotor *nifH* de *H. seropedicae*, tanto na presença, quanto na ausência de oxigênio. Porém quando a estirpe mutante *fnr* foi complementada, a proteína NifA N-truncada foi capaz de ativar a transcrição deste promotor de forma semelhante a estirpe selvagem. Também foi observado que houve 95% de decréscimo na quantidade de NifA N-truncada na estirpe de *E. coli* mutante *fnr*, em comparação com a estirpe selvagem. Este decréscimo parece ocorrer devido a degradação da proteína NifA (MONTEIRO *et al.*, 2003).

Em *K. pneumoniae*, a proteína FNR é requerida na via que previne a inibição da NifA pela NifL em condição de anaerobiose. Na falta da proteína FNR, a NifL, não recebe o sinal de anaerobiose, e inibe a NifA, mesmo em condições de limitação de oxigênio (GRABBE, KLOPPROGGE & SCHMITZ, 2001).

A proteína NifL é um regulador negativo dos genes *nif*, que inibe a ativação transcricional, inibindo a NifA em resposta a nitrogênio e/ou oxigênio. A inibição da atividade na NifA, por meio da NifL, ocorre por meio de uma interação direta proteína-proteína. (GOVANTES, ANDUJAR & SANTERO, 1998; HENDERSON, AUSTIN & DIXON, 1989; LEI, PULAKAT & GAVINI, 1999 ; MONEY *et al.*, 1999).

A proteína NifL de *K. pneumoniae* sob altos níveis de oxigênio, encontra-se no citoplasma e está com seu co-fator FAD oxidado em uma conformação inibitória. Já em baixos níveis de oxigênio, encontra-se associada a uma oxiredutase na membrana citoplasmática. Esta oxiredutase liga a NifL e reduz o co-fator FAD a FADH<sub>2</sub>, gerando uma alteração conformacional que diminui a

afinidade de ligação a NifA (KLOPPROGGE *et al.*, 2002; GRABBE & SCHMITZ, 2003).

Grabbe e Schmitz (2003) propuseram que em *K. pneumoniae*, sob condições anaeróbias, FNR é um sensor primário de O<sub>2</sub>, que ativa a expressão dos genes que codificam para as proteínas NADH ubiquinona redutase e a formato desidrogenase N. Estas oxiredutases de membrana geram um *pool* de quinonas reduzidas na membrana citoplasmática, que permite a transferência de elétrons para o co-fator FAD da proteína NifL, reduzindo-a. Sendo assim, a NifL em sua forma reduzida não inibe a proteína NifA (GRABBE & SCHMITZ, 2003).

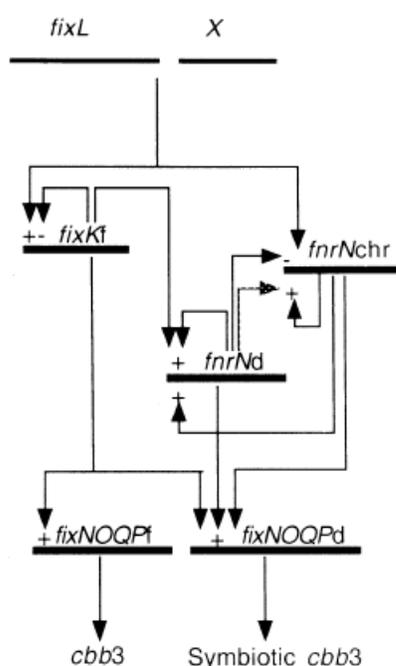
Ainda no grupamento Fnr dos reguladores da família Crp-Fnr, a proteína CydR de *A. vinelandii* regula a expressão da citocromo d oxidase (operon *cydBD*) que é um elemento essencial para o suprimento de energia para a fixação biológica de nitrogênio (KELLY *et al.*, 1990) e também para a proteção da nitrogenase em relação ao oxigênio (Para revisão a respeito veja POOLE & HILL, 1997). A proteína CydR de *A. vinelandii* tem como característica marcante uma aumentada sensibilidade ao oxigênio em relação a Fnr de *E. coli* e a sua expressão máxima ocorre sob altos níveis de oxigênio (WU *et al.*, 2000). CydR parece reprimir a expressão da oxidase codificada pelo operon *cydBD*, porém permite sua expressão quando altas concentrações de oxigênio destroem o cluster Fe-S (WU *et al.*, 2000). Uma citocromo d oxidase, codificada por *cydBD* é também encontrada em *E. coli*, onde diferentemente de *A. vinelandii*, é expressa a níveis máximos em baixas concentrações de oxigênio.

Proteínas pertencentes ao grupo FnrN também estão envolvidas na fixação biológica de nitrogênio. Estas proteínas também possuem um grupamento [4Fe-4S], porém estes possuem um motivo de cisteínas conservadas organizados em uma disposição diferente do motivo do grupo Fnr (KÖRNER, SOFIA & ZUMFT, 2003). Reguladores do grupo FnrN são elementos chave na expressão de vias respiratórias em rizóbios simbiotes. Estes organismos vivem em um ambiente com limitações nos níveis de oxigênio e também tem que lidar com um grande requerimento energético para a reação da nitrogenase. Para isso estes organismos expressam uma oxidase do tipo citocromo *cbb3*, a qual possui uma afinidade muito alta pelo oxigênio.

Esta oxidase é codificada pelo operon *fixNOQP*, essencial para a fixação biológica de nitrogênio (PREISIG, ANTHAMATTEN, & HENNECKE, 1993).

Múltiplas proteínas do grupamento FnrN em um mesmo organismo, podem estar envolvidas em circuitos regulatórios muito complexos. Este parece ser o caso da relação regulatória encontrada entre duas proteínas FnrN e uma proteína FixK, presente em *Rhizobium etli* (Figura 4). Neste organismo há a presença de genes codificando membros da família Crp-Fnr distribuídos no cromossomo (*fnrNchr*), no plasmídeo simbiótico (*fnrNd*), e também no plasmídeo críptico (*fixKf*). *fixKf* e *fnrNchr* estão sob o controle de um sistema oxigênio-sensitivo, o sistema de dois componentes *fixLJ* (LOPEZ *et al*, 2001).

A função principal de FixKf, parece ser o controle da expressão do operon *fixNOQP* presente no plasmídeo críptico, enquanto *fnrNchr* e *fnrNd* atuam em um operon parálogo presente no plasmídeo simbiótico (LOPEZ *et al*, 2001).



**Figura 4.** Interação entre reguladores Crp-Fnr na expressão do sistema respiratório em *R. etli*. chr, localizado no cromossomo; d, localizado no plasmídeo simbiótico; f, localizado no plasmídeo críptico; + e -, funções ativadoras e repressoras, respectivamente. Retirado de LOPEZ *et al*, 2001.

Um mecanismo igualmente complexo, de interação entre FnrN e FixK, parece estar presente em *Rhizobium leguminosarum* UPM791. Esta bactéria tem duas cópias do gene *fnrN* localizadas no cromossomo e no plasmídeo simbiótico, respectivamente. FnrN controla a fixação biológica de nitrogênio através da ativação da expressão do operon *fixNOQP*. Neste organismo, FnrN também regula a expressão de genes para a utilização de hidrogênio (operon *hypBFCDEX*) (GUTIERREZ, *et al*, 1997).

Os dois reguladores FnrN de *R. leguminosarum* UPM791 são cerca de 87,5% idênticos e somente a inativação dos dois genes *fnrN* resulta em um fenótipo defectivo no metabolismo de nitrogênio. O fenótipo Fix- neste organismo é devido ao controle exercido por FnrN na expressão dos genes que codificam para a oxidase de alta afinidade (GUTIERREZ, *et al*, 1997). A regulação destes genes em *R. leguminosarum* UPM791 é dependente de um circuito de interação de regulação positiva e negativa (COLOMBO *et al*, 2000).

Proteínas do grupo FixK são essenciais para a fixação de nitrogênio durante a simbiose, sendo sua principal função, a ativação da expressão de uma oxidase microaeróbica Fix-NOQP. Devido a isso, funcionalmente a proteína FixK se parece a proteínas reguladoras do grupo FnrN, porém filogeneticamente, formam um ramo separado do grupo FnrN (Figura 2, item 1.4). As proteínas do grupo FixK possuem uma distinção estrutural bastante clara em relação aos grupos Fnr e FnrN, pois não possuem na região N-terminal o motivo conservado para a ligação do grupamento  $[4Fe-4S]^{2+}$  que responde a transição entre os estados aeróbio e anaeróbio.

A proteína FixK2 de *Bradyrhizobium japonicum*, pertencente ao grupamento FixK, não monitora diretamente os níveis de oxigênio. Para tal monitoramento, FixK2 possui um mecanismo de cooperação com outras proteínas (FixL-FixJ) e assim tem um papel essencial na regulação transcricional de um grande número de genes requeridos para o crescimento microaeróbio, anaeróbio ou em simbiose (MESA *et al*, 2003 e NELLEN-ANTHAMATTEN, *et al* 1998). FixK2 é componente de uma cascata regulatória formada juntamente com o sistema de dois componentes FixLJ. Nesta cascata regulatória, a hemoproteína FixL, se auto fosforila em resposta a baixos de níveis de oxigênio (GILLES-GONZALES, *et al* 1991 e GONG, *et al* 1998). Após

sua autofosforilação, FixL transfere o grupamento fosfato para uma outra proteína, FixJ, que finalmente em sua forma fosforilada, ativa a transcrição do gene *fixK2*. Em resumo, através do sistema de dois componentes FixLJ, a proteína FixK2 distribui o sinal de baixo oxigênio intracelular, ativando vários genes envolvidos no metabolismo microaeróbio. O gene *fixK2* é reprimido, diretamente ou indiretamente, pelo seu próprio produto, a proteína FixK2 (NELLEN-ANTHAMATTEN, *et al* 1998).

Parte do controle exercido pelo circuito regulatório FixLJ-FixK2 é a ativação do gene *fixK1*, que apesar de seu nome é filogeneticamente mais relacionada com o grupo FnrN, da família Crp-Fnr. Ao contrário de FixK2, FixK1 possui um domínio conservado de cisteínas na região N-terminal capaz de ligar um grupamento  $[4Fe-4S]^{2+}$ .

A proteína FixK1 é parte um de circuito de regulação negativa do gene *nifA* em *S. meliloti* e em *B. japonicum* (BOBIK, MEILHOC & BATUT, 2006; MESA *et al*, 2008). Entre seus alvos, FixK1 ativa o gene *fixT* em *S. meliloti*, cujo produto é responsável pela inativação da proteína quinase sensora de oxigênio FixL (GARNERONE, *et al*, 1999).

Em *B. japonicum* a proteína FixK1, cuja expressão é ativada por FixK2, não é requerida para a fixação biológica de nitrogênio (ANTHAMATTEN, *et al* 1992 e NELLEN-ANTHAMATTEN, *et al* 1998). A análise do transcriptoma de mutantes *fixLJ*, *fixK2* e *fixK1* de *B. japonicum* por Mesa e colaboradores em 2008 revelou que apenas 17 genes estão sob o controle positivo de FixK1, sendo que a maioria destes genes codificam para proteínas hipotéticas sem função definida. Surpreendentemente, neste mesmo trabalho, FixK1 revelou-se como um regulador negativo de 47 genes, sendo que 46 destes genes, estão sob o controle positivo da proteína NifA (HAUSER, *et al*, 2007).

## 1.6 A Proteína FNR

Os produtos dos três genes *fnr* encontrados durante o sequenciamento do genoma de *H. seropedicae* têm uma maior proximidade filogenética com o grupamento Fnr descrito no item 1.4. Deste grupamento, a proteína FNR de *E. coli* é a melhor caracterizada. O gene *fnr*, que codifica para a proteína FNR, foi primeiramente isolado por John Guest e colaboradores, em meados da década de 70, em um trabalho pioneiro de caracterização de mutantes incapazes de reduzir fumarato e nitrato (LAMBDEM & GUEST, 1976).

Devido a uma grande similaridade de seqüência, a estrutura da proteína FNR de *E.coli*, pode ser modelada sobre a da proteína CRP, do inglês, “cyclic AMP receptor protein”, também conhecida como CAP, do inglês “catabolite activator protein”, revelando uma grande semelhança entre essas duas proteínas (SCHULTZ, SHIELDS & STEITZ, 1991). Devido à grande similaridade estrutural entre CRP e FNR, estas proteínas foram às primeiras constituintes da família Crp-Fnr de reguladores transcricionais, (LI *et al.*, 1998).

Em *E. coli* a proteína FNR age como um regulador transcricional que responde ao estado redox intracelular, ativando genes cujos produtos estão envolvidos na respiração anaeróbica, ou reprimindo outros genes requeridos para a respiração aeróbica (UNDEN *et al.*, 1995, BAUER *et al.*, 1999). Dados obtidos através de uma análise de microarranjos de DNA em *E. coli* K12, revelaram que cerca de 297 unidades transcricionais são reguladas direta ou indiretamente por FNR. Destas, 184 constituem operons. Se todos os genes localizados em operons fossem considerados individualmente, o número de genes regulados por FNR e ou O<sub>2</sub> aumentaria para cerca de 465 (KANG *et al.*, 2005).

A FNR de *E.coli* possui em sua região N-terminal um motivo estrutural composto por uma alfa hélice e oito folhas beta, que é o motivo sensor desta proteína. Este é similar ao motivo de ligação a AMPc da proteína CRP, porém os resíduos de aminoácidos responsáveis pela ligação do AMPc não são conservados. Ao invés de monitorar estados fisiológicos na célula através da ligação de AMPc, a proteína FNR é capaz de monitorar os níveis de oxigênio

intracelular através da ligação de um grupamento Fe-S na região N-terminal (SHARROCKS, GREEN & GUEST, 1990; SPIRO & GUEST, 1987)..

No domínio N-terminal, a estrutura de folhas beta é importante para a atividade de FNR, tendo em vista que este domínio contém a Cys122, que participa da formação de um grupamento Fe-S (KILEY & REZNIKOJ, 1991), juntamente com mais três resíduos de cisteína Cys20, Cys23 e Cys29, também localizados na região N-terminal (SHARROCKS, GREEN & GUEST, 1990; SPIRO & GUEST, 1987). No domínio C-terminal, a proteína FNR, possui um motivo hélice-volta-hélice de ligação sítio específica ao DNA. Este motivo liga-se a uma seqüência simétrica TTGATNNNNATCAA muito similar a da proteína CAP (WEBER & STEITZ, 1987).

Na proteína CAP, a ligação do AMPc, causa uma mudança conformacional que aumenta a especificidade de ligação ao DNA alvo (KOLB *et al.*, 1993), já na proteína FNR, a redução do grupamento Fe-S aumenta a habilidade de dimerização da proteína, aumentando também a afinidade de ligação sítio-específica ao DNA alvo (LAZAZZERA *et al.*, 1996; GREEN *et al.*, 1996; KHOROSHILOVA *et al.*, 1995, 1997).

O alinhamento entre as seqüências de aminoácidos das proteínas FNR<sub>1</sub>, FNR<sub>2</sub> e FNR<sub>3</sub> com as seqüências de aminoácidos da proteína FNR de *E. coli* (Figura 5) mostra que todos os domínios modulares característicos das proteínas FNR, são encontrados nas proteínas homólogas de *H. seropedicae*. Ainda, pode-se inferir que assim como em *E. coli*, as proteínas FNR de *H. seropedicae* devem monitorar os níveis de oxigênio intracelular, através da ligação de um grupamento Fe-S, pois possuem os quatro resíduos de cisteína essenciais para a formação de tal grupamento.

```

FNR1_H.s MNQSCHSTPITTPANAAAPLTHCSSLTAAREAAAASSALRSCTACGMHQLCLPMGLDESDM 60
FNR3_H.s ----MSSLPASTHKHSPPPVN----LHALR-----ASCSACSMHQLCLPMGLDQGM 44
FNR_E.c -----MIPEKRIIRRIQSGG-----CAIH-----CQDCSISQLCIPFTLNEHEL 39
FNR2_H.s ----MSKSDNDLSKRLFPVLT-----CRNCIVKKHCFPHDLSPEET 37
      . . . . * * : : *:* * . :

FNR1_H.s KRLDKIIGRR-KVARDDFLYRIGDRFTALYAVRVGHFKTYQENLDGDRQITGFQMPGELL 119
FNR3_H.s QRLEQVINRRRKVKRDETLYRLNDKFDMLYAIRLGHFKTFQHNPNGGQOITGFQMAGELL 104
FNR_E.c DQLDNIIERKKPIQKGQTLFKAGDELKSLYAIRSGTIKSYTITEQGEQITGFHLAGDLV 99
FNR2_H.s AQFEQLVVRRRRVLRGEPAYRAHDECISKIFIVRLGSFKTVRVSRYGMDVIAPHHTGDL 97
      : : : : * : : : : * . : : * * * : : . * . : : * : : * : :

FNR1_H.s GMDAISTEQHQDAVALQDSEVCEIPFARLEQLFGQIPHLRRHFHRIMSHEITSEQNVIM 179
FNR3_H.s GMDAIGAGHHLCEVALEDSEVCEIPFASLEDLFRDMPILLRQFHRMMSLEISREQRVML 164
FNR_E.c GFDAIGSGHHPFAQALETSMVCEIPFETLDDLSGKMPNLRQMMRLMSGEIKGDQDMIL 159
FNR2_H.s GIEGASHSAYEVDTIALEDSQICELSFVGLEELSRIKIPRLHQQVWRRRLSNEVTLMQQQSL 157
      * : : . : : * : * : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * :

FNR1_H.s LLGNMRAEQRFAAFLVNLSSRYAARGYSSTRFQLRMTRQDVGNYLGLTIESISRLISKFR 239
FNR3_H.s TLGSMTAQQKMAAFLLNLSRYMSRGYSSTRFQLRMTRREEIGNYLGLAVESVSRLLTNFK 224
FNR_E.c LLSKKNAEERLAAFIYNLSRRFAQRGFSPREFRLTMRGDIGNYLGLTVETISRLLGRFQ 219
FNR2_H.s LLKAR-SEQRFAFFLLDLSRISRRCGNASTEFSLRMSRTDIGLFLGLTNESMSRLISKFR 216
      * : : : * * : * : * * : . . * * * * : * : * : * : * : * : * :

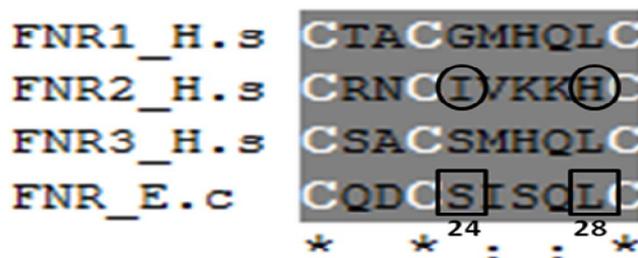
FNR1_H.s KQGLLAVEQRDVEVVDLAALKRLAAGVDACTATPTRSTS----- 278
FNR3_H.s KSGVIEVNHDRVELCDLPTLRAVALGNDPCA----- 255
FNR_E.c KSGMLAVKGYITIEENNDAQLAGHTRNVA----- 250
FNR2_H.s KAGLIDVSVRKVRVLSPTLEELASGATSWEQLEQQEMNLPCQRNLDDLKRIFNCG 272
      * * : : * . : : : . : * * :

```

Figura 5 - Alinhamento entre as proteínas FNR<sub>1</sub>, FNR<sub>2</sub> e FNR<sub>3</sub> de *H. seropedicae* e a proteína FNR de *E. coli*. O programa utilizado para o alinhamento foi o ClustalW2 (THOMPSON *et al* 1994 e LARKIN *et al*, 2007). Os aminoácidos idênticos estão indicados com um asterístico (\*), os aminoácidos com alta similaridade estão indicados com dois pontos (: ) e os aminoácidos com baixa similaridade estão indicados com um ponto ( . ). Na caixa em cinza escuro está indicada a região que contém os resíduos de Cys (fonte branca e maior) essenciais para a formação do grupamento [4Fe-4S]<sup>+</sup>. Na caixa preta está indicado o domínio conservado semelhante ao domínio de ligação ao cAMP e na caixa cinza claro o domínio hélice-volta-hélice de ligação ao DNA, característicos das proteínas da família Crp-Fnr.

Evolutivamente, é possível que tenha ocorrido à seleção de diferentes resíduos de aminoácidos em diferentes proteínas FNR de diversos organismos, para gerar uma melhor adaptação às diferentes pressões de O<sub>2</sub> presentes nos diversos nichos ocupados por esses organismos. Esse parece ser o caso das três proteínas FNR de *H. seropedicae*, pois como demonstrado adiante nas figuras 6 e 7, tais proteínas possuem diferentes resíduos de aminoácidos em posições que parecem afetar a sensibilidade de FNR ao oxigênio e também a capacidade de dimerização das mesmas.

Pesquisadores já demonstraram independentemente, que mutações feitas nos resíduos de Ser-24 (JERVIS *et al.*, 2009) e Leu-28 (BATES *et al.*, 2000) na proteína FNR de *E. coli*, levam a um aumento da resistência da FNR a oxigênio. Dentre as três proteínas FNR de *H. seropedicae* a FNR<sub>2</sub> pode ser menos sensível ao O<sub>2</sub>, pois além de ter uma isoleucina na posição equivalente a da serina 24, possui uma histidina na posição equivalente a histidina 28 (Figura 6).



**Figura 6 – Alinhamento de parte da região N-terminal contendo o motivo de cisteínas conservadas, das três proteínas FNR de *H. seropedicae* com a proteína FNR de *E. coli*. Na sequência de *E. coli* e também na sequência da proteína FNR<sub>2</sub> de *H. seropedicae* encontram-se destacadas em quadrados e círculos, respectivamente, aminoácidos que estão relacionados com a sensibilidade do cluster [4Fe-4S]<sup>2+</sup> ao oxigênio. Abaixo dos quadrados estão assinalados os números equivalentes a posição do aminoácido na FNR de *E. coli*.**

A troca da serina da posição 24, por aminoácidos de cadeia volumosa, parece proteger o cluster [4Fe-4S]<sup>2+</sup> da oxidação, sendo assim, estas proteínas FNR mutantes parecem ser mais eficientes na ativação de um promotor FNR-dependente, mesmo sob altos níveis de oxigênio (JERVIS *et al.*, 2009). Já a substituição de um resíduo de leucina da posição 28 por uma histidina aumenta impressionantemente a resistência de FNRL28H de *E. coli* ao oxigênio, fazendo com que a mesma seja ativa mesmo sob condições aeróbias (BATES *et al.*, 2000). A presença da histidina na posição 28 parece proteger o cluster [4Fe-4S]<sup>2+</sup>. A exposição da FNRL28H, purificada anaerobicamente, ao ar por 60 minutos, provocou uma diminuição de apenas 5% no espectro de absorção na região de 409nm, correspondente a presença de um cluster [4Fe-4S]<sup>2+</sup> (BATES *et al.*, 2000). Este efeito mínimo na mudança do espectro de absorção na FNRL28H, em resposta ao oxigênio, contrasta muito com a FNR selvagem,

tendo em vista que nesta, uma exposição ao ar de apenas 10 minutos, leva a uma redução de 50% no espectro de absorvância a 409nm.

Outra característica estrutural na proteína FNR<sub>2</sub> que pode sugerir que esta seja ativa mesmo na presença de oxigênio, é a substituição de um resíduo de aspartato por uma metionina (Figura 7), na região da hélice de dimerização, na posição equivalente a 154 na FNR de *E. coli*. Neste organismo, a substituição do aspartato por uma alanina (aminoácido com mesmas propriedades que a metionina), faz com a FNRD154A tenha uma afinidade de ligação ao DNA aumentada (LAZAZZERA, BATES & KILEY, 1993 ; BATES, LAZAZZERA & KILEY, 1995). Isso se deve ao aumento da capacidade de dimerização de FNRD154A, mesmo na ausência do cluster [4Fe-4S]<sup>2+</sup>, ou seja estas proteínas FNR mutantes possuíam uma capacidade aumentada de dimerização mesmo na presença de oxigênio, pois as apoFNR mutantes tinham uma capacidade de dimerização semelhante a da FNR selvagem contendo o cluster [4Fe-4S]<sup>2+</sup> (LAZAZZERA, BATES & KILEY, 1993 ; BATES, LAZAZZERA & KILEY, 1995).

```

FNR1_Hs EITSEQNVIM
FNR2_Hs EVTIMQ○QSL
FNR3_Hs EISREQRVML
FNR_Ec EIKG□DDMIL
          * : . * :
          154

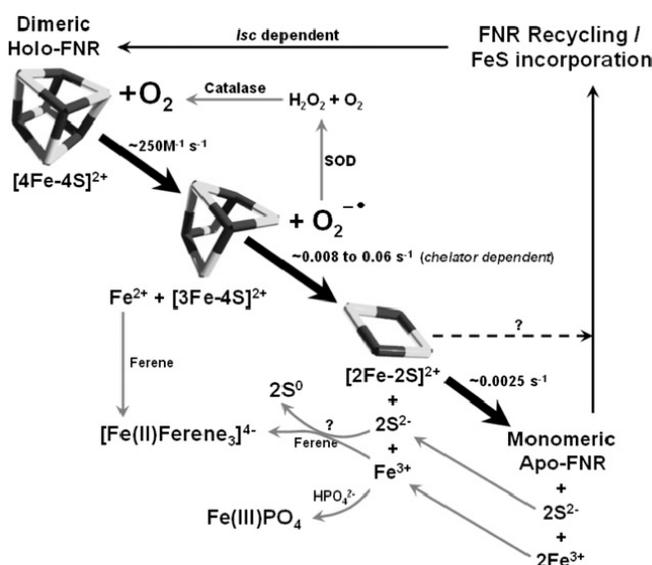
```

Figura 7 – Alinhamento de parte da região central onde se encontra a hélice de dimerização, das três proteínas FNR de *H. seropedicae* com a proteína FNR de *E. coli*. Na sequência de *E. coli* e também na sequência da proteína FNR<sub>2</sub> de *H. seropedicae* encontram-se destacadas em quadrados e círculos, respectivamente, aminoácidos que estão relacionados com o aumento da capacidade de dimerização de FNR. Abaixo do quadrado está assinalado o número equivalente a posição do aminoácido na FNR de *E. coli*.

A interconversão entre a forma ativa [4Fe-4S]<sup>2+</sup> e a forma inativa [2Fe-2S]<sup>2+</sup> da proteína FNR é um processo reversível (DIBDEN & GREEN, 2005). Na ausência de oxigênio, a proteína FNR torna-se ativa de modo dependente do

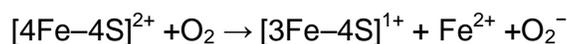
gene *isc* (que codifica para uma proteína cisteína desulfurase) pela aquisição de um cluster  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  por monômero (SCHWARTZ *et al.*, 2000).

Investigações a cerca de como a reação de interconversão entre as formas dos clusters ocorria, revelaram características cinéticas consistentes com uma primeira etapa de oxidação oxigênio-dependente do cluster  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ , seguida por uma etapa, mais lenta e oxigênio independente, de rearranjo do cluster  $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$  a um cluster  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  (CRACK, GREEN & THONSOM, 2004; CRACK *et al.*, 2007), derrubando a proposta de que a conversão do cluster ocorria em uma única etapa, como proposto por Sutton e colaboradores em 2004 (Figura 8).

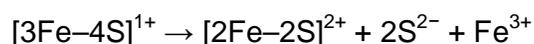


**Figura 8 – Representação esquemática da interconversão entre as formas da proteína FNR em resposta ao oxigênio. Adaptado de Crack *et al* 2008.**

O primeiro passo na reação de interconversão entre a proteína  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  FNR e a proteína  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  FNR, é a oxidação de um elétron do cluster pelo oxigênio, representado na equação abaixo:



Diferentemente de ferredoxinas bacterianas, o cluster  $[3\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$  da proteína FNR é termodinamicamente instável. Esta instabilidade permite a proteína completar a alteração conformacional em uma segunda etapa, que ocorre espontaneamente e de maneira independente de oxigênio, como representado na equação abaixo:



A geração de um ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) na primeira etapa da reação parece ser uma estratégia perigosa para um ativador transcricional, considerando-se que o  $\text{O}_2^-$  pode causar dano oxidativo ao DNA (IMLAY, 2002).

Porém, quando considerado como um regulador com a necessidade de uma alta sensibilidade ao oxigênio, a reciclagem do superóxido/peróxido de hidrogênio para a molécula sinal primária ( $\text{O}_2$ ), constitui um mecanismo importante de retroalimentação que amplifica a sensibilidade da proteína  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$  FNR ao oxigênio (CRACK *et al.*, 2007).

## 1.7 Regulação dos níveis da proteína FNR em *E. coli*

O entendimento dos mecanismos que controlam os níveis da proteína FNR é importante para o entendimento global de sua resposta ao O<sub>2</sub>. Esse controle ocorre tanto a nível transcricional quanto pós-transcricional. Sob condições aeróbias de crescimento, os níveis de FNR são diminuídos através de proteólise (DIBDEN & GREEN, 2005; METTERT & KILEY, 2005), enquanto sob condições anaeróbias, FNR reprime a sua própria transcrição. (JONES & GUNSALUS, 1987; PASCAL *et al.*, 1986; REYES-RAMIREZ & SAWERS, 2006; SAWERS, 2005; SPIRO & GUEST, 1987).

O mecanismo de proteólise de FNR é bem elucidado. A partir de estudos que demonstraram a co-immunoprecipitação de FNR com uma variante da protease ClpXP (FLYNN *et al.*, 2003), sugeriu-se que FNR poderia ser substrato de tal protease. Na proteína FNR foram encontradas duas seqüências semelhantes ao motivo de reconhecimento da protease ClpX (resíduos de aminoácidos 5–11 na região N-terminal e resíduos 249–250 na região C-terminal) (FLYNN *et al.*, 2003). Flynn e colaboradores (2003), demonstraram que ClpX liga-se diretamente a um peptídeo correspondente a 11 resíduos de aminoácidos da região N-terminal de FNR.

Mettert e Kiley em 2005, demonstraram que sob condições aeróbias de crescimento, a degradação de FNR foi prejudicada em estirpes de *E. coli* *clpX*<sup>-</sup> e *clpP*<sup>-</sup>. Porém, quando um plasmídeo expressando somente ClpP foi transformado na estirpe *clpP*<sup>-</sup>, a degradação de FNR foi restaurada aos níveis da estirpe selvagem. Análises por “western blot”, usando anticorpos anti-FNR, demonstraram que os níveis totais da proteína FNR permaneceram estáveis na estirpe *clpP*<sup>-</sup>, porém diminuídos na estirpe *clpP*<sup>+</sup>. Juntos, estes resultados indicaram que a protease ClpXP é responsável pela degradação aumentada da proteína FNR em células sob condições aeróbicas de crescimento.

Para investigar se os resíduos de aminoácidos 5–11 da região N-terminal e os resíduos 249–250 da região C-terminal são os sítios de reconhecimento da proteína FNR para a protease ClpXP, mutantes FNR contendo deleções nesses sítios, respectivamente FNR-D5-11 e FNR-D249-250 foram submetidas a experimentos de proteólise *in vitro*. Estes

experimentos demonstraram que ao contrário da proteína FNR selvagem, as proteínas mutantes FNR-D5-11 e FNR-D249-250 tiveram a degradação por ClpXP diminuída cerca de 17 e 6 vezes, respectivamente (METTERT & KLILEY, 2005).

Em *E.coli* a expressão de FNR é dependente de  $\sigma^{70}$  (SHAW & GUEST, 1982). Estudos *in vivo*, usando fusões *fnr::lacZ*, demonstraram que o promotor *fnr* é reprimido, sob condições anaeróbias, aproximadamente duas a três vezes de maneira FNR dependente. (JONES & GUNSALUS, 1987; PASCAL *et al.*, 1986; REYES-RAMIREZ & SAWERS, 2006; SAWERS, 2005; SPIRO & GUEST, 1987). Ainda foi demonstrado que a repressão da fusão *fnr::lacZ* foi aumentada quando o gene *fnr* foi expresso a partir de um plasmídeo com múltiplas cópias (REYES-RAMIREZ & SAWERS, 2006; SPIRO & GUEST, 1987), sugerindo que a repressão do gene *fnr* é limitada pelos níveis da proteína FNR sob condições anaeróbias.

Na região promotora do gene *fnr* de *E.coli*, foram encontradas duas sequências apresentando similaridade com o consenso de ligação a FNR (TTGAT-N4-ATCAA) (GUEST *et al.*, 1996) (Figura 9). O sítio *upstream* para ligação de FNR (TTAAGN4-TTCAA) está localizado a 103,5 pb em relação ao sítio de início da transcrição, enquanto que o sítio *downstream* está localizado a 0,5 pb do sítio de início da transcrição, sobrepondo-se a este sítio (GUEST *et al.*, 1996).

Por meio de abordagens *in vitro* e *in vivo*, Mettert e Kiley (2007) investigaram se a ligação da proteína [4Fe-4S]-FNR aos sítios *upstream* e *downstream* eram suficientes para a repressão do promotor *fnr* em *E.coli*. Através de dados de *footprinting* de DNA, estes autores demonstraram que o sítio predito para ligação da proteína FNR, localizado na região *upstream* do promotor, parece não ser um sítio de ligação a FNR.

A repressão do promotor *fnr* de *E. coli* parece ocorrer apenas devido a ligação da proteína FNR ao sítio localizado na região *downstream* do promotor, porém o mecanismo pelo qual FNR previne a transcrição pela RNA polimerase não é bem compreendido. Considerando-se a posição do sítio *downstream* para ligação da proteína FNR, a -0,5 pb do início da transcrição, sugeriu-se que

FNR bloqueie a ligação da RNA polimerase ao promotor por meio de impedimento estérico (METTERT & KILEY, 2007).

Os mesmos autores ainda sugeriram que sobreposto ao provável sítio *upstream* para FNR havia a presença de um sítio de ligação para IHF (*integration host factor*) que aumenta a expressão de *fnr* em *E.coli* (Figura 6).

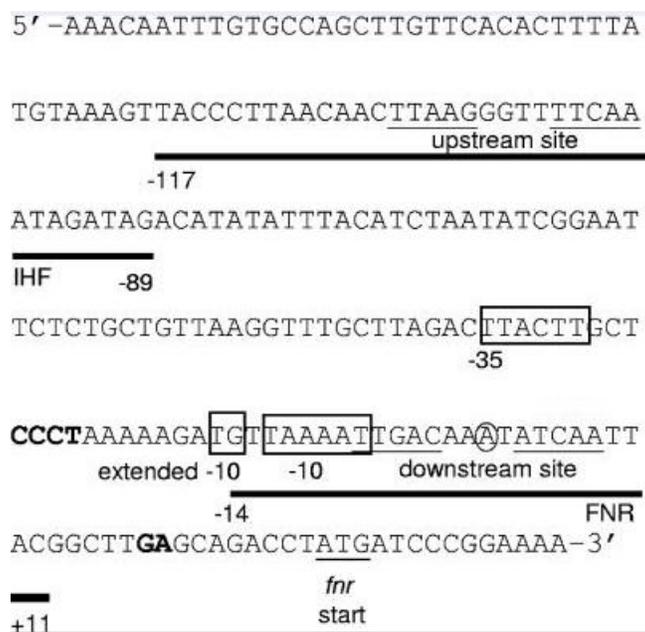


Figura 9 – Região promotora do gene *fnr* de *E. coli*. Os nucleotídeos -163 a +40 estão sendo demonstrados em relação ao sítio de começo da transcrição (circulado). Os sítios preditos de ligação para FNR localizados *downstream* e *upstream* do promotor estão grifados. O códon de início do gene *fnr* também está grifado e as regiões -35 e -10 do promotor estão em uma caixa. Grifado em negrito estão os sítios de proteção por IHF (-117\_ - 89) ou FNR (-14\_+11) da clivagem por DNaseI. Adaptado de Mettert e Kiley, 2007.

O aumento da expressão de *fnr*, em resposta a IHF (METTERT & KILEY, 2007), corrobora estudos prévios que indicaram que seqüências de DNA localizadas a montante da região -41, em relação ao sítio de início da transcrição, eram importantes para a expressão máxima do gene *fnr* em *E.coli* (SAWERS, 2005).

Somente IHF não altera a transcrição de *fnr in vitro*, sugerindo que nestas condições, o papel de IHF na ativação do promotor *fnr*, ou de um outro

fator transcricional juntamente com IHF, tenha sido suprimido. Alternativamente IHF pode ativar a transcrição do promotor *fnr*, impedindo a repressão do mesmo por outros fatores de transcrição (METTERT & KILEY, 2007). Esse parece ser o caso do promotor *nir*, no qual a ligação de IHF, no sítio de ligação II, diminui a repressão do promotor *nir*, mediada pela ligação de IHF e FIS em outros sítios (BROWNING, *et al.*, 2002).

Em 2005, Shalel-Levanon e colaboradores, sugeriram a participação da proteína ArcA na regulação da transcrição de *fnr*, pois resultados de RT-PCR demonstraram que os níveis do transcrito *fnr* eram um pouco maiores em estirpes de *E.coli arcA*- em relação a estirpe selvagem, sob condições microaeróbicas. Para confirmar que FNR era mais ativa em uma estirpe *arcA*- estes autores testaram o nível de expressão do gene *frdA* (um gene ativado por FNR e por isso utilizado em estudos da atividade de FNR, como por exemplo em BECKER *et al.*, 1996) em estirpes mutantes *fnr* e *arcA*. Os níveis de expressão do gene *frdA* foram menores na estirpe mutante *fnr* e também na estirpe duplo mutante *fnr arcA* em comparação com a estirpe selvagem. Em contrapartida a expressão de *frdA* foi aumentada em um mutante simples *arcA*. Este resultado indicou que realmente há um nível maior da proteína FNR, na sua forma ativa, na estirpe mutante *arcA*.

Apesar destas evidências, a participação da proteína ArcA na regulação da transcrição de *fnr* é ainda controversa. Isto porque o sítio para ligação de ArcA no promotor de *fnr* não é conhecido e também porque Mettert e Kiley (2007) demonstraram que a expressão do promotor *fnr* em estirpes *arcA*- era semelhante a expressão da estirpe selvagem.

## 2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Devido ao grande interesse na compreensão dos mecanismos moleculares que envolvem a regulação da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em *H. seropedicae*, e a evidências de que proteínas da família Crp-Fnr estão relacionadas nesta regulação, esta dissertação teve como objetivo a determinação do papel da proteína FNR na fixação biológica de nitrogênio em *H. seropedicae*. Os objetivos específicos desta dissertação estão descritos abaixo:

- Construção de estirpes mutantes de *H. seropedicae* nos genes *fnr<sub>1</sub>*, *fnr<sub>2</sub>* e *fnr<sub>3</sub>*, por deleção;
- Determinação da atividade da nitrogenase nestes mutantes;
- Determinação do efeito das mutações nos genes *fnr* de *H. seropedicae* no padrão de desrepressão do promotor dos genes *nifB* e *nifA*;
- Construção das fusões transcricionais *pfnr<sub>1</sub>::lacZ*, *pfnr<sub>2</sub>::lacZ*, *pfnr<sub>3</sub>::lacZ*, *pfixN::lacZ*, *phemN::lacZ* e determinação do padrão de expressão destes genes em *H. seropedicae*;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Bactérias e Plasmídeos

As estirpes de *Escherichia coli* que foram utilizadas estão listadas na tabela 1.

**Tabela 1 – Estirpes de *E. coli***

Estirpe	Característica	Referência
TOP 10	<i>hsdR</i> , <i>mcrA</i> , <i>lacZΔM15</i> , <i>recA</i>	INVITROGEN
S17.1	Sm <sup>R</sup> , Tra <sup>+</sup>	SIMON, PRIEFFER e PUHLER, 1983

As estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* que foram utilizadas estão listadas na tabela 2.

**Tabela 2 – Estirpes de *H. seropedicae***

Estirpe	Característica	Referência
SMR1	Estirpe parental, Sm <sup>R</sup> , Nif <sup>+</sup>	SOUZA <i>et al.</i> , 2000
MBFNR1	SMR1 contendo uma deleção de aproximadamente 250 nucleotídeos no gene <i>fnr1</i>	Este trabalho
MBFNR2	SMR1 contendo uma deleção de aproximadamente 250 nucleotídeos no gene <i>fnr2</i>	Este trabalho
MBFNR3	SMR1 contendo uma deleção de aproximadamente 250 nucleotídeos no gene <i>fnr3</i>	Este trabalho
MBFNR1/3	SMR1 contendo deleções de aproximadamente 250 nucleotídeos nos genes <i>fnr1</i> e <i>fnr3</i>	Este trabalho
MBFNR2/1	SMR1 contendo deleções de aproximadamente 250 nucleotídeos nos genes <i>fnr1</i> e <i>fnr2</i>	Este trabalho
MBFNR2/3	SMR1 contendo deleções de aproximadamente 250 nucleotídeos nos genes <i>fnr2</i> e <i>fnr3</i>	Este trabalho
MBFNR2/3/1	SMR1 contendo deleções de aproximadamente 250 nucleotídeos nos genes <i>fnr1</i> , <i>fnr2</i> e <i>fnr3</i>	Este trabalho

Os plasmídeos que foram utilizados estão listados na tabela 3.

**Tabela 3 – Plasmídeos**

Plasmídeo	Característica	Referência
pSUP202	Cb <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Mob	SIMON, PRIEFFER e PUHLER, 1983
pMH1701	Km <sup>R</sup> , contém cassete <i>nptI-sacR-sacB</i>	HYNES et al., 1989
pPW452	Tc <sup>R</sup> , vetor fusão transcricional com gene lacZ sem promotor	WOODLEY, PAUL
pMP220	Tc <sup>R</sup> , vetor fusão transcricional com gene lacZ, com sítio policlonagem do pPW452 invertido	WOODLEY, PAUL
pEMS140	Tc <sup>R</sup> , contendo o promotor do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> em pPW452	REGO et al, 2006
pRW1	Tc <sup>R</sup> , contendo o promotor do gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> em pPW452	WASSEM, 1999
pTZ57R/T	Amp <sup>R</sup> , 3'-T p/ ligação de fragmentos de DNA amplificados pela <i>Taq</i>	FERMENTAS
pTZFNR1A	Contém 273 pb da região a montante do gene <i>fnr1</i> mais 240 pb da região codificadora 5' ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZFNR1B	Contém 245 pb a jusante do gene <i>fnr1</i> mais 255 pb da região codificadora 3' ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZFNR2A	Contém 333 pb a montante do gene <i>fnr2</i> mais 279 pb da região codificadora 5' ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZFNR2B	Contém 357 pb a jusante do gene <i>fnr2</i> mais 273 pb da região codificadora 3' ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZFNR3A	Contém 315 pb a montante do gene <i>fnr3</i> mais 255 pb da região codificadora 5' ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZFNR3B	Contém 315 pb a jusante do gene <i>fnr3</i> mais 264 pb da região codificadora 3' ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZFNR1DEL	Contém o fragmento Xho I e Hind III do vetor pTZFNR1A ligado ao pTZFNR1B, linearizado com as mesmas enzimas	Este trabalho
pTZFNR2DEL	Contém o fragmento Xho I e Hind III do vetor pTZFNR2A ligado ao pTZFNR2B, linearizado com as mesmas enzimas	Este trabalho
pTZFNR3DEL	Contém o fragmento Xho I e Hind III do vetor pTZFNR3A ligado ao pTZFNR3B, linearizado com as mesmas enzimas	Este trabalho
pMBB1D	Contém o fragmento Hind III e BamH I do vetor pTZFNR1DEL ligado ao pSUP202, linearizado com as mesmas enzimas	Este trabalho
pMBB2D	Contém o fragmento Hind III e BamH I do vetor pTZFNR2DEL ligado ao pSUP202, linearizado com as mesmas enzimas	Este trabalho
pMBB3D	Contém o fragmento Hind III e BamH I do vetor pTZFNR3DEL ligado ao pSUP202, linearizado com as mesmas enzimas	Este trabalho
pMBB1DS	pMBB1D contendo o cassete <i>nptI-sacR-sacB</i> , derivado do vetor pMH1701, ligado ao sítio BamH I	Este trabalho

Continua na próxima página

pMBB2DS	pMBB2D contendo o cassete <i>nptI-sacR-sacB</i> , derivado do vetor pMH1701, ligado ao sítio BamH I	Este trabalho
pMBB3DS	pMBB3D contendo o cassete <i>nptI-sacR-sacB</i> , derivado do vetor pMH1701, ligado ao sítio BamH I	Este trabalho
pTZP1	Contém a região promotora do gene <i>fnr1</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZP2	Contém a região promotora do gene <i>fnr2</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZP3	Contém a região promotora do gene <i>fnr3</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZPFN	Contém a região promotora do gene <i>fixN</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZPHN	Contém a região promotora do gene <i>hemN</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pMPFNR1	Contém a região promotora do gene <i>fnr1</i> , derivado do pTZP1, ligado ao vetor pMP220 nos sítios Pst I e Bgl II	Este trabalho
pMPFNR2	Contém a região promotora do gene <i>fnr2</i> , derivado do pTZP2, ligado ao vetor pMP220 nos sítios Pst I e Bgl II	Este trabalho
pMPFNR3	Contém a região promotora do gene <i>fnr3</i> , derivado do pTZP3, ligado ao vetor pMP220 nos sítios Pst I e Bgl II	Este trabalho
pMPPFN	Contém a região promotora do gene <i>fixN</i> , derivado do pTZPFN, ligado ao vetor pMP220 nos sítios Pst I e Bgl II	Este trabalho
pMPPHN	Contém a região promotora do gene <i>hemN</i> , derivado do pTZPHN, ligado ao vetor pMP220 nos sítios Pst I e Bgl II	Este trabalho

### 3.2 Meios de Cultura

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFb-malato (KLASSEN *et al*, 1997), que tem sua composição apresentada na tabela 4.

**Tabela 4 – Composição do meio NFb-malato**

Elemento	gramas/litro
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2,0 . 10 <sup>-1</sup>
NaCl	1,0 . 10 <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	2,0 . 10 <sup>-2</sup>
Ácido nitrilo-triacético	5,6 . 10 <sup>-2</sup>
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2,0 . 10 <sup>-2</sup>
Ácido málico	5,0
Biotina	1,0 . 10 <sup>-4</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2,0 . 10 <sup>-3</sup>
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	2,35 . 10 <sup>-3</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8 . 10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	8,0 . 10 <sup>-5</sup>
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2,4 . 10 <sup>-4</sup>

No momento do uso foram adicionados ao meio NFb-malato 50 mL/L ou 10mL/L de solução de fosfatos (159,4 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 17,8 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

Estes meios foram denominados respectivamente de NFbHP-malato e NFbLP-malato. Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH<sub>4</sub>Cl 20 mmol/L ou gultamato de sódio 0,5 ou 5 mmol/L. O meio NFbHP-malato com adição de NH<sub>4</sub>Cl 20 mmol/L foi denominado NFbHPN-malato, já os meios com a adição de gultamato de sódio 0,5 ou 5 mmol/L foram chamados respectivamente de NFbHPG<sub>0,5</sub>-malato ou NFbHPG<sub>5</sub>-malato.

As soluções de fosfatos e cloreto de amônio foram esterilizadas por autoclavação separadamente e adicionadas ao meio no momento do uso. Os meios sólido e semi-sólido foram obtidos adicionando-se ágar nas concentrações de 15 g/L e 1,5 g/L, ao meio líquido, respectivamente.

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) (SAMBROOK *et al.*, 1989). Após a transformação, as células de *E. coli* foram recuperadas em meio SOC .

O meio LB (Luria Bertani) (SAMBROOK *et al.*, 1989) tem a composição listada na tabela 5.

**Tabela 5 – Composição do meio LB (Luria Bertani)**

Elemento	gramas/litro
Extrato de levedura	5
Cloreto de sódio	10
Triptona	10

O meio sólido LA foi obtido após adição de 15g/L de agar ao meio LB.

O meio SOB (SAMBROOK *et al.*, 1989) tem a composição apresentada na tabela 6. O meio SOC foi obtido após a adição de glucose 20mmol/L ao meio SOB.

**Tabela 6 – Composição do meio SOB**

Elemento	gramas/litro
Bacto triptona	20
Extrato de levedura	5
Cloreto de sódio	0,5
Cloreto de potássio	0,186
Sulfato de magnésio	2,4

### 3.3 Antibióticos

A tabela 7 mostra as concentrações e modo de preparo dos diferentes antibióticos utilizados para seleção das estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho. Os antibióticos foram adicionados ao meio de cultura no momento do uso. Para o preparo de placas com meio sólido, este foi previamente fundido, resfriado até uma temperatura de aproximadamente 50°C e então os antibióticos foram adicionados antes da distribuição do meio em placas de petri.

**Tabela 7 – Relação dos antibióticos utilizados**

Antibiótico	Concentração estoque	Preparo	Concentração final
Ampicilina	250 mg/mL	Em H <sub>2</sub> O destilada e esterilização por filtração	250 µg/mL <sup>1</sup>
Ácido Nalidíxico	10 mg/mL	Em NaOH 0,1N e esterilização por filtração	5 µg/mL <sup>2</sup>
Canamicina	100 mg/mL	Em H <sub>2</sub> O destilada e esterilização por filtração	500 µg/mL <sup>2</sup> 50 µg/mL <sup>1</sup>
Cloranfenicol	30 mg/mL	Etanol 95 %	30 µg/mL <sup>1</sup> 100 µg/mL <sup>2</sup>
Estreptomicina	80 mg/mL	Em H <sub>2</sub> O destilada e esterilização por filtração	80 µg/mL <sup>1,2</sup>
Tetraciclina	10 mg/mL	Etanol 50% (v/v)	10 µg/mL <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Escherichia coli*

<sup>2</sup> *Herbaspirillum seropedicae*

### 3.4 Condições de Cultivo e Estoque dos Microorganismos

As culturas de *H. seropedicae* foram incubadas a 30°C em meio NFbHP-Malato com diferentes concentrações de glutamato ou com NH<sub>4</sub>Cl e também com os antibióticos necessários a seleção. As culturas cultivadas em meio líquido foram incubadas em agitador rotatório a 120 rpm, em frascos de 25, 40 ou 60 mL, mantendo-se uma proporção de 1/3 ou 1/4 entre o volume do meio de cultura e o volume total do frasco. As culturas cultivadas em meio semi-sólido foram incubadas em estufa a 30°C, em frascos de 10 mL, contendo 4 mL de meio de cultura.

As culturas de *E. coli* foram incubadas a 37°C em meio LB na presença de antibióticos para a seleção. As culturas cultivadas em meio líquido foram incubadas em agitador rotatório a 180 rpm, em frascos de 25, 40 ou 60 mL, mantendo-se uma proporção de 1/3 ou 1/4 entre o volume do meio de cultura e o volume total do frasco.

Culturas estoque de *E. coli* foram mantidas em solução de glicerol 50% a -20°C. Já as culturas estoque de *H. seropedicae* foram mantidas a temperatura ambiente em meio NFbHPN-Malato semi-sólido, contendo os antibióticos adequados.

Nos experimentos de desrepressão da nitrogenase, as células de *H. seropedicae* foram crescidas durante a noite em meio NfbHPN-Malato líquido. No dia seguinte as células foram coletadas por centrifugação em uma mini-centrífuga do tipo *minispin* da Eppendorf® por 2 minutos a 5000 rpm, e então ressuspensas em meio NFb-Malato contendo 5,0 mM de NH<sub>4</sub>Cl e 50mL/L de solução de fosfatos. A densidade ótica das culturas para o início do ensaio foi ajustada para um valor entre 0,010 e 0,020. As suspensões bacterianas assim preparadas foram cultivadas a 30°C sob agitação de 120 rpm por até 24 horas, sendo que alíquotas de 100 µL de células foram retiradas a cada duas horas para determinação da atividade de β-galactosidase.

### **3.5 Crescimento e Determinação do Tempo de Geração e da Taxa de crescimento nas estirpes de *Herbaspirillum seropedicae***

As estirpes de interesse foram cultivadas basicamente como descrito no item 3.4, em frascos de 40 mL contendo 5 mL de meio NFbHPN-Malato. Também foram feitos cultivos usando 10mM de  $\text{KNO}_3$  como fonte de nitrogênio ou também acrescentando-se ao meio NFbHPN-Malato concentrações variadas de  $\text{KNO}_2$ , como uma fonte geradora de espécies reativas de nitrogênio. Para obtermos diferentes concentrações de  $\text{O}_2$  na cultura bacteriana em crescimento, cultivos foram feitos em frascos de 10mL com diferentes volumes de meio de cultura e com atmosfera fechada (ou seja, em frascos selados com tampa de borracha).

A densidade ótica das culturas, para o início dos ensaios, foi ajustada para 0,010 e o crescimento foi acompanhado de hora em hora por até 24 horas. A cada hora, alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  das culturas em crescimento foram transferidas para placas do tipo ELISA (Greiner Bio One) e então submetidas a leitura de sua turbidez a um comprimento de onda de 595 nm em leitor de microplacas (ELX 800 BIO-TEK Instruments).

Os parâmetros cinéticos do crescimento foram calculados a partir das equações (disponíveis em <<http://www.studentsguide.in/microbiology/microbial-nutrition-growth/mathematical-expression-of-growth.html>> acesso em 21/06/2010) que seguem:

$$K = \frac{\log B_n - \log B_0}{t \log 2}$$

$$\mu = \frac{(\log_{10} N - \log_{10} N_0) \times 2,303}{t - t_0}$$

$$\mu = \frac{\ln 2}{G}$$

Onde:

**N<sub>0</sub> ou B<sub>0</sub>** número de organismos no tempo zero;

**N<sub>n</sub> ou B<sub>n</sub>** número de organismos depois de n gerações;

**G** é o tempo de geração;

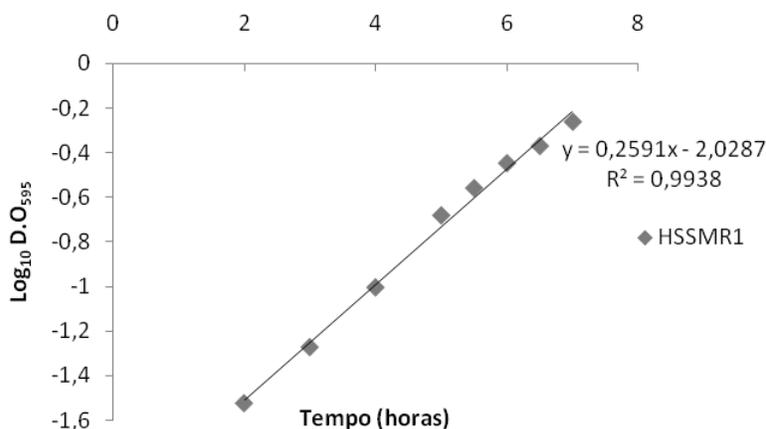
**(μ)** taxa de crescimento bacteriano;

**K** constante da taxa de crescimento exponencial. Esta constante é recíproca ao tempo de geração (G), isto é, **G = 1/K**;

A taxa de crescimento (**μ**) também foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\mu = 2,303 \cdot a$$

Onde **a** é o coeficiente angular do gráfico seguinte, plotado tomando-se o log<sub>10</sub> da densidade ótica das culturas *versus* tempo de cultivo, nos pontos em que o crescimento bacteriano é exponencial.



### 3.6 Preparo de Células Termo-Competentes e Transformação Bacteriana por Choque Térmico

As células foram preparadas de acordo com dois protocolos modificados a partir dos trabalhos de Chung e colaboradores (1989) e também de Chung e Miller (1993).

#### 3.6.1 Preparo de células competentes utilizando $MgCl_2$ e $CaCl_2$

Para o preparo, células de *E. coli* TOP10 ou S17.1 provenientes de uma cultura saturada, previamente crescida em LB durante a noite, foram diluídas no mínimo 100 vezes em 200 mL de meio LB fresco em um frasco do tipo erlenmeyer de 1L e cultivado a 30°C e 120 rpm por aproximadamente 4 horas até que a cultura de células atinja uma  $D.O_{595}$  entre  $\cong 0,2 - 0,4$ .

As células foram transferidas para 4 tubos falcon de 50 mL incubadas por 15 minutos em banho de gelo, coletadas por centrifugação (2.500 x g por 8 minutos, a 0°C) e o sedimento de células foi ressuspensão em 15 mL de uma solução de  $MgCl_2$  (100mM). Esta ressuspensão foi centrifugada (2.500 x g por 8 minutos, a 0°C), ressuspensa em 25 mL de uma solução de  $CaCl_2$  (100mM) e então incubadas por 30 minutos em banho de gelo.

Após esta incubação, as células foram coletadas a 2.500 x g por 8 minutos e a 0°C, todo o sobrenadante foi descartado e finalmente as células foram ressuspensas em 200  $\mu$ L de uma solução de  $CaCl_2$  (100mM) preparada em Glicerol 50%. As células ressuspensas foram aliqotadas em volume de 100  $\mu$ L em microtubos previamente gelados. Antes da utilização, as células foram congeladas a -80°C, mesma temperatura de armazenamento, por no mínimo 30 minutos, devido a observações empíricas de aumento da eficiência de transformação quando se faz o congelamento imediato após o término da preparação.

### 3.6.2 Preparo de células competentes utilizando TSS “*Transformation and storage solution*”

Para o preparo, células de *E. coli* TOP10 ou S17.1 provenientes de uma cultura saturada crescida em LB durante a noite, foram diluídas no mínimo 100 vezes em um volume de 5 a 10 mL, em frascos de 25 ou 40 mL, respectivamente. Após um período de cultivo de 2 a 3 horas, alíquotas de 1 mL foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, previamente gelados, coletadas por centrifugação em centrífuga *minispin* Eppendorf® (13400 rpm 1 minuto, temperatura ambiente) e então ressuspensas em 100 µL de TSS (LB contendo 10%PEG 6000, 50 mM MgCl<sub>2</sub> e 5%DMSO).

### 3.6.3 Protocolo para Transformação Bacteriana por Choque Térmico

Para a transformação plasmídeos íntegros ou ligações foram misturadas à uma suspensão de 100µL de células competentes. Após a incubação por 30 minutos em banho de gelo, a mistura foi levada a banho-maria a 42°C por 1min30seg e depois incubada novamente em gelo por 2 minutos. Após esse choque térmico, as células foram recuperadas pela adição de 400µL de meio SOC e incubação por uma hora em estufa a 37°C, no mesmo tubo de transformação. Durante o período de recuperação as células foram homogeneizadas por inversão em intervalos de 10-15 minutos. Após a recuperação aproximadamente 250µL da suspensão de células foram plaqueados em meio LA contendo os antibióticos e indicadores para seleção de clones convenientes a cada transformação. Nos casos em que a marca de resistência a antibiótico contido nos plasmídeos era ampicilina, as células não foram recuperadas, somente ressuspensas em meio SOC e então diretamente plaqueadas.

### 3.7 Transferência de Plasmídeos por Conjugação

Os plasmídeos recombinantes de interesse foram primeiramente transformados em *E. coli* S17.1 (*tra*<sup>+</sup>). As estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas um dia antes da conjugação nos meios NFbHPN-Malato e LB, respectivamente contendo os antibióticos para a seleção. No dia da realização da conjugação, as culturas saturadas foram utilizadas para o re-inóculo das estirpes de interesse nos meios de cultura adequados sem adição de antibióticos. Um volume de 75 µL das estirpes de *H. seropedicae* (receptora) foram inoculadas em 2,5mL de NFbHPN-malato 3 horas antes do inóculo de 25 µL da estirpe S17.1 de *E. coli* (doadora) em 2 mL de meio LB. Os tempos de incubação, no dia da conjugação, das estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram de, respectivamente, 6 e 3 horas nas condições ótimas de crescimento.

Em seguida foram feitas misturas da cultura de *H. seropedicae* com cultura de *E. coli* em duas proporções distintas. Em um microtubo foram misturados 50 µL da cultura de *H. seropedicae* com 5 µL da cultura de *E. coli*, e em outro 100 µL da cultura de *H. seropedicae* com 2 µL da cultura de *E. coli*. As suspensões de células de ambas misturas foram colocadas em pólos distintos na placa, como uma gota em meio LA/NFbHPN-malato (1:3) e incubadas a 30°C por 24 horas. A massa de células foi raspada, ressuspensa em 1 mL de NFb-malato e então 250µL foram plaqueados em meio NFbLP-malato sólido contendo de 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl e dos antibióticos adequados.

### 3.8 Purificação de Plasmídeos em Pequena Escala

A purificação de plasmídeos foi feita de acordo com o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). A cultura bacteriana, contendo o plasmídeo de interesse, foi coletada por centrifugação e então ressuspensa em 150µL de GET (glucose 50 mmol/L, Tris.HCl 25 mmol/L pH 8.0 e EDTA 10 mmol/L). A lise das células foi feita pela adição de 150µL da solução de lise (SDS 1% e NaOH 0,18 mol/L) e suave homogeneização por não mais do que 5 minutos até a neutralização da solução pela adição de 150µL de Kcaf (acetato de potássio 3mol/L pH 4,8 e ácido fórmico 1,8mol/L) e incubação por 15 minutos no gelo. 2 a 3 µL de RNase PureLink (Invitrogen), não fervida, foram adicionados às células em processo de lise, antes da neutralização com Kcaf. Após esse período, o DNA cromossomal, proteínas e fragmentos celulares, foram precipitados por centrifugação por um tempo de 10 minutos. Então, o sobrenadante (cerca de 300 µL) foi coletado por decantação ou com auxílio de uma pipeta e tratado com 100µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo e o DNA plasmidial precipitado com a adição de 3 volumes de etanol 96%. Após a homogeneização vigorosa e centrifugação a 13400 rpm em centrífuga Minispin da Eppendorf por 30 minutos, o DNA precipitado foi lavado com 1mL de etanol 70%, seco a vácuo ou a temperatura ambiente, ressuspensa em 30 µL de água ultrapura e estocado a -20°C. Alternativamente a purificação de plasmídeos foi feita utilizando-se o kit QIAprep® Miniprep Kit (QIAGEN), no caso de plasmídeos com baixo número de cópias (até 10 kb) ou quando deseja-se obter DNA com alto grau de pureza, como por exemplo no caso de sua utilização para reações de sequenciamento ou preparo de vetores e fragmentos para a clonagem.

O rendimento e qualidade das purificações foram avaliados através da aplicação de 1µL da purificação para análise eletroforética em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X. A concentração foi estimada através da comparação visual com um padrão de concentração (0,1µg/mL) do plasmídeo pTZ57R (PROMEGA).

### 3.9 Eletroforese de DNA em Gel de Agarose

A eletroforese de DNA foi feita em gel de agarose horizontal como descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989). Quando a eletroforese for utilizada para a verificação de rendimento de purificações de DNA, de obtenção de amplificadores por PCR, ou verificação de clonagens por meio de análises de restrição o tampão utilizado será o TBE 1X (Tris-borato 40 mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,3).

No caso da eletroforese ter por objetivo a melhor separação e resolução de fragmentos de DNA com tamanhos muito aproximados, ou a recuperação de fragmentos de DNA do gel a eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,3). No último caso citado, foi utilizado gel de agarose de baixo ponto de fusão 0.8% ("Low Melting Point" – LMP).

As amostras de DNA foram misturadas ao tampão de amostra Fsduds (azul de bromofenol 0.8%, ficol 10%, xileno cianol 0.4%, SDS 1%, EDTA 1,8mmol/L, pH 8,0), na proporção de 1 $\mu$ L de tampão para 5 $\mu$ L de amostra.

Após a corrida eletroforética a 30-100V, o gel foi transferido para um recipiente contendo solução de brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/mL) e incubado por cerca de 20 minutos. Após a retirada do excesso de brometo de etídeo em água corrente o gel foi visualizado sob luz ultravioleta (312 nm) em transiluminador EC3 System – UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA-USA). O registro das imagens foi feito em papel térmico Sony (Video printer GfaticUP860CE).

### 3.10 Clivagem de DNA com Enzimas de Restrição e Preparo dos Vetores e Insertos para a Clonagem

A digestão de DNA com enzimas de restrição foi feita segundo as recomendações especificadas pelos fabricantes INVITROGEN ou FERMENTAS. Os volumes de reação e quantidade de DNA utilizados foram variados de acordo com a aplicação da restrição.

No caso da análise de restrição para a verificação/confirmação da obtenção de clones, as reações foram feitas em volume final de 10  $\mu\text{L}$ , utilizando-se de 3 a 5  $\mu\text{L}$  (aproximadamente 0,1 a 0,3  $\mu\text{g}$ ) de DNA preparado como descrito no item 3.8. Após a incubação durante a noite, todo o volume de restrição foi aplicado em gel de agarose para análise como descrito no Item 3.9.

A preparação dos vetores, bem como dos insertos para a clonagem foi feita através da clivagem dos plasmídeos de interesse com as enzimas de restrição adequadas, em uma reação com volume final de 100  $\mu\text{L}$ , contendo de 30 a 60  $\mu\text{L}$  (aproximadamente 20 a 30  $\mu\text{g}$ ) do plasmídeo preparado como descrito no Item 3.8, e cerca de 10 unidades de enzima e incubação durante a noite. Ao final do tempo de incubação, 1  $\mu\text{L}$  da reação foi analisado por eletroforese para confirmação da restrição total. Todo o volume restante da reação de restrição (99  $\mu\text{L}$ ) foi aplicado em gel de agarose para separação e posterior recuperação dos fragmentos através da utilização dos kits illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) ou Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA)

A porcentagem de recuperação de DNA a partir dos kits de purificação foi estimada visualmente em uma corrida eletroforética onde foram aplicados: 1  $\mu\text{L}$  do vetor ou inserto antes da recuperação do DNA do gel, 1  $\mu\text{L}$  do vetor ou inserto após a recuperação do DNA do gel com os kits citados e também um padrão de corrida com concentração conhecida (1kb plus DNA ladder – FERMENTAS).

Alternativamente os vetores para a clonagem foram defosfatizados, após a restrição, utilizando a enzima fosfatase alcalina de camarão (do inglês SAP- "*Shrimp Alkaline Phosphatase*"), como indicado no manual do fabricante da enzima (USB Corporation), antes da purificação do vetor linearizado utilizando os kits de purificação supracitados.

### 3.11 Ligação de Fragmentos de DNA a Vetores

O vetor (linearizado) e o inserto, preparados como descrito no Item 3.10, foram ligados numa razão molar de aproximadamente 1:1. O volume do sistema de ligação foi de 10  $\mu$ L utilizando o tampão da T4 DNA ligase (FERMENTAS) na concentração de 1X, juntamente com 0,2 a 0,5 U da enzima T4 DNA ligase (FERMENTAS). O sistema de ligação foi incubado a aproximadamente 20°C durante a noite ou a 37°C por uma hora. No caso da incubação a 37°C, metade do volume final de enzima foi adicionado ao tubo de reação na primeira meia-hora de reação, e a outra metade, adicionada na segunda meia-hora de reação.

### 3.12 Sequenciamento de DNA

O DNA dupla fita para sequenciamento foi obtido basicamente como descrito no Item 3.8. A reação de sequenciamento foi feita utilizando dideoxynucleotídeos terminadores de cadeia marcados com fluoróforos (SANGER, NICKLEN & COULSON, 1977). Nesta reação foram utilizados aproximadamente 300 a 400 ng do DNA purificado (Item 3.8), 2 pmols do primer apropriado e 4,0  $\mu$ L de mistura para sequenciamento Sequencing Reagent Premix (DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, GE Healthcare Biosciences). O volume final da reação foi de 10  $\mu$ L. A reação foi feita utilizando o termociclador Mastercycler Gradient da Eppendorf, sendo utilizado um programa de dois ou de três passos, dependendo da temperatura de fusão do primer utilizado. No caso dos primers reverso e universal, onde a temperatura de fusão é igual a 60°C foi utilizado um ciclo de desnaturação a 95°C e um outro ciclo onde anelamento e extensão a 60°C. Já para outros primers, com temperatura de fusão diferente de 60°C o ciclo de anelamento foi separado do ciclo de extensão.

O produto da reação de sequenciamento, acrescido de 10 $\mu$ L de água ultrapura, foi precipitado através da adição de 2 $\mu$ L de Acetato de Amônio 7,5mol/L, 60 $\mu$ L de etanol absoluto e centrifugação a temperatura ambiente a 13.000 rpm por 30 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo ou a temperatura ambiente protegido da luz e então dissolvido em 4  $\mu$ L

de Formamide Loading Dye (Applied Biosystems), desnaturado por 2 minutos a 96°C e submetido à eletroforese em um seqüenciador automático de DNA da ABI-PRISM 377 (Applied Biosystems). As seqüências obtidas no formato FASTA foram submetidas a análise no banco de dados do NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>).

### 3.13 Amplificação de Fragmentos de DNA por PCR

As amplificações dos fragmentos dos genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3* de *H. seropedicae* foram feitas pelo método de reação em cadeia da polimerase, do inglês, “*Polimerase Chain Reaction*”, ou PCR (MULLIS & FALOONA, 1987; SAIKI, *et al.*, 1988). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram desenhados com base nas seqüências dos genes de interesse disponibilizadas pelo Programa GENOPAR. Antes da síntese química dos oligonucleotídeos, pelas empresas Invitrogen ou IDT (Integrated DNA Technologies), estes foram analisados através das ferramentas do Programa OligoAnalyzer (OWCZARZY, *et al.*, 2008) disponíveis em: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx> (Acesso em Junho/2009). Os oligonucleotídeos sintetizados como descrito, estão listados na tabela 8.

**Tabela 8 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR**

Primer	Sentido	Sítio Restrição	Sequência (5'-->3')	Aplicação	Referência
1dA+	F	Hind III	TGCATCAAGCTTGTGTGGTA	Amplificar 273 pb a montante do gene <i>fnr1</i> mais 240 pb da região codificadora	Este trabalho
1dA-	R	Xho I	GCCGTCCTCGAGTTCCTGATA		
1dB+	F	Xho I	GTGAACCTCGAGTCACGCTAC	Amplificar 245 pb a jusante do gene <i>fnr1</i> mais 255 pb da região codificadora.	Este trabalho
1dB-	R	BamH I	TCTTTTGGATCCTCAACCCG		
2dA+	F	Hind III	GGAACAAGCTTTTCAGCAGC	Amplificar 333 pb a montante do gene <i>fnr2</i> mais 279 pb da região codificadora	Este trabalho
2dA-	R	Xho I	GGTATGCTCGAGGGCAATCAC		

Continua na próxima página

2dB+	F	Xho I	AATGCC <b>CTCGAG</b> GAATTCTCG	Amplificar 357 pb a jusante do gene <i>fnr2</i> mais 273 pb da região codificadora.	Este trabalho
2dB-	R	BamH I	AGGTTGG <b>GATCCT</b> GGTGGGAAG		
3dA+	F	Hind III	ACTGGAA <b>AAGCTT</b> GGCCTATG	Amplificar 315 pb a montante do gene <i>fnr3</i> mais 255 pb da região codificadora.	Este trabalho
3dA-	R	Xho I	CTGGAAGGT <b>CTCGAG</b> ATGGCC		
3dB+	F	Xho I	ATGACGGCG <b>CTCGAG</b> AAGATG	Amplificar 315 pb a jusante do gene <i>fnr3</i> mais 264 pb da região codificadora.	Este trabalho
3dB-	R	BamH I	GTATAGCC <b>CGATCC</b> AGTTTCG		
1pN	F	Nde I	CACTGCC <b>CATATG</b> CTGACCGCG	Clonagem do gene <i>fnr1</i> em vetor de expressão	Este trabalho
1pB	R	BamH I	ATCGCTGTT <b>GGATCCT</b> GACCG		
2pN	F	Nde I	GGAGCC <b>CATATG</b> AGCAAGTCC	Clonagem do gene <i>fnr2</i> em vetor de expressão	Este trabalho
2pB	R	BamH I	TCAGCAG <b>GGATCCT</b> TCGACTCA		
3pN	F	Nde I	TCCAACC <b>CATATG</b> TCCAGCCT	Clonagem do gene <i>fnr3</i> em vetor de expressão	Este trabalho
3pB	R	BamH I	CCATTCTA <b>GGATCCT</b> GGGGG		
p1P	F	Pst I	AGTTTCA <b>CTGCAG</b> CGGAAGTTT	Clonagem da região promotora do gene <i>fnr1</i> em vetor de fusão com o <i>lacZ</i>	Este trabalho
p1B	R	Bgl II	AGACCCA <b>AGATCT</b> GGCACAAC		
p2P	F	Pst I	AAATCGCA <b>CTGCAG</b> TTCCGCTT	Clonagem da região promotora do gene <i>fnr2</i> em vetor de fusão com o <i>lacZ</i>	Este trabalho
p2B	R	Bgl II	ACGATGCA <b>AGATCT</b> GCATGTC		
p3P	F	Pst I	AGATG <b>CTGCAG</b> TATGAATGGCT	Clonagem da região promotora do gene <i>fnr3</i> em vetor de fusão com o <i>lacZ</i>	Este trabalho
p3B	R	Bgl II	CGAATGCT <b>AGATCT</b> TGGAAGC		
pFNP	F	Pst I	TGGAAG <b>CTGCAG</b> ATCTCCTCAT	Clonagem da região promotora do gene <i>fixN</i> em vetor de fusão com o <i>lacZ</i>	Este trabalho
pFNB	R	Bgl II	ATTGGCG <b>AGATCT</b> GTGTAGTT		
pHNP	F	Pst I	TTAACATTG <b>CTGCAG</b> TTGGGCT	Clonagem da região promotora do gene <i>hemN</i> em vetor de fusão com o <i>lacZ</i>	Este trabalho
pHNB	R	Bgl II	TCTTGTTCA <b>AGATCT</b> CGAGACT		
1F	F	Nenhum	ACCAGTTGTGCCTGCCCA	Confirmação de clonagens e obtenção dos mutantes	BATISTA, M.B; 2008
1R	R	Nenhum	CTGCTTGCGGAACCTTGA		

Continua na próxima página

2F	F	Nenhum	CAATGACCTGAGTAAGCGT	Confirmação de clonagens e obtenção dos mutantes	BATISTA, M.B; 2008
2R	R	Nenhum	GAACTTGCTGATGAGGCG		
3F	F	Nenhum	TTCCACCCACAAGCATTC	Confirmação de clonagens e obtenção dos mutantes	BATISTA, M.B; 2008
3R	R	Nenhum	TGAAGTTGGTCAGCAGGC		

Nas reações de amplificação foram utilizados de 0,2 a 0,5 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas), tampão para a Taq na concentração de 1X no volume final de reação, 0,2 mol/L de dNTPs, 0,1 a 1  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo 1,5 a 4 mmol/L de  $MgCl_2$  e aproximadamente 20 ng de DNA molde em um volume final de reação de 20  $\mu$ l ou 50  $\mu$ l. O DNA molde foi obtido basicamente como descrito no item 3.8 ou a partir de culturas bacterianas fervidas, para rompimento celular e exposição do DNA genômico. Visando-se otimizar as condições de amplificação, as concentrações dos reagentes bem como os parâmetros da reação foram variados. Ainda, para a otimização de tais condições, foram aplicadas variações da técnica de PCR convencional, tais como a *“Hot Start PCR”*, a *“TouchDown PCR”* de acordo com DIEFFENBACH e DVEKSKER (1995), e também foram utilizados aditivos como DMSO, polietilenoglicol, glicerol, betaína e também formamida (WINSHIP, 1989; BACHMAN, LUKE e HUNSMANN, 1990; POMP e MADRANO, 1991; SMITH, *et al*, 1990; WEISSENSTEINER e LANCHBURRY, 1996).

### 3.14 Determinação da Atividade da Nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno a etileno como descrito por Dilworth (1966) e Schollhorn & Burris (1967), modificado por Klassen e colaboradores (1997).

Os frascos com culturas em meio NFbHP-Malato semi-sólido foram suplementados com 0,5 mmol/L de glutamato e vedados com rolhas de borracha (suba-seal). Após a vedação, foi injetado acetileno gasoso (10% do volume da fase gasosa do frasco).

A cultura foi então incubada a 30°C por 1 hora. Após este período, uma amostra de 0,5 mL, da fase gasosa dos frascos, foi coletada para análise do etileno formado, em cromatógrafo Varian Star 3400 CX equipado com uma coluna de Porapak N e detector de ionização de chama. A temperatura da coluna foi mantida em 120°C e do detector em 200°C. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio super seco. Etileno padrão (100 ppm) foi fornecido pela White Martins S.A.

Depois da coleta da fase gasosa dos frascos para a cromatografia, o meio semi-sólido foi vigorosamente homogeneizado em vórtex e então utilizado para a realização do ensaio de determinação da concentração de proteínas pelo método descrito por Bradford (Item 3.16). A atividade da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína da cultura.

### 3.15 Determinação da Atividade de $\beta$ -Galactosidase

A atividade de  $\beta$ -galactosidase em *H. seropedicae* foi determinada de acordo com MILLER (1992). As estirpes de *H. seropedicae* cultivadas por 16 horas em meio NFbHP-malato na presença de 20 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em meio NFbHP-malato, contendo 5mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  numa D.O<sub>595</sub> nm de 0.2 e transferidas para frascos de 25 mL

Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  das culturas foram coletadas e misturadas a 900  $\mu\text{L}$  de tampão Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  60 mmol/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  40 mmol/L, KCl 10 mmol/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mmol/L,  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mmol/L e SDS 0,0027% pH 7,0) em microtubos de 2,0 mL. Cinquenta microlitos de clorofórmio foram adicionados e então o sistema de reação foi agitado em vórtex por cerca de 30 segundos para lise das células. Esta mistura foi incubada por 10 minutos a 30°C, para equilíbrio dos tubos e então a reação foi iniciada pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de ONPG (*o*-nitrofenil  $\beta$ -D-galactosídeo; 4mg/mL preparado em tampão Z sem adição de  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mmol/L e SDS 0,0027%). Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1mol/L. Previamente a determinação da absorbância do cromóforo *o*-nitrofenol em 415

nm, os tubos foram centrifugados por 10 minutos para retirada de “*debris*” celulares.

### 3.16 Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteínas foi feita utilizando-se o método descrito por Bradford (1976). Este é um método colorimétrico que se baseia na ligação do Comassie Brilliant Blue G-250 à proteína.

Para a dosagem, 50µL de cultura bacteriana, proveniente de meio semi-sólido ou líquido, foram primeiramente lisadas, em placas do tipo ELISA, pela adição de 50 µL de NaOH 0,2 mol/L e incubação por cerca de 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação em vórtex regulado para agitação em sua intensidade mínima. Depois deste tempo de incubação, 30 µL do produto de lise foi transferido para poços de uma placa de ELISA (Greiner Bio One) onde foi então adicionado um volume de 170µL de reativo de Bradford, preparado com algumas modificações em relação a referência original que descreve a técnica. Para preparação de um litro de Reativo de Bradford 100mg de Comassie Brilliant Blue G-250, foram dissolvidos em 40 mL de metanol (J.T.Baeker) e então 120 mL de ácido fosfórico 85% (m/v) foi adicionado. O volume da solução foi completado para um litro, adicionando-se água ultrapura. Antes do uso a solução foi filtrada em membrana de papel de 28µM (J.Prolab).

Após a adição do reativo de Bradford às amostras, a absorbância a 595 nm foi determinada em um leitor de microplacas (ELX 800 BIO-TEK Instruments). Cada ensaio de determinação da concentração de proteínas foi realizado em duplicata e a curva padrão foi feita utilizando-se BSA (albumina de soro bovina) em diferentes concentrações (0,6µg/µL - 20 µg/µL) preparada com o mesmo tampão das proteínas a serem quantificadas.

### 3.17 Estratégia para a mutagênese dos genes *fnr* de *H. seropedicae*

Visando a caracterização do fenótipo *fnr*- em *H. seropedicae*, por meio da perda da função das proteínas codificadas por estes genes, foi realizada a deleção do domínio central das três proteínas FNR como esquematizado na figura 10. Neste domínio estão inclusas regiões importantes para o funcionamento da proteína, como a hélice de dimerização e uma das cisteínas importantes para a ligação do cluster  $[4Fe-4S]^{2+}$ .

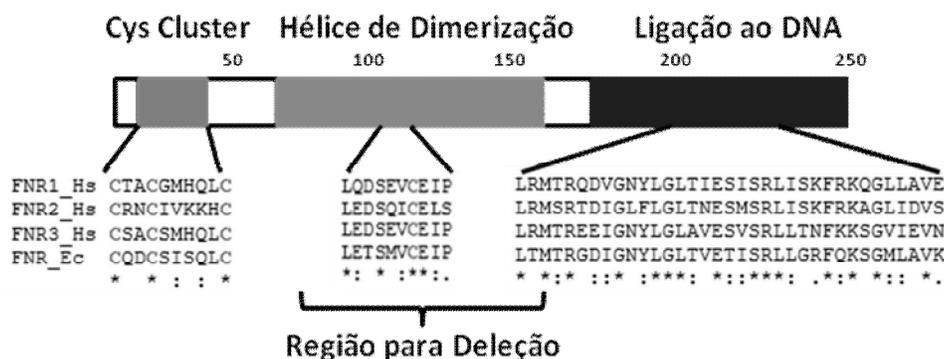


Figura 10 – Representação esquemática dos domínios das proteínas FNR, com indicação da região deletada.

A estratégia de deleção foi escolhida para realização da mutagênese dos genes *fnr*<sub>1</sub>, *fnr*<sub>2</sub> e *fnr*<sub>3</sub> de *H. seropedicae*, pois favorece a construção de mutantes duplos para os genes *fnr* (nas três combinações possíveis) e também a construção do mutante para os três genes *fnr*.

Regiões a montante e a jusante (aproximadamente 300 pb) da região codificadora do genes *fnr* e um marcador de seleção negativa foram adicionados ao vetor empregado na mutagênese. A inclusão destas regiões, teve como objetivo aumentar o grau de homologia entre o vetor construído e o genoma de *H. seropedicae*, favorecendo desta forma a recombinação homóloga. Já o marcador de seleção possibilitará o uso de uma pressão de seleção negativa para isolamento de transformantes que tenham integrado o gene mutado em seu genoma e perdido o restante do vetor.

Um marcador de seleção negativa bastante utilizado é o gene *sacB* isolado de *Bacillus subtilis* por Philippe Gay e colaboradores em 1983. A

expressão deste gene é letal para *H. seropedicae* na presença de sacarose no meio de cultura. A levano-sucrase codificada por este gene de *B. subtilis*, catalisa a formação de polímeros de frutose no envelope celular que são em seguida liberadas para o meio de cultura. Em bactérias gram-negativas onde o envelope celular compreende uma membrana externa e um espaço periplasmático, a expressão do gene *sacB*, na presença de sacarose, leva ao acúmulo de polímeros de frutose no espaço periplasmático resultando na lise da célula bacteriana (STEINMETZ *et al.*, 1983).

O cassete contendo o gene *sacB* também inclui um gene de resistência a canamicina (cassete *nptI-sacR-sacB*), e foi obtido a partir do vetor pMH1701 (HYNES *et al.*, 1989). O gene de resistência a antibiótico auxilia na seleção das bactérias que tenham tido a integração do vetor ao DNA cromossomal.

Em resumo, depois da construção do vetor e transformação deste, as estirpes bacterianas resistentes ao antibiótico foram selecionadas em placas com meio adequado, porém, em um primeiro momento, sem sacarose.

Teoricamente dois eventos genéticos poderiam ter ocorrido:

1° Recombinação homóloga simples entre o gene deletado e o gene selvagem, levando a inserção do vetor inteiro no locus gênico alvo;

2° Recombinação inespecífica levando a inserção do vetor inteiro em um locus gênico não homólogo.

A ocorrência do primeiro evento genético citado foi confirmada através da detecção de duas cópias do gene alvo em uma PCR, ou seja, uma cópia selvagem e outra cópia deletada. Após a identificação deste evento, a estirpe isolada foi cultivada em meio contendo sacarose, para seleção negativa das estirpes em que o segundo evento de recombinação tenha ocorrido. De modo geral a figura 11 ilustra a estratégia utilizada.

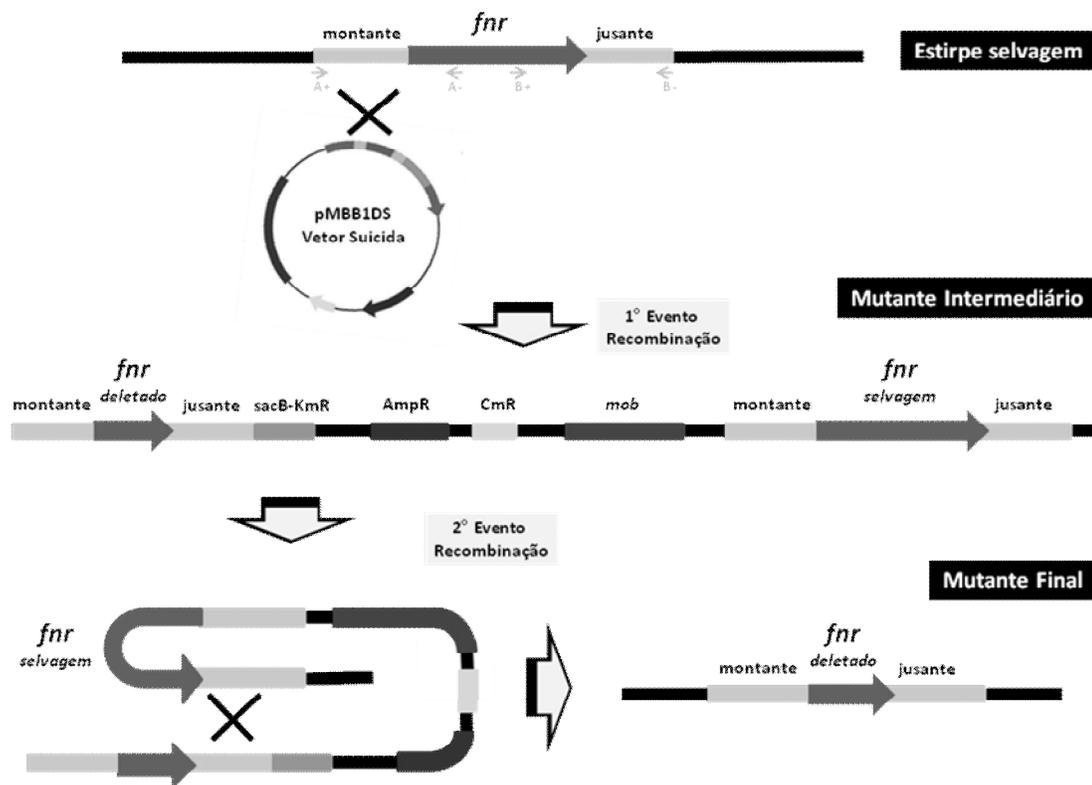


Figura 11 – Representação esquemática da estratégia de substituição gênica para mutagênese dos genes *fnr*. O fragmento de DNA contendo o gene *fnr* deletado é transferido do vetor para a região homóloga alvo no genoma de *H. seropedicae*. A transferência ocorre em duas etapas, primeiramente o vetor inteiro integra-se à região homóloga alvo, durante o primeiro evento de recombinação. No segundo evento de recombinação o vetor é eliminado, permanecendo apenas a cópia deletada do gene *fnr*. A recombinação homóloga é catalisada pela maquinaria de recombinação da célula hospedeira.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção dos plasmídeos mutagênicos pMBB1DS, pMBB2DS e pMBB3DS

Para a execução da estratégia mutagênica descrita no Item 3.17, posteriormente à análise da região genômica de interesse, planejamento e síntese dos oligonucleotídeos indicados na Figura 9, iniciou-se as etapas de clonagem e subclonagem para construção dos plasmídeos contendo as cópias deletadas dos três genes *fnr* de *H. seropedicae*. Os fragmentos da região A e a região B indicados na figura 9, após amplificação por PCR, foram clonados no vetor pTZ57R/T (FERMENTAS) dando origem aos plasmídeos pTZfnrA e pTZfnrB, respectivamente, para cada gene *fnr*. (Figuras 12 e 13).

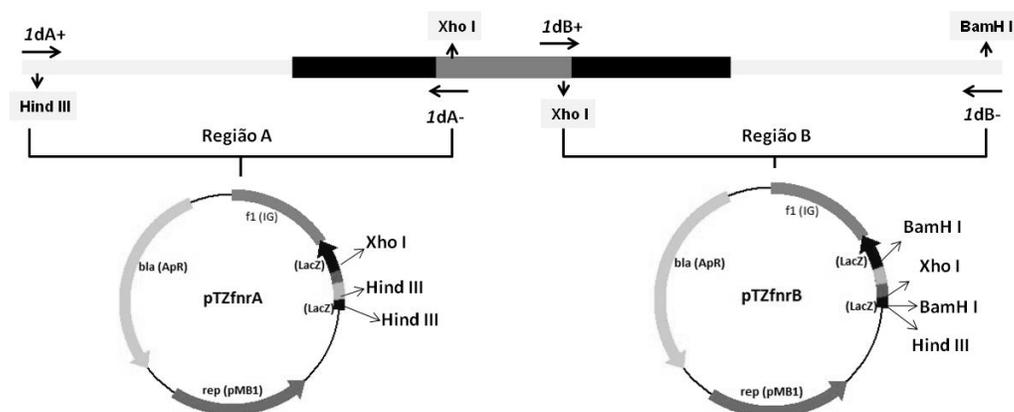
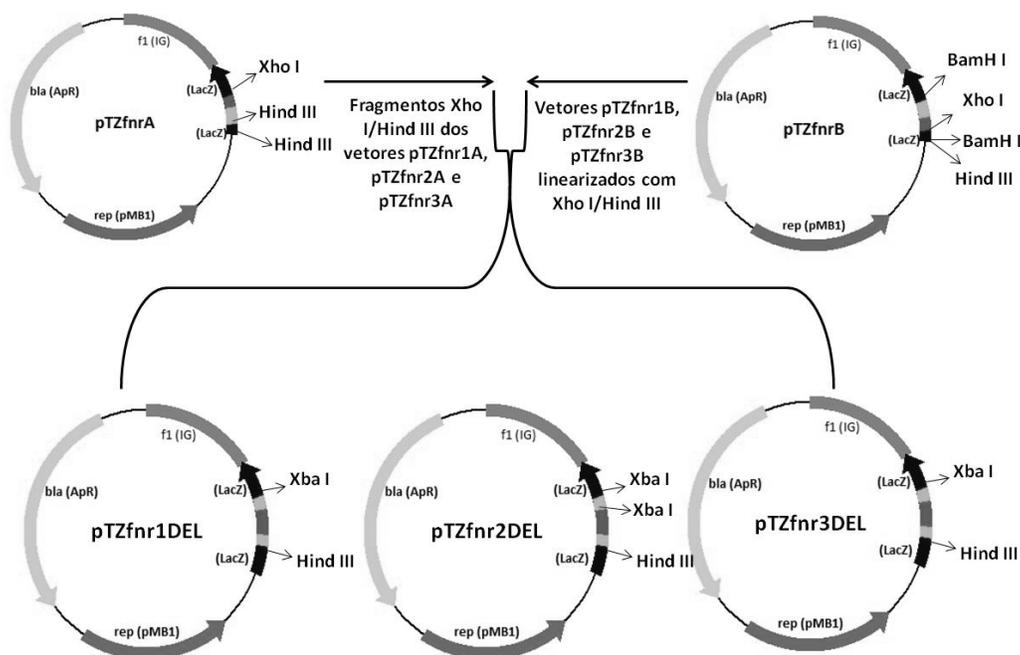


Figura 12 – Esquema geral da região dos genes *fnr*<sub>1</sub>, *fnr*<sub>2</sub> e *fnr*<sub>3</sub> utilizadas para a construção dos plasmídeos contendo deleções nestes genes. Os oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação dos fragmentos indicados estão representados por setas, seguidas da denominação e dos sítios de restrição inseridos em tais oligonucleotídeos. As regiões em preto e em cinza escuro correspondem à região codificadora dos genes *fnr*, sendo a região em cinza escuro correspondente a região central a ser deletada. A região em cinza claro corresponde aos cerca de 300 pb a montante e também a jusante da região codificadora dos genes *fnr*. Sítios de restrição de interesse, no vetor e nos fragmentos, estão indicados.

A confirmação da clonagem e da orientação dos insertos nos plasmídeos pTZfnrA e pTZfnrB foi feita utilizando-se as enzimas HindIII e BamHI. Sítios de restrição para essas enzimas estavam presentes tanto no vetor (pTZ57R) quanto no inserto (Figura 12). A digestão do plasmídeo pTZfnrA com HindIII, contendo o inserto fnrA na orientação correta, gera uma banda única de aproximadamente 3300 pb. Já para o plasmídeo pTZfnrB, contendo o inserto fnrB na orientação correta, a digestão com BamHI gera duas bandas, uma correspondente ao o inserto fnrB de aproximadamente 500 pb mais o vetor pTZ57R de aproximadamente 2800 pb.

Após a confirmação dos clones, o fragmento XhoI e HindIII, de aproximadamente 500 pb do vetor pTZfnrA, foi ligado ao plasmídeo pTZfnrB, linearizado com as mesmas enzimas, dando origem aos plasmídeos pTZfnr1DEL, pTZfnr2DEL e pTZfnr3DEL como esquematizado na figura 13.



**Figura 13 – Esquema da estratégia utilizada para obtenção dos vetores contendo os genes *fnr* deletados. Sítios de restrição de interesse, no vetor e nos fragmentos, estão indicados.**

A obtenção dos plasmídeos pTZfnr1DEL, pTZfnr2DEL e pTZfnr3DEL foi confirmada através da análise de restrição com as enzimas XbaI e HindIII.

O perfil de restrição dos plasmídeos pTZfnr1DEL e pTZfnr3DEL continha duas bandas, uma entre 2500 e 3000 pb correspondente ao vetor pTZ57R e outra de aproximadamente 1000 pb correspondente aos genes *fnr1* e *fnr3* deletados juntamente com as regiões a montante e jusante. Já o padrão de restrição do plasmídeo pTZfnr2DEL mostrou três bandas. Uma entre 2500 e 3000 pb correspondente ao vetor pTZ57R, uma próxima de 1000 pb correspondente ao fragmento XbaI/HindIII e outra entre 250 e 500 pb correspondente ao fragmento XbaI/XbaI. As análises de restrição descritas acima estão representadas na figura 14.

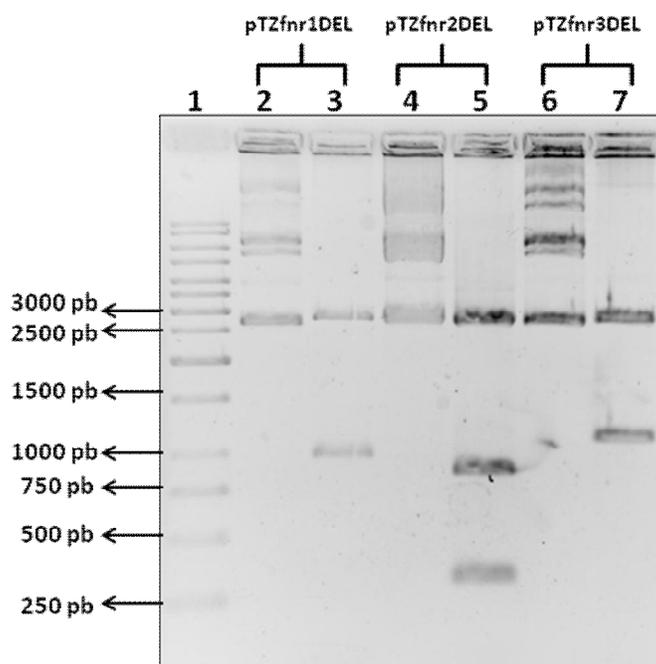
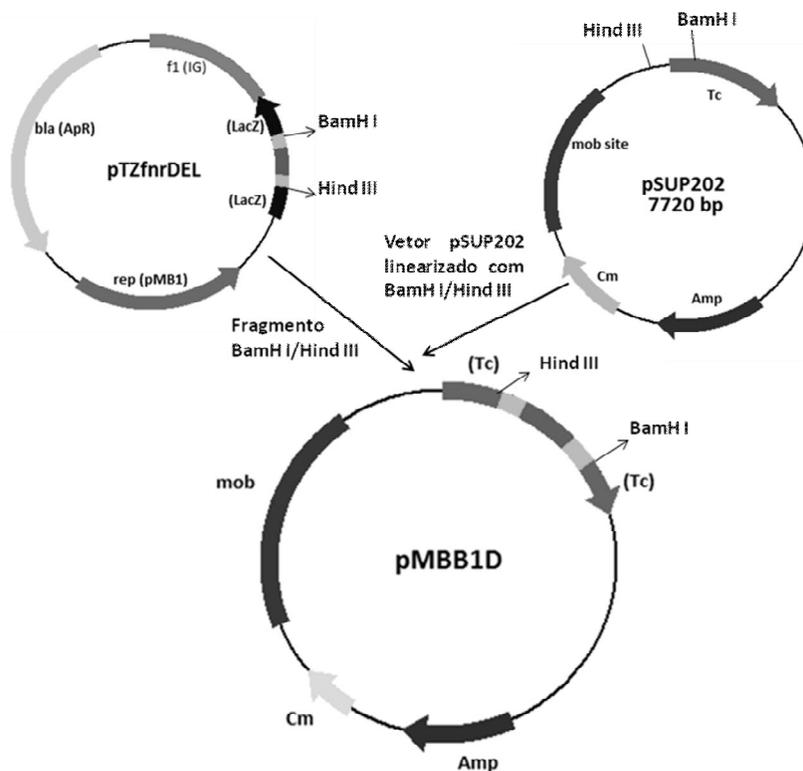


Figura 14 – Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, da análise de restrição com as enzimas XbaI e HindIII para confirmação da obtenção dos plasmídeos pTZfnr1DEL, pTZfnr2DEL e pTZfnr3DEL. Linha 1, 1 Kb ladder (Fermentas); linhas pares, plasmídeos íntegros; linhas ímpares, plasmídeos digeridos enzimaticamente.

Após o sequenciamento dos plasmídeos pTZfnr1DEL, pTZfnr2DEL e pTZfnr3DEL, para verificação da integridade de seus insertos, tais plasmídeos foram utilizados para a transferência da cópia deletada dos genes *fnr* para o vetor suicida pSUP202. Os fragmentos BamHI e HindIII provenientes dos plasmídeos pTZfnr1DEL, pTZfnr2DEL e pTZfnr3DEL, foram então subclonados

no vetor pSUP202, linearizado com as mesmas enzimas. Assim obteve-se os plasmídeos pMBB1D, pMBB2D e pMBB3D. A figura 15 apresenta um esquema desta subclonagem.



**Figura 15 – Esquema da estratégia utilizada para transferência dos fragmentos deletados dos genes *fnr* do vetor derivado do pTZ57R para o vetor suicida pSUP202, dando origem ao vetor pMBB1D, pMBB2D e pMBB3D. Sítios de restrição de interesse nos vetores e nos fragmentos estão indicados.**

A obtenção dos plasmídeos pMBB1D, pMBB2D e pMBB3D foi confirmada através da análise de restrição com as enzimas HindIII e BamHI, representada na figura 16. Os perfis de restrição dos plasmídeos pMBB1D, pMBB2D e pMBB3D, mostraram um padrão de duas bandas, sendo a de maior peso molecular equivalente ao vetor e a segunda, de menor peso molecular, equivalente aos genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3* deletados mais as regiões a montante e jusante, respectivamente, incluídas no plasmídeo (Figura 16).

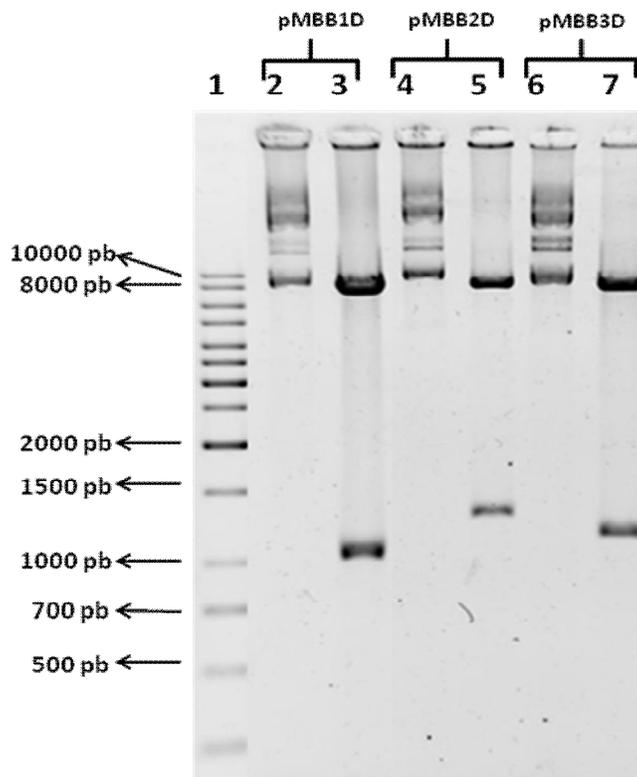


Figura 16 – Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, da restrição com as enzimas HindIII (H) e BamHI (B) para análise e confirmação da subclonagem dos fragmentos *fnr* deletados, retirado dos vetores pTZfnr1DEL, pTZfnr2DEL e pTZfnr3DEL, no vetor pSUP202. Linha 1, 1 Kb Ladder (Axygen); linhas pares, plasmídeos íntegros; linhas ímpares, plasmídeos tratados enzimaticamente.

Os plasmídeos pMBB1D, pMBB2D e pMBB3D foram então linearizados com a enzima BamHI e ligados ao cassete SacB-Km<sup>R</sup>, proveniente do vetor pMH1701 (digerido com a mesma enzima) de acordo com o esquematizado na figura 17, para dar origem aos plasmídeos pMBB1DS, pMBB2DS e pMBB3DS.

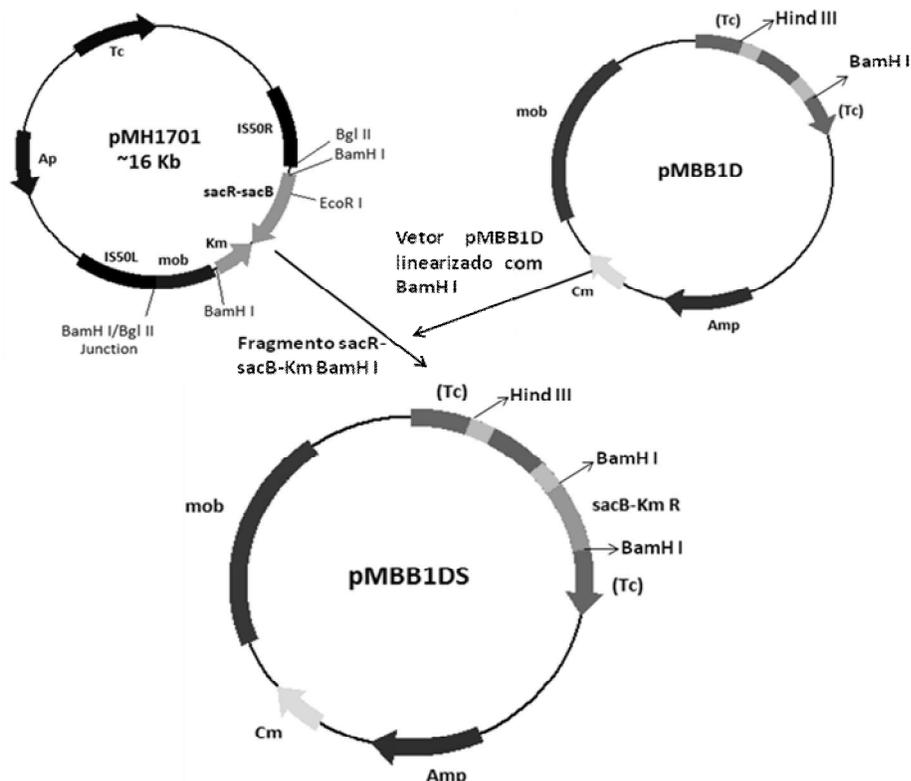


Figura 17 – Esquema da estratégia utilizada para transferência do cassete SacB-KmR para os vetores pMBB1D, pMBB2D e pMBB3D, dando origem aos vetores pMBB1DS, pMBB2DS e pMBB3DS. Sítios de restrição de interesse nos vetores e nos fragmentos estão indicados.

A obtenção dos plasmídeos pMBB1DS, pMBB2DS e pMBB3DS também foi confirmada através da análise de restrição com as enzimas HindIII e BamHI, mostrada na figura 18. Os perfis de restrição dos plasmídeos pMBB1DS, pMBB2DS e pMBB3DS correspondem, respectivamente, a soma dos perfis dos plasmídeos pMBB1D, pMBB2D e pMBB3D (Figura 17), mais o perfil de restrição do cassete SacB-Km<sup>R</sup> digerido com as mesmas enzimas (linha 2 da figura 18).

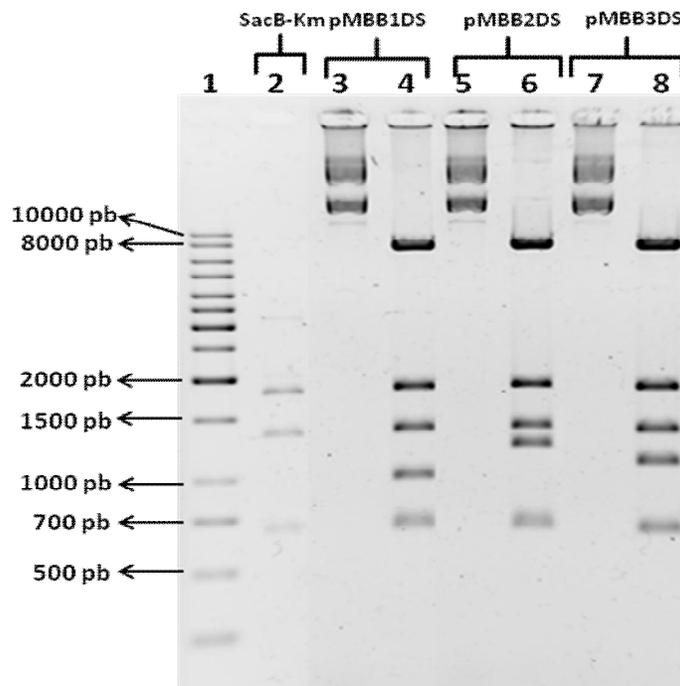


Figura 18 – Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, da restrição com as enzimas HindIII e BamHI para análise e confirmação da subclonagem do cassete SacB-KmR para os vetores pMBB1D, pMBB2D e pMBB3D, dando origem aos vetores pMBB1DS, pMBB2DS e pMBB3DS. Linha 1, 1 Kb ladder (Axygen); Linha 2, SacB-Km<sup>R</sup> tratado com as enzimas HindIII e BamHI; linhas ímpares, plasmídeos íntegros; linhas pares (exceto 2), plasmídeos tratados enzimaticamente.

Os plasmídeos pMBB1DS, pMBB2DS e pMBB3DS foram transferidos para *H. seropedicae* por conjugação para a construção das estirpes mutantes nos três genes *fnr* de *H. seropedicae*.

#### 4.2 Obtenção de fusões transcricionais das regiões promotoras dos genes *fnr*<sub>1</sub>, *fnr*<sub>2</sub>, *fnr*<sub>3</sub>, e dos operons *fixNOQP* e *hemNHs\_3206fixIS* de *H. seropedicae*

Visando-se a determinação do padrão de expressão dos genes *fnr* e também a busca de um fenótipo para mutantes *fnr* foi realizada a construção das fusões transcricionais *pfnr*<sub>1</sub>::*lacZ*, *pfnr*<sub>2</sub>::*lacZ*, *pfnr*<sub>3</sub>::*lacZ*, *pfixN*::*lacZ* e *phemN*::*lacZ* contendo as regiões promotoras dos genes *fnr*<sub>1</sub>, *fnr*<sub>2</sub>, *fnr*<sub>3</sub>, *fixN* e *hemN*. Estas regiões promotoras foram amplificadas por PCR, utilizando-se nucleotídeos contendo os sítios de restrição PstI e BglII, como esquematizado na figura 16 e então clonadas no vetor pTZ57R/T (FERMENTAS) dando origem aos plasmídeos pTZ1, pTZ2, pTZ3, pTZFN e pTZHN.

Os fragmentos de DNA correspondentes as regiões promotoras dos genes *fnr*<sub>1</sub>, *fnr*<sub>2</sub>, *fnr*<sub>3</sub>, *fixN* e *hemN* foram então subclonados no vetor de fusão pMP220 nos sítios das enzimas PstI e BglII (Figura 19), dando origem aos plasmídeos pMP1, pMP2, pMP3, pMPPFN e pMPPHN.

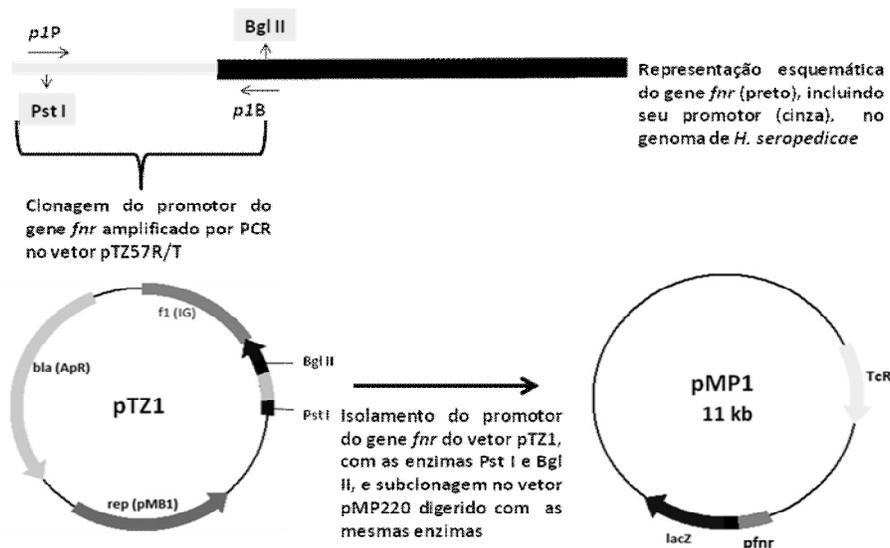


Figura 19 – Esquema da estratégia utilizada para a clonagem das regiões promotoras dos genes *fnr* no vetor pTZ57R/T seguido de sua subclonagem no vetor pMP220, dando origem aos plasmídeos pMP1, pMP2, pMP3, pMPPFN e pMPPHN. Os oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação dos fragmentos indicados estão representados como setas, juntamente com sua denominação. Os sítios de restrição inseridos nos oligonucleotídeos estão indicados.

A obtenção das fusões da região promotora dos genes *fnr<sub>1</sub>*, *fnr<sub>2</sub>*, *fnr<sub>3</sub>* e dos operons *fixNOQP* e *hemNHs\_3206fixIS* com o gene repórter *lacZ* foi confirmada através de reações de PCR, utilizando-se pares de oligonucleotídeos específicos para cada inserto (*p1P/p1B*, *p2P/p2B*, *p3P/p3B*, *pFNP/pFNB* e *pHNP/pHNB*, descritos no item 3.13) e também pares de nucleotídeos que anelam no vetor de fusão transcricional cedidos pela Prof<sup>a</sup> Roseli Wassem, denominados *pmp220for* (5' GCTCACCCCAAAAATGGCA3') e *lacZrev* (5' GCAAGGCGATTAAGTTGGGT3'). Os resultados das análises para a confirmação da obtenção das fusões estão apresentados nas figuras 20 e 21.

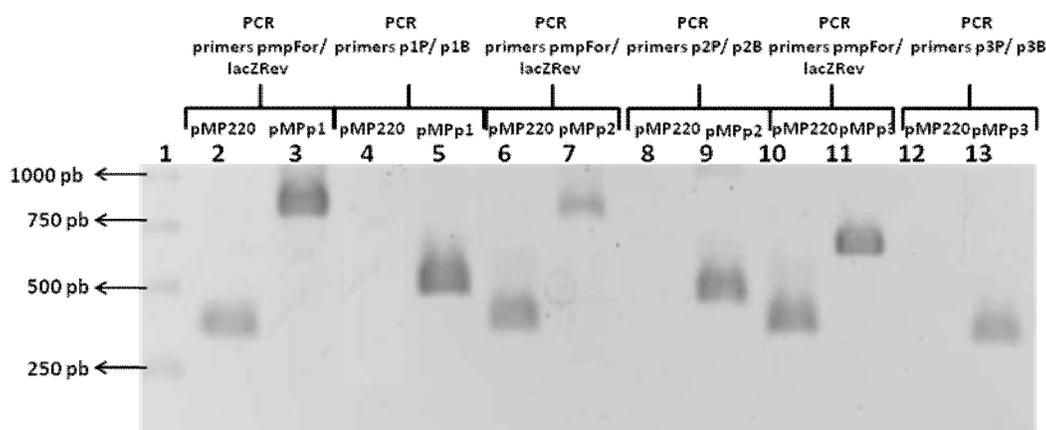


Figura 20 - Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, das reações de PCR para a confirmação da obtenção das fusões *fnr<sub>1</sub>::lacZ*, *fnr<sub>2</sub>::lacZ* e *fnr<sub>3</sub>::lacZ*. As reações foram feitas utilizando como DNA molde os plasmídeos pMP1, pMP2 e pMP3 diluídos em H<sub>2</sub>O na proporção de 1/10. Linhas: 1, 1 Kb Ladder (Fermentas); Linhas pares, PCR controle utilizando como DNA molde o plasmídeo pMP220; sendo que nas linhas 2, 6 e 10 foram utilizados os oligonucleotídeos que anelam no vetor, já nas linhas 4, 8, 12 foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para os insertos; Linhas ímpares, PCR utilizando os plasmídeos pMP1 (linhas 3 e 5), pMP2 (linhas 7 e 9) e pMP3 (linhas 11 e 13). Para facilitar a visualização, os plasmídeos usados como molde nas reações de PCR, bem como os pares de oligonucleotídeos utilizados, estão indicados acima das linhas.

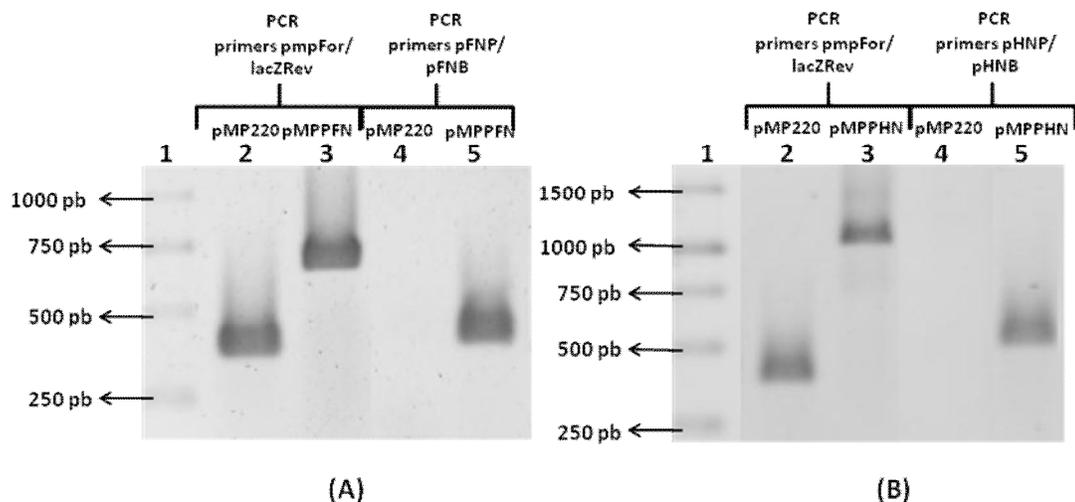


Figura 21 - Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, das reações de PCR realizadas para a confirmação da obtenção da fusão *fixN::lacZ* (A) e da fusão *phemN::lacZ* (B). As reações foram feitas utilizando como DNA molde os plasmídeos pMPPFN (A) e pMPPHN (B) diluídos em H<sub>2</sub>O na proporção de 1/10. Linhas em A e B: 1, 1 Kb Ladder (Fermentas); Linhas pares, PCR controle utilizando-se como DNA molde o plasmídeo pMP220; sendo que nas linhas 2 em A e B foram utilizados oligonucleotídeos que anelam no vetor, já nas linhas 4 em A e B foram utilizados pares de oligonucleotídeos específicos para o inserto; Linhas ímpares, PCR utilizando-se o plasmídeo pMPPFN (linhas 3 e 5 em A) e o plasmídeo pMPPHN (linhas 3 e 5 em B). Para facilitar a visualização, os plasmídeos usados como molde nas reações de PCR, bem como os pares de oligonucleotídeos utilizados, estão indicados acima das linhas.

A obtenção destes plasmídeos, a orientação da região promotora, em relação ao gene repórter *lacZ*, e a integridade das sequências foram verificadas através de sequenciamento de DNA, item 3.12.

#### 4.3 Construção das estirpes mutantes de *H. seropedicae* nos genes *fnr*<sub>1</sub>, *fnr*<sub>2</sub> e *fnr*<sub>3</sub>

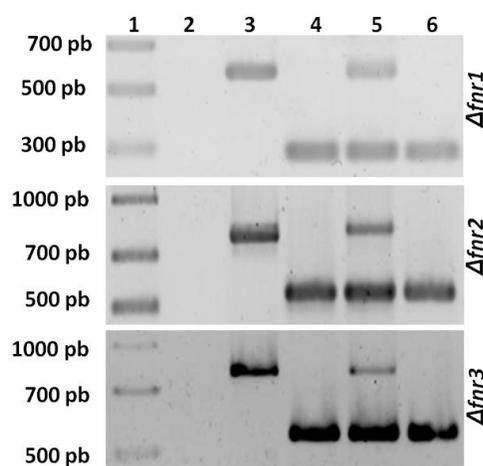
Visando a caracterização do fenótipo *fnr*- em *H. seropedicae*, foi realizada a deleção da região codificadora para o domínio central das três proteínas FNR como apresentado em Material e Métodos, item 3.17. Neste domínio estão inclusas regiões importantes para o funcionamento da proteína, como a hélice de dimerização e uma das cisteínas importantes para a ligação do cluster [4Fe-4S]<sup>2+</sup>. Para a obtenção das estirpes mutantes nos genes *fnr*<sub>1</sub>, *fnr*<sub>2</sub> e *fnr*<sub>3</sub>, os plasmídeos mutagênicos pMBB1DS, pMBB2DS e pMBB3DS foram transformados na estirpe S17.1 de *E. coli*, como descrito no Item 3.7. Após a transformação uma colônia isolada foi usada para a conjugação com a estirpe SMR1 de *H. seropedicae*, como descrito no Item 3.8.

Os transconjugantes resistentes a cloranfenicol 100µg/mL e canamicina 500µg/mL, foram analisados quanto a ocorrência da recombinação homóloga simples (inserção do vetor suicida ao genoma de *H. seropedicae*) através de uma reação de PCR. A eletroforese dos produtos de PCR mostrou dois fragmentos, um referente a cópia selvagem do gene e outra referente a cópia deletada do gene. Após esta confirmação, no mínimo três colônias transconjugantes para o primeiro evento de recombinação, ou seja simples recombinantes, foram individualmente inoculadas em meio Nfb-MalatoHPN líquido sem adição de antibióticos e incubado a 30°C e 120 rpm durante a noite.

Após este período de incubação, 100 a 200 µL da cultura saturada foi então plaqueada em meio NfbMalatoLPN contendo 5% de sacarose e estreptomicina na concentração de 80µg/mL. Após incubação por aproximadamente 48 horas a 30°C, foram isolados transconjugantes nos genes *fnr* que sofreram o segundo evento de recombinação, ou seja, os que eliminaram as seqüências referentes ao vetor suicida integrado ao genoma no primeiro evento de recombinação. Para confirmação de tal evento, as colônias isoladas obtidas foram submetidas à seleção quanto a sensibilidade aos antibióticos cloranfenicol e canamicina nas concentrações de 100 e 500 µg/mL respectivamente, e em seguida 10 a 200 colônias isoladas sensíveis a tais

antibióticos foram analisadas por PCR, para a confirmação da ocorrência da deleção dos genes *fnr* nos possíveis transconjugantes duplos recombinantes isolados.

Para a confirmação da deleção ou genotipagem dos mutantes nos genes *fnr* foram utilizados os pares de oligonucleotídeos listados na tabela 8 (Item 3.13). O resultado das reações de PCR, confirmando a obtenção das estirpes mutantes para os genes *fnr*<sub>1</sub>, *fnr*<sub>2</sub> e *fnr*<sub>3</sub> está apresentado a seguir na figura 22. Os mutantes duplos e triplos para os genes *fnr* foram obtidos da mesma forma como descrito para os mutantes simples. A confirmação dos mesmos também foi feita por PCR, e estão demonstradas nas figuras 23 e 24.



**Figura 22** – Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, das reações de PCR realizadas para a genotipagem dos mutantes de *H. seropedicae* SMR1 nos genes *fnr*<sub>1</sub>, *fnr*<sub>2</sub> e *fnr*<sub>3</sub> (como indicado de cima para baixo). Linhas: 1, 1 Kb ladder Axygen; 2, PCR controle sem adição de DNA molde; 3, PCR com DNA da estirpe SMR1 como molde; 4, PCR com os vetores suicidas (pMBB1DS, pMBB2DS ou pMBB3DS) como molde; 5, PCR com DNA das estirpes isoladas após o 1º evento recombinação; 6, PCR com DNA da estirpe mutante com genes *fnr* deletados (MBFNR1 ( $\Delta fnr1$ ), MBFNR2 ( $\Delta fnr2$ ) ou MBFNR3 ( $\Delta fnr3$ )). Os oligonucleotídeos utilizados para a genotipagem foram 1F/1R, 2pN/2Pb e 3pN/3pB para as estirpes MBFNR1, MBFNR2 e MBFNR3, respectivamente.

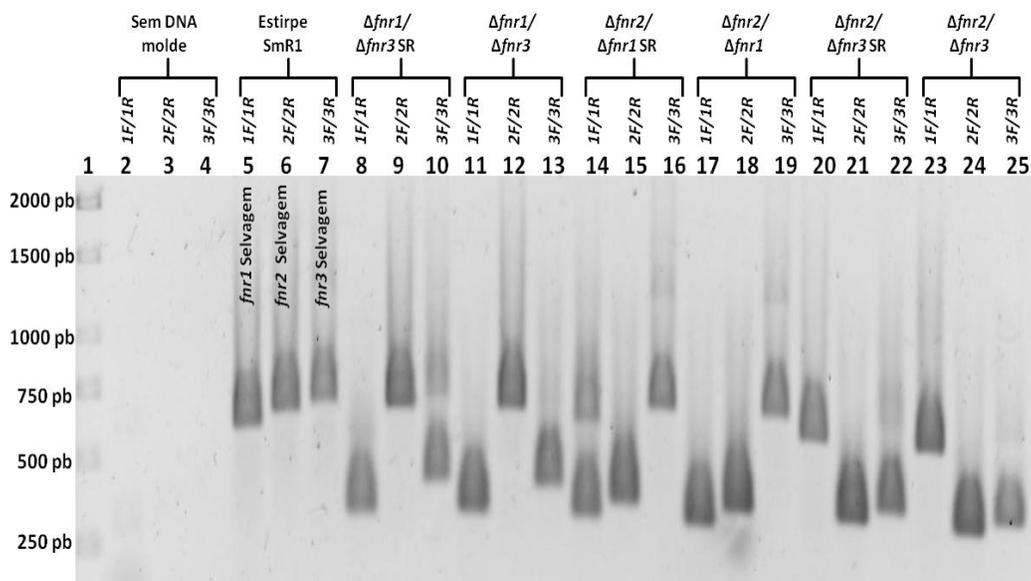


Figura 23 – Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, das reações de PCR realizadas para a genotipagem dos mutantes duplos de *H. seropedicae* SMR1 nos genes *fnr<sub>1</sub>/fnr<sub>3</sub>*, *fnr<sub>2</sub>/fnr<sub>1</sub>* e *fnr<sub>2</sub>/fnr<sub>3</sub>* (como indicado no topo da figura). Linhas: 1, 1 Kb ladder Axygen; 2, 3 e 4, PCR controle sem adição de DNA molde; 5, 6 e 7, PCR controle com DNA da estirpe parental SMR1 como molde; 8, 9 e 10, duplo mutante *fnr<sub>1</sub>/fnr<sub>3</sub>* intermediário (1º evento recombinação); 11, 12 e 13, duplo mutante *fnr<sub>1</sub>/fnr<sub>3</sub>* final (MBFNR1/3); 14, 15 e 16, duplo mutante *fnr<sub>2</sub>/fnr<sub>1</sub>* intermediário (1º evento recombinação); 17, 18 e 19, duplo mutante *fnr<sub>2</sub>/fnr<sub>1</sub>* final (MBFNR2/1); 20, 21 e 22, duplo mutante *fnr<sub>2</sub>/fnr<sub>3</sub>* intermediário (1º evento recombinação); 23, 24 e 25, duplo mutante *fnr<sub>2</sub>/fnr<sub>3</sub>* final (MBFNR2/3). Sigla SR denota as estirpes isoladas no 1º evento de recombinação. Os oligonucleotídeos utilizados em cada reação de PCR estão assinalados acima das linhas e ainda estão descritos no item 3.13.

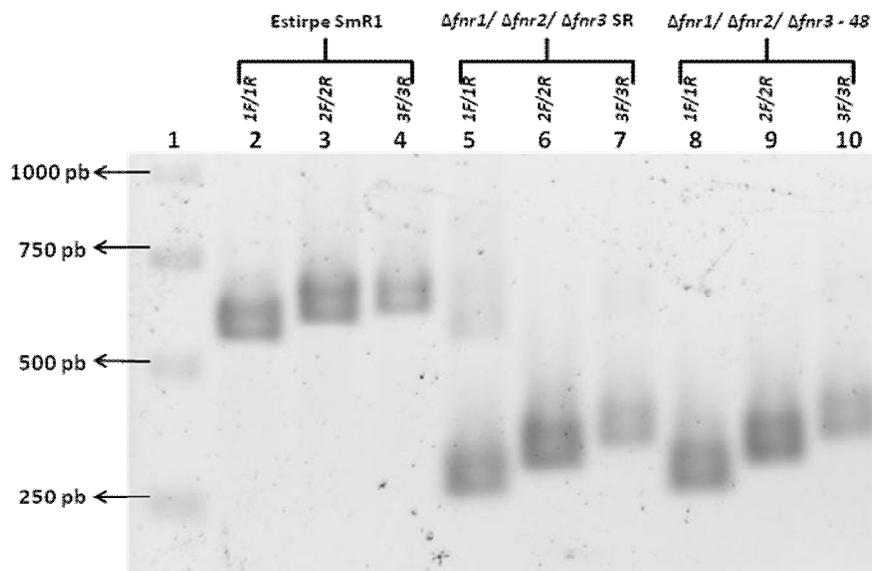


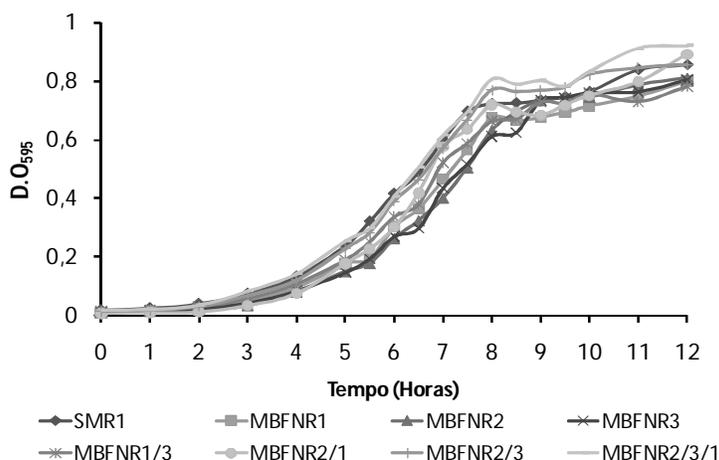
Figura 24 – Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TBE 1X, das reações de PCR realizadas para a genotipagem dos mutantes de *H. seropedicae* SMR1 nos genes *fnr*<sub>1</sub>, *fnr*<sub>2</sub> e *fnr*<sub>3</sub> (como indicado no topo da figura). Linhas: MW, 1 Kb ladder Axygen; 2, 3 e 4, PCR controle com a estirpe parental SMR1; 5, 6 e 7, triplo mutante *fnr*<sub>2</sub>/*fnr*<sub>3</sub>/*fnr*<sub>1</sub> intermediário (1º evento recombinação); 8, 9 e 10, triplo mutante *fnr*<sub>2</sub>/*fnr*<sub>3</sub>/*fnr*<sub>1</sub> final (MBFNR2/3/1). Sigla SR denota a estirpe isolada no 1º evento de recombinação. Os oligonucleotídeos utilizados em cada reação de PCR estão assinalados acima das linhas e ainda estão descritos no item 3.13.

Por fim, todas as estirpes mutantes isoladas também tiveram o perfil de ARDRA (CRUZ *et al.*, 2001), com a enzima Hae III, comparado com o perfil de ARDRA da estirpe parental SmR1, para confirmação de que a estirpe mutante isolada era realmente derivada da estirpe parental SMR1 de *H. seropedicae* (Não mostrado).

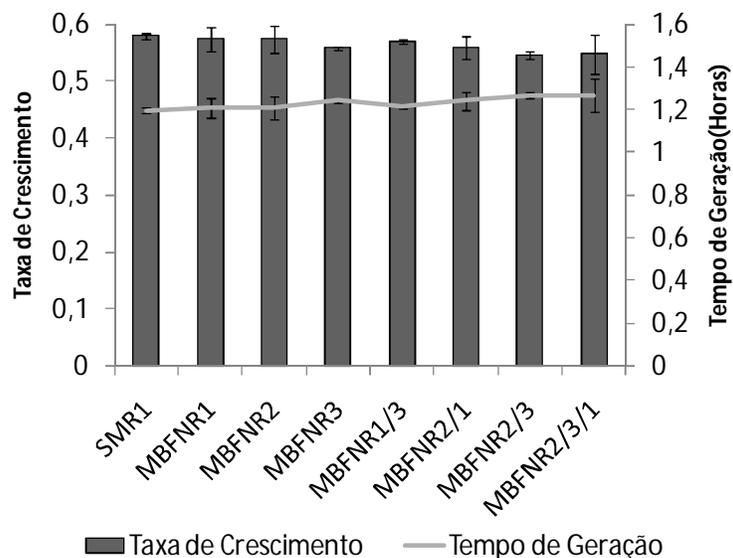
#### 4.4 Caracterização fisiológica das estirpes mutantes simples, duplos e triplo para os genes *fnr*<sub>1</sub>, *fnr*<sub>2</sub> e *fnr*<sub>3</sub> de *H. seropedicae*

##### 4.4.1 Caracterização do perfil de crescimento

Visando a caracterização das estirpes mutantes *fnr* construídas durante esta dissertação, o perfil de crescimento de todas as estirpes mutantes MBFNR1, MBFNR2, MBFNR3, MBFNR1/3, MBFNR2/1, MBFNR2/3 e MBFNR2/3/1 de *H. seropedicae* foi obtido e comparado com a estirpe parental SMR1. Na figura 25 estão demonstrados os perfis de crescimento em 20mM de NH<sub>4</sub>Cl das estirpes parental e mutantes nos genes *fnr*. Comparando esses perfis e também os parâmetros cinéticos de crescimento (Figura 26) durante a fase exponencial, pode-se sugerir que não houve alteração no crescimento destas estirpes. Também não foi observado alteração no perfil de crescimento entre as estirpes quando 10mM de KNO<sub>3</sub> foram utilizados como fonte de nitrogênio (não mostrado). Estes resultados indicam que os genes *fnr* não estão envolvidos com utilização de nitrato e de íons amônio como fonte de nitrogênio.

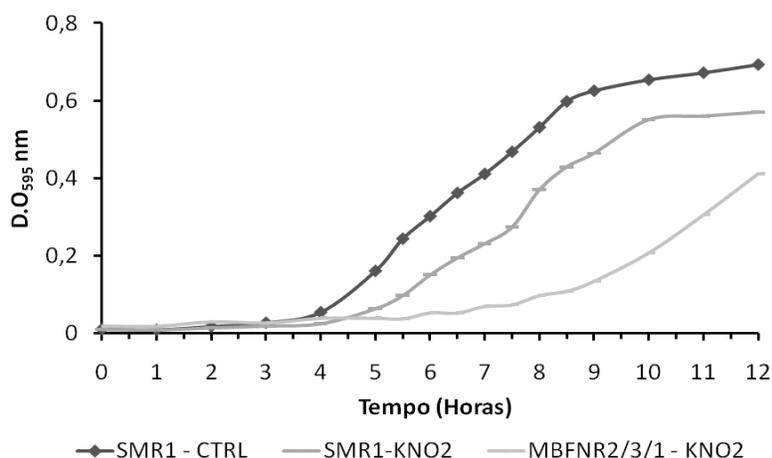


**Figura 25 – Perfil de crescimento das diferentes estirpes de *H. seropedicae* mutantes nos genes *fnr* em comparação com a estirpe parental SMR1. O crescimento das culturas foi acompanhado através da determinação da densidade ótica, a um comprimento de onda de 595nm, das culturas durante o tempo. A  $D.O_{595}$  para o início do ensaio era de 0,01, aproximadamente. No gráfico está demonstrado o perfil de crescimento representativo de dois experimentos independentes realizados em duplicata.**



**Figura 26 – Representação gráfica de dois parâmetros cinéticos do crescimento bacteriano, taxa de crescimento e do tempo geração, determinados durante a fase de crescimento exponencial das estirpes de *H. seropedicae* mutantes nos genes *fnr* em comparação com a estirpe parental SMR1. Tais parâmetros foram calculados a partir dos pontos tomados durante a realização da curva de crescimento apresentada na figura 22 utilizando-se as equações apresentadas no item 3.5. Os parâmetros foram calculados a partir dos dados de crescimento retirados de dois ensaios realizados em duplicata. Os desvios padrão estão indicados, porém em alguns pontos são tão pequenos que não podem ser vistos na escala apresentada.**

Quando as estirpes mutantes e parental foram cultivadas em meio NfbHPN-Malato contendo  $\text{KNO}_2$  na concentração de 1mM, como fonte geradora de espécies reativas de nitrogênio, um fenótipo diferenciado foi encontrado. A estirpe MBFNR2/3/1, apresentou uma fase lag de mais de 8 horas, e somente após este longo período de latência, a estirpe ingressou na fase exponencial atingindo a fase estacionária em cerca de 16 horas (não mostrado) (Figura 27).



**Figura 27 – Perfil de crescimento das diferentes estirpes de *H. seropedicae* mutantes nos genes *fnr* em comparação com a estirpe parental SMR1, em meio Nfb-MalatoHPN contendo 1mM de KNO<sub>2</sub>. O crescimento das culturas foi acompanhado através da determinação da densidade ótica, a um comprimento de onda de 595nm, das culturas durante o tempo. A D.O<sub>595</sub> para o início do ensaio era de 0,01, aproximadamente. No gráfico está demonstrado o perfil de crescimento representativo de dois experimentos independentes realizados em duplicata.**

Esses resultados sugerem que os genes *fnr* em *H. seropedicae* devem ter algum papel no processo de detoxificação celular, relacionado a espécies reativas de nitrogênio. Constantinidou e colaboradores (2006) mostraram que em *E. coli* a proteína FNR pode estar envolvida no metabolismo de espécies reativas de nitrogênio (RNS). Por meio de análises de microarranjo, estes autores demonstraram que diferentes grupos de genes são regulados por FNR na presença de nitrito e ou nitrato. Destes genes, dois grupos são ativados por FNR, enquanto outros dois são reprimidos (CONSTANTINIDOU, *et al* 2006). Dentre os genes ativados por FNR, estão os genes *nrfA* e *nirBD* que codificam para duas nitrito redutases, HADH-dependentes, periplasmática e citoplasmática, respectivamente. Em *E. coli* a expressão dos dois genes é complementar, pois em baixas concentrações de nitrato NrfA é expressa, enquanto que em altas concentrações NirB/NirD são expressas quase exclusivamente. Já em níveis intermediários de nitrato, as três são expressas. Estes genes também podem ser induzidos por nitrito, porém a formação das duas enzimas é duas ordens de magnitude menor, em resposta a nitrito do que

em resposta a nitrato (WANG & GUNSALUS, 2000). A transcrição do gene *nirB* é ativada por NarL e NarP. Devido a incapacidade de gerar um gradiente de prótons, acredita-se que a proteína NirB possui um provável papel na detoxificação do nitrito (JACKSON, CORNISH-BOWDEN & COLE, 1981; McDONALD & COLE, 1985; CAMMACK *et al* 1982).

Em *H. seropedicae* as proteínas FNR podem estar envolvidas no mecanismo de resposta a detoxificação de espécies reativas de nitrogênio (RNS) como o proposto para *E. coli*, tendo em vista que foi observado que o mutante triplo para os genes *fnr*, estirpe MBFNR2/3/1, apresentou uma deficiência no crescimento quando cultivada em meio NfbHPN-Malato contendo  $\text{KNO}_2$ , na concentração de 1mM (Figura 27).

Para a caracterização do perfil de crescimento dos mutantes *fnr* de *H. seropedicae* em diferentes condições limitantes de oxigênio, as estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em frascos de 10mL contendo diferentes volumes de meio de cultura (1,0mL; 2,5mL; 5,0mL; 7,5mL e 9,0mL) e também com uma atmosfera fechada. Com isso, esperava-se que as estirpes crescessem e consumissem todo ou quase todo o oxigênio dissolvido presente no meio de cultura e também na fase gasosa do frasco, até que este se tornasse diferencialmente limitante ao crescimento das estirpes em questão.

Quando as estirpes foram cultivadas em 1mL de meio Nfb-malatoHPN, nenhuma diferença foi observada (Figuras 28 e 29). Utilizando 2,5ml de meio de cultura foi possível observar que todas as estirpes mutantes nos genes *fnr* são deficientes no crescimento nestas condições limitantes de  $\text{O}_2$ , tanto pela determinação da densidade ótica 595 nm (Figura 28), como também pela determinação da concentração total de proteínas (Figura 29) após um período de 24 horas de crescimento. Nos experimentos com volumes de 5,0ml, 7,5ml e 9,0ml não foi detectado nenhum crescimento das estirpes analisadas. Estes resultados sugerem que o crescimento das estirpes em 1mL de cultura mimetizou as condições de crescimento aeróbias, tendo em vista que neste volume não houve alteração no crescimento. Já utilizando 2,5mL de meio, obteve-se condições limitantes de oxigênio que permitiram o crescimento da estirpe parental, mas limitaram o crescimento das estirpes mutantes. Nas

demais condições, a limitação do oxigênio se revelou incompatível com o hábito microaerofílico do organismo de estudo.

A deficiência do crescimento das estirpes mutantes *fnr* de *H. seropedicae*, nas condições de limitação de oxigênio citadas, é compatível com observações de que a estirpe mutante *fnr* de *E. coli* é deficiente no crescimento em anaerobiose, pois são incapazes de crescer, ou crescem a uma taxa muito baixa, em condições anaeróbias na presença de diferentes aceptores finais de elétrons e de uma fonte de carbono não fermentável, como glicerol ou lactato (LAMBDEM & GUEST, 1976; CONSTANTINIDOU, *et al* 2006). Em *E. coli* a proteína FNR age como um regulador transcricional que responde ao estado redox intracelular, ativando genes cujos produtos estão envolvidos na respiração anaeróbica, ou reprimindo outros genes requeridos para a respiração aeróbica (UNDEN *et al.*, 1995, BAUER *et al.*, 1999). Dentre os genes que fazem parte deste interruptor genético em resposta ao estado redox intracelular, muitos são alvos de regulação da proteína FNR. Esta age como ativador de oxiredutases anaeróbias codificadas por diferentes operons e/ou genes, incluindo *narGHJ* (nitrito redutase), *nirB* (nitrito redutase), *dmsABC* (DMSO/TMAO redutase) e também *frdABCD* (fumarato redutase). FNR também atua como um ativador de genes requeridos para fermentação (fluxo carbono em anaerobiose) como os genes *pfl* (piruvato formato liase), *fumB* (fumarase B) e *frdABCD* (fumarato redutase) que também é requerido para respiração em condições anaeróbias, como já citado. Outros genes ativados por FNR em anaerobiose são, o operon *fdnGHI*, que codifica para formato desidrogenase N, *aspA* que codifica para aspartase e *glpA* que codifica para a glicerol-3-fosfato desidrogenase. FNR ainda tem papel repressor da expressão dos genes *cyoABCDE* (citocromo o oxidase), *cydAB* (citocromo d oxidase), *ndh* (NADH desidrogenase II), *sdhCDAB* que codifica para a succinato desidrogenase e *sodA* que codifica para a superóxido dismutase (Para revisão ver GUNSALUS & PARK, 1994; IUCHI & LIN, 1993, SPIRO & GUEST, 1990 e UNDEN *et al* 1994).

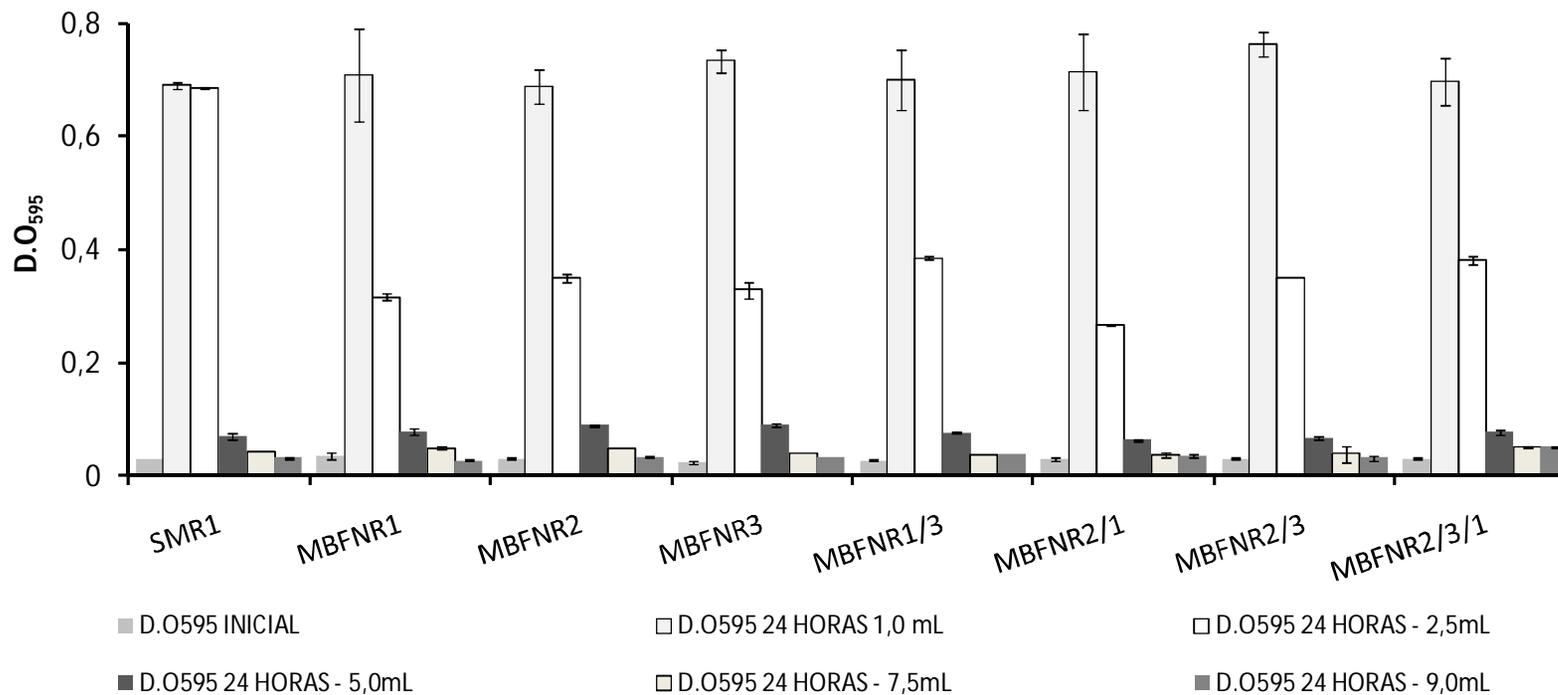
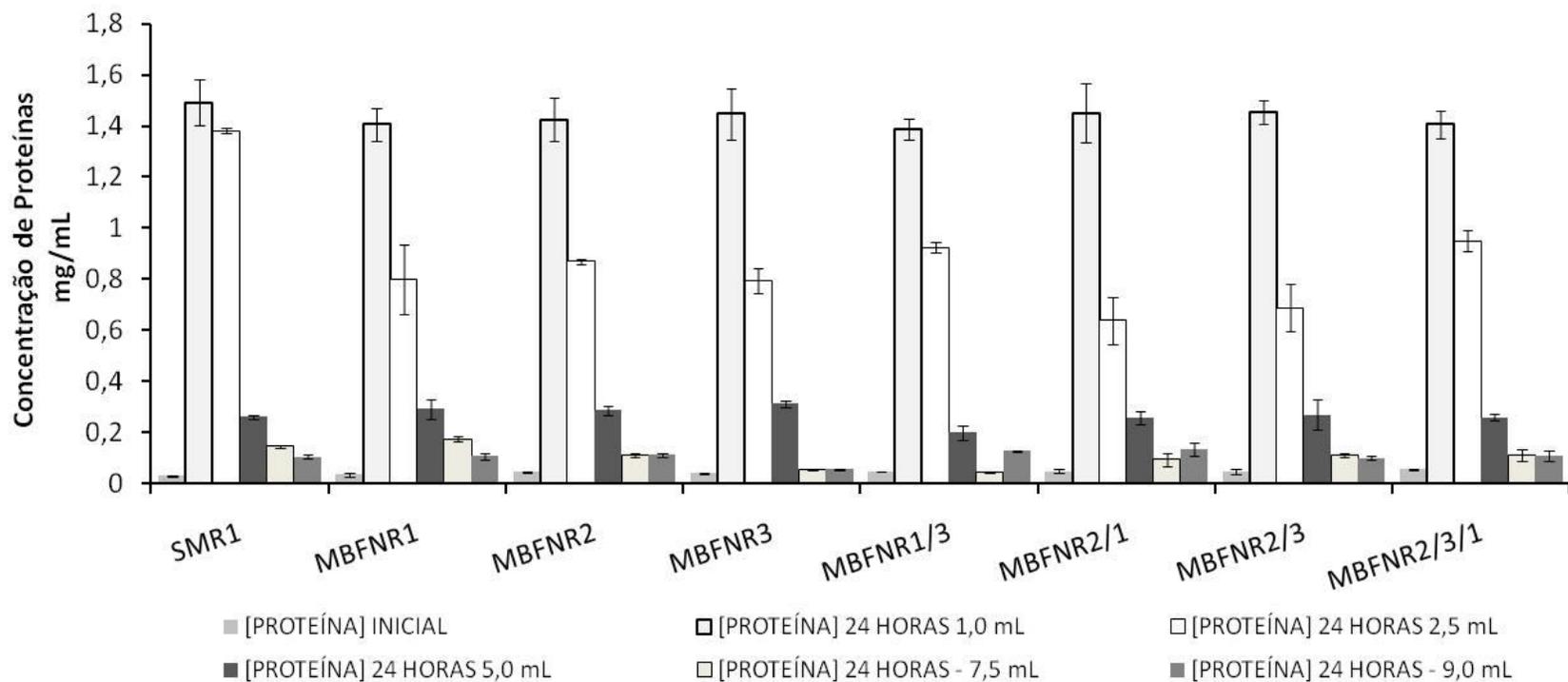


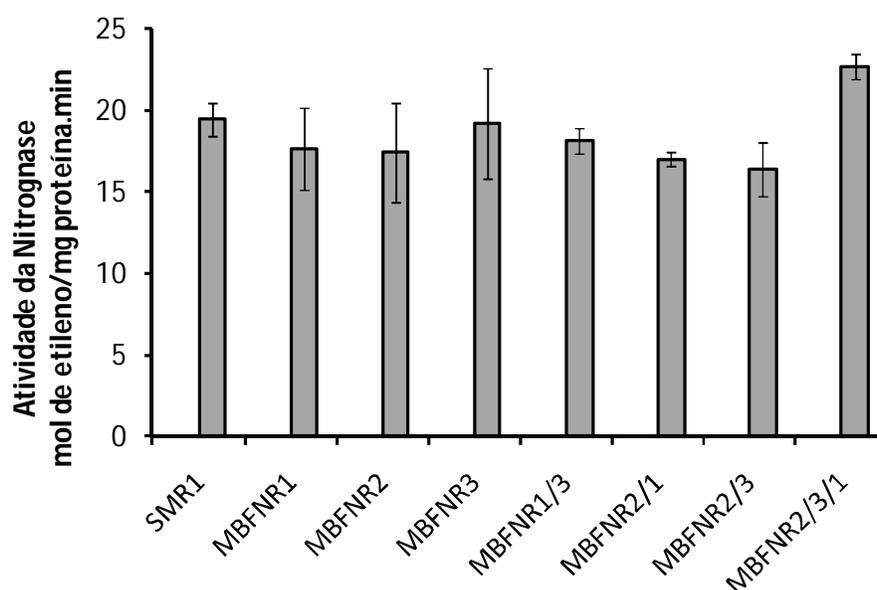
Figura 28 – Representação da  $D.O_{595}$  atingida durante o crescimento das estirpes de *H. seropedicae* mutantes nos genes *fnr* e também da estirpe parental SMR1, em diferentes condições limitantes de oxigênio. Para atingir diferentes concentrações de  $O_2$  durante o crescimento, as estirpes foram cultivadas em frascos de 10mL contendo diferentes volumes de meio (1,0 ml; 2,5 ml; 5,0 ml; 7,5 ml e 9,0 ml) com atmosfera fechada, ou seja vedados com tampa de borracha. As estirpes foram cultivadas por 24 horas, quando os frascos foram abertos e a  $D.O_{595}$ , determinada.



**Figura 29 - Representação da concentração de proteínas após 24 horas de crescimento das estirpes de *H. seropedicae* mutantes nos genes *fnr* e também da estirpe parental SMR1, em diferentes condições limitantes de oxigênio. Para atingir diferentes concentrações de O<sub>2</sub> durante o crescimento, as estirpes foram cultivadas em frascos de 10mL contendo diferentes volumes de meio (1,0 ml; 2,5 ml; 5,0 ml; 7,5 ml e 9,0 ml) com atmosfera fechada, ou seja vedados com tampa de borracha. Após 24 horas de cultivo, 50 µL de cultura foram lisadas com NaOH 0,2 M durante a noite. Após a lise, uma alíquota 30 µL foi utilizada para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford, como descrito no item 3.16.**

#### 4.4.2 Determinação da atividade de nitrogenase das estirpes mutantes de *H. seropedicae* nos genes *fnr*.

Para verificar se as mutações nos genes *fnr* afetariam a fixação biológica de nitrogênio, a atividade de nitrogenase das estirpes MBFNR1, MBFNR2, MBFNR3, MBFNR1/3, MBFNR2/1, MBFNR2/3 e MBFNR2/3/1 de *H. seropedicae* foi determinada e comparada com a estirpe parental SMR1. Os resultados obtidos mostraram que não ocorreu diminuição na atividade das estirpes mutantes *fnr* quando comparadas com a estirpe parental SMR1 (Figura 30), sugerindo que os genes *fnr* de *H. seropedicae* não são necessários para a atividade da nitrogenase em *H. seropedicae*.



**Figura 30** – Determinação da atividade de nitrogenase das estirpes de *H. seropedicae* mutantes nos genes *fnr* e parental SMR1. Os ensaios foram realizados em meio NFbHPG<sub>0,5</sub>-Malato semi-sólido. Após a formação da película no meio, (aproximadamente 24 horas) os frascos foram vedados com suba-seal e então um volume de acetileno correspondente a 10% da fase gasosa foi injetado. Após incubação por 1 hora a 30°C, 0,5 mL da fase gasosa dos frascos foi coletada e submetida a análise cromatográfica do tipo GC-FID. A atividade de nitrogenase foi expressa como nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína da cultura. No gráfico estão indicados os desvios padrão de um experimento representativo realizado em triplicata.

De acordo com Monteiro e colaboradores (2003) os genes *fnr* estariam envolvidos no controle da atividade da proteína NifA, pois no mutante *fnr* de *E.coli* a NifA era menos ativa e mais susceptível a degradação. A hipótese inicial era de que na ausência do gene *fnr* ocorreria uma diminuição na atividade de NifA que poderia ser observada por uma diminuição na atividade de nitrogenase. No entanto, esse efeito não foi observado, pois as estirpes mutantes para os genes *fnr* não tiveram uma diminuição na atividade da nitrogenase em relação à estirpe parental SMR1.

Com esse resultado, pudemos concluir que provavelmente em *H. seropedicae*, os genes *fnr*, não estão envolvidos com o controle da atividade de NifA e também com qualquer outro fator relacionado com a atividade da nitrogenase. Para confirmar esta hipótese, a expressão do gene *nifB* nos diferentes mutantes *fnr* de *H. seropedicae* foi determinada, utilizando-se uma fusão transcricional (*nifB::lacZ*).

#### 4.4.3 Determinação do padrão de expressão do promotor do gene *nifB* de *H. seropedicae*

O plasmídeo pEMS140 (REGO *et al*, 2006), que contém uma fusão transcricional *nifB::lacZ* foi escolhido, para verificar o efeito dos genes *fnr* sobre a atividade da proteína NifA. O gene *nifB*, tem sua expressão regulada pela proteína NifA de maneira muito semelhante aos genes estruturais da nitrogenase (genes *nifHDK*) (MACHADO *et al*, 1996).

Os ensaios de  $\beta$ -galactosidase foram feitos como descrito no item 3.15. Ao longo do período de crescimento, as bactérias presentes no frasco de cultivo cresceriam, consumindo rapidamente os 5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  adicionados no início do cultivo, atingindo uma fase de crescimento em que o consumo de  $\text{O}_2$ , seria tal que, mesmo sob agitação de 120 rpm iria impor uma condição de limitação de oxigênio e desta forma permitiria o funcionamento dos componentes sensíveis a oxigênio que participam da expressão do gene *nifB*, que é ótima em condições de limitação de nitrogênio fixado e oxigênio.

Os resultados obtidos mostram que nas estirpes mutantes *fnr* a expressão do gene *nifB* começa em uma densidade ótica da cultura menor (entenda-se então que as concentrações de oxigênio possivelmente estavam maiores), em relação a estirpe SMR1 (Figura 31). Sendo assim, com as culturas dos mutantes *fnr* desreprimindo antes do SMR1, a atividade da fusão *nifB::lacZ* sempre foi maior nos mutantes *fnr* em relação a estirpe SMR1 em todos os ensaios realizados. O efeito mais evidente foi observado no mutante triplo MBFNR2/3/1 onde a expressão do promotor *nifB* foi cerca de duas vezes maior que em relação a atividade do mesmo promotor na estirpe SMR1 (Figura 32).

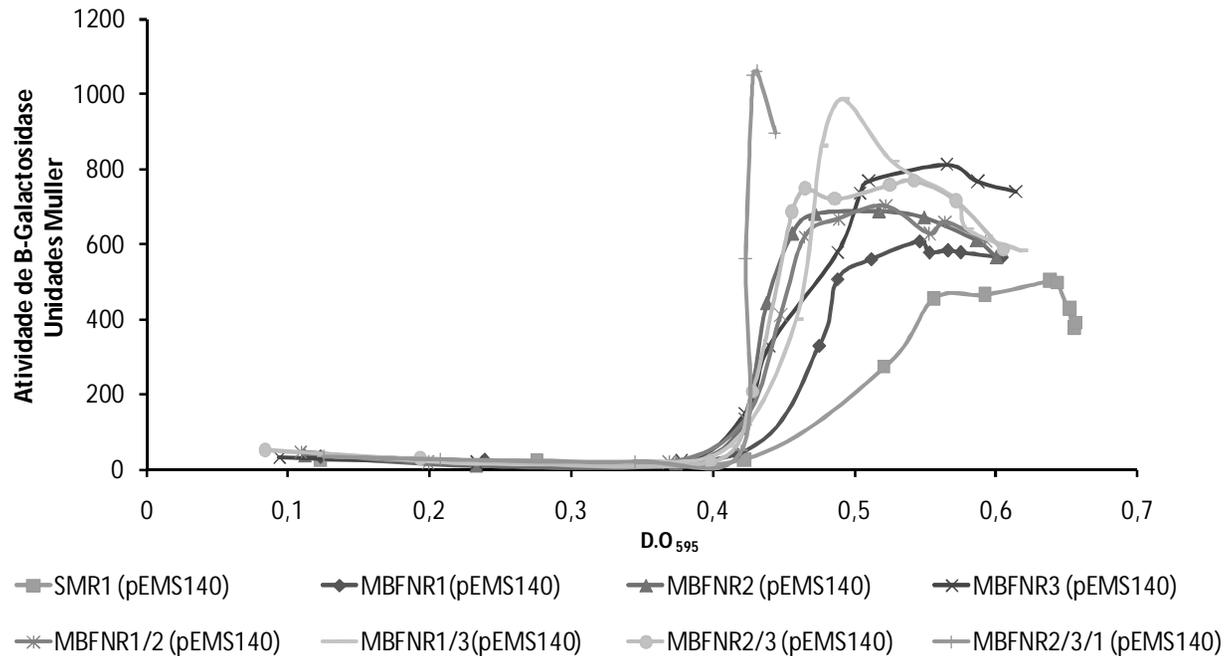
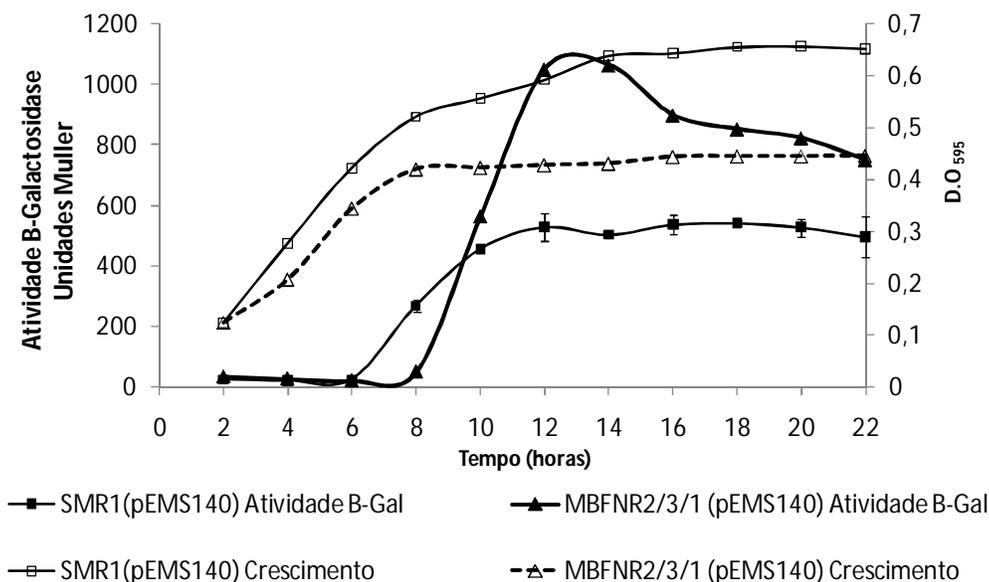


Figura 31 – Perfil de expressão do gene *nifB* de *H. seropedicae* em função da D.O<sub>595</sub> das culturas, nas estirpes mutantes para os genes *fnr* em comparação com a estirpe parental SMR1. As diferentes estirpes foram crescidas em meio NfbHP-Malato suplementado com 5,0 mM de NH<sub>4</sub>Cl. A D.O<sub>595</sub> para o início dos experimentos foi de aproximadamente 0,01. Ao longo do tempo amostras foram retiradas dos cultivos em crescimento para a determinação da atividade de β-galactosidase, como descrito no item 3.15. Neste experimento foram utilizados como controles negativos a estirpe SMR1 sem nenhum plasmídeo e também contendo o vetor de fusão transcricional pPW452 (contendo o gene da β-Galactosidase sem um promotor). Em todos os experimentos a estirpe SMR1 não desenvolveu qualquer atividade detectável, enquanto que a estirpe SMR1(pPW452) teve uma atividade correspondente a vazamento de expressão de cerca de 30 a 50 unidades Muller. No gráfico está demonstrado um experimento representativo, de um grupo de quatro experimentos realizados em duplicata.



**Figura 32 – Perfil de expressão do gene *nifB* de *H. seropedicae*, em função do tempo e em comparação com o perfil de crescimento, nas estirpes MBFN2/3/1 e SMR1. As duas estirpes foram crescidas em meio NFbHP-Malato suplementado com 5,0 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . A  $\text{D.O}_{595}$  para o início dos experimentos foi de aproximadamente 0,01. Ao longo do tempo amostras foram retiradas dos cultivos em crescimento para a determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase, como descrito no item 3.15. Neste experimento foram utilizados como controles negativos a estirpe SMR1 sem nenhum plasmídeo e também contendo o vetor de fusão transcricional pPW452 (contendo o gene da  $\beta$ -Galactosidase sem um promotor). Em todos os experimentos a estirpe SMR1 não desenvolveu qualquer atividade detectável, enquanto que a estirpe SMR1(pPW452) teve uma atividade correspondente a vazamento de expressão de cerca de 30 a 50 unidades de Muller. No gráfico está demonstrado um experimento representativo, de um grupo de quatro experimentos realizados em duplicata.**

Com esses resultados, pode-se sugerir que as proteínas FNR estejam exercendo um efeito repressor, direto ou indireto, na expressão do gene *nifB* e assim estariam envolvidas em um fino mecanismo de regulação da expressão deste gene em relação a disponibilidade de oxigênio. Este efeito repressor de proteínas da família Crp-Fnr sobre genes ativados por NifA, já foi observado em *B. japonicum*, onde a proteína FixK1 é conhecida por atuar negativamente sobre a expressão de 45 genes ativados por NifA (MESA *et al*, 2008 e HAUSER, *et al*, 2007).

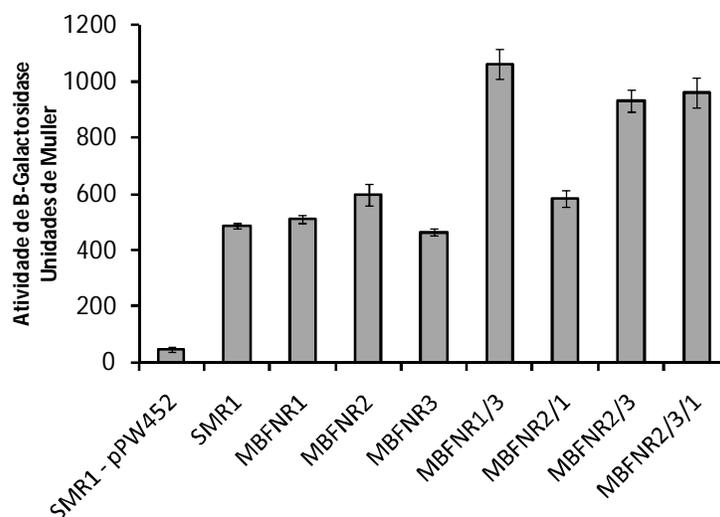
Mesa e colaboradores em 2008, propuseram que em *B. japonicum* o efeito de FixK1, componente da cascata regulatória FixLJ-FixK2-FixK1, seja direta ou indiretamente antagonizar os genes ativados por NifA, sendo que tal efeito é mais pronunciado em concentrações de oxigênio intermediárias (como em uma cultura em microaerofilia), do que em anaerobiose. Sendo assim, uma diminuição na concentração de oxigênio a níveis intermediários, poderia ainda manter alguns genes dependentes de NifA reprimidos via FixK1. Porém quando a concentração de oxigênio cai a níveis abaixo do intermediário, a célula produziria mais NifA ativa, de modo que a mesma pudesse superar o efeito repressor de FixK1. Como este mecanismo de regulação fina da expressão dos genes dependentes de NifA funciona mecanisticamente, ainda precisa ser elucidado. Curiosamente, um mecanismo reverso de regulação entre estas vias parece existir em bacterióides de *S. meliloti*. Análises transcriptômicas deste organismo, demonstraram que um grupo de genes dependentes de FixK foram super-expressos no mutante *nifA* (BOBIK, MEILHOC & BATUT, 2006).

Análises *in silico* da região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* mostraram que não parece existir um possível sítio de ligação para a proteína FNR, nem a montante e nem a jusante do promotor -24/-12 do gene *nifB*. Então, decidiu-se verificar se esse efeito repressor observado poderia também ocorrer sobre a expressão de *nifA*.

#### 4.4.4 Determinação do padrão de expressão do promotor do gene *nifA* de *H. seropedicae*

Visando determinar se o efeito de FNR na expressão aumentada do gene *nifB* de *H. seropedicae* era devido a alguma alteração direta na expressão de *nifA*, o plasmídeo pRW1 (WASSEM, 2000 e 2002) contendo a fusão *nifA::lacZ* de *H. seropedicae* foi utilizado em experimentos para determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase nas estirpes mutantes para os genes *fnr*.

Na figura 33 podemos verificar que a expressão da fusão *nifA::lacZ* nas estirpes mutantes MBFNR1/3, MBFNR2/3 e MBFNR2/3/1 foi aproximadamente duas vezes maior em relação a estirpe parental SMR1. Estes resultados sugerem que as proteínas FNR estão envolvidas com o controle da expressão do gene *nifA* de *H. seropedicae*.



**Figura 33 – Determinação da expressão do promotor do gene *nifA* de *H. seropedicae* nas estirpes mutantes para os genes *fnr* em comparação com a estirpe parental SMR1. Foi utilizado como controle a estirpe SMR1 contendo o vetor de fusão transcricional pPW452 (contendo o gene da  $\beta$ -Galactosidase sem um promotor). As diferentes estirpes foram crescidas em meio Nfb-MalatoHP suplementado com 5,0 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . A  $\text{D.O}_{595}$  no início dos experimentos foi de aproximadamente 0,01. Depois de um período de aproximadamente 16 horas de cultivo, amostras foram coletadas para a determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase, como descrito no item 3.15. No gráfico está demonstrado um experimento representativo, de um grupo de dois experimentos realizados em duplicata.**

Análises *in silico* da região promotora do gene *nifA*, mostraram que parcialmente sobreposta a região de ligação a IHF, existe uma provável seqüência de ligação a FNR, ou anaerobox (Figura 34), muito semelhante ao consenso TTGAT-NNNN-ATCAA.



**Figura 34 – Região promotora do gene *nifA* de *H. seropedicae* incluindo parte de sua região codificadora. Todas as regiões regulatórias no promotor estão destacadas e acima das mesmas está assinalado o nome de cada região. O início de transcrição está indicado com uma flecha e com o símbolo +1 (Adaptado de Wassem, 1999).**

A ligação da proteína FNR a esse sítio poderia causar a diminuição da expressão do gene *nifA*. Wassem e colaboradores (2000 e 2002) mostraram a importância do sítio de ligação a IHF para a expressão do gene *nifA*. No promotor deste gene, IHF tem dois efeitos, pois participa da ativação do promotor *nifA* pela proteína NtrC, mas prejudica a ativação do promotor *nifA* pela própria proteína NifA. Em 1991, Souza e colaboradores descreveram a presença de uma anaerobox (sítio para ligação para FNR) no gene *nifA*, depois do início de tradução, mais precisamente na posição +1538. Uma provável função repressora pode ser relacionada com a presença de um sítio de ligação para FNR na região codificadora (NEES *et al*, 1988). Os resultados obtidos nos experimentos realizados não estão relacionados como esse sítio, já que a

fusão transcricional utilizada (plasmídeo pRW1) não se estende até a posição +1538. A comparação entre as seqüências anaerobox consenso, a encontra por Souza *et al*, 1991b na região codificadora de *nifA*, a sobreposta a IHF, e outras prováveis presentes no genoma de *H.seropedicae* estão apresentadas na figura 35.

```

A -> TTGATNNNNATCAA
B -> TTCTTTTAAATCAA
C -> TTCATCAAGGTCAA
D -> TTGATCTGGGACAA
E -> TTGACCTAGATCAG
F -> TTGAAACTGGTCAA
G -> TTGATACACGTCAA
H -> TTGATACACATCAA

```

**Figura 35 – Alinhamento entre prováveis seqüências FNR-BOX ou anaerobox, presentes em *H. seropedicae* em comparação com a seqüência consenso em A (EIGLMEIER *et al*, 1989 e GERASIMOVA *et al*, 2001). Em B temos a seqüência encontrada com sobreposição parcial ao sítio de ligação a IHF no promotor do gene *nifA*. Em C a seqüência presente na posição +1538 do gene *nifA* assinalada por Souza *et al*, 1991b. Em D, E, F, G e H temos as seqüências encontradas nos promotores dos genes *fnr1*, *fnr2*, *fnr3*, *fixN* e *hemN*, respectivamente. No alinhamento, os nucleotídeos sublinhados representam os que divergem da seqüência consenso apresentada em A. No consenso, N representa qualquer nucleotídeo.**

As análises de expressão do gene *nifA* revelaram que as estirpes mutantes MBFNR1/3 e MBFNR2/3/1 tiveram uma atividade de  $\beta$ -galactosidase pelo menos duas vezes maior em relação a estirpe parental SMR1 (Figura 33). A determinação do padrão de expressão dos genes *fnr* de *H.seropedicae* (apresentadas adiante no item 4.4.6) revelou que as proteínas FNR1, FNR2 e FNR3, são requeridas para a expressão máxima do gene *fnr2* (Figura 38). Na ausência de FNR1 a expressão do gene *fnr2* é completamente abolida, porém quando FNR1 está presente, mas FNR2 ou FNR3 estão ausentes, a expressão do gene *fnr2* é reduzida cerca de 50%. Estas observações sugerem que no mutante duplo MBFNR1/3 assim como no mutante triplo MBFNR2/3/1 as três proteínas FNR estão ausentes.

Com isso podemos concluir que o efeito observado no aumento da expressão do gene *nifA* nas estirpes MBFNR1/3 e MBFNR2/3/1 é devido a ausência das três proteínas FNR. Assim, o efeito repressor de FNR sobre a expressão de NifA só deixa de ser observado quando não há a presença de nenhuma proteína FNR em *H. seropedicae*, sugerindo ainda que FNR1, FNR2 e FNR3 podem ter alguma sobreposição de função, pelo menos em relação ao controle da expressão de NifA.

Por fim, os resultados obtidos abriram novas possibilidades a respeito do papel dos genes *fnr* na regulação da expressão de NifA e por consequência na ativação dos genes *nif*. Porém novos experimentos são necessários para corroborar a hipótese de que as proteínas FNR atuem como repressoras da expressão dos genes ativados por NifA e também para que se possa entender este efeito. O efeito da mutação nos genes *fnr* sobre a expressão de *nifA*, pode ser devido a ligação de FNR no sítio parcialmente sobreposto ao sítio de ligação a IHF, ou também pode ser devido a uma alteração na atividade de NifA.

#### 4.4.5 Determinação do padrão de expressão do operon *fixNOQP* de *H. seropedicae*

Em diversos organismos diazotrofos, uma oxidase de alta afinidade pelo oxigênio, codificada pelo operon *fixNOQP* é requerida para a respiração em condições limitantes de oxigênio e por isso, essencial a fixação biológica de nitrogênio (PREISIG, ANTHAMATTEN & HENNECKE, 1993). Outro operon envolvido na respiração microaeróbia é o operon *fixGHIS*, pois estes genes parecem ser importantes para a correta montagem da oxidase codificada por *fixNOQP* (PREISIG, ZUFFEREY & HENNECKE, 1996 e KOCH *et al*, 2000). Em *H.seropedicae* os genes constituintes destes dois operons estão presentes, com exceção de *fixH*, porém em uma organização genômica diferente em relação a outros diazotrofos (Figura 36).

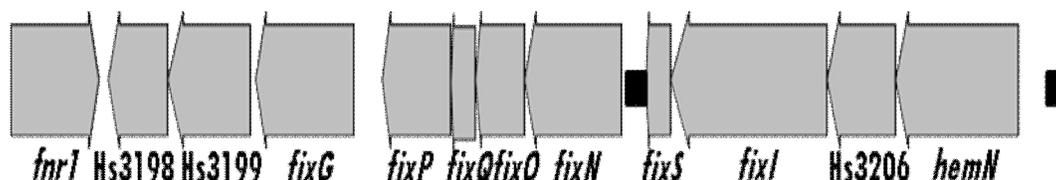


Figura 36 – Representação da região do operon *fixNOQP* de *H.seropedicae*. Os genes representados como setas cinza, são: Hs 3195, proteína dessaturase de ácido graxo; Hs 3196, proteína hipotética; *fnr1*, proteína reguladora transcricional da família Crp/Fnr; Hs 3198, proteína transmembrana; Hs 3199, proteína conservada hipotética; *fixG*, proteína ferredoxina transmembrana 4Fe-4S; *fixP*, citocromo c oxidase do tipo cbb3, subunidade III; *fixO*, citocromo c oxidase do tipo cbb3, subunidade II; *fixN*, citocromo c oxidase do tipo cbb3, subunidade I; *fixS*, proteína de fixação de nitrogênio (Proteína ATPase do tipo-P); *fixI*, proteína de transporte de cátion (Proteína ATPase do tipo-P); Hs 3206, proteína conservada hipotética; *hemN*, oxidase oxigênio-independente copropofirinogênio III. Os retângulos em preto indicam a presença de um sítio de ligação a FNR (ou anaerobox). O gene *fnr1*, localizado em orientação contrária a os outros representados, provavelmente faz parte de um operon, juntamente com o genes Hs\_3195 e Hs\_3196. Estes últimos não foram representados visando à simplificação da figura.

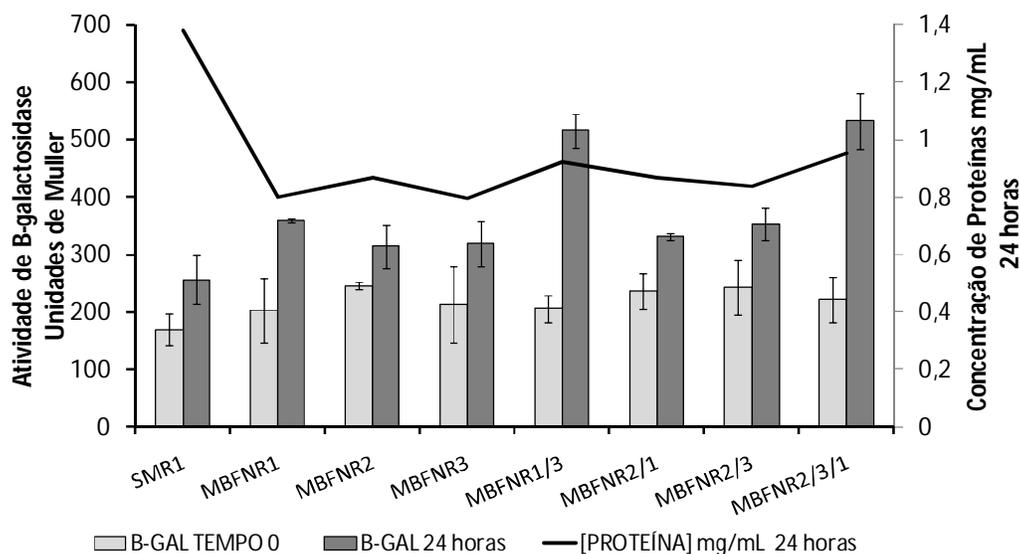
Ao contrário de *H. seropedicae*, a maioria dos organismos, possuem o operon *fixNOQP* localizado a montante do operon *fixGHIS* (KAHN *et al.*, 1989; PREISIG *et al.*, 1996; de GIER *et al.*, 1996 e KOCH *et al.*, 1998), sendo que os mesmos são co-regulados e mutações em qualquer um destes operons resultam em um fenótipo deficiente na fixação biológica de nitrogênio (Para revisão ver BATUT & BOISTARD 1994, PITCHER & WATMOUGH, 2004 e COSSEAU & BATUT, 2004). A co-regulação destes dois operons organizados *in tandem*, geralmente envolve um sítio de ligação a FNR (ou anaerobox) localizado a montante de *fixNOQP* (COSSEAU & BATUT, 2004).

Como representado na figura 33, em *H.seropedicae* há a presença do operon *fixNOQP*, porém este não está a montante do operon *fixGHIS*, ao contrário disto, está a jusante de um provável operon *hemN.Hs\_3206fixIS*. A região intergênica entre *fixNOQP* e *hemN.Hs\_3206fixIS* é de cerca de 134 pares de base, sendo que nesta região há a presença de um sítio de ligação para FNR, assim como a montante de *hemN.Hs\_3206fixIS* (Figura 33). A jusante de *fixNOQP* encontra-se um outro provável operon englobando o gene *fixG*, o operon *fixG.Hs\_3199.Hs\_3198*, que aparentemente não possui a sua montante, qualquer seqüência que lembre um sítio de ligação a FNR.

Para determinar a expressão do operon *fixNOQP* de *H.seropedicae* foi utilizado o plasmídeo pMPPFN contendo uma fusão transcricional *fixN::lacZ* construída como descrito em Material e Métodos, item 3.19. Apesar de os mutantes *fnr* apresentarem um crescimento deficiente nas condições de limitação de oxigênio em que o experimento foi realizado, como já descrito no item 4.4.1, tais estirpes não tiveram a expressão do operon *fixNOQP* diminuída, pelo contrário, as estirpes MBFNR1/3 e MBFNR2/3/1 tiveram a atividade da fusão *fixN::lacZ* cerca de 2 vezes maior em comparação com a estirpe parental SMR1(Figura 37).

Considerando que a oxidase codificada por *fixNOQP* é expressa em condições de limitantes de oxigênio e que esta é requerida para geração de energia nestas condições (PREISIG, ANTHAMATTEN & HENNECKE, 1993; DELGADO, BEDMAR & DOWNIE, 1998) poderia se atribuir a deficiência no crescimento observada, a uma expressão diminuída de *fixNOQP* nas estirpes mutantes *fnr* (MESA *et al*, 2003 e NELLEN-ANTHAMATTEN, *et al* 1998).

Porém como tais estirpes não são defectivos na expressão de tais genes, o fenótipo relacionado ao crescimento pode estar relacionado com um outro gene regulado por FNR ainda não descrito.



**Figura 37 – Determinação da expressão do promotor do operon *fixNOQP* de *H. seropedicae* nas estirpes mutantes para os genes *fnr* em comparação com a estirpe parental SMR1. Neste experimento as estirpes foram crescidas em meio Nfb-MalatoHPN em frascos de 10 ml contendo 2,5ml de meio sob atmosfera fechada. A D.O<sub>595</sub> para o início dos experimentos foi de aproximadamente 0,01. Depois de um período de 24 horas de cultivo, amostras foram coletadas para a determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase, como descrito no item 3.15. Foi utilizado como controle a estirpe SMR1 contendo o vetor de fusão transcricional pMP220 (contendo o gene da  $\beta$ -Galactosidase sem um promotor). A estirpe SMR1(pMP220) teve uma atividade correspondente a vazamento de expressão entre 30 a 70 unidades de Muller. A concentração de proteínas plotada no eixo Y secundário é representativa da deficiência de crescimento das estirpes mutantes, como discutido no item 4.3.1. No gráfico está demonstrado um experimento representativo, de dois experimentos realizados em duplicata**

Se considerarmos que a oxidase do tipo *cbb<sub>3</sub>* codificada pelo operon *fixNOQP* é realmente requerida para a fixação biológica de nitrogênio em *H. seropedicae*, a constatação de que o gene *fnr* não é importante para a expressão de *fixNOQP*, é compatível com o fenótipo relacionado a atividade de nitrogenase apresentado no item 4.4.2. Em *R. leguminosarum* UPM791 uma

bactéria que possui duas cópias do gene *fnrN*, o fenótipo  $\text{fix}^-$  é observado somente no duplo mutante *fnrN1fnrN2*. Este resultado é atribuído ao requerimento de pelo menos um dos genes *fnrN1* ou *fnrN2*, já que estes são 87,5% idênticos, para a expressão da oxidase de alta afinidade do tipo *cbb<sub>3</sub>* codificada pelo operon *fixNOQP* (GUTIÉRREZ, *et al*, 1997).

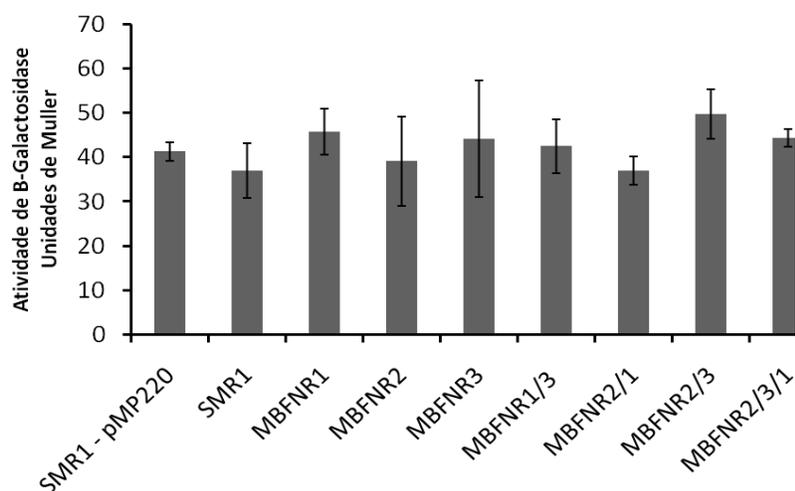
Outra possibilidade que não pode ser descartada é a de que *H.seropedicae* não utilize esta oxidase, codificada por *fixNOQP*, para a respiração em condições de fixação de nitrogênio, ou ainda que esta não seja a principal oxidase utilizada para a respiração em tais condições. No genoma de *H.seropedicae* há a presença de genes que codificam para outras oxidases de alta afinidade.

Os genes *fixNOQP*, *fixG*, *fixI* e *fixS* em *H. seropedicae* apresentam uma organização genômica diferente em relação a outras bactérias, portanto pode ser que o mecanismo de regulação destes também seja diferente. Analisando a organização dos operons *hemN.Hs\_3206fixIS* e *fixNOQP* de *H.seropedicae* (Figura 33) pode-se propor que estes operons sejam co-ativados por FNR, sendo que a anaerobox presente na região intergênica destes dois operons faça parte de um mecanismo fino de regulação da expressão de *fixNOQP*.

#### 4.4.6 Determinação do padrão de expressão dos genes *fnr*<sub>1</sub>, *fnr*<sub>2</sub> e *fnr*<sub>3</sub> de *H. seropedicae*

Visando determinar as condições de expressão dos genes *fnr*<sub>1</sub>, *fnr*<sub>2</sub> e *fnr*<sub>3</sub> de *H. seropedicae*, fusões transcricionais contendo as prováveis regiões promotoras dos genes *fnr* foram construídas da forma descrita no item 4.2. O provável efeito de uma FNR sobre a expressão de outra também foi analisado, através da determinação da atividade das fusões transcricionais construídas, em cada uma das estirpes mutantes *fnr*, MBFNR1, MBFNR2, MBFNR3, MBFNR1/3, MBFNR2/1, MBFNR2/3 e MBFNR2/3/1.

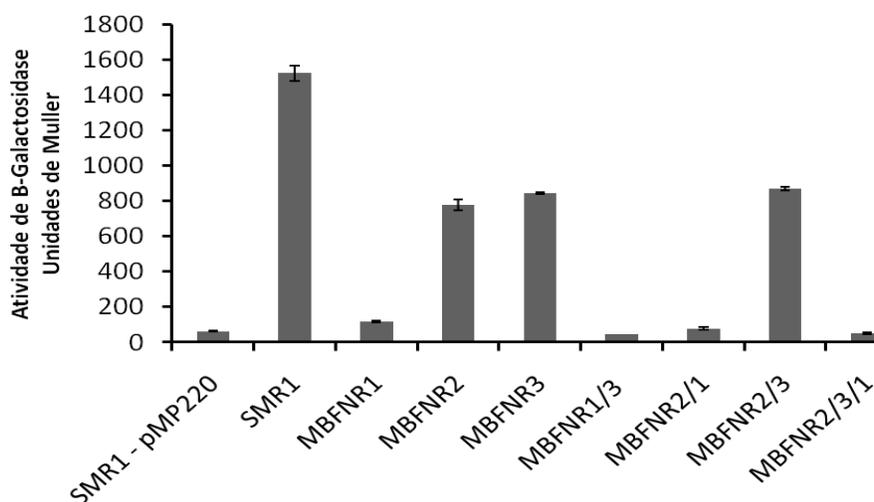
Não foi possível determinar a expressão da fusão *fnr*<sub>1</sub>::*lacZ* construída (plasmídeo pMPP1) (Figura 38), nas condições testadas.



**Figura 38 – Determinação da expressão do provável promotor do gene *fnr*<sub>1</sub> de *H. seropedicae* nas estirpes mutantes para os genes *fnr* em comparação com a estirpe parental SMR1. Foi utilizado como controle negativo a estirpe SMR1 contendo o vetor de fusão transcricional pMP220 (contendo o gene da  $\beta$ -Galactosidase sem um promotor). As diferentes estirpes foram crescidas em meio Nfb-MalatoHPN em frascos de 10 ml contendo 2,5ml de meio sob atmosfera fechada. A D.O<sub>595</sub> para o início do experimento foi de aproximadamente 0,01. Depois de um período de 24 horas de cultivo, amostras foram coletadas para a determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase, como descrito no item 3.15. No gráfico está demonstrado um experimento representativo, de um grupo de três experimentos realizados em duplicata**

Diante disso, uma nova análise da região promotora de *fnr*<sub>1</sub>, foi feita e constatou-se que existe a possibilidade de o promotor escolhido para a construção da fusão transcricional não ser funcional ou não ser o promotor real. Uma re-anotação do genoma de *H. seropedicae* revelou a existência de um novo gene localizado a 42 pares de base de *fnr*<sub>1</sub>, o gene Hs\_3196 sobrepondo-se à região inicialmente considerada como a promotora de *fnr*<sub>1</sub>. Este gene codifica para uma proteína hipotética presente somente em *H. seropedicae*. Desta forma, de acordo com a nova anotação, *fnr*<sub>1</sub> estaria em um operon juntamente com Hs\_3195 e Hs\_3196.

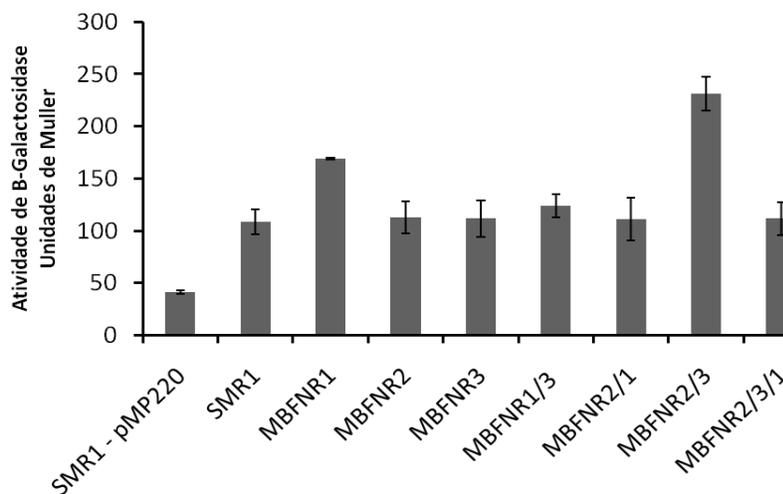
Apesar disso, durante a análise da fusão *fnr*<sub>2</sub>::*lacZ* (plasmídeo pMPP2) pudemos concluir indiretamente, que *fnr*<sub>1</sub> é expresso em *H. seropedicae*, devido ao fato da mutação em *fnr*<sub>1</sub> afetar drasticamente a expressão do gene *fnr*<sub>2</sub> (Figura 39).



**Figura 39 – Determinação da expressão do promotor do gene *fnr*<sub>2</sub> de *H. seropedicae* nas estirpes mutantes para os genes *fnr* em comparação com a estirpe parental SMR1. Foi utilizado como controle negativo a estirpe SMR1 contendo o vetor de fusão transcricional pMP220 (contendo o gene da  $\beta$ -Galactosidase sem um promotor). As diferentes estirpes foram crescidas em meio Nfb-MalatoHPN em frascos de 10 ml contendo 2,5ml de meio sob atmosfera fechada. A D.O<sub>595</sub> para o início do experimento foi de aproximadamente 0,01. Depois de um período de 24 horas de cultivo, amostras foram coletadas para a determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase, como descrito no item 3.15. No gráfico está demonstrado um experimento representativo, de um grupo de três experimentos realizados em duplicata.**

O gene *fnr<sub>2</sub>* foi expresso em *H.seropedicae* na estirpe SMR1, sendo sua expressão não dependente das concentrações de oxigênio e da disponibilidade de íons amônio. Análises da expressão do gene *fnr<sub>2</sub>*, nas estirpes mutantes *fnr*, mostrou que as proteínas FNR participam da regulação da expressão deste gene. A expressão do gene *fnr<sub>2</sub>* nas estirpes MBFNR1, MBFNR1/3, MBFNR2/1 e MBFNR2/3/1 foi completamente abolida, mas apenas parcialmente reprimida em MBFNR2, MBNFR3 e MBFNR2/3 (Figura 39). Estas observações levam a conclusão de que na ausência da proteína FNR1 o gene *fnr<sub>2</sub>*, não é expresso. A redução da expressão de *fnr<sub>2</sub>* nas estirpes MBFNR2, MBNFR3 e MBFNR2/3, revelam que as proteínas FNR2 e FNR3 também são requeridas para a expressão máxima do gene *fnr<sub>2</sub>*.

As análises da atividade da fusão *fnr<sub>3</sub>::lacZ* (plasmídeo pMPP3) revelaram que a expressão de *fnr<sub>3</sub>* é bem menor em relação a expressão de seu homólogo *fnr<sub>2</sub>* (Figura 40).



**Figura 40 – Determinação da expressão do promotor do gene *fnr<sub>3</sub>* de *H.seropedicae* nas estirpes mutantes para os genes *fnr* em comparação com a estirpe parental SMR1. Foi utilizado como controle negativo a estirpe SMR1 contendo o vetor de fusão transcricional pMP220 (contendo o gene da  $\beta$ -Galactosidase sem um promotor). As diferentes estirpes foram crescidas em meio Nfb-MalatoHPN em frascos de 10 ml contendo 2,5ml de meio sob atmosfera fechada. A D.O<sub>595</sub> para o início do experimento foi de aproximadamente 0,01. Depois de um período de 24 horas de cultivo, amostras foram coletadas para a determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase, como descrito no item 3.15. No gráfico está demonstrado um experimento representativo, de um grupo de três experimentos realizados em duplicata.**

A regulação da expressão do gene *fnr<sub>3</sub>* pelas proteínas FNR, é diferente da observada para o gene *fnr<sub>2</sub>*. Aparentemente FNR1 atua como ativador da expressão de *fnr<sub>2</sub>*, em uma provável cascata regulatória que também envolve FNR2 e FNR3. Já na expressão de *fnr<sub>3</sub>* as proteínas FNR, parecem atuar como repressoras, pois nos mutantes MBFNR1 e MBFNR2/3, houve um aumento na expressão de *fnr<sub>3</sub>* de 50% e 100%, respectivamente, em comparação com a estirpe SMR1.

A alta expressão de *fnr<sub>2</sub>*, aliada à ausência de um efeito auto-repressor em sua expressão e também algumas observações estruturais em FNR2, apresentadas no item 1.6, leva-nos a hipotetizar que esta proteína pode ter uma sensibilidade ao O<sub>2</sub> bastante reduzida e ainda ter uma capacidade de dimerização aumentada, podendo ser desta forma, ser ativa mesmo na presença de O<sub>2</sub>.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gene *fnr*, codifica para a proteína FNR, um regulador transcricional da família Crp-Fnr que pode atuar positiva ou negativamente sobre diferentes genes alvo em resposta aos níveis de oxigênio intracelular. Proteínas da família Crp-Fnr de diferentes organismos têm sido relacionadas a regulação da fixação biológica de nitrogênio, como por exemplo, a proteína FNR em *K. pneumoniae* (GRABBE & SCHMITZ, 2003), CydR em *A. vinelandii* (KELLY *et al* 1990; ), FnrN em *R. leguminosarium* UPM791 e *R. etli* (GUTIERREZ, *et al*, 1997; LOPEZ *et al*, 2001), FixK2 em *B. japonicum* e *S. meliloti*, (NELLEN-ANTHAMATTEN, *et al* 1998; BOBIK, MEILHOC e BATUT, 2006; MESA *et al*, 2008) entre outras. Em *H. seropedicae* a conclusão do sequenciamento genômico, revelou a presença de três genes homólogos a *fnr*. A participação de FNR na regulação da fixação biológica de nitrogênio, em *H. seropedicae* foi sugerida por Monteiro e colaboradores (2003).

Neste trabalho o papel dos três genes *fnr* na fixação biológica de nitrogênio foi determinado através da análise fenotípica de estirpes mutantes construídas para os genes *fnr*<sub>1</sub>, *fnr*<sub>2</sub> e *fnr*<sub>3</sub>. Conforme proposto inicialmente, em *H. seropedicae*, FNR poderia estar envolvida em uma via de transmissão do sinal de baixo oxigênio para a proteína NifA, e portanto seria importante para a atividade de tal proteína. Porém os resultados obtidos indicam que os genes *fnr* não são requeridos para a atividade da nitrogenase. A ausência de redução da atividade da nitrogenase é compatível com o fato de expressão de *fixNOQP*, um operon que codifica para uma oxidase de alta afinidade essencial para a fixação biológica de nitrogênio, não ter sido diminuída nas estirpes mutantes. As estirpes mutantes também tiveram um crescimento deficiente em condições limitantes de oxigênio. Este efeito pode estar relacionado a genes regulados por FNR ainda não descritos.

Os resultados também indicam que FNR pode estar relacionada com um mecanismo fino de regulação da expressão dos genes *nifB* e *nifA* em resposta ao níveis de oxigênio. Nas estirpes mutantes *fnr* a expressão de *nifB* é sempre maior em relação a estirpe parental SMR1, pois nestes mutantes a desrepressão de *nifB* começa em níveis mais altos de oxigênio. Um efeito

semelhante ao observado na expressão de *nifB* também foi observado na expressão de *nifA*. Na região promotora deste gene foi encontrado um provável sítio de ligação a FNR. Se este sítio for funcional, pode-se sugerir que o efeito repressor na expressão deste gene, seja devido a ligação de FNR neste sítio. As três proteínas FNR em *H.seropedicae* podem atuar em diferentes concentrações de oxigênio e assim poderiam estar envolvidas em um mecanismo fino de regulação que só permite a expressão máxima de *nifA* quando as concentrações de oxigênio são ótimas para a fixação biológica de nitrogênio.

## 6 CONCLUSÕES

- Os genes *fnr*<sub>1</sub>, *fnr*<sub>2</sub> e *fnr*<sub>3</sub> são expressos em *H. seropedicae*;
- A expressão do gene *fnr*<sub>2</sub> é dependente das proteínas FNR1, FNR2 e FNR3;
- FNR1 é mais importante do que FNR2 e FNR3 para a expressão do gene *fnr*<sub>2</sub>;
- O gene *fnr*<sub>3</sub> tem sua expressão regulada negativamente pelas proteínas FNR;
- As estirpes mutantes nos genes *fnr* são deficientes no crescimento em condições de limitação de oxigênio;
- As proteínas FNR não são necessárias para a atividade da nitrogenase em *H. seropedicae*;
- As proteínas FNR estão relacionadas com a expressão dos genes *nifA* e *nifB* de *H. seropedicae*;
- As proteínas FNR tem um efeito repressor sobre a expressão de *nifA*;
- As proteínas FNR reprimem a expressão do operon *fixNOQP*;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTHAMATTEN, D; SCHERB, B, e HENNECKE, H. Characterization of a *fixLJ*-regulated *Bradyrhizobium japonicum* gene sharing similarity with the *Escherichia coli fnr* and *Rhizobium meliloti fixK* genes. **J. Bacteriol** 174:2111–2120, 1992.

BACHMAN B., LUKE,W. e HUNSMANN,G. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. **Nucleic Acids Res** 18:1309, 1991

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. Syst. Bact.**, v. 36, p. 86-93, 1986.

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

BATES, D.M., LAZAZZERA, B.A., AND KILEY, P.J. Characterization of FNR\* mutant proteins indicates two distinct mechanisms for altering oxygen regulation of the *Escherichia coli* transcription factor FNR. **J. Bacteriol.** 177, 3972-3978, 1995.

BATES, D.M., POPESCU, C.V., KHOROSHILOVA, N., VOGT, K., BEINERT, H., MUNCK, E. and KILEY, P.J. Substitution of Leucine 28 with Histidine in the *Escherichia coli* Transcription Factor FNR Results in Increased Stability of the [4Fe-4S]<sub>2</sub><sup>+</sup> Cluster to Oxygen. **J. Biol. Chem.** 275(9) 7234-6240, 2000.

BAUER, C.E.; ELSEN, S.; AND BIRD, T.H. Mechanisms of redox control of gene expression. **Annu. Rev. Microbiol.** 53: 495–523, 1999.

BATUT, J. e BOISTARD, P. Oxygen control in *Rhizobium*. **Antonie van Leeuwenhoek** 66:129-150,1994.

BERGER, D.K.; NARBERHAUS, F.; LEE, H.; KUSTU, S. In Vitro Studies of the Domains of the Nitrogen Fixation Regulatory NifA Protein. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 191-199, 1995.

BOBIK, C., MEILHOC,E., e BATUT, J. FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. **J. Bacteriol.** 188:4890–4902, 2006.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D. e DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation

associated with sugar cane and rice contributions and prospects for improvement. **Plant Soil**, v. 174, p. 195-209, 1995.

BONNEFOY, V., FONS, M., RATOUCHE, J., PASCAL, M.C. e CHIPPAUX, M. Aerobic expression of the *nar* operon of *Escherichia coli* in a *fnr* mutant. **Mol. Microbiol.** 2:419–425, 1988

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

BRILL, W.J. Biological nitrogen fixation. **Sci. American**, v.236, p.68-81, 1977.

BROWNING, D.F., BEATTY, C.M., WOLFE, A.J., COLE, J.A BUSBY, S.J. Independent regulation of the divergent *Escherichia coli nrfA* and *acsPI* promoters by a nucleoprotein assembly at a shared regulatory region. **Mol. Microbiol.** 43: 687-701, 2002.

BURRIS, R.H. Minireview: Nitrogenases. **J. Biol. Chem.**, v.266, p.9339-9342, 1991.

BUSBY, S. e EBRIGHT, R.H. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). **J. Mol. Biol.** 293:199-213.1999.

CAMMACK, R., JACKSON, R. H., CORNISH-BOWDEN, A., COLE, J. A. Electron-spin-resonance studies of the NADH-dependent nitrite reductase from *Escherichia coli* K12. **Biochem J** 207(2):333-339, 1982.

CHUNG, C.T., MILLER, R.H. *Preparation and storage of competent Escherichia coli cells.* **Methods Enzymol** 218 621-7, 1993.

CHUNG, C.T., NIEMELA, S.L., MILLER, R.H. *One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86(7) 2172-5, 1989.

COLOMBO, M.V., GUTIÉRREZ, D., PALACIOS, J.M., IMPERIAL, J. e RUIZ-ARGUESO, T. A novel autoregulation mechanism of *fnrN* expression in *Rhizobium leguminosarum* bv viciae. **Mol. Microbiol.** 36:477-486, 2000.

CONSTANTINIDOU, C., HOBMAN, J.L., GRIFFITHS, L., PATEL, M.D., PENN, C.W., COLE, J.A e OVERTON, T.W. A Reassessment of the FNR Regulon and Transcriptomic Analysis of the Effects of Nitrate, Nitrite, NarXL, and NarQP as *Escherichia coli* K12 Adapts from Aerobic to Anaerobic Growth. **J. Biol. Chem.** 281(8) : 4802-4815, 2006.

COSSEAU, C. & BATUT, J. Genomics of the *ccoNOQP*-encoded *cbb3* oxidase complex in bacteria. **Arch. Microbiol.** 181:89–96, 2004

CRACK, J.C., GREEN, J., CHEESMAN, M.R., Le BRUN, N.E., THOMSON, A.J. Superoxide-mediated amplification of the oxygen-induced switch from [4Fe–4S] to [2Fe–2S] clusters in the transcriptional regulator FNR. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104, 2092–2097, 2007.

CRACK, J., GREEN, J., THOMSON, A. J. Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). **J. Biol. Chem.** 279, 9278–9286, 2004

CRUZ LM, SOUZA EM, WEBER OB, BALDANI JI, DÖBEREINER J., PEDROSA, FO. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Appl Environ Microbiol** 67:2375-2379, 2001.

de GIER, J.W., SCHEPPER, M., REIJNDERS, W. N. M., van DYCK, S. J., SLOTBOOM, D. J., WARNE, A., SARASTE, M., KRAAB, K., FINEL, M., STOUTHAMER, A. H., van SPANNING, R. J. M. e van der OOST, J. Structural and functional analysis of *aa3*-type and *ccb3*-type cytochrome c oxidase of *Paracoccus denitrificans* reveals significant differences in proton-pump design. **Mol. Microbiol.** 20: 1247-1260, 1996.

DELGADO, M.J., BEDMAR, E.J., e DOWNIE, J.A. Genes involved in the formation and assembly of rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation. **Adv Microb Physiol** 40 : 191–231, 1998.

DIBDEN, D.P., GREEN, J. *In vivo* cycling of the *Escherichia coli* transcription factor FNR between active and inactive states. **Microbiology** 151, 4063–4070, 2005.

DIEFFENBACH, C.W., DVEKSLER, G.S., **PCR primer: A Laboratory Manual.** 1° ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 714p, 1995.

DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Bioch. Biophys. Acta.** 127 : 285-294, 1966.

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

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant-bacteria interaction: Endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. **Cienc. Cult.**, v. 44, p. 310-313, 1992.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.; REIS, V.M. The role of biological nitrogen fixation to bio-energy programmes in the tropics. **EMBRAPA**, 2000.

DRUMMOND, M.; WHITTY, P.; WOOTTON, J. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. **EMBO J.**, v. 5, p. 441-447, 1986.

EADY, R.R.; POSTGATE, J.R. Nitrogenase. **Nature**, v.249, p.805-810, 1974.

EIGLMEIER K, HONORE N, IUCHI S, LIN EC, COLE ST. Molecular genetic analysis of FNR-dependent promoters. **Mol Microbiol** 3 (7) 869-78, 1989.

ENGEL, P., TRAGESER, M. and UNDEN, G. Reversible interconversion of the functional state of the gene regulator FNR from *Escherichia coli* in vivo by O<sub>2</sub> and iron availability. **Arch. Microbiol.** 156, 463- 470,1991.

FISCHER,H. M.; BRUDENER,T.; HENNECKE,H. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox activity and/or metal binding. **Nucl. Acids Res.**, v.16, p.2207-2224,1988.

FISCHER, H. Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. **Microbiol. Rev.** 58:152-386, 1994.

FLYNN, J. M., NEHER, S. B., KIM, Y. I., SAUER, R. T. AND BAKER, T. A. Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. **Mol. Cell.** 11, 671–683, 2003.

GAY, P., LE COQ, D., STEINMETZ, M., FERRARI, E., HOCH, J.A. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *B. subtilis*: expression of the gene in *E. coli*. **J. Bacteriol.** 153:1424-1431, 1983.

GARNERONE, A.M., CABANES, D., FOUSSARD, M., BOISTARD, P. e BATUT, J. Inhibition of the FixL sensor kinase by the FixT protein in *Sinorhizobium meliloti*. **J. Biol. Chem.** 274: 32500-32506. 1999.

GERASIMOVA AV, RODIONOV DA, MIRONOV AA, GEL'FAND MS. Computer analysis of regulatory signals in bacterial genomes. Fnr binding segments. **Mol Biol (Mosk)** 35(6);1001-9, 2001.

GOVANTES, F., ANDUJAR, E.; SANTERO, E. Mechanism of translational coupling in the *nifLA* operon of *Klebsiella pneumoniae*. **EMBO J.** 17:2368–2377, 1998.

GRABBE, R.; KLOPPROGGE, K., SCHMITZ, R. A. Fnr is required for NifL-dependent oxygen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*.**J. Bacteriol.** 183:1385–1393,2001

GRABBE, R.; SCHMITZ, R. A. Oxygen Control of *nif* Gene Expression in *Klebsiella pneumoniae* is dependent on NifL reduction at the cytoplasmic membrane by electrons derived from the reduced quinone pool. **European journal of biochemistry** 270, 1555–1566 2003.

GREEN, J.; BENNETT, B.; JORDAN, P.; RALPH, E. T; THOMSON, A. J; GUEST, J. R. Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch in vitro. **Biochem. J.**, v. 316, p. 887-892, 1996a.

GREEN, J.; ANJUM, M. F.; GUEST, J. R. The *ndh*-binding protein (Nbp) regulates the *ndh* gene of *Escherichia coli* in response to growth phase and is identical to Fis. **Mol. Microbiol.** 20: 1043–1055, 1996b.

GUEST, J. R., GREEN, J., IRVINE, A. S., SPIRO, S. The FNR modulon and FNR-regulated gene expression, p. 317–342. *In* LIN, E. C. C. e LYNCH, A. S **Regulation of gene expression in *Escherichia coli***. R. G. Landes Company, Austin, TX, 1996.

GUNSALUS, R. P., e PARK, S.J. Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons. **Res. Microbiol.**145:437–450, 1994.

GUTIÉRREZ, D., HERNANDO, Y., PALACIOS, J.M., IMPERIAL, J. e RUIZ-ARGUESO, T. FnrN controls symbiotic nitrogen fixation and hydrogenase activities in *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae UPM791. **J. Bacteriol.** 179:5264-5270, 1997.

HAUSER, F., PESSI, G.,FRIBERG, M., WEBER, C., RUSCA,N., LINDEMANN, A., FISCHER, H.M e HENNECKE,H. Dissection of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA  $\sigma^{54}$  regulon, and identification of a ferredoxin gene (*fdxN*) for symbiotic nitrogen fixation. **Mol. Genet. Genomics** 278:255–271, 2007

HENDERSON, N., AUSTIN, S., DIXON, R. A. Role of metal ions in negative regulation of nitrogen fixation by the *nifL* gene product from *Klebsiella pneumoniae*. **Mol. Gen. Genet.** 216:484–491, 1989.

HILL, S.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; DIXON, R. *Azotobacter vinelandii* NifL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 2143-2148, 1996.

HUBBEL, D. H.; KIDDER, G. Biological nitrogen fixation. **IFAS Extension**: University of Florida, SL16, 2003.

HYNES, M. F.; QUANDT, J.; O'CONNELL, M. P.; PUHLER, A. Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis sacB* gene.**Gene**, 78:111-120, 1989.

IUCHI, S., e LIN, E. C. C. Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. **Mol. Microbiol.** 9:9–15, 1993.

IMLAY, J. A. How oxygen damages microbes: oxygen tolerance and obligate anaerobiosis. **Adv. Microb. Physiol.** 46:111–153, 2002

JACKSON, R,H., CORNISH-BOWDEN, A., COLE, J.A. Prosthetic groups of the NADH-dependent nitrite reductase from *Escherichia coli* K12. **Biochem J** 193(3):861-867, 1981.

JAMES, E. K.; OLIVARES F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Crit. Rev. Plant Sci.**17: 77-119, 1998.

JERVIS, A.J., CRACK, J.C., WHITE, G., ARTYMIUK, P.J., CHEESMAN, M.R., THOMSON, A.J., Le BRUN, N.E., GREEN, J. The O<sub>2</sub> sensitivity of the transcription factor FNR is controlled by Ser24 modulating the kinetics of [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 106(12):4659-4664, 2009.

JONES, H. M., GUNSALUS, R.P. Regulation of *Escherichia coli* fumarate reductase (*frdABCD*) operon expression by respiratory electron acceptors and the *fnr* gene product. **J. Bacteriol.** 169:3340–3349, 1987.

KANG, Y. WEBER, K.D. QIU, YU. KILEY, P J. BLATTNER, F. Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K12 regulates a large number of genes of unknown function. **J. Bacteriol.** 187:1135 -1160, 2005.

KAHN, D., DAVID, M., DOMERGUE, O., DAVERAN, M.L., GHAI, J., Hirsch, P. R., e BATUT, J. *Rhizobium meliloti fixGHI* sequence predicts involvement of a specific cation pump in symbiotic nitrogen fixation. **J. Bacteriol.** 171:929-939, 1989.

KELLY, M.J.S., POOLE, R.K., YATES, M.G. e KENNEDY, C. Cloning and mutagenesis of genes encoding the cytochrome bd terminal oxidase complex in *Azotobacter vinelandii*: mutants deficient in the cytochrome d complex are unable to fix nitrogen in air. **J. Bacteriol.** 172: 6010-6019.

KHOROSHILOVA, N.; BEINERT, H.; AND KILEY, P.J. Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant FNR protein enhances DNA binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92:2499–2503, 1995.

KHOROSHILOVA, N., POPESCU, C., MUNCK, E., BEINERT, H., e KILEY, P.J. Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O<sub>2</sub>: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94:6087-6092, 1997.

KILEY, P. J., BEINERT, H. Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. **FEMS Microbiol. Rev.** 22:341-352, 1999

KILEY, P.J. and REZNIKO, W.S. Fnr mutants that activate gene expression in the presence of oxygen. **J. Bacteriol.** 173:16-22, 1991.

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

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.** 43:887-891, 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.** 181:165-170, 1999.

KLOPPROGGE, K.; GRABBE, R.; HOPPERT, M.; AND SCHMITZ, R.A. Membrane association of *Klebsiella pneumoniae* NifL is affected by molecular oxygen and combined nitrogen. **Arch. Microbiol.** 177(3): 223-34,2002.

KLOPPROGGE, K., and SCHMITZ, R.A. NifL of *Klebsiella pneumoniae*: redox characterization in relation to the nitrogen source. **Biochem. Biophys. Acta** 1431:462–470, 1990.

KOCH, H.G., WINTERSTEIN, C., SARIBAS, A.S., ALBEN, J.O. e DALDAL, F. Roles of the *ccoGHIS* gene products in the biogenesis of the *cbb3*-type cytochrome c oxidase. **J. Mol. Biol.** 297: 49– 65, 2000.

KOCH, H.G., HWANG, O. e DALDAL, F. Isolation and characterization of *Rhodobacter capsulatus* mutants affected in cytochrome *cbb3* oxidase activity. **J. Bacteriol.** 180, 969-978, 1998.

KOLB, A., BUSBY, S., BUC, H., GARGES, S. and ADHYA, S. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. **Annu. Rev. Biochem.** 62:749-795, 1993.

KÖRNER, H., SOFIA, H.J., ZUMFT, W. G. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcriptional regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. **FEMS Microbiol. Rev.** 27: 559-592, 2003.

LAMBDEN, P.R. and GUEST, J.R. Mutants of *Escherichia coli* unable to use fumarate as an anaerobic electron acceptor. **J. Gen. Microbiol.** 97:145-160, 1976.

LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G. ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics** 23 (21): 2947–2948, 2007.

LAZAZZERA, B.A., BATES, D.M. and KILEY, P.J. The activity of the *Escherichia coli* transcription factor FNR is regulated by a change in oligomeric state. **Genes Dev.** 7:1993-2005, 1993.

LAZAZZERA, B.A.; BEINERT, H.; KHOROSHILOVA, N.; KENNEDY, M.C.; AND KILEY, P.I. DNA-binding and dimerization of the Fe-S containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. **J. Biol. Chem.** 271: 2762–2768,1996.

LEI, S., PULAKAT, L., and GAVINI, N. Genetic analysis of *nif* regulatory genes by utilizing the yeast two-hybrid system detected formation of a NifLNifA complex that is implicated in regulated expression of *nif* genes. **J. Bacteriol.** 181:6535–6539, 1999.

LI, B., WING, H., LEE, D., WU, H.C. e BUSBY, S. Transcription activation by *Escherichia coli* FNR protein: similarities to, and differences from, the CRP paradigm. **Nucleic Acids Res.** 26, 2075-2081, 1998.

LOPEZ, O., MORERA, C., MIRANDA-RIOS, J., GIRARD, L., ROMERO, D. e SOBERON, M. Regulation of gene expression in response to oxygen in *Rhizobium etli* : role of FnrN in *fixNOQP* expression and in symbiotic nitrogen fixation. **J. Bacteriol.** 183: 6999-7006, 2001.

MACHADO, I. M. P. **Clonagem e sequenciamento dos genes estruturais *nifHDK* de *Herbaspirillum seropedicae*.** Tese de Doutorado em Ciências (Bioquímica). Editora da UFPR – Curitiba-Paraná, 1999.

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. Res.** 29:1599-1602, 1996.

MACDONALD, H., COLE, J. Molecular cloning and functional analysis of the *cysG* and *nirB* genes of *Escherichia coli* K12, two closely-linked genes required for NADH-dependent nitrite reductase activity. **Mol Gen Genet** 200(2):328-34, 1985.

MELVILLE, S. B., GUNSALUS, R. P. Mutations in *fnr* that alter anaerobic regulation of electron transport-associated genes in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 265:18733–18736, 1990.

MERRICK, M. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. **Biological nitrogen fixation.** New York: Chapman & Hall, 1992.

MESA, S., HAUSER, F., FRIBERG, M., MALAGUTI., FISCHER, H.M., e HENNECKE, H. Comprehensive Assessment of the Regulons Controlled by the FixLJ-FixK2-FixK1 Cascade in *Bradyrhizobium japonicum*. **J. Bacteriol** 190(2):6568–6579,2008.

METTERT, E. L., KILEY, P. J. ClpXP-dependent proteolysis of FNR upon loss of its O<sub>2</sub>-sensing [4Fe-4S] cluster. **J. Mol. Biol.** 354:220–232, 2005.

METTERT, E. L., KILEY, P. J. Contributions of [4Fe-4S]-FNR and Integration Host Factor to *fnr* transcriptional regulation. **J. Bacteriol.** 189: 3036-3043, 2007.

METTERT, E. L., OUTTEN, F. W., WANTA, B. KILEY, P. J. The impact of O<sub>2</sub> on the Fe–S cluster biogenesis requirements of *Escherichia coli* FNR. **J. Mol. Biol.** 384 : 798–811, 2008.

MILLER J. H. **Experiments in Molecular Genetics**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1992.

MONEY, T., JONES, T., DIXON, R.A., AUSTIN, S. Isolation and properties of the complex between the enhancer binding protein NifA and the sensor NifL. **J. Bacteriol.** 181:4461–4468, 1999.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.** 447:283-286, 1999a.

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

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Fnr Is Involved in Oxygen Control of *Herbaspirillum seropedicae* N-Truncated NifA Protein Activity in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 1527-1531, 2003.

MOORE, L.J., KILEY, P.J. Characterization of the dimerization domain in the FNR transcription factor. **J. Biol. Chem.** 276, 45744–45750, 2001

MOORE, L.J., METTERT, E.L., KILEY, P.J. Regulation of FNR dimerization by subunit charge. **J. Biol. Chem.** 281, 33268–33275C, 2006

MORETT, E.; SEGOVIA, L. The  $\sigma^{54}$  Bacterial Enhancer Binding-Protein Family: Mechanism of Action and Phylogenetic Relationship of Their Functional Domains. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 6067-6074, 1993.

MULLIS, K., FALOONA F. Specific Synthesis of DNA *in Vitro* via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. **Methods Enzymol** 155:335-350, 1987

NEES, D.W., STEINP, A. e LUDWIGR, A. The *Azorhizobium caulinodans nifA* gene : identification of upstream activating sequences including a new element, the 'anaerobox'. *Nucleic Acids Research* 16: 9839-9853, 1988.

NELLEN-ANTHAMATTEN, D., ROSSI, P., PREISIG, O., KULLIK, I., BABST, M., FISCHER, H.M. e HENNECKE, H. *Bradyrhizobium japonicum* FixK2, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels. **J. Bacteriol.** 180:5251–5255, 1998.

NOINDORF, L.; REGO, F.G.M.; BAURA, V.A.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.; e CHUBATSU, L.S. Characterization of the *orf1glnKAmB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.** v. 185, p. 55-62, 2006.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum*

spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biol. Fertil. Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.

OWCZARZY, R. TATAUROV, A.V. WU, Y. MANTHEY, J.A. MCQUISTEN, K.A. ALMABRAZI, H.G. PEDERSEN, K.F. LIN, Y. GARRETSON, J. McENTAGGART, N.O. SAILOR, C.A. DAWSON, R.B e PEEK, A.S. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic Acids Res.** 36 (Web Server Issue) w163-w169, 2008.

PASCAL, M. C., BONNEFOY, V. FONS, M., CHIPPAUX, M. Use of gene fusions to study the expression of *fnr*, the regulatory gene of anaerobic electron transfer in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.** 36:35–39, 1986.

PEDROSA, F.; YATES, G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr (gln)* type gene products. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 23, p. 95-101, 1984.

PEDROSA, F. O. Fixação biológica de nitrogênio: fértil idéia. **Ciência Hoje**, v. 6, p. 12-13, 1987.

PIMENTEL, J. P.; OLIVARES, F.; PITARD, R. M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans*. and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil**, v. 137, p. 61-65, 1991.

PITCHER, R.S. & WATMOUGH, N.J. The bacterial cytochrome *cbb3* oxidases. **Biochimica et Biophysica Acta** 1655: 388– 399, 2004

POMP D. e MADRANO, J.F. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. **Biotechniques** 10: 58–59, 1991.

POPESCU, C., BATES, D., MÜNCK, E., BEINERT, H. Mössbauer spectroscopy as a tool for the study of activation/inactivation of the transcription regulator FNR in whole cells of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 95:13431–13435, 1998

POOLE, R.K e HILL, S. Respiratory Protection of Nitrogenase Activity in *Azotobacter vinelandii*—Roles of the Terminal Oxidases. **Bioscience Reports.** 17(3),1997.

PREISIG, O., ANTHAMATTEN, D. e HENNECKE, H. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90: 3309-3313, 1993.

PREISIG, O., ZUFFEREY, R., HENNECKE, H. The *Bradyrhizobium japonicum* *fixGHIS* genes are required for the formation of the high affinity *cbb3*-type cytochrome oxidase, **Arch. Microbiol.** 165:297-305, 1996.

RAULFS, E. C., O'CARROLL, I. P., Dos SANTOS, P. C., UNCIULEAC, M. C., DEAN, D. R. In vivo iron–sulfur cluster formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 105 : 8591–8596, 2008.

REGO, F.G.M., PEDROSA, F.O., CHUBATSU, L.S., YATES, M.G., WASSEM, R., STEFFENS, M.B.R., RIGO, L.U., SOUZA, E.M. The expression of *nifB* from *Herbaspirillum seropedicae* is dependent upon the NifA and RpoN proteins. **Can J Microbiol** 52(12) 1199-1207, 2006.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Revs. Plant Sci.** 19: 227-247, 2000.

REYES-RAMIREZ, F., SAWERS, R. G. Aerobic activation of transcription of the anaerobically inducible *Escherichia coli* *focA-pfl* operon by fumarate nitrate regulator. **FEMS Microbiol. Lett.** 255:262–267, 2006.

ROBERTS, G. P., MACNEIL, T., MACNEIL, D., BRILL, W. J. Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.** 136:267–279, 1978.

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

SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., ERLICH, H. A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science** 239:487-491, 1988.

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

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

SAWERS, R.G., ZEHELEIN, E., BOËCK, A. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of *Escherichia coli* proteins: influence of various anaerobic growth conditions and the *fnr* gene product on cellular protein composition. **Arch. Microbiol.** 149:240-244, 1988.

SAWERS, R.G. Expression of *fnr* is constrained by an upstream IS5 insertion in certain *Escherichia coli* K-12 strains. **J. Bacteriol.** 187: 2609-2617, 2005.

SCHWARTZ, C.J., DJAMAN, O., IMLAY, J.A., KILEY, P.J. The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in *in vivo* Fe–S cluster formation in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97:9009–9014, 2000

SCHIMID, M., BALDANI, J. I., HARTMANN, A. The Genus *Herbaspirillum*. In: DWORKIN, D., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHEFLER, K-H., STACKBRANDT, E. **The Prokaryotes: a handbook on the Biology of Bacteria. Proteobacteria, Alpha and Beta subclasse**. New York: Springer, 2006. 141-150. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/gx93396gt4k10352/>>. Acesso em 03/11/2008.

SCHOLLHORN, R., BURRIS, R.H., Acetylene as a competitive inhibitor of N<sub>2</sub> fixation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 58 : 213-16, 1967.

SCHULTZ, S.C., SHIELDS, G.C., STEITZ, T.A. (1991) Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90°. **Science** 253:1001-1007, 1991.

SHALEL-LEVANON, S., SAN, K.Y., BENNETT, G.N. Effect of ArcA and FNR on the expression of genes related to oxygen regulation and the glycolysis pathway in *Escherichia coli* under microaerobic growth conditions. **Biotechnol. Bioeng.** 92: 147-159, 2005.

SHAW, D.J., GUEST, J.R. Nucleotide sequence of the *fnr* gene and primary structure of the Fnr protein of *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.** 10: 6119-6130, 1982.

SHAW, D.J., RICE, D.W. e GUEST, J.R. Homology between CAP and Fnr, a regulator of anaerobic respiration in *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.** 166: 241-247, 1983.

SHARROCKS, A., GREEN, J. GUEST, J. In vivo and in vitro mutants of FNR the anaerobic transcriptional factor of *Escherichia coli*. **FEBS Lett.** 270: 119-122, 1990.

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

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

SMITH T.K., LONG, C.M., BOWMAN, B. e MANOS, M.M. Using cosolvents to enhance PCR amplification. **Amplifications** 5:16-17, 1990 .

SOUZA, E. .M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F.O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.** 37: 425 – 429, 1991a.

SOUZA, E.M., FUNAYAMA, S., RIGO, L.U., YATES, M.G., e PEDROSA, F.P. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like

gene of *Herbaspirillum seropedicae* Z78. **J. Gen. Microbiol.** 137:1511-1522, 1991b

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L.U.; YATES, M.G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA Activity by Ammonium Ions and Oxygen. **J. Bacteriol.** 181: 681-684, 1999.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v. 146, p. 1407-1418, 2000.

SPIRO, S., e GUEST, J.R. Inactivation of the FNR protein of *Escherichia coli* by targeted mutagenesis in the N-terminal region. **Mol. Microbiol.** 2: 701-07, 1988.

SPIRO, S., e GUEST, J.R. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Rev.** 75:399–428, 1990.

STEINMETZ, M., Le COQ, D., DJEMIA, H.B. e GAY, P. Analyse génétique de *sacB*, gene de structure d'une enzyme sécrétée, la lévane-saccharase de *Bacillus subtilis* Marburg. **Mol. Gen. Genet.** 191:138-144, 1983.

SPIRO, S., GUEST, J.R. Regulation and over-expression of the *fnr* gene of *Escherichia coli*. **J. Gen. Microbiol.** 133: 3279–3288,1987.

SUTTON, V.R., KILEY, P.J. Techniques for Studying the Oxygen-Sensitive Transcription Factor FNR from *Escherichia coli*. **Methods Enzymol.** 370 : 300-312, 2003.

SUTTON, V.R., METTERT, E.L., BEINERT, H. e KILEY, P.J. Kinetic analysis of the oxidative conversion of the [4Fe–4S]<sub>2</sub><sup>+</sup> cluster of FNR to a [2Fe–2S]<sub>2</sub><sup>+</sup> cluster. **J. Bacteriol.** 186, 8018–8025, 2004.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. E GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22:4673–4680, 1994.

UNDEN, G., BECKER, S., BONGAERTS, J., SCHIRAWSKI, J., e SIX, S. Oxygen regulated gene expression in facultative anaerobic bacteria. **Antonie Leeuwenhoek** 66:3–23, 1994.

UNDEN, G.; BONGAERTS, J.; BECKER, S.; HOLIGHAUS, G.; SCHIRAWSKI, J.; SIX, S. O<sub>2</sub>-sensing and O<sub>2</sub>-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. **Arch. Microbiol.** 164: 81–90,1995

WANG, H., GUNSALUS, R.P. The *nrfA* and *nirB* nitrite reductase operons in *Escherichia coli* are expressed differently in response to nitrate than to nitrite. **J Bacteriol** 182(20):5813-5822, 2000.

WASSEM, R. **REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DO GENE *nifA* DE *Herbaspirillum seropedicae* PELAS PROTEÍNAS NTRC, NIFA E IHF**. Tese de Doutorado em Ciências (Bioquímica). Editora da UFPR – Curitiba-Paraná, 1999.

WASSEM, R.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; BUCK M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 756-764, 2000.

WASSEM, R.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; REGO, F. G. M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M. Control of autogenous activation of *Herbaspirillum seropedicae nifA* promoter by the IHF protein. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 212, p. 177-182, 2002.

WEBER, I.T., STEITZ, T.A. Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP reñned at 2.5 Å resolution. **J. Mol. Biol.** 198, 311-326, 1987.

WEISSENSTEINER, T. e LANCHBURY, J.S. Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing reactions. **Biotechniques** 21:1102–1108, 1996.

WOOTTON, J.C.; DRUMMOND, M. The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory protein. **Protein Eng**, v. 2, p. 535-543, 1989.

WU, G., CRUZ-RAMOS, H., HILL, S., GREEN, J., SAWERS, G. e POOLE, R.K. Regulation of cytochrome bd expression in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii* by CydR (Fnr): sensitivity to oxygen, reactive oxygen species, and nitric oxide. **J. Biol. Chem.** 275: 4679-4686, 2000.

YAN, A., KILEY, P.J. Techniques to Isolate O<sub>2</sub>-Sensitive Proteins: [4Fe–4S]-FNR as an Example. **Methods Enzymol.** 463 : 787-805, 2009.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H. ; EVANS, H. J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman & Hall, New York, p. 43-86, 1992.

YOUNG, J. P. W., DOWNER, H. L., EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **J. Bacteriol.** 173:2271–2277, 1991.