

CLÁUDIO LUIZ GUSSO

**Utilização de fontes alternativas de nitrogênio pelas  
estirpes selvagem (SMR1) e *ntnC* mutante (DCP286A)  
de *Herbaspirillum seropedicae***

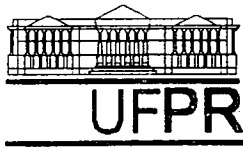
Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de  
Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia  
e Patologia, Setor de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Giseli Klassen

Co-orientador: Dr. Emanuel Maltempi de Souza

CURITIBA

2005

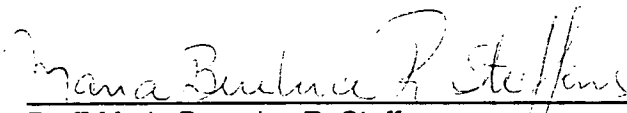


Ministério da Educação e Desporto  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SETOR DA SAÚDE**  
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

### PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "Utilização de fontes alternativas de nitrogênio pelas estirpes selvagem (SMR1) e *nrC* mutante (DCP286A) de *Herbaspirillum seropedicae*", de autoria do Pós-Graduando em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Cláudio Luiz Gusso, e com a Banca Examinadora constituída pelos Professores: Dr. Silvio Marques Zanata (Departamento de Patologia Básica-UFPR), Dr<sup>a</sup> Maria Berenice R. Steffens (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular-UFPR), Dr<sup>a</sup> Lia Sunie Nakao (Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde-PUCPR). Segundo a avaliação da Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado, o candidato foi Aprovado. Para a devida publicação, o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 22 de fevereiro de 2005.

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Giseli Klassen

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Maria Berenice R. Steffens

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Silvio Marques Zanata

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Lia Sunie Nakao

Cláudio Luiz Gusso

Utilização de fontes alternativas de nitrogênio pelas  
estirpes selvagem (SMR1) e *ntrC* mutante (DCP286A)  
de *Herbaspirillum seropedicae*

Dissertação de Mestrado aprovada como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Ciências – Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná pela Comissão Examinadora formada pelos professores:

Orientadora Prof<sup>ª</sup>. Giseli Klassen  
Departamento de Patologia Básica - UFPR

Prof<sup>ª</sup> Cyntia F. Pichet  
Departamento de Patologia Médica - UFPR

Prof<sup>ª</sup> Maria Berenice R. Steffens  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular -  
UFPR

Prof<sup>ª</sup> Lia Sunie Nakao  
Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC-  
PR

Curitiba

2005

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Professor Fábio de Oliveira Pedrosa pelo grande incentivo e pela oportunidade que me concedeu para realizar todo o meu trabalho no departamento de Bioquímica.

Agradeço ao departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná onde realizei todo o trabalho experimental.

Ao professor Emanuel Maltempi de Souza pela co-orientação, dedicação e paciência no decorrer deste trabalho.

À professora Giseli Klassen pela orientação desta dissertação e que em todos os momentos, mesmo distante, manteve-se disposta e solícita comigo.

Aos professores: Cynthia Picheth, Geraldo Picheth, Elaine Benelli, Leda Chubatsu, Leonardo Cruz, Liu Rigo, Maria Berenice, Rose Adele, Roseli Wassem.

Ao departamento de Patologia Básica.

À professora e coordenadora do curso do Pós-Graduação da Patologia Básica, Vanete Tomaz Soccol que, com muita competência, deu início e soube conduzir esse curso que sem dúvida terá grandes contribuições para o departamento e para a pesquisa.

Em especial ao meu colega de formação acadêmica, Júlio C. Possamai pelo companheirismo e incentivo.

Aos meus queridos cães companheiros e fiéis no qual tenho me dedicado com muito carinho ao longo dos anos.

Aos amigos do departamento, Ana Claudia, André Luis, Adriana, Augusto, Carolina, Daniela, Giovanna, Gustavo, Juliana, Helisson, Karen, Lílian, Luciano, Lysangela, Marcelo Assunção, Marcelo Santos, Marco Aurélio, Michele, Patrícia, Rafael, Stefan e Humberto.

A Dona Julieta e Roseli Prado por toda a atenção dispensada.

À minha querida colega de laboratório Fabiane Rego que tanto me ajudou no percurso desse trabalho.

Ao Salah pelas dicas prestadas, por sua perseverança na pesquisa e também por me convencer de que realmente é necessário saber um pouco de tudo para ter uma boa análise crítica.

Ao Valter pela ajuda, disposição e pelos bons momentos de distração.

À minha namorada Patricia Tesser que, com toda a paciência compreendeu as minhas jornadas de trabalho durante muitos finais de semana.

Com muito amor e fé à Deus pela minha saúde e disposição para realizar mais essa grande conquista.

Aos meus pais pelo carinho e incentivo nos estudos.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Fixação Biológica do Nitrogênio .....	1
1.2. O Complexo Nitrogenase .....	2
1.3. Assimilação do Nitrogênio.....	3
1.4. Sistema de Regulação do Nitrogênio (Ntr) na família de Enterobacteriaceae .....	5
1.5. A proteína NtrC.....	7
1.6. Regulação da proteína NtrC .....	8
1.7. O gene <i>rpoN</i> .....	9
1.8. Controle de Assimilação de Nitrogênio: o produto do gene <i>nac</i> .....	10
1.9. <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	17
1.10. JUSTIFICATIVA .....	19
1.11. OBJETIVOS.....	21
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	22
2.1. Estirpes e plasmídeos .....	22
2.2. Reagentes.....	22
2.3. Meios de cultivo .....	23
2.4. Estocagem das estirpes .....	25
2.5. Condições de cultivo .....	25
2.6. Antibióticos .....	25
2.7. Manipulação de DNA.....	26
2.7.1. Purificação de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> .....	26
2.7.2. Purificação de DNA plasmidial de <i>H. seropedicae</i> .....	27
2.7.3. Condições de digestão de DNA com enzimas de restrição .....	27
2.7.4. Preparo dos vetores.....	27

2.7.5. Ligação de DNA.....	28
2.8. Análise eletroforética de DNA plasmidial.....	28
2.9. Purificação de fragmentos de DNA.....	28
2.10. Preparo de células <i>E. coli</i> eletrocompetentes.....	29
2.11. Preparo de células <i>H. seropedicae</i> eletrocompetentes .....	29
2.12. Transformação por eletroporação .....	30
2.13. Reação de sequenciamento .....	30
2.14. Edição e análise das seqüências .....	31
2.15. Análise da utilização de fontes alternativas de nitrogênio pelas estirpes SMR1 e NtrC mutante (DCP286A).....	32
2.16. Análise da região promotora de gene do tipo <i>nac1</i> ( <i>pnac1</i> ) através da construção da fusão <i>lacZ</i> .....	32
2.16.1. Clonagem do <i>pnac1</i> no vetor pTZ18R.....	33
2.16.2. Clonagem do <i>pnac1</i> no vetor pMP220 (fusão <i>lacZ</i> ).....	35
2.17. Determinação da atividade de $\beta$ - galactosidase.....	37
2.18. Dosagem de proteínas.....	38
<b>3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>39</b>
3.1. Busca de gene <i>nac</i> no banco de dados do Genopar.....	39
3.2. Utilização de fontes alternativas de nitrogênio das estirpes de <i>H. seropedicae</i> SMR1 e DCP286A ( <i>ntrC</i> ) .....	39
3.3. Análise comparativa das proteínas do tipo Nac de <i>H. seropedicae</i> .....	44
3.3.1. Comparação entre as 3 prováveis proteínas do tipo Nac em <i>H. seropedicae</i> .....	46
3.3.2. Comparação entre as proteínas do tipo Nac de <i>H. seropedicae</i> com proteínas Nac de outros organismos.....	48
3.4. Análise <i>in silico</i> funcional das proteínas do tipo Nac de <i>H. seropedicae</i> ..	52
3.5. Análise da provável região promotora do gene do tipo <i>nac1</i> em <i>H. seropedicae</i> .....	53
3.5.1. Análises <i>in silico</i> da região regulatória.....	53
3.5.2. Subclonagem do fragmento de DNA contendo a provável região promotora do gene do tipo <i>nac1</i> de <i>H. seropedicae</i> .....	57

3.5.3. Análise da expressão do promotor <i>pnac1</i> : avaliação da atividade específica de $\beta$ - galactosidase .....	63
<b>4. Conclusões.....</b>	<b>71</b>
<b>5. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>72</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema do sistema Ntr em <i>E. coli</i> .....	6
<b>Figura 2</b>	Esquema representativo da estrutura geral dos reguladores LTTRs ....	11
<b>Figura 3</b>	Esquema geral da cascata regulatória NtrC – Nac em <i>K. aerogenes</i> ...	13
<b>Figura 4</b>	Mapa esquemático do vetor de clonagem multifuncional pTZ18R .....	34
<b>Figura 5</b>	Mapa esquemático do vetor de transcrição pMP220 e pPW450 .....	36
<b>Figura 6</b>	Curva de crescimento de <i>H. seropedicae</i> SMR1 e DCP286A.....	42
<b>Figura 7</b>	Provável região promotora do gene da prolina permease .....	44
<b>Figura 8</b>	Localização dos genes do tipo <i>nac</i> e genes adjacentes no genoma de <i>H. seropedicae</i> .....	45
<b>Figura 9</b>	Alinhamento das três proteínas do tipo Nac de <i>H. seropedicae</i> .....	47
<b>Figura 10</b>	Alinhamento das proteínas do tipo Nac de <i>H. seropedicae</i> com Nac de <i>E. coli</i> e <i>K. aerogenes</i> .....	49
<b>Figura 11</b>	Análise das proteínas do tipo Nac pelo PROSITE .....	52
<b>Figura 12</b>	Sequência de nucleotídeos do provável promotor do gene do tipo <i>nac1</i> .....	55
<b>Figura 13</b>	Comparações de sítios para NtrC-P.....	54
<b>Figura 14</b>	Comparação do sítio para $\sigma^{70}$ .....	56
<b>Figura 15</b>	Comparação do sítio para $\sigma^{54}$ .....	56
<b>Figura 16</b>	Mapa de restrição de gene do tipo <i>nac1</i> obtido do banco de dados de <i>H. seropedicae</i> .....	58
<b>Figura 17</b>	Perfil de restrição do plasmídeo pHS24 com a enzima <i>HincII</i> .....	58
<b>Figura 18</b>	Esquema representativo da primeira etapa de clonagem para fusão <i>pnac1-lacZ</i> .....	59
<b>Figura 19</b>	Perfil de restrição do plasmídeo pFRAL .....	60
<b>Figura 20</b>	Fragmento <i>pnac1</i> ( <i>EcoRI</i> e <i>PstI</i> ) clonado no vetor de transcrição pMP220 .....	61
<b>Figura 21</b>	Perfil de restrição e confirmação da fusão <i>pnac1-lacZ</i> .....	62
<b>Figura 22</b>	Atividade específica de $\beta$ - galactosidase da estirpe SMR1 de <i>H. seropedicae</i> .....	63
<b>Figura 23</b>	Análise qualitativa da atividade $\beta$ - galactosidase .....	65

**Figura 24** Modelo de regulação proposto para utilização de fontes alternativas de nitrogênio em *H. seropedice*.....69

### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Estirpes e plasmídeos .....	22
<b>Tabela 2</b> Lista de antibióticos e concentrações .....	26
<b>Tabela 3</b> Tabela comparativa das proteínas Nac .....	48
<b>Tabela 4</b> Características das proteínas Nac de <i>E. coli</i> , <i>K. aerogenes</i> e <i>H. seropedicae</i> .....	53

### LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>pb</b>	pares de base de nucleotídeos
<b>BSA</b>	albumina de soro bovino (Bovine Sera Albumin)
<b>D.O.</b>	densidade óptica
<b>HTH</b>	hélice-volta-hélice (Helix-turn-Helix)
<b>LTTR</b>	Regulador transcricional do tipo LysR (LysR Type Transcription Regulator)
<b>Nac</b>	Controle da Assimilação do Nitrogênio (Nitrogen Assimilation Control)
<b>Ntr</b>	Sistema de Regulação do Nitrogênio
<b>kb</b>	quilopares de bases nucleotídicas

## RESUMO

*H. seropedicae* foi estudado no contexto do metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio. A provável existência de um gene do tipo *nac* no genoma deste organismo foi investigada. Para isso inicialmente caracterizamos o crescimento da estirpe mutante *ntrC*, DCP286A, em fontes alternativas de nitrogênio porque sabia-se através do estudo em outros organismos que o gene *nac* é dependente da proteína NtrC-P para sua expressão. Os resultados da análise fisiológica da utilização de fontes alternativas de nitrogênio mostraram a dependência parcial ou total da proteína NtrC-P para o catabolismo da uréia, L-alanina, L-serina e L-prolina. Um modelo de regulação foi proposto mostrando o provável envolvimento da proteína NtrC-P na utilização dessas fontes de nitrogênio. Uma pesquisa no banco de dados do Genopar indicou a presença de três prováveis proteínas do tipo Nac (Nac1, Nac2 e Nac3) e as análises comparativas revelaram que essas proteínas estão em regiões distintas do genoma. As seqüências de aminoácidos das proteínas do tipo Nac de *H. seropedicae* foram traduzidas e comparadas entre si e os dados revelaram apenas 7,8% de identidade e 23 % de similaridade. Estas seqüências foram também alinhadas com as ortólogas Nac de *E. coli* e *K. aerogenes*. Os dados revelaram maior identidade para a proteína do tipo Nac1 (27% de identidade), seguida da Nac2 (22%) e Nac3 (16%). Essas proteínas são pertencentes à família LysR de reguladores transcricionais e apresentam um motivo hélice-volta-hélice na região N-terminal que é o fragmento mais conservado dessas três proteínas e portanto, característica de todas LTTRs. A provável região promotora do gene do tipo Nac1 foi clonada no vetor de transcrição pMP220 originando a fusão *pnac1::lacZ*. A análise da expressão de *pnac1* revelou que a proteína NtrC-P não é um ativador da transcrição desse gene. Os resultados sugerem que as proteínas do tipo Nac1, Nac2 e Nac3 apresentam funções diferentes das proteínas Nac já estudadas e talvez e provavelmente sem envolvimento com o metabolismo de nitrogênio em *H. seropedicae*.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Fixação Biológica do Nitrogênio

A vida neste planeta depende de reciclagem de elementos como carbono, oxigênio, enxofre, nitrogênio. O nitrogênio, depois o carbono, hidrogênio e oxigênio, é o elemento químico quantitativamente mais abundante na matéria viva e constitui aproximadamente 79% da atmosfera terrestre na sua forma molecular  $N_2$ , conhecida como dinitrogênio ou nitrogênio molecular. Entretanto, por estar em sua maioria na atmosfera, é um dos elementos mais escassos nos solos e é metabolicamente indisponível para a maioria dos seres vivos. O elemento nitrogênio é um constituinte essencial da matéria viva porque constituem as principais macromoléculas orgânicas: proteínas e ácidos nucleicos (POSTGATE, 1982).

O processo de redução industrial do  $N_2$  pode ocorrer quimicamente a altas temperaturas e pressões pelo processo conhecido como Haber-Bosch, o qual emprega uma mistura de  $H_2$  e  $N_2$  submetida a temperaturas de 400 a 500°C e pressões de milhares de kilopascals (kPa), pois a molécula de dinitrogênio é constituída por dois átomos de nitrogênio unidos por uma tripla ligação diazo, extremamente estável e requer uma alta energia de ativação para reagir com outros compostos (SCHLOGL, 2003).

A obtenção de nitrogênio pela maioria dos organismos vivos ocorre através de compostos orgânicos como aminoácidos ou nucleosídeos e através de compostos inorgânicos, mais comumente sais de nitrato e amônio. Na natureza existem grupos de bactérias que reduzem o nitrato presente no solo a dinitrogênio ( $N_2$ ) atmosférico. Essa via de redução do ciclo do nitrogênio é chamada de denitrificação e alguns gêneros responsáveis por esse processo incluem: *Pseudomonas*, *Micrococcus* e *Thiobacillus*. Portanto, a denitrificação causa uma grande perda do nitrogênio biológico presente na água e solo.

Entretanto, um número restrito de microrganismos chamados de diazotrofos, isoladamente ou em simbiose, sintetiza um complexo enzimático chamado nitrogenase, capaz de reduzir a molécula de nitrogênio combinando seus átomos com hidrogênio formando amônia, sob condições ambientes de temperatura e pressão, pelo processo chamado de fixação biológica de nitrogênio

(LJONES, 1979).

Os diazotrofos são responsáveis pelo processo de compensação da grande perda de nitrogênio na atmosfera (POSTGATE, 1998) e contribuem com aproximadamente 60% do nitrogênio fixado no planeta sendo, portanto, essenciais para a manutenção do ciclo do nitrogênio (BURNS e HARDY, 1975).

As estimativas da fixação biológica do nitrogênio da atmosfera são bastante imprecisas, mas sabe-se que a fixação industrial para a produção de fertilizantes nitrogenados representa uma parcela muito menor que o total do nitrogênio fixado biologicamente pela natureza (POSTAGATE, 1998).

Os diazotrofos podem ser simbióticos, de vida livre ou associativos. Os diazotrofos simbióticos formam nódulos de fixação nas leguminosas e os mais intensamente estudados devido as suas importâncias agrônômicas são da família *Rhizobiaceae*. Dentre os microrganismos de vida livre destacam-se as espécies *Rhodobacter capsulatus*, *Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Clostridium pasteurianum*. Entre os associativos, *Azospirillum brasilense*, *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* merecem destaque, e estes dois últimos também recentemente denominado endofíticos encontram-se no interior de raízes, colmos e folhas de gramíneas como trigo, milho, sorgo e cana-de-açúcar (BALDANI et al. 1986; DOBEREINER, 1992a, 1992b).

Embora as plantas e animais vivam em um ambiente abundante de nitrogênio, por ser inacessível são necessários suplementos com derivados de alto custo deste elemento nos sistemas agrícolas. Portanto, a fixação biológica do nitrogênio representa uma economia nacional de milhões de toneladas de uréia e nitrato, principalmente na soja que é cultivada utilizando o N<sub>2</sub> obtido pela fixação em simbiose com rizóbio. Em relação a fertilizantes nitrogenados, a produção brasileira é de 1 milhão de toneladas para uma demanda de 1,7 milhões, sendo esta diferença suprida pela importação (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2003).

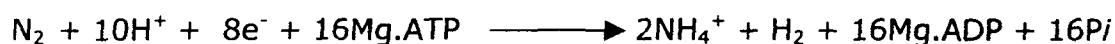
## **1.2 O complexo NITROGENASE**

Os diazotrofos fixam nitrogênio porque possuem genes que codificam proteínas que compõem um complexo enzimático denominado nitrogenase. Este

complexo é composto por duas metaloproteínas: a proteína ferro (proteína Fe) e a proteína molibdênio-ferro (proteína MoFe) (GEORGIADIS *et al.*, 1992; DEAN *et al.*, 1993). A proteína Fe assimila elétrons provenientes do metabolismo do organismo transferindo-os para a proteína MoFe que possui um cofator metálico chamado FeMoco onde se liga o nitrogênio (GEORGIADIS *et al.*, 1992).

O complexo não é altamente específico podendo reduzir vários substratos diferentes contendo dupla ou tripla ligação (acetileno, cianeto de hidrogênio, óxido nitroso e ciclopropeno) (POSTGATE, 1982). A redução do acetileno a etileno tem sido o método de determinação da atividade da nitrogenase (SCHOLLHORN e BURRIS, 1967).

A reação catalisada pelo complexo nitrogenase (POSTGATE, 1982) segue abaixo:

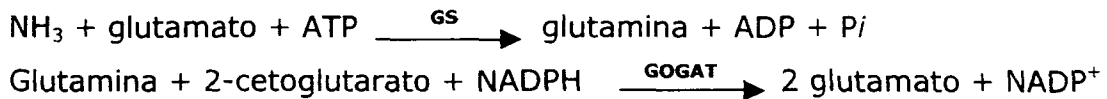


A fixação de nitrogênio pelos diazotrofos requer condições favoráveis como: ausência de amônia, baixas tensões de oxigênio, presença de molibdênio e temperatura adequada (POSTGATE, 1982).

Esta reação envolve um alto custo energético para a célula, por essa razão este processo é extremamente regulado tanto na atividade da nitrogenase como na expressão de seus genes (POSTGATE, 1982). O processo de regulação do metabolismo de nitrogênio tem sido intensamente estudado em diversos organismos.

### **1.3 Assimilação do Nitrogênio**

Glutamato e glutamina são os principais doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas de todas as células. As reações catalisadas pelas enzimas responsáveis pela biossíntese de glutamato e glutamina (MERRICK e EDWARDS, 1995) estão representadas a seguir.

Reações da incorporação de nitrogênio:

A glutamina sintetase (GS) é uma enzima codificada pelo gene *glnA* cuja expressão é regulada dependendo dos níveis de nitrogênio celular e sua atividade pode ser regulada por modificação covalente reversível (REITZER e MAGASANIK, 1985). A GS pode ser adenililada em suas 12 subunidades idênticas e esta modificação pós-traducional ocorre em resposta a um aumento no nitrogênio intracelular (DEUEL e STADTMAN, 1970; JANSSEN *et al.*, 1988). Essa regulação é importante para a manutenção dos níveis de glutamato em condições de aumento de amônio permitindo um rápido crescimento ou em baixo amônio economizando ATP para sintetizar glutamina (reação catalisada pela GS no esquema acima). A enzima que catalisa a adenililação da GS é a adenililtransferase (ATase) e esta é codificada pelo gene *glnE* (MERRICK e EDWARDS, 1995).

A síntese de GOGAT é reprimida num meio rico em nitrogênio na forma de aminoácidos, bases de ácidos nucléicos e amônia pelo regulon Lrp (leucine-responsive regulatory proteins) (ERNSTING *et al.*, 1993).

A incorporação do amônio via GS/GOGAT ocorre em níveis de 0,1 mmol/L. Em alguns organismos, inclusive enterobactérias, o amônio em níveis próximos de 1mmol/L é assimilado pela enzima glutamato desidrogenase (GHD). Esta enzima é codificada pelo gene *gdhA* (MERRICK e EDWARDS, 1995). A reação catalisada pela GDH é:



Em síntese, a via GDH é utilizada quando as células crescem em alta concentração de nitrogênio, enquanto que a via GS/GOGAT ocorre em condições limitantes de nitrogênio.

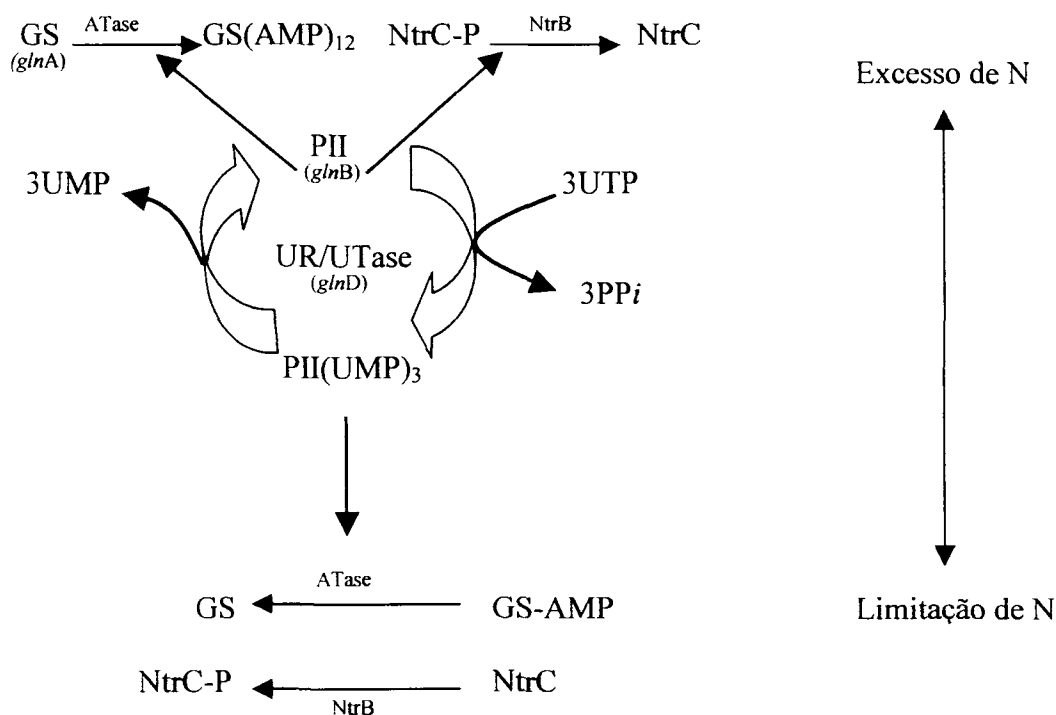
#### 1.4 Sistema de Regulação do Nitrogênio (Ntr) na família de *Enterobacteriaceae*

O amônio é a fonte preferencial de nitrogênio para o crescimento bacteriano sendo que proporciona a maior velocidade de crescimento, no entanto outras fontes de nitrogênio podem ser utilizadas por bactérias. A utilização das diversas fontes alternativas de nitrogênio é regulada por um sistema de proteínas extremamente regulado e responsável pelo metabolismo do nitrogênio celular. A síntese e, em alguns casos, a atividade destas proteínas é regulada pela disponibilidade de  $\text{NH}_4^+$  no meio (MERRICK e EDWARDS, 1995).

O sistema de regulação do nitrogênio (Ntr) é composto por quatro proteínas: GlnD (produto do gene *glnD*) que possui atividades de uridililtransferase ou enzima removedora de uridilil (UTase/UR), PII e um sistema de dois componentes composto pela proteína histidina quinase NtrB e sua proteína regulatória NtrC codificados pelos genes *ntrB* e *ntrC* respectivamente (MERRICK e EDWARDS, 1995).

Em meio limitante de nitrogênio (Figura 1) a relação glutamina/2-cetoglutarato diminui e a proteína GlnD uridilila PII em cada uma das 3 subunidades e essa forma resultante é a  $\text{PII}(\text{UMP})_3$ . A proteína PII uridililada promove a atividade da ATase de desadenililação da GS, ativando-a. Ainda, em condições limitantes de nitrogênio, a proteína PII uridililada favorece que a proteína NtrB atue na fosforilação da proteína ativadora de transcrição NtrC, resultando na forma NtrC-P que age como ativadora de promotores do tipo  $\sigma^{54}$  (ARCONDÉGUY, 2001).

Inversamente, sob condições suficientes de amônio no meio, a atividade enzima removedora de uridilil (UR) da GlnD predomina e PII é desuridililada. Nesta forma PII promove a atividade de adenililação da Atase e GS passa a GS-AMP. A UTase/UR e PII agem como sensores do nitrogênio intracelular. Nessas mesmas condições, a proteína NtrB apresenta atividade fosfatásica sob NtrC inativando-a (MERRICK e EDWARDS, 1995; ARCONDÉGUY, 2001).



**Figura 1. Esquema do sistema Ntr em *E. coli* (MERRICK e EDWARDS, 1995)**

O gene que codifica a glutamina sintetase (GSI), a qual está envolvida na assimilação de amônio em *E. coli*, *glnA*, é expresso por dois promotores *glnAp1* e *glnAp2*. Este gene faz parte de um operon *glnAntrBC* onde os produtos dos genes *ntrB* e *ntrC*, NtrB e NtrC são co-transcritos (NINFA, REITZER e MAGASANIK, 1987).

Em *E. coli*, sob condições suficientes de nitrogênio, *glnA* é expresso por *glnAp1* a qual é transcrito pela RNA polimerase utilizando a subunidade  $E\sigma^{70}$ . Sob condições limitantes de nitrogênio, a expressão de *glnA* ocorre a partir de *glnAp2*, um promotor reconhecido pela subunidade  $\sigma^{54}$ . Estes promotores são dependentes de uma proteína ativadora e neste caso, *glnAp2* é ativado pela forma fosforilada de NtrC que se liga a dois sítios, a 110 e 140 pb a montante do início de transcrição. Portanto, a proteína NtrC fosforilada sobrepõe a região *glnAp1* e serve para reprimir a expressão de *glnAp1* enquanto ativa a transcrição de *glnAp2* pela RNA polimerase contendo o fator  $\sigma^{54}$  (MERRICK e EDWARDS, 1995).

## 1. 5 A proteína NtrC

Os genes *ntrBC* foram identificados em *Azotobacter vinelandii* (TOUKDARIAN E KENNEDY, 1986), *Vibrio* (MAHARAJ et al., 1989), *Proteus vulgaris alginolyticus* (STEGLITZ-MORS DORF, MORS DORF e KALTWASSER, 1993), *Thiobacillus ferrooxidans* (KILKENNY, BERGER E RAWLINGS, 1994), *Rhizobium leguminosarum* (MORENO et al., 1992), *Bradyrhizobium japonicum* (MARTIN, CHAPMAN E CHELM, 1988), *Azorhizobium caulinodans* (PAWLOWSKI, et al., 1987), *Agrobacterium tumefaciens* (ROSSBACH, SCHELL e BRUIJN, 1987), *Rhodobacter capsulatus* (KRANZ e HASELKORN, 1985), *Azospirillum brasilense* (LIANG, ARSENE e ELMERICH, 1993), *Herbaspirillum seropedicae* (PERSUHN et al., 2000), e ainda em alguns outros organismos como exemplo *Shewanella violacea* (IKEGAMI et al., 2000), *Brucella suis* (DORREL et al., 1999). A ligação *glnA* e *ntrBC* em um mesmo operon foi observado somente em *Vibrio alginolyticus*, *Proteus vulgaris*, *A. vinelandii*. (MERRICK e EDWARDS, 1995), *E. coli* (REITZER e MAGASANIK, 1985), *K. pneumoniae* (ESPIN et al., 1982) e *H. seropedicae* (PERSUHN et al., 2000).

Em enterobactérias, os genes transcricionalmente regulados pelas proteínas NtrBC incluem *glnAntrBC* (REITZER e MAGASANIK, 1985); genes que codificam sistemas de transporte para glutamina (*glnHPQ*) (NOHNO E SAITO, 1987), arginina (*argT*) e histidina (*hisJQMP*) (SCHMITZ et al., 1987); os genes necessários para a assimilação de nitrato e nitrito (*nasFEDCBA*) (GOLDMAN, LIN e STEWART, 1994); os genes regulatórios da fixação do nitrogênio *nifLA* de *K. pneumoniae* (ESPIN et al., 1982) e o gene de regulação do controle de assimilação do nitrogênio (*nac*) de *K. pneumoniae* (COLLINS, GUTMAN e LAMAN, 1993), *K. aerogenes* (MACALUSO, BEST e BENDER, 1990), *E. coli* (MUSE e BENDER, 1998), além de *Salmonella typhi* (SHERBURNE et al., 2000).

Até 2000 havia sido descrito que a proteína NtrC em *E. coli* controla 25 operons, o que equivale aproximadamente 2% dos genes presentes nesse organismo (ZIMMER et al., 2000). Sob controle direto de NtrC foram descritos os genes do operon *glnAntrBC*, *glnKamtB*, os operons relacionados ao transporte de glutamato (*gltIJKL*), glutamina (*glnHPQ*), D-ala (*ddpXABCDE*), histidina (*hisJQMP*), aminoácidos básicos (*argT*), aminoácidos polares (*yhdWXYZ*),

regulador do transporte de cátions (*chaBC*), o operon relacionado ao catabolismo de arginina (*astCADBE*), regulador do metabolismo de enxofre (*clb*), *nar* (nitrato redutase) e o gene *nac* (ZIMMER et al., 2000).

Mutantes do gene *ntrC* de proteobactérias em geral apresentam deficiência de crescimento em nitrato, como ocorre em *H. seropedicae* (MERRICK e EDWARDS, 1995; PERSUHN et al., 2000).

### 1.6 Regulação da proteína NtrC

Para ativar a transcrição de seus genes alvo NtrC precisa estar em sua forma fosforilada NtrC-P (NINFA, REITZER e MAGASANIK, 1987). Essa proteína possui três domínios distintos (DRUMMOND, WHITTY e WOOTTON, 1986). O domínio central é característico das proteínas ativadoras dependentes de  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ) o qual interage com a RNA polimerase contendo  $\sigma^{54}$  ( $E\sigma^N$ ) para ativar a transcrição por esta enzima. A NtrC-P possui uma atividade ATPase que é essencial para a formação do complexo aberto pela  $\sigma^{54}$  (AUSTIN e DIXON, 1992). Esta atividade ATPase é estimulada pela ligação ao DNA e pela fosforilação no domínio N-terminal (MERRICK e EDWARDS, 1995).

A ligação ao DNA é mediada pelo domínio C terminal o qual contém um motivo típico hélice-volta-hélice (CONTRERAS e DRUMMOND, 1988). Este motivo permite o reconhecimento pela NtrC-P de seqüências ativadoras e intensificadoras a montante (upstream), que estão localizadas cerca de 100pb da seqüência promotora onde  $E\sigma^{54}$  se liga. A determinação do sítio de ligação da proteína NtrC-P levou a uma seqüência consenso GCAC-N5-TGGTGCA (REITZER e MAGASANIK, 1985). A função da seqüência intensificadora é facilitar a oligomerização da proteína que é requerida para a ativação transcricional e segurar a NtrC-P próximo ao promotor e assim aumentar sua freqüência de contato com  $E\sigma^{54}$  (KLOSE et al., 1994; WEDEL et al., 1991).

Em alguns fixadores de nitrogênio estudados como *H. seropedicae*, NtrC-P é essencial para a fixação de nitrogênio devido à ativação dos genes da *nifA* e *glnAntrBC* sob condições limitantes de nitrogênio (PEDROSA et al., 2001; PERSHUN et al., 2000). Em *E. coli* e *Azorhizobium caulinodans* a expressão do operon *glnKamtB* é controlada por NtrBC (VAN HEESWIJK, 1996; MICHEL-

REYDELLET *et al.* 1998). Em *A. brasilense* NtrBC estão presentes porém não são necessários para ativar os genes da fixação de nitrogênio (LIANG, ARSENE e ELMERICH, 1993).

### 1.7 O gene *rpoN*

Esse gene codifica para o fator  $\sigma^{54}$  também conhecido como  $\sigma^N$  (HUNT e MAGASANIK, 1985). Ainda que o fator  $\sigma^{54}$  seja capaz de se ligar ao DNA na ausência da enzima RNA polimerase, sua afinidade é intensamente aumentada no contexto de holoenzima (associada a RNA polimerase) (BUCK e CANNON, 1992). Esse fator confere à enzima RNA polimerase a habilidade de reconhecer e iniciar a transcrição de promotores bacterianos tipo -24/-12. A holoenzima RNA polimerase contendo o fator  $\sigma^{54}$  se liga aos promotores -24/-12 para formar um complexo fechado estável e transcricionalmente silencioso. A transcrição se inicia quando a holoenzima  $E\sigma^{54}$  forma um complexo transcricionalmente aberto, um processo dependente da hidrólise de ATP (WANG, CAREY e GRALLA, 1992).

Em 2001 REITZER e SCHENEIDER encontraram que em *E. coli*, aproximadamente 30 operons são dependentes do fator  $\sigma^{54}$  e que a metade destes operons está envolvida no metabolismo de nitrogênio. Os genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio que são dependentes do fator  $\sigma^{54}$  em *E. coli* são o operon *glnKamtB* (*glnK* paróloga de PII que atua como sensor em baixos níveis de amônio impedindo a inibição da fixação de nitrogênio em *K. pneumoniae* (HE *et al.*, 1998; JACK, ZAMAROCZY e MERRICK, 1999) e *amtB* transportador de amônio, *astCADBE* (catabolismo de arginina), *nac* (controle de assimilação de nitrogênio), *glnALG* (assimilação de nitrogênio e regulação da resposta do sistema Ntr) *glnHPQ* (transporte de glutamina), *argT-hisJQMP* (transporte de arginina e histidina) *ycjJ* (suposto transportador de aminoácidos) (REITZER e SCHENEIDER, 2001).

RpoN em *A. brasilense* está envolvida na ativação da fixação de nitrogênio, crescimento em nitrato, transporte de amônio e biossíntese de flagelo (MILCAMPs *et al.*, 1996).

Em *H. seropedicae* o gene *rpoN* é transcrito em um operon e estirpes mutantes desse gene são deficientes no transporte de metilamônio (REGO -

comunicação pessoal).

### **1.8 Controle de Assimilação de Nitrogênio: o produto do gene *nac***

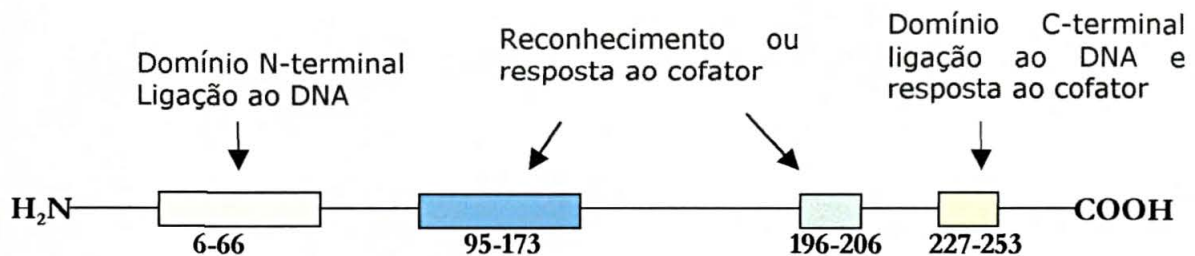
Um conjunto de enzimas reguladas pela disponibilidade de nitrogênio celular e envolvidas na utilização de fontes alternativas de nitrogênio na ausência de amônia, é dependente da expressão do gene *nac* em *K. aerogenes* e *E. coli* (SCHWACHA e BENDER, 1993a; MUSE e BENDER, 1998). A proteína Nac em *K. aerogenes* e *E. coli* é um dímero, com massa molecular de 32 kDa por subunidade e é um membro da família LysR de reguladores transcricionais (SCHWACHA e BENDER, 1993a). Acredita-se que a família LysR seja a maior família de proteínas regulatórias em procariontes e atualmente são reconhecidos ~800 reguladores transcricionais pertencentes às LTTRs (LysR Type Transcriptional Regulators) (ZAIM e KIERZEK, 2003), na grande maioria como dímeros, de tamanhos similares (300-350 aminoácidos) e autoregulatórios (SCHELL, 1993; SCHWACHA e BENDER, 1993a). LysR é uma proteína reguladora transcricional da biossíntese de lisina em *E. coli* e como LysR foi o primeiro membro deste grupo a ser estudado detalhadamente, este grupo é conhecido como família LysR (HENIKOFF *et al.*, 1988).

Estudos e análises de similaridade entre os membros LTTRs identificaram um domínio N-terminal (aproximadamente os 60 primeiros resíduos de aminoácidos) que contém o motivo hélice-volta-hélice (HTH) responsável pela ligação ao DNA. A porção central (resíduos 21-40) dessa região altamente conservada representa a estrutura e função do motivo HTH; dois domínios envolvidos no reconhecimento e/ou resposta ao cofator (resíduos 100-173 e 196-253) e um domínio C-terminal envolvido na ligação ao DNA e resposta ao cofator (resíduos 227-253) (Figura 2).

Em geral membros das LTTRs se ligam em regiões promotoras através de uma seqüência consenso de 15 pares de base, que é o espaço onde o motivo HTH se liga ao DNA em uma posição comum (em torno de 65 pares de base a montante do início de transcrição) (HENIKOFF *et al.*, 1988 e SCHELL, 1993). A região N-terminal é a mais conservada dos reguladores transcricionais do tipo LysR onde a maior similaridade está representada pelo motivo HTH (HENIKOFF

*et al.*, 1988 e SCHELL, 1993).

Os membros LTTRs ativam a transcrição de operons envolvidos em diversas funções, como: biossíntese de aminoácidos, fixação de CO<sub>2</sub>, resistência a antibióticos, regulação de fatores de virulência, nodulação para bactérias fixadoras de nitrogênio, resposta ao stress oxidativo ou catabolismo de compostos aromáticos. A grande maioria dos pertencentes das LTTRs são proteínas citoplasmáticas solúveis e reprimem sua própria expressão (autoregulação negativa) (SCHELL, 1993).



**Figura 2. Esquema representativo da estrutura geral dos reguladores LTTRs (SCHELL, 1993).**

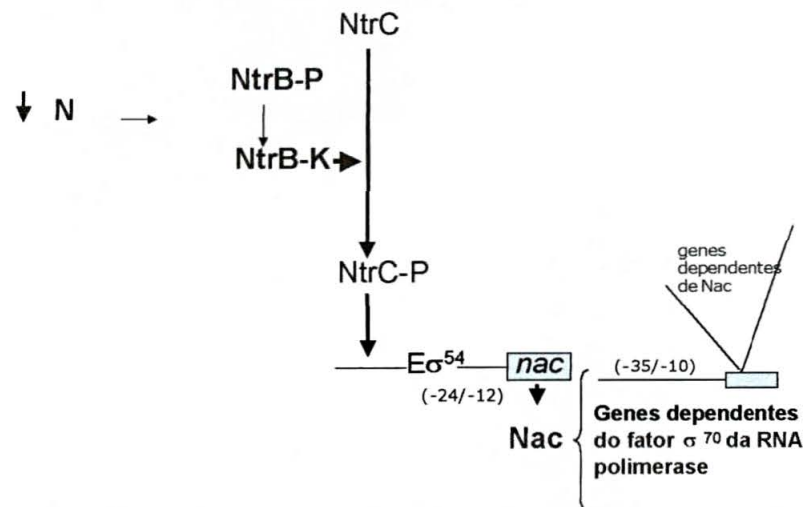
A grande maioria dos membros LTTRs necessita da interação com um cofator para ativar a transcrição onde o cofator provoca uma alça no DNA ou uma nova interação LTTR-DNA aumentando a afinidade do complexo LTTR-cofator-DNA com a RNA polimerase. Alguns exemplos de interação com cofatores são descritos para a proteína OxyR que possivelmente interage com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e atua contra o estresse oxidativo; a proteína AmpR age na ativação da  $\beta$  - lactamase na presença de derivados  $\beta$  - lactâmicos; CynR que interage com cianato e atua na detoxificação desse elemento (SCHELL, 1993). Entretanto, em *K. aerogenes* e *E. coli* Nac difere da maioria dos membros LTTRs pois não necessita de um cofator para ativar a transcrição, ele por si só é um regulador (MUSE e BENDER, 1998; SCHWACHA e BENDER, 1993a).

A proteína Nac foi primeiro estudada em *K. aerogenes* em 1983 (BENDER *et al.*). Os autores demonstraram o papel crucial de Nac na ativação ou repressão da síntese de certas enzimas em condições limitantes de nitrogênio, onde estirpes *nac* mutantes eram incapazes de reprimir a expressão da

glutamato desidrogenase (*gdh*) que utiliza a fonte de nitrogênio preferencial (amônia) para formar glutamato e ainda, essas estirpes não foram capazes de utilizar prolina (*putP*), histidina (*hutUH*) e uréia (*ure*) (MACALUSO, BEST e BENDER, 1990) como única fonte de nitrogênio em comparação às estirpes de *K. aerogenes* com *nac* funcionando. Em outro trabalho, estirpes *nac* mutantes de *K. aerogenes* demonstraram o mesmo fenótipo quanto à regulação desses operons, no entanto, experimentos complementares demonstraram que as mutações no gene *nac* não afetaram a regulação da glutamina sintetase, asparaginase ou triptofano permease. Portanto, os autores propuseram duas classes de operons regulados pela disponibilidade de nitrogênio; uma classe onde o sistema Ntr ativa diretamente operons dependentes da RNA polimerase contendo o fator  $\sigma^{54}$  (glutamina sintetase, asparaginase ou triptofano permease) e outra classe onde o sistema Ntr ativa o gene *nac* e o produto Nac é suficiente para regular operons dependentes de  $\sigma^{70}$  (RNAP $\sigma^{70}$ ) (*hutUH*, *putP*, *ure*, *gdh* e *gltB*) (MACALUSO, BEST e BENDER, 1990; SCHWACHA e BENDER, 1993b).

Em *K. aerogenes* o sistema NTR e o fator  $\sigma^{54}$  (RNAP $\sigma^{54}$ ) são necessários para a ativação da expressão do gene *nac* em resposta a limitação de nitrogênio (FENG *et al.*, 1995a), nesse caso o sistema NTR está envolvido apenas na ativação da expressão do gene *nac*, que uma vez formado, não apresenta nenhuma função na regulação dos operons dependentes de  $\sigma^{70}$  (SCHWACHA e BENDER, 1993a e 1993b). Em síntese, a proteína Nac permite o acoplamento de operons transcritos pela RNA polimerase contendo o fator  $\sigma^{70}$  ao sistema de regulação de nitrogênio (Ntr) o qual utiliza a RNA polimerase contendo  $\sigma^{54}$  (BENDER, 1991) (Figura 3). Nac em *E. coli* e *K. aerogenes* também regula negativamente a sua própria transcrição através da dobra que causa no DNA impedindo o contato da proteína NtrC-P com RNAP $\sigma^{54}$  (FENG *et al.*, 1995b; MUSE e BENDER, 1998).

### Esquema geral da função regulatória da proteína Nac em *Klebsiella aerogenes*



**Figura 3: Esquema geral da cascata regulatória NtrC – Nac em *K. aerogenes* segundo Feng et al. (1995).**

Alguns dos operons regulados por Nac em *K. aerogenes* estão ausentes em *E. coli* (*hut* e *ure*) ou não são regulados (*dadAB* e *gdhA*) ou são pouco regulados pela disponibilidade de nitrogênio (*putP*) (JANES e BENDER, 1998; MUSE e BENDER, 1998).

Comparações da proteína Nac de *E. coli* com Nac de *K. aerogenes* demonstraram que as proteínas têm 80% de identidade entre si. A maior parte da seqüência divergente entre a proteína Nac de *E. coli* e *K. aerogenes* ocorre nos dois terços da região C-terminal da proteína. E ainda concluiu-se que todas as funções da proteína Nac provavelmente estariam presentes somente nos 100 resíduos de aminoácidos da região N-terminal (MUSE e BENDER, 1999).

POMPOSIELLO, JANES e BENDER (1998) construíram uma série de promotores quiméricos através da fusão de um fragmento de 26 pares do promotor de *hutUH* de *K. aerogenes* com o promotor *lacZ* de *E. coli*. Foi mostrado que o espaço de 64 pares de base do início da transcrição é a posição ideal onde a proteína Nac se liga no promotor *hutUH*. Os autores concluíram que esse espaçamento é necessário para uma série de contatos com o complexo transcricional resultando em uma forte ativação do promotor.

O mecanismo pelo qual Nac pode ativar ou reprimir a transcrição é

diverso, no entanto, Nac se liga em regiões promotoras envolvendo 15 pares de base. Nac pode ativar a transcrição a partir de uma variedade de posições a montante da RNA polimerase sendo que o consenso de ativação é ATA-N<sub>6</sub>-TNGTAT e o consenso para repressão é ATAA-N<sub>8</sub>-GAT (POMPOSIELO, JANES e BENDER, 1998).

Em *K. aerogenes* estudos envolvendo metabolismo da alanina demonstraram que este aminoácido tem um papel importante no crescimento e fisiologia das enterobactérias (NEIDHARDT e UMBARGER, 1996). O catabolismo da alanina resulta em amônia e piruvato, portanto a alanina fornece fontes de carbono, de nitrogênio e energia à célula (JANES e BENDER, 1998). O catabolismo da alanina requer duas enzimas envolvidas no processo de degradação deste aminoácido, codificadas pelo operon *dadAB*, a racemase que converte a L-alanina em D-alanina e a D-aminoácido desidrogenase que catalisa a conversão da D-alanina em piruvato e amônia (REITZER, 1996). Em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio o operon *dadAB* de *K. aerogenes* é ativado pela proteína Nac (JANES e BENDER, 1998).

O isolamento de mutantes Nac de *K. aerogenes* demonstrou que as funções de ativação nos operons *hut* e *ure* e a repressão de *gdhA* são separadas. Foi demonstrado que dois sítios de ligação para Nac em *gdhA* são necessários para repressão e que a interação entre esses dois sítios é essencial para repressão (GOSS, JANES e BENDER, 2002). Portanto, este grupo concluiu que a repressão da expressão de *gdhA* por Nac é transcricional. A repressão da expressão de *gdhA* é mediada pela ligação da proteína Nac em dois sítios diferentes no DNA, nas regiões -89 e +57 do início da transcrição de *gdhA*. Mutações pontuais nas regiões conservadas de ligação de Nac no DNA, acarretam na perda parcial da função da proteína Nac (POMPOSIELLO, JANES e BENDER, 1998), isso sugere que o sítio de ligação para Nac pode tolerar alterações consideráveis na região consenso ainda retendo alguma habilidade para ocorrer ligação com Nac. (GOSS, JANES e BENDER, 2002). Recentemente foi descrito que mutantes Nac negativos retém a habilidade de ativar a transcrição de *ure* e *hut*, mas falham em reprimir a transcrição de *gdhA*. Nesses mutantes a capacidade de ligação da proteína Nac ao DNA não é afetada e a falha em reprimir o promotor de *gdhA* é, possivelmente, devido a não formação

de tetrâmeros ou possivelmente oligômeros maiores de Nac que são fundamentais para esse processo (JANES, ROSARIO e BENDER, 2003).

Nac pode também estar envolvido na regulação de *codBA* (codifica para utilização de citosina) (MUSE, ROSARIO e BENDER, 2003) em *E. coli*. A utilização de citosina como única fonte de nitrogênio ocorre através da enzima citosina desaminase que cliva a citosina em amônia (fonte de nitrogênio) e uracil (fonte de pirimidina). O gene que codifica para a citosina desaminase faz parte de um operon *codBA*, onde *codB* codifica para citosina permease e *codA* para citosina desaminase. A transcrição do operon *codBA* em *E. coli* é regulada pelo sistema NTR em resposta ao nível de nitrogênio celular. A expressão de *codBA* é aumentada em condições limitantes de nitrogênio. Em *E. coli* foi encontrado uma seqüência consenso na região promotora do operon *codBA* ATA-N<sub>9</sub>-TAT onde se liga a proteína Nac. Cepas mutantes no gene *nac* de *E. coli* cresceram mais vagorosamente do que cepas selvagens em meios contendo citosina como única fonte de nitrogênio. Portanto, a presença de um sítio para a proteína reguladora Nac na região promotora de *codBA* e o crescimento lento de cepas *nac* mutantes quando citosina foi utilizada como única fonte de nitrogênio, sugeriu que Nac está envolvida na regulação de *codBA*. (MUSE, ROSARIO e BENDER, 2003).

Foi demonstrado que a proteína Nac ativa a transcrição de vários genes e operons que codificam proteínas transportadoras como, *dAB*, *nupC* e *gabDTPC*, os quais fornecem à célula compostos orgânicos nitrogenados (POGGIO *et al.*, 2002). Em *E. coli* e *K. aerogenes* a asparagina é sintetizada pela ação de duas enzimas: AsnA que utiliza ácido aspártico e amônia para produzir asparagina e AsnB, que utiliza ácido aspártico e glutamina como substratos (REITZER e MAGASANIK, 1982). POGGIO *et al.* (2002) verificaram que a transcrição de *asnA* e *asnC* em *E. coli* é controlada pela disponibilidade de nitrogênio no meio e ainda, é controlada pelo sistema NTR através da proteína ativadora Nac. A regulação da expressão do gene *asnA* pela disponibilidade de amônia implica que AsnA sintetiza asparagina somente sob condições de suficiência de amônia no meio, enquanto que sob condições limitantes de nitrogênio, a amônia é preferencialmente assimilada pela glutamina sintetase (GS) para formar glutamina. Em condições limitantes de nitrogênio, a proteína Nac diretamente

reprime a transcrição de *asnC*. É sabido que AsnC controla positivamente a expressão de *asnA*, portanto Nac ao reprimir *asnC*, diminui a expressão de *asnA* (POGGIO *et al.*, 2002).

BLAUWKAMP *et al.* (2002) sugeriram que a alta expressão da proteína Nac em *E. coli* sob condições limitantes de nitrogênio resulta em uma redução na biossíntese de serina, por repressão do promotor de *serA* (gene que codifica para serina). O papel da Nac parece limitar a biossíntese de serina como um mecanismo celular de reduzir o metabolismo coordenadamente quando a célula se encontra limitada em fontes de nitrogênio.

Em 2000 ZIMMER *et al.*, determinaram através de análises de microarranjo os níveis de mRNA e revelaram a existência de 9 operons (25 genes) regulados pela proteína Nac em *E. coli* e que a maioria destes operons codifica proteínas de transporte de compostos nitrogenados, citados a seguir: b1440-1444 (provável gene de transporte da putrecina), *dppABCDF* (transporte de dipeptídeos), *fkIB-cycA* (transporte de D-alanina, D-serina e glicina), *gabDTP* (metabolismo do GABA), *nupC* (transporte de nucleosídeos), *ompF* (proteína F de membrana externa), *oppABCD* (transporte de oligopeptídeos), *yedL* (função desconhecida) e *yhiE* (função desconhecida) (ZIMMER *et al.*, 2000). Recentemente, RUBACK e REITZER verificaram que o operon *gab* (transporte de catabolismo do ácido gama-aminobutírico) também é regulado pela proteína Nac (observações não publicadas).

Até o momento estudos envolvendo produto do gene *nac* não foram publicados em organismos aeróbicos ou em nenhum outro organismo além dos citados.

Em síntese, Nac possui a propriedade de ativar operons envolvidos no catabolismo de histidina (*hutUH*), uréia (*ure*), prolina (*putP*), alanina (*dadAB*) e citosina (*codBA*) ou de reprimir operons como *gdhA* (glutamato desidrogenase), *gltBD* (glutamato sintetase), *asnC* (síntese de asparagina), *serA* (síntese de serina) e *nac*, e além disso Nac só é sintetizada sob condições limitantes de nitrogênio.

### 1.9 *Herbaspirillum seropedicae*

*H. seropedicae* é um diazotrofo que foi isolado da rizosfera ou da superfície de raízes de milho, sorgo e arroz (BALDANI *et al.*, 1986) e tem sido também isolado de cana-de-açúcar, abacaxizeiro e bananeira (PIMENTEL, *et al.*, 1991; BALDANI *et al.*, 1992; MAGALHÃES *et al.*, 2001). Esta bactéria pertencente à subdivisão  $\beta$  das proteobactérias (YOUNG, 1992) é Gram negativa, vibrióide, com diâmetro de 0,6 a 0,7  $\mu\text{m}$  e tamanho variando de 1,5 a 5  $\mu\text{m}$  conforme o meio de cultivo utilizado. São microrganismos aeróbios, móveis, que fixam nitrogênio em condições de microaerofilia (BALDANI *et al.*, 1986).

Atualmente sabe-se que *H. seropedicae* é um microrganismo endofítico. Ao contrário do observado com *A. brasilense*, este microrganismo não sobrevive em solos isentos de raízes (BALDANI *et al.*, 1992). Este tipo de associação diazotrofo-planta talvez explique os altos níveis de fixação de nitrogênio obtidos com diferentes gramíneas principalmente em cana-de-açúcar (DOBEREINER, 1992b). A expressão dos genes *nif* de *H. seropedicae* foi observada em associação com as raízes, caules e folhas de gramíneas como milho, trigo, sorgo e arroz (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003).

*H. seropedicae* já teve diversos genes isolados e caracterizados. Os genes *nifHD* e parte do gene *nifK* de que codificam para as proteínas Ferro e Molibdênio Ferro respectivamente (MACHADO *et al.*, 1996). A jusante a estes genes foram seqüenciados os genes *nifENXorf1orf2* formando um superoperon *nifHDKENXorf1orf2* (KLASSEN *et al.*, 1999). A inativação de *nifX* ou da *orf1* em *H. seropedicae* não alterou a atividade da nitrogenase sugerindo que estes genes não são essenciais para a atividade da nitrogenase (KLASSEN *et al.*, 1999). Entretanto são essenciais em condições limitantes de ferro e molibdênio (KLASSEN *et al.*, 2003). Até 2001 haviam sido identificados os genes *nifA*, *nifB*, *nifQmodABCfixXC*, *recA*, *recX*, *glnB*, *glnKamtB*, *glnAntrBC* além da caracterização das funções de seus produtos (SOUZA *et al.*, 1991; MACHADO *et al.*, 1996; STEFFENS *et al.*, 1993; GALVÃO *et al.*, 2003; KLASSEN *et al.*, 1999; PEDROSA *et al.*, 2001; BENELLI *et al.*, 1997; PEDROSA *et al.*, 1997; PERSUHN *et al.*, 2000). Para demonstrar a função do gene *ntrC* em *H. seropedicae* um mutante deste gene foi construído através da inserção do transposon Tn5-B20 resultando na

estirpe DCP286A. Três fenótipos foram identificados nesse mutante: Nif, incapacidade de utilizar nitrato com fonte de nitrogênio e diminuição da expressão e das atividades biossintética e transferásica da glutamina sintetase (GS) (PERSUHN *et al.*, 2000).

## 1.10 JUSTIFICATIVA

Somente parte dos genes de *H. seropedicae* envolvidos no metabolismo de nitrogênio já foram isolados e caracterizados. O projeto de sequenciamento do genoma de *H. seropedicae*, vem sendo realizado pelo consórcio GENOPAR, que estabeleceu uma rede de laboratórios no Estado do Paraná com competência em Biologia Molecular e Genômica e tem permitido a identificação de novos genes cujas funções poderão ser inferidas por comparação de seqüências no banco de genes NCBI e usando o programa Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

O grupo do Núcleo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, apoiado pelo MCT/PADCT/FINEP/CNPq tem como propósito entender os mecanismos básicos envolvidos na regulação da expressão dos genes da fixação de nitrogênio e no controle da atividade de seus produtos e suas interações em *H. seropedicae* e *A. brasilense*. Estes estudos visam a construção de estirpes mais eficientes destes microrganismos para uso na Agricultura. Estima-se que o uso destes organismos na Agricultura Brasileira representará uma economia anual da ordem de US\$ 420.000.000,00 em fertilizantes nitrogenados. O uso desta bactéria na Agricultura Paranaense poderá trazer uma economia anual em fertilizantes nitrogenado para o agricultor da ordem de U\$ 115 milhões de dólares, o que plenamente justifica o investimento de recursos públicos neste programa.

Em dezembro de 2004 o sequenciamento foi oficialmente finalizado estimando um tamanho do genoma em torno de 5,7 Mb. Ao longo do processo foi possível procurar genes de interesse no banco genômico do Genopar, isolar o DNA do gene de interesse e estudar a regulação desse gene bem como caracterizar as funções da proteína codificada.

Tendo então a possibilidade de acesso ao Banco Genômico de *H. seropedicae* (apesar de ainda não estar liberado para o público) com a autorização do Coordenador do Consórcio Genopar o professor Fábio de Oliveira Pedrosa, foi procurado o gene *nac* buscando ampliar o conhecimento do metabolismo de nitrogênio deste microrganismo.

Uma análise prévia do genoma em fevereiro de 2003 mostrou que *H. seropedicae* possuía um gene do tipo *nac* no seu genoma. Como o produto deste

gene em enterobactérias está envolvido no metabolismo de nitrogênio, surgiu o interesse de esclarecer se havia relação funcional ou regulatória de *Nac* em *H. seropedicae*. Posteriormente com análises periódicas foram encontrados mais dois genes do tipo *nac* e por essa razão no decorrer deste trabalho foi preciso acrescentar mais alguns objetivos a fim de analisar os genes em estudo.

## 1.11 OBJETIVOS

### Objetivos Gerais

Estudar a fisiologia do mutante *ntrC* de *H. seropedicae* quanto à utilização de fontes alternativas de nitrogênio para posterior utilização no estudo do provável gene tipo *nac* (nitrogen assimilation control).

### Objetivos específicos

1 - Estudar o crescimento do mutante *ntrC* de *H. seropedicae* em fontes alternativas de nitrogênio.

2 - Comparar as proteínas do tipo Nac de *H. seropedicae* quanto a similaridade e identidade e análise funcional através de programas de computador e compará-las com as ortólogas Nac de *E. coli* e *K. aerogenes*.

3 - Analisar a região promotora do provável gene do tipo *nac1* de *H. seropedicae* e seqüências regulatórias de expressão do gene.

4 - Clonar e estudar a expressão de um dos prováveis genes do tipo *nac* em estirpes de *H. seropedicae* SMR1 (wt) e DCP286A (mutante *ntrC*).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Estirpes e plasmídeos

As estirpes e plasmídeos utilizados estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1. Estirpes e plasmídeos**

<b>Estirpe</b>	<b>Genótipo Relevante</b>	<b>Fonte ou Referência</b>
<b><i>H. seropedicae</i></b>		
SMR1	Estirpe selvagem Sm <sup>R</sup>	SOUZA <i>et al.</i> , 1999
DCP286A	SMR1 <i>ntnC::Tn5-B20 (ntnC)</i> Sm <sup>R</sup> ; Km <sup>R</sup>	PERSHUN <i>et al.</i> , 2000
<b><i>E. coli</i></b>		
DH10B	Sm <sup>r</sup> ; F' [ <i>proAB<sup>+</sup> lacZΔM15</i> ]	GRANT <i>et al.</i> , 1990
<b>Vetores</b>		
pUC18/19	Amp <sup>R</sup>	PHARMACIA
pTZ18R	Amp <sup>R</sup> , CbR <i>lacZ</i> , <i>f1</i>	MEAD <i>et al.</i> , 1986
pMP220	Tc <sup>R</sup> , contém o gene <i>lacZ</i> sem promotor	SPAINK <i>et al.</i> , 1987
<b>Plasmídeos</b>		
pHS24	Vetor pUC19R contendo a suposta região promotora e o gene do tipo <i>nac1</i> de <i>H. seropedicae</i> inserido no sítio <i>Sma</i> I do vetor.	Projeto Genopar
pFRAL	Vetor pTZ18R contendo a suposta região promotora do gene do tipo <i>nac1</i> de <i>H. seropedicae</i> inserido no sítio <i>Sma</i> I do vetor	Este trabalho
pCLG25	Vetor pMP220 contendo a suposta região promotora do gene do tipo <i>nac1</i> de <i>H. seropedicae</i> inserido nos sítios <i>Eco</i> RI e <i>Pst</i> I do vetor.	Este trabalho
pCWG2aZ	pPW452::2,6 Kb <i>Bgl</i> II/ <i>Eco</i> RI pBMR507 (promotor do gene <i>recX</i> de <i>H. seropedicae</i> ).	GALVÃO <i>et al.</i> , 2003

### 2.2 Reagentes

Enzimas e reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Company, Merck

Company, InVitrogen, Amershan e British Drug House (BDH).

### 2.3 Meios de Cultura

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB (Luria Broth), TB (Terrific Broth) ou LA (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989). Para o preparo de células eletrocompetentes e recuperação das estirpes *E. coli* foram utilizados os meios SOB e SOC respectivamente.

Composição do meio:

<b>Luria Broth</b>	<b>gramas/litro</b>
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

O pH final foi corrigido para 7,0 com solução de NaOH 1 mol/L. O meio sólido LA foi preparado a partir do meio LB pela adição de 15 g/L de ágar ao meio líquido.

O meio TB apresenta a seguinte composição:

<b>Terrific Broth</b>	<b>gramas/litro</b>
Bacto triptona	12,0
Extrato de levedura	24,0
Glicerol	4,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,31
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,54

Os meios SOC e SOB apresentam a seguinte composição:

<b>SOB</b>	<b>gramas/litro</b>
Bacto triptona	20,0
Extrato de levedura	5,0
NaCl	0,5

O pH final foi corrigido para 7,0 com solução de NaOH 1 mol/L.

O meio SOC é idêntico ao meio SOB com a adição de 20 mmol/L de glucose. A solução de glucose foi esterilizada por filtração (filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ ).

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHP (PEDROSA e YATES, 1984), apresentando a seguinte composição:

<b>NFbHP</b>	<b>gramas/litro</b>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	$2 \times 10^{-1}$
NaCl	$1 \times 10^{-1}$
CaCl <sub>2</sub>	$2 \times 10^{-2}$
Ácido nitrilo-triacético	$5,6 \times 10^{-2}$
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	$2 \times 10^{-2}$
Malato de sódio	5,0
Biotina	$1 \times 10^{-4}$
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	$2 \times 10^{-3}$
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	$2,35 \times 10^{-3}$
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	$2,8 \times 10^{-3}$
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	$8 \times 10^{-5}$
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	$2,4 \times 10^{-4}$
<b>Solução de fosfatos:</b>	<b>gramas/litro</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	120
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80

As soluções de fosfato (50 ml/L) e de cloreto de amônio (20 mmol/L)

foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio no momento do uso. O meio resultante (NFbHPN) apresentou pH final de 6,8.

As fontes de nitrogênio utilizadas foram cloreto de amônio, nitrato de potássio, uréia, L-alanina, L-serina, L-prolina e glutamato. Os aminoácidos e a uréia foram esterilizadas por filtração (filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ ).

O meio NFbHP sólido foi preparado pela adição de 15 g/L de ágar ao meio líquido.

#### **2.4 Estocagem das estirpes**

Estoques de *E. coli* e *H. seropedicae* foram mantidos em glicerol 50% a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.5 Condições de cultivo**

As estirpes *H. seropedicae* foram cultivadas em meio líquido NFbHP (PEDROSA e YATES, 1984) suplementado com cloreto de amônio 20 mmol/L ou 2 mmol/L ou glutamato 5 mmol/L ou fontes alternativas de nitrogênio (uréia, L-serina, L-alanina, L-prolina e nitrato de potássio na concentração de 10 mmol/L) sob agitação de 140 rpm a  $30^{\circ}\text{C}$ . Os inóculos em meio sólido NFbHP suplementado com cloreto de amônio 20 mmol/L ou 1mmol/L foram crescidos em estufa a  $30^{\circ}\text{C}$ .

As estirpes de *E. coli* foram crescidas em Terrif Broth (TB) e Luria Broth (LB) sob agitação de 140 rpm a  $37^{\circ}\text{C}$ . Os inóculos em meio sólido LA foram crescidos a  $37^{\circ}$  por 18 horas.

#### **2.6 Antibióticos**

Os antibióticos utilizados para seleção de estirpes de *E. coli* e *H. seropedicae* estão listados na Tabela 2. Os antibióticos ampicilina (em forma de sal de sódio), estreptomicina (em forma de sulfato) foram dissolvidos em água e esterilizados por filtração (0,22  $\mu\text{m}$ ) e conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O antibiótico tetraciclina (em forma de hidrocloreto) foi dissolvido em etanol 70% diretamente

em um recipiente estéril sem filtração (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989).

**Tabela 2. Lista de antibióticos e concentrações**

<b>ANTIBIÓTICO</b>	<b>SOLUÇÃO-ESTOQUE (mg/mL)</b>	<b>CONCENTRAÇÃO FINAL (µg/mL)</b>
Ampicilina (Ap)	250	250 <sup>a</sup>
Tetraciclina (Tc)	10	10 <sup>a/b</sup>
Canamicina (Km)	100	50 <sup>a</sup> e 500 <sup>b</sup>
Estreptomicina (Sm)	80	20 <sup>a</sup> e 80 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> : *Escherichia coli*

<sup>b</sup> : *Herbaspirillum seropedicae*

## 2.7 Manipulação de DNA

### 2.7.1 Purificação de DNA plasmidial de *E. coli*

O isolamento e a purificação de DNA foram realizados pelo método de lise alcalina (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989). Estirpes de *E. coli* contendo os plasmídeos de interesse foram cultivadas em 10 mL de meio Terrific Broth (TB) ou Luria Broth (LB) sob agitação de 140 rpm a 37°C por 18 horas. As células (1.5 mL da cultura saturada) foram centrifugadas e ressuspensas em 100 µL de tampão GET (Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8,0; glicose 50 mmol/L e EDTA 10 mmol/L). As células foram lisadas com 200 µL de uma solução contendo NaOH 0,2 mol/L e SDS 1% (m/v). A seguir foi adicionado 200 µL de acetato de potássio 3,0 mol/L pH 4,8 e incubação por 10 minutos em gelo. Após nova centrifugação de 5 minutos (13.000) a solução aquosa foi extraída, misturada a 100 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e agitado em agitador de tubos (tipo Vortex). Após centrifugação o sobrenadante contendo DNA plasmidial foi incubado por 20 minutos com 2,5 volumes de etanol absoluto, centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o DNA lavado com etanol 80%. O DNA foi secado

a vácuo e dissolvido em 15  $\mu$ L de água miliq e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.7.2 Purificação de DNA plasmidial de *H. seropedicae***

A purificação de plasmídeos de *H. seropedicae* foi realizada por meio de uma adaptação do método proposto por KADO e LIU (1981). Uma alíquota de 1,5 mL da cultura saturada ( $\text{Abs}_{600} = 2,0$ ) foi centrifugada a 13.000 rpm por 1 minuto. O meio de cultura foi descartado e as células foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de GET (D-glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L pH 8,0 e Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0). As células foram lisadas com 200  $\mu$ L de uma solução de Tris-HCl 1 mmol/L pH 8,0, NaOH 0,2 mol/L e 50  $\mu$ L SDS 10% e homogeneizadas por 10 minutos.

Foram adicionados ao conteúdo lisado 500  $\mu$ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), seguido de homogeneização lenta através de inversões do tubo. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 20 minutos, sendo o sobrenadante transferido para outro tubo e precipitado com 2 volumes de etanol 95% (v/v). O precipitado formado foi novamente centrifugado, seco em câmara de vácuo e ressuspensão em 10  $\mu$ L de água miliq.

### **2.7.3 Condições de digestão de DNA com enzimas de restrição**

As condições utilizadas para a digestão de DNA com enzimas de restrição foram aquelas especificadas pelo fabricante ou por SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989.

Usualmente 1 U de enzima foi utilizada para digestão de 0,2 a 1  $\mu$ g de DNA em um volume final de 20 $\mu$ L, durante 4 horas, na presença do tampão adequado e na temperatura especificada para cada enzima.

### **2.7.4 Preparo dos vetores**

Os vetores foram digeridos (linearizados) com as enzimas de restrição apropriadas. A confirmação das digestões foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8%. As enzimas foram inativadas à  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. O DNA

(vetor) foi precipitado com etanol absoluto, seco a vácuo e dissolvido em água miliq.

### **2.7.5 Ligação de DNA**

A reação de ligação segue as especificações do fabricante da T4 DNA ligase ou como descrito por SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989). O vetor linearizado foi ligado ao inserto numa proporção aproximada de 1:5 (vetor:inserto) utilizando tampão de ligação e 0,8 U T4 DNA ligase. A incubação foi a 16°C durante a noite. No caso de ligação em pontas cegas, a mistura vetor-inserto foi aquecida a 65°C por 5 minutos e resfriada em gelo antes da adição do tampão e da enzima (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989).

### **2.8 Análise eletroforética de DNA plasmidial**

A eletroforese de DNA foi feita em gel de agarose horizontal (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989).

O tampão de corrida utilizado foi o TBE 1X concentrado (Tris-base 89 mmol/l, ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 2 mmol/L pH 8,0) e a solução de aplicação de amostra em gel de agarose foi FSUDS [azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol 0,25% (p/v), Ficoll 25% (p/v), SDS 0,5% (p/v), Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 e EDTA 1 mmol/L pH 8,0].

O DNA foi visualizado após tratamento com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 20 minutos em transiluminador de luz ultravioleta (312 nm) e o perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema de vídeo acoplado ao EpiChemi II Darkroom (UVP BioImaging Systems).

### **2.9 Purificação de fragmentos de DNA**

Após a restrição do DNA plasmidial ( $\pm 5 \mu\text{g}$ ) com enzimas apropriadas, o fragmento de DNA a ser purificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,0% de baixo ponto de fusão em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,0). As bandas de interesse foram cortadas sob

iluminação com luz ultravioleta e o fragmento de DNA foi extraído do gel por tratamento com fenol (pH 7-8) como descrito (BANKIER *et al.*, 1987).

### **2.10 Preparo de células *E. coli* eletrocompetentes**

Duzentos microlitros de cultura saturada e obtida a partir de uma colônia isolada de *E. coli* DH10B foram inoculados em 250 mL de meio SOB e mantidos sob agitação de 140 rpm a 37°C até absorbância (600nm) entre 0,4 e 0,6. Após o crescimento, a cultura foi transferida para tubos de plástico estéreis, mantida em gelo por 20 minutos e então centrifugada (5.000 rpm por 10 minutos a 2°C). As células foram ressuspensas e lavadas duas vezes com glicerol 10% estéril gelado (10.000 rpm por 5 minutos). Finalmente, o sedimento de células foi ressuspendido com 500  $\mu$ L de glicerol 10% e a suspensão de células foi fracionada (30  $\mu$ L/tubo de 1,5 mL) e mantida em estoque a -70°C.

### **2.11 Preparo de células *H. seropedicae* eletrocompetentes**

Cem mililitros de uma cultura de *H. seropedicae* foi cultivada em meio NFbHPN (fosfato 50 ml/L e cloreto de amônio 20 mmol/L) até absorbância (600nm) aproximado de 1,5. As células foram coletadas por centrifugação (5.000 rpm, 4°C por 5 minuto), lavadas duas vezes com água e uma vez com glicerol 10% gelado e estéril e centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C por 5 minutos. Em seguida, foram ressuspendidas em glicerol 10%, aliquotadas (30  $\mu$ L/tubo de 1,5 mL) e mantidas em estoque a -70°C.

### **2.12 Transformação por eletroporação**

Os plasmídeos foram transferidos para estirpes *E. coli* e *H. seropedicae* eletrocompetentes por eletroporação (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989, MILLER, 1992; KLASSEN *et al.*, 1999) como descrito em seguida.

Para a transformação em estirpes de *E. coli*, foi adicionado 1  $\mu$ L de DNA plasmidial, aproximadamente 100 ng de DNA, ao tubo contendo 30  $\mu$ L de células eletrocompetentes descongeladas e mantidos em banho de gelo. As células com

o DNA foram transferidos para uma cubeta de eletroporação resfriada em banho de gelo. A eletroporação foi feita de acordo com as instruções do fabricante do eletroporador (Eletroporador Cell-Porator<sup>®</sup> Electroporation System - Life Technologies, Gaithersburg, EUA), nas seguintes condições: resistência de 200  $\Omega$ ; capacitância de 300  $\mu$ F e voltagem 4 kV. Após serem submetidas ao pulso aplicado, as células foram recuperadas em 1 mL de meio SOC e incubadas a 37°C por 1 hora em agitador a 140 rpm. 200  $\mu$ L desta suspensão de células foram espalhados em meio LA contendo antibióticos seletivos e incubados a 37°C por 18 horas.

A transformação de *H. seropedicae*, seguiu as mesmas condições descritas para *E. coli*. Após a eletroporação as células foram recuperadas em 1 mL de meio NFbHPN (fosfatos 50 mL/L e cloreto de amônio 20 mmol/L) e incubadas a 30°C em agitador a 140 rpm por 8 horas. Após esse período, alíquotas de 200  $\mu$ L foram espalhadas em placas contendo meio sólido NFbHPN (fosfatos 50 mL/L e cloreto de amônio 20 mmol/L) com antibióticos apropriados e incubadas por 48 a 72 horas a 30°C.

### 2.13 Reação de sequenciamento

O DNA foi isolado utilizando o método de lise alcalina (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989) descrito no item 4.7.1.

A reação de sequenciamento foi realizada pelo método descrito por SANGER *et al.* (1977) e está baseado no processo de incorporação de dideoxynucleotídeos marcados com compostos fluorescentes utilizando o Kit DYEnamic ET (Amersham Biosciences).

#### Sistema para a reação de seqüenciamento

- 100 a 400 ng de DNA purificado tratado com RNase
- 10 pmoles de primer Reverso ou Universal
- 4,0  $\mu$ L de Polimerase DYEnamic ET (Amersham Biosciences)
- água miliq q.s.p 10  $\mu$ L

O sistema foi colocado em termociclador (Applied Biosystems). O programa de amplificação realizado está mostrado abaixo:

**Programa de amplificação**

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1	94°C	2 min
30	95°C	20s
	50°C	15s
	60°C	1min
	4°	∞

Após a reação foi acrescentado ao sistema 10 µl de água miliq, o DNA foi precipitado com 20 µl de isopropanol e o sistema foi incubado por 20 minutos. O volume foi transferido para um tubo eppendorf de 500 µl e centrifugado por 20 minutos (13.000 rpm). O sobrenadante foi desprezado e o "pellet" lavado com etanol 80% (v/v). O "pellet" foi secado em bomba à vácuo e ressuspenso em 4 µL de Formamide Loading Dye (Amersham Biosciences) e mantido a 96°C por 2 minutos. Após este tratamento a amostra foi submetida à eletroforese em seqüenciador automático de DNA ABI-PRISM 377 (Perkin-Elmer).

**2.14 Edição e análise das seqüências**

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas e editadas com auxílio do programa Auto Assembler (Perkin Elmer). Para identificar a presença das possíveis regiões codificadoras de proteínas (ORFs), as seqüências de nucleotídeos foram submetidas ao programa Blast (ALTSCHUL et al., 1997) e FramePlot 2.3 (BIBB, FINDLAY e JOHNSON, 1984). As seqüências de aminoácidos foram alinhadas e comparadas utilizando o programa ClustalW (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994), no qual se obteve os aminoácidos idênticos e similares identificados por diferentes cores, assim como suas respectivas porcentagens. As análises de topologia das proteínas foram feitas pelos programas TMHMM (MOLLER, CRONING e APWEILER, 2001) e Psort-B (GARDY et al., 2003) e as análises da estrutura primária foram executadas pelo ProtParam (KYTE e DOOLITTLE, 1982).

A busca de domínios conservados nas proteínas foi feita pelo programa PROSITE (HULO et al., 2004).

### **2.15 Análise da utilização de fontes alternativas de nitrogênio pelas estirpes selvagem (SMR1) e NtrC mutante (DCP286A)**

Esse estudo foi conduzido através da utilização de fontes alternativas de nitrogênio pelas estirpes SMR1 e DCP286A (PERSHUN *et al.*, 2000) de *H. seropedicae* e acompanhando o crescimento das estirpes em até 48 horas de incubação, como descrito a seguir:

As estirpes SMR1 (selvagem) (SOUZA *et al.*, 1999) resistente a estreptomicina 80 µg/mL e DCP286A (mutante *ntrC*) (PERSHUN *et al.*, 2000) resistente a canamicina 500 µg/mL (Tabela 1), foram pré-cultivadas por toda noite em meio NFbHP (PEDROSA e YATES, 1984) contendo 20 mmol/L de cloreto de amônio e antibióticos. As culturas foram centrifugadas e as células ressuspendidas em um novo meio sem fonte de nitrogênio com a finalidade de ajustar a absorbância a 600 nm para 1.0. Para avaliar o crescimento, foram inoculadas 50 µL das culturas de DCP286A e SMR1 em frascos de 60 mL contendo 20 mL meio NFbHP e 10 mmol/L de L-alanina, L-serina, L-prolina ou uréia. Cloreto de amônio e nitrato de potássio na mesma concentração foram utilizados como controle positivo e negativo respectivamente. As estirpes foram então incubadas sob agitação de 130 rpm a 30°C. O crescimento foi acompanhado pela determinação da D.O[600] de alíquotas das culturas (300 µL) em intervalos de 7, 21, 28, 40 e 48 horas de incubação. As densidades óticas das culturas bacterianas foram medidas em um espectrofotômetro Beckman DU7400.

Esse experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes para se obter uma média dos valores para obtenção da curva de crescimento.

### **2.16 Análise da região promotora do gene tipo *nac1* (*pnac1*) através da construção da fusão *lacZ***

O gene tipo *nac1* foi subclonado no vetor pMP220 (SPAINK *et al.*, 1987) que possui o gene da β-galactosidase sem promotor. A estratégia da fusão *lacZ* consistiu em duas etapas, uma subclonagem no vetor pTZ18R e a fusão no vetor pMP220, como descrito a seguir:

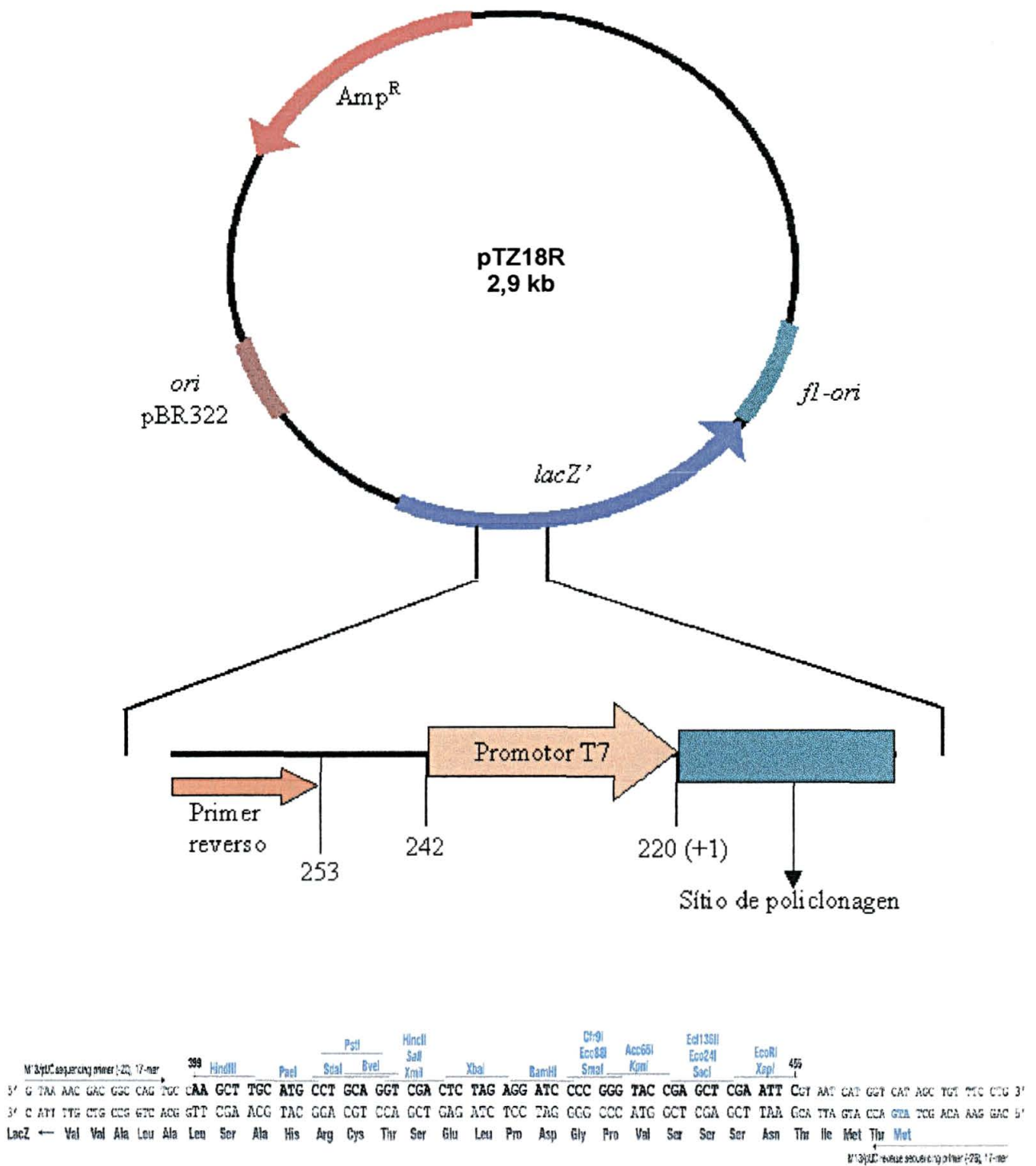
O plasmídeo pHS24 ( $\pm 5 \mu\text{g}$ ) foi digerido com a enzima de restrição *HincII* liberando um fragmento de 0,6 kb que corresponde à região a montante e parte do gene que poderia conter uma seqüência de ligação de fatores de transcrição. O fragmento foi purificado após eletroforese em gel de agarose 1% de baixo ponto de fusão (item 4.9). O fragmento de 0,6 kb foi submetido a uma segunda eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão e purificado mais uma vez. O DNA purificado foi ressuspendido em água miliq e guardado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.16.1 Clonagem do *pnac1* no vetor pTZ18R**

O plasmídeo pTZ18R (Figura 4) foi digerido com a enzima de restrição *SmaI* do sítio de policlonagem.

O fragmento purificado de 0,6 kb (*pnac1*) foi misturado com o vetor pTZ18R na proporção aproximada de 5:1 inserto:vetor e o produto de ligação foi transformado em células competentes de *E. coli* DH10B (item 2.12). Os prováveis clones foram selecionados em meio L.A contendo estreptomicina (20  $\mu\text{g/ml}$ ), ampicilina (250  $\mu\text{g/ml}$ ), X-gal (30  $\mu\text{g/ml}$ ) e IPTG (0,1 mM). As colônias brancas foram coletadas, cultivadas em meio LB e o DNA plasmidial purificado foi analisado quanto ao perfil de restrição com *EcoRI* e *PstI* que contém sítios flanqueando o fragmento clonado no sítio *SmaI*. Para confirmar o sentido de transcrição do fragmento clonado, o plasmídeo foi digerido com as enzimas *EcoRV* e *EcoRI* e analisado quanto ao perfil de restrição. Depois dessas análises a clonagem ainda foi confirmada por sequenciamento do inserto utilizando iniciadores reverso e universal complementares às regiões adjacentes ao sítio de policlonagem do vetor pTZ18R.

O plasmídeo resultante desta clonagem foi denominado pFRAL e utilizado na etapa de clonagem do *pnac1* no vetor pMP220.



**Figura 4 – Mapa esquemático do vetor de clonagem multifuncional pTZ18R (MEAD *et al.*, 1986).**

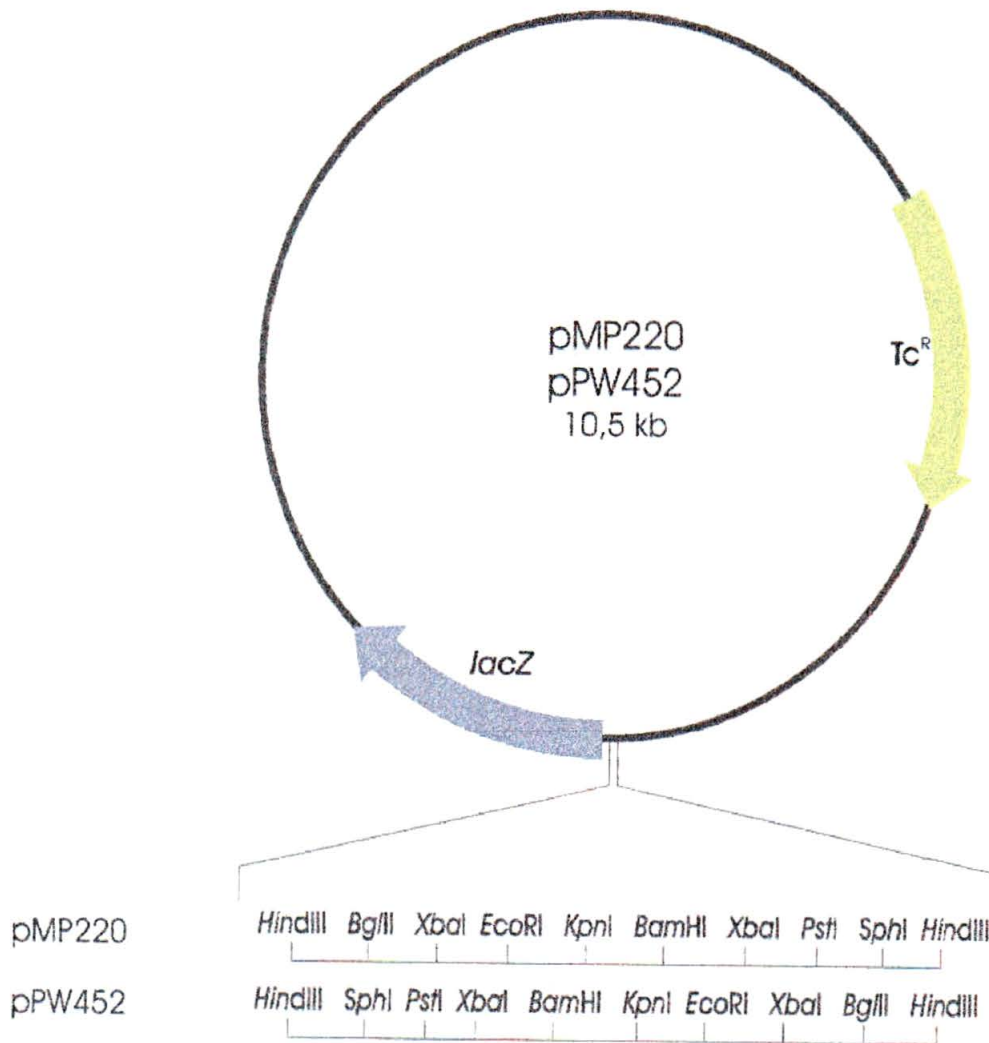
### 2.16.2 Clonagem do *pnac* no vetor pMP220 – fusão *lacZ*

O vetor de fusão transcricional pMP220 (SPAINK *et al.*, 1987) foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *PstI* presentes somente no sítio de policlonagem (Figura 5). Essa digestão permitiu que o fragmento *EcoRI* e *PstI* contendo o provável promotor do gene tipo *nac1* (*pnac1*) ficasse na mesma orientação de transcrição do gene da  $\beta$  - galactosidase do vetor pMP220.

Para construir a fusão *pnac1-lacZ*, o vetor pMP220 (SPAINK *et al.*, 1987) e o plasmídeo pFRAL (Tabela 1) foram preparados separadamente após a digestão com *EcoRI* e *PstI*. Após a digestão, as enzimas foram inativadas a 65° por 10 minutos e a digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%. A partir dessa análise foi feita a ligação na proporção 5:1 (inserto:vetor) preparando o sistema de ligação com os produtos de digestão inativados sem purificação do inserto. O produto de ligação foi transformado em *E. coli* estirpe DH10B (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989).

Os transformantes foram plaqueados em meio LA contendo antibióticos apropriados. Foram selecionadas as colônias que cresceram em meio contendo estreptomicina (20  $\mu\text{g/mL}$ ) e tetraciclina (10 $\mu\text{g/mL}$ ) e que não cresceram em meio contendo ampicilina (250  $\mu\text{g/mL}$ ). A confirmação dessa clonagem baseou-se no perfil de restrição com as enzimas *EcoRI* e *PstI* cujos sítios flanqueiam o fragmento clonado e com *NsiI* cujo sítio está presente somente no inserto.

O plasmídeo resultante da fusão *lacZ*, pCLG25 foi transformado por eletroporação (item 4.12) em células *H. seropedicae* estirpes SMR1 (selvagem) e DCP286A (*ntrC*<sup>-</sup>). As células *H. seropedicae* transformantes foram selecionadas em meio NFbHPN20 sólido contendo tetraciclina (10  $\mu\text{g/mL}$ ) e estreptomicina (80  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 5 - Mapa esquemático do vetor de transcrição pMP220 e pPW452 (SPAINK *et al.*, 1987)**

## 2.17 Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase

*H. seropedicae* estirpes SMR1 e DCP286A contendo o plasmídeo pCLG25 foram cultivadas em meio NFbHP na presença de 2 mmol/L ou 20 mmol/L de cloreto de amônio ou na presença de 5 mmol/L de glutamato como única fonte de nitrogênio por 18 horas a 30°C e 140 rpm. A atividade de  $\beta$ -galactosidase das culturas foi determinada segundo MILLER (1992). Alíquotas (100 $\mu$ L) das culturas foram coletadas e adicionadas a 900 $\mu$ L de tampão Z (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 60 mmol/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 40 mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1mmol/L,  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mmol/L e SDS 0,0027% pH 7,0). Vinte e cinco microlitros de clorofórmio foram adicionados ao sistema que foi homogeneizado em agitador de tubos (tipo Vortex) por 10 segundos e incubado a 30°C por 5 minutos. O início da reação foi determinado pela adição de 200  $\mu$ L de ONPG (o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactosídeo; 4 mg/mL preparado em tampão Z). Após incubação de 30 minutos a 30°C ou até o aparecimento de cor amarela nos sistemas, as reações foram interrompidas por adição de 500  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mol/L. A absorbância do cromóforo o-nitrofenol foi determinada em 420 nm.

Como controle positivo dos reagentes foi utilizada a estirpe de *H. seropedicae* com o plasmídeo pCWG2aZ (GALVÃO *et al*, 2003) que possui atividade  $\beta$ -galactosidase constitutiva. Para o controle negativo foram utilizadas as estirpes SMR1 ou DCP286A sem plasmídeo ou com plasmídeo sem inserto (pMP220).

Esse experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes.

A atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinada de acordo com a utilização do substrato o-nitrofenol- $\beta$ -D-galactosídeo (ONPG). O cálculo de atividade foi feito utilizando a fórmula abaixo:

$$\text{Atividade Específica} = \frac{\text{Abs}_{420}}{T \times V \times \text{mg prot/mL}} \times 1000$$

Onde: Abs<sub>420</sub> é a absorbância da mistura de reação (cromóforo) no comprimento de onda 420;

mg prot/mL é a concentração de proteína em miligrama por mililitro de cultura saturada.

T é o tempo de reação em minutos;

V é o volume de cultura utilizado no ensaio (0,1mL).

Essas mesmas estirpes utilizadas para a atividade da  $\beta$ -galactosidase em meio líquido, foram testadas quanto a atividade dessa enzima em placas contendo meio NFbHP sólido.

### **2.18 Dosagem de proteínas**

A dosagem de proteínas de células intactas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Após lise das células com NaOH 0,5 mol/L por 30 minutos à temperatura ambiente foi adicionado reativo de Bradford e a leitura foi feita a 595nm. Os resultados representam uma média dos ensaios realizados em triplicata.

Uma solução de soro albumina bovina 1 mg/mL foi utilizada para preparação de uma curva padrão.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Busca do gene *nac* no banco de dados do Genopar

Análises *in-silico* no banco de dados do programa de seqüenciamento genômico de *H. seropedicae* (Genopar) e resultados obtidos através do programa Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1997) revelaram no início deste trabalho em fevereiro de 2003 a presença de um possível gene do tipo *nac* no genoma de *H. seropedicae*. Este dado preliminar deu origem ao projeto de estudo inédito desse gene em um organismo não entérico. Alguns clones contendo o gene de estudo foram selecionados seqüenciados até encontrar um clone que tivesse o gene todo e a provável região promotora a montante do início de transcrição. O clone escolhido foi o HS24-FP-00-000-030-G12.b redenominado pHS24.

#### 3.2 Utilização de fontes alternativas de nitrogênio das estirpes de *H. seropedicae* SMR1 e DCP286A (*ntrC*<sup>-</sup>)

Em paralelo as buscas e sequenciamentos dos plasmídeos contendo o gene do tipo *nac*, foi feito o estudo fisiológico do mutante DCP286A (*ntrC*<sup>-</sup>). Estes dados foram considerados importantes para posteriores análises de comparação entre um mutante no gene *nac* que pretendia-se construir.

Estudos sobre a função da proteína Nac em enterobactérias demonstram que a proteína NtrC fosforilada ativa o gene *nac* utilizando o fator de transcrição  $\sigma^{54}$  e a proteína Nac ativa diversos operons utilizando  $\sigma^{70}$ , sendo que a maioria destes operons está envolvida na utilização de fontes alternativas de nitrogênio na ausência de amônio (Figura 3).

Portanto, iniciou-se o estudo do envolvimento da proteína NtrC na utilização de fontes alternativas de nitrogênio em *H. seropedicae*. Iniciamos nossos estudos com as estirpes selvagens (SMR1) e *ntrC* mutante (DCP286A) de *H. seropedicae* através do perfil de crescimento em L-serina, L-alanina, L-prolina e uréia. Esses compostos foram escolhidos seguindo o modelo de regulação já bem caracterizado em *E. coli* e *K. aerogenes*.

A estirpe selvagem apresentou crescimento em nitrato um pouco inferior

ao observado em amônia que é uma fonte de uso preferencial e mais rápida (Figura 6A). O crescimento da estirpe selvagem foi muito similar em todas as fontes de nitrogênio utilizadas.

A estirpe mutante DCP286A como esperado, não cresceu em nitrato como única fonte de nitrogênio, uma vez que a expressão da enzima nitrato redutase é dependente da proteína NtrC (PERSHUN *et al.*, 2000) (Figura 6B). O crescimento em amônio foi superior quando comparado com o selvagem (Figura 6A). Este mutante apresenta um comportamento diferente provavelmente devido ao envolvimento de outros genes homólogos ao sistema NtrBC ainda em estudo denominados NtrXY.

O crescimento de DCP286A em uréia como única fonte de nitrogênio foi inicialmente mais lento que a estirpe selvagem SMR1. Somente depois de 14 horas a estirpe DCP286A apresentou crescimento similar ao SMR1 (Figura 6C). Ou seja, houve uma longa fase lag de crescimento em uréia. Em *K. aerogenes*, mutações em NtrC ou Nac acarretam em um crescimento bastante reduzido em uréia em relação à estirpe selvagem (MACALUSO, BEST e BENDER, 1990). Em *Rhodobacter capsulatus*, estirpes *ntrC* mutantes não crescem em meio contendo uréia como única fonte de nitrogênio. A deficiência no crescimento em uréia deste microrganismo está relacionada com a falta de ativação direta do gene *ureD* (um dos genes que codifica a urease) pela proteína NtrC mas de maneira independente da proteína Nac (MASEPOHL *et al.*, 2001). O longo tempo de fase lag do mutante DCP286A em uréia sugere que NtrC seja importante para a permeação ou entrada da uréia e que uma vez que isso aconteça lentamente através de permeabilidade da uréia através da membrana, a uréia passa então a ser metabolizada e utilizada como fonte de nitrogênio. Uma outra hipótese é de que a uréia após algumas horas seja degradada e então a amônia formada seria utilizada pelo mutante.

Quando as estirpes SMR1 e DCP286A foram cultivadas em L-alanina ou L-serina, observou-se uma fase lag muito mais longa para o mutante DCP286A em relação ao SMR1 (Figura 6D-E). O crescimento de DCP286A em L-alanina começou somente após 21 horas de incubação. Este resultado sugere o transporte de L-alanina é dependente direta ou indiretamente de NtrC, mas não o para o metabolismo.

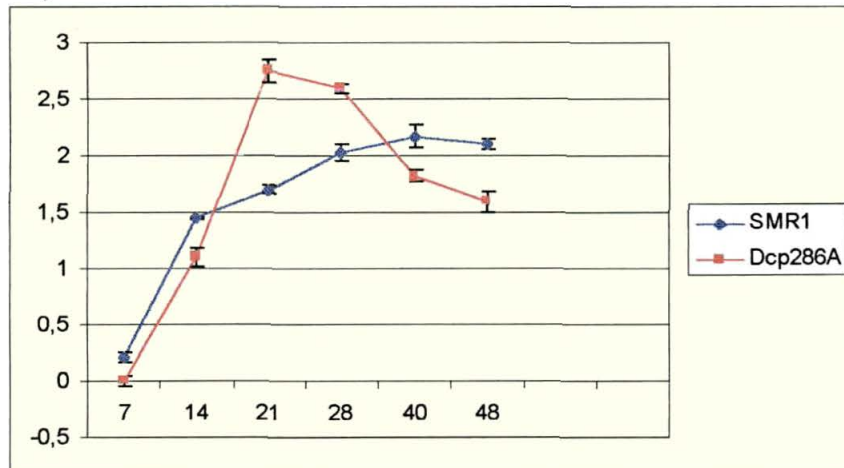
O crescimento do mutante DCP286A em L-serina foi praticamente inexistente (observado após 28 horas de incubação) sugerindo o papel essencial de NtrC-P para permeação e/ou metabolização de L-serina.

Durante as 48 horas de incubação não houve nenhum crescimento do mutante DCP286A no meio contendo L-prolina como fonte de nitrogênio (Figura 6F). A ausência de crescimento em L-prolina mostrou que assim como observado com a L-serina, *H. seropedicae* depende da proteína NtrC na ativação de genes envolvidos no transporte e/ou degradação da L-prolina ou na ativação de algum outro ativador transcricional envolvido no metabolismo da L-serina e L-prolina.

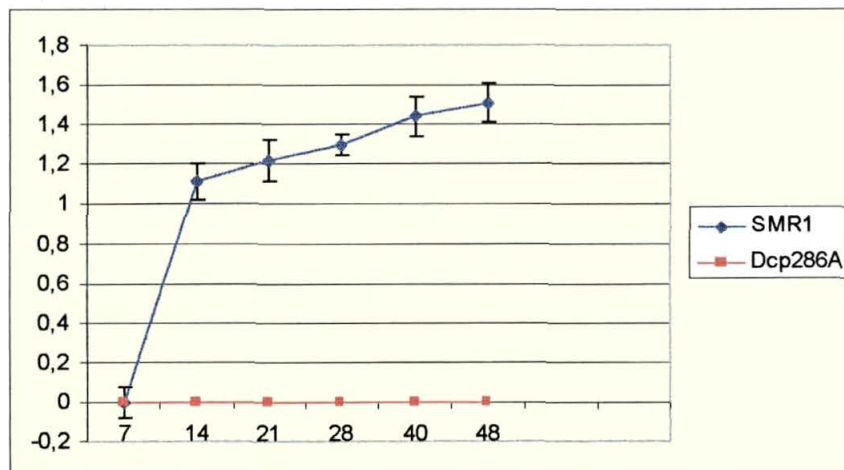
MACALUSO, BEST e BENDER (1990) determinaram as atividades das enzimas prolina oxidase e mostraram que mutantes *rpoN*, *ntrC* ou *nac* de *K. aerogenes* não conseguem ativar os genes da prolina oxidase em resposta a limitação de nitrogênio. No entanto, em *Rhodobacter capsulatus* mutações nos genes *ntrC*, *ntrB* ou *ntrA* (codifica para  $\sigma^{54}$ ) não afetam a expressão do gene *putA* (codifica prolina oxidase) e conseqüentemente, essas estirpes mutantes são capazes de crescer em meio contendo somente prolina como fonte de nitrogênio (KEUNTJE, MASEPOHL e KLIPP, 1995).

Para esclarecer a total dependência da proteína NtrC-P na utilização da L-prolina como fonte de nitrogênio, foram feitas buscas de alguns genes responsáveis pela utilização da prolina no banco de dados do Genopar (a busca foi feita para serina também, mas não foram encontrados sítios para NtrC). As seqüências dos genes que codificam para prolina oxidase, prolina desaminase e prolina permease foram analisadas. Dois prováveis sítios de ligação para a proteína NtrC-P foram encontrados somente na região promotora do gene que codifica a proteína transportadora prolina permease (Figura 7). Nos demais genes envolvidos no metabolismo os sítios de ligação para NtrC-P podem não ter sido visualizados por terem um consenso diferente do esperado ou ainda porque em *H. seropedicae* podem existir outras enzimas envolvidas no metabolismo de L-prolina que não foram pesquisadas. Os dados de fisiologia nos sugerem que os sítios encontrados na região promotora da prolina permease apesar de diferentes do consenso geral podem ser essenciais para ligação de NtrC-P ao DNA e conseqüente transporte da L-prolina.

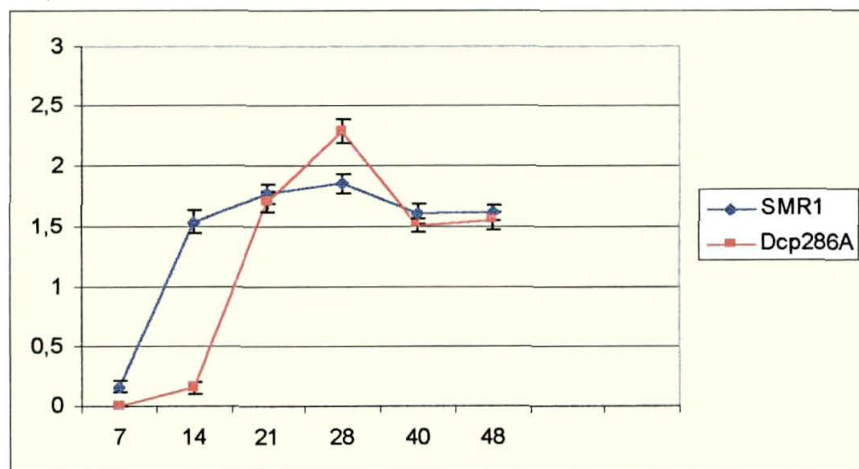
**A) Amônio**

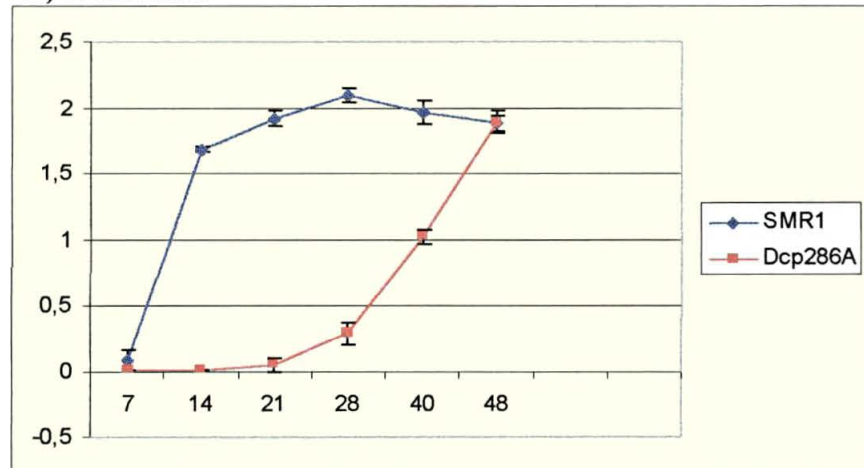
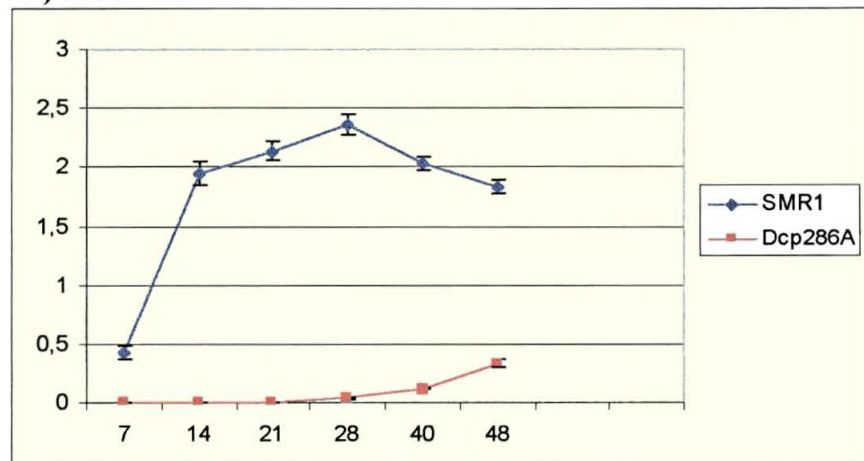
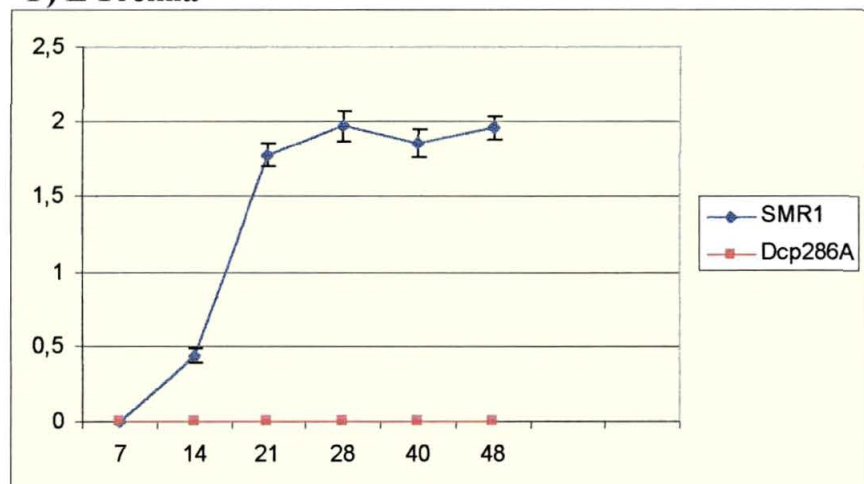


**B) Nitrato**



**C) Uréia**



**D) L-Alanina****E) L-Serina****F) L-Prolina**

**Figura 6. Curvas de crescimento de *H. seropedicae* SMR1 (wt) e DCP286 (*ntrC*).** Foram utilizadas as fontes de nitrogênio: cloreto de amônio, nitrato de sódio, L-alanina, L-serina, uréia ou L-prolina como fonte de nitrogênio na concentração de 10 mmol/L. O crescimento foi acompanhado através da leitura de densidade óptica das culturas a 550 nm.

```

CGG TTG CCC CTC CTA CGA GCG CAA CAA CGA AGG CGC TTG AGT CCA
GCT CCG GCT GGC GGC TCC GCC AGC CCA TCT TCC CTG ACA AAG CAC
                    -24                -12
TGA CAC TCC TGC CCC TTG GCA GGA GCA ATT CTT GCT TGA CGA CAC
CCC GAT CCG GGC CAC TCG CGG CAG CAC AGC TGT GGT CCC GTC GCG
ACA GGT GAA AAG TCT TGC CGC AAG CGG CTT TGC GCG CAG AAC TTG
                    RBS
CCG CTA TAA TGC GCG TTT TTC GTC TTC ACC CCC CTG CAA GGA AAA
GGC ATG AAT GCA CTG CTT TGG TTC GTC GTC CTC TAT TGG GTC ATC
    M  N  A  L  L  W  F  V  V  L  Y  W  V  I

```

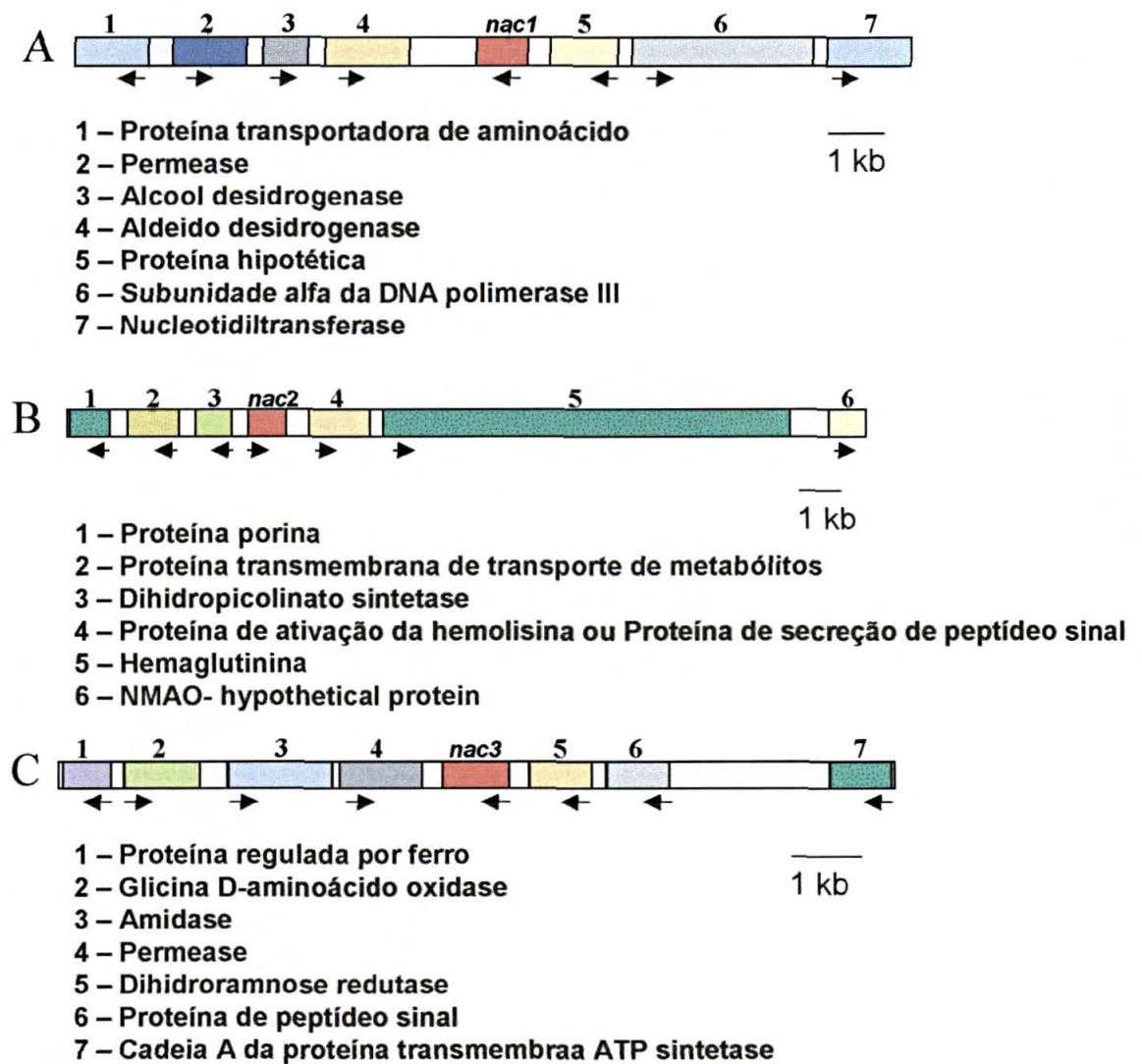
**Figura 7. Provável região promotora do gene da prolina permease.** Estão representados em azul os dois prováveis sítios para NtrC-P, sublinhado as regiões -24/-12 para o fator  $\sigma^{54}$ , em verde o sítio RBS e em vermelho o códon de início da proteína.

Em síntese, os resultados obtidos em *H. seropedicae* revelaram a dependência parcial ou total da proteína reguladora NtrC para o catabolismo da uréia, L-alanina, L-serina e L-prolina.

### 3.3 Análise comparativa de proteínas do tipo Nac de *H. seropedicae*

Enquanto estavam em andamento os estudos fisiológicos com o mutante *ntrC* descrito anteriormente novas buscas no genoma em sequenciamento revelaram a presença de mais 2 clones contendo prováveis genes *nac*. Esses clones estão depositados com os números HS23-AF-00-000-107-C09.g e HS03-FP-00-000-027-B09.b. Por ordem de identificação os prováveis genes do tipo *nac* foram chamados de *nac1*, *nac2* e *nac3* respectivamente aos plasmídeos selecionados do banco genômico. A presença dos outros 2 genes do tipo *nac* foi confirmada após o isolamento do DNA plasmidial e sequenciamento.

Para verificar se os 3 clones identificados não se tratavam do mesmo gene em "contigs" diferentes ainda não alinhados, foram pesquisadas no banco genômico as ORFs contíguas dos três genes do tipo *nac* em seus respectivos "contigs" e através do programa Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1997), confirmou-se que esses genes estão em regiões distintas no genoma (Figura 8). Portanto como as regiões adjacentes aos denominados genes do tipo *nac1*, 2 e 3 são bem diferentes, descartamos a possibilidade de erro no ordenamento dos clones.



**Figura 8. Localização dos genes tipo *nac* e genes adjacentes no genoma de *H. seropedicae*.**

As setas indicam a direção de transcrição e os espaços em branco as regiões intergênicas. A tamanho relativo dos genes é proporcional ao indicador de 1 Kb.

### **3.3.1 Comparação entre as 3 prováveis proteínas do tipo Nac em *H. seropedicae***

Para um melhor entendimento e identificação mais precisa dos 3 prováveis genes do tipo *nac*, após a tradução dos genes com auxílio do programa Strider (DOUGLAS, 1994) as seqüências de aminoácidos foram comparadas entre si e entre as proteínas Nac já caracterizadas em outros organismos utilizando o programa ClustalW (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994).

As comparações revelaram que as prováveis proteínas do tipo Nac em *H. seropedicae* tem 7,8% de identidade e 23,6% de similaridade, como mostrado na Figura 9. Esses valores são considerados muito baixos para que sejam proteínas homólogas. Ainda mostrado na Figura 9 observamos que as regiões com maior identidade e similaridade estão representadas pelo motivo hélice-volta-hélice (HTH) no fragmento amino terminal. Extensas similaridades fora dessa região não são esperadas porque esta é uma característica da família LysR (SCHELL, 1993 e HENIKOFF *et al.*, 1988). Portanto, certamente são proteínas que pertencem a família de proteínas LysR, ou seja, esses genes codificam para proteínas reguladoras transcricionais do tipo LysR (LTTRs – “LysR Type Transcription Regulators”). Os membros dessa família são reconhecidos por apresentarem um motivo hélice-volta-hélice na região amino terminal, estão relacionadas com um ancestral comum, são enoveladas de maneira similar e não estão relacionadas com outras proteínas ativadoras bacterianas, contudo as funções são diversas (HENIKOFF *et al.*, 1988).

```

          10      20      30      40      50      60
          |      |      |      |      |      |
(Nac2)  -----MHYAAWKL FVEALEL GSLSKV ALLHGTT QPHISRQIAE LEQQYGGRL EQRNG
(Nac3)  MSTIHTRV LQETAVRY FLEVRR GSI TEAANTLNV ASSAISRQIAR LEAELDTP LEERVA
(Nac1)  -----MELRQLRY FVAIVDH GSLSRAAR ALHIAQPAL TQQIRQLE DELAAQL LHRSA
          :.      : * :      : ** : . . *      : . . : : ** . ** :      : * : . * .

          70      80      90      100     110     120
          |      |      |      |      |      |
(Nac2)  RGVIPTEL GMRVAPRV RAWLATTE QLTNDI QSAAGTPI GRV RMGILPSAA HPLVSTLY QQ
(Nac3)  RGM RPNAAG ELLAAHAL RMQLEA ERIGNEI AALKGLRR GEV K LACTEGFALE FVPATIEQ
(Nac1)  QGVIA TDAGK V FYEHALAIL KQVQDAK QAVGQSADKPS GTVALGIPQS VSNALAL PLLNA
          : * : . . * . : . : : : . * * : . : : . : . :

          130     140     150     160     170     180
          |      |      |      |      |      |
(Nac2)  IQQRYPQI QLSVREGQGA QLDTWLDNG YVDLALL ERHGANA KNGDLYIT KTD TYLVGAPD
(Nac3)  FCRQHKG IREFQL SVGNAMHVAQQ IREGAVD LGLTF TMAPDADI KVEFAQRAP I LAMVHHPA
(Nac1)  VRSTYPEI TLQTEELTGNLITQLKSGRINLAVLEDDGQLS SFAATPMIEEMMYI TRAK
          . : * : . : : : : . * : : * : . : . : . : . :

          190     200     210     220     230     240
          |      |      |      |      |      |
(Nac2)  DP--LVQGPTV PFA SLDR LPLV SF CRPN SWRDR LDHLS IEHGITL NVQIEAD SLSIQEHL
(Nac3)  HE--LAHRKQV SLS ELAPY PLAMPKKTITMRRLIDACCSRNVL EPTLAADSISALLCF
(Nac1)  SQYGVAGRKS VPLARAIQAPL I L PGLAHGVRPRIENLVR SQGMSLDNVIEINSVA I LKSA
          : .      * : :      **      .      * : :      : : * : :      : * : :

          250     260     270     280     290     300
          |      |      |      |      |      |
(Nac2)  VENGGVYAL LGPYAIASAVR KNRLKAARI I APEITR HIALAMSRHGELT LACRTVMQLIK
(Nac3)  VMAGQGIGF SAALPIRKL VREGKLAALPI RDKDMNTLQLEIQSLAGRTL PDAGKLSQRP
(Nac1)  ILADIGATI LPVAPLLGRHR TRRDGGPSHRRRAHLPHPGAVRLAQYSADDGGGGGGATGA
          : .      :      :      * :      : .

          310     320     330     340     350     360
          |      |      |      |      |      |
(Nac2)  ELAQDRVDIAGIH-----
(Nac3)  HCAGSRTALMGRTRRRVTLWRTIEPAWVGVMGACDSVMARVIPGPKDGSIPVDHSFKER
(Nac1)  RCHR-----

```

Figura 9. Alinhamento das três proteínas do tipo Nac (Nac1, Nac2 e Nac3) de *H. seropedicae*.

\* representa 100% de identidade; : 75% e . 50% de similaridade respectivamente.

### 3.3.2 Comparação entre as proteínas do tipo Nac de *H. seropedicae* com proteínas Nac de outros organismos

As proteínas do tipo Nac de *H. seropedicae* foram comparadas, isoladamente, com as proteínas Nac de *K. aerogenes* (SCHWACHA e BENDER, 1993a) e *E. coli* (MUSE e BENDER, 1998), como mostrado na Tabela 3.

**Tabela 3. Tabela comparativa das proteínas Nac \***

Proteína Nac	Identidade (%)	Similaridade (%)
Nac1 X Nac <i>E.coli/K.aerogenes</i>	27	60
Nac2 X Nac <i>E.coli/K.aerogenes</i>	22	57
Nac3 X Nac <i>E.coli/K.aerogenes</i>	16	47
Nac <i>E. coli</i> X Nac <i>K. aerogenes</i>	80	96

\* Dados do alinhamento demonstram a identidade e similaridade das proteínas do tipo Nac1, Nac2 e Nac3 comparadas com Nac em *E. coli* e *K. aerogenes*. Também são mostradas a identidade e similaridade entre as proteínas Nac de *E. coli* e *K. aerogenes*.

A partir destas análises, observa-se que o produto do gene do tipo *nac1* (Nac1), apresentou maior identidade e similaridade com as proteínas Nac de *K. aerogenes* e *E. coli* em seguida Nac2 e Nac3. A identidade de apenas 16% da proteína do tipo Nac3 contrasta com o padrão de identidade entre os membros das LTRs. A maioria dos membros LTRs apresenta acima de 20% de identidade na seqüência de aminoácidos com outro membro da família ou uma seqüência altamente conservada na região amino terminal (SCHELL, 1993). O alinhamento das proteínas Nac está mostrado nas Figuras 10A, 10B e 10C.

**A. Alinhamento da proteína do tipo Nac1 de *H. seropedicae* com Nac de *E. coli* e *K. aerogenes*.**

```

                10      20      30      40      50      60
                |      |      |      |      |      |
NacEc          MNFRRLKYFVKIVDIGSLTQAAEVLHIAQPALSQQVATLEGEELNQQLLIRTKRGVTPDA
NacKA          MNLRLKYFVKIVDIGSLTQAAEVLHIAQPALSQQVATLEGEEMDQQLLIRTKRGVTPTEA
Nac1          MELRQLRYFVAIVDHGSLSRRAARALHIAQPALTQQIRQLEDELAAQLLHRSAQGVIAATDA
                *::*:*** ** *::**..*****:***: **.*: ** * : :** .*:*

                70      80      90      100     110     120
                |      |      |      |      |      |
NacEc          GKILYTHARAILRQCEQAQLAVHNVGQALSQVSIQFAPGTAASSITMPLLQAVRAEFPE
NacKA          GKILYTHARTIILRQCEQAQLAVNNVGQTLRGQVSIQLAPGTAASAITMPLLQTVRNELPE
Nac1          GKVFYEHALAILKQVQDAKQAVGQSADKPSGTVALG-IPQSVSNALALPLLNAVRSYPE
                **::* ** :***: * :*: ** : .: * *::* * : :.:.:***: ** **

                130     140     150     160     170     180
                |      |      |      |      |      |
NacEc          IVIYLHENS GAVLNEKLNHQLDMAVIYEHSPVAGVSSQALLKEDLFLVGTQDCPG----
NacKA          VMVYLQESSGTALNDKLLAGQLDMAVLYERSPVAGIVSQPLLKEDLYLVGTRDCPG----
Nac1          ITLQLTEELTGNLITQLKSGRINLAVLFDDGQLSFAATPMIEEEMMYITRAKSQYGVAG
                : * *. * : * : : : ** : : . : . . : : : : : : : : : . .

                190     200     210     220     230     240
                |      |      |      |      |      |
NacEc          -QSDVNAIAQMNLF LPSDYSAIRLRVDEAFSLRRLTAKVIGEIESIATLTAAIASGMGV
NacKA          -QVDLTAVAEMNLF LPRDYSAVRARVTEAFTLRRLSAKIIGEIESITLTAAIASGMGA
Nac1          RKSVP LARAIQAPLILPGLAHGVRPRIENLVRSQGMSIDNVIIEINSVAILKSAILADIGA
                : ** : : : * : ** . : * * : : . : : : . : * * : : : * : ** : : : * .

                250     260     270     280     290     300
                |      |      |      |      |      |
NacEc          AVLPE SAARSLCGAVNGWMSRITTPSMSLSLSLNLPARANLSPQAQAVKELLMSSVISPV
NacKA          TVLPE SAARSLCGAANGWMARISTPSMSLSLSLNMSARGSLSPQAQAVKEILLVSRPS
Nac1          TILPVAPLLGRHRTR-----FDGGPSHRRRAHLPHPGAVRLAQYSADGGGGGGATGARC
                : ** : . . : : * ** * . . * : : : . .

```

**B. Alinhamento da proteína do tipo Nac2 de *H. seropedicae* com Nac de *E. coli* e *K. aerogenes*.**

```

                10      20      30      40      50      60
                |      |      |      |      |      |
NacEc          ---MNFRRLLKYFVKIVDIGSLTQAAEVLHIAQPALSQQVATLEGEELNQQLLIRTKRGVTP
NacKA          ---MNLRRLLKYFVKIVDIGSLTQAAEVLHIAQPALSQQVATLEGEEMDQQLLIRTKRGVTP
Nac2          ATGMHYAAWKL FVEALELGSLSKVALLHGTTQPHISRQIAELEQQYGGRLFRNGRGVIP
                * : * ** : ::***::* : : ** :*:** * * : . :*: * . *** *

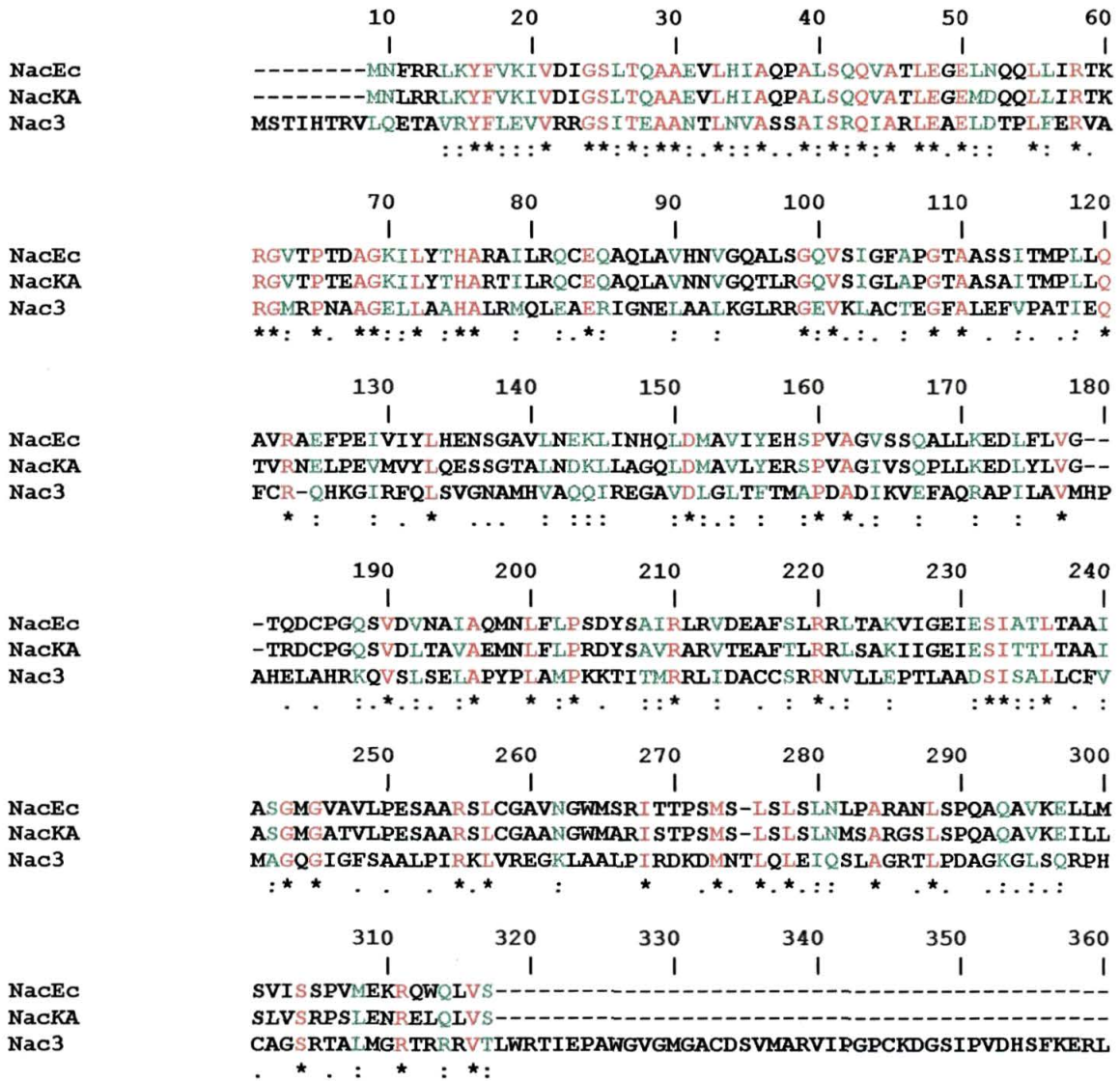
                70      80      90      100     110     120
                |      |      |      |      |      |
NacEc          TDAGKILYTHARAILRQCEQAQLAVHNVGQALSQVVSIGFAPGTAASSITMPLLQAVRAE
NacKA          TEAGKILYTHARTILRQCEQAQLAVNNVGQTLRGQVSI GLAPGTAASAITMPLLQTVRNE
Nac2          TELGMRVAPRVRAWLATTEQLTNDIQSAAGTPIGRVVMGILP-SAAHPLVSTLYQQIQQR
                * : * : . :*: * ** : : : : : : * : * : * : * : * : . * * : : .

                130     140     150     160     170     180
                |      |      |      |      |      |
NacEc          FPEIVIYLHENS GAVLNEK LINHQLDMAVIYEHSPVAGVSSQALLKEDFLVGTQDCP--
NacKA          LPEVMVYLQESSGTALNDKLLAGQLDMAVLYERSPVAGIVSQPLLKEDLYLVGTRDCP--
Nac2          YPQIQLSVREGQGAQLDTWLDNGYVDLALLFRHGANA KNGDLYITKTDYLVGAPDDPLV
                * : : : :*: . * : * : * : * : : : : : * . : * * : * * : * *

                190     200     210     220     230     240
                |      |      |      |      |      |
NacEc          -GQSV DVN AIAQMNLFLPSDYSAIRLRVDEAFSLRRLTAKVIGEIESIATLTAAIASGMG
NacKA          -GQSV DLTAVAEMNLF LPRDYS AVRARVTEAFTLRRLSAKIIGEIESITLTAAIASGMG
Nac2          QGPTVPFASLDRLPLV SFCRPN SWRDRLDHLSIEHGITLNVQIEADSLSIQEHVENGGV
                * : * . : : . : * . : : * * : . : : : : * : * : : : . *

                250     260     270     280     290     300
                |      |      |      |      |      |
NacEc          VAVLPESAARSLCGAVNGWMSRITTPSMSLSLSLNLPARANLSPQAQAVKELLMSVISSP
NacKA          ATVLPESAARSLCGAANGWMARISTPSMSLSLSLNMSARGSLSPQAQAVKEILLSLVSRP
Nac2          YALLGPYAIASAVRKNRLKAARIIAPEITRHIALAMSRHGELTLACRTVMQLIKELAQDR
                : : * * * . : * * : * : : : * : . : . : * : : * : : : . .
    
```

**C. Alinhamento da proteína do tipo Nac3 de *H. seropedicae* com Nac de *E. coli* e *K. aerogenes*.**



**Figura 10. Alinhamento das proteínas tipo Nac de *H. seropedicae* com proteínas Nac de outros organismos.**

Os aminoácidos com 100% de identidade estão representados por asteriscos, os aminoácidos com 75% de similaridade por : e 50% de similaridade por . Ec, *E. Coli*; KA, *K. aerogenes*; Hs, *H. seropedicae*

### 3.4 Análise *in silico* funcional das proteínas do tipo Nac de *H. seropedicae*

As seqüências das proteínas do tipo Nac de *H. seropedicae* foram analisadas pelo programa PROSITE (HULO *et al.*, 2004). As análises demonstraram a presença de um motivo hélice-volta-hélice (helix-turn-helix) na porção central dos 60 resíduos de aminoácidos da região N-terminal das proteínas do tipo Nac, que é o fragmento mais conservado (Figura 11). Estudos demonstraram que os membros LTTs contêm um motivo hélice-volta-hélice nessa mesma região do fragmento N-terminal (SCHELL, 1993 e HENIKOFF *et al.*, 1988).

Esses resultados sugerem que as proteínas do tipo Nac de *H. seropedicae* provavelmente estão envolvidas em processos de ligação ao DNA ativando ou reprimindo a transcrição de seus genes alvos.

#### A - Nac1



MELRQLRYFVAIVDHGSLSRAARALHIAQPALTQQIRQLEDELAQAQLLHRSAQGVIAI (58 resíduos)

#### B - Nac2



MHYAAWKLFVEALELGSLSKVALLHGTTQPHISRQIAELEQQYGGRLFQRNGRQVIPT (58 resíduos)

#### C - Nac3



LQETAVRYFLEVRRGSITEAAANTLNVASSAISRQIARLEAELDTPLFERVARGMRPN (58 resíduos)

**Figura 11. Análise das proteínas do tipo Nac1, Nac2 e Nac3 pelo programa PROSITE (HULO *et al.*, 2004).**

A seqüência de aminoácidos do fragmento N-terminal é mostrada e os resíduos responsáveis pela ligação ao DNA estão sublinhados.

Dados mais recentes de MUSE e BENDER (1999) demonstraram que não somente 60 mas sim os 100 aminoácidos da região N-terminal da proteína Nac contém os determinantes para todas as funções conhecidas da proteína Nac em *K. aerogenes*: ativação da transcrição, repressão da transcrição, ligação sítio-específico, dimerização e talvez solubilidade.

Outras características compartilhadas com Nac de *E. coli* e Nac de *K. aerogenes* estão representadas na Tabela 4 e são características compartilhadas entre os membros da família LysR. As proteínas do tipo Nac1 e Nac2 apresentam semelhanças com Nac de *E. coli* e *K. aerogenes* quanto à localização, número de resíduos de aminoácidos e massa molecular, sendo essas características conservadas dentro da família LysR (SCHELL, 1993). A proteína do tipo Nac3 apresenta o maior número de resíduos (367) e conseqüentemente maior massa molecular, sendo que a grande maioria das proteínas dessa família apresenta em média 300 resíduos de aminoácidos (pode variar entre 276 a 350 resíduos).

**Tabela 4. Características das proteínas Nac de *E. coli*, *K. aerogenes* e *H. seropedicae***

<b>Proteína Nac</b>	<b>Nº de resíduos</b>	<b>Localização</b>	<b>Massa Molecular (kDa)</b>
Nac1	296	citoplasmática	32.2
Nac2	309	citoplasmática	34.3
Nac3	367	citoplasmática	40.7
Nac <i>K. aerogenes</i>	305	citoplasmática	33.3
Nac <i>E. coli</i>	305	citoplasmática	33.3

### **3.5 Análise da provável região promotora do gene do tipo *nac1* em *H. seropedicae***

#### **3.5.1 Análises *in silico* da região regulatória**

Todas as análises feitas até essa etapa geraram dados de interpretação

pouco elucidativos quanto ao envolvimento das proteínas denominadas aqui como do tipo Nac1, Nac2 e Nac3 no metabolismo de nitrogênio. A mutagênese de uma ou mais delas poderia por análise fisiológica de crescimento indicar se o gene mutado é importante para este metabolismo, entretanto ainda assim resultados conflitantes poderiam ser de difícil interpretação. Como a mutagênese e a confirmação por hibridização são experimentos de maior custo e mais elaborados foram feitas outras análises e outros experimentos para esclarecer buscar esclarecer o papel desses genes em *H. seropedicae*.

Entre os 3 prováveis genes do tipo *nac* de *H. seropedicae*, o mais provável é o gene *nac1* como já discutido anteriormente. Por isso ele foi escolhido inicialmente para caracterização *in silico* e de sua provável região promotora.

A seqüência de nucleotídeos do provável promotor do gene do tipo *nac1* de *H. seropedicae* está mostrada na Figura 12.

A proteína Nac em *E. coli* e *K. aerogenes* é expressa a partir da ligação da proteína NtrC fosforilada a aproximadamente 150 pb a montante do início de transcrição do gene *nac* e a seqüência consenso para ligação de NtrC-P é GCAC-N5-TGGTGCA. Além disso, é necessária também a ligação do fator  $\sigma^{54}$  que reconhece o consenso CTGG-N8-TTGCA nas posições -24/-12 (SCHWACHA e BENDER, 1993a).

A comparação do possível promotor do gene do tipo *nac1* com outros promotores já estudados sugere a presença de dois possíveis sítios de ligação para proteína NtrC-P, um possível sítio para o fator  $\sigma^{54}$  e um sítio para  $\sigma^{70}$  (Figura 12).

Os dois possíveis sítios encontrados para a proteína NtrC foram alinhados com o consenso geral GCAC-N5-TGGTGCA de ligação da proteína NtrC das enterobactérias (Figura 13A e 13B). O primeiro sítio apresenta pouca semelhança com o consenso geral, entretanto como são bactérias de grupos diferentes que geraram o consenso não se pode descartar a ligação de NtrC-P nesse local. O segundo sítio é bem mais conservado e muitas vezes alguns nucleotídeos são essenciais para ligação de uma proteína em um dado organismo, mas não em outro. Isso só poderá ser confirmado com experimentos bastante específicos de ligação da proteína purificada, inicialmente pelo retardamento de migração do DNA e depois pela confirmação dos nucleotídeos envolvidos na ligação da

proteína em experimentos de ligação após clivagem pela DNaseI.

```

ACT GCG CCT GGT GAT CGA GCC CGA ATG CGC CGC CAT GGC CGC GCT
GCG CCG CAA CCG CCA GGA CCT GGA CAG GAT GGA GCG CCT CCT GGA
AGG GTT CGA AGC GGC CAA CCG GGT GGG CGG CAT CGC CCA CCA TTA
CGA TTT CGG CTT CCA TGA AGC CAT TGC CAC GGC CAC TGG CAA CCT
GCG CTT CGT GCA GGT GAT GAA GAC GCT GGA ATA CGA TGT CAG CCA
TGC CGT CAA CAT GCT GCG CCA CCT GAT GCA TAT CGC GCC CTG GAA
      sítio 1 NtrC ?
GCG CTC GCA GGA CGC CAT GGA CGA GCA CCG CCA GAT CTT CGA GCT
GAT CCG CGT GCA AGA CGC CGA AGG GGC GCG CCG CGC CAT GCG CGG
      sítio 2 NtrC ?
TCA TAT CGA GAA CGC CCG CAC GCG CAT GTT CAA TAG TCG GCC GGG
      -12      -10      -35      -24
ATT GTA GAT TGT AAA TAA TAC TGA CAA CTT GCT TTA CAG CGA CGC
      RBS
CAG ACA CCC GAT ACC CGA TAT CAC ACA GGA CCC GCC CGC ATG GAA
      M E
TTA CGC CAA CTG CGC TAC TTC GTC GCC ATC GTC GAT CAC GGC TCG
L R Q L R Y F V A I V D H G S
    
```

**Figura 12. Sequência de nucleotídeos do provável promotor do gene do tipo *nac1*.**

Após o ATG está traduzida uma parte da seqüência de aminácidos. Em amarelo destaca-se um possível consenso para o fator  $\sigma^{70}$ , em azul os dois prováveis sítios para NtrC-P, sublinhado um possível sítio para o fator  $\sigma^{54}$ , em verde o sítio de ligação do ribossomo (RBS) e em vermelho o códon de início (ATG).

**A**

<b>Sítio 1 NtrC-P <i>H.s.</i></b>	<b>GCAG-N5-CATGGAC</b>
<b>Consenso geral NtrC-P</b>	<b>GCAC-N5-TGGTGCA</b>
	<b>***_ - - - -* - -</b>

**B**

<b>Sítio 2 NtrC-P <i>H.s.</i></b>	<b>GCAC-N5-TGTTCAA</b>
<b>Consenso geral NtrC-P</b>	<b>GCAC-N5-TGGTGCA</b>
	<b>**** *_- *- -*</b>

**Figura 13. Comparações do sítio consenso de ligação da proteína NtrC com os sítios 1 e 2 encontrados na suposta região promotora do gene do tipo *nac1* de *H. seropedicae* (*H.s.*). \* nucleotídeos idênticos; - nucleotídeos diferentes.**

A região consenso para o fator  $\sigma^{70}$  é caracterizada por TGGACA -N13/17-TATAAT. O sítio encontrado no provável promotor do gene do tipo *nac1* de *H. seropedicae* apresentou um espaçamento de 16 nucleotídeos e as regiões -35/-10 bastante similares (Figura 14). A presença desse provável sítio para o fator  $\sigma^{70}$  é contrastante com observado em *K. aerogenes* e *E. coli* (SCHWACHA e BENDER, 1993a; MUSE e BENDER, 1998) nos quais nenhum sítio de ligação para  $\sigma^{70}$  foi encontrado na região promotora do gene *nac*.

<b>Sítio <math>\sigma^{70}</math> <i>H.s.</i></b>	<b>TCGGCC</b>	<b>-N16-</b>	<b>AATAAT</b>
<b>Consenso geral <math>\sigma^{70}</math></b>	<b>TGGACA</b>	<b>-N13/17-</b>	<b>TATAAT</b>
	*- *- *-		- *****

**Figura 14.** Comparação do sítio consenso  $\sigma^{70}$  com o sítio encontrado na suposta região promotora do gene do tipo *nac1* de *H. seropedicae* (*H.s.*). \* nucleotídeos idênticos; - nucleotídeos diferentes.

O provável sítio para o fator  $\sigma^{54}$  encontrado na região promotora do gene do tipo *nac1* foi alinhado com o consenso CTGG-N8-TTGCA de ligação para o fator  $\sigma^{54}$  e está mostrado na Figura 15. Os nucleotídeos nas posições -24/-12 GG e GC são conservados no consenso geral. Em *H. seropedicae* a seqüência apresenta um espaçamento ideal (10 nucleotídeos entre as posições -24 e -12) e alguns nucleotídeos importantes são conservados. Entretanto em o par GC está substituído por GT e alterações nessas posições podem reduzir a ligação da RNAP-  $\sigma^{54}$  (MERRICK, 1993).

<b>Sítio <math>\sigma^{54}</math> <i>H.s.</i></b>	<b>CGGG-N8-TTGTA</b>
<b>Consenso geral <math>\sigma^{54}</math></b>	<b>CTGG-N8-TTGCA</b>
	*-***      *** -*

**Figura 15.** Comparação do sítio consenso  $\sigma^{54}$  com o sítio encontrado na suposta região promotora do gene do tipo *nac1* de *H. seropedicae* (*H.s.*). \*nucleotídeos idênticos; - nucleotídeos diferentes. Em vermelho está mostrada a substituição C por T.

MUSE e BENDER (1998) observaram que a seqüência da região promotora de *nac* em *E. coli* é bastante diferente da região correspondente do gene *nac* em *K. aerogenes*, exceto nas regiões onde ocorre ligação das proteínas regulatórias NtrC-P e Nac e do fator  $\sigma^{54}$  da RNA polimerase. Os autores ainda demonstraram que existe consenso para ligação da proteína Nac (ATA-N6-TNGTAT) no promotor do gene *nac* em *E. coli* em posição bastante similar àquela em *K. aerogenes* (localizada a 76 pares de base a montante do início de transcrição).

Outro fator contrastante na região promotora do gene do tipo *nac1* em *H. seropedicae* é que não foi encontrado nenhum possível consenso para ligação da proteína Nac. Portanto, não ficou claro se a provável proteína do tipo Nac1 em *H. seropedicae* é autoregulatória como em *E. coli* e *K. aerogenes*.

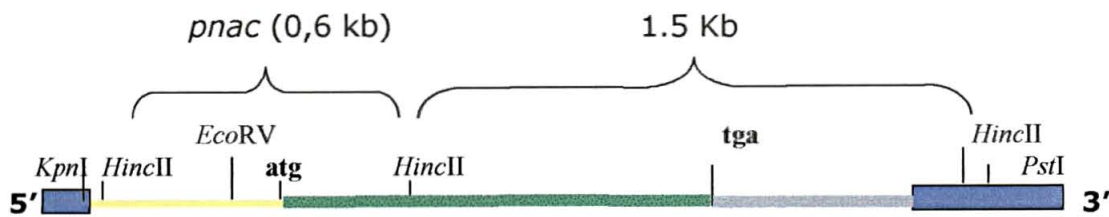
A análise da provável região promotora do gene do tipo *nac1* foi pouco esclarecedora sobre quais são os fatores essenciais para a transcrição do provável gene do tipo *nac* em *H. seropedicae*. Para melhor esclarecimento de expressão desse provável promotor foram feitos experimentos de fisiologia como descrito a seguir.

### **3.5.2 Subclonagem do fragmento de DNA contendo a provável região promotora do gene do tipo *nac1* de *H. seropedicae***

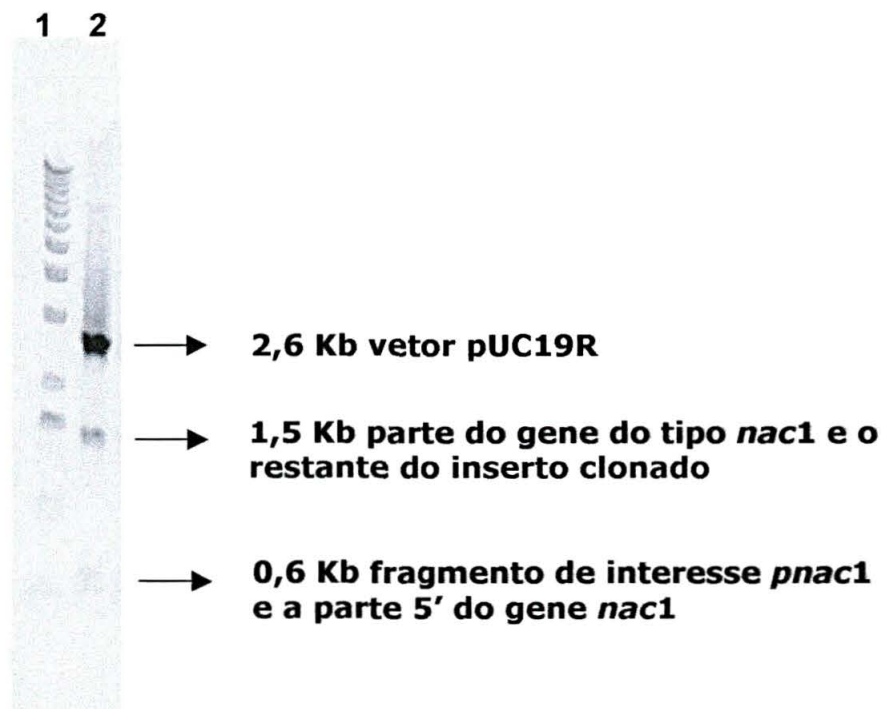
Como demonstrado anteriormente (Tabela 3) a proteína do tipo Nac1 apresenta maior similaridade com Nac de *E. coli* e *K. aerogenes*. E tem, apesar de pouco conservados, sítios consensos de ligação para proteína NtrC.

Para avaliar a provável ativação do gene do tipo *nac1* em *H. seropedice* pela proteína NtrC, uma parte da região a montante de *nac1* contendo os sítios de ligação para transcrição foi subclonada em vetor de transcrição contendo o gene repórter da  $\beta$ -galactosidase sem promotor.

O mapa de restrição do gene tipo *nac1* e provável região promotora contido no vetor pUC19R estão representados na Figura 16. Esse plasmídeo foi digerido com a enzima de restrição *HincII* liberando um fragmento de 0,6 kb que corresponde ao provável promotor deste gene (Figura 17). Essa estratégia foi a única possível para clonar a região de estudo. Os prováveis sítios de ligação para NtrC estão presentes nesse fragmento.



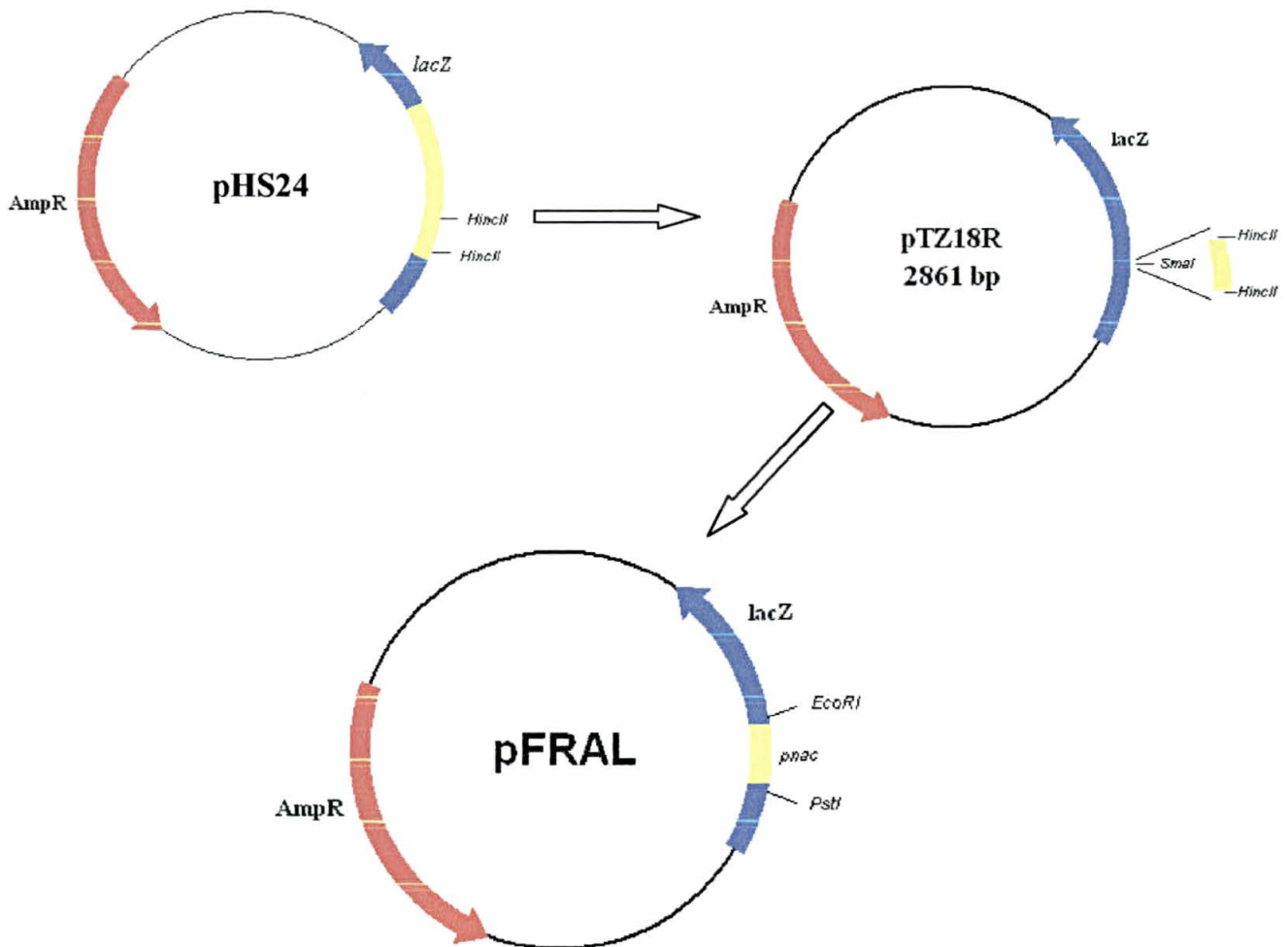
**Figura 16. Mapa de restrição do gene do tipo *nac1* obtido do banco de dados de *H. seropedicae*.** Em azul estão representadas partes do sítio de policlonagem do vetor pUC19R. Em amarelo a provável região promotora, em verde o gene do tipo *nac1* e em cinza o restante do inserto clonado no vetor. O início e o término do gene estão mostrados *atg* e *tga* respectivamente. Importante observar que o fragmento de 0,6 kb tem um sítio *EcoRV* que foi utilizado posteriormente.



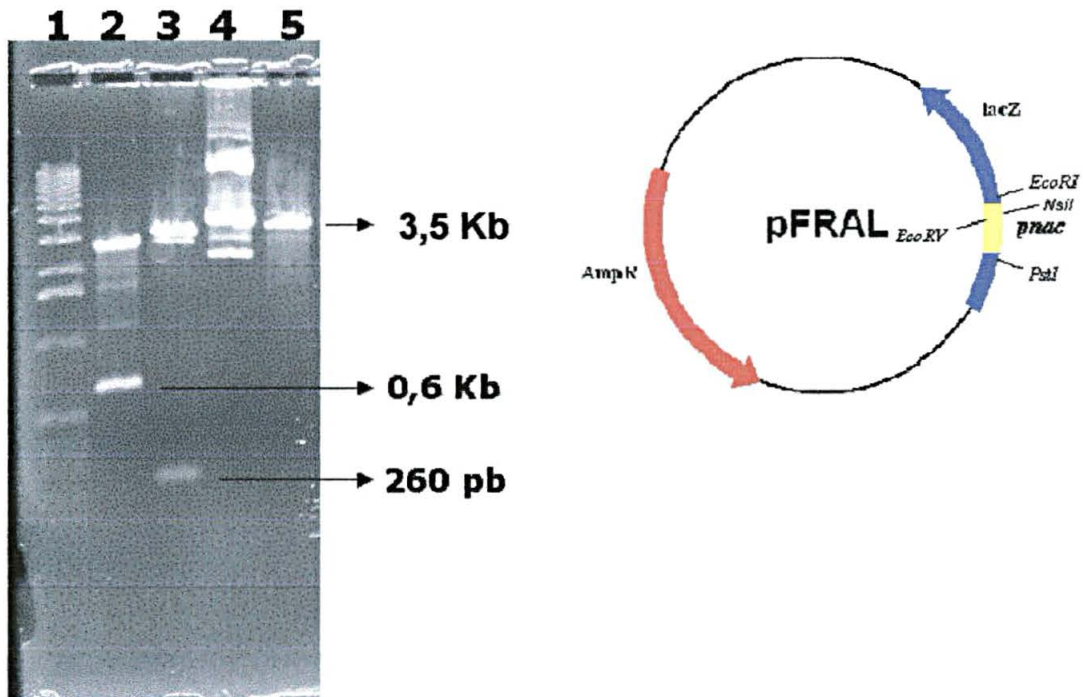
**Figura 17. Perfil de restrição do plasmídeo pHS24 com a enzima *HincII***  
**1 - 1 Kb ladder**  
**2 - plasmídeo pHS24 digerido com *HincII* liberando três fragmentos.**

Para a construção da fusão *pnac1-lacZ*, foram realizadas duas etapas de clonagem. Como descrito (item 2.16) o fragmento 0,6 Kb (*pnac1*) do gene tipo *nac1* foi isolado e ligado no sítio *SmaI* do vetor pTZ18R (as pontas *HincII* e *SmaI* são cegas) esquema na Figura 18.

A clonagem do *pnac1* no vetor pTZ18R originou o plasmídeo pFRAL confirmada através do perfil de restrição com as enzimas *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI* e *NsiI* (Figura 19). Foi feita também confirmação por sequenciamento utilizando iniciadores reverso e universal. As análises do perfil eletroforético e o resultado do sequenciamento confirmaram a orientação do inserto no vetor facilitando a próxima etapa de clonagem.



**Figura 18. Esquema representativo da primeira etapa de clonagem para fusão *pnac1-lacZ*.** O fragmento de 0,6 kb liberado após digestão com *HincII* (pontas cegas) do plasmídeo pHs24, o qual contém o gene do tipo *nac1* e sua região promotora (*pnac1*), foi clonado no sítio *SmaI* (pontas cegas) da região de policlonagem do vetor pTZ18R gerando o plasmídeo pFRAL.

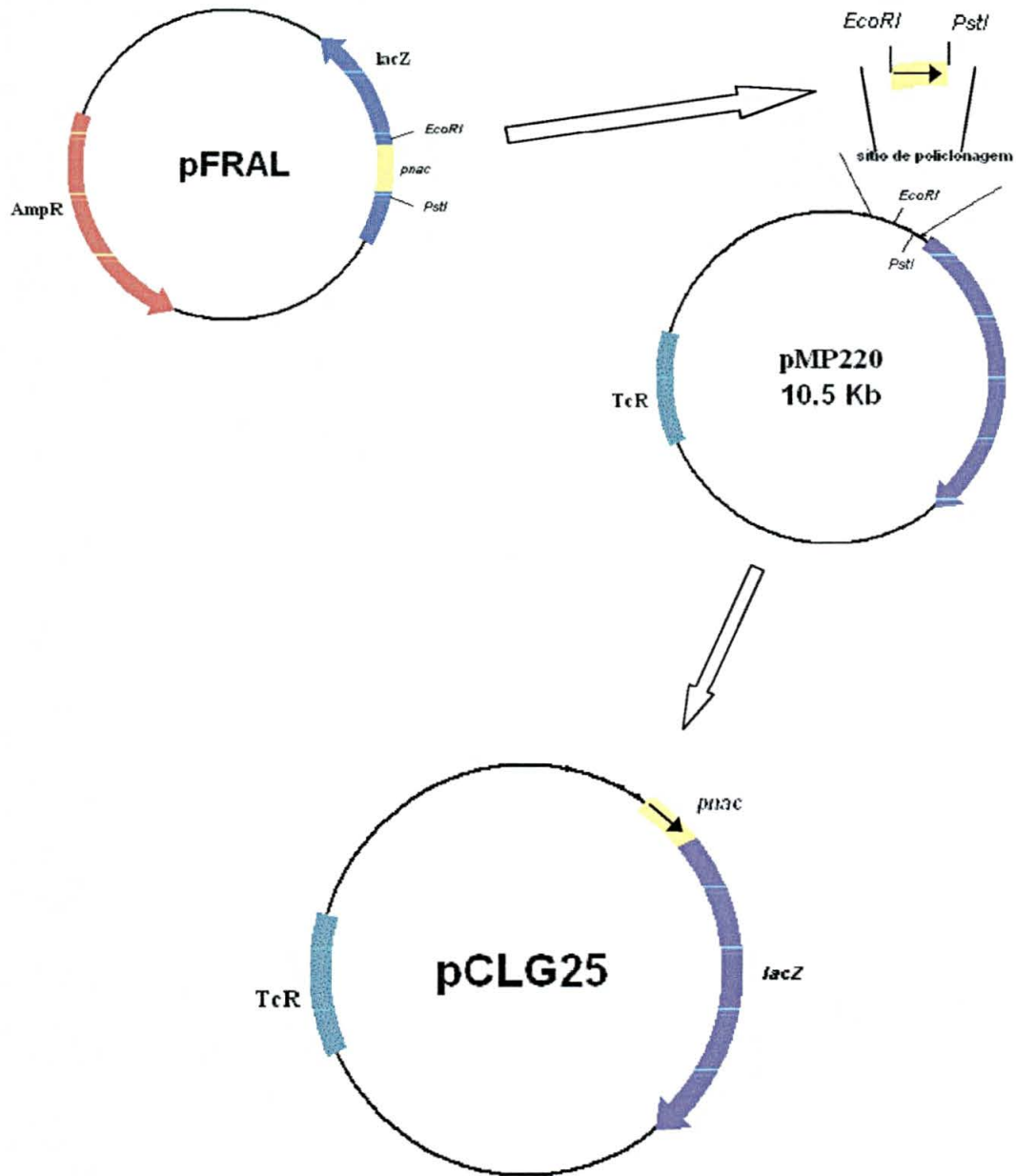


**Figura 19.** Perfil de restrição do plasmídeo pFRAL. O esquema representativo do plasmídeo com os sítios de restrição também são indicados.

- 1 - 1 Kb ladder
- 2 - pFRAL / *EcoRI* e *PstI*
- 3 - pFRAL / *EcoRI* e *EcoRV*
- 4 - pTZ18R / *NsiI* controle (não digerido por não ter o sítio para esta enzima)
- 5 - pFRAL / *NsiI*

A partir desse resultado foi escolhido o vetor de transcrição pMP220 (SPAINK *et al.*, 1987) para que a clonagem subsequente fosse orientada no sentido correto de transcrição do gene da  $\beta$  - galactosidase.

Para a fusão *lacZ*, o vetor de fusão transcricional pMP220 e o plasmídeo pFRAL digeridos separadamente com as enzimas *EcoRI* e *PstI* e então ligados aleatoriamente ("shut gun") resultando no plasmídeo pCLG25 (Figura 20). Após a transformação foram selecionados quatro possíveis transformantes para análise do perfil de restrição com as enzimas *EcoRI* e *PstI* (Figura 21A). O plasmídeo pCLG25 também foi digerido com a enzima *NsiI* cujo sítio só está presente no fragmento *pnaC1* (Figura 21B).



**Figura 20. Fragmento *pnc1* (*EcoRI* e *PstI*) clonado no vetor de transcrição *pMP220*.** Essa figura o fragmento *pnc1* clonado no vetor de transcrição *pMP220*. As setas indicam a orientação do fragmento igual ao gene da  $\beta$  - galactosidase.

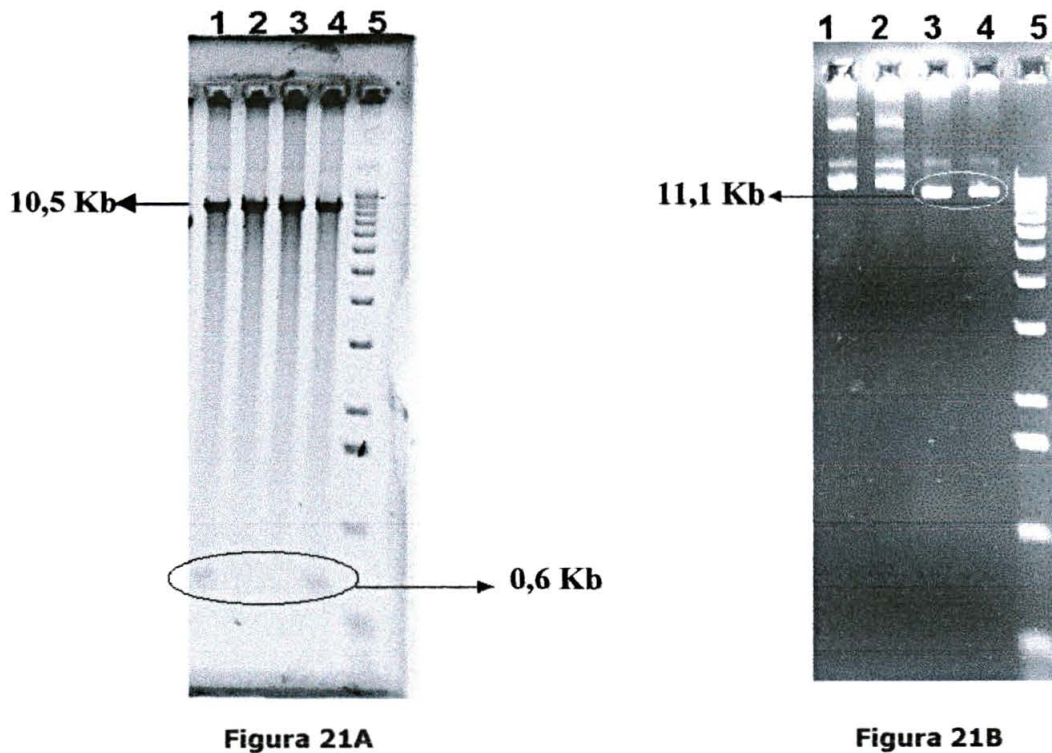
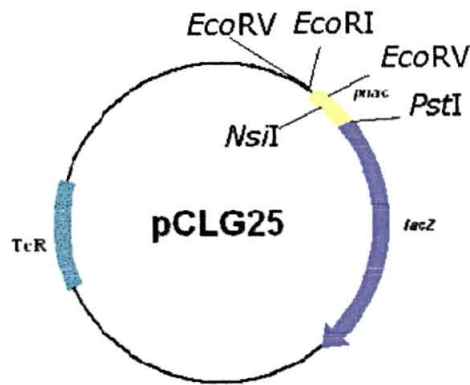


Figura 21A

Figura 21B



**Figura 21**

**A - Perfil de restrição do DNA plasmidial de 4 possíveis clones.**

1 a 4 - plasmídeos digeridos com *EcoRI* e *PstI*, liberando o inserto clonado de 0,6 Kb e o vetor pMP220 de 10,5 kb.

5 - 1 Kb ladder

**B - Confirmação dos clones quanto ao perfil de restrição.**

1 e 2 - pCLG25 não digerido

3 e 4 - pCLG25 / *NsiI* - o sítio *NsiI* está contido no fragmento clonado. O tamanho do fragmento (aprox. 11,1 Kb) corresponde ao inserto *pnac1* mais o vetor pMP220 (10,5 Kb).

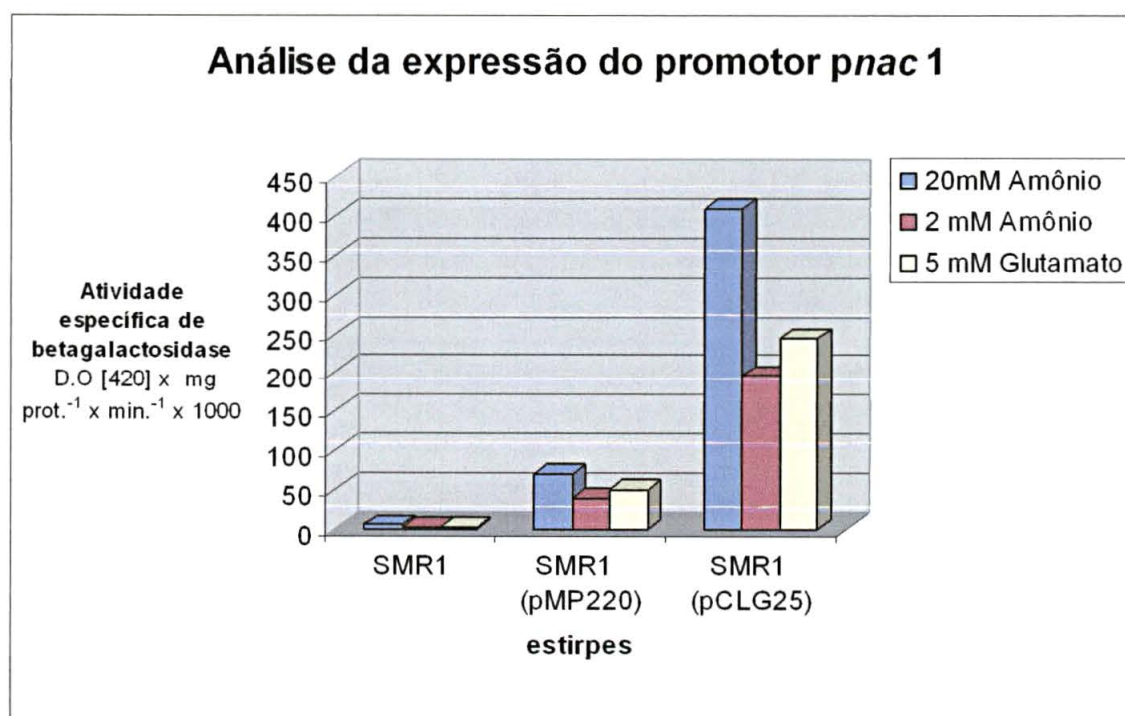
5 - 1 Kb ladder

O esquema do plasmídeo pCLG25 com os sítios de restrição está mostrado.

### 3.5.3 Análise da expressão do promotor *pnac1*: avaliação da atividade específica de $\beta$ - galactosidase

O plasmídeo pCLG25 foi transformado em células de *H. seropedicae* estirpes selvagens (SMR1) e *ntnC*<sup>-</sup> (DCP286A) e medida a atividade da enzima  $\beta$  - galactosidase para avaliar a ativação do promotor na célula hospedeira. Essas análises foram realizadas em diferentes condições de nitrogênio no meio (2 mmol/L de amônio, 20 mmol/L de amônio, 5 mmol/L de glutamato). Foram determinadas as atividades de  $\beta$  - galactosidase nas estirpes SMR1 e DCP286A sem plasmídeo, com pMP220 e com pCLG25.

Os resultados das atividades estão mostrados na Figura 22. A estirpe SMR1 sem plasmídeo ou contendo o plasmídeo pMP220 não apresentaram atividade de  $\beta$  - galactosidase significativa. SMR1 contendo o plasmídeo pCLG25 cultivada em 20mmol/L ou 2 mmol/L de amônio ou 5 mmol/L de glutamato apresentou atividade de  $\beta$ -galactosidase, demonstrando que o fragmento clonado que corresponde ao *pnac1* apresenta atividade promotora.



**Figura 22.** Atividade específica de  $\beta$  - galactosidase da estirpe SMR1 de *H. seropedicae*. Os valores são representativos de 3 repetições independentes.

As atividades específicas na estirpe SMR1 variaram de acordo com as condições de crescimento. As estirpes cultivadas em 20 mmol/L de cloreto de amônio apresentaram a maior atividade em relação às condições de baixo amônio (2 mmol/L) ou 5 mmol/L de glutamato. Esse resultado é contrastante com aqueles já descritos para bactérias entéricas, onde o promotor do gene *nac* é controlado pela disponibilidade de nitrogênio no meio. Na presença de íons amônio NtrC é inativado por NtrB e portanto o gene *nac* não é transcrito a partir de -24/-12. Por outro lado em condições de baixo amônio no meio o promotor do gene *nac* é ativado pela proteína NtrC fosforilada e pelo fator  $\sigma^{54}$  da RNA polimerase (SCHWACHA e BENDER, 1993a). Em experimentos com componentes purificados de *K. aerogenes*, a transcrição do promotor *nac* inicia-se pela forma ativada da proteína NtrC em contato com o fator  $\sigma^{54}$  da RNA polimerase com a formação de uma dobra na DNA (DNA looping) (FENG *et al.*, 1995a). A transcrição do gene *nac* nesse organismo requer a presença de uma quantidade maior da proteína NtrC ativada do que para a ativação de *glnAp2* indicando que o promotor *nac* é ativado somente em altas concentrações de NtrC-P, uma vez que o produto resultante desta ativação é útil em condições limitantes de nitrogênio no meio (FENG *et al.*, 1995a). Os genes *nifLA* de *K. pneumoniae* também são ativados somente em altas concentrações de NtrC-P quando a disponibilidade de nitrogênio no meio é bastante baixa (ATKINSON *et al.*, 2002). Esses mesmos autores descreveram que em *E. coli* quando as células são submetidas a transições de alta para baixa condição de amônio no meio, a quantidade de proteína NtrC-P é significativamente aumentada para ativar os genes *glnA*, *glnK* e *nac*, onde a quantidade de NtrC-P para ativar *nac* é maior do que a concentração requerida para ativar *glnAp2*, concordando com os resultados de FENG *et al.* (1995a).

A estirpe DCP286A teve o gene *ntrC* mutagenizado com transposon Tn5-B20 (PERSHUN *et al.*, 2000). Esse transposon possui o gene da  $\beta$  - galactosidase e possui atividade baixa porém constitutiva.

O plasmídeo pCLG25 foi introduzido na estirpe DCP286A e em todas as condições de crescimento a atividade foi igual ou pouco superior a atividade basal da estirpe controle com o plasmídeo pMP220 não sendo possível observar se existia ou não regulação pela ausência de NtrC. Esses resultados não

conclusivos não foram mostrados nesse trabalho.

Em paralelo foi avaliada a atividade promotora de *pnac1* em meio NFbHP sólido suplementado com 1 mmol/L ou 20 mmol/L de cloreto de amônio e X-gal com a estirpe SMR1 de *H. seropedicae*.

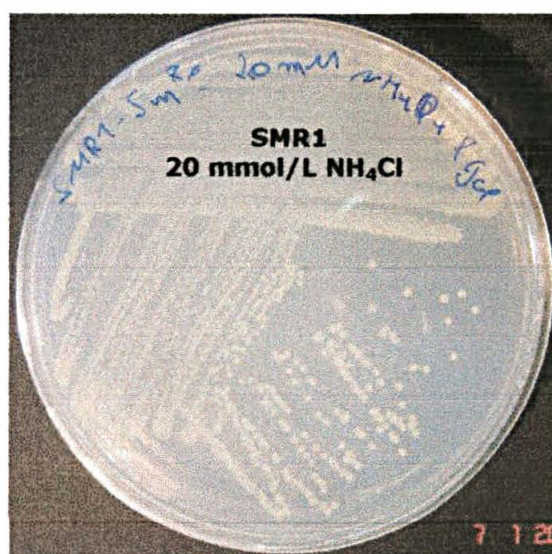
Os resultados obtidos nas placas confirmam os resultados da atividade específica da  $\beta$ -galactosidase em *H. seropedicae* como mostra a Figura 23. Como controles em A e B é mostrado o crescimento da estirpe SMR1 sem plasmídeo e C e D SMR1 com plasmídeo pMP220 sem inserto e com o plasmídeo pCLG25.

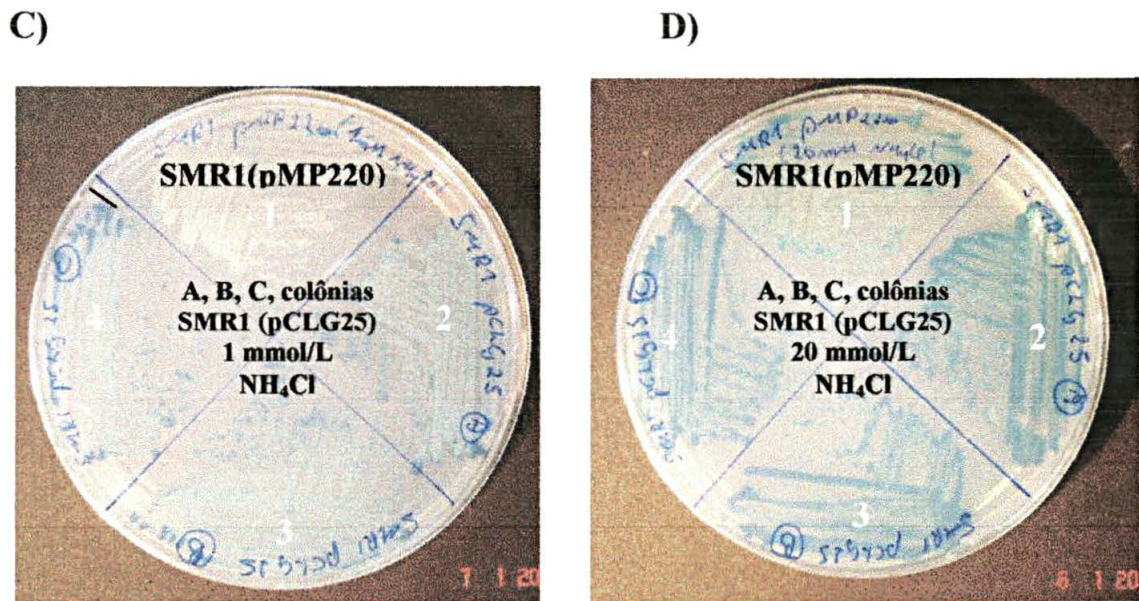
O cultivo com 1 mmol/L de cloreto de amônio (Figura 23 C) mostrou que a estirpe selvagem SMR1 (pMP220) tem uma atividade basal, por isso as colônias ficaram levemente azuis. Ainda na Figura 23 C 2, 3 e 4, o cultivo mostrou que a estirpe SMR1 (pCLG25) apresentou coloração azul bem definida indicativo de atividade de  $\beta$  - galactosidase da fusão. O cultivo de SMR1 (pMP220) em 20 mmol/L de cloreto de amônio (Figura 23 D1), apresentou uma coloração de fundo (coloração basal) superior em relação à condição de baixo amônio (1 mmol/L) provavelmente devido ao maior número de células que cresceram. As estirpes contendo o plasmídeo pCLG25 apresentaram colônias de coloração azul com maior intensidade quando comparado com o crescimento em 1 mmol/L de cloreto de amônio (Figuras 23 C 2, 3 e 4 e D 2, 3 e 4).

A)



B)





**Figura 23. Visualização da atividade  $\beta$ -galactosidase pela degradação do substrato X-gal.** Estirpes *H. seropedicae* SMR1 (wt) ou contendo plasmídeos pMP220 (controle) ou pCLG25 crescidas em meio NFbHP malato contendo X-gal e 1 mmol/L ou 20 mmol/L de cloreto de amônio.

Os resultados de fisiologia sugerem que o fragmento clonado no vetor pMP220 apresenta atividade de promotor produzindo a enzima beta galactosidase determinada quantitativamente (Figura 22) e qualitativamente em placa (Figura 23). As atividades mais altas ocorrem na presença de íons amônio no meio e nessas condições NtrC está inativo (defosforilado). Em baixo amônio a atividade é significativamente menor. Portanto esse gene não é ativado pela disponibilidade da proteína NtrC fosforilada em baixo amônio no meio.

Além disso, considerando a presença das regiões intensificadoras de ligação para NtrC mostrados na figura 12 pode-se ainda cogitar uma regulação negativa e dependente da disponibilidade de nitrogênio do gene do tipo *nac1*. Nesse caso, em baixa disponibilidade de amônia no meio haveria ativação da proteína NtrC para sua forma fosforilada e nessa forma poderia haver a ligação no(s) sítio(s) e ocorreria o impedimento da transcrição do gene do tipo *nac1* que normalmente seria transcrito pela RNA polimerase contendo o fator  $\sigma^{70}$ . Nesse caso a atividade  $\beta$  - galactosidase apresentou-se baixa.

Na presença de alta concentração de íons amônio, a proteína NtrC não

está fosforilada e conseqüentemente o(s) sítio(s) NtrC não estaria(am) ocupado(s) e o gene seria ativado livremente pelo fator  $\sigma^{70}$  da RNA polimerase.

De qualquer modo o promotor em estudo regulado ou não por NtrC não apresentou as características necessárias para que a proteína produzida ativasse genes essenciais para condições de assimilação de outras fontes de nitrogênio.

Em síntese, os resultados obtidos em *H. seropedicae* revelaram a dependência parcial ou total da proteína reguladora NtrC para o transporte e/ou catabolismo da uréia, L-alanina, L-serina e L-prolina.

Os dados da análise funcional feita por programas no computador (item 3.4) das prováveis proteínas do tipo Nac e o estudo da região promotora do gene do tipo *nac1* não mostraram claramente dependência de NtrC-P para a expressão desse gene.

Os experimentos de fisiologia usando o clone contendo o provável promotor do gene do tipo *nac1* confirmaram que NtrC-P não é um ativador desse gene e a hipótese de atuação de NtrC como um eventual repressor teria que ser mais estudada.

Nossos resultados mostram que os genes do tipo *nac1*, *nac2* e *nac3* provavelmente codificam proteínas com funções completamente diferentes das proteínas Nac já estudadas e talvez sem envolvimento com o metabolismo de nitrogênio em *H. seropedicae*.

Certamente os produtos desses 3 genes são proteínas do tipo HTH como discutido anteriormente isto devido a maior percentagem de similaridade e identidade na região N-terminal nas 3 proteínas o que é característico da família LysR. Entretanto a parte restante da proteína tem baixa identidade e similaridade quando comparamos as proteínas Nac dos organismos entéricos.

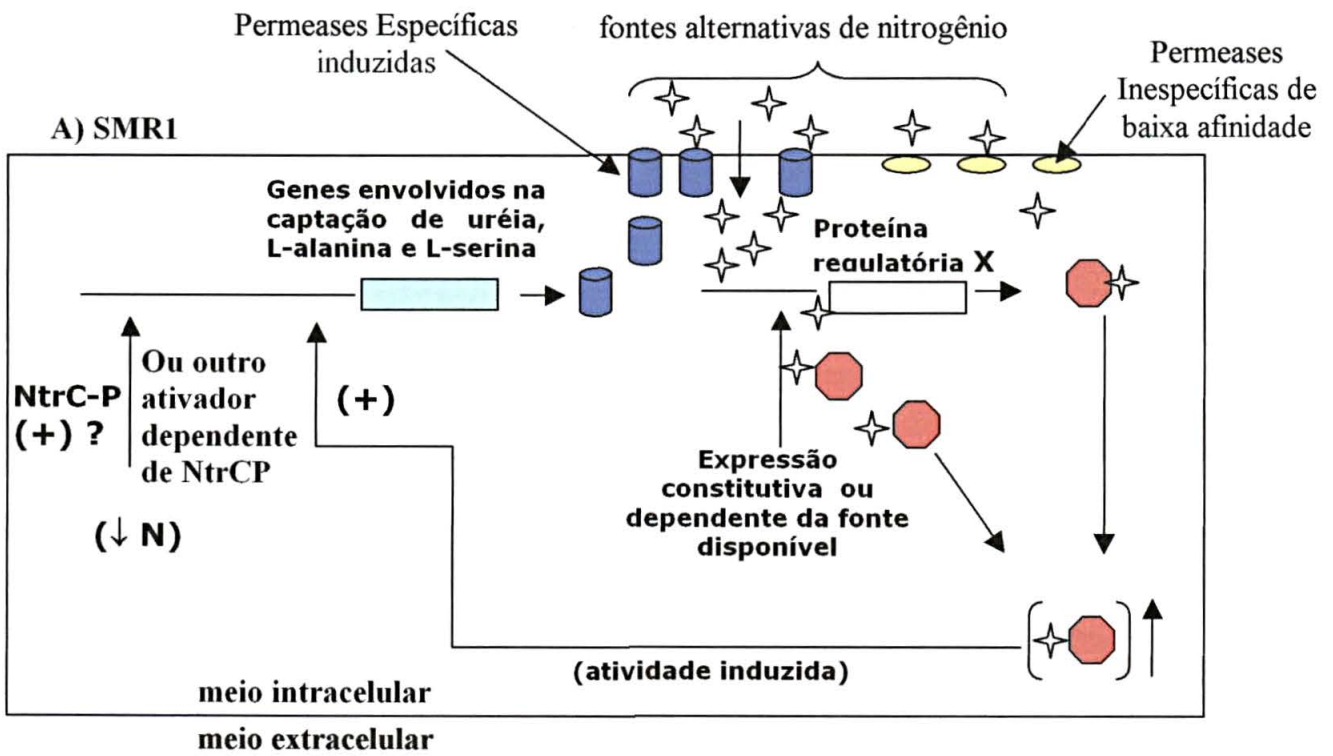
Portanto, com os dados até aqui obtidos propomos um modelo de regulação (Figura 24) sujeito a estudos posteriores para sua confirmação ou ampliação. Esse modelo tenta explicar a longa fase lag de crescimento das estirpes DCP286A em uréia e L-serina. A ausência de crescimento em L-prolina além do modelo deve envolver a necessidade de NtrC-P para o catabolismo.

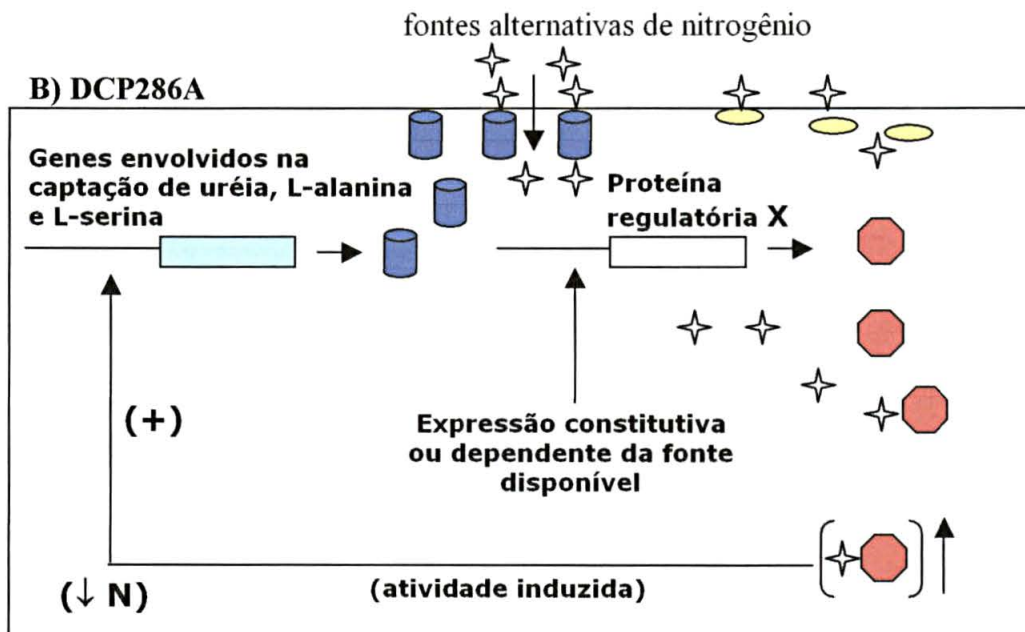
A figura 24 A mostra um modelo proposto para a estirpe selvagem (SMR1) de *H. seropedicae*. A estirpe selvagem inicialmente capta lentamente a fonte alternativa de nitrogênio (na ausência de amônio) através de uma

permease inespecífica. Enquanto isso a proteína NtrC fosforilada ou outro ativador dependente de NtrC pode ativar a transcrição de uma permease específica que age rapidamente na captação da fonte disponível. Simultaneamente, uma segunda proteína, a proteína X, pode também ter sua transcrição dependente da fonte disponível ou ser transcrita constitutivamente. Com o acúmulo da fonte de nitrogênio dentro da célula, a proteína X reconhece e interage com essa molécula e dessa forma a proteína X ligada ao seu cofator (fonte alternativa de nitrogênio) atua rapidamente na ativação dos genes (ativação induzida) envolvidos na captação específica (permease específica) da fonte disponível.

A Figura 24 B mostra o modelo para a estirpe *ntrC*<sup>-</sup> mutante de *H. seropedicae* DCP286A. O lento crescimento da estirpe DCP286A na fonte alternativa de nitrogênio em estudo pode decorrer da lenta captação inicial da fonte disponível somente através da permease inespecífica. Na ausência da proteína NtrC a captação via permease específica da fonte de nitrogênio se torna mais lenta devido à falta de ativação do gene dessa permease (direta ou indiretamente dependente de NtrC-P) que atuaria na rápida captação da fonte disponível.

A proteína NtrC pode também estar envolvida na ativação de algum gene responsável pelo catabolismo de L-serina e L-prolina, não mostrado no esquema, o que explicaria o baixo ou a ausência total de crescimento da estirpe DCP286A em meio contendo L-serina ou L-prolina respectivamente.





**Figura 24. Modelo de regulação proposto para utilização de fontes alternativas de nitrogênio em *H. seropedicae* estirpes SMR1 e DCP286A.**

Em amarelo, permease inespecífica; em azul, permease específica; em branco, fonte alternativa de nitrogênio; em vermelho: proteína X ativadora de transcrição dependente do tipo de fonte de nitrogênio.

#### 4 – CONCLUSÕES

- 1- NtrC-P facilita a utilização de uréia e L-alanina tornando rápida a incorporação e a utilização desses compostos como fontes de nitrogênio. Isto implica que algumas fontes de nitrogênio alternativas podem ser utilizadas, mesmo que mais lentamente, independente de NtrCP garantindo a manutenção do crescimento da cultura.
- 2- Ao oposto para alguns compostos nitrogenados como L-serina e L-prolina NtrC-P é essencial para o crescimento da cultura.
- 3- Existem no genoma de *H. seropedicae* três genes que codificam proteínas identificadas, através do programa Blast, como ortólogas as Nac de *K. aerogenes* e *E. coli*.
- 4- O provável promotor da proteína a Nac1 que possui maior similaridade com as proteínas Nac de organismos entéricos é expresso na presença de íons amônio, portanto provavelmente não dependente de NtrC-P.
- 5- As proteínas identificadas como Nac de *H. seropedicae* pertencem à família de proteínas LysR e suas funções ainda são desconhecidas, entretanto seu envolvimento no metabolismo de nitrogênio é pouco provável.

## 5. Referências Bibliográficas

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped blast and psi-Blast: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, Oxford, v.25, p. 3389-3402, 1997.
- ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. J. PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. American Society of Microbiology, Washington, v. 65, n. 1, p. 80-105, 2001.
- ATKINSON, M. R.; BLAUWKAMP, T. A.; BONDARENKO, V.; STUDITSKY, V.; NINFA, A. J. Activation of the *glnA*, *glnK*, and *nac* promoters as *Escherichia coli* undergoes the transition from nitrogen excess growth to nitrogen starvation. J.Bacteriol., Washington, v.184, n.19, p. 5358-63, 2002.
- AUSTIN, S.; DIXON, R. The prokaryotic enhancer binding protein NTRC has an ATPase activity which is phosphorylation and DNA dependent. EMBO J., Oxford, v.11, n. 6, p. 2219-28, 1992.
- 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. Bacteriol., Washington, v.36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DOBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. Symbiosis, Rehovot, v.13, p. 65-73, 1992.
- BANKIER, A.T.; WESTON, K.M.; BARREL, B.G. Random cloning and sequencing by the M13 dideoxynucleotide chain termination method. Methods Enzymol., v. 155, p. 51-93, 1987.
- BENDER, R. A. The Role of the Nac protein in the nitrogen regulation of *Klebsiella aerogenes*. Mol. Microbiol. Oxford, v. 5, n. 11, p. 2575-80, 1991.
- BENDER, R. A.; SNYDER, P. M.; BUENO, R.; QUINTO, M.; MAGASANIK, B. Nitrogen

- regulation system of *Klebsiella aerogenes*: the *nac* gene. J. Bacteriol., Washington, v. 156, n.1, p. 444-46. 1983.
- BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Evidence for two possible *glnB* type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. J. Bacteriol., Washington, v. 179, p. 4623-4626, 1997.
- BIBB, M.J.; FINDLAY, P.R.; JOHNSON, M.W. The relationship between base composition and codon usage in bacterial gene and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. Gene, Amsterdam, v.30, p. 157-66, 1984.
- BLAUWKAMP, T. A.; NINFA, A. J. Nac-mediated repression of the *serA* promoter of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol., Oxford, v. 45, n. 2, p. 351-63, 2002.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, Georgia, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BUCK, M.; CANNON, M. Specific binding of the transcription factor sigma-54 to promoter DNA. Nature, London, v. 358, n. 6385, p. 422-24, 1992.
- BURNS, R.C.; HARDY, K.W. Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants. Berlin: Springer-Verlag, 1975.
- COLLINS, C. M.; GUTMAN, D. M.; LAMAN, H. Identification of a nitrogen-regulated promoter controlling expression of *Klebsiella pneumoniae* urease genes. Mol. Microbiol., Oxford, v. 8, n. 1, p. 187-98, 1993.
- CONTRERAS, A.; DRUMMOND, M. The effect on the function of the transcriptional activator NtrC from *Klebsiella pneumoniae* of mutations in the DNA-recognition helix. Nucleic Acids Research, Oxford, v.16, n. 9, p. 4025-39, 1988.
- de 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., Washington, v. 181, n. 2, p. 681-84, 1999.

- DEAN, R. D.; BOLIN, J. T.; ZHENG, L. Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. J. Bacteriol., Washington, v. 175, n. 21, p. 6737, 1993.
- DEUEL, T. F.; STADTAMN, E. Some Kinetic properties of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase. Nature., London, v. 323, p. 304-309, 1970.
- DOBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non leguminous plants. Symbiosis, Rehovot, v. 13, p. 1-13, 1992a.
- DOBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. Cienc. Cult. (São Paulo), v. 44, p. 310-313, 1992b.
- DORRELL, N.; GUIGUE-TALET, P.; SPENCER, S.; FOULONGE, V.; O'CALLAGHAN, D.; WREN, B. W. Investigation into the role of the response regulator NtrC in the metabolism and virulence of *Brucella suis*. Microb.Pathog., v. 27, n. 1, p. 1-11, 1999.
- DOUGLAS, S. E. DNA Strider. A Macintosh program for handling protein and nucleic acid sequences. Methods Mol. Biol., v. 25, p. 181-94, 1994.
- DRUMMOND, M.; WHITTY, P.; WOOTTON, J. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. EMBO J., Oxford, v. 5, n. 2, p. 441-47, 1986.
- ERNSTING, B. R.; DENNINGER, J. W.; BLUMENTHAL, R. M.; MATTHEWS, R. G. Regulation of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*: how is a leucine-insensitive operon regulated by the leucine-responsive regulatory protein? J.Bacteriol., Washington, v. 175, n. 22, p. 7160-69, 1993.
- ESPIN, G.; ALVAREZ-MORALES, A.; CANNON, F.; DIXON, R.; MERRICK, M. Cloning of the *glnA*, *ntrB* and *ntrC* genes of *Klebsiella pneumoniae* and studies of their role in regulation of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster. Mol.Gen.Genet., Berlin, v. 186, n. 4, p. 518-24, 1982.

- FENG, J.; GOSS, T. J.; BENDER, R. A.; NINFA, A. J. Activation of Transcription Initiation from the *nac* Promoter of *Klebsiella aerogenes*. J. Bacteriol., Washinton, v. 177, n. 19, p. 5523-5534, 1995a.
- FENG, J.; GOSS, T. J.; BENDER, R. A.; NINFA, A. J. Repression of the *Klebsiella aerogenes nac* promoter. J. Bacteriol., Washington, v. 177, n. 19, p. 5535-5538, 1995b.
- GALVÃO, C.W.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; CHUBATSU, L.S.; STEFFENS, M.B. The *recX* gene product is involved in the SOS response in *Herbaspirillum seropedicae*. Can. J. Microbiol., Ottawa, v. 49, n. 2, p. 145-50, 2003.
- GARDY, JENNIFER L. *et al.* PSORT-B: improving protein subcellular localization prediction for Gram-negative bacteria. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 31, n. 13, p. 3613-3617, 2003.
- GEORGIADIS, M. M.; KOMIYAH, H.; CHAKRABARTI, P; WOO, D.; KORNUC, J. J. REES, D. C. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. Science, Washington, v. 257, p.1653-1659, 1992.
- GOLDMAN, B. S.; LIN, J. T.; STEWART, V. Identification and structure of the *nasR* gene encoding a nitrate- and nitrite-responsive positive regulator of *nasFEDCBA* (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. J.Bacteriol., Washington, v. 176, n. 16, p. 5077-85, 1994.
- GOSS, T. J.; JANES, B. K.; BENDER, R. A. Repression of glutamate dehydrogenase formation in *Klebsiella aerogenes* requires two binding sites for the nitrogen assimilation control protein, NAC. J.Bacteriol., Washington, v. 184, n. 24, p. 6966-75, 2002.
- GRANT, S.; JESSEE, J.; BLOOM, F.; HANAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 87, p. 4645-49, 1990.
- HE, L.; SOUPENE, E.; NINFA, A.; KUSTU, S. Physiological role for the GlnK protein of

- enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting conditions. J. Bacteriol., Washington, v. 180, n. 24, p. 6661-6667, 1998.
- HENIKOFF, S.; HAUGHN, G. W.; CALVO, J. M; WALLACE, J. C. A large family of bacterial activator proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 85, p. 6602-6606, 1988.
- HULO, N.; SIGRIST, C.J.; Le SAUX, V.; LANGENDIJK-GENEYAU, P.S.; BORDOLI, L.; GATTIKER, A.; De CASTRO, E.; BUCHER, P.; BAIROCH, A. Recent improvements to the PROSITE database. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 32, Database issue: D134-7, 2004.
- HUNT, T. P.; MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG*, and *glnL*. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Washington, v. 82, n. 24, p. 8453-57, 1985.
- IKEGAMI, A.; NAKASONE, K.; KATO, C.; USAMI, R.; HORIKOSHI, K. Structural analysis of the *ntrBC* genes of deep-sea piezophilic *Shewanella violacea*. Biosci.Biotechnol.Biochem., v. 64, n. 4, p. 915-18, 2000.
- JACK, R.; DE ZAMAROCZY, M., MERRICK, M. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of *nif* genes expression in *Klebsiella pneumoniae*. J. Bacteriol., Washington, v. 181, n. 4, p. 1156-62, 1999.
- JANES, B. K.; BENDER, R. A. Alanine catabolism in *Klebsiella aerogenes*: molecular characterization of the *dadAB* operon and its regulation by the nitrogen assimilation control protein. J.Bacteriol., Washington, v. 180, n. 3, p. 563-70, 1998.
- JANES, B. K.; ROSARIO, C. J; BENDER,R. A. Isolation of a negative control mutant of the nitrogen assimilation control protein, NAC, in *Klebsiella aerogenes*. J.Bacteriol., Washington, v. 185, n. 2, p. 688-92, 2003.
- JANSSEN, P. J.; JONES, W. A.; JONES, D. T.; WOODS, D. R. Molecular analysis and regulation of the *glnA* gene of the gram-positive anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. J. Bacteriol., Washington, v. 170, p. 400-408, 1988.

- KADO, C. I.; LIU, S. T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol., Washington, v. 145, n. 3, p. 1365-73, 1981.
- KEUNTJE, B.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. Expression of the *putA* Gene Encoding Proline Dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus* Is Independent of NtrC Regulation but Requires an Lrp-Like Activator Protein. J. Bacteriol., Washington, v. 177, n. 22, p. 6432-39, 1995.
- KILKENNY, C. A.; BERGER, D. K.; RAWLINGS D. E. Isolation of the *Thiobacillus ferrooxidans ntrBC* genes using a *T. ferrooxidans nifH-lacZ* fusion. Microbiology, v. 140, (Pt 10), p. 2543-53, 1994.
- KLASSEN, G.; PEDROSA F. O; de SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. Nitrogenase activity of *Herbaspirillum seropedicae* grown under low iron levels requires the products of *nifXorf1* genes. FEMS Microbiol.Lett., Amsterdam, v. 224, n. 2, p. 255-59, 2003.
- KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; de SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *Herbaspirillum seropedicae*. FEMS Microbiol.Lett., Amsterdam, v. 181, n. 1, p. 165-70, 1999.
- KLOSE, K. E.; NORTH, K.; STEDMAN, K. M.; KUSTU, S. The major dimerization determinants of the nitrogen regulatory protein NTRC from enteric bacteria lie in its carboxy-terminal domain. J. Mol. Biol., London, v. 241, n. 2, p. 233-45, 1994.
- KRANZ, R. G.; HASELKORN, R. Characterization of *nif* regulatory genes in *Rhodospseudomonas capsulata* using *lac* gene fusions. Gene, Amsterdam, v. 40, n. 2-3, p. 203-15, 1985.
- KYTE, J.; DOOLITTLE, R.F. "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." J. Mol. Biol., London, v. 157, p.105-132, 1982.
- LIANG, Y. Y.; ARSENE, F.; ELMERICH, C. Characterization of the *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* Sp7: their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity. Mol.Gen.Genet., Berlin, v. 240, n. 2, p. 188-96, 1993.

- LJONES, T. Nitrogen fixation and bioenergetics: the role of ATP in nitrogenase catalysis. FEBS Lett. Amsterdam, v. 98, n.1, p. 1-8, 1979.
- MACALUSO, A.; BEST E. A.; BENDER, R. A. Role of the *nac* gene product in the nitrogen regulation of some NTR-regulated operons of *Klebsiella aerogenes*. J.Bacteriol., Washington, v. 172, n. 12, p. 7249-55, 1990.
- MACHADO, I.M.P.; YATES, M.G.; MACHADO, H.B.; SOUZA, E.M. PEDROSA, F.O. Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. Braz. J.Med.Biol.Res., Ribeirão Preto, v.29, p. 1599-1602, 1996.
- MAGALHÃES, C. L.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). Appl. Environ. Microbiol., v. 67, n. 5, p. 2375-2379, 2001.
- MAHARAJ, R.; RUMBAC, E.; JONES, W. A.; ROBB, S. M.; ROBB, F. T.; WOODS, D. R. Nucleotide sequence of the *Vibrio alginolyticus glnA* region. Arch. Microbiol., New York, v. 152, n. 6, p. 542-49, 1989.
- MARTIN, G. B.; CHAPMAN K. A.; CHELM B. K. Role of the *Bradyrhizobium japonicum ntrC* gene product in differential regulation of the glutamine synthetase II gene (*glnII*). J.Bacteriol., Washington, v. 170, n. 12, p. 5452-59, 1988.
- MASEPOHL, B.; KAISER, B.; ISAKOVIC, N.; RICHARD, C. L.; KRANZ, R. G.; KLIPP, W. Urea Utilization in the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus* Is Regulated by the Transcriptional Activator NtrC. J. Bacteriol., Washington, v. 183, n. 2, p. 637-643, 2001.
- MEAD, D.A.; SZCZESNA-SKORUPA, E; KEMPER, B. SINGLE-STRAND DNA "BLUE" T7 PROMOTER PLASMIDS: A versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. Protein Engineering, Oxford, v. 1, n. 1, p. 67-74, 1986.
- MERRICK, M. J. In a class of its own-the RNA polymerase sigma factor  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ). Mol. Microbiol., Oxford, v. 10, n. 5, p. 903-909, 1993.

- MERRICK, M. J; EDWARDS, R. A. Nitrogen Control in Bacteria. American Society for Microbiology, Washington, v. 59, n. 4, p. 604-622, 1995.
- MICHEL-REYDELLET, N; DESNOUES, N; DE ZAMAROCZY, M; ELMERICH, C; KAMINSKI, P. A. Characterisation of the *glnK-amtB* operon and the involvement of AmtB in methylammonium uptake in *Azorhizobium caulinodans*. Mol. Gen. Genet., Berlin, v. 258, p. 671-677, 1998.
- MILCAMP, A.; VAN DOMMELEN, A., STIGER, J; VANDERLEYDEN, J.; DE BRUJIN F. J. The *Azospirillum brasilense rpoN* gene is involved in nitrogen fixation, nitrate assimilation, ammonium uptake and flagellar biosynthesis. Can. J. Microbiol., Ottawa, v. 258, p. 671-677, 1996.
- MILLER, J. H. A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 456 p. 1992.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Estatísticas. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: Janeiro de 2004.
- MOLLER, S.; CRONING, M.D.R; APWEILER, R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. Bioinformatics, v. 17, n. 7, p. 646-653, 2001.
- MORENO, S.; PATRIARCA, E. J.; CHIURAZZI, M.; MEZA, R.; DEFEZ, R.; LAMBERTI, A.; RICCIO, A.; IACCARINO, M.; ESPIN, G. Phenotype of a *Rhizobium leguminosarum ntrC* mutant. Res.Microbiol., v. 143, n. 2, p. 161-71,1992.
- MUSE, W. B.; BENDER, R. A. The amino-terminal 100 residues of the nitrogen assimilation control protein (NAC) encode all known properties of NAC from *Klebsiella aerogenes* and *Escherichia coli*. J.Bacteriol., Washington, v. 181, n. 3, p. 934-40, 1999.
- MUSE, W. B.; BENDER, R. A. The *nac* (nitrogen assimilation control) gene from *Escherichia coli*. J.Bacteriol., Washington, v. 180, n. 5, p. 1166-73, 1998.

- MUSE, W. B.; ROSARIO, C. J.; BENDER, R. A. Nitrogen regulation of the *codBA* (cytosine deaminase) operon from *Escherichia coli* by the nitrogen assimilation control protein, NAC. J.Bacteriol., Washington, v. 185, n. 9, p. 2920-26, 2003.
- NEIDHARDT, F. C.; UMBARGER, H. E. Chemical composition of *Escherichia coli*,. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham. E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter e G. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C, p. 13-16, 1996.
- NINFA, A. J.; REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Initiation of transcription at the bacterial *glnAp2* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers. Cell, Cambridge v. 50, n. 7, p. 1039-46, 1987.
- NOHNO, T; SAITO, T. Two transcriptional start sites found in the promoter region of *Escherichia coli* glutamine permease operon, *glnHPQ*. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 15, n. 6, p. 2777, 1987.
- PAWLOWSKI, K.; RATET, P.; SCHELL, J.; BRUIJN, F. Cloning and characterization of *nifA* and *ntrC* genes of the stem nodulating bacterium ORS571, the nitrogen fixing symbiont of *Sesbania rostrata*: regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes in the free living versus symbiotic state. Mol. Gen Genet., Berlin, v. 206, p. 207-219, 1987.
- PEDROSA, F. O.; BENELLI, E. M.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A.; KLASSEN, G.; STEFFENS, M. B.; de SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. J. Biotechnol., v. 91, n. 2-3, p. 189-95, 2001.
- PEDROSA, F. O.; TEIXEIRA, K. R. S.; MACHADO, I. M. P.; STEFFENS, M. B. R.; KLASSEN, G.; BENELLI, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; ISHIDA, M. L.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. Soil Biol. Biochem. V. 29, p. 843-846, 1997.

- PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. FEMS Microbiol. Lett., Amsterdam, v. 23, p. 95-101, 1984.
- PERSUHN, D. C.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. FEMS Microbiol. Lett., Amsterdam, v. 192, n. 2, p. 217-21, 2000.
- PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas ribrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. Plant. Soil, Dordrecht, v. 137, p. 61-65, 1991.
- POGGIO, S.; DOMEINZAIN, C.; OSORIO, A.; CAMARENA, L. The nitrogen assimilation control (Nac) protein represses *asnC* and *asnA* transcription in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett., Amsterdam, v. 206, n. 2, p. 151-56, 2002.
- POMPOSIELLO, P. J.; JANES, B. K.; BENDER, R. A. Two roles for the DNA recognition site of the *Klebsiella aerogenes* nitrogen assimilation control protein. J. Bacteriol., Washington, v. 180, n. 3, p. 578-85, 1998.
- POSTGATE, J. R. Biological nitrogen fixation: Fundamental. Phil. Trans. R. Soc. Lond., Brighton, v. 296, p. 375-85, 1982.
- POSTGATE, J. R. Nitrogen Fixation. Cambridge: Cambridge University Press. 3rd ed., 1998.
- REITZER, L. J. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine e D-alanine, In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin. K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter e H. E. Umbarger (ed.). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 391-407, 1996.
- REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Asparagine synthetases of *Klebsiella aerogenes*:

- properties and regulation of synthesis. J.Bacteriol., Washington, v. 151, n. 3, p. 1299-313, 1982.
- REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, Washington, v. 82, n. 7, p. 1979-83, 1985.
- REITZER, L.; SCHNEIDER, B. L. Metabolic Context and Possible Physiological Themes of  $\sigma^{54}$  – Dependent Genes in *Escherichia coli*, American Society for Microbiology, Washington, v. 65, n. 3, p. 422-444, 2001.
- 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. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. FEMS Microbiol.Lett., Amsterdam, v.45, p.39-47, 2003.
- ROSSBACH, S.; SCHELL J.; DE BRUIJN, F. J. The *ntnC* gene of *Agrobacterium tumefaciens* C58 controls glutamine synthetase (GSII) activity, growth on nitrate and chromosomal but not Ti-encoded arginine catabolism pathways. Mol. Gen. Genet., Berlin, v. 209, p.419-426, 1987.
- SAMBROOK , J. FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULDON, A.R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v.74, p. 5463-5467, 1977.
- SCHELL, M. A. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. Annu. Rev. Microbiol., v. 47, p. 597-626, 1993.
- SCHLOGL, R. Catalytic synthesis of ammonia "never-ending history". Andew. Chem. Int. Ed. Engl. v. 42, n. 18, p. 2004-8, 2003.
- SCHMITZ, G.; DURRE, P.; MULLENBACH, G.; AMES, G. Nitrogen regulation of transport operons: analysis of promoters *argTr* and *dhuA*. Mol. Gen. Genet., Berlin, v. 209, n. 403-407, 1987.

- SCHOLLHORN, R.; BURRIS, R. H. Acetylene as a competitive inhibitor of N-2 fixation. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, Washington, v. 58, n. 1, p. 213-16, 1967.
- SCHWACHA, A.; BENDER, R. A. The *nac* (nitrogen assimilation control) gene from *Klebsiella aerogenes*. J.Bacteriol., Washington, v. 175, n. 7, p. 2107-15, 1993a.
- SCHWACHA, A.; BENDER, R. A. The product of the *Klebsiella aerogenes nac* (nitrogen assimilation control) gene is sufficient for activation of the *hut* operons and repression of the *gdh operon*. J.Bacteriol., Washington, v. 175, n. 7, p. 2116-24, 1993b.
- SHERBURNE, C.K.; LAWLEY, T.D.; GILMOUR, M.W.; BLATTNER, F.R.; BURLAND, V.; GROTEBECK, E.; ROSE, D.J.; TAYLOR, D.E. The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 28, n. 10, p. 2177-2186, 2000.
- SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U. YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. J. Gen. Microbiol., Reading, v. 137, p. 1511-1522, 1991.
- 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., Washington, v. 181, n. 2, p. 681-84, 1999.
- SPAINK, H.P.; OKKER, R.J.H.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E.; LUGTENBERG, B. J.J Promoters in the nodulation region of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. Plant. Molec. Biol. Dordrecht, v.9, p.27-39, 1987.
- STEFFENS, M. B.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S.; de SOUZA, E. M.; MACHADO, H. B.; PEDROSA, F. O. Cloning of a *recA*-like gene from the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. Can.J.Microbiol., Ottawa, v. 39, n. 12, p. 1096-102, 1993.
- STEGLITZ-MORS DORF, U.; MORS DORF, G.; KALTWASSER, H. Cloning, heterologous

- expression, and sequencing of the *Proteus vulgaris* *glnAntrBC* operon and implications of nitrogen control on heterologous urease expression. FEMS Microbiol.Lett., Amsterdam, v. 106, n. 2, p. 157-64, 1993.
- THOMPSON J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl.Acid.Res., Oxford, v.22, p. 4673-4680, 1994.
- TOUKDARIAN, A.; KENNEDY, C. Regulation of nitrogen metabolism in *Azotobacter vinelandii*: isolation of *ntr* and *glnA* genes and construction of *ntr* mutants. EMBO J., Oxford, v. 5, n. 2, p. 399-407, 1986.
- VAN HEESWIJK, W. C., HOVING, S., MOLENAAR, D., STEGEMAN, B., KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol., Oxford, v.21, p. 133-146, 1996.
- WANG, W.; CAREY, M.; GRALLA J. D. Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening. Science, Washington, v. 255, n. 5043, p. 450-53, 1992.
- WEDEL, A.; WEISS, D. S.; POPHAM, D.; DROGE, P.; KUSTU, S. A bacterial enhancer functions to tether a transcriptional activator near a promoter. Science, Washington, v. 248, n. 4954, p. 486-90, 1991.
- YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STANLEY, G. BURRIS, R.M.; EVANS, H.J. Biological Nitrogen Fixation. New York: Chapman & Hall, p. 43-86, 1992.
- ZAIM, J; KIERZEK, A. M. The structure of full-length LysR-type transcriptional regulators. Modeling of the full-length OxyR transcription factor dimer. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 31, n. 5, p. 1444-54, 2003.
- ZIMMER, D. P.; SOUPENE, E.; LEE, H. L.; WENDISCH, V. F.; KHODURSKY, A. B.; PETER, B. J.; BENDER, R. A.; KUSTU, S. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 97, p. 14674-14679, 2000.