

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

VANESSA HAUER

SEQUENCIAMENTO DO GENE *glnA* DAS ESTIRPES MUTANTES HM14,
HM26, HM053 E HM210 DE *Azospirillum brasilense*

Curitiba
2012

VANESSA HAUER

SEQUENCIAMENTO DO GENE *glnA* DAS MUTANTES HM14, HM26, HM053
E HM210 DE *Azospirillum brasilense*

Monografia apresentada como pré-requisito para a conclusão do Curso de Ciências Biológicas, modalidade Bacharelado, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Roseli Wassem

Curitiba
2012

AGRADECIMENTOS

*“Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, pois cada pessoa é única
e nenhuma substitui outra.*

*Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, mas não vai só
nem nos deixa sós.*

*Leva um pouco de nós mesmos,
deixa um pouco de si mesmo.*

*Há os que levam muito,
mas há os que não levam nada.*

Essa é a maior responsabilidade de nossa vida (...)
(Antoine de Saint-Exupéry)

Assim, agradeço a minha orientadora pela paciência e pelos seus ensinamentos.

Aos colegas do laboratório, pelo apoio tanto em momentos difíceis, como nos felizes.

Por fim, aos meus amáveis pais e querido irmão, pelos bons exemplos, incentivo, amor e por toda compreensão.

RESUMO

Azospirillum brasilense é uma proteobactéria gram-negativa, diazotrófica, microaerófila, capaz de viver livremente no solo ou em associação com raízes de diversas gramíneas de importância econômica, onde promove crescimento vegetal. A fixação biológica do nitrogênio pode ser catalisada naturalmente em bactérias diazotróficas por meio do complexo protéico da nitrogenase. O produto dessa reação, a amônia, junto com o glutamato, é utilizado como substrato pela glutamina sintetase (GS) para a formação da glutamina, a qual é utilizada pela planta e pela bactéria como substrato em outras reações de síntese de compostos nitrogenados. A GS é produto do gene *glnA*, o qual faz parte do operon *glnBA* em *A. brasilense*. Em 1988, Machado obteve mutantes excretadores de amônio de *A. brasilense*, a partir da estirpe Sp7, denominadas estirpes: HM14, HM26, HM053 e HM210, capazes de fixar nitrogênio constitutivamente e excretar quantidades consideráveis de amônio. Este fenótipo pode ser resultante de mutações em diversos genes, mas provavelmente estão presentes no gene *glnA*. Todos os mutantes apresentam baixa capacidade de sintetizar glutamina, a qual é a provável razão pela qual o amônio excedente é excretado. No presente trabalho, o gene *glnA* das quatro estirpes foi sequenciado e deverá contribuir para a compreensão do fenótipo destas estirpes e para a identificação de aminoácidos importantes para a atividade biossintética de GS. HM14 apresenta baixos níveis de atividade transferásica total de GS e esta é parcialmente regulada por amônio, semelhante ao da estirpe selvagem. Nele foram observadas duas mutações, uma que troca o resíduo de histidina na posição 248 para arginina e outra do resíduo de leucina na posição 291 para arginina. Ambos estão localizados na superfície das subunidades que compõem a estrutura da enzima e podem estar levando a um comprometimento de sua estrutura e atividade biossintética. Na estirpe HM053, a qual também possui baixa atividade transferásica total de GS, mas mantida altamente adenililada, foi identificada uma mudança do resíduo de prolina na posição 347 para leucina. Esses resíduos estão próximos a arginina 339 e a arginina 359, as quais são importantes como sítios de ligação a ATP e glutamato. Na estirpe HM26 foi detectada uma troca de glicina por cisteína na posição 53. Este resíduo alterado está ao lado do aspartato 52, que é um aminoácido envolvido na conversão de amônio em amônia, essencial para a síntese de glutamina. Na estirpe HM210 foi detectada uma troca de glicina por serina na posição 129. A serina está ao lado de dois resíduos de glutamato que coordenam metais que estabilizam ATP e interagem com outro substrato da GS, o glutamato. As mutações encontradas em HM26, HM053 e HM210 provavelmente afetam o mecanismo catalítico e induzem a baixa atividade biossintética de GS.

Palavras-chave: Glutamina sintetase. *Azospirillum brasilense*. Gene *glnA*.

ABSTRACT

Azospirillum brasilense is a gram-negative, diazotrophic, microaerophilic proteobacteria, found in soil or in association with roots of various important economic grasses and promote their growth. Biological nitrogen fixation can be catalyzed by the nitrogenase protein in diazotrophic bacteria. The product of this reaction, ammonia, along with glutamate, is used as a substrate by glutamine synthetase (GS) to produce glutamine, which is used by plants and bacteria to synthesize other nitrogen compounds. GS is the product of the *glnA* gene, which is part of the *glnBA* operon in *A. brasilense*. In 1988, Machado obtained mutant strains from *A. brasilense* Sp7, named: HM14, HM26, HM053 and HM210. These are able to fix nitrogen constitutively and excrete considerable amounts of ammonium. This phenotype may result from mutations in several genes, but *glnA* is the probable candidate for mutations. All mutants have low capacity to synthesize glutamine, which is the probable reason why the remainder ammonium is excreted. In the present work, the *glnA* gene from these four strains was sequenced and should contribute to understanding the phenotype of these strains and to identify amino acids important for the biosynthetic activity of GS. HM14 has low levels of GS transferase activity, which is partially regulated by ammonium, similar to the wild type strain. HM14 bears two mutations, one that replaces the histidine residue at position 248 by arginine and a leucine residue at position 291 by arginine. Both are located on the surface of the subunits that maintain the structure of the enzyme and may impair its biosynthetic activity. The HM053 strain, which also has low GS transferase activity, a proline residue at position 347 was replaced by leucine. This residue is in the same region as arginine 339 and arginine 359, which are important binding sites for ATP and glutamate. HM26 bears an exchange of glycine by cysteine at position 53. This mutation is adjacent to the aspartate 52, which is an amino acid involved in the conversion of ammonium to ammonia, that is essential for the synthesis of glutamine. HM210 bears an exchange of glycine by serine at position 129. Serine is close to two glutamate residues that coordinate metals that stabilize ATP and interact with another GS substrate, glutamate. The mutations found in HM26, HM053 and HM210 are likely to affect the catalytic mechanism and induce low biosynthetic activity of GS.

Keywords: Glutamine synthetase. *Azospirillum brasilense*. *glnA* gene.

SUMÁRIO

RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 <i>Azospirillum brasilense</i>	10
2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	11
2.2.1 Glutamina sintetase - GS	14
2.2.1.1 GSI	15
2.3 MUTANTES EXCRETORES DE AMÔNIO DE <i>Azospirillum brasilense</i>	21
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 CULTURA DAS BACTÉRIAS.....	26
4.1.1 Meios de cultura para <i>Azospirillum brasilense</i>	26
4.2 EXTRAÇÃO DO DNA CROMOSSOMAL	27
4.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>glnA</i>	28
4.3.1 <i>Primers</i> utilizados	28
4.3.2 Amplificação do gene <i>glnA</i>	29
4.4 PREPARAÇÃO DO PRODUTO DE PCR PARA SEQUENCIAMENTO	29
4.5 ELETROFORESE	30
4.6 SEQUENCIAMENTO DO DNA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	30
5 RESULTADOS.....	32

6 DISCUSSÃO	39
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um componente muito importante na natureza, visto ser ele constituinte dos ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas presentes em todos os seres vivos. O seu maior reservatório é a atmosfera, onde se encontra na forma gasosa, porém não disponível para a maioria dos organismos. Na agricultura, fertilizantes nitrogenados capazes de serem absorvidos com maior eficiência pelas plantas são empregados diretamente no solo para melhorar a produtividade. Entretanto, a produção desta forma e fonte de nitrogênio exige um elevado gasto energético e financeiro. Além disso, a utilização desses fertilizantes pode deixar resíduos que atingem negativamente o meio ambiente, visto que metade do nitrogênio que é adicionado ao solo não é absorvido pelas plantas (GALLOWAY; COWLING, 2002) e pode promover a acidificação e eutrofização dos ecossistemas para onde é lixiviado (GRUBER; GALLOWAY, 2008).

Por outro lado o uso de inoculantes constituídos por bactérias diazotróficas, como *Azospirillum brasilense* é uma alternativa de menor custo e impacto ambiental. Neste caso, o nitrogênio atmosférico é convertido em amônia pela bactéria, que a disponibiliza para as plantas com as quais se associam (BASHAN; HOLGUIN, 1997).

A. brasilense interage com mais de 60 espécies de plantas hospedeiras conhecidas (BASHAN; HOLGUIN, 1995; BASHAN; HOLGUIN, 1997), sendo capaz de se associar a diversas gramíneas de importância econômica, como o trigo, milho, sorgo e o arroz.

A colonização por *A. brasilense* acontece na zona de crescimento das raízes das plantas, possibilitando a entrada e o estabelecimento destas bactérias nos tecidos vegetais. Então, a fixação biológica do nitrogênio é catalisada na célula bacteriana pelo complexo protéico da nitrogenase. O produto dessa reação, a amônia, junto com o glutamato, é utilizado como substrato pela glutamina sintetase (GS) para a formação da glutamina, a qual é utilizada pela planta e pela bactéria como substrato em outras reações. A GS é produto do gene *glnA*, o qual faz parte do operon *glnBA* em *Azospirillum brasilense* (BOZOUKLIAN; FOGHER; ELMERICH, 1986).

Todo esse processo envolve um gasto energético elevado e por isso apresenta variadas formas de regulação. Na presença de concentrações elevadas

de amônio a fixação é inibida, assim como quando os níveis de oxigênio são altos. Esta regulação se torna ainda mais complexa se analisada a nível molecular e genético, podendo ser evidenciada a regulação em nível de transcrição e tradução, via inibição metabólica ou modificação pós-traducional (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

Por apresentar vida livre e por exibir propriedades promotoras de crescimento vegetal, além de fixar nitrogênio, *A. brasilense* recebe grande destaque em estudos genéticos e no desenvolvimento de inoculantes para a agricultura. O empreendimento destas novas alternativas em conjunto com a pesquisa de base, é fundamental para o desenvolvimento do mercado agrícola brasileiro (HUNGRIA, 2011).

A análise de 20 anos de dados experimentais de campo com esta espécie indicou cerca de 60 a 70 % de sucesso obtido por meio dela e um incremento da produção agrícola em torno de 5 a 30 % (BASHAN; HOLGUIN, 1997). A contribuição de *A. brasilense* para o desenvolvimento vegetal corresponde a cerca de 5 a 18 %. Porém, estirpes mutantes não fixadoras (Nif⁻) desta bactéria também são capazes de estimular o crescimento das plantas de forma similar às estirpes selvagens fixadoras (Nif⁺) (BASHAN; SINGH; LEVANONY, 1989). Como a secreção de amônio e fornecimento deste as plantas por estas bactérias é mínimo, mutantes espontâneos de *A. brasilense* que secretam quantidades substanciais de NH₄⁺ são estudados com o objetivo de aumentar o crescimento vegetal também pelo suprimento de nitrogênio fixado (SRIVASTAVA; TRIPATHI, 2006).

Em 1988, Machado obteve mutantes excretoras de amônio de *Azospirillum brasilense*, a partir da estirpe Sp7, resistentes a etilenodiamina, denominadas estirpes: HM14, HM26, HM053 e HM210, capazes de fixar nitrogênio constitutivamente (Nif^c), ou seja, mesmo na presença de altas concentrações do íon amônio. Este fenótipo foi associado a diversas alterações, dentre as quais possíveis mutações no gene *glnA*, o qual codifica para GS, além de outros genes relacionados com esta enzima como o *glnB*, o *glnE*, o *glnD* e o operon *ntrYX*. Estudos de complementação genética de mutantes HM com plasmídeos contendo estes genes não foram suficientes para esclarecer os mecanismos que alteram a fixação biológica de nitrogênio e a assimilação e secreção do amônio por estas bactérias.

Portanto, o sequenciamento e análise do gene *glnA* nas estirpes HM em comparação aos dados fenotípicos e genotípicos conhecidos, podem auxiliar no entendimento do processo de fixação biológica de nitrogênio em *Azospirillum brasilense*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Azospirillum brasilense*

Azospirillum (*azote*, do francês, nitrogênio; e *spira*, do grego, espiral) é um gênero de proteobactéria gram-negativa da subclasse α , do tipo diazotrófica, microaerófila, curvilínea e móvel, capaz de viver livremente no solo ou em associação com raízes de plantas (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Foi identificada pela primeira vez neste tipo de interação por volta de 1975 (DOBEREINER; DAY, 1975).

Este gênero comporta sete espécies: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. doebereineriae* e *A. largimobile* (ANTONYUK, 2007). Dentre estas espécies, *Azospirillum brasilense* é a mais estudada com relação à bioquímica e genética do metabolismo de nitrogênio. Além disso, recebeu destaque por se associar a gramíneas de importância econômica, como o arroz, o milho, o trigo e cereais, colonizando a superfície de suas raízes e a rizosfera (BASHAN; HOLGUIN, 1997).

O genoma de diversas espécies de *Azospirillum* é constituído por cerca de 5 a 7 megareplicons (de 0,65 a 2,6 Mbp), além de outros plasmídeos. A detecção de diversas cópias dos RNAs ribossomais nos replicons desta bactéria sugere a presença de múltiplos cromossomos (MARTIN-DIDONET et al., 2000).

A. brasilense tem a habilidade de metabolizar diversas fontes de carbono e também de nitrogênio, como amônio, nitrato, nitrito, aminoácidos e dinitrogênio. Em condições não favoráveis pode se converter na forma de cisto desenvolvendo uma camada protetora a base de polissacarídeos e acumulando grânulos de poli- β -hidroxibutirato, o qual é usado como substrato para a obtenção de energia (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

Dentre os benefícios que este microorganismo pode dar as plantas estão: a fixação de nitrogênio, o desenvolvimento de um sistema radicular mais robusto pela produção de fitormônios, como o ácido-indol-acético, giberilinas e citocininas, assim

como o aumento na absorção de água e de minerais do solo e o crescimento mais rápido da planta (HUNGRIA, 2011).

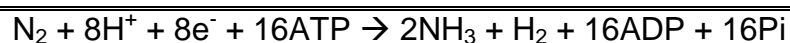
2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A habilidade de fixar nitrogênio e crescer diazotroficamente é encontrada em organismos com vários comportamentos fisiológicos, desde aeróbicos obrigatórios até metanotróficos. Os diazotrofos de vida livre, como *Azospirillum brasilense*, são capazes de fixar nitrogênio também *in vitro* ou independentemente de seus hospedeiros (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000)

Os fatores essenciais para que ocorra a fixação biológica de nitrogênio são: fonte de energia (ATP), co-fatores como molibdênio, ferro e enxofre, baixa tensão de oxigênio e hidrogênio nos sítios do complexo protéico da nitrogenase e pouco nitrogênio na forma fixada (PEDROSA; YATES, 1988). A temperatura apropriada, a presença do dinitrogênio atmosférico e de um sistema de assimilação de amônia para a incorporação do nitrogênio fixado nas biomoléculas, também são favoráveis.

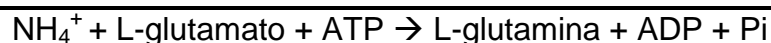
A energia necessária para crescer e fixar nitrogênio das bactérias diazotróficas que se associam a raízes provém da oxidação de compostos carbônicos e hidrogenados. *Azospirillum* é uma espécie tipicamente microaeróbia com fraca ou sem capacidade fermentativa. Ácidos orgânicos (malato, lactato, piruvato e succinato) são as principais fontes de carbono deste gênero. Os carboidratos são utilizados de forma espécie-específicos (PEDROSA; YATES, 1988).

A nitrogenase, a qual é essencial para a fixação de nitrogênio, é composta por duas metaloproteínas, as quais catalisam a redução do dinitrogênio a amônia, como segue a reação:



Este complexo protéico é produto dos genes *nifHDK*, sendo constituído pela ferro-proteína (dinitrogenase redutase), que doa elétrons ao se ligar ao ATP, e a molibdênio-ferro proteína (dinitrogenase), a receptora dos elétrons e local para a redução do dinitrogênio a amônia (HUERGO et al., 2005).

O amônio, produto da redução do dinitrogênio, pode ser utilizado para a síntese de glutamina numa reação catalisada pela glutamina sintetase (GS), a qual é codificada pelo gene *glnA* em *A. brasilense* (BOZOUKLIAN; FOGHER; ELMERICH, 1986). Essa reação, representada abaixo, é a principal responsável pela assimilação de amônio quando este é limitante (HOLGUIN; PATTEN; GLICK, 1999).



Posteriormente, a glutamina produzida doa um grupo amino para o 2-oxoglutarato numa reação que pode ser catalisada pela glutamato sintase (GOGAT), produto dos genes *gltDB* (WESTBY, 1987). Essa reação representada abaixo ocorre quando a concentração de amônio no meio é baixa (HOLGUIN; PATTEN; GLICK, 1999).



Ambos os produtos destas duas reações, GS/GOGAT (fig. 1), servem como fonte de nitrogênio para as reações biossintéticas tanto na bactéria diazotrófica, quanto na planta associada, se o amônio for secretado pela bactéria (FORCHHAMMER, 2007).

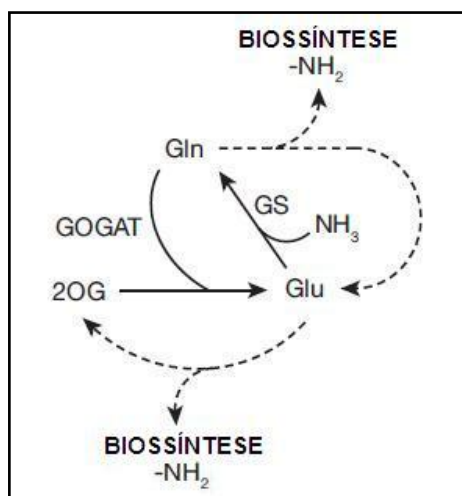


Figura 1: Vias GS/GOGAT de assimilação do amônio. Linhas sólidas: reações que levam a formação de Glu e Gln a partir de 2OG (2-oxoglutarato) e NH_3 . Linhas pontilhadas: representação da transferência do grupamento amina para as vias biossintéticas (adaptado de LEIGH; DODSWORTH, 2007)

Tanto a fixação de nitrogênio, como as etapas de assimilação e incorporação de nitrogênio fixado, são altamente reguladas em diversos níveis, transcricional, pós-transcricional e pós traducional. Esta forte regulação é necessária, pois o custo energético da reação de redução de N_2 é muito alto e também em função dos centros metálicos da nitrogenase, os quais são suscetíveis a oxidação na presença de oxigênio (DIXON; KAHN, 2004).

O complexo protéico da nitrogenase pode ser regulado negativamente por NH_4^+ , oxigênio e glutamina, através de um mecanismo denominado *switch off*, ou inativação da nitrogenase. Esse mecanismo de regulação ocorre pela ligação covalente de uma molécula ADP-ribose (proveniente de NAD^+) a uma arginina da subunidade ferro-proteína, numa reação que é catalisada pela dinitrogenase redutase ADP-ribosil transferase (DraT). O inverso deste mecanismo, o *switch on* da ferro-proteína, ocorre quando o NH_4^+ é consumido e o grupamento glicosil transferase ativadora da dinitrogenase redutase ADP-ribosil é então removido pela enzima ativadora (DraG) (DIXON; KAHN, 2004). Em diversos mutantes para GS esta inibição por NH_4^+ não ocorre e o nitrogênio é fixado constitutivamente (MACHADO, 1988).

2.2.1 Glutamina sintetase – GS

O estudo da regulação da fixação de nitrogênio tem como um marco importante os trabalhos de Earl Stadtman, através dos quais pode ser elucidada a regulação da fixação via glutamina sintetase (GS) em *Escherichia coli*. Paralelamente, estudos sobre o principal regulador do metabolismo do nitrogênio, as proteínas PII, passaram a se desenvolver. As primeiras informações sobre a GS de *A. brasilense* foram publicados no final de 1970, quando passaram a ser encontrados indícios de uma correlação entre a atividade da GS e a nitrogenase em *Spirillum lipoferum*. Em 1980, a taxonomia de *S. lipoferum* foi definida e então separada entre *A. brasilense* e *A. lipoferum* e a estrutura do gene *glnA* da estirpe selvagem de *A. brasilense* foi clonada e sequenciada (revisto por ANTONYUK, 2007).

A GS é essencial para a assimilação da amônia e biossíntese de glutamina durante a fixação biológica de nitrogênio. São conhecidos quatro tipos de GS: GSI, GSII, GSIII e GlnT (BROWN et al., 1994; MERRICK; EDWARDS, 1995). Os genes para GSI foram identificados em *Bacteria* e *Archaea*, enquanto os genes para GSII apenas ocorrem entre eucariotos e algumas bactérias simbiotes, como *Rhizobium* e *Frankia*. Os genes da GSIII foram encontrados em poucas espécies de bactérias, como *Bacteroides fragilis* e *Butyrivibrio fibrisolvens* (BROWN et al., 1994). GlnT foi identificada em *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium meliloti* e é considerada distinta das outras enzimas GS (MERRICK; EDWARDS, 1995). A grande distribuição e história filogenética das variadas glutaminas sintetases contribuem para o fato de GS ser considerada uma das enzimas mais antigas na natureza (FORCHHAMMER, 2007).

Dentre as enzimas GS, a mais estudada é a GSI de *Escherichia coli* (BESPALOVA; ANTONYUK; IGNATOV, 1999). A glutamina sintetase ou GSI, catalisa a síntese de glutamina numa reação dependente de ATP a partir de glutamato e amônia. A reação catalisada pela GS é a única via para a síntese de glutamina, que é substrato para a síntese de purinas e pirimidinas, de outros aminoácidos, de glucosamina-6P e ácido *p*-aminobenzóico (BESPALOVA;

ANTONYUK; IGNATOV, 1999; LEIGH; DODSWORTH, 2007). Com base em análises filogenéticas a GSI é subdividida em α -GSI e β -GSI. A α -GSI é encontrada em bactérias gram-positivas, com baixo conteúdo G+C, formadoras de endósporos, e em arqueobactérias. A β -GSI é encontrada em quase todo o restante das bactérias, incluindo *A. brasilense*. Esta enzima GS é regulada via adenililação e pertence a este grupo, pois o grupo das α -GSI parece não ser regulado via modificações covalentes (FORCHHAMMER, 2007).

A segunda forma de GS (GSII) foi originalmente identificada em *Rhizobium* e subsequentemente em *Agrobacterium*. A GSII é codificada pelo gene *glnII*, estruturalmente se apresenta na forma de um octâmero constituído por subunidades idênticas. Em *Rhizobium leguminosarum* GSII está sujeita a modificações pós-traducionais (MERRICK, M. J.; EDWARDS, 1995).

A GSIII é um hexâmero composto por subunidades maiores. A sua sequência de aminoácidos não se assemelha a da GSI ou da GSII, apesar de várias regiões bem conservadas já terem sido identificadas. Enquanto a GSIII parece ser a única forma presente na família *Bacteroidaceae*, em *Synechocystis* spp. tanto a GSI como a GSIII podem ser sintetizadas (MERRICK, M. J.; EDWARDS, 1995).

A quarta GS, denominada GlnT, é um octâmero, como a GSII. Diferentemente da GSII, é mais estável quando submetida a temperaturas elevadas e apresenta um *K_m* consideravelmente mais elevado para o glutamato e a amônia que a GSI e a GSII. Em *R. meliloti*, GlnT sofre modificação pós-traducional via ADP-ribosilação, inibindo sua atividade (MERRICK; EDWARDS, 1995).

2.2.1.1 GSI

A GSI é considerada a primeira enzima de assimilação de amônia e está presente na maioria dos procariontes (LEIGH; DODSWORTH, 2007), mas ausente entre os eucariontes (FORCHHAMMER, 2007). Estruturalmente esta enzima se apresenta na forma de um dodecâmero com subunidades idênticas de aproximadamente 55 kDa, codificadas pelo gene *glnA* (MERRICK, M. J.;

EDWARDS, 1995; LEIGH; DODSWORTH, 2007). A cristalografia de GS de *Salmonella typhimurium* revelou ser esta composta por 12 subunidades idênticas arranjadas em dois anéis hexagonais ligados por interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio entre as subunidades (ALMASSY et al., 1986).

Na GSI dois cátions metálicos também estão ligados ao centro ativo da enzima, participando na formação do complexo enzima-substrato. Em *A. brasilense* a afinidade dos íons metálicos Mn^{2+} , Mg^{2+} e Co^{2+} varia de acordo com seu grau de adenililação e pH do meio (ANTONYUK, 2007). A GS de *A. brasilense* é composta por 59 % de seus resíduos arranjados em α -hélice e 13 % β -pregueado. A remoção dos íons metálicos via tratamento por EDTA resulta na alteração da estrutura secundária da enzima. Isso demonstra a influência dos íons metálicos tanto na catálise como na manutenção da conformação da enzima (ANTONYUK, 2007).

Cada monômero ou subunidade que constitui a GS pode ser modificado via adenililação, de forma reversível, de um resíduo de tirosina localizado na região terminal (MERRICK, M. J.; EDWARDS, 1995; BESPALOVA; ANTONYUK; IGNATOV, 1999; KAMNEV et al., 2004). A quantidade de monômeros adenililados determina o nível de atividade da enzima tendo como consequência uma inativação progressiva dela. Isto ocorre em resposta a um aumento intracelular das quantidades de nitrogênio fixado. A adenililação de uma subunidade apenas inativa ela mesma, portanto esta enzima pode se apresentar em variados estados de ativação na célula (MERRICK, M. J.; EDWARDS, 1995).

Três proteínas estão envolvidas com a regulação pós-traducional (fig. 2) da GS. A adenililtransferase ou ATase (codificada pelo gene *glnE*), catalisa tanto a adição como a remoção de AMP a um resíduo de tirosina da GS (MERRICK, M. J.; EDWARDS, 1995; BESPALOVA; ANTONYUK; IGNATOV, 1999; LEIGH; DODSWORTH, 2007). A proteína alostérica efetora do tipo PII, GlnB (codificada pelo gene *glnB*), a qual pode estar presente em duas formas: a não-modificada ou a uridililada. A não-modificada estimula a adenililação da GS, enquanto a uridililada estimula a desadenililação através da interação com a ATase. A terceira proteína é uma proteína bifuncional que tem atividade uridililtransferase (UTase) e uridilil-removedora (UR), a qual atua transferindo UMP de UTP para um resíduo de tirosina de PII e também faz a remoção de UMP via hidrólise (LEIGH; DODSWORTH, 2007).

Estas proteínas regulatórias controlam a atividade de GS em resposta aos níveis intracelulares de diversos metabólitos.

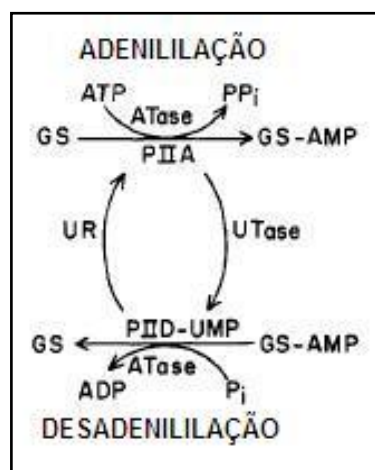


Figura 2: As proteínas envolvidas nas modificações covalentes de GS. A adenililtransferase (ATase) catalisa tanto a adenililação como a desadenililação de GS. A proteína auxiliar P_{II} modula a atividade ATase. A forma não modificada de P_{II} (P_{II}A) estimula a adenililação, enquanto a forma uridililada (P_{II}D) estimula a desadenililação. A conversão da P_{II} de uma forma para a outra é catalisada pela enzima bifuncional P_{II} - uridililtransferase (UTase) - uridilil removedora (UR) (adaptado de GINSBURG; STADTMAN, 1973)

O 2-oxoglutarato (2OG) e a glutamina (Gln) são os principais efetores no controle da atividade de GS, pois indicam a disponibilidade de nitrogênio e o estado energético da célula. A razão entre Gln e 2OG controla diretamente a atividade de UR/UTase estimulando a atividade de UTase quando há pouca glutamina e a atividade UR em excesso de glutamina. Dessa forma, GlnB encontra-se uridililada quando há pouco nitrogênio fixado disponível e estimula a desadenililação da GS pela ATase, deixando-a ativa. A atividade elevada de GS leva a um aumento de glutamina intracelular, sinalizando UR/UTase a reverter GlnB a sua forma não uridililada, o que leva à inativação de GS pela ATase (LEIGH; DODSWORTH, 2007).

Além da regulação por adenililação, a GS também pode ser regulada alostericamente por compostos nitrogenados que são produzidos a partir de Gln. O próprio produto da GS, a glutamina, pode inibir a sua atividade, como é observado em diversos organismos, além de *Azospirillum*. Neste gênero, aminoácidos como glicina e serina, influenciam consideravelmente na queda da atividade enzimática (MAGASANIK, 1993; ANTONYUK, 2007).

A regulação da expressão de GS, além de ser a nível traducional, também ocorre durante a transcrição. Nas bactérias entéricas o gene *glnA* faz parte do operon *glnAntrBC*, onde os genes *ntrB* e *ntrC* codificam para o sistema de regulação de dois componentes. Este sistema é constituído por uma proteína sensora histidina quinase (NtrB) e um regulador de resposta (NtrC) que é uma proteína de ligação ao DNA (MERRICK.; EDWARDS, 1995).

O operon *glnAntrBC* é expresso via dois promotores em *tandem*: *glnAp1* e *glnAp2*, mas ainda pode ser expresso a partir de *pntrBC*, situado entre *glnA* e *ntrBC*. Sob condições suficientes de nitrogênio, *glnA* é expresso a partir de *glnAp1* e *ntrBC* é primeiramente expresso de forma independente a partir de *pntrBC*. Quando em condições limitantes de nitrogênio NtrC se liga a seus sítios parcialmente sobreposto a *glnAp1*, reprime a expressão a partir deste promotor, e ativa a transcrição a partir de *glnAp2* (MERRICK.; EDWARDS, 1995).

No entanto em *Azospirillum brasilense* a transcrição de *glnA* parece não ser ativada diretamente por NtrC, sendo capaz de interferir apenas na expressão de *glnB*. Entretanto, estudos com mutantes *glnB* indicam que a proteína GlnB está envolvida com a expressão do gene *glnA* (HUERGO et al., 2003).

Em *Azospirillum brasilense* o gene *glnA* forma um operon com o gene *glnB* (fig. 3) (BOUZOKLIAN; ELMERICH, 1986). Este operon é expresso a partir de três promotores, dois no início do operon, *glnBp1* e *glnBp2*, e o terceiro entre os genes *glnB* e *glnA*, *glnAp* (fig. 3). Em condições limitantes de amônio o operon *glnBA* é altamente transcrito a partir do promotor *glnBp2*, que é dependente do fator σ^{54} da RNA polimerase e de NtrC (ZAMAROCZY; PAQUELIN; ELMERICH, 1993). Por outro lado, em condições de excesso de amônio o promotor do operon *glnBA* é *glnBp1*, que é dependente de σ^{70} é pouco expresso nessas condições.

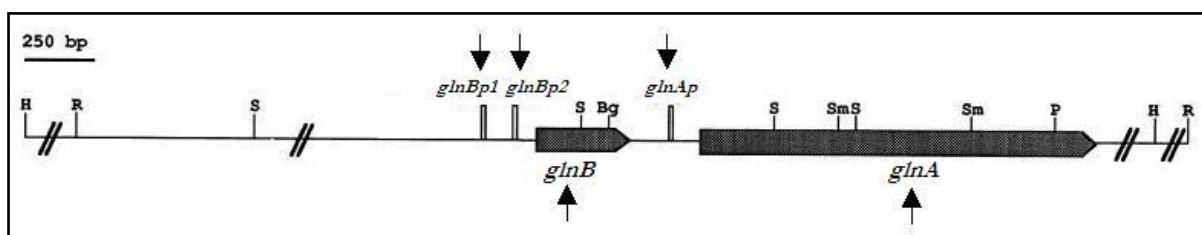


Figura 3: Mapa físico e genético do operon *glnBA* de *Azospirillum brasilense* e localização dos promotores das sequências consenso (*glnBp1*, *glnBp2* e *glnAp*) indicados pelas setas (adaptado de ZAMAROCZY; PAQUELIN; ELMERICH, 1993).

O gene *glnA* é também transcrito de forma independente de *glnB* a partir de seu promotor ainda não conhecido (ZAMAROCZY; PAQUELIN; ELMERICH, 1993). Além disso, o promotor *glnBp1* é sobreposto a um sítio de ligação de NtrC, que ao ser ocupado por NtrC-P, favorece a ação do promotor *glnBp2* em condições limitantes de amônio. A sequência completa do gene *glnA* (1410pb) (fig. 4) pertencente a estirpe Sp7 foi a primeira a ser determinada em *Azospirillum* (BOZOUKLIAN; ELMERICH, 1986).

3'CGCCTCCACCCGCGCAATCCCGCATCACCGTCACCCGGCACAATAAGCACCGCGACGGCCGCAG
 CATAGCCGGGCACAGGGGAATGAAAGGACTGGCCTGATTGGCACAGGAATTGGAAGAAAGGACTG
 GGGCGATGGATGGGACTCGAACCCACGACCGCTCGGACCACAACCGAGAGCTCTACCAACTGAGCT
 ACCACCGCCACCGGGGACGAAAAGATTCTGTCGCAAACACCCGACCCGTCGCCCCGACCGATGCAA
 CGCCGGCGTGAAGTCTCACGAAACCGACACATCCGCCGTCAAGGAGGACTGGGGCGATGGATGGG
 ACTCGAACCCACGACCGCTCGGACCACAACCGAGAGCTCTACCAACTGAGCTACCACCGCCACCGG
 GTCGCCTATTTGCCCAAGGGACGGGGCGGGTCAAGCTCTATTTTCCACCTTGTCCATCAATGTGA
 AAAGCCGGGTGGAAAGCCGGCGCTACCCCATCCGAACGGACAAGGCTGCGCGGATTGCTTGCAGCA
 Sítio de ligação NtrC Sítio de ligação NtrC
 TGTGCACAAATATTGTTCACCTCGCCCTATCCGTTGGCAGTCGCGTGC CGCCACGGTGGCATCGGC
glnBp1 - σ^{70}
 CCGCTGCGGCCCGGCATCCACGCAGCCGGATCGCAACCGCTCCGATTGGCAGCCAACGTGCTTTA
glnBp2 - σ^N
 CATCGGACCGTCGGCAGAGCCGTGGACGGTGCCTGCCGACGTTGGCACCTCGTACACGAGAGACCC
 Início do gene *glnB*
 ATGAAGAAGATCGAAGCCATCATTAAGCCGTTCAAACCTCGACGAAGTGAAGGAAGCCCTTACGAAGT
 CGGCATCAAGGGCATCACCGTCACCGAGGCCAAGGGCTTCGGCCGTCAGAAGGGGCACACCGAGCT
 GTACCGCGGGCGGGAGTATGTGGTCGACTTCTGCCGAAGGTGAAGATCGAGGTGGTGTATGGAGGA
 CTCCCTGGTGGAGCGGGCGATCGAGGGCATCCAGCAGGCCGCCACACCGGCCGCATCGGGCAGC
 GCAAGATCTTCGTCACCCCGTGGAAAGAAGTTGTCCGCATCCGGACCGGGCAGAAAGGGAGGCGACG
pglA1 5' ----- 3'
 CGATCTGATTCGCGTCCCGAGAACCCGACCACCGGCCACCATGAACCAGCCCCGCCACAACCGACG
 CAGAGCCGGCCGACTCCGATCGGGCCGACGCAGACCGTCGCAACCGCGAGCGGAACGATCCGTGC
 GTGGATGCCCATCCGGGCGCGACTTTTTGTGCTGTCACGTTGTGTGCTTGGGAAAGGCATGACATAA
 CGTCCGCCGCGAGCGCCGTCACCCGCCCTTGGTCCGTTTACGCGAGCGGGACCCAAACCTCTTAA
glnAp
 Início do gene *glnA*
 GCGTGGAAAAAGAGATATGTCCGACATCAGCAAGGTCTTCGACCTGATCAAGGAACACGACGTCAAG
 TACGTGGACCTCCGCTTACCGACCCGCGCGGCAAGCTGCACCACACCGCTCAGCACGTCTCGACC
 ATCGACGAGGACGTGTTTGAAGACGGCATCATGTTTCGACGGCTCCTCGATCGCCGTTGGAAGGCGA
 TCAACGAGTCGGACATGATCCTCCAGCTCGACCCGACCACCGCCGTCATGGACCCGTTTTTCGGCCCA
 GCCGACGCTGAACATCCTCTGCGACGTGTACGAGCCGTGACCCGGCCAGCCCTACGCCCGCTGCC
 GCGCGGTATCGGAAGGCCGCGGAGAAGTACATGGCGTCCGCCGGCATCGGCCACACCGCCTACTT
 CGGCCCGGAAGCCGAGTTCTTCGTTCTTCGACGACGTCAAGTTCAAGGTCGAGATGAACAAGGTGTCC
 TACGAGTTCGACTCGGAGGAAGGCCCGTACACCTCGGACAAGGACTATGAGGACGGCAACCTGGGC
 CACCGCCCGGGCGTCAAGGGCGGCTACTTCCCGGTCGCTCCGGTCGACAGCGGCTCGGACCTGCC
 CGCCGAGATGCTGAGCGTGTCTCGCCGAGATGGCGTGC CGGTCGAGAAGCACCACCACGAGGTGG
 -----5' Interno GS1 -----3' 3'-----
CCGCTTCGACGATGAGCTGGGCATCAAGTTCGACACGCTGGTCCGCACCGGGCGACAACATGCAGT
 ACTACAAGTACGTCGTGCACAATGTCGCCACGCCTACGGCAAGACCGCGACCTTCATGCCGAAGCC

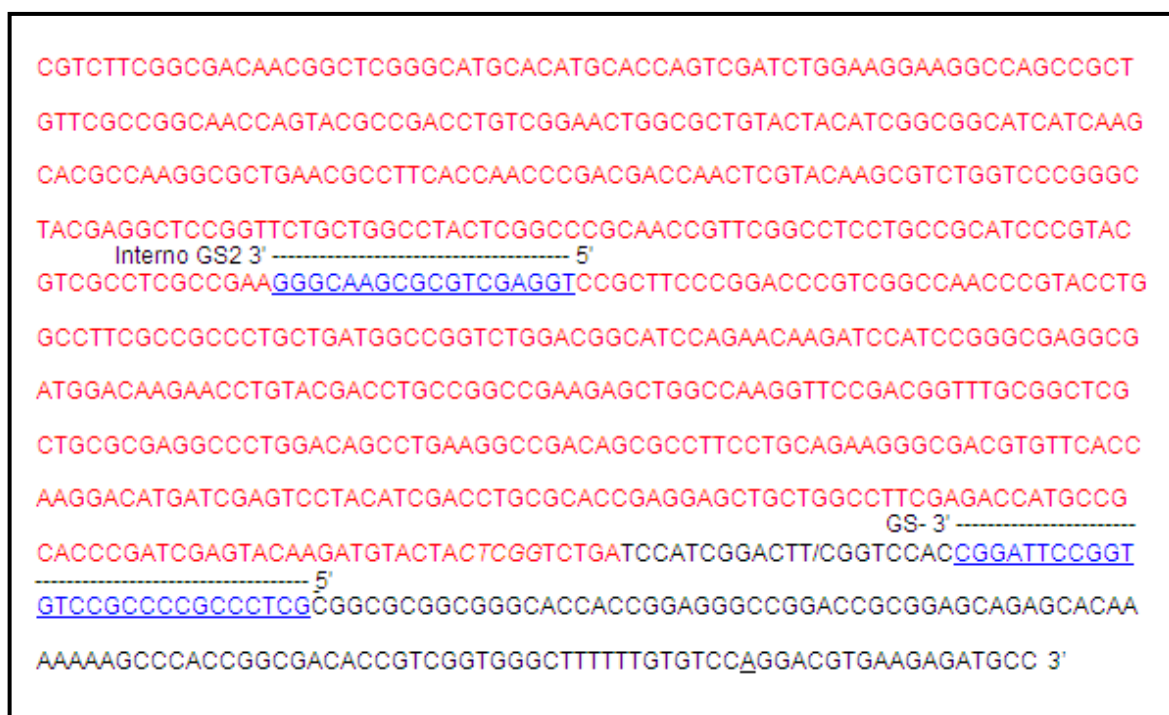


Figura 4: Operon *glnBA* da estirpe FP2 de *Azospirillum brasilense*. Região sobrelinhada corresponde aos sítios de ligação de NtrC. Quadrados vermelhos correspondem aos promotores. Bases em azul são as regiões de alinhamento dos *primers* utilizados neste trabalho para a amplificação da região codificadora do gene *glnA*, que está destacado em vermelho. A região codificadora do gene *glnB* está destacado em verde.

2.3 MUTANTES EXCRETORES DE AMÔNIO DE *Azospirillum brasilense*

O interesse em se obter diazotrofos capazes de excretar mais amônio, com o objetivo de expandir os benefícios para as plantas, também contribuiu para a maior compreensão da regulação dos mecanismos de transporte e assimilação de amônio. A razão para a liberação de amônio por estes mutantes parece estar relacionada tanto com a maior fixação de nitrogênio do que a enzima GS pode assimilar, quanto com os maiores níveis de adenililação de GS, acarretando na diminuição da incorporação do amônio. Consequentemente, mutantes que acumulam maiores quantidades de amônio passam a excretá-lo (SRIVASTAVA; TRIPATHI, 2006).

Alguns mutantes na GS da estirpe Sp7 de *A. brasilense* apresentam a capacidade de excretar amônio. Dentre estes, o mutante 7028 possui 18 % da atividade da GS, se comparada à estirpe selvagem, fixa nitrogênio constitutivamente

(Nif^c) e apresenta mutação na posição 322 do resíduo de arginina para cisteína na região codificadora do gene *glnA*. Já o mutante 7029 apresenta menos de 1,5 % da atividade GS da estirpe selvagem, também apresenta mutação na região codificadora do gene *glnA* na posição 52 do resíduo de aspartato para asparagina e não fixa nitrogênio (DOMMELEN et al.; 2003). A presença de um plasmídeo contendo o gene *glnA* de *A. brasilense* restaura a regulação da nitrogenase por amônio no mutante 7028 e torna a estirpe 7029 capaz de fixar nitrogênio (DOMMELEN et al., 2003).

As estirpes derivadas da selvagem Sp7: HM14, HM26, HM053 e HM210 de *A. brasilense*, utilizadas neste trabalho, são mutantes excretoras de amônio resistentes a etilenodiamina (EDA) (MACHADO, 1988). O EDA é um análogo do amônio que se liga aos mesmos sítios desta molécula. Logo, as mutações em bactérias EDA-resistentes frequentemente estão localizadas em regiões do gene *glnA* que são os sítios de ligação ao amônio (SRIVASTAVA; TRIPATHI, 2006).

As quatro estirpes HM possuem o sistema de regulação da atividade da nitrogenase parcialmente afetado, não sendo sensíveis a inibição diante do excesso de amônio. Estes mutantes também compartilham diversas características, tais como: alterações no transporte de amônio e na atividade da GS; o não crescimento em meio com baixa concentração de amônio ou apenas com nitrato; alterações no perfil de adenililação da GS; capacidade de excretar altos níveis de amônio (tab. 1) (MACHADO, 1988). Estas estirpes foram agrupadas em três classes, em função do perfil de expressão e atividade GS.

Tabela 1: Características fenotípicas das estirpes estudadas (com base em MACHADO, 1988).

Estirpes	Excreção de NH ₄ ⁺	Atividade transferásica total de GS ^b	Fração de GS ativa ^a	Atividade biossintética de GS ^b	Classificação	Fixação
FP2	0,04mM	3,844	47,7 %	0,239	-----	Regular
HM14	1,83mM	0,033	100 %	0,027	II – baixo nível de GS normalmente regulado por NH ₄ ⁺	Constitutiva
HM26	3,99mM	3,300	0,9 %	0,004	III – nível normal de GS mantida altamente adenililada	Constitutiva
HM053	4,19mM	0,244	15,6 %	0,028	I – baixo nível de GS altamente adenililada	Constitutiva
HM210	5,11mM	6,006	5,7 %	0,056	III – nível normal de GS mantida altamente adenililada	Constitutiva

^aBaseado na atividade transferásica da fração não adenililada em relação a total, sob condições limitantes de nitrogênio. ^bAtividade biossintética total (em μmol de γ -glutamil hidroxamato. min^{-1} .mg proteína⁻¹).

O gene *glnBA* de *Azospirillum brasilense* foi primeiramente clonado no plasmídeo pAB441 (BOZOUKLIAN; FOGHER; ELMERICH, 1986; CASTELLEN et al., 2009) e este foi utilizado em ensaios de complementação genética destes mutantes. Este plasmídeo restaurou sua capacidade de crescer em nitrato, porém a atividade da nitrogenase foi abolida tanto na presença, quanto na ausência de amônio (VITORINO, 2001).

O mutante HM053, pertencente à classe I, apresenta baixos níveis de GS que se encontra adenililada constitutivamente (MACHADO, 1988). Estudos de caracterização genética e complementação indicam que HM053 deve conter mutações na região promotora do operon *glnBA* visto que o gene *glnB* expresso constitutivamente restaura o controle da atividade de GS e um plasmídeo com o operon *glnBA* de *A. brasilense* restaura o controle da atividade e parcialmente os níveis de GS (VITORINO et al., 2001).

A estirpe HM14, representante da classe II, apresenta regulação da atividade de GS por amônio mais semelhante à estirpe selvagem FP2, porém o nível de GS total é menor que 1 % em relação ao da selvagem (MACHADO, 1988; VITORINO et al., 2001). A estirpe HM14 é capaz de crescer em nitrato e voltar a regular a atividade da nitrogenase quando complementada com plasmídeo contendo o operon *nifR3ntrBCYX* sob o controle de seus próprios promotores. Além disso, a estirpe HM14 tem o controle e a regulação da atividade da nitrogenase restaurada

quando complementada com *ntrYX*, bem como o crescimento, o qual fica semelhante ao da estirpe selvagem (VITORINO et al., 2001).

Mutantes da classe III, HM26 e HM210, apresentam níveis de GS semelhantes à selvagem, porém esta se encontra altamente adenililada, mesmo em baixa disponibilidade de nitrogênio fixado (MACHADO et al., 1991). Na estirpe HM26 foi detectada uma transversão no gene de GS que produz a troca de aminoácidos na região do sítio de ligação do amônio e em HM210 uma transversão que afeta o sítio de ligação de íons metálicos desta enzima (CASTELLEN, 2005). A atividade de GS da estirpe HM210 pode ser restaurada quando complementada com o gene *glnB*; logo ela também pode apresentar mutação neste gene (VITORINO, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo sequenciar o gene *glnA* das estirpes mutantes: HM14, HM26, HM053 e HM210 de *Azospirillum brasilense* para posterior caracterização funcional.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Extrair o DNA cromossomal das estirpes HM14, HM26, HM053 e HM210 de *Azospirillum brasilense*.

Amplificar o gene *glnA* a partir do DNA extraído.

Sequenciar o gene *glnA* de cada estirpe para comparação e análise.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTURA DAS BACTÉRIAS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas as seguintes estirpes mutantes isoladas por MACHADO (1988): HM14, HM26, HM053 e HM210. Estas estirpes foram armazenadas em meio NfbHPN semi-sólido a temperatura ambiente e cultivadas em meio líquido NfbHPN (ver item 4.1.1) sob agitação a 28 °C.

4.1.1 Meios de cultura para *Azospirillum brasilense*

Para o preparo de 1 L de meio líquido para *Azospirillum brasilense* ou meio NfbHP–lactato (MACHADO *et al.*, 1991) foram utilizados:

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g/L
NaCl	0,1 g/L
lactato de sódio	5 g/L
CaCl ₂	20 g/L
ácido nitrilo triacético	56 mg/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	20 mg/L
biotina	0,1 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	2 mg/L
MnSO ₄ .H ₂ O	2,4 mg/L
H ₃ BO ₃	2,8 mg/L
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,08 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,24 mg/L

Para o preparo do meio semi-sólido foi adicionado 0,17 % de ágar ao meio líquido e para o meio sólido 1,5 % de ágar antes da autoclavagem (temperatura de esterilização de 121 °C por 21 minutos, a 1 atm de pressão).

A este meio foi acrescido ainda a mistura de fosfato a 50 mL/L de meio (para ajustar o pH para 6,8). Esta mistura foi preparada e estocada autoclavada vinte vezes concentrada contendo a cada litro 80 g de KH_2PO_4 e 120 g de K_2HPO_4 . Como fonte de nitrogênio foi acrescido ao meio NfbBHP–lactato 20 mL/L de cloreto de amônio 1 M e, quando necessário, o antibiótico (estreptomicina e/ou ácido nalidíxico).

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA CROMOSSOMAL

As células das estirpes de *A. brasilense* em cultura em meio líquido NfbHPN (1,5 mL) D.O.₆₀₀ 1,5 foram coletadas por centrifugação em microcentrífuga (14.500 rpm por 1 minuto). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 400 µL de tampão TES (50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 20 mM de EDTA pH 8,0 e 200 mM de NaCl). Para lisar as células foi usado lisozima (10 mg/mL) em concentração final de 100 µg/mL, seguido de incubação a 30 °C por meia hora. Ao lisado foi adicionado SDS 1 % (v/v), seguido por incubação a 50 °C por 10 minutos. Após, foi acrescentado proteinase K (20 mg/mL) e RNase (10 mg/mL), sendo cada uma em concentração final de 50 µg/mL, seguido por incubação a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

A retirada dos restos celulares não desejáveis foi realizada via extrações sucessivas com 200 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24;1), com leve homogeneização por inversão durante 5 minutos. Após centrifugação por 15 minutos a 14.500 rpm o sobrenadante foi transferido para tubo novo, precipitado com um volume de isopropanol e centrifugado novamente a 14.500 rpm durante 20 minutos. O DNA foi lavado com etanol 80 %, seco e ressuspenso em 50 µL de água ultrapura estéril.

4.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *glnA*

A amplificação do gene *glnA* consistiu na escolha dos pares de *primers* mais eficientes para amplificação do gene e da construção de um *primer*. Então, foram determinadas as temperaturas de anelamento (T_{ann}) para os pares de *primers* utilizados por meio de reações de PCR sob diferentes temperaturas de anelamento, num sistema em gradiente. Por último, a amplificação do gene *glnA* com base nos métodos pré-determinados foi também obtida por meio de PCR.

4.3.1 *Primers* utilizados

Os *primers* utilizados são os mesmos utilizados por Castellen (2005), Huergo e colaboradores (2003) e Dommelen e colaboradores (2003) e apenas um *primer*, o Interno GS3, foi construído (tab. 2 e fig. 4). A construção foi realizada com base na sequência do gene *glnA* de *A. brasilense*. A formação de dímeros ou estruturas secundárias foi analisada por meio do programa *NetPrimer*, da *Premier Biosoft*. Após o planejamento, o *primer* foi enviado para síntese na *Sigma-Aldrich Brasil LTDA*. O *primer* foi recebido liofilizado e foi dissolvido com água ultrapura estéril a 100pmol/ μ l para estoque e a partir deste foi gerada a mistura para uso a 10 pmol/ μ L.

Tabela 2: *Primers*

<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	Tamanho do <i>amplicon</i>	T_{ann} estabelecida
pglnA1	Interno GS2	1348 pb	70 °C
Interno GS3*	GS-	834 pb	60 °C
pglnA1	Interno GS1	934 pb	69 °C

**Primer* Interno GS3 foi construído neste trabalho.

4.3.2 Amplificação do gene *glnA*

Para cada reação de amplificação foram acrescentados: água ultrapura estéril para completar 15 μL de volume final por reação; tampão da Fermentas (1,5 μL ; 10X); MgCl_2 da Fermentas (0,9 μL ; 25 mM); dNTP da Eppendorf (0,75 μL ; 5 mM); *primer forward* e *reverse* escolhidos (1 μL de cada; 10 μM); taq polimerase da Fermentas (0,3 μL ; 5U/ μL) e DNA genômico (1 μL ; cerca de 100 ng/ μL).

As misturas foram homogeneizadas e levadas ao termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf), com a seguinte programação: um período de desnaturação de 95 °C por 2 minutos e 34 ciclos com as seguintes temperaturas: 94 °C por 30 segundos, depois T_{ann} específico para cada par de *primers* utilizado (tab. 1) por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto a 1 minuto e meio dependendo do tamanho do *amplicon*; por fim, uma extensão adicional dos produtos de PCR a 72 °C por 3 minutos. Em seguida os produtos foram analisados via eletroforese em géis de agarose aplicando o desejado de cada amostra (ver item 4.5).

As PCRs em gradiente, elaboradas previamente para a determinação das T_{ann} dos pares de *primers* utilizados, diferiram da PCR comum, descrita acima, apenas com relação ao gradiente de T_{ann} . O próprio termociclador permitiu a variação de temperatura ao longo do bloco, criando um gradiente, onde cada reação era submetida a uma T_{ann} diferente. Então ao analisar os produtos de PCR por meio de eletroforese em gel de agarose (ver item 4.5), foi possível determinar em qual T_{ann} os produtos de PCR foram amplificados com maior especificidade e intensidade (tab. 1).

4.4 PREPARAÇÃO DO PRODUTO DE PCR PARA SEQUENCIAMENTO

Os produtos de PCR obtidos foram purificados via tratamento enzimático com Exonuclease I (EXO I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP). Para cada reação foi adicionado ao volume total do produto de PCR restante, 0,2 μL de EXOI (1 U) e

0,6 µL de SAP (0,66 U). Após homogeneizar os tubos foram levados até o termociclador *Mastercycler gradient (Eppendorf)*, com a seguinte programação: 37°C por 30 minutos, depois 80 °C por 15 minutos.

4.5 ELETROFORESE

As eletroforeses foram realizadas em gel de agarose de 1 %, preparado em tampão TBE 1 X (estoque 10 X Tris 107,81 g/L; EDTA 5,8 g/L; ácido bórico 55 g/L), sob 60 V durante o tempo necessário para a separação e visualização das bandas desejadas. Cerca de 5 µL de cada amostra foram acrescidos de 1,5 µL de tampão de amostra FSUDS (azul de bromofenol 0,025 %; xileno cianol 0,025 %, SDS 0,1 %, Ficoll 20 % em tampão contendo 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM de EDTA pH 8,0). Os géis foram corados em brometo de etídeo (0,5 µg/mL), visualizados em transiluminador ultravioleta e fotografados.

4.6 SEQUENCIAMENTO DO DNA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Para cada reação de sequenciamento foi utilizado 1 µL de *BigDye Terminator (Applied Biosystems)*, 0,5 µL do *primer* escolhido (10 pmol), 3 µL de tampão 5 X *BigDye (Applied Biosystems)*, cerca de 100 ng do produto de PCR tratado enzimaticamente e água ultrapura estéril para completar 10 µL de volume final por reação. Estas foram submetidas a 96 °C por 1 minuto, e 34 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 3 minutos. Em seguida, foram adicionados 10 µL de água ultrapura estéril, 2µL de acetato de amônio 7,5 M e 2 volumes de etanol 100 %. Após homogeneização as reações foram centrifugadas por 20 minutos (14.500 rpm) e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com etanol 70 % e centrifugado por 15 minutos (14.500 rpm). O

sobrenadante foi removido e o precipitado seco para o sequenciamento no ABI3500XL (*Applied Biosystems*), seguindo as recomendações do fabricante.

As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados nr (*non-redundant*) disponível no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando a ferramenta BLAST N, (ALTSCHUL et al., 1997) a qual compara a sequência de nucleotídeos com o banco de dados de nucleotídeos. Além disso, a qualidade das sequências foi analisada com o software Phred (EWING; GREEN, 1998) disponibilizado online na página da Embrapa (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). A sequência do gene *glnA* de *Azospirillum brasilense* FP2 foi utilizada para comparação e alinhamento com as sequências das estirpes HM estudadas, utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). Possíveis alterações estruturais decorrentes das mutações foram analisadas utilizando o programa PyMOL (www.pymol.org).

5 RESULTADOS

As estirpes mutantes excretoras de amônio de *Azospirillum brasilense* estirpes: HM14, HM26, HM053 e HM210, são capazes de fixar nitrogênio constitutivamente (Nif^c), ou seja, mesmo na presença de altas concentrações do íon amônio. Este fenótipo pode estar associado a alterações no gene *glnA*, o qual codifica para GS. Para esclarecer os mecanismos que alteram a fixação biológica de nitrogênio e a assimilação e secreção do amônio por estas bactérias foi realizado o sequenciamento e análise do gene *glnA* dessas estirpes.

A partir do DNA genômico de cada estirpe foram realizadas reações de amplificação do gene *glnA*. Inicialmente foram realizadas PCRs em gradiente visando determinar a T_{ann} que melhor se ajustava a cada par de *primers* utilizado (a região de alinhamento com o gene *glnA* de cada primer utilizado pode ser observado na figura 4; tabela 1).

Para o par de *primers* p*glnA*1 e Interno GS2 (fig. 4), foram testadas temperaturas de anelamento entre 58 °C a 70,5 °C. A amplificação do fragmento esperado foi alcançada com melhor especificidade e eficiência com a T_{ann} de 70 °C (fig. 5). O mesmo foi realizado para o par de *primers* p*glnA*1 e Interno GS1, para os quais a melhor T_{ann} encontrada foi 69 °C (fig. 5).

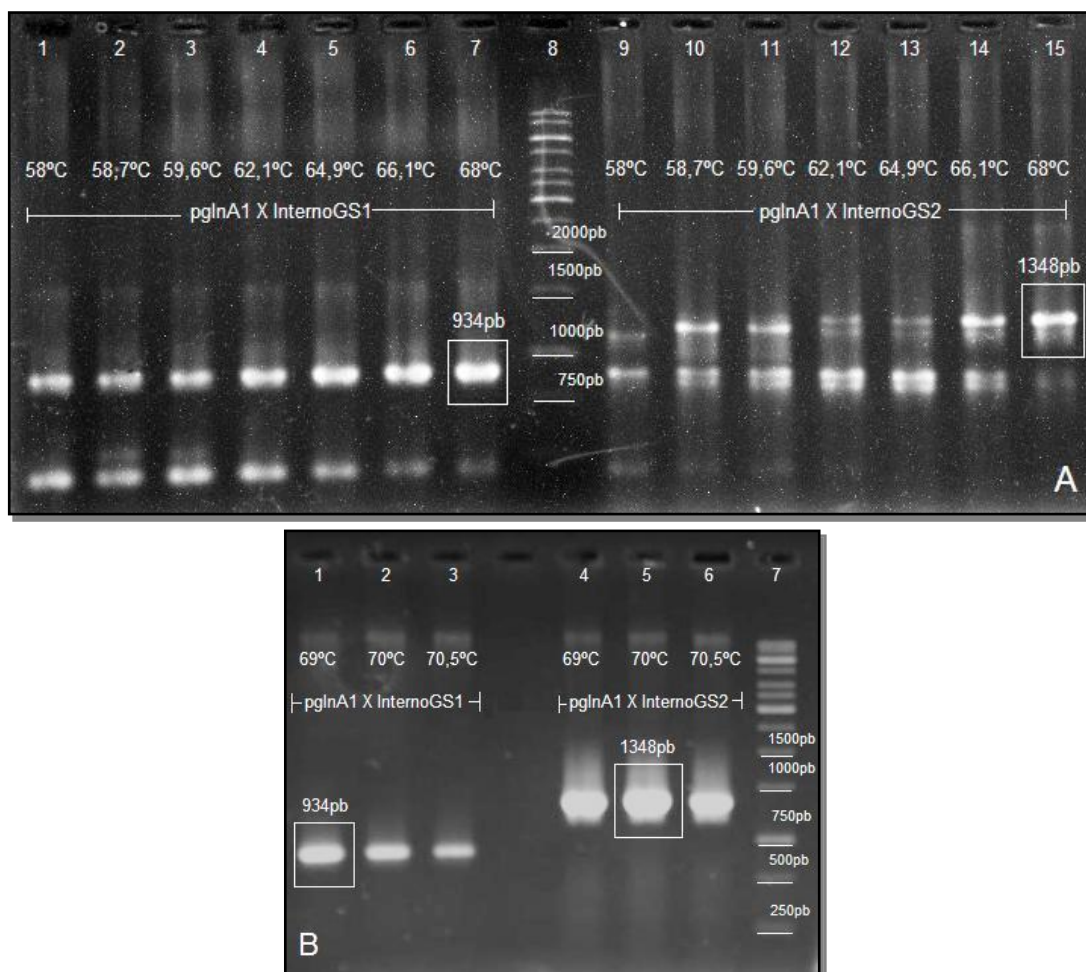


Figura 5: Perfil de amplificação de diferentes trechos do operon *glnBA* sob diferentes temperaturas de anelamento dos *primers*. Os géis de eletroforese apresentados são referentes ao primeiro teste da PCR em gradiente com T_{ann} variando de 58 °C a 68 °C (A) e ao segundo teste com T_{ann} variando de 69 °C a 70,5 °C (B). 1A a 7A, 9A a 15A e 1B a 6B são os produtos das amplificações e 8A e 7B correspondem ao marcador molecular 1 kb Ladder (*Fermentas*).

Para o par de *primers* InternoGS3 e GS- foram testadas temperaturas de anelamento entre 56 °C a 70 °C para a obtenção da região final do gene *glnA*. Na figura 6 pode-se observar que a amplificação do produto de PCR ideal, sem apresentar bandas referentes a produtos inespecíficos e com maior quantidade de produto foi alcançado com a T_{ann} de 60 °C.

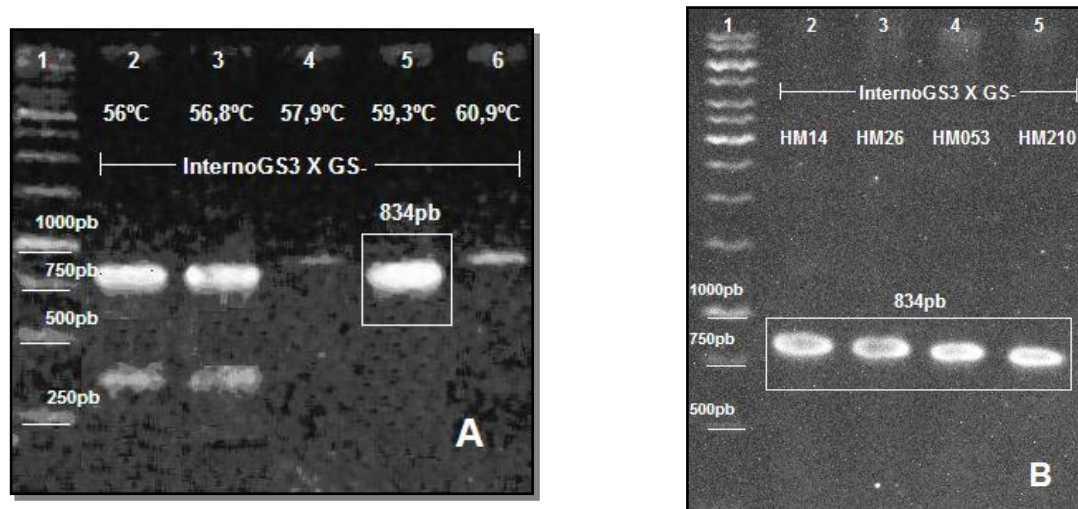


Figura 6: Perfil de amplificação de diferentes trechos do operon *glnBA* sob diferentes temperaturas de anelamento dos *primers*. Os géis de eletroforese apresentados são referentes ao teste da PCR com os *primers* Interno GS3 e GS- com T_{ann} variando de 56 °C a 70 °C (A) e ao produto de PCR obtido com a T_{ann} ideal de 60 °C para todas as estipes (B). 1A e 1B correspondem ao marcador molecular 1kb Ladder (*Fermentas*) e, 2A a 6A e 2B a 5B são os produtos das amplificações.

Para a realização das reações de sequenciamento os produtos de PCR obtidos foram previamente tratados utilizando as enzimas EXOI e SAP, para a eliminação dos *primers* e nucleotídeos livres excedentes. O produto destas reações foi utilizado no sequenciamento com os mesmos *primers* da etapa de amplificação, porém em reações separadas.

Para cada estirpe foram obtidas cerca de sete sequências de boa qualidade, oriundas de produtos de reações de amplificação diferentes. A qualidade delas foi analisada, utilizando o software Phred, e a maior parte apresentou mais de 450pb capazes de serem lidas com qualidade, como pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3: Análise da qualidade das sequências obtidas para as estirpes HM.

Número de bases lidas com escore Phred >20	HM14	HM26	HM053	HM210
311 pb a 395 pb	1	2	2	1
396 pb a 480 pb	0	1	3	2
481 pb a 565 pb	2	2	1	2
mais de 566 pb	4	5	7	5
Total de sequências analisadas	7	10	13	10

O alinhamento e comparação destas sequências com a região codificadora do gene *glnA* da estirpe FP2 de *A. brasilense*, utilizando o programa BioEdit (HALL,

1999), possibilitou a identificação de mutações de ponto em todas as sequências de *glnA* das quatro estirpes mutantes (tab. 4).

Tabela 4: Diferenças nas sequências de nucleotídeos e de aminoácidos entre a sequência do gene *glnA* de FP2 e as sequências obtidas para o gene *glnA* dos mutantes HM.

Posição do nucleotídeo	Nucleotídeo(s) em:		Posição do aminoácido	Aminoácido em:		Estirpe
	<i>glnA</i> FP2	<i>glnA</i> HM		<i>glnA</i> FP2	<i>glnA</i> HM	
743 ^o	A	G	248 ^o	His	Arg	HM14
872 ^o	T	G	291 ^o	Leu	Arg	HM14
157 ^o	G	T	53 ^o	Gly	Cys	HM26
1040 ^o	C	T	347 ^o	Pro	Leu	HM053
385 ^o	G	A	129 ^o	Gly	Ser	HM210

A sequência codificadora do gene *glnA* de HM14 apresentou uma transição, A→G no códon CAC (histidina) para CGC (arginina) e uma transversão T→G no códon CTG (leucina) para CGG (arginina). Eletroferogramas de três leituras de cada região mutada podem ser vistas na figura 7 e confirmam a existência dessas mutações pontuais.

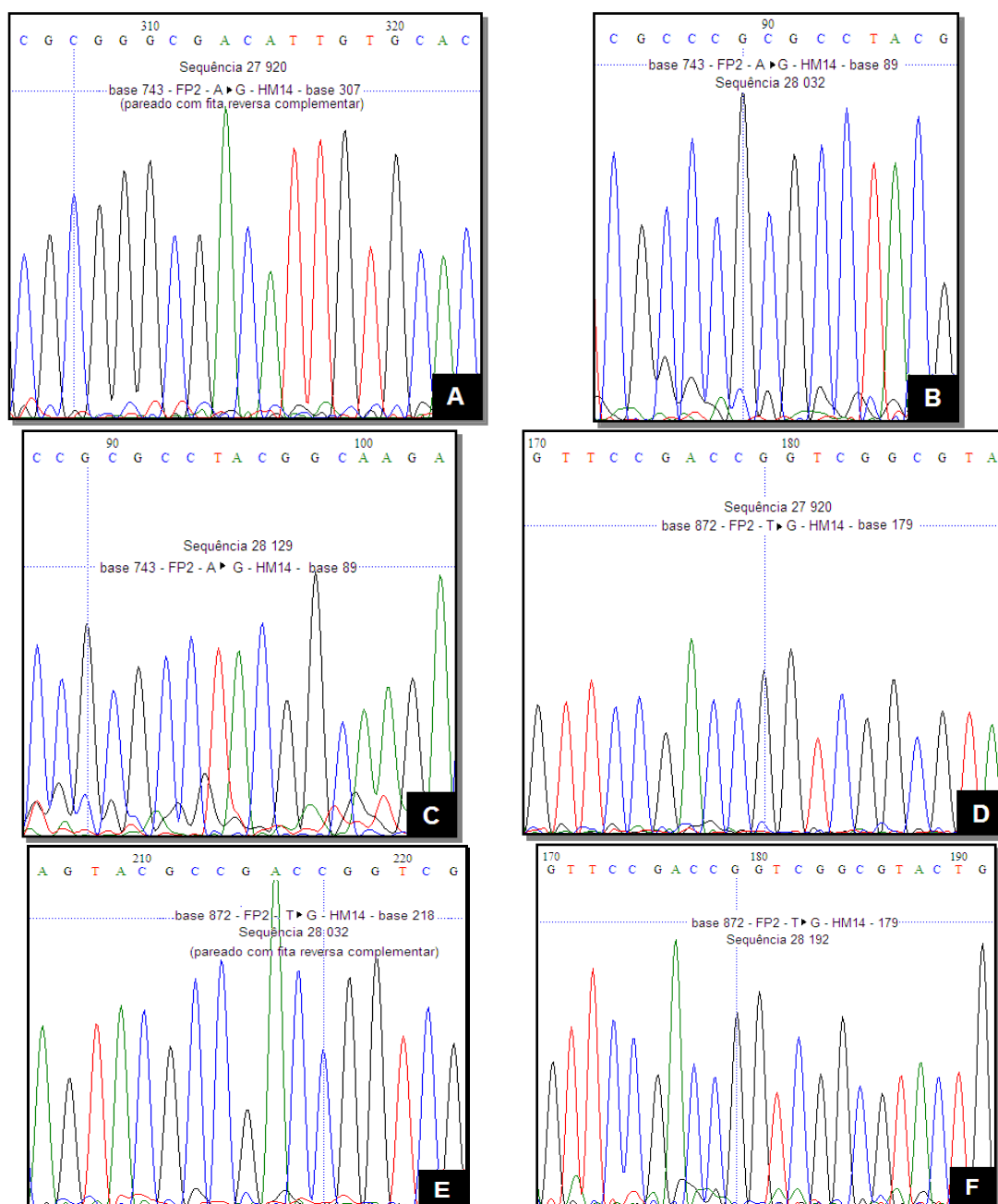


Figura 7: Eletroferogramas das mutações detectadas na região codificadora do gene *glnA* da estirpe HM14. A (pareamento com fita reversa complementar, códon do mutante analisado de CGC para GCG), B e C correspondem aos eletroferogramas da região com transição A→G; D, E (pareamento com fita reversa complementar, códon do mutante analisado de CAG para CCG) e F correspondem aos eletroferogramas da região com transversão T→G (as linhas pontilhadas indicam a base mutada).

Na estirpe HM053 foi encontrada uma transição C→T no códon CCG (prolina) para CTG (leucina). A detecção desta mutação foi evidenciada pelo alinhamento das sequências obtidas para esta estirpe com a selvagem FP2. Os respectivos eletroferogramas desta região com transversão também apresentaram picos bem distintos de detecção das bases (fig. 8) confirmando esta troca.

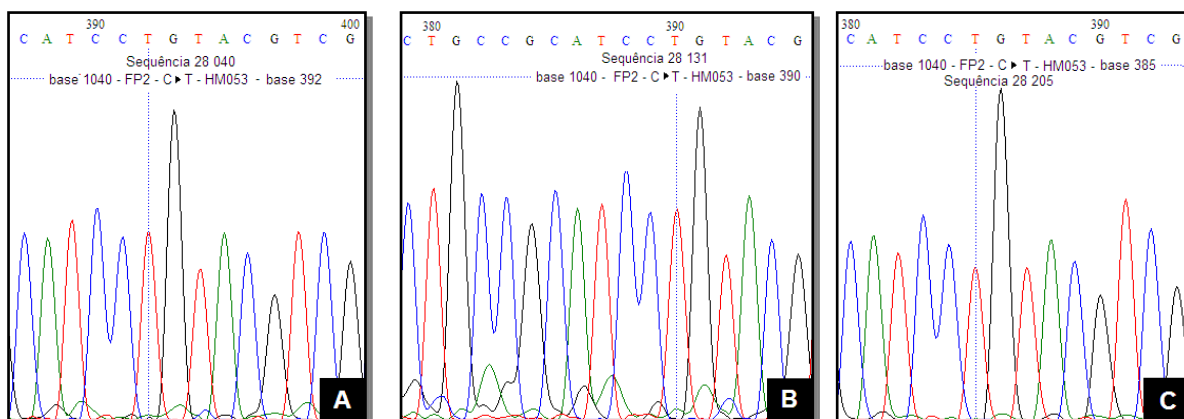


Figura 8: Eletroferogramas da transição detectada na região codificadora do gene *glnA* da estirpe HM053. A, B e C correspondem aos eletroferogramas da região com transverso $C \rightarrow T$ (as linhas pontilhadas indicam a base mutada).

Em HM26 a base 157 apresentou transverso $G \rightarrow T$ no códon GGC (glicina) para TGC (cisteína). Na estirpe HM210 a base 385 apresentou transição $G \rightarrow A$ no códon GGC (glicina) para AGC (serina). Tanto o alinhamento com a sequência codificadora de *glnA* de FP2, como as imagens dos eletroferogramas (correspondentes as fitas reversas complementares) serviram para evidenciar ambas as mutações observadas (fig. 9 e 10).

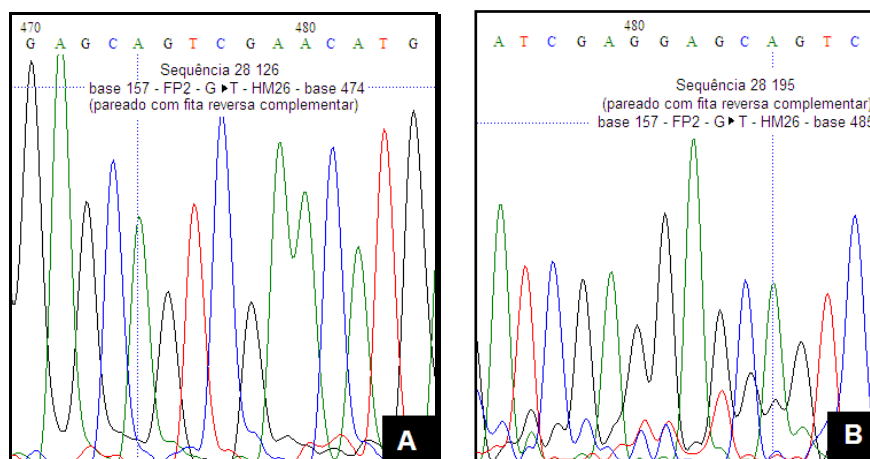


Figura 9: Eletroferogramas da transverso detectada na região codificadora do gene *glnA* da estirpe HM26. A e B correspondem aos eletroferogramas da região com transverso $G \rightarrow T$ (as linhas pontilhadas indicam a base mutada).

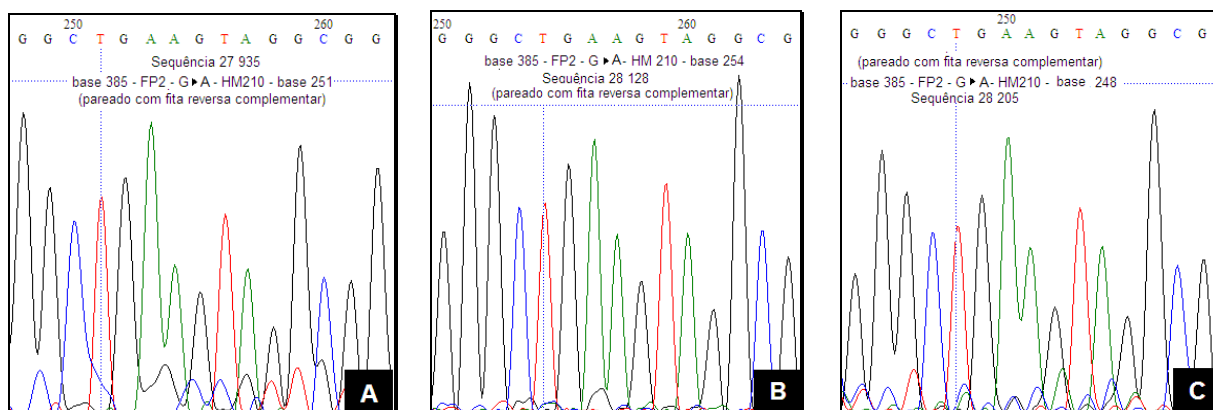


Figura 10: Eletroferogramas da transversoão detectada na região codificadora do gene *glnA* da estirpe HM210. A, B e C correspondem aos eletroferogramas da região com transição G→A (as linhas pontilhadas indicam a base mutada).

6 DISCUSSÃO

Os mutantes HM14, HM26, HM053 e HM210 são capazes de fixar nitrogênio constitutivamente e excretar amônio em quantidades superiores a estirpe selvagem FP2. Estas características estão associadas a alterações na via de assimilação de amônio e com os mecanismos de percepção intracelular da disponibilidade de compostos nitrogenados nestas bactérias. A glutamina sintetase (GS) é a principal enzima responsável pela assimilação do amônio, e seu produto, a glutamina, atua como sinalizador das concentrações de nitrogênio fixado no interior das células bacterianas (ADLER; PURICH; STADTMAN, 1975).

Em *A. brasilense* foram descritas duas outras estirpes, a 7028 e a 7029, que apresentam baixa atividade biossintética de GS, comparado a estirpe selvagem Sp7, e cujo gene *glnA* está mutado (DOMMELEN et al., 2003). Portanto, alterações neste gene, o qual codifica para GS, também poderiam explicar os fenótipos observados nos mutantes HM (MACHADO, 1988; CASTELLEN, 2005).

Outros genes candidatos a terem sofrido mutação e a levarem ao mesmo fenótipo são *glnD*, *glnE*, *glnB* e *glnZ*. Uma vez que *glnB* e *glnZ* estão relacionados com a regulação da atividade de GS as regiões codificadoras destes foram sequenciadas nos mutantes HM por Vitorino (2001), porém nenhuma mutação foi encontrada. Castellen (2005) sequenciou parcialmente o gene *glnA* das estirpes HM26 e HM210 e detectou uma mutação em cada estirpe. Neste trabalho foi concluído o sequenciamento da região codificadora do gene *glnA* da série de mutantes HM de *A. brasilense*.

A estirpe HM26 fixa nitrogênio constitutivamente e apresenta atividade transferásica total de GS semelhante à selvagem, porém esta é mantida quase 100% adenililada, ou seja, não ativa (MACHADO, 1988). Logo, a maioria do amônio produzido pela fixação de nitrogênio não é assimilado e acaba sendo excretado pela bactéria. A mutação encontrada no gene *glnA* deste mutante originou a troca de um resíduo de glicina na posição 53 por um resíduo de cisteína. O local desta alteração fica próximo ao sítio de ligação do íon amônio, que é formado pelo aspartato 50, serina 53, tirosina 179 e glutamato 327 em *Salmonella typhimurium*. Em *A.*

brasiliense estes aminoácidos são os mesmos que em *S. typhimurium* e equivalem aos resíduos 52, 55, 181 e 328 (LIAW; EISENBERG, 1994; CASTELLEN, 2005).

Segundo Liaw e Eisenberg (1994) o resíduo de aspartato, com sua carga negativa, é fundamental para a ligação do íon amônio e sua desprotonação, formando espécies ativas de NH_3 . Esta ataca o intermediário formado pela reação do glutamato com ATP, o γ -glutamil fosfato, a partir do qual se origina a glutamina. O aspartato também atua estabilizando o resíduo arginina 339 promovendo maior aproximação entre as subunidades da GS e aumentando a afinidade delas pelo amônio (LIAW; KUO; EISENBERG, 1995).

Devido à proximidade da mutação glicina→cisteína, no primeiro aminoácido do lado do Asp 50, é possível que esta mutação, como considerado por Castellen (2005), explique a baixa atividade biossintética de GS do mutante HM26. A presença da cisteína poderia provocar impedimento estérico na interação do amônio com Asp 50. Ou então, a alteração na flexibilidade do sítio de ligação ao amônio, visto que Asp 50 sofre forte deslocamento para fazer parte do sítio e requer ainda um reposicionamento de sua cadeia lateral para que essa remova um próton de amônio, convertendo-o em amônia. A regulação da atividade de GS da estirpe HM26 é restaurada pelo operon *glnBA*, mas *glnB* apenas não a complementa. Portanto, a mutação no gene *glnA* explicaria o fenótipo observado em HM26, da mesma forma que no mutante 7029 de *A. brasiliense* (*Nif*⁻), onde a baixa atividade biossintética de GS, é atribuída a troca do Asp 50 (na posição 52 em *A. brasiliense*), o qual está próximo ao sítio de ligação ao amônio (DOMMELEN et al., 2003).

A estirpe HM210 é semelhante a HM26, ou seja, fixa nitrogênio constitutivamente, apresenta níveis altos de GS, mas altamente adenilada e excreta amônio (MACHADO, 1988). A mutação encontrada originou a troca de um resíduo de glicina na posição 129 por um resíduo de serina. Este resíduo situa-se num domínio conservado próximo as posições 129 e 131, nas quais estão dois resíduos de ácido glutâmico em *Salmonella typhimurium*. Estes resíduos são considerados importantes uma vez que Glu 129 coordena os íons metálicos que participam da interação com ATP e ADP, enquanto o Glu 131 interage com o substrato glutamato, viabilizando a ativação do intermediário γ -glutamil fosfato para a síntese da glutamina (LIAW; VILLAFRANCA; EISENBERG, 1993).

Castellen (2005) detectou uma transversão de G→T, o que alterava o aminoácido de glicina para cisteína nesta mesma posição desta estirpe, porém os resultados deste trabalho indicam existir na realidade uma transição G→A. Esta alteração em HM210 poderia estar desestabilizando a coordenação de íons metálicos e promovendo a diminuição da afinidade de GS por ATP. Como conseqüência, isso pode bloquear, na estirpe HM210, a reação de formação de γ -glutamil fosfato e a síntese de glutamina, mantendo a atividade biossintética desta enzima baixa. Independente da função exercida pela glicina mutada nessa estirpe, é importante ressaltar que apesar desta não ter sido caracterizada funcionalmente, ela é conservada nessa posição tanto em espécies de procaríotos quanto de eucariotos (EISENBERG et al., 2000).

O estudo realizado por Vitorino (2001), complementando a estirpe HM210 com plasmídeo contendo o gene *glnB* de *A. brasilense*, demonstrou ser este suficiente para restaurar a atividade transferásica de GS a níveis semelhantes da estirpe selvagem. Logo, a mutação identificada neste trabalho, e também por Castellen (2005), pode não ser suficiente para explicar a baixa atividade biossintética de GS. Isso sugere, que outras mutações possam ainda existir na região regulatória de *glnB* ou em genes envolvidos com o controle de sua atividade, como *glnD* ou *glnE*.

Na estirpe HM14 foram observadas duas mutações, uma transição e uma transversão. Apesar de fixar nitrogênio constitutivamente, ela apresenta níveis muito baixos de GS (1 a 2 %), mas que se encontra completamente ativa (MACHADO, 1988). Ensaio de complementação e análise de transcrição permitiram a proposição de que a estirpe HM14 pode apresentar alterações tanto na regulação de *glnB*, quanto em *ntrYX* (MACHADO, 1988; VITORINO et al., 2001). Quando esta estirpe é complementada com um plasmídeo contendo os genes *nifR3ntrBCYX*, ela volta a ser capaz de crescer em nitrato e a regulação da atividade da nitrogenase é normalizada, indicando o possível envolvimento do produto destes genes com o controle da atividade de GS e da nitrogenase (VITORINO et al., 2001). Além disso, a análise de expressão dos genes *glnB* e *glnA*, através de fusão traducional, mostrou que a expressão de *glnA* está normal nessa estirpe, enquanto *glnB* é expresso

constitutivamente, diferente da estirpe selvagem, onde este é reprimido por amônio (VITORINO, 2001).

As duas mutações encontradas na região codificadora do gene *glnA* da estirpe HM14 devem contribuir para a redução ou perda da atividade biossintética de GS. Os resíduos de histidina na posição 248 e de leucina na posição 291, ambos convertidos para arginina, estão localizados na superfície das subunidades que constituem a GS (fig. 10). Apesar destes aminoácidos não interagirem diretamente e nem indiretamente com outros aminoácidos relacionados aos sítios de interação desta enzima com seus substratos, eles podem ser importantes para a interação entre as subunidades ou afetam a estrutura de forma que a atividade biossintética da enzima é comprometida. Desta forma, mutações da histidina-248 e leucina-291, os quais são resíduos conservados em diversas bactérias, poderiam estar afetando a forma multimérica da GS.



Figura 10: Análise estrutural da subunidade de GS com destaque para a alteração da histidina 248 e leucina 291, ambas convertidas para arginina na estirpe HM14. Os resíduos circundados em vermelho correspondem aos aminoácidos alterados para arginina e o restante marcado em azul e roxo, são aminoácidos relacionados com a manutenção dos sítios de interação enzima-substrato.

A estirpe HM053 fixa nitrogênio constitutivamente, possui baixa atividade transferásica de GS, a qual é mantida em grande parte adenilada (75 a 80 %) e excreta amônio em quantidades superiores a estirpe FP2 (MACHADO, 1988). Nesta estirpe foi identificada uma mudança do resíduo de prolina na posição 347 para leucina (fig. 11). A região com o resíduo resultante da mutação não parece ter

interação com outros aminoácidos na vizinhança e se manter estruturalmente estável, quando cada subunidade constituinte de GS é analisada isoladamente. No entanto, estudos com mutantes de GS de *S. typhimurium* em resíduos bem conservados e próximos, como a arginina 339 e a arginina 359 demonstraram serem estas importantes como sítios de ligação a ATP e glutamato (DHALLA et al., 1994).

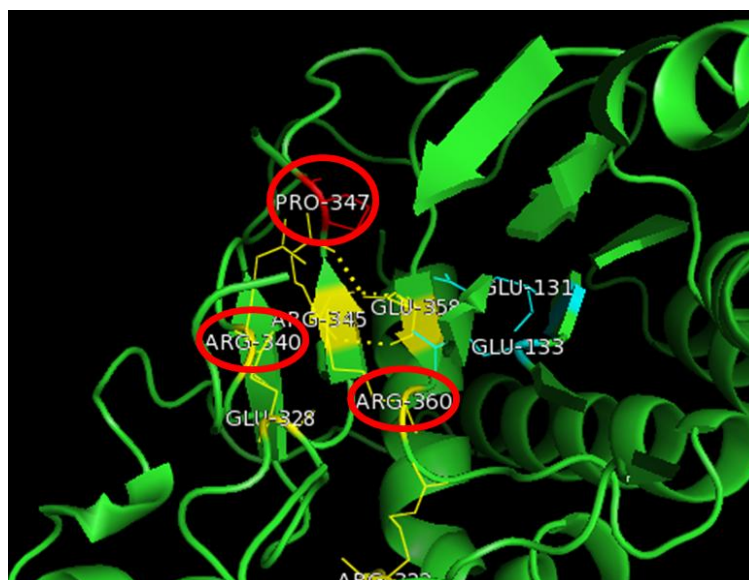


Figura 11: Análise estrutural da subunidade de GS com destaque para conversão do aminoácido 347 de prolina para leucina na estirpe HM053. Em vermelho e circundado está o resíduo 347 de HM053, em amarelo e circundado os resíduos 340 e 360, homólogos, respectivamente, aos resíduos 339 e 359 em *S. typhimurium*. Estes são aminoácidos relacionados com a manutenção da estabilidade de sítios importantes para a atividade de GS. O restante, marcado em azul e roxo, também é importante para a manutenção dos sítios de interação enzima-substrato.

A complementação desta estirpe com o gene *glnB* restaura o controle da atividade de GS e quando complementada com o operon *glnBA*, além do retorno do controle, os níveis de GS voltam parcialmente ao normal (VITORINO et al., 2001). Assim estes estudos sugerem que parte do fenótipo de HM053 pode ser gerado por mutação na região regulatória do gene *glnA* (VITORINO, 2001) e outra parte pela mutação encontrada na região codificadora deste gene.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As duas mutações detectadas na estirpe HM14 estão em posições não claramente envolvidas com o mecanismo de atividade catalítica de GS, mas podem afetar a sua estrutura. Novos ensaios poderão confirmar se a estrutura quaternária de GS se encontra alterada nesse mutante. Análises prévias do genoma completo de HM14 (em fase de construção) confirmaram a existência destas duas mutações.

A troca de glicina por cisteína observada na estirpe HM26, assim como a troca de glicina por serina na estirpe HM210, estão em regiões envolvidas na interação com os substratos de GS e devem ser a razão pela baixa atividade desta. Os dados de atividade transferásica destas mutantes sugerem que os níveis totais de GS são altos e apenas a atividade biossintética é baixa. A análise direta do nível de adenililação de GS dessas duas estirpes deve confirmar se a habilidade catalítica destas é realmente afetada pelas mutações.

A prolina, trocada por leucina na estirpe HM053, está próxima a sítios de ligação a ATP e glutamato. Portanto esta mutação pode estar afetando parte da atividade biossintética de GS. Possivelmente, na região regulatória ainda possa existir mais mutações que justificam o restante da deficiência enzimática observada.

Estas estirpes mutantes são importantes ferramentas para estudar os mecanismos de catálise de GS. Deste modo, estudos futuros de cinética enzimática com estas formas de GS trariam grande contribuição para a construção dos conhecimentos sobre a fixação biológica de nitrogênio em *Azospirillum brasilense*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, S. P.; PURICH, D.; STADTMAN, E. R. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the PII regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylyl-removing enzyme. **Journal of Bacteriology**, v. 250, nº16, p. 6264-6272. 1975.
- ALMASSY, R.J.; JANSON, C.A.; HAMLIN, R.; EISENBERG, D. Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. **Nature**, v. 323, p.304-309. 1986.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, 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**, v.25, p.3389-3402. 1997.
- ANTONYUK, L.P. Glutamine Synthetase of the Rhizobacterium *Azospirillum brasilense*: Specific Features of Catalysis and Regulation. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.43, nº3, p.244-249. 2007.
- BASHAN, Y; HOLGUIN, G. Inter-root Movement of *Azospirillum brasilense* and Subsequent Root Colonization of Crop and Weed Seedlings Growing in Soil. **Microbial Ecology**, v.29, p.269-281. 1995.
- _____. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-121. 1997.
- BASHAN, Y.; SINGH, M.; LEVANONY, H. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. **Canadian Journal of Botany**, v.67, nº8, p.2429-2434. 1989.
- BESPALOVA, L. A.; ANTONYUK, L. P.; IGNATOV, V. V. *Azospirillum brasilense* glutamine synthetase: influence of the activating metal ions on the enzyme properties. **BioMetals**, v.12, p.115-121. 1999.
- BOZOUKLIAN, H.; ELMERICH, C. Nucleotide sequence of the *Azospirillum brasilense* Sp7 glutamine synthetase structural gene. **Biochimie**, v.68, p.1181-1187. 1986.
- BOZOUKLIAN, H.; FOGHER C.; ELMERICH, C. Cloning and characterization of the *glnA* gene of *Azospirillum brasilense* Sp7. **Annales de l'Institut Pasteur/ Microbiology**, 137 B, p. 3-18. 1986.
- BROWN, J. R.; MASUCHI, Y.; ROBB, F. T.; DOOLITTLE, W. F. Revolutionary Relationships of Bacterial and Archaeal Glutamine Synthetase Genes. **Journal of Molecular Evolution**, v.38, p.566-576. 1994.

CASTELLEN, P. **Análise estrutural e funcional da região *glnBA* de *Azospirillum brasilense***. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

CASTELLEN, P; WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A.; CRUZ, L. M.; STEFFENS, M. B. R.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M. de; PEDROSA, F. de O. Structural organization of *glnBA* region of the *Azospirillum brasilense* genome. **European Journal of Soil Biology**, v.45, p.100-105. 2009.

DHALLA, A. M.; LI, B.; ALIBHAI, M. F.; YOST, K. J.; HEMMINGSEN, J. M.; ATKINS, W. M.; SCHINELLER, J.; VILLAFRANCA, J. J. Regeneration of catalytic activity of glutamine synthetase mutants by chemical activation: Exploration of the role of arginines 339 and 359 in activity. **Protein Science**, v.3, p.476-481. 1994.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.621-631. 2004.

DOBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. **In: Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation**, p. 518-538. 1975.

DOMMELEN, A. V.; KEIJERS, V.; WOLLEBRANTS, A.; VANDERLEYDEN, J. Phenotypic Changes Resulting from Distinct Point Mutations in the *Azospirillum brasilense glnA* Gene, Encoding Glutamine Synthetase. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n°9, p.5699-5701. 2003.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred II*. Error Probabilities. **Genome Research**, v.8, p.186-194. 1998.

EISENBERG, D.; GILL, H. S.; PFLUEGL, G. M. U.; ROTSTEIN, S. H. Structure-function relationships of glutamine synthetases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1477, p.122-145. 2000.

FORCHHAMMER, K. Glutamine signaling in bacteria. **Frontiers in Bioscience**, v.12, p.358-370. 2007.

GALLOWAY, J. N.; COWLING, E. B. Reactive Nitrogen and The World: 200 Years of Change. **Ambio**, v.31, n°2, p.64-71. 2002.

GINSBURG, A.; STADTMAN, E. R. **Regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli***. In: Prusiner S, Stadman ER (eds) The enzymes of glutamine metabolism. Academic Press, New York, 1973, 943p.

GRUBER, N.; GALLOWAY, J. N. An Earth-system perspective or the global nitrogen cycle. **Nature**, v.451, p.293-296 , 2008.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis

program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, Ser. 41:95-98, 1999.

HOLGUIN, G.; PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. **Biology Fertil Soils**, v.29, p.10-23, 1999.

HUERGO, L. F.; FILIPAKI, A.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; STEFFENS, M. B.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Effect of the over-expression of PII and PZ proteins on the nitrogenase activity of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, 253, p. 47-54, 2005.

HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; YATES, G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; Regulation of *glnB* gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein. **FEMS Microbiology Letters**, 223, p. 33-40, 2003.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja** (Londrina), nº325, 2011. 36p.

KAMNEV, A. A.; ANTONYUK, L. P.; SMIRNOVA, V. E.; KULIKOV, L. A.; PERFILIEV, Y. D.; KUDELINA, I. A.; KUZMANN, E.; VÉRTES, A. Structural Characterization of Glutamine Synthetase from *Azospirillum brasilense*. **Biopolymers**, v.74, p.64-68. 2004.

LIAW, S. H.; EISENBERG, D. Structural Model for the Reaction Mechanism of Glutamine Synthetase, Based on Five Crystal Structures of Enzyme-Substrate Complexes. **Biochemistry**, v. 33, p. 675-681. 1994.

LIAW, S. H.; KUO, I; EISENBERG, D. Discovery of the ammonium substrate site on glutamine synthetase, a third cation binding site. **Protein Science**, v. 4, p. 2358-2365.1995.

LIAW, S. H.; VILLAFRANCA, J. J.; EISENBERG, D. A model for oxidative modification of glutamine synthetase, based on crystal structures of mutant H269N and the oxidized enzyme. **Biochemistry**, v.32, nº31, p.7999-8003. 1993.

LEIGH, J. A.; DODSWORTH, J. A. Nitrogen Regulation in Bacteria and Archaea. **Annual Review of Microbiology**, v.61, p.349-377. 2007.

MACHADO, H. B. **Isolamento e caracterização de mutantes de *Azospirillum brasilense* constitutivos para fixação de nitrogênio**. 128f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1988.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F.O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, nº 29, p. 549-553, 1991.

MAGASANIK, B. The regulation of nitrogen utilization in enteric bacteria. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 51, p.34-40, 1993

MARTIN-DIDONET, C. C. G.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; KLEINA, M.; REGO, F. G. M.; RIGO, L. U.; GEOFFREY YATES, M.; PEDROSA, F. O. Genome Structure of the Genus *Azospirillum*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, nº14, p. 4113–4116. 2000.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen Control in Bacteria. **Microbiological Reviews**, v.59, nº 4, p.604-622. 1995.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntnC* (*glnG*) type genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 55, p. 95-101, 1984.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Physiology, biochemistry, and genetics of *Azospirillum* and other root-associated nitrogen-fixing bacteria. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 6, p. 345-384, 1988.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^a ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SRIVASTAVA, A.; TRIPATHI, A. K. Adenosine Diphosphate Ribosylation of Dinitrogenase Reductase and Adenylation of Glutamine Synthetase Control Ammonia Excretion in Ethylenediamine-Resistant Mutants of *Azospirillum brasilense* Sp7. **Current Microbiology**, v.53, p.317-323. 2006.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 24, nº4, p. 487-506, 2000.

VITORINO, J. **Análise genética e funcional de genes *nif*, *gln*, e *ntn* em mutantes de *Azospirillum brasilense* constitutivos para fixação de nitrogênio**. 149f. Tese (Doutorado em Ciências- Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001.

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

WESTBY, C. A.; ENDERLIN, C. S.; STEINBERG, N. A.; JOSEPH, C. M.; MEEKS, J. C. Assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. **Journal Bacteriology**. v. 169, nº 9, p. 4211-4214, 1987.

ZAMAROCZY, de M.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional Organization of the *glnB-glnA* Cluster of *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, nº9, p. 2507-2515, 1993.