

LYSANGELA RONALTE ALVES

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *ntrY* E *ntrX* DE
*Herbaspirillum seropedicae***

Monografia apresentada na disciplina de Estágio em Bioquímica (BQ016), como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadores: Prof^a Dr^a Leda Satie Chubatsu

Prof^a Dr^a Liu Un Rigo

Prof^a Dr^a Roseli Wassem

CURITIBA

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

TÍTULO DO PROJETO DE MONOGRAFIA

Caracterização dos genes *ntrY* e *ntrX* de *Herbaspirillum seropedicae*

ALUNA

LYSANGELA RONALTE ALVES

ORIENTADORES

Profa. Dra. LEDA SATIE CHUBATSU

Profa. Dra. LIU UN RIGO

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Profa. Dra ROSELI WASSEM

Departamento de Genética

COLABORADORES:

Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Profa. Dra Maria Berenice R. Steffens

Profa. Dra Elaine Machado Benelli

Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz

RESUMO

Os genes *ntrY* e *ntrX* constituem um sistema regulatório de dois componentes inicialmente descrito em *Azorhizobium caulinodans*. As proteínas NtrY e NtrX estão envolvidas com fixação e metabolismo de nitrogênio. Em *Herbaspirillum seropedicae*, uma bactéria fixadora de nitrogênio, o operon *ntrYX* foi identificado durante o projeto de seqüenciamento do genoma (GENOPAR). Análises de seqüência de DNA mostraram que os genes *ntrYX* estão localizados a jusante de duas *orf*s transcritas na mesma direção e com regiões intergênicas muito curtas. A primeira *orf* codifica para um polipeptídeo com similaridade com a proteína SUN, uma RNA metil transferase. A segunda *orf* (*orfP*) sobrepõe-se ao códon de parada do gene *sun*, e o seu produto é similar a um peptídeo rico em prolina com função desconhecida. O códon de início de tradução de *ntrY* sobrepõe-se ao códon de parada da *orfP*, seguido pelo gene *ntrX* e um terminador de transcrição independente de Rho. Dois prováveis promotores dependentes de σ^N foram identificados: um a montante ao gene *sun* e outro a montante ao gene *ntrY*. Próximo ao promotor σ^N a montante a *ntrY* foram identificados quatro prováveis seqüências de ligação de NtrC também sobrepostos a região codificadora da *orfP*. A proteína NtrY contém quatro hélices transmembrana e quatro domínios conservados envolvidos com as atividades sensora e quinase da proteína. A proteína NtrX é um ativador transcricional que contém dois motivos conservados envolvidos com a regulação de resposta e ligação ao DNA. A ausência de um domínio de interação com σ^{54} sugere que os genes alvo de NtrX sejam dependentes de outro fator σ^N . Mutantes *ntrY* foram obtidos por reação de inserção transposon que confere resistência a tetraciclina (Tc^R), confirmados por ensaios de hibridização de DNA. Esses mutantes foram incapazes de utilizar nitrato como única fonte de nitrogênio, mas apresentaram crescimento positivo em meio contendo amônio como fonte de nitrogênio. Esses resultados sugerem que NtrY e NtrX estão envolvidas no metabolismo e/ou transporte de nitrato em *H. seropedicae*.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Fixação Biológica de Nitrogênio	1
1.2. <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	2
1.3. Genética e Regulação da Fixação de Nitrogênio em <i>H. seropedicae</i> .	3
1.4. Sistema Ntr	5
1.5. Sistemas reguladores de dois componentes	6
1.6. Operon <i>ntrYX</i>	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Microrganismos e plasmídeos	11
3.2. Condições e meios de cultivo das bactérias	11
3.3. Antibióticos	13
3.4. Manipulação de DNA	13
3.4.1. Purificação de DNA plasmidial	13
3.4.2. Purificação de DNA genômico de <i>H. seropedicae</i>	14
3.4.3. Sequenciamento de DNA plasmidial	14
3.5 Alinhamento e análise das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos	15
3.6. Transformação bacteriana por eletroporação	15
3.6.1. Preparo de células eletrocompetentes	15
3.6.2 Transformação por eletroporação	16
3.7. Obtenção de mutantes <i>ntrYX</i> de <i>H. seropedicae</i>	16
3.7.1. Mutagênese aleatória dos genes <i>ntrX</i> e <i>ntrY</i>	17
3.8. Obtenção de mutantes <i>ntrY</i> de <i>H. seropedicae</i>	18
3.8.1. Transferência de DNA do gel de agarose para membrana de nylon e Hibridização do DNA com sonda específica	18
3.9 Análise fisiológica dos mutantes quanto ao crescimento em nitrato	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Isolamento e seqüenciamento do clone 17003C02	20
4.2 Análise do "Contig" que contém os genes <i>ntrY</i> e <i>ntrX</i>	22
4.3 Análise das proteínas NtrY e NtrX de <i>H. seropedicae</i>	27
4.4 Mutagênese aleatória do clone 17003C02 por reação de inserção de transposon	33
4.5 Obtenção de Mutantes <i>ntrY</i> em <i>H. seropedicae</i>	35
4.6. Regulação do metabolismo de nitrato	Erro! Indicador não definido.
4.6.1 Análise fenotípica do mutante <i>ntrY</i> de <i>H. seropedicae</i> quanto ao crescimento em nitrato.	Erro! Indicador não definido.
5. CONCLUSÕES	41
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fixação Biológica de Nitrogênio

Os elementos mais abundantes nos seres vivos são o carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e fósforo. O oxigênio, o fósforo e o hidrogênio são encontrados na natureza em formas metabolicamente assimiláveis por todos os organismos (H₂O, O₂ e fosfato). Por outro lado, as principais formas de carbono e nitrogênio encontradas na natureza são, respectivamente CO₂ e N₂, cuja assimilação é restrita a alguns organismos (Howard e Rees, 1996). O CO₂ é utilizado para a síntese de biomoléculas somente por organismos fotossintetizantes enquanto o N₂ é somente assimilável por procariotos denominados diazotrofos (Howard e Rees, 1996). Os diazotrofos possuem a capacidade de converter dinitrogênio gasoso (N₂) a amônio numa reação catalisada pelo complexo enzimático denominado nitrogenase (Postgate et al., 1982).

A nitrogenase é composta por duas metaloproteínas, a proteína ferro (Fe), também chamada de dinitrogenase redutase, produto do gene *nifH*; e a proteína ferro-molibdênio (MoFe), também chamada de dinitrogenase, produto dos genes *nifD* e *nifK* (Eady et al, 1986).

A redução do N₂ pela nitrogenase envolve a transferência de elétrons, que ocorre em três etapas: primeiro ocorre à redução da proteína ferro por proteínas carreadoras de elétrons, seguida de transferência de elétrons da proteína ferro para a proteína ferro molibdênio e por último a redução do substrato no sítio ativo da proteína ferro-molibdênio (Eady et al., 1986). A reação catalisada pela nitrogenase é apresentada abaixo (Halbleid e Ludden, 2000):



1.2. *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é um organismo diazotrófico gram-negativo, pertencente a subclasse β das Proteobactérias, geralmente vibrióide podendo apresentar formas helicoidais (Baldani et al., 1986). O tamanho varia de 1,5 a 5 μm conforme o meio de cultivo utilizado e possui de um a três flagelos bipolares. *H. seropedicae* apresenta um metabolismo respiratório típico onde carboidratos não são fermentados (Baldani et al., 1986). Este organismo fixa nitrogênio atmosférico sob condições microaeróbicas e cresce bem com dinitrogênio gasoso como única fonte de nitrogênio (Baldani et al., 1986). Ácidos orgânicos são as principais fontes de carbono, embora glucose, galactose e arabinose possam também ser utilizados, enquanto sacarose não é metabolizada (Baldani et al., 1986). O pH de crescimento é bastante amplo (5,3 a 8,0) e a temperatura ótima de crescimento fica em torno de 35°C (Baldani et al., 1986; Fu e Burris 1989; Klassen et al., 1997).

H. seropedicae foi a princípio descrito como uma nova espécie de *Azospirillum* (Baldani et al., 1984) por apresentar hábitos de crescimento *in vitro* semelhantes a esse gênero de bactéria, formando a mesma película em meio semi-sólido livre de nitrogênio (Baldani et al., 1986). Entretanto estudos de hibridização rRNA/DNA revelaram apenas de 9 a 22% de homologia com as espécies de *Azospirillum* (*A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*) (Falk et al., 1986).

H. seropedicae foi inicialmente isolado de raízes de cereais e gramíneas, e mais recentemente do interior de folhas e caules de cana-de-açúcar e arroz (Baldani et al., 1986; 1992). Ao contrário do observado em *A. brasilense*, *H. seropedicae* não sobrevive em solos isentos de raízes sugerindo um caráter endofítico obrigatório deste organismo (Baldani et al., 1992). Um dos benefícios da associação com plantas é o favorecimento do crescimento vegetal. Isto foi observado pela avaliação do peso seco de plantas, como o arroz, inoculadas e não inoculadas com *H. seropedicae* (Döbereiner et al., 1992;

Roncatto-Maccari et al., 2003). As plantas inoculadas apresentaram um maior peso seco do que as não inoculadas, evidenciando as vantagens da interação.

1.3. Genética e Regulação da Fixação de Nitrogênio em *H. seropedicae*.

Por ser um processo de alto custo energético, a fixação de nitrogênio é estritamente regulada, sendo reprimida em altas concentrações de amônio e altas taxas de oxigênio (Postgate, 1982).

Os genes envolvidos na fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* identificados em nosso laboratório estão distribuídos em duas regiões que contém os genes *nifAB*, *nifHDKENXorf1orf2orf3*, *modABC* e *fixXfixC* (Souza et al., 1991ab; Machado et al., 1995; Klassen et al., 1999) e a outra região que contém os genes *glnAntrBntrC* (Rigo et al., 2001).

A regulação da fixação em *H. seropedicae* requer o ativador transcricional NifA (Souza et al., 1991a,b) e também o sistema geral de regulação do metabolismo nitrogenado, denominado sistema Ntr. A ativação da transcrição de *nifA* é dependente de NtrC e da subunidade σ^{54} (a proteína RpoN) da RNA polimerase (Souza et al., 1991, 1999, Wassem et al., 2000). O gene *nifA* de *H. seropedicae* apresenta uma região promotora bastante complexa onde foram encontrados dois sítios de ligação de NtrC, três para NifA e um para IHF. Análises do mecanismo de regulação da expressão de *nifA* mostraram que sua expressão é positivamente regulado por NtrC sendo dependente do fator σ^{54} . Esta ativação de NtrC é estimulada por IHF. Foi também observada a ativação da expressão do gene pela proteína NifA, porém esta é negativamente regulada por IHF na ausência do sítio para ligação para NtrC ou ausência de NtrC. Acredita-se que isso ocorra para prevenir a contínua auto-ativação de *nifA* por NifA (Wassem et al., 2000 e 2002).

A proteína NifA de *H. seropedicae* possui três domínios: um domínio N-terminal, um domínio central e um domínio C-terminal (Souza et al., 1991b). O domínio N-terminal é pouco conservado entre os organismos e alguns

resultados indicam que em *H. seropedicae* esse domínio está envolvido na resposta aos níveis de amônio intracelular (Monteiro et al., 1999, Souza et al., 1999). Este domínio parece estar envolvido em um mecanismo de controle auto-inibitório que responde a altas concentrações de amônio (Souza et al., 1999) Esse controle parece envolver a ligação da proteína PII na proteína NifA (Benelli et al., 1997; Souza et al., 1999).

O domínio C-terminal e o domínio central estão ligados por um “linker”, que apresenta dois resíduos conservados de cisteína que juntamente com outros dois resíduos de cisteína no domínio central formam um motivo possivelmente envolvido na ligação com metais. Acredita-se que essa região esteja relacionada com a sensibilidade a O_2 da proteína NifA de *H. seropedicae* (Souza et al, 1999; Monteiro et al., 1999), um processo que também envolve a proteína FnR (Monteiro et al., 2003).

Em *H. seropedicae*, assim como em outros diazotrofos, todos os promotores dos genes *nif* identificados até o momento são dependentes do fator σ^{54} , sendo também ativados pela proteína NifA (Merrick 1993, Fischer 1994, Pedrosa et al., 1997).

Os genes *glnAntrBC* de *H. seropedicae* foram sequenciados por Rigo e colaboradores em 2001 e constatou-se que fazem parte de um único operon (Schwab et al., 2002). A região promotora do operon possui dois sítios de ligação a NtrC, um promotor dependente de σ^{54} e outro dependente de σ^{70} . Os resultados obtidos mostraram que a expressão máxima desse operon ocorre sob condições limitantes de amônio e é dependente de NtrC. Em condições de alta concentração de amônio o promotor dependente de σ^{54} fica inativado, e níveis basais desses genes são transcritos a partir do promotor dependente de σ^{70} (Persuhn et al., 2000).

A análise fisiológica de mutantes nos genes *ntrC* e *ntrB* de *H. seropedicae* sugere que o sistema Ntr esteja envolvido na regulação da expressão de *glnA*, no controle da atividade da glutamina sintetase e na regulação da fixação de nitrogênio (Persuhn et al., 2000).

Dois genes similares ao gene *glnB* (Benelli et al., 1997; Noindorf, 2002) foram identificados em *H. seropedicae*. O produto do gene *glnB* é a proteína PII que aparentemente controla a atividade de NifA ligando-se a ela. O outro é o gene *glnK*, que é co-transcrito com o gene *amtB* que codifica para um transportador de nitrogênio. Sua expressão é regulada por níveis de nitrogênio intracelulares e dependente de NtrC (Noindorf, 2002).

1.4. Sistema Ntr

Em bactérias entéricas, o sistema Ntr está envolvido na expressão de proteínas relacionadas ao catabolismo e à assimilação de nitrogênio e engloba, além dos produtos dos genes *ntrB* e *ntrC*, os produtos dos genes *glnA* (glutamina sintetase ou GS), *glnB* (proteína PII ou GlnB), *glnK*, *glnD* (uridilil transferase/Utase enzima removedora de uridilil/UR) e *glnE* (adenilil transferase e removedora de adenilil/ ATase) (Merrick, 1992).

Neste sistema o produto do gene *ntrB* (NtrB) controla a atividade do produto do gene *ntrC* (NtrC) que funciona como um ativador de transcrição, através de reações de fosforilação/desfosforilação de um resíduo conservado de aspartato presente em NtrC. A proteína NtrC é um ativador de transcrição dos promotores dependentes de σ^{54} e pode, eventualmente, funcionar como um repressor dos promotores dependentes de σ^{70} (MacFarlane e Merrick, 1987).

Em bactérias entéricas, a proteína NtrB apresenta atividade de histidina quinase e de fosfatase dependendo do nível de nitrogênio celular. Estas atividades são controladas pelo produto de gene *glnB*, a proteína PII. Em condições de nitrogênio limitante, a proteína PII é uridililada (PII-UMP) pelo produto do gene *glnD* (Son e Rhee, 1987) e nesta forma não é capaz de interagir com NtrB. NtrB na forma livre catalisa a fosforilação de NtrC (NtrC-P), que irá ativar promotores dependentes de NtrC.

A enzima glutamina sintetase (GS), produto do gene *glnA*, converte glutamato e amônio em glutamina (Merrick e Edwards, 1995). A regulação da atividade enzimática da GS é dependente de adenililação e envolve duas

enzimas bifuncionais, GlnD (uridilil transferase/UTase e enzima removedora de adenilil/UR) e GlnE (adenilil transferase, ATase). Quando o nível de nitrogênio fixado é baixo, UTase (enzima sensora) converte PII em PII-UMP por ligação covalente de UMP (proveniente de UTP), no resíduo de tirosina na posição 51 (Son e Rhee, 1987). PII-UMP interage com a ATase, estimulando sua atividade de desadenilação da proteína GS. Nessa situação, GS apresenta-se ativa. Em condições de excesso de nitrogênio fixado, a atividade de remoção do grupo uridilil da enzima GlnD é estimulada, e PII-UMP é convertida em PII. A proteína PII interage com a ATase, estimulando a atividade de adenililação que converte a GS numa forma inativa, consequência da ligação de um grupo adenilil a cada subunidade da GS (Jaggi et al., 1997).

1.5. Sistemas reguladores de dois componentes

A importância da sinalização metabólica e, conseqüente resposta a essa sinalização, é decorrente do fato dos organismos estarem sujeitos a grandes variações ambientais, como disponibilidade de nutrientes, osmolaridade, pH e temperatura, aos quais eles devem se adaptar (Parkinson, 1993; Stock, Ninfa e Stock, 1989).

Para uma precisa regulação metabólica a essas variações, muitos organismos desenvolveram um sistema de sinalização e transdução de sinal extra ou intracelulares que possui dois componentes: uma proteína sensora e uma proteína reguladora. A proteína sensora tem a função de quinase/fosfatase que, através de fosforilação/desfosforilação, sinaliza ao seu par que irá atuar como proteína reguladora ativadora ou repressora de transcrição (West e Stock, 2001).

A reação básica da transdução de sinal envolvendo uma proteína sensora e uma proteína reguladora ocorre em três etapas: primeiro ocorre uma autofosforilação, com transferência do grupo gama-fosfato do ATP para a cadeia lateral do resíduo de histidina da proteína sensora. O segundo passo é a transferência do grupo fosfato, que estava ligado à histidina para um resíduo

aspartato da proteína reguladora. Finalmente, o grupo fosfato é transferido do fosfoaspartato para a água (hidrólise). A proteína sensora faz parte da família das histidinas quinases, e é geralmente regulada em resposta a mudanças ambientais. A proteína reguladora faz parte de uma família de proteínas reguladoras de resposta e, quando fosforilada, sofre uma mudança conformacional que leva à resposta (West e Stock, 2001).

Um exemplo de um sistema de dois componentes, é o sistema *ntrBC* onde NtrB é a proteína sensora e NtrC é a reguladora (Nixon, Ronson e Ausubel, 1986). NtrB apresenta duas atividades: de proteína quinase, fosforilando a proteína reguladora NtrC ou de proteína fosfatase, retirando esse grupamento fosfato. As duas atividades ocorrem como resposta às alterações do meio. NtrC quando fosforilada atua como ativadora de promotores dependentes de NtrC.

NtrB possui duas regiões funcionais. A região N-terminal é pouco conservada em bactérias entéricas e acredita-se estar envolvida na atividade quinase/fosfatase (Atkinson e Ninfa, 1993). Esta região contém um domínio PAS que é provavelmente a região sensora da proteína. A região C-terminal apresenta várias regiões distintas. Uma região com o domínio His KA (histidina quinase A), que possui a função de recepção e transferência do grupo fosfato, sendo o resíduo de histidina o alvo da autofosforilação de NtrB (Ninfa e Bennett, 1991). Outro domínio importante na região C-terminal é o domínio ATPase C, que faz ligação ao ATP e pode estar envolvida na ligação a nucleotídeos (Atkinson e Ninfa, 1993).

A proteína NtrC é ativadora de transcrição cuja atividade é dependente de fosforilação (Merrick, 1993). Em diversos organismos estudados, a região N-terminal de NtrC apresenta-se bastante conservada, sendo que ocorre fosforilação de um resíduo de aspartato na posição 54 (Sanders et al., 1992; Klose, Weiss e Kustu, 1993). A fosforilação leva a um rearranjo conformacional aumentando a afinidade de NtrC ao DNA, permitindo que haja ligação ao seu sítio alvo.

O domínio central de NtrC possui dois sítios para a ligação de ATP (Drummond, Whitty e Wooton, 1986). A fosforilação que ocorre no resíduo aspartato da região N-terminal causa uma mudança estrutural em NtrC estimulando sua atividade de ativadora de transcrição. A região C-terminal possui uma estrutura hélice-volta-hélice e está relacionada ao reconhecimento e ligação de NtrC ao DNA.

1.6. Operon *ntrYX*

O operon *ntrYX* foi inicialmente descrito por Pawlowski, Klosse e Bruijn (1991) em *Azorhizobium caulinodans*, como sendo um sistema de dois componentes, onde NtrY é uma proteína quinase sensora e NtrX é uma proteína ativadora de transcrição.

Em *A. caulinodans* os níveis de amônio são detectados pelo sistema NtrY-NtrX, cuja expressão está parcialmente sob o controle do NtrC (Pawloski, Klosse e Bruijn, 1991). NtrY é uma proteína sensora transmembrana que fosforila ou desfosforila a proteína NtrX dependendo dos níveis de amônio extracelular (Pawloski, Klosse e Bruijn, 1991). *A. brasilense* também apresenta esse sistema de dois componentes (Ishida et al., 2002). A proteína NtrX é similar a NtrC e parece receber o grupamento fosforil da proteína NtrY, similar a NtrB, num sistema semelhante ao das proteínas NtrC/NtrB.

Em *H. seropedicae*, as proteínas NtrB e NtrC parecem estar diretamente envolvidas na regulação da fixação de nitrogênio, pois mutantes para esses genes não são capazes de fixar nitrogênio (Persuhn et al, 2000). Entretanto, após um longo período de crescimento em meio semi-sólido desses mutantes (72 horas) observou-se uma atividade basal da nitrogenase (Persuhn et al, 2000). Foi sugerida a existência de outro par de genes similares em função aos genes *ntrBC*, e que estes poderiam estar permitindo indiretamente a atividade da nitrogenase. Os genes *ntrYX* foram identificados durante o seqüenciamento do genoma de *H. seropedicae* (Programa GENOPAR) e o seu

estudo deverá contribuir para o entendimento do metabolismo nitrogenado em *H. seropedicae*.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é a caracterização dos genes *ntrYX* de *Herbaspirillum seropedicae*. Apresenta como objetivos específicos:

- Comparação das seqüências dos genes *ntrYX* e de seus respectivos produtos NtrY e NtrX com genes similares de outros organismos para identificação de regiões conservadas ou motivos de função conhecida.
- Mutagênese dos genes *ntrY* e *ntrX* de *H. seropedicae* por inserção de transposon que confere resistência ao antibiótico tetraciclina.
- Obtenção de mutantes para os genes *ntrY* em *H. seropedicae*.
- Análise fisiológica dos mutantes *ntrY* de *H. seropedicae* quanto ao crescimento em nitrato.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos e plasmídeos

As estirpes de bactérias e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela abaixo.

Estirpes	Genótipo e/ou fenótipo	Referência
<i>E. coli</i>		
DH10B	$\phi 80d/lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 \Delta(ara, leu)7697 galU galK \lambda^- rpsL nupG$	Grant et al., 1990
XL1-Blue	$recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lac^{\rho}Z\Delta M15 Tn10 (Tc^R)]$	Bullock e Fernandes 1987
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
SMR1	Nif ⁺ , Sm ^R	Pedrosa et al., 1997
Y01	NtrY ⁻ , Sm ^R , Tc ^R	Este trabalho
Y02	NtrY ⁻ , Sm ^R , Tc ^R	Este trabalho
Plasmídeos		
pUC18	$lacZ, lacI, Amp^R$	Sambrook, Fritsch e Maniatis 1989
pLYSTY4C	Amp ^R , Tc ^R , fragmento do genoma de <i>H. seropedicae</i> contendo os genes <i>ntrYX</i> com inserção do transposon que confere resistência a tetraciclina no gene <i>ntrY</i>	Este Trabalho
pLYSTX4E	Amp ^R , Tc ^R , fragmento do genoma de <i>H. seropedicae</i> contendo os genes <i>ntrYX</i> com inserção do transposon que confere resistência a tetraciclina no gene <i>ntrX</i>	Este trabalho
p17003C02	Amp ^R , clone da biblioteca aleatória de DNA de <i>H. seropedicae</i> clonado em pUC18 contendo os genes <i>ntrY</i> e <i>ntrX</i> .	GENOPAR

3.2. Condições e meios de cultivo das bactérias

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido Luria-Bertani Broth (LB) ou Terrific Broth (TB) à 37°C sob agitação (200 rpm) (Sambrook,

Fritsch e Maniatis, 1989). Para cultivo em meio sólido foi utilizado o meio Luria-Bertani Agar (LA) (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989). Ao meio foram adicionados antibióticos, de acordo com a resistência da estirpe ou do vetor que contenham.

O meio Luria-Bertani Broth (LB) possui a seguinte composição:

Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L

O pH foi corrigido para 7,0 com NaOH 1 mol/L. O meio LA sólido foi preparado pela adição de 15 g/L de ágar ao meio líquido antes da autoclavação.

O meio Terrific Broth possui os seguintes componentes:

Bacto-triptona	12 g/L
Extrato de levedura	24 g/L
Glicerol	4 mL/L

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas à 30°C, sob agitação a 130 rpm, durante 16 horas em meio NFbHP (Klassen et al., 1997), utilizando malato como fonte de carbono, na presença dos respectivos antibióticos. O meio NFbHP possui a seguinte composição:

MgSO ₄ .7H ₂ O	2 x 10 ⁻¹ g/L
NaCl	1 x 10 ⁻¹ g/L
CaCl ₂	2 x 10 ⁻² g/L
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 ⁻² g/L
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2 x 10 ⁻² g/L
Malato de sódio	5 g/L
Biotina	1 x 10 ⁻⁴ g/L
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	2 x 10 ⁻³ g/L
MnSO ₄ . H ₂ O	2,35 x 10 ⁻³ g/L
H ₃ BO ₃	2,8 x 10 ⁻³ g/L
CuSO ₄ .5 H ₂ O	8 x 10 ⁻⁵ g/L



No momento do uso foi adicionado ao meio NFbHP 50 mL/L de solução estéril de fosfatos (159,4 g/L de KH_2PO_4 e 17,8 g/L de K_2HPO_4) e 20 mL/L de cloreto de amônio 1mol/L ou 5mL/L de glutamato de sódio 1 mol/L também estéreis, conforme as concentrações dos experimentos. Os meios NFbHP sólido e semi-sólido foram preparados pela adição ao meio líquido de 15 e 1,75 g/L de ágar, respectivamente.

3.3. Antibióticos

Os antibióticos usados foram: tetraciclina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ampicilina 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para *E.coli*. Em *H. seropedicae* foi utilizado estreptomicina 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e tetraciclina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A solução de tetraciclina foi preparada em 70% de etanol. As soluções estoque de estreptomicina e ampicilina foram preparadas em água destilada e esterilizadas em filtro millipore de 0,22 μm . Todas as soluções foram mantidas a -20°C .

3.4. Manipulação de DNA

3.4.1. Purificação de DNA plasmidial

A extração de plasmídeos a partir de estipes de *E. coli* foi realizada segundo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Alíquotas de 1,5 mL da cultura crescidas durante a noite foram centrifugadas a 13000 rpm por 1 minuto. As células foram ressuspensas em 150 μL de tampão GET (50 mmol/L D-glucose, 25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 10 mmol/L EDTA pH8,0) e lisadas com 150 μL de solução contendo NaOH 0,2 mol/L e SDS 1% sob agitação manual. A esta mistura foram adicionados 150 μL de Kacf (acetato de potássio 3 mol/L, ácido fórmico 1,8 mol/L) e após agitação foi incubada em banho de gelo por 5 minutos. O material foi extraído com 100 μL de uma mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13000 rpm.

A fase aquosa resultante foi coletada e o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto. Depois de 20 minutos de repouso em temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70% e seco à vácuo e dissolvido em 20 μ L de água.

3.4.2. Purificação de DNA genômico de *H. seropedicae*

Células de 1,5 mL de cultura de *H. seropedicae*, crescida em meio NFbHP foram coletadas por centrifugação a 13000 rpm por 1 minuto. As células foram ressuspensas em 200 μ L de tampão GET (50 mmol/L D-glucose, 25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 10 mmol/L EDTA pH8,0) e lisadas pelo tratamento com SDS 1 % a 55°C por 30 minutos. Em seguida, o material foi incubado com pronase E 20 μ g/mL a 37°C por 24 horas. Após esse período o material foi extraído com um volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico homogeneizando lentamente e centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos. O DNA genômico presente na fase aquosa foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol 96%, lavado com etanol 80%, seco e ressuspensado em 200 μ L de água miliQ estéril.

3.4.3. Sequenciamento de DNA plasmidial

O seqüenciamento de DNA foi realizado utilizando método de incorporação de dideoxynucleotídeos baseado no protocolo de Sanger, Nicklen e Coulson (1977). Foram utilizados dideoxynucleotídeos fluorescentes, separação em eletroforese e detecção do fluoróforo após excitação com laser em sequenciador automático ABI-PRISM 377 da Applied Biosystems. O sistema de reação foi constituído de aproximadamente 350 ng de DNA de fita dupla, 5 pmol de iniciador, 3 μ L de ET terminador mix (Amersham Biosciences) e água Milli-Q suficiente para 10 μ L. O sistema foi amplificado em termociclador Eppendorf seguindo a programação de um único ciclo de 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de

94°C por 20 segundos e 60°C por 1 minuto e trinta segundos. A seguir o produto das reações foi transferido para um novo tubo contendo 2/3 de volume de acetato de amônio (7,5 mol/L) e 2,5 volumes de etanol 96%. Após precipitação, o DNA foi coletado por centrifugação, lavado duas vezes com etanol 80% e seco à vácuo. O DNA foi ressuspenso em 3 µL de formamida, desnaturado a 95°C por 2 min e aplicado no gel do sequenciador automático.

3.5 Alinhamento e análise das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos

Os perfis cromatográficos das seqüências de DNA do clone 17003C02, dos plasmídeos pLYSTY4C e pLYSTX4E e as seqüências de DNA cedidas pelo programa GENOPAR obtidas foram analisadas para avaliar as seqüências de nucleotídeos.

A tradução de seqüências codificadoras de proteínas (ORF) foi feita pelo programa Strider. O alinhamento com proteínas similares e identificação de regiões consensuais foram determinadas pelo programa ClustalW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>).

As análises de similaridade e identidade entre as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos obtidas e as seqüências depositadas no GenBank foram realizadas através do programa BLAST (Altschul et al, 1997). A caracterização de domínios estruturais presente nas proteínas identificadas foi feita pelo programa SMART – Simple Modular Architecture Research Tool (<http://smart.embl-heidenberg.de/>) (Schultz et al, 1998) e InterProScan (<http://srs.ebi.ac.uk>). Para determinação do pI e da massa molecular teórica foi utilizado o programa ProtParam (www.expasy.org).

3.6. Transformação bacteriana por eletroporação

3.6.1. Preparo de células eletrocompetentes

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em 100 mL de meio LB até $DO_{600nm} \sim 0,8$. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos a 5°C. As células foram lavadas duas vezes com 30 mL de água miliQ estéril gelada e 1 vez com 10 mL de solução de glicerol 15% estéril gelada. O sedimento foi ressuspendido em 500 μ L de glicerol 15% e alíquotas das células (20 μ L) foram distribuídas em tubos plásticos de 1,5 mL e mantidos a -70°C .

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas por 16 horas em 100 mL NFbHP contendo NH_4Cl 20 mmol/L e 5 mg/L de solução de fosfatos. O processamento das células foi igual ao preparo de célula competente de *E. coli*.

3.6.2 Transformação por eletroporação

Alíquotas de 20 μ L de células eletrocompetentes foram descongeladas em banho de gelo e misturadas a alíquotas do DNA a ser eletroporado. A mistura foi transferida para a cubeta de eletroporação (BRL) previamente resfriada e colocada na câmara de eletroporação e submetida a um rápido choque elétrico de 12 a 16 kV/cm para *E. coli* e 8 a 10 kV/cm para *H. seropedicae*. As células de *E. coli* foram recuperadas em 1 mL de meio LB ou TB e incubadas sob agitação (200 rpm) por 1 hora à 37°C . As células de *H. seropedicae* foram incubadas por 3 a 6 horas a 30°C sob agitação a 130 rpm em meio NFbHPN contendo 1% do volume de meio LB. Ambas as culturas, após recuperação, foram plaqueadas em seus respectivos meios de cultura e antibióticos para isolamento dos transformantes.

3.7. Obtenção de mutantes *ntYX* de *H. seropedicae*

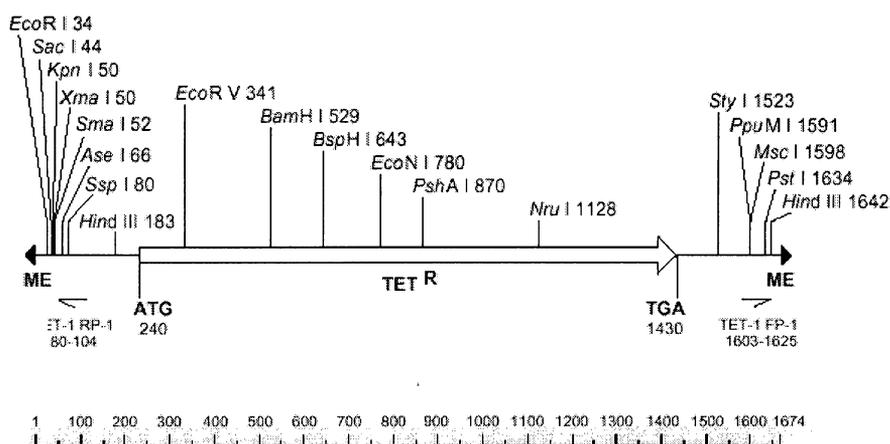
A estirpe mutante de *H. seropedicae* foi obtida por inativação dos genes *ntY* e *ntX* através de inserção do transposon contendo resistência a tetraciclina (Tc).

3.7.1. Mutagênese aleatória dos genes *nrX* e *nrY*

Para mutagenizar os genes *nrYX* foi utilizado o transposon contendo o gene para resistência ao antibiótico tetraciclina. Os genes *nrYX* foram identificados pelo Programa GENOPAR, que tem como objetivo o seqüenciamento completo do genoma de *H. seropedicae*. Os plasmídeos 05061H07, 03001G02, 04001A03, 17003C02 e 03188D09 cujos insertos contém os genes *nrY* e/ou *nrX* foram isolados e o clone 17003C02 foi selecionado e utilizado para a inserção do transposon.

Para inserção do transposon, a reação foi feita com o “kit” EZ::TN™ <TET-1> Epicentre (Figura 1) conforme a recomendação do fabricante (Epicentre). O ensaio foi realizado *in vitro* onde o plasmídeo p17003C02 (0,2 µg) foi misturado em uma solução contendo o tampão de reação EZ::TN em uma concentração final de 1x, o transposon (1 U) que confere resistência ao antibiótico tetraciclina e a enzima transposase (0,1 pmol) que realiza a inserção do transposon no DNA alvo. O sistema foi incubado por 2 horas a 37°C O local da inserção foi localizado por análises de restrição e seqüenciamento de DNA.

Figura 1 – Esquema do transposon EZ:: TN™ <TET-1>, com os sítios de restrição e a localização dos iniciadores.



Notas: Mapa do transposon que confere resistência ao antibiótico tetraciclina, utilizado para mutagênese dos genes *nrY* e *nrX*. O transposon possui 1674 pares de base como mostrado na base da figura. O mapa apresenta os sítios de restrição que o transposon apresenta e a posição em que ocorre a clivagem, os iniciadores TET-1 RP-1 e TET-1 FP-1 e suas orientações, os códons de início ATG na base 240 e fim de tradução TGA na base 1430 do

gene que confere resistência a tetraciclina. O mapa foi obtido no endereço eletrônico da EPICENTRE (<http://www.epicentre.com/pdftechlit/135pl023.pdf>).

3.8. Obtenção de mutantes *ntrY* de *H. seropedicae*

Os plasmídeos mutagenizados com o transposon de tetraciclina foram eletroporados em *H. seropedicae* estirpe SMR1. As estirpes foram selecionadas em meio NFbHPN sólido contendo 80 µg/mL de estreptomicina e 10 µg/mL de tetraciclina. As estirpes selecionadas tiveram seu DNA genômico extraído e tratado com endonucleases gerando padrões de restrição. A mutagênese foi confirmada através de ensaios de hibridização do DNA com sonda contendo os genes *ntrYX*.

3.8.1. Transferência de DNA do gel de agarose para membrana de nylon e Hibridização do DNA com sonda específica

Após eletroforese em gel de agarose 0,8%, os fragmentos de DNA foram transferidos para a membrana de nylon seguindo o método de transferência por capilaridade ascendente descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

A membrana de nylon contendo os fragmentos de DNA fixados por exposição a radiação ultra-violeta por 4 minutos, foi colocada em tubo de vidro para hibridização contendo 10 mL de solução de pré-hibridização [SSC 5X (NaCl 0,75 mol/L, citrato trissódico 0,075 mol/L) e SDS 2%] e 200 µg/mL DNA de esperma de salmão sonicado e desnaturado e incubado em forno Hybaid a 65°C por 4 horas, sob agitação rotatória.

Após a pré-hibridização, o DNA-sonda, o plasmídeo pLYSTY4C digerido com *EcoRI*, marcado radioativamente por extensão com o nucleotídeo dCTP [³²P] foi desnaturado em banho-maria fervente por 5 minutos e rapidamente esfriado em banho de gelo. O DNA-sonda foi então adicionado à solução de pré-hibridização no tubo de vidro contendo a membrana e o sistema foi incubado por 18-24 horas a 65°C. Em seguida, a solução de hibridização foi

estocada e a membrana de nylon foi lavada duas vezes com 40 a 60 mL de solução contendo SSC 0,1x e SDS 0,1%, 60°C por 15 minutos. A membrana foi seca e exposta à placa de amplificação Storm (Amersham-Biosciences) para detecção dos fragmentos de DNA que hibridizaram com a sonda. (Os experimentos de hibridização foram realizados pela professora Roseli Wassem).

3.9 Análise fisiológica dos mutantes quanto ao crescimento em nitrato

Os mutantes de *H. seropedicae* para o gene *ntrY* foram crescidos em meio NFbHP sólido e líquido contendo 10 mmol/L de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. O controle foi feito com 20 mmol/L de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio. Para o ensaio em meio líquido as culturas foram crescidas em meio NFbHP líquido com 5 mmol/L de cloreto de amônio até uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,7. Foram coletados 200 μ L das culturas e transferidos para frascos contendo meio NFbHP líquido com 10 mmol/L de nitrato de sódio, e para os frascos controle contendo meio NFbHP líquido com 20 mmol/L de cloreto de amônio. As culturas tiveram a densidade óptica a 600 nm monitorada a cada duas horas, durante 10 horas, e esses dados foram usados para obter uma curva de crescimento. O ensaio em meio líquido foi realizado a partir de uma cultura em que a densidade óptica foi analisada em duplicata.

Para o ensaio em meio sólido foram crescidas culturas em meio NFbHP líquido com 5 mmol/L de cloreto de amônio até uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,7. As culturas foram então riscadas em placas de meio NFbHP sólido contendo nitrato de sódio (10 mmol/L) e placas de meio NFbHP sólido contendo cloreto de amônio (20 mmol/L) como fonte de nitrogênio. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

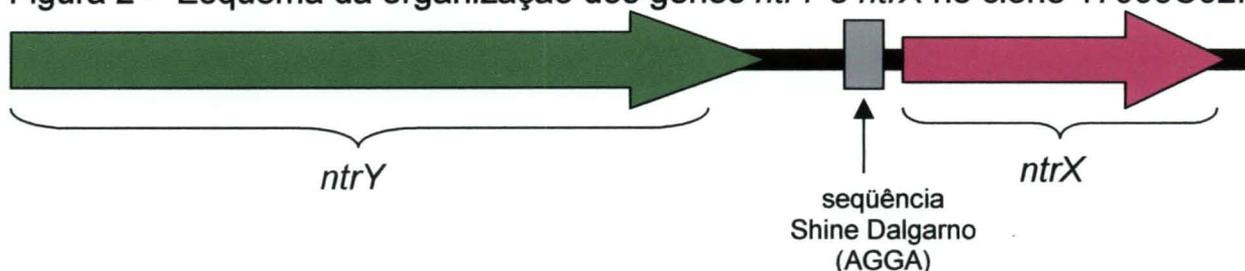
Em pesquisa ao banco de dados do programa GENOPAR, foi possível identificar clones da biblioteca genômica no vetor pUC18 que continham os genes *ntrY* e *ntrX*. Esses clones foram identificados através do programa BlastX, que realiza a comparação entre as seqüências de DNA (traduzidas pelo programa em seqüências de aminoácidos nas seis fases de leitura) dos clones depositadas no banco de dados do programa GENOPAR, com as seqüências de aminoácidos das proteínas depositadas no banco de dados GenBank para identificação dos genes que esses clones possam conter. Foram identificados os clones 05061H07, 03001G02, 04001A03, 17003C02 e 03188D09. Para a realização dos experimentos, o clone 17003C02 foi cedido para este projeto pelo programa GENOPAR por possuir um inserto de DNA de 3,2 kb aproximadamente contendo os genes *ntrY* e *ntrX* contíguos.

4.1 Isolamento e seqüenciamento do clone 17003C02

O plasmídeo p17003C02 foi purificado e seqüenciado para confirmação de sua identidade (Figuras 2 e 3). A submissão da seqüência obtida ao programa BlastX mostrou alta homologia com genes que codificam para as proteínas NtrY e NtrX de diversos organismos. A região de aproximadamente 1 kb do clone seqüenciada utilizando-se o iniciador universal (M13) apresentou similaridade com a proteína NtrY de *Bordetella pertussis* (42%), *Burkholderia fungorum* (40%), *Ralstonia solanacearum* (37%), *Neisseria meningitidis* (30%) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (24%). A região seqüenciada com o iniciador reverso (T7) apresentou similaridade com a proteína NtrX de *Burkholderia fungorum* (57%), *Ralstonia metallidurans* (54%), *Bordetella parapertussis* (48%), *Chromobacterium violaceum* (70%) e *Neisseria meningitidis* (70%). A partir da análise da seqüência completa do clone, cedida gentilmente pelo programa GENOPAR, foi possível determinar que o clone 17003C02 (Figuras 2 e 3) possui 3160 pares de base, sendo que o gene *ntrY* está incompleto. Contíguo ao gene

ntrY tem-se uma região intergênica e o gene *ntrX*, onde não foi encontrada nenhuma provável região promotora ou terminadora, indicando que esses genes possam constituir um operon. Uma seqüência de Shine-Dalgarno (AGGA) que corresponde ao sítio de ligação de ribossomo foi determinada a 9 pares de base do início do gene *ntrX*, que possui 750 pares de base e está completo nesse clone.

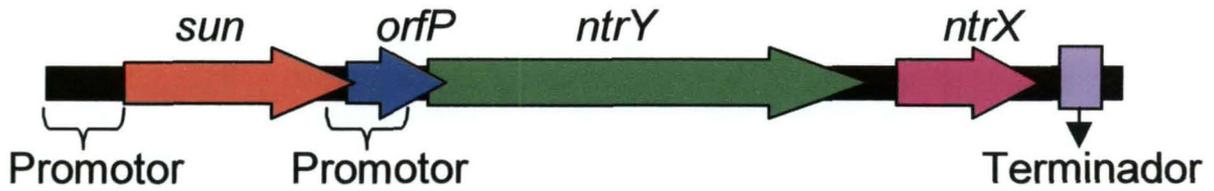
Figura 2 - Esquema da organização dos genes *ntrY* e *ntrX* no clone 17003C02.



Notas: A região em verde corresponde ao gene *ntrY*, a região em preto corresponde à região intergênica, seguida da seqüência de ligação do ribossomo em cinza e a região em rosa corresponde ao gene *ntrX*.

dos genes próximos a *ntrY* e *ntrX* (Figura 4). A montante ao gene *ntrY* foram localizados os genes *sun* e *orfP* (Figura 5). Foi observado sobreposição entre os genes *sun*, *orfP* e *ntrY*. O gene *sun* codifica para uma possível RNA metil transferase, enquanto a *orfP* codifica para um peptídeo rico em prolina. A montante ao gene *sun* foram encontradas duas prováveis regiões promotoras, uma dependente do fator σ^{70} (**TTACGACATCCTCTGGGGCGTCTGATAT**) e outra do tipo σ^{54} (**CCGGCGAAGCCATCGCC**) e uma região de ligação de ribossomo (GACAG) a 9 pares de base do início do gene *sun* (Figura 5). Dentro da região codificadora da *orfP*, a montante ao gene *ntrY*, foram encontrados 2 prováveis promotores dependentes do fator σ^{54} (**CTGGTTCGACGAAAGCA** a -305 pb do início de tradução do gene *ntrY* e **CTGGCGCTGGCCTGGCA** a -435 pb do início de tradução do gene *ntrY*) e quatro regiões prováveis de ligação para NtrC (**GCAATGAATTTGACGCA** a -544 pb do início de tradução do gene *ntrY*, **GCAAAGCCCTCGGCC** a -581 pb do início de tradução do gene *ntrY*, **CCAAAACCTGGTGCA** a -610 pb do início de tradução do gene *ntrY* e **CGACCATGATGGTCTG** a -624 pb do início de tradução do gene *ntrY*). O gene *sun* possui 1428 pares de base sendo que região terminal desse gene se sobrepõe com o início da *orfP* que possui 651 pares de base. A região terminal da *orfP* também se sobrepõe ao início do gene *ntrY*. O gene *ntrY* possui 2283 pares de base e contíguo a ele se localiza o gene *ntrX* que possui 750 pares de base. A montante ao gene *ntrX* ocorre uma região de ligação de ribossomo (AGGA a -9 pares de base do início de tradução do gene *ntrX*) e a jusante a esse gene ocorre um terminador independente de rho (**CAAAAACAAACGGGACCTTCACGGTCCCGTTTGT TTTTG**) (Figura 5).

Figura 4 – Esquema da análise da região contendo os genes *ntrY* e *ntrX* através do programa Frameplot mostrando as prováveis ORF's contidas nessa região.



Notas: As regiões a montante e a jusante aos genes *ntrY* (verde) e *ntrX* (rosa) foram analisadas e os genes *sun* (vermelho) e *orfP* (azul) foram identificados a montante ao gene *ntrY* e encontram-se parcialmente sobrepostos. Entre os genes *ntrY* e *ntrX* existe uma região intergênica e a jusante ao gene *ntrX* ocorre um terminador independente de Rho.

Figura 5 -Seqüência de DNA e de aminoácidos dos genes *sun*, *orfP*, *ntrY* e *ntrX*.

1 GTG ATG TAT GAA TCG CAC GCC AAA CCC ATC CTG GAC CTG TTG CAC AAG GAC CCC GCG CGC 60
 σ^{54}

61 GGG GTG ATC ACC GCT GCC GAA GCC GGC GAA GCC ATC GCC GCG CTG GAA CAG CAG ATC AAC 120

121 GCC AGC AAG GCC CAC GAA GCC GCC GAA GCC CTG GCC CGT GAT GTC AAT GCC CAC CAC AAC 180

181 GCC GAC GTG GAC GAC CAC AAC CAC GAA AAG ATC GAG GCC GTC AGC TTC TCG GCG CGC GCC 240
 σ^{70}

241 TAT CCG CTG CTG GAC ATG CTG CGC GAA GCC AAG AAG GGC GGT TAC GAC ATC CTC TGG GGC 300
 σ^{70}

301 GTC TGA TAT CGC CGC CAA GGC CAT CCC CGC ATC ACG CAT CAC CTG AAA CGG CTG TCG CGA 360

361 TCA TCC ACC GCG ACA GCC GTT TTT CCT GGG CGC GCT CCC CGG ACG GGC TGT TAC ACT GAC 420
 A R A C G H R S F P S E T P P A P P L E

421 GGC CCG CGC CTG TGG CCA CAG AAG TTT CCC CAG CGA AAC GCC GCC CGC GCC CCC TCT TGA 480
 Q A N D V I Q I S L L P P G A K A D S L

481 GCA AGC AAA CGA CGT GAT CCA GAT TTC CCT TCT TCC TCC CGG CGC CAA GGC CGA TTC CCT 540
 A Y Q L A Y A A Q A V A A V R A G H A L

541 GGC CTA CCA GTT GGC CTA CGC CGC CCA GGC GGT GGC CGC CGT GCG GGC CGG CCA CGC GCT 600
 P Q A L A Q I F S R S D A P A P A R G A

601 GCC GCA GGC GCT GGC GCA GAT CTT CAG CCG CAG CGA TGC GCC AGC GCC GGC GCG CGG CGC 660
 I Q D L S Y R A M R S L G L T E S L L G

661 CAT CCA GGA TCT CAG CTA CCG CGC CAT GCG CAG CCT GGG CCT GAC CGA GAG CCT ACT GGG 720
 L L A N K P P Q P E V L H G L L V T A L

721 CCT GCT GGC CAA CAA GCC GCC CCA GCC GGA GGT GCT GCA TGG GCT GCT GGT GAC GGC GCT 780
 A L L V N E E E S G Y D S F T V V D Q A

781 GGC GCT GCT GGT CAA CGA AGA AGA GTC CGG CTA CGA CAG CTT CAC CGT GGT GGA CCA GGC 840
 V Q A A A I S P E M S F A K G V V N A I

841 CGT GCA GGC CGC CGC CAT CAG CCC CGA GAT GAG TTT CGC CAA GGC GGT GGT CAA TGC CAT 900
 L R R L L R E R A T L M P Q A T K T P P

901 CCT GCG CCG CTT GCT GCG CGA ACG CGC CAC CCT GAT GCC GCA GGC GAC CAA GAC CCC GCC 960
 G T W N Y P T W W I D R L K A A Y P E Q

961 CGG CAC CTG GAA CTA CCC GAC CTG GTG GAT CGA CCG CCT CAA GGC GGC CTA TCC CGA ACA 1020
 W Q A I L H A G N Q A P P L T L R V N R

1021 ATG GCA AGC CAT CCT GCA CGC CGG CAA CCA GGC CCC GCC GCT GAC CCT GCG GGT GAA TCG 1080
 R R T T V A Q Y L D T L Q Q A G M A A R

1081 CCG TCG CAC CAC GGT GGC GCA ATA CCT CGA CAC CCT GCA ACA GGC TGG CAT GGC CGC GCG 1140
 Q V G P A A V R L H R P V P V Q Q L P G

1141 CCA GGT CGG CCC GGC GGT GCG GCT GCA CCG GCC GGT GCC GGT GCA GCA GCT TCC CGG 1200
 F A E G V V S V Q D A A A Q L A A P L L

1201 TTT TGC CGA AGG CGT GGT GTC GGT GCA GGA CGC CGC CGC CCA GCT GGC CGC GCC GCT GCT 1260
 D V A D G M R V L D A C A A P G G K T G
 1261 GGA CGT GGC CGA TGG CAT GCG GGT GCT GGA CGC CTG CGC CGC CCC GGG CGG CAA GAC CGG 1320
 H L L E L A D L D L Q A L D H D T R R L
 1321 CCA TCT GCT GGA ACT GGC CGA TCT CGA CCT GCA AGC CCT GGA CCA CGA CAC CCG CCG CCT 1380
 Q R I A E N L D R L Q L K A R L T T G D
 1381 GCA ACG CAT CGC CGA GAA CCT TGA TCG GCT CCA GCT CAA GGC CCG CCT GAC CAC CGG CGA 1440
 A R A D D W W D G Q P F D R I L A D V P
 1441 CGC CCG CGC CGA CGA CTG GTG GGA TGG CCA GCC CTT CGA TCG CAT CCT GGC CGA CGT GCC 1500
 C T A S G I V R R H P D I R W L R R K T
 1501 CTG CAC CGC CTC GGG CAT CGT GCG CCG CCA CCC GGA TAT CCG CTG GCT GCG CCG CAA GAC 1560
 D T A Q L A T L S T Q I L D K L W Q M L
 1561 CGA CAC CGC GCA GCT TGC AAC ACT TTC CAC GCA AAT TCT GGA CAA GCT TTG GCA GAT GCT 1620
 R P D G K L L L V T C S L W P Q E S E Q
 1621 GCG ACC CGA TGG TAA ATT GCT GCT GGT AAC CTG CTC GCT GTG GCC CCA GGA ATC GGA GCA 1680
 Q A V A F A Q K H N A I R L P A P G Q L
 1681 GCA GGC AGT CGC CTT CGC GCA GAA GCA CAA CGC CAT CCG GTT GCC CGC ACC CGG CCA ACT 1740
 L P T A S E T A D H D G L F Y A L F Q K
 1741 CCT GCC CAC CGC CAG CGA GAC GGC **CGA CCA TGA TGG TCT GTT CTA TGC GCT GTT **CCA AAA**** 1800
 P G A *
 M N L T Q S D F A P S H R Q S P R
 1801 **ACG TGG TGC ATG AAT TTG ACG CAA** TCG GAC TTC GCC CCT TCC CAC **CGG CAA AGC CCT CGG** 1860
 P L A A W G R P P S R L L A W L L P L L
 1861 **CCC** CTG GCG GCC TGG GGC CGC CCT CCA TCA CGG CTG CTG GCG TGG CTG CTG CCG CTG CTG 1920
 A L L L A L L L A L A W H P A R A A E I
 1921 GCG CTG CTG CTG GCG CTG CTG **CTG GCG CTG GCC TGG CAT** CCT GCC CGG GCT GCC GAA ATC 2040
 T V S Q A S I E H S D E G Y R L S V S Y
 2041 ACG GTC AGC CAG GCC AGC ATC GAG CAT AGC GAC GAG GGC TAC CGG CTC TCG GTC TCC TAT 2100
 D F D L N R G L E D A L S R G V P L Y F
 2101 GAC TTC GAT CTG AAC CGT GGC CTG GAA GAC GCC CTC TCG CGC GGG GTG CCG CTC TAT TTC 2160
 T T D V Q L T R R R W Y W F D E S S V S
 2161 ACC ACC GAC GTG CAG CTG ACC CGG CGC CGC TGG **TAC TGG TTC GAC GAA AGC AGC** GTC TCG 2220
 A T R G T V R L S Y N V L T R Q Y H T A I
 2221 GCC ACC CGC ACG GTG CGC CTG TCC YAT AAC GTG CTC ACG CGC CAG TAC CAT ACC GCC ATC 2280
 S G Q L Q Q S F T N L D D A L T L I R R
 2281 AGC GGC CAG CTG CAG CAG AGC TTC ACC AAC CTG GAC GAC GCC CTT ACG CTG ATC CGC CGT 2340
 P P R W L I A D N N T L K S G D N Y N V
 2341 CCG CCG CGC TGG CTC ATT GCC GAC AAC AAT ACC CTC AAG AGC GGC GAC AAC TAC AAC GTC 2400
 G L R M R L D V A Q L P K P F Q V N A L
 2401 GGC CTG CGC ATG CGG CTG GAC GTG GCG CAA CTG CCC AAG CCC TTC CAG GTC AAC GCG CTC 2460
 M S
 N N S D W R L S S D W I E F T Y K P E *
 2461 AAC AAC AGC GAC TGG CGG CTC TCC TCC GAC TGG ATC GAA TTC ACC TAC AAA CCC **GAA TGA** 2520
 R T L R Y L L V V G G V I S I L L F L
 2521 GCC GCA CCT TAC GCT ATC TGC TGG TGG TCG GCG GGG GCG TCA TCA GCA TCC TGC TGT TCC 2580
 L A S A S E N S A L F E Q H Y P W L L F
 2581 TGC TGG CCT CGG CCT CCG AAA ATT CCG CCC TCT TCG AGC AGC ACT ACC CCT GGC TGC TGT 2640
 L N G L A A I S L G L V L L L G R L
 2641 TCT TGA ATG GCC TGG CCG CCA TCT CGC TGC TGG GGC TGG TGC TGC TGC TGG TGC GGC 2700
 Y K R Y R R G K F G S R L L A R L V L M
 2701 TCT ACA AGC GCT ACC GCC GCG GCA AGT TCG GCT CGC GGC TGC TGG CGC GGC TGG TGC TCA 2760
 F A L V G I L P G A V I Y L M S V Q F V
 2761 TGT TTG CGC TGG TGG GAA TCC TGC CGG GAG CGG TGA TCT ACC TGA TGT CGG TGC AGT TCG 2820
 S R S I E S W F D V R M E A A L E S G L
 2821 TCT CCC GCT CCA TCG AGT GGT GGT TCG ACG TGC GCA TGG AGG CGG CGC TGG AAT CGG GCC 2880
 N L G R N A L D S S L S D L V S R A R G
 2881 TGA ACC TGG GCC GCA ACG CCC TCG ACT CCT CGC TCT CAG ACC TGG TCT CGC GGG CGC GCG 2940
 M A Q E L S D M S D S E Q V T Y L S R Q
 2941 GCA TGG CCC AGG AGC TCT CCG ACA TGA GCG ACT CCG AAC AGG TGA CCT ATC TGT CGC GCC 3000
 R D Q Q N M E I T I V N G S G Q V M S T V
 3001 AGC GCG ACC AGA ACA TGG AAA TCA CCA TCG TCA ACG GCA GCG GCC AGG TCA TGA GCA CGG 3060
 G G S I G S L T P I L P S T Q A M R Q A
 3061 TGG GCG GCT CCA TCG GCT CGC TCA CGC CCA TCC TGC CGA GCA CCC AGG CGA TGC GCC AGG 3120
 R V S R A F S A V E S D D S R P A S G Q
 3121 CAC GGG TCT CGC GCG CCT TCT CGG CGG TGG AAA GCG ATG ACA GCC GGC CGG CCA GCG GCC 3180
 S D S D G N L R L H V V V L V P A P S R
 3181 AGT CCG ACT CCG ACG GCA ACC TGC GCC TGC ATG TGG TGG TGC TGG TGC CGG CCC CCA GCC 3240
 A L A L Q G E T R Y L Q I L Q P V P D Y
 3241 GGG CGC TGG CGC TGC AAG GCG AGA CGC GCT ACC TGC AGA TCC TGC AAC CGG TGC CGG ACT 3300
 L A S N A E T L R L A Y N E Y Q Q R S V
 3301 ACC TGG CCA GCA ACG CCG AGA CCC TGC GCC TGG CCT ACA ACG AAT ACC AGC AAC GTT CGG 3360
 S R S G L R K I Y L V T L T L T L L L A

3361 TGT CGC GCT CGG GCC TGC GCA AGA TCT ACC TGG TCA CGC TGA CGC TCA CGC TGC TGC TGG 3420
 I F A A I A S A F L I A S D L A K P L L
 3421 CCA TCT TCG CGG CCA TCG CCA GCG CCT TCC TGA TCG CCA GCG ACC TGG CCA AGC CGC TGC 3480
 L L A E G T K A V A E G N L S P R P I V
 3481 TGC TGC TGG CCG AAG GGA CCA AGG CCG TGG CCG AAG GCA ATC TCT CGC CCC GGC CCA TCG 3540
 S T S D E L G T L T Q S F N I M T R Q L
 3541 TGA GCA CCT CCG ATG AAC TGG GCA CGC TGA CCC AGT CCT TCA ACA TCA TGA CGC GCC AGC 3600
 L E A R T S V E K N R A E L E N A K A Y
 3601 TGC TGG AGG CGC GCA CCT CGG TGG AAA AGA ACC GGG CCG AGC TGG AAA ACG CCA AGG CCT 3660
 L E S V L A N M S A G V M V L D G Q F N
 3661 ACC TGG AGT CCG TGC TGG CCA ATA TGT CAG CCG GGG TGA TGG TGC TGG ATG GCC AAT TCA 3720
 I L S A N D S V R R I L G H D F S A D I
 3721 ACA TCC TCA GCG CCA ACG ACT CGG TGC GCC GCA TCC TGG GCC ACG ACT TCT CGG CCG ATA 3780
 G T P L Q T I E A Q A P F A Q A V I R A
 3781 TCG GCA CGC CGC TGC AGA CCA TCG AGG CGC AGG CGC CGT TCG CCC AGG CGG TCA TCC GCG 3840
 F S E Q L A Q H S S D S T P D G L H W Q
 3841 CCT TCT CCG AAC AAC TGG CCC AGC ACA GCA ATT CCA CCC CGG ACG GGC TGC ACT GGC 3900
 R Q F E L S R Q P G A M L D S D D E Q G
 3901 AGC GCC AGT TCG AAC TCT CGC GCC AGC CCG GCG CGA TGC TCG ACA GCG ACG ACG AGC AAG 3960
 G K P D H D K L T L L A R G S H L P V E
 3961 GCG GCA AGC CTG ACC ACG ACA AGC TGA CCC TGC TGG CGC GCG GCT CGC ACC TGC CGG TGG 4020
 N G V G Y V V V F D I S N V I S A Q R
 4021 AAA ACG GCG TGG GCT ATG TGG TGT TCG ATG ACA TCA GCA ACG TCA TCT ACG CCC AGC 4080
 S I A W G E V A R R L A H E I K N P L T
 4081 GCT CCA TTG CCT GGG GCG AAG TGG CGC GCC GCC TGG CGC ACG AGA TCA AGA ACC CGC TCA 4140
 P I Q L S A E R L Q H R L S D K L M P A
 4200 CGC CCA TCC AGC TCT CGG CCG AAC GCC TGC AGC ATC GCC TGT CGG ACA AGC TCA TGC CGG 4260
 D A A I L D K G T T T I V N Q V T A M K
 4261 CCG ACG CCG CCA TCC TGG ACA AAG GCA CCA CCA CCA TCG TCA ACC AGG TCA CGG CCA TGA 4320
 R M V D D F R D Y A R T P P A K P V A L
 4321 AGC GCA TGG TGG ACG ATT TCC GCG ACT ACG CCC GCA CGC CGC CGG CCA AGC CGG TCG CGC 4380
 D L N A L I E E I L N L Y L A G D G R D
 4381 TGG ACC TCA ATG CAC TGA TCG AGG AAA TCC TCA ACC TGT CCG GCG ACG GCC GCG GCG 4440
 A I H A R L A P S M A K V M G D A T Q L
 4441 ACG CCA TCC ACG CCC GCC TGG CGC CCT CCA TGG CCA AGG TCA TGG GCG ACG CCA CCC AGT 4500
 R Q V I H N L L Q N A Q D A V A D E G E
 4501 TGC GCC AGG TCA TCC ACA ACC TGC TGC AGA ATG CCC AGG ACG CCG TCG CCG ACG GCG 4560
 V A P R I D V L T E Q I D I A G A D A G Q
 4561 AGG TGG CGC CGC GCA TCG ACG TGC TGA CCG AAC AGA TCG ACA TTG CCG GCG CCG ATG GCC 4620
 R Q P A V R L S I M D N G P G F S A K I
 4621 AGC GCC AGC CGG CGG TGC GCC TGT CGA TCA TGG ACA ATG GCC CTG GTT TTT CGG CCA AGA 4680
 L A R A F E P Y V T S K S K G T G L G L
 4681 TCC TGG CGC GCG CCT TCG AAC CCT ATG TCA CGT CCA AGA GCA AAG GGA CCG GTC TGG GAC 4740
 A M V K K I V E E H G R I D I Q N R T
 4741 TGG CGA TGG TGA AGA AAA TCG TCG AAG AAC ATG GTG GCC GCA TCG ATA TCC AGA ACC GTA 4800
 D G R G A K I V I L L V K L A S V E *
 4801 CCG ATG GGA GAG GCG CAA AAA TTG TAA TTT TGC TGG TAA AGT TAG CAT CTG TTG AAT AAA 4860
 4861 TGC GAC ACG ACT CAA GAT TCG AAG GCA CTA GGC GGG GGA ACC GGC AGT TCA TCC AGG CGC 4920
 4921 TCA CAG CAT CGG GCA GAC CGG CCG GAA GGG ATC GAA CAC TTG GAC AAT GAA CTA GCA GCG 4980
 M A N I L V V D D E M G I R E L
 4981 AGG AAA GCA GCA CAT GGC TAA CAT CCT GGT CGT CGA TGA CGA AAT GGG TAT CCG CGA ATT 5040
 L S E I L G D E G H V V T T A E N A Q Q
 5041 GCT CTC AGA AAT TCT GGG CGA TGA GGG ACA TGT CGT GAC CAC TGC GGA AAA CGC GCA GCA 5100
 A R E L R Q A G V P D L V L L D I W M P
 5101 GGC ACG TGA GCT TCG CCA GGC CGG CGT CCC CGA CCT CGT GCT GCT CGA TAT CTG GAT GCC 5160
 D T D G V T L L K E W Q R D G L L T M P
 5161 CGA CAC CGA CCG GGT GAC GCT GTT GAA GGA GTG GCA GCG CGA TGG CCT GTT GAC CAT GCC 5220
 V I M M S G H A T I D T A V E A T R I G
 5221 GGT CAT CAT GAT GTC CGG CCA CGC CAC CAT CGA CAC CGC CGT CGA AGC CAC CCG CAT CGG 5280
 A L N F L E K P I A L Q K L L K A V Q Q
 5281 CGC ACT CAA TTT CCT GGA AAA GCC GAT CGC CCT GCA GAA GCT GCT CAA GGC CGT GCA GCA 5340
 G L S H S R E A V R P A G Y R P A P V A
 5341 AGG CCT GTC GCA CAG CCG CGA AGC GGT GCG CCC GGC CGG CTA CCG GCC GGC GGC CGT GGC 5400
 A V V N G A A D G L H T P E H A A P V A
 5401 CGC CGT GGT CAA CGG CGC CGC CGA CGG TCT GCA TAC CCC TGA ACA CGC GGC CCC GGT GGC 5460
 A Y A P A L G G G E P L H H G T T A S T P
 5461 GGC CTA TGC GCC GGC CCT GGG CGG CGA ACC GTT ACA CCA TGG GAC GGC GAC CAC GCC 5520
 F G Q V A D N A A N I S F D L P L R E A
 5521 CTT CGG CCA GGT CGC CGA CAA TGC CGC CAA CAT CTC CTT CGA CCT GCC GCT GCG GGA AGC 5580
 R D A F E R A Y F E Y H L V R E N G S M

```

5581 GCG CGA CGC CTT CGA GCG CGC CTA TTT CGA GTA CCA CCT GGT GCG CGA AAA CGG CAG CAT 5640
      T R V A E R T G L E R T H L Y R K L K Q
5641 GAC CCG CGT GGC CGA ACG TAC CGG CCT GGA ACG CAC CCA CCT CTA CCG CAA GCT CAA GCA 5700
      L G V E P G K L A R K N H *
5701 GCT CGG CGT GGA ACC GGG CAA GCT GGC GCG CAA GAA TCA CTG AGC GCC ACT GAG CGC GAC 5760
5761 AGC AAG CTC ACA AAA ACA AAC GGG ACC TTC ACG GTC CCG TTT GTT TTT GGC CTG CAC GTC 5820

```

Notas: A região marcada em vermelho corresponde ao gene *sun*, a região em azul representa a *orfP*, em verde está representado o gene *ntrY* e em rosa o gene *ntrX*. As regiões sublinhadas representam os possíveis promotores tanto σ^{54} quanto σ^{70} . As prováveis regiões de ligação de ribossomo estão marcadas em amarelo e o provável terminador em azul-claro. As regiões marcadas em cinza são as prováveis regiões de ligação de NtrC.

4.3 Análise das proteínas NtrY e NtrX de *H. seropedicae*

O sistema de dois componentes *ntrYX* ocorre em diversos organismos. Em *Azorhizobium caulinodans*, está relacionado com sinalização e transdução, onde NtrY é uma proteína sinalizadora e NtrX uma proteína ativadora de transcrição (Pawlowski, Klosse e Bruijn, 1991). A comparação entre as proteínas NtrY de diversos organismos através do programa ClustalW, mostrou várias regiões conservadas (Figura 6). A comparação de similaridade entre a proteína NtrX de *H. seropedicae* e de outros organismos mostrou algumas regiões conservadas (Figura 7). As proteínas NtrY e NtrX tiveram seus domínios determinados pelos programas SMART e InterProScan (Figuras 8 e 9).

A proteína NtrY possui uma massa molecular calculada de 79,9 kDa (descontando-se o peptídeo sinal, que é clivado entre os resíduos de aminoácidos 26 e 27 da proteína) e um pI teórico de 6,03 determinados através do programa ProtParam. O início da seqüência apresenta um peptídeo sinal de 26 aminoácidos (MSRTLRYLLVGGGVISILLFLLASA), seguido da região N-terminal que possui 4 regiões transmembrana (aminoácidos 41-63, 75-97, 171-193 e 290-312) (Figura 6). A região central da proteína apresenta 3 domínios distintos: HAMP (315-367), o domínio PAS (381-448) e o domínio HisKA (525-597) (Figura 6). O domínio HAMP é encontrado em proteínas bacterianas sensoras e quimiotáticas. As proteínas bacterianas que apresentam esse domínio são geralmente integrais de membrana e fazem parte de um sistema de dois componentes envolvidos com transdução de sinal (Aravind e Ponting, 1999). O domínio PAS está envolvido com proteínas de sinalização, usados

como um domínio sensor de sinal. O domínio PAS ocorre tanto em bactéria como em eucariotos. Muitos domínios PAS são conhecidos por detectar o sinal do estado redox da célula através da associação a um cofator (heme ou flavina, por exemplo) (Zhulin, Taylor e Dixon, 1997). O domínio HisKa possui uma região de ligação a ATP conservada que é requerida para a atividade quinase. A autofosforilação de proteínas na região do domínio HisKa provê grupos fosforil para proteínas reguladoras de resposta que funcionam como controle de diversas atividades efetoras (West e Stock, 2001; Foussard et al., 2001). Na porção C-terminal de NtrY ocorre um domínio HATPase C, que tem como função ligar ATP para sua posterior hidrólise (Figura 6).

A proteína NtrX possui uma massa molecular calculada de 27,1 kDa e um pI teórico de 5,80 e apresenta duas regiões: N-terminal e C-terminal (Figura 7). A proteína NtrX de *H. seropedicae* não apresenta o domínio AAA (ATPase Associada com Atividades celulares) relacionada com a interação com o fator σ^{54} da RNA polimerase que é dependente de ATP, indicando que NtrX possa ser ativador de outro fator sigma da RNA polimerase ou ainda possa atuar como um repressor de transcrição. A região N-terminal de NtrX possui o domínio REC, ou "Response Regulator", que recebe o sinal do seu par sensor através de fosforilação, podendo ser seguida de mudança conformacional para a sua atividade efetora (Pao e Saier, 1995). A região C-terminal possui um motivo hélice-volta-hélice (HTH) que está envolvido com a ligação ao DNA para a regulação de transcrição (Wilson et al., 2001).

Figura 6 – Análise de similaridade entre as proteínas NtrY de diversos organismos (incluindo a região do peptídeo sinal).

<i>Bordetella</i>	-----MRMFLRLALVVGG--VSGLALLGLLAWSTGNASRFAR	35
<i>Burkholderia</i>	-----MLNKVRSATSVSSIVVRVLVSTVAVTAVLLLVLAAASANTEFFDR	46
<i>Ralstonia</i>	-----MIFDRSYKRLLYQVVAGTIVFLAIVLVGLLAAASANTEFFDR	42
<i>Azorhizobium</i>	MTQAAFDQASDNGPMTPSGSS----FGLFAPAVVLLALISALATFLILMGLTPVVPVTH-Q	55
<i>Azospirillum</i>	MSPTPPETVTPLWQQFLRWAARVGLAKRLAFALSALVAGFATYALTESAPFGETNPR	60
<i>Herbaspirillum</i>	-----MSRTLRYLLVVGGSVIS--ILLFLLASASENSALFEQ	35
	: . * :	

<i>Bordetella</i>	YYDTLLIINGIFAFALFVWVVALTVRLARQIRRRQFGARLTARFALAFALIGVVPGALIY	95
<i>Burkholderia</i>	YYQWLYAANLAVAMI FLLVVATLVII I IARLRKKGKFGTRLLAKLAFFMALVGVVPGGIY	106
<i>Ralstonia</i>	YFTLLYKVNLVIGVLLVVI IGGLMLLALRARRGKFGTRLMTKLAVFFGVVGLPGVLIY	102
<i>Azorhizobium</i>	VVISVLLVNAAVLILSAMVGREIWRIAKARARGRAARLHIRIVGLFAVVSVPAILVA	115
<i>Azospirillum</i>	TVTWLLTLDLALLLLLVLIARRIVYLWIGRRRGLAGSQMHVRLVAVFSLAVAPATIMA	120
<i>Herbaspirillum</i>	HYPWLLFLNGLAAISLLGLVLLLLGRLYKRYRRGKFGSRLARLVLMFALVGLPGAVIY	95
	: : . : : : : : . : : : . : : : * . : :	
<i>Bordetella</i>	TLSVQFMSRSIESWFNVRVDSALESGLNLGRAALDSQLADMVRRARAMAAELNNMSDNDI	155
<i>Burkholderia</i>	VVSQFVSRSESIEWFVNVETALTSGLNLGRGMLDASLSDLQTKGRMLSEQLASADAAGT	166
<i>Ralstonia</i>	LVSQFVSRSESIEWFVVKVESALEAGNLGRRTMDASLAEQNKGRLIAEQLDGGSMSAT	162
<i>Azorhizobium</i>	VVASLTLDRGLDRWFSMRTQEIVASSVVAQTYVREHALNIRGDILAMSADLT---RLKS	172
<i>Azospirillum</i>	IFSTVFFYVGVQSWFSERVAVNESLAVASAYLHEHQONIRADALAMANDLN---QEAA	177
<i>Herbaspirillum</i>	LMSVQFVSRSESIEWFVDRMEAALESGLNLGRNALDSSLSLDSVSRARGMAQELSDMSDSEQ	155
	. : . . : : * . . : : : : : : : : : : : : * :	
<i>Bordetella</i>	PLALTRLREANGAQEATVFTGSG-----RILAFSTNTYGQLLPPSLPAT-LLNQLR	205
<i>Burkholderia</i>	TLTLLRLRDQFGVQDATIVEPTRSMGATPDMHVVAQASGNATLVPNDLPTPLMIDQAR	226
<i>Ralstonia</i>	AITLNLRLREQFGVQEATIFTGSG-----RVVATSSNTYDTLVP-EFPSQAVLEQAR	212
<i>Azorhizobium</i>	VYEGDRSRFNQILTAQAALRNLP-----GAMLIR-RDLSVVERANVNIREFIVPA	222
<i>Azospirillum</i>	RLASDPERFEQVVATQAMLRALS-----EAIVFNGTTGAIVARSGYTFALEFDPIP	228
<i>Herbaspirillum</i>	VTYLSRQRDQN--MEITIVNGSG-----QVMSTVGGSIGSLTP-ILPSTQAMRQAR	203
	* : . : : : : : : : :	
<i>Bordetella</i>	LARGYSAAEA-----DDPAIPGA---EGGLHLRVVIPLSAPARFDGILGSSA--	249
<i>Burkholderia</i>	GRG-YAAIEG-----EVDGDPHAHGS---KGVLRRLRVVQRIP---DSNASLLQPT--	269
<i>Ralstonia</i>	TPGGYASLEGGSDSAAADGEAASAPAAARAGGRRSDLYQLRVVVALGTMARDDAALTPTPTV	272
<i>Azorhizobium</i>	NLAIGDATPD-----QPVIYLPNDADYVAAVVPLKD-	253
<i>Azospirillum</i>	DDKLATARRG-----EVAMIVSENDRVRALVRLDR-	259
<i>Herbaspirillum</i>	VSRAFSAVES-----DDSRPASGQSDSDGNLRLHVVLVLP---APSRALALQG--	248
	: : . : : : :	
<i>Bordetella</i>	-----EPRWLQLMHAVPDQIAHNANRVQQGFRDYQ	279
<i>Burkholderia</i>	-----ERFLQLTQPVSPSLARNADAVQRAYREYQ	298
<i>Ralstonia</i>	RKWAGSGLLADRRSDDSSTRGFGLIGEAGREERFLQLVQVPPQALARNADAVQRAYQEYQ	332
<i>Azorhizobium</i>	-----YDDLILYVARLIDPRVIGYLKTTQETLADYR	284
<i>Azospirillum</i>	-----FADTYLYVGRMVEPRVLSHMASAEGAVREFG	290
<i>Herbaspirillum</i>	-----ETRYLQILQVPPDYLASNAETLRLAYNEYQ	278
	: * : : : : : . : :	
<i>Bordetella</i>	ELALSRLGLRKLKYGITLTLALLLAVFAAIAVALSLSKRLVLRPLRLLAGGTQAVGVGDFRP	339
<i>Burkholderia</i>	EKALGRTGLRKMYYIGTTLTALFLATFIAMMLALALGNQLARPLFLLAQGTKEITEGDYTP	358
<i>Ralstonia</i>	EKALGRTGLRKMYYIGTTLTALFLAVFIAMMLALLLGAQLARPLMLLQGTREVAEGDLSP	392
<i>Azorhizobium</i>	SLEERRFGVQVAFALMYAVITLIVLLSAVWGLNFSKWLVAPIRRLMSAADHVAEGNLDV	344
<i>Azospirillum</i>	ALESQRGSLQITFTLIFLCVALLLLAAVWAGLIFATRLVVPISALIGAADRVRAGDLTV	350
<i>Herbaspirillum</i>	QRSVSRSGLRKIYLVTLTLLLAIFAAIASAFLIASDLAKPLLLLAEQTKAVAEGNLSP	338
	* . : : : : : : : * : . : . * . * : : : * :	
<i>Bordetella</i>	-LPEPPERDEVGQLTRSFNAMTRQLEEARQMVESNRRQLERSNVYLESVLSNLSGVI AF	398
<i>Burkholderia</i>	-KREIKSRDELGFLTQSFNAMTRQLSEARA AVENNR IALEH SKAYLESILANLTAGV FVF	417
<i>Ralstonia</i>	-KRELHTRDELGLLTQQFNQMTROLADARRAVEQNRAALEQSKAYLESVLTNLTAGV FVF	451
<i>Azorhizobium</i>	RVPIYRAEGDLASLAETFNKMTHELRSQREAILTARDQIDSRRRFTEAVLSGVGAGVIGL	404
<i>Azospirillum</i>	RVTERPAEDDLALLSRAFNRMTEIESQRHALLSANRLIDSRRRFTEVLSGVSAGRDGL	410
<i>Herbaspirillum</i>	-RPIVSTSDDELGTLTQSFNIMTRQLLEARTSVEKNRAELENAKAYLESVLANMSAGVMVL	397
	. : . * . * * * : : . * : . : : . : * : : : : * : :	
<i>Bordetella</i>	DEGFRVTTVNQGAQTILQADLRVIGRPLETVDGMLEFAQVVRQAFAAHAAVGS-----E	453
<i>Burkholderia</i>	DRQFRLTTANRGAERIFRQPFQAVMGSA LDQIGV LSEFGGMVRKAFADREAASG-DGHDD	476
<i>Ralstonia</i>	DHRLVLLTANPGAERIFKQPFQAVMGSA LDQIGV LSEFGGMVRKAFADREAASG-DGHDD	509
<i>Azorhizobium</i>	DSQERITILNRS AERLLGLSEVEALH--RH LAEVPETAGLLEEAEHA-----R	451
<i>Azospirillum</i>	DAEGRITLSKFS AARLLGVKDAESLIG-MRLAELVPEMGGLLHEAPGR-----P	458
<i>Herbaspirillum</i>	DGQFNILSANDSVRRILGHDFSADIGTPLQTI EAQAPFAQAVIRAFSEQLAQHSSDSTPD	457
	* : : : . : : : : : : . : * :	

<i>Bordetella</i>	RLHWQQQFEIT-----PGLDETEGGQPVT----LLARGTHLRVDGRNGYLVVFDITE	502
<i>Burkholderia</i>	RGHWQQQFSVQ-----VPGETEPLTLVLRGARLVSATDRDAEDMQTS-GYVVVFDISD	529
<i>Ralstonia</i>	AAHWQKQVEIP-----LADEDEPLTLVLRGTRLLGPS-VDARGTER--GYVVVFDISD	560
<i>Azorhizobium</i>	QRSVQGNITLT-----RDGRE-RVFAVR-----VTTE-QSPEAEHGWVTLDDITE	495
<i>Azospirillum</i>	GLVVQDQIKIR-----RDGTTPLTLVLR-----ISTEGRGSGMMRGYVVTFDEHHR	504
<i>Herbaspirillum</i>	GLHWQRQFELSRQPGAMLDSDEQGKPDHDKLTLARGSHLPVENGV-GYVVVFDISN	516
	* :. : *::*::*	
<i>Bordetella</i>	VIS-ANRTVAVGEVARRLAH--EIKNPLTPIQLSAERLAMKLDRLQPADAQMLIRSTNT	559
<i>Burkholderia</i>	VIS-AQRSIAWGEVARRLAH--EIKNPLTPIQLSAERLQMKLADKLSPSDADVLKRGATT	586
<i>Ralstonia</i>	VIS-AQRSVAVGEVARRLAH--EIKNPLTPIQLSAERLEMKLSPKLTDADAIEVLRGATT	617
<i>Azorhizobium</i>	LIS-AQRTSAWADVARRIAH--EIKNPLTPIQLSAERLKRKFGRHVTVQ-DREIFDQCTDT	551
<i>Azospirillum</i>	TWSPAQRKAAWARRRPIAASPTRVKNPLTPIQLSAEPCAASTLKEITS-DTEVFTMCTDT	563
<i>Herbaspirillum</i>	VIS-AQRSIAWGEVARRLAH--EIKNPLTPIQLSAERLQHRLSDKLMPADAAILDKGTTT	573
	* * :. * * : * : : *	
<i>Bordetella</i>	IVNQVGLKQMVDDFREYARTPPAVMQRIDLNALVADVLSLYGWDPDGGGRGAARVLNL	619
<i>Burkholderia</i>	IVNQVAAMQMVDFRDYARTPPAVLAHLQLNDLVSEVLTLYGIEE----GKGAIQVE--	640
<i>Ralstonia</i>	IVNQVAAMKRMVDDFRDYARTPPAVLQDLDLNALCTEVLHLYGIDHPGQSDHAVIAVR--	675
<i>Azorhizobium</i>	IIRQVGDIGRMVDEFSSFARMKPVVDSQDMSEIIRQTVFLMRVGHV----EYVFDSE--	605
<i>Azospirillum</i>	IVRQVDDIRRMVDEFSAFARMKPVVDMKPCNLDLVRQAVFLQSSAHAG---KIKFDMA--	618
<i>Herbaspirillum</i>	IVNQVTAMKRMVDDFRDYARTPPAKPVALDLNALIEEILNLYLAGD----GRDAIHAR--	627
	* :. * * : : * * : * * * * : : : *	
<i>Bordetella</i>	DVELAPGLPDIEGDPTQLRQVIHNLNLSNARDAVAEQGGEG----RVKVTQIVQSEQ--P	673
<i>Burkholderia</i>	---LAA-LPAIRGDATQLRQVIHNLNLSNARDAVADEHP-----RVLLETRTVEYGDPA	691
<i>Ralstonia</i>	---LGEGLPLIKGDPTQLRQVIHNLNLSNARDAVADEAAGRPAHVMLQTDVVEYDD--A	730
<i>Azorhizobium</i>	---VPP-AMPARFDRRLVSQLTNILKNAEAIEAVPPD-----VRG----QGRIKRV	650
<i>Azospirillum</i>	---LPQGPLTVPCDSRQISQALTNLLQNAADAIEGRPPP-----AEGTELPPGHVAIR	668
<i>Herbaspirillum</i>	---LAPSMKVMGDATQLRQVIHNLNLSNARDAVADEGEVAP---RIDVLTEQIDIAG--A	679
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>Bordetella</i>	DGGQQRVAVRFTVADTGPFGFPQVMQRAFEFYVTTKAHGTGLGLAIVRKIEEHGGRIDLA	733
<i>Burkholderia</i>	EGKVRVAVRLTVSDNPGPFSARILTRAFEPYVTTKAKGTGLGLAMVKKIVDEHGARIDIR	751
<i>Ralstonia</i>	SGARRQAVRLGIADNGTGFSSRILNRAFEFYVTTKAKGTGLGLAMVKKIMDEHGARIELR	790
<i>Azorhizobium</i>	ANRVGEDLVIDIIDNGTGLPQESNRLLPEYVTTREKGTGLGLAIVGKIMEEHGGGIELN	710
<i>Azospirillum</i>	VEADAERIAIIEDNKGKLPTEERDLTEPYVTTTRAKGTGLGLAIVKIMEDHGGVLTLE	728
<i>Herbaspirillum</i>	DGQRQPAVRLSMDNPGPFSAKILARAFEFYVTSKSKGTGLGLAMVKKIVEEHGGRIDIQ	739
	: : : * . * * : * * * * * : : * * * * * : * * : : * . : :	
<i>Bordetella</i>	NRKEG-----GARISILLTRLALPSDTMDATAQKKNAAATQ-----	769
<i>Burkholderia</i>	NRMKAGDVIEGAQISILFLQLADDAATPGTGPRPAHGGASQGGKTKATVQTRAA-----	804
<i>Ralstonia</i>	NRQSGTDTVG-AQVSILFVKLA-----	811
<i>Azorhizobium</i>	DAPEGRGAWIRLTLKAEKPKAEPDASTKATGAATPAAPAASAMARDAADSAARGKNER	770
<i>Azospirillum</i>	DR-EGGARVGLVLPQHIPPASGTAAGDAPGGVGTPAETGE---EKRHAAHGA-----	777
<i>Herbaspirillum</i>	NRTDG----RGAKIVILLVKLASVE-----	760
	: .. :	
<i>Bordetella</i>	-	
<i>Burkholderia</i>	-	
<i>Ralstonia</i>	-	
<i>Azorhizobium</i>	T 771	
<i>Azospirillum</i>	-	
<i>Herbaspirillum</i>	-	

Notas: As seqüências de aminoácidos da proteína NtrY dos organismos selecionados para comparação da proteína NtrY de *H. seropedicae* foram obtidas no banco de dados Genbank. *Bordetella pertussis* Tohama I (NP_879418), *Burkholderia fungorum* (ZP_00028166), *Ralstonia solanacearum* (NP_518198), *Azorhizobium caulinodans* (Q04850) e *Azospirillum brasilense* (P45675). A região em azul corresponde ao domínio HAMP, em rosa o domínio histidina quinase (HisKA), em verde o domínio HATPaseC. O resíduo de histidina (H), marcado em vermelho é a provável região de autofosforilação da proteína. Os asteriscos (*) representam resíduos de aminoácidos iguais, os dois pontos (:) aminoácidos conservados e os pontos (.) aminoácidos semi-conservados. No fim de cada linha os números referem-se ao número de aminoácidos das proteínas de cada organismo comparado.

Figura 7 – Análise de similaridade entre as proteínas NtrX de diversos organismos.

<i>Ralstonia</i>	-MATILVVDDDEMGIRELLSEILGDEGHVVEAENAQQAREHRNGATPDLVLLDIWMPDT-	58
<i>Burkholderia</i>	-MATILVVDDDEMGIRELLSEILSDEGHVVEAENAQQAREFRRLRQAPDLVLLDIWMPDT-	58
<i>Bordetella</i>	-MARILVVDDDEMGIRELLSEILYDEGHTVELAENAAQARAARLRMRPDLVLLDIWMPDT-	58
<i>Azorhizobium</i>	MAHDILIVDDEPDISGLVAGILEDEGYSARTARDADGALAEIAARRPNLIIFLDIWLQGSR	60
<i>Bradyrhizobium</i>	MASEILIVDDEADIRDLVAGILEDEGFVTRTARDSDSALAEIANRRPHLVFLDIWLQGSK	60
<i>Mesorhizobium</i>	MASDILIVDDEEDIRELVAGILSDEGHETRTAFDADSALAAIADRAPRLIIFLDIWLQGSR	60
<i>Herbaspirillum</i>	-MANILVVDDDEMGIRELLSEILGDEGHVVTTAENAQQARELRQAGVDPDLVLLDIWMPDT-	58
	: * *::: * * * * . * :: * * *:::***: .:	
<i>Ralstonia</i>	-DGVTLLEKESQGLLTMPVIMMSGHATIDTAVEATKIGALNFLEKPIALQKLLAAVEQG	117
<i>Burkholderia</i>	-DGVTLLEKESQGLLTMPVIMMSGHATIDTAVEATKIGALNFLEKPIALQKLLKAVEQG	117
<i>Bordetella</i>	-DGVSLLEKESQGLLDMPVIMMSGHATIDTAVEATRIGAMDFLEKPIITLQRLKKTIEAG	117
<i>Azorhizobium</i>	LDGLELLDIKRE-HPEVPVVMISGHGNIETAVAAIKRGAYDFIEKPFNADRLVITERA	119
<i>Bradyrhizobium</i>	LDGLQLEQVKKD-NADLPVVMISGHGNIETAVAAIKRGAYDFIEKPFKADRLILVANRA	119
<i>Mesorhizobium</i>	LDGLALLDEIKTM-HPTLPVVMISGHGNIETAVSAIRRGAYDFIEKPFKADRLILIAERA	119
<i>Herbaspirillum</i>	-DGVTLLEKESQGLLTMPVIMMSGHATIDTAVEATRIGALNFLEKPIALQKLLKAVQQG	117
	: * * . ::***:***:***: * : * * : * :***: : * : * .	
<i>Ralstonia</i>	LARGKER-----PRVSPAAPLAV	135
<i>Burkholderia</i>	LARGNAA-----GAPGGAAAKPV	135
<i>Bordetella</i>	LARVRAP-----RAAPPLAHAAA	135
<i>Azorhizobium</i>	LETLRRLRREVRELKQLT-QPHTMVGSRSSVIQQLRATVDRVGPNTSRILIVGPGSGKELT	178
<i>Bradyrhizobium</i>	LENSRLKREVKELKQLAPSASSLVGRSPSMNQLRQTIERAANKANSRILIVGPAGAGKELT	179
<i>Mesorhizobium</i>	LETSKLRREVSCLKQRSGETFDLIGMSSAMSQLRQTIERVAPTNSRVMIIGPSGSGKELA	179
<i>Herbaspirillum</i>	LSHSREA-----VRPAGYRPAPV	135
	* .	
<i>Ralstonia</i>	AAVGG-----GSAPLAAAAQGAV-----	153
<i>Burkholderia</i>	SPVS-----ASAVASAAALPM-----	151
<i>Bordetella</i>	APVA-----VALEDELDPQ-----	150
<i>Azorhizobium</i>	ARMIHAASARAQGFVIVINAAAITPERLEYELFGVEEGEGRE-RHRGALAEAHGGTFLFD	237
<i>Bradyrhizobium</i>	ARTLHTASGRADGPFVIVINAAAITPERMEHELFGVEQSNGEQPRKPGALEEAHGGTFLFD	239
<i>Mesorhizobium</i>	ARAIHTLSARKGAPFVTLAANAITPERMEIEELFGTE-SNGVE-RKVGALAEAHRGILYID	237
<i>Herbaspirillum</i>	AAVVNGAADGLHTPEHAAPVAAYAPA-----	161
	: .	
<i>Ralstonia</i>	-----	
<i>Burkholderia</i>	-----	
<i>Bordetella</i>	-----	
<i>Azorhizobium</i>	EIADMPRETQNRVLRVLEQTFSRIGSSEKVRVDVRIISSTGRHLEEEIAAGRFREDLYH	297
<i>Bradyrhizobium</i>	EIADMPRETQNKILRVLEQSFQRVGGTGVQVDVRIISSTARNLEEEIAAGHFREDLYH	299
<i>Mesorhizobium</i>	EVADMPRETQNKILRVLEQQFERVGGTKRVKVDVRIISSTQNLEAMIADGRFREDLYH	297
<i>Herbaspirillum</i>	-----	
<i>Ralstonia</i>	-----	
<i>Burkholderia</i>	-----	
<i>Bordetella</i>	-----	
<i>Azorhizobium</i>	RLSVVPIRVPLAERREDIPDLVDFIDLISQTTGLQRRKVGEDAMAVLQSHDWPGNVRQ	357
<i>Bradyrhizobium</i>	RLSVVPIRVPLASERREDIPELIDYFMEQISAGSGLPKRQIGQDAMAVLQSHVWPGNVRQ	359
<i>Mesorhizobium</i>	RLAVVPMVPGLAERREDIPYLVDFNMKQIARQAGIKPRRIGDDALAVLQAHNWPNGNVRQ	357
<i>Herbaspirillum</i>	-----	
<i>Ralstonia</i>	-----LATDRADV-----GAPVRAAEGGGMQFSFDMPLREARDLFE	191
<i>Burkholderia</i>	-----LSTDGLGSG-----ALAAQTAS-----ISFDIPLRDARDAFER	184
<i>Bordetella</i>	-----PFQAPVEAP-----AASNGQLG-----SISLDQPLREARDEFER	184
<i>Azorhizobium</i>	LRNNVERLLILAGGD-PDAEVTASMLPPDVGVLPVPTLPNGNGGEHLMGLPLREAREVFER	416
<i>Bradyrhizobium</i>	LRNNVERVMILAAGG-PEVIITADMLPQDVGSMVPAMPTSNNGEHIMGLPLREAREVFER	418
<i>Mesorhizobium</i>	LRNNVERLMI LARGDDVDAPITADLLPSEIGDVMPTPNQSD-QHIMALPLREAREQFEK	416
<i>Herbaspirillum</i>	-----LGGEPLHHGTTASTPFQGVADNAANISFDLPLREARDAFER	202
	: ***:***: * *:	
<i>Ralstonia</i>	AYFEYHLQREGGSMTRVAEKTGLERTHLYRKLKQLGVELSRNKGEPSA	239

<i>Burkholderia</i>	AYFEYHLARENGSMTRVAEKTGLERTHLYRKLKQLGVDLGKKNKGE---	229
<i>Bordetella</i>	IYFEYHLVRENHSMTRVSERTGLERTHLYRKLKQLGIESARKRGT---	229
<i>Azorhizobium</i>	EYLAAQINRFGGNISRTAEFVGMERSALHRKLKALGVG-----	454
<i>Bradyrhizobium</i>	DYLIAQISRFGSNISRTAEFVGMERSALHRKLKALGVG-----	456
<i>Mesorhizobium</i>	DYLIAQINRFGGNISRTAEFIGMERSALHRKLKSLGV-----	453
<i>Herbaspirillum</i>	AYFEYHLVRENGSMTRVAERTGLERTHLYRKLKQLGVEPGKLARKNH-	249
	*: :: * . .:::.* *::*: *::*** **:	

Notas: As seqüências de aminoácidos da proteína NtrX dos organismos selecionados para comparação com a proteína NtrX de *H. seropedicae* foram obtidas no banco de dados Genbank *Ralstonia solanacearum* (NP_518199), *Burkholderia fungorum* (ZP_00028165), *Bordetella pertussis* Tohama I (NP_879419), *Azorhizobium caulinodans* (Q04849), *Bradyrhizobium japonicum* (NP_771130) e *Mesorhizobium loti* (NP_102203). Em vermelho está o provável sítio de fosforilação (D), em verde a região do domínio REC, em azul a região do domínio hélice-volta-hélice (HTH). A região central de NtrX de *H. seropedicae* não apresenta similaridade com nenhuma proteína NtrX dos organismos *Azorhizobium caulinodans*, *Mesorhizobium loti* e *Bradyrhizobium japonicum* comparados, sendo que na região marcada em cinza encontra-se a região de interação com o fator σ^{54} . Os asteriscos (*) representam resíduos de aminoácidos iguais, os dois pontos (:) aminoácidos conservados e os pontos (.) aminoácidos semi-conservados. No fim de cada linha os números referem-se ao número de aminoácidos das proteínas de cada organismo comparado.

Figura 8 – Esquema dos domínios da proteína NtrY obtidos através do programa SMART.



Notas: Em vermelho está representado a região do peptídeo sinal. As barras em azul representam as regiões transmembrana, seguido dos motivos HAMP (em verde), PAS (em rosa), HisKA (quadrado em verde) e HATPaseC (triângulo em verde)

Figura 9 – Esquema dos domínios da proteína NtrX obtidos através do programa SMART.

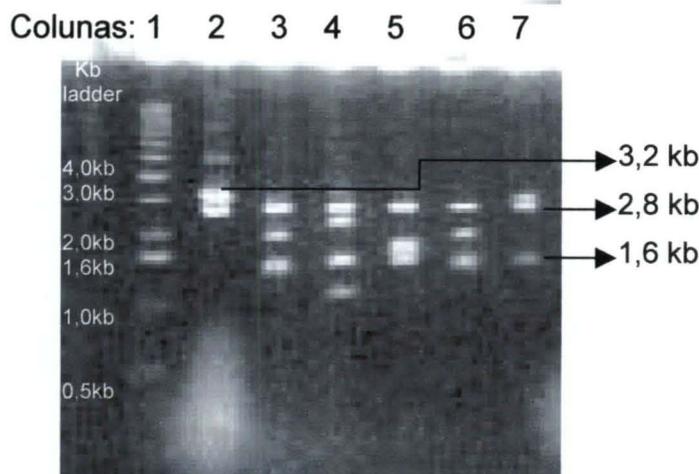


Notas: O domínio REC está representado em azul e em preto está representada a região que corresponde ao domínio hélice-volta-hélice (HTH-FIS).

4.4 Mutagênese aleatória do clone 17003C02 por reação de inserção de transposon

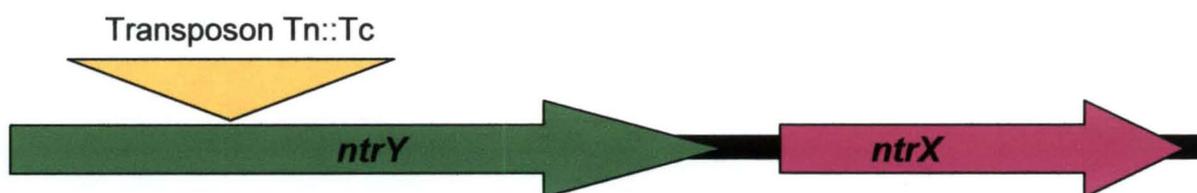
O clone p17003C02 foi utilizado para a inserção do transposon a fim de mutagenizar os genes *ntrY* e *ntrX*. A reação foi realizada *in vitro* seguindo o protocolo do fabricante Epicentre (Material e Métodos, item 3.7.1). Após a eletroporação em células de *E. coli* estirpe DH10B, as colônias foram selecionadas para a resistência ao antibiótico tetraciclina. As colônias resistentes foram coletadas, tiveram seu DNA purificado e submetido a clivagem pelas endonucleases de restrição *EcoRI* e *HindIII* para determinar se a entrada do transposon ocorreu no inserto ou no vetor (Figura 10). A restrição do plasmídeo p17003C02 com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* gera dois fragmentos: um de 2,8 kb referente ao vetor pUC18 e um segundo fragmento de 3,2 kb referente ao inserto, como pode ser observado na coluna 2 da Figura 10. Nos plasmídeos resistentes a tetraciclina (pLYST) a clivagem com *EcoRI* e *HindIII* gera um padrão de restrição diferente do descrito, em que se mantém constante nesses plasmídeos uma banda de 1,6 kb referente ao transposon. Caso a inserção do transposon ocorresse no vetor a banda de 2,8 kb teria seu tamanho alterado e caso a entrada do transposon ocorresse no inserto, a banda de 3,2 kb teria seu tamanho alterado, pois a clivagem do transposon geraria fragmentos menores referentes à região do inserto (essas bandas menores quando somadas resultavam no valor de 3,2 kb confirmando a entrada do transposon no inserto). Quatro clones nos quais houve a entrada do transposon no inserto foram seqüenciados com o iniciador Tet-1 FP-1 (Figura 1) do transposon para a determinação da localização da inserção. Dois plasmídeos foram então selecionados por apresentarem o transposon dentro dos genes *ntrY* e *ntrX* e foram denominados pLYSTY4C (onde o transposon entrou na base 474 do gene *ntrY*) e pLYSTX4E (onde o transposon entrou na base 122 do gene *ntrX*) respectivamente (Figuras 11 e 12).

Figura 10- Padrão de restrição dos plasmídeos após digestão com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *HindIII*.



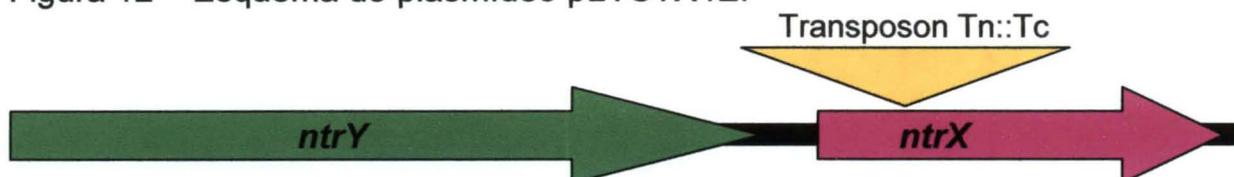
Notas: Coluna 1- marcador de massa molecular (1 kb ladder); Coluna 2 - plasmídeo p17003C02 clivado com *EcoRI* e *HindIII*, usado como controle do padrão de restrição onde pode-se observar uma banda de 3,2 kb referente ao inserto e uma banda de 2,8 kb referente ao pUC18. Nas colunas 3 a 7 representam os clones resistentes a tetraciclina (pLYST4A, pLYST4B, pLYST4C, pLYST4D e pLYST4E) que foram digeridos com as enzimas *EcoRI/HindIII*. Pode-se observar no padrão de restrição desses plasmídeos uma banda de 1,6 kb referente ao transposon e uma banda de 2,8 kb referente ao vetor, sendo que essas bandas se mantêm em todos os clones. A banda de 3,2 kb referente ao inserto não aparece nesses clones confirmando a entrada do transposon nessa região, uma vez que a clivagem do transposon quando esse se localiza no inserto faz com que a banda de 3,2 kb seja fragmentada em bandas de tamanho menor.

Figura 11 – Esquema do plasmídeo pLYSTY4C.



Notas: O seqüenciamento com o iniciador do transposon permitiu determinar que o local de entrada do transposon dentro do inserto ocorreu na região do gene *ntrY* na base 474.

Figura 12 – Esquema do plasmídeo pLYSTX4E.

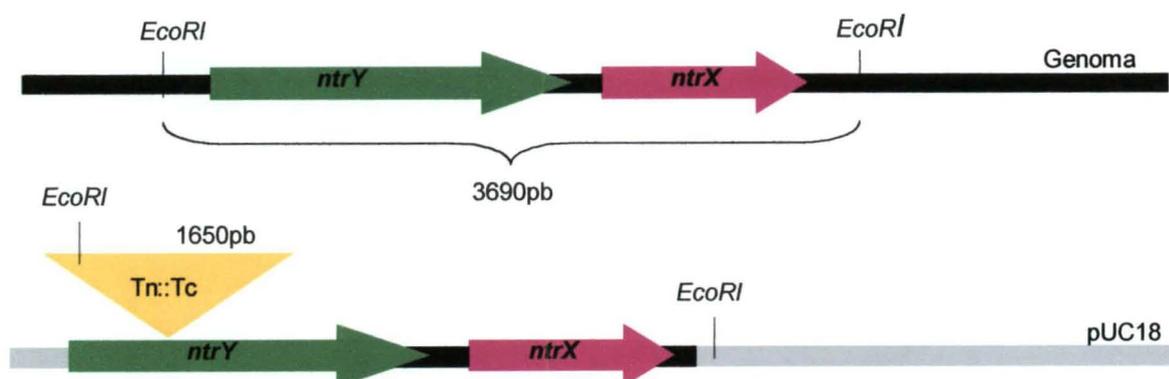


Notas: O seqüenciamento com o iniciador do transposon permitiu determinar que o local de entrada do transposon dentro do inserto ocorreu na região do gene *ntrX* na base 122.

4.5 Obtenção de Mutantes *ntrY* em *H. seropedicae*

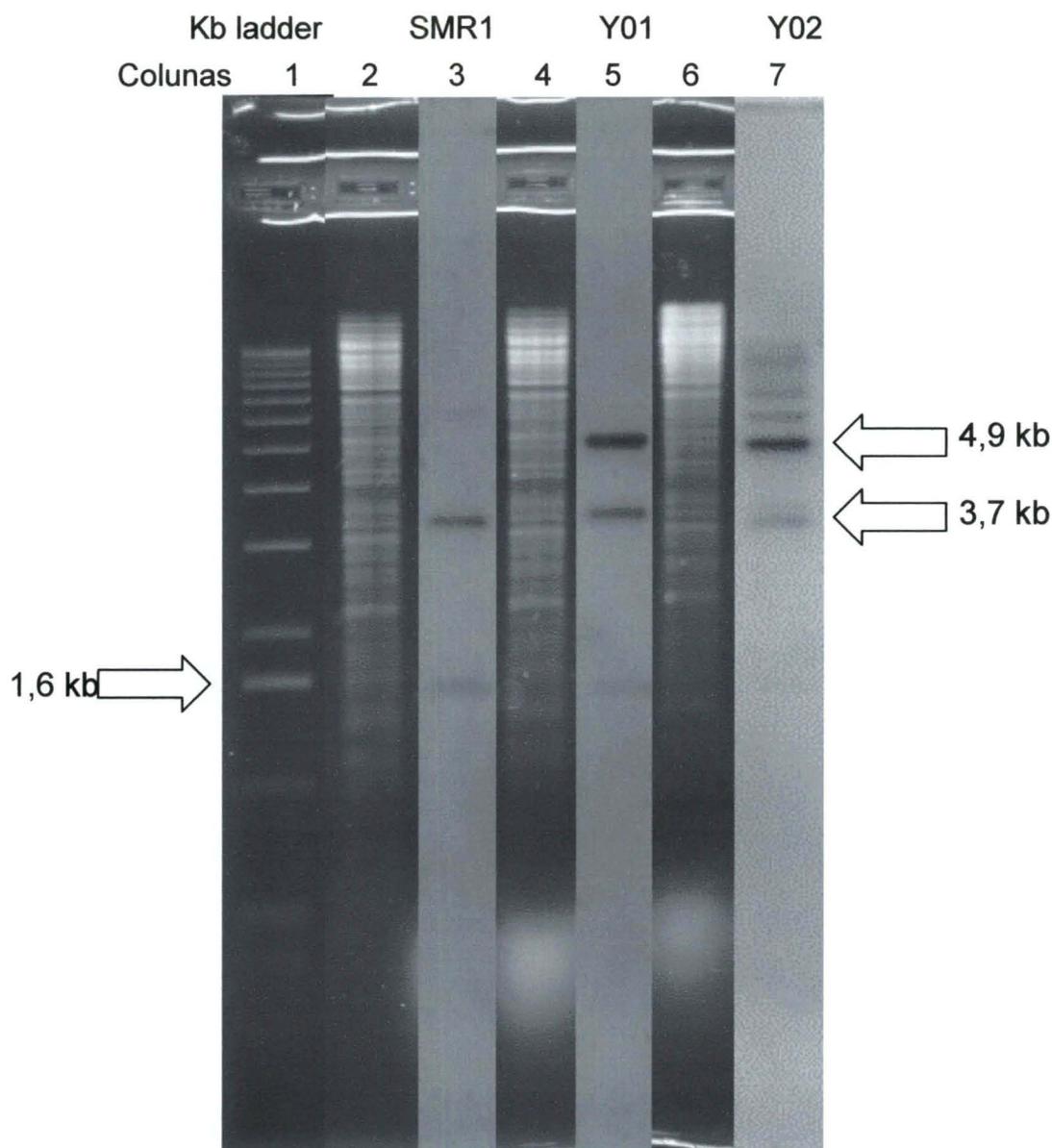
O plasmídeo pLYSTY4C foi introduzido por eletroporação em *H. seropedicae* estirpe selvagem (SMR1). Transformantes resistentes a tetraciclina foram selecionados e denominados Y01 e Y02. As estirpes mutantes Y01 e Y02 tiveram seu DNA genômico purificado para análise de hibridização. Esses mutantes também foram analisadas quanto ao crescimento em nitrato como fonte de nitrogênio. O esquema do mapa de restrição com a enzima *EcoRI* e o resultado da hibridização da membrana utilizando o plasmídeo pLYSTY4C como sonda são apresentados nas Figuras 13 e 14 respectivamente. Na Figura 14, na coluna 3 tem-se a autorradiografia referente a estirpe SMR1 (selvagem) que apresenta uma banda de aproximadamente 3,7 kb referente a região dos genes *ntrYX*. Nas colunas 5 e 7 têm-se a autorradiografia das estirpes Y01 e Y02 (*ntrY*) onde ocorre uma banda de aproximadamente de 3,7 kb e uma de 4,9 kb confirmando que houve a recombinação. Desta forma, Y01 e Y02 são mutantes *ntrY* obtidos por recombinação de simples permuta. O gene *ntrY* não foi reconstituído por não estar inteiro dentro do plasmídeo.

Figura 13 – Mapa de restrição da região do genoma que contém os genes *ntrY* e *ntrX*, e do transposon.



Notas: Estão mostrados na figura somente os sítios de clivagem da enzima *EcoRI*, que foi usada para o ensaio de hibridização.

Figura 14 – Padrão de hibridização das estirpes de *H. seropedicae* SMR1 (estirpe selvagem) Y01 e Y02 (estirpes mutantes) com a sonda pLYSTY4C clivada com *EcoRI*.



Notas :Ensaio de hibridização do DNA genômico da estirpe selvagem de *H. seropedicae* SMR1 e dos mutantes Y01 e Y02. O DNA foi isolado e processado conforme descrito em Material e Métodos. A sonda utilizada foi o plasmídeo pLYSTY4C clivado com *EcoRI*.

Coluna 1 – Marcador de massa molecular; Colunas 2, 4 e 6 perfil de restrição com *EcoRI* do DNA genômico das estirpes selvagem SMR1 e mutantes Y01 e Y02 respectivamente; Colunas 3, 5 e 7 autoradiografia após hibridização das estirpes selvagem e mutantes Y01 e Y02 respectivamente.

4.6. Regulação do metabolismo de nitrato

O nitrato pode servir como fonte de nitrogênio para plantas, fungos e bactérias. Entretanto, algumas bactérias assimilam o nitrato durante aerobiose (via assimilatória) e outras bactérias são capazes de dissimilar nitrato durante o crescimento em anaerobiose (via dissimilatória). A via assimilatória leva a redução do nitrato a amônia durante crescimento aeróbico. As enzimas envolvidas na redução assimilatória do nitrato a amônio são a nitrato redutase citoplasmática (produto dos genes *nasCA*), que reduz o nitrato a nitrito; e a nitrito redutase citoplasmática (produto do gene *nasB*) que catalisa a redução do nitrito a amônio. Os genes *nasFED* codificam para um transportador de nitrato e nitrito. Os genes *nasFEDCBA* formam um operon em *Klebsiella oxytoca* (Wu et al, 1999). A expressão desse operon em *K. oxytoca* está sob regulação do sistema Ntr via NtrC (Wu et al, 1999). Em condições limitantes de nitrogênio, a proteína NtrC fosforilada ativa a transcrição do operon *nasFEDCBA* aumentando o transporte de nitrato e nitrito e consequentemente aumentando os níveis intracelulares de amônio por redução do nitrato a amônio via nitrato e nitrito redutases (Wu et al, 1999).

A. brasilense e *H. seropedicae*, como outras bactérias fixadoras de nitrogênio, são capazes de metabolizar o nitrato, crescendo aerobicamente em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio e sob essas condições não fixam nitrogênio (Baldani et al., 1986). *A. brasilense* é também capaz de crescer anaerobicamente usando nitrato como aceptor final de elétrons (e como única fonte de nitrogênio), através de uma via denominada dissimilatória ou respiração por nitrato (Bothe et al., 1981). A dissimilação do nitrato forma produtos como nitrito e os gases óxido nítrico, óxido nitroso ou dinitrogênio. Esses produtos, como o nitrito, podem ser excretados ao invés de serem incorporados em compostos nitrogenados, levando ao acúmulo de nitrito em meio semi-sólido sob condições anaeróbicas. Esse processo ocorre mais pronunciadamente em *A. brasilense* do que outras espécies do gênero *Azospirillum* (*A. lipoferum*, *A. amazonense* e *A. halopraeferans*) mas também ocorre em *H. seropedicae*

(Baldani et al., 1986). A resposta em anaerobiose à presença ou ausência de nitrato e nitrito da bactéria é regulada por sistemas de dois componentes que consistem em duas proteínas histidina quinase, NarX e NarQ (produto dos genes *narX* e *narQ*, respectivamente) e duas proteínas reguladoras de resposta NarL (produto do gene *narL*) e NarP (produto do genes *narP*) (Hartig et al., 1999; Stewart e Bledsoe, 2003). Esses sistemas respondem a altos níveis de nitrato e nitrito ativando a transcrição dos genes *narG* (que codifica para a proteína NarG ou nitrato redutase respiratória), *narH* e *narI*. O produto desses genes, as proteínas NarG, NarH e NarI respectivamente, formam um complexo que catalisa a redução do nitrato a nitrito. O nitrito formado é um composto tóxico para a célula sendo reduzido a óxido nítrico pela proteína nitrito redutase respiratória, produto do gene *nrfA* (Poock et al., 2002). O óxido nítrico pode ser excretado nessa forma ou ser transformado em óxido nitroso ou dinitrogênio gasoso, sendo que o dinitrogênio gasoso pode ser reduzido a amônio através da fixação de nitrogênio.

4.6.1 Análise fenotípica do mutante *ntrY* de *H. seropedicae* quanto ao crescimento em nitrato.

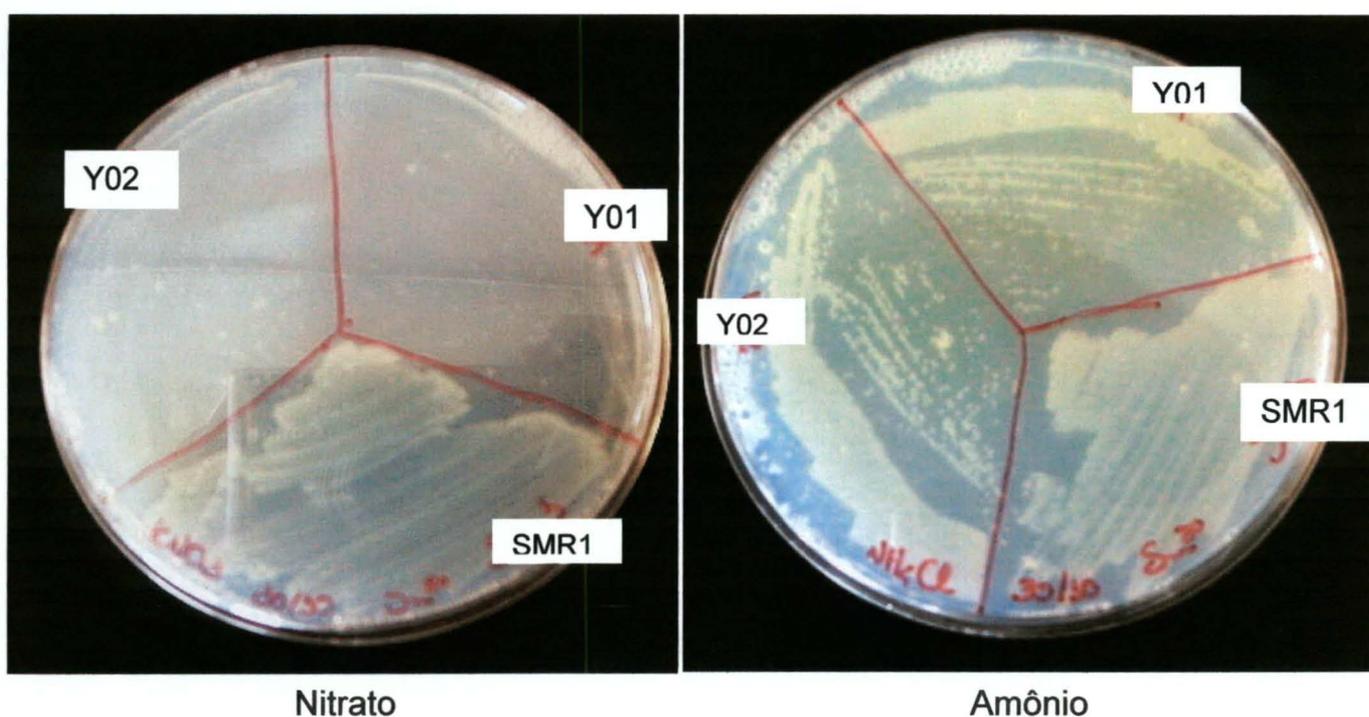
Considerando-se que o sistema *ntrYX* possa estar envolvido no metabolismo de nitrogênio em *H. seropedicae*, os mutantes Y01 e Y02 foram testados quanto a habilidade de utilizar nitrato como única fonte de nitrogênio.

A Figura 15 mostra o ensaio em meio sólido. Enquanto a estirpe selvagem SMR1 foi capaz de crescer tanto em cloreto de amônio quanto em nitrato de sódio, as duas estirpes mutantes *ntrY* analisadas (Y01 e Y02) embora sejam capazes de crescer em presença de amônio, não foram capazes de utilizar nitrato de sódio como única fonte de nitrogênio (Figura 15).

A habilidade de usar nitrato também foi testada em meio líquido, aonde foi possível acompanhar a taxa de crescimento das células. A Figura 16 mostra que o resultado obtido é semelhante ao observado para o crescimento em meio sólido, todas as estirpes são capazes de crescer em meio contendo

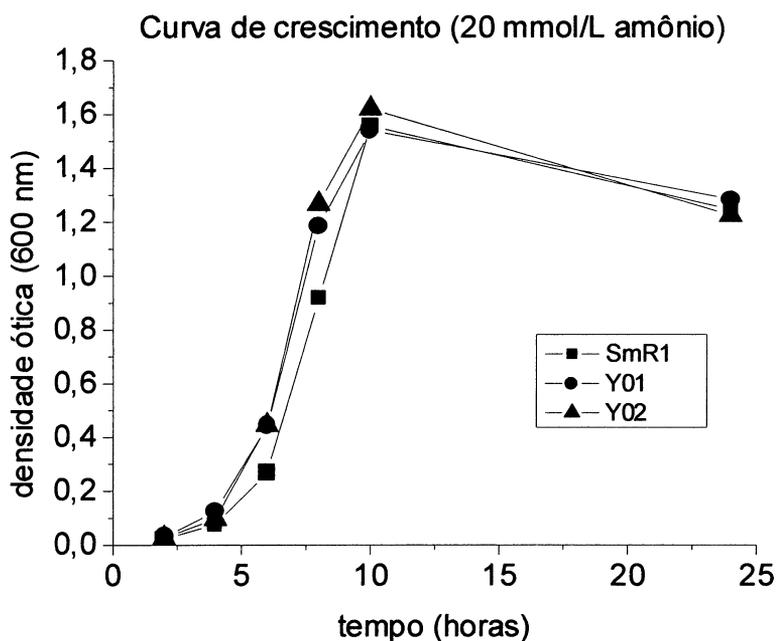
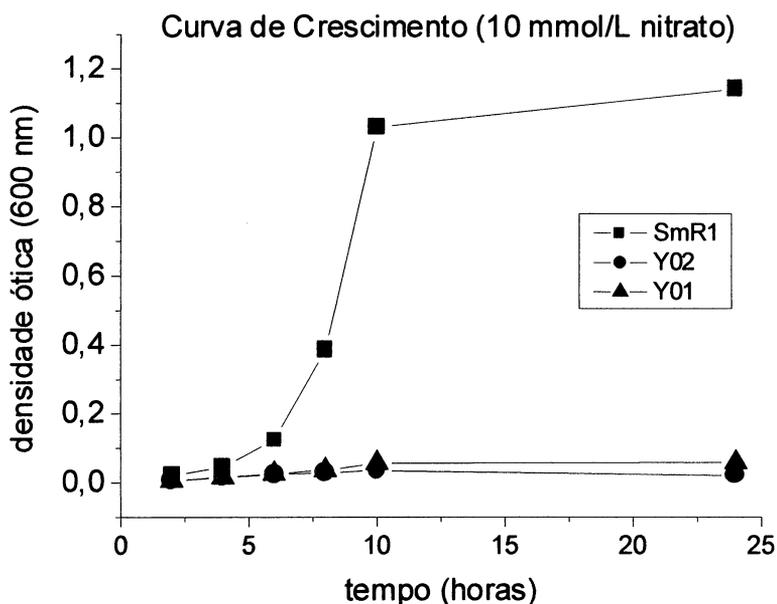
amônio como fonte de nitrogênio. Por outro lado, quando foi utilizado nitrato, somente a estirpe selvagem foi capaz de crescer. Após 24 horas de incubação ainda não foi possível observar crescimento para as estirpes mutantes Y01 e Y02. Estes resultados indicam o envolvimento dos genes *ntrYX* no processo de assimilação de nitrato como fonte de nitrogênio em *H. seropedicae*.

Figura 15 – Efeito da mutação em *ntrY* sobre o crescimento em nitrato em *H. seropedicae* em meio sólido.



Notas: Na placa a direita as culturas foram riscadas em meio NFbHP sólido contendo cloreto de amônio (20 mmol) como fonte de nitrogênio. Na placa a esquerda as culturas foram riscadas em meio contendo nitrato de sódio (10 mmol) como fonte de nitrogênio. SMR1 (estirpe selvagem), Y01 e Y02 (mutantes *ntrY*). As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas.

Figura 16 - Crescimento em nitrato e amônio das estirpes selvagem e mutantes de *H. seropedicae* em meio líquido.



Notas: As células foram crescidas em NFbHP com 5 mM de cloreto de amônio até uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,7 sendo posteriormente re-inoculadas no meio com 10 mM de nitrato de sódio e no meio contendo 20 mM de cloreto de amônio. Alíquotas de 1mL foram retiradas a cada duas horas e analisadas em espectrofotômetro a uma densidade óptica de 600 nm.

5. CONCLUSÕES

H. seropedicae possui genes homólogos a *ntrY* e *ntrX*, indicando a presença de outro sistema de dois componentes envolvidos no metabolismo de nitrogênio.

Análises de seqüência da região contendo os genes *ntrY* e *ntrX* indicam que os dois provavelmente formam um operon

Duas prováveis regiões promotoras foram identificadas: uma a montante ao gene *sun* e outra a montante ao gene *ntrY*.

Foram obtidos dois plasmídeos recombinantes aonde os genes *ntrY* e *ntrX* foram interrompidos pela inserção de um transposon de tetraciclina.

Dois mutantes de simples permuta para o gene *ntrY* a partir de recombinação homóloga com o genoma da *H. seropedicae* estirpe SMR1 foram analisados.

Esses mutantes em *ntrY* apresentaram um fenótipo de ausência de crescimento em nitrato de sódio como fonte de nitrogênio indicando que esse gene possa estar envolvido com a regulação da expressão dos genes do metabolismo e/ou transporte de nitrato em *H. seropedicae*.

6.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. **Nucl. Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARAVIND, L., PONTING, C.P. The cytoplasmatic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signaling proteins. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 176, p. 111-116, 1999.

ATKINSON, M. R., NINFA, A. J.. Mutational analysis of the bacterial signal-transducing protein kinase/phosphatase nitrogen regulator II (NR_{II} or NtrB). **J. Bacteriol.**, v. 175, p.7016-23, 1993.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M. J. A. M.; DOBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 56, p. 365, 1984.

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

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65-73, 1992.

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.**, v. 179, p. 4623-4626, 1997.

BODDEY, R. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBERINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on the nitrogen assimilation of field grown wheat. **Plant soil**, v. 90, p. 109-121, 1986.

BOTHE, H.; KLEIN, B.; STEPHAN, M. P.; DÖBERINER, J. Transformations of inorganic nitrogen by *Azospirillum* spp. **Arch. Microbiol.** v. 130, p. 96-100, 1981.

BULLOCK, W.O.; FERNANDEZ, J.M. XL1-Blue – a high-efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. **Biotechniques**, v.5, p.376-379, 1987.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant-bacteria interaction: endophytic N₂ fixing bacteria. **Cienc. Cult.**, v. 44, p. 310-313, 1992.

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

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

ESPIN, G., ALVAREZ-MORALES, A., CANNON, F., DIXON, R., MERRICK, M. Cloning 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.**, v. 186, p. 518-24, 1982.

FALK, E. C.; JOHNSON, J. L.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J.; KRIEG, N. R. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 36, p. 80-85, 1986.

FISCHER, H.M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiol. Rev.**, v. 58, p. 352-386, 1994.

FOUSSARD, M., CABANTOUS, S., PEDELCOQ, J., GUILLET, V. TRAINER, S., MOUREY, L., BIRCK, C., SAMANA, J. The molecular puzzle of two-component signaling cascades. **Microbes Infect.**, v. 3, p. 417-424, 2001.

FU, H.; BURRIS, R.H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 3168-3175, 1989.

GRANT, S.G.N.; JESSEE, J.; BLOOM, F.R.; HANAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 4645-4649, 1990

HALBLEID, C. M.; LUDDEN, P. W. Regulation of biological nitrogen fixation. **J. Nutr.**, Philadelphia, v. 130, p. 1081-84, 2000.

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

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

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

JAGGI, R.; van HEESWIJK, W.C.; WETERHOFF, H.V.; OLLIS, D.L.; VASUDEVAN, S.G. The two opposing activities of adenylyltransferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction. **EMBO J.**, v.16, p.5562-5571, 1997.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microb.**, v.43, p. 887-891, 1997.

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

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

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

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

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

MERRICK, M. J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes. In PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E. (eds.), **New horizons in nitrogen fixation**. Kluwer Academic Publisher, p. 1-12, 1993.

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

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

MONTEIRO, R.A., SOUZA, E.M., YATES, M.G., PEDROSA, F.O., CHUBATSU, L.S. Fnr is involved in oxygen control of *Herbaspirillum seropedicae* N-truncated NifA protein activity in *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol.** v. 69, p1527-1531, 2003.

NINFA, A.J., BENNETT, R.L. Identification of the site autophosphorylation of the bacterial protein kinase/phosphatase NR_{II}. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 7024-32, 1993.

NIXON, B.T.; RONSON, C.W.; AUSUBEL, F.M. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 83, p. 7850-7854, 1986.

NOINDORF, L. **Clonagem, seqüenciamento e caracterização dos genes *glnK* e *amtB* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2002. 105 p. Dissertação (Mestrado Ciências-Bioquímica) Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná.

PAO, G.M., SAIER, MH Jr. Response regulators of bacterial signal transduction systems: selective domain shuffling during evolution. **J. Mol. Evol.**, v. 40, p. 136-154, 1995.

PARKINSON, J.S. Signal transduction schemes of bacteria. **Cell**, v. 73, p. 857-871, 1993.

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

PEDROSA, F.O., TEIXEIRA, K.R.S.; MACHADO, I.M.O.; 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

PERSUHN, D.C., STEFFENS, M.B.R., PEDROSA, F.O., SOUZA, E.M., YATES, M.G., TEIXEIRA, K.R.; RIGO, L.U. Cloning, sequencing and functional analysis of the *glnAntrBC* operon of *H. seropedicae*. **FEMS microbiol Lett.**, v. 192, p.217-221, 2000.

POOCK, S. R.; LEACH, E. R.; MOIR, J. B. W.; COLE, J. A. Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome *c* nitrite reductase of *Echerichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 23664-23669, 2002.

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

RIGO, L.U., STEFFENS, M.B.R., SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O. *Herbaspirillum seropedicae glnAntrBC operon*, complete sequence. GenBank, no. acesso AF082873. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list_uids=5732037&dopt=GenBank>, 2001.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, 3v. 1989.

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

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

SCHULTZ, J., MILPETZ, F., BORK, P., PONTING, C.P. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 5857-5864, 1998.

SCHWAB, S. **Caracterização parcial dos elementos em CIS responsáveis pela regulação da expressão do operon *glnAntrBC* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2002. 97 p. Dissertação (Mestrado Ciências-Bioquímica) Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná.

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

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

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

SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O., DRUMMOND, M., RIGO, L.U., YATES, M.G. Control of *H. seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 681-684, 1999.

STEWART, V.; BLEDSOE, P. J. Synthetic *lac* operator for studying the nitrate- and nitrite-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems of *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 2104-2111, 2003.

STOCK, J.B., NINFA, A.J., STOCK, A.M. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 53, p. 450-90, 1989.

WASSEM, R., SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O., YATES, M.G. e BUCK, M. Two roles for Integration Host Factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.**, v 35, p. 756-64, 2000.

WASSEM R, PEDROSA F.O., YATES M.G., REGO F., CHUBATSU L.S., RIGO L.U., SOUZA E.M., Control of autogenous activation of *Herbaspirillum seropedicae nifA* promoter by the IHF protein. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 212, p.177-82, 2002.

WEST, A; STOCK, A., Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signalling systems. **Trends Biochem. Sci.**, v.26. p. 369-376, 2001.

WILSON, R.L. LIBBY, S.J., FREET, A.M., BODDICKER, J.D., FAHLEN, T.F., JONES, B.D. Fis, a DNA nucleotid-associated protein, is involved in *Salmonella typhimurium* SPI-1 invasion gene expression. **Mol. Microbiol.**, v. 39, p. 79-88, 2001.

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

ZHULIN I.B., TAYLOR, B.L., DIXON, R. PAS domain S-boxes in Archea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, p. 331-333, 1997.