

STEFAN SCHWAB

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE GENES DE *Herbaspirillum seropedicae*
REGULADOS PELA DISPONIBILIDADE DE AMÔNIO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Profa. Dra. Liu Un Rigo

Co-orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Curitiba

Novembro 2006

STEFAN SCHWAB

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE GENES DE *Herbaspirillum seropedicae*
REGULADOS PELA DISPONIBILIDADE DE AMÔNIO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Profa. Dra. Liu Un Rigo

Co-orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Curitiba

Novembro 2006

Orientador: Profa. Dra. Liu Un Rigo

Co-orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Liu Un Rigo pela orientação neste trabalho e amizade. Ao Prof. Dr. Emanuel M. de Souza pela co-orientação e participação.

Ao Prof. Dr. Fábio de O. Pedrosa e ao Núcleo de Fixação de Nitrogênio pela oportunidade do trabalho de doutorado em seu laboratório e contribuição.

Aos Profs. Drs. Leda S. Chubatsu, M. Berenice R. Steffens, Leonardo M. Cruz e Rose A. Monteiro por toda sua colaboração.

Ao Dr. M. Geoffrey Yates pela revisão crítica do manuscrito.

Aos Drs. Humberto J. de O. Ramos, Carolina W. Galvão, Salah M. AlJanabi, Guilherme L. Sasaki e Alan G. Gonçalves pelo suporte técnico.

Ao Dr. Ray Dixon pela discussão.

Ao Programa Genopar por ceder dados de seqüências de DNA da bactéria *H. seropedicae*.

Aos Drs. J. J. Dennis e G. Z. Zylstra por ceder o plasmídeo precursor pTnMod-OGm.

A Valter Baura, Roseli Prado e Julieta Pie pela assistência técnica.

Ao Dr. David Galbraith pela oportunidade do estágio de doutorando em seu laboratório, aos Drs. Jeremy D. Edwards, Ambika Gaikwad, Jaroslav Janda, Chanqing Zhang e Roger Barthelson por sua contribuição no trabalho de estágio, e a Georgina Lambert e Leukena Cheam pela assistência técnica durante o mesmo.

Às agências CNPq (Demanda Espontânea), CAPES (PDEE), PRONEX (FINEP/CNPq/MCT), CNPq/PADCT III, Paraná Tecnologia e Fundação Araucária pelo financiamento deste trabalho.

Aos colegas, amigos e familiares por todo o suporte à execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE EQUAÇÕES.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	1
1.2 COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA POR DIAZOTROFOS.....	6
1.3 MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO EM BACTÉRIAS.....	10
1.4 ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PROTEOBACTÉRIAS	12
1.5 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	23
1.6 OBJETIVOS.....	27
1.6.1 Objetivo Geral.....	27
1.6.2 Objetivos Específicos	27
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1 ESTIRPES, MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	28
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>.....	28
2.1.2 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	28
2.2 PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS PELA TÉCNICA DA LISE ALCALINA.....	29
2.3 CLIVAGEM DE DNA POR ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	30
2.4 ELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR OU AGAROSE	30
2.5 LIGAÇÃO DE DNA	30
2.6 TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO	31
2.6.1 Preparação de células eletrocompetentes	31
2.6.2 Eletroporação	31
2.7 ENSAIO DE ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE.....	32
2.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	33
2.9 PREPARAÇÃO DE DNA CROMOSSÔMICO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	34
2.10 CONSTRUÇÃO E CLONAGEM DO PLASMÍDEO MUTAGÊNICO pTnMod-OGmKmlacZ	35
2.11 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES ALVOS DE INSERÇÃO	37
2.11.1 Preparação da amostra de DNA.....	37
2.11.2 Reação de seqüenciamento.....	38
2.11.3 Edição e análise das seqüências	39
2.12 TESTES DE FISILOGIA	40
2.13 INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO NO SOBRENADANTE DE CULTURAS DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	40
2.13.1 Quantificação de compostos de indol	40
2.13.2 Detecção de ácido indol-3-acético por cromatografia em camada delgada	41
3 RESULTADOS.....	43
3.1 OBTENÇÃO DO PLASMÍDEO pTnMod-OGmKmlacZ PARA A MUTAGÊNESE ALEATÓRIA DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	43
3.2 CONSTRUÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DE UMA BIBLIOTECA DE MUTANTES ALEATÓRIOS DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	44
3.3 OBTENÇÃO DE UMA COLEÇÃO DE MUTANTES <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z78 COM PADRÃO DE EXPRESSÃO <i>lacZ</i> DIFERENCIAL.....	45
3.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ORFS CONTENDO INSERÇÃO OGmKmlacZ COM PADRÃO DE EXPRESSÃO <i>lacZ</i> DIFERENCIAL	51
3.5 EFEITOS FISIOLÓGICOS DAS MUTAÇÕES E EXPRESSÃO DOS GENES ALVOS DE INSERÇÃO EM FONTES VARIADAS DE NITROGÊNIO	62

3.6 PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA NITRILA HIDRATASE NO METABOLISMO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	70
3.7 IDENTIFICAÇÃO DE PROVÁVEIS ELEMENTOS DE REGULAÇÃO NAS SEQUÊNCIAS A MONTANTE DOS GENES ALVOS DE INSERÇÃO REGULADOS POR AMÔNIO	72
4 DISCUSSÃO	81
5 CONCLUSÕES	93
ADENDO	94
A1 INTRODUÇÃO	95
A1.1 JUSTIFICATIVA	95
A1.2 EXPERIMENTOS EM MICROARRANJO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS E MÉTODOS DE DETECÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO	97
A1.3 OBJETIVOS	102
A1.3.1 Objetivo geral	102
A1.3.2 Objetivos específicos	102
A2 MATERIAL E MÉTODOS	103
A2.1 AMOSTRAGEM BIOLÓGICA E PREPARAÇÃO DO RNA TOTAL	103
A2.2 PURIFICAÇÃO DE RNA	104
A2.3 MARCAÇÃO DE RNA POR FLUORÓFOROS	104
A2.3.1 Marcação pelo método envolvendo incorporação de aa-UTP	105
A2.3.2 Marcação pelo método ULS™	107
A2.4 CARACTERÍSTICAS DO <i>CHIP</i> DE MICROARRANJO, HIBRIDIZAÇÃO E AQUISIÇÃO DOS DADOS	108
A3 RESULTADOS	110
A4 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS	117
REFERÊNCIAS	119
ANEXOS	142
1 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO INDEXADO	142
2 CARTA DE RECOMENDAÇÃO DO ORIENTADOR ESTRANGEIRO, REFERENTE AO TRABALHO DE ESTÁGIO DE DOUTORANDO	143

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – COMPARAÇÃO ENTRE AS CASCATAS REGULATÓRIAS QUE CONTROLAM A TRANSCRIÇÃO DOS GENES <i>nif</i> NO DIAZOTROFO DE VIDA LIVRE <i>Klebsiella pneumoniae</i> E NOS DIAZOTROFOS SIMBIÓTICOS <i>Sinorhizobium meliloti</i> E <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	4
FIGURA 2 – SISTEMAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS QUE CONTROLAM A TRANSCRIÇÃO DOS GENES <i>ntf</i> E O ESTADO DE ADENILILAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE EM <i>Escherichia coli</i>	13
FIGURA 3 – MODELO DO SISTEMA GlnK/AmtB EM BACTÉRIAS	16
FIGURA 4 – MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pKOK6 E SEU CASSETE <i>lacZ-Km^r</i>	36
FIGURA 5 – MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pTnMod-OGm	36
FIGURA 6 – MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pTnMod-OGmKmlacZ	44
FIGURA 7 – COBERTURA RELATIVA DO GENOMA DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> PELA ESTRATÉGIA DA MUTAGÊNESE ALEATÓRIA ENVOLVENDO O PLASMÍDEO pTnMod-OGmKmlacZ.....	46
FIGURA 8 – ENSAIO DE EXPRESSÃO <i>lacZ</i> DIFERENCIAL DAS ESTIRPES MUTANTES RESISTENTES A CANAMICINA E GENTAMICINA EM NH ₄ Cl 2 E 20 mmol/L.....	47
FIGURA 9 – INDUÇÃO/REPRESSÃO DOS GENES ALVOS DE INSERÇÃO NAS 59 ESTIRPES MUTANTES CULTIVADAS EM BAIXA CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIO	51
FIGURA 10 – MAPAS DAS INSERÇÕES NO GENOMA DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	56
FIGURA 11 – CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DOS PRODUTOS DOS GENES REGULADOS POR AMÔNIO	61
FIGURA 12 – EFEITO DA MUTAÇÃO SOBRE A UTILIZAÇÃO DE ALGUNS COMPOSTOS NITROGENADOS E VARIAÇÃO APARENTE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE ALVO DE INSERÇÃO NAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	65
FIGURA 13 – COMPARAÇÃO ENTRE AS ESTIRPES MUTANTE NITRILA HIDRATASE (S31) E SELVAGEM (Z78) DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> QUANTO AO PERFIL DE EXCREÇÃO DE COMPOSTOS DE INDOL.....	71
FIGURA 14 – COMPARAÇÃO ENTRE AS ESTIRPES MUTANTE NITRILA HIDRATASE (S31) E SELVAGEM (Z78) DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> QUANTO AO PERFIL DE EXCREÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA)	72

FIGURA 15 – SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DAS REGIÕES A MONTANTE DOS GENES ALVOS DE INSERÇÃO REGULADOS POR AMÔNIO CONTENDO PROVÁVEIS ELEMENTOS REGULATÓRIOS.....	75
FIGURA 16 – REGIÃO PROMOTORA DO OPERON <i>guaBA</i> DE <i>Escherichia coli</i>	89
FIGURA 17 – ESQUEMA DA REAÇÃO DE MARCAÇÃO DO MÉTODO ULS™.	100
FIGURA 18 – ESQUEMA DA SEQÜÊNCIA DE REAÇÕES PELO KIT AMINO ALLYL MESSAGEAMP™ II.	106
FIGURA 19 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ULS™ E POR INCORPORAÇÃO DE aa-UTP PARA A MARCAÇÃO DE RNA VEGETAL DURANTE ENSAIOS DE HIBRIDIZAÇÃO EM MICROARRANJO DE DNA	111
FIGURA 20 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ULS™ E POR INCORPORAÇÃO DE aa-UTP PARA A MARCAÇÃO DE RNA VEGETAL DURANTE ENSAIOS DE HIBRIDIZAÇÃO EM MICROARRANJO DE DNA	113
FIGURA 21 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS DADOS DE HIBRIDIZAÇÃO NORMALIZADOS.....	116

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FATORES SIGMA DE <i>Escherichia coli</i>	12
TABELA 2 – OPERONS DE <i>Escherichia coli</i> ATIVADOS POR NtrC/Nac.....	21
TABELA 3 – ATIVIDADE ESPECÍFICA DE β-GALACTOSIDASE DAS 131 ESTIRPES MUTANTES SELECIONADAS PELO TESTE EM X-GAL	48
TABELA 4 – IDENTIDADES MAIS PROVÁVEIS DE 32 GENES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> REGULADOS CONFORME A CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIO NO MEIO	53
TABELA 5 – CONTEÚDO PROTEICO DAS ESTIRPES CULTIVADAS EM N ₂ COMO FONTE ÚNICA DE NITROGÊNIO	63
TABELA 6 – EFEITO DA MUTAÇÃO SOBRE A UTILIZAÇÃO DE N ₂ , NaNO ₃ E AMINOÁCIDOS, E VARIAÇÃO APARENTE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE ALVO DE INSERÇÃO, NAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	68
TABELA 7 – COMPARAÇÃO DE CUSTOS ENTRE OS MÉTODOS ULS™ E POR INCORPORAÇÃO DE aa-UTP.....	101

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 ($N_2 + 8 e^- + 8 H^+ + 16 MgATP \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 MgADP + 16 P_i$).....	2
Equação 2 (Atividade específica _{β-galactosidase} = $\frac{D.O_{415} \times 255 \text{ nmol ONP}}{V \times t \times [\text{prot}]}$),.....	33
Equação 3 ($k - k(1 - p)^n = 5000 - 5000 \times (1 - 1,9 \cdot 10^{-4})^{2700} \cong 2000$),.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

aa-UTP = aminoalil-uridina-trifosfato

AIA = ácido indol-3-acético

AR = atividade removedora de adenilil

aRNA = RNA amplificado

AT = atividade de adenilil transferase

BSA = albumina de soro bovino

ddH₂O = água destilada e desionizada

EBP = “*enhancer-binding protein*” ou proteína ligadora de seqüências estimuladoras

FBN = fixação biológica de nitrogênio

GDH = glutamato desidrogenase

GOGAT = glutamato sintase

GS = glutamina sintetase

LB = meio de cultura Luria Bertani

MES = ácido 2-(N-morfolino)etano-sulfônico

ONP = *o*-nitrofenol

ONPG = *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo

pb = pares de bases

PNA = ácido nucleico peptídico

RNAP = RNA polimerase

SDS = dodecil sulfato de sódio

UR = atividade removedora de uridilil

UT = atividade de uridilil transferase

UTase = uridilil transferase

X-GAL = 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

RESUMO

A metodologia de mutagênese aleatória utilizando transposon com gene repórter sem promotor tem sido amplamente utilizada para determinar padrões de expressão diferencial de genes em bactérias. Baseando-se nesta metodologia, foi desenvolvido um procedimento para a identificação de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados em resposta à concentração de amônio, que envolveu a construção de um plasmídeo mutagênico. O procedimento permitiu a identificação de vinte e seis genes distintos da bactéria endofítica fixadora de nitrogênio regulados de acordo com a concentração de amônio. Dentre estes, nove genes codificam proteínas envolvidas no transporte de compostos nitrogenados, como o que codifica o transportador de amônio de alta afinidade AmtB e os que codificam sistemas de captação de fontes alternativas de nitrogênio; outros nove genes produzem proteínas responsáveis por restabelecer os níveis intracelulares de amônio através de reações enzimáticas, tais como a nitrogenase, amidase e arginase; e um terceiro grupo constituiu-se de quatro genes que codificam interruptores metabólicos (quinases sensoras e fatores de regulação de transcrição), dois dos quais constituindo prováveis pares sensor/regulador de dois componentes. Além desses, outros quatro genes identificados não têm função conhecida. Este trabalho descreve o envolvimento desses oito últimos genes na resposta à limitação de amônio. O procedimento desenvolvido permitiu analisar fisiologicamente os produtos de tradução dos genes regulados por amônio; por exemplo, verificou-se que as proteínas FixB e uma do tipo HesB estão envolvidas na fixação de nitrogênio em *H. seropedicae*. Um dos genes ativado em condições limitantes de amônio, e que codifica uma nitrila hidratase, poderia participar na biossíntese do fito-hormônio ácido indol-3-acético (AIA) (o que ocorre em algumas outras espécies) e a produção dessa auxina poderia ser aumentada em baixa concentração de amônio, conforme indicado pelo aumento da expressão da enzima nestas condições. Contrariando a hipótese inicial, não foi detectado um papel importante para essa enzima na produção daquele composto; além disso, a produção de AIA por *H. seropedicae* só foi significativa em alta concentração de amônio. Os

resultados forneceram um perfil preliminar da resposta metabólica de *H. seropedicae* ao estresse por amônio.

ABSTRACT

Random mutagenesis using transposons with promoterless reporter genes has been widely used to determine differential gene expression patterns in bacteria. By following this methodology, a procedure for identifying *Herbaspirillum seropedicae* genes regulated in response to ammonium concentration was developed, and this was achieved by constructing a mutagenic plasmid. The procedure has permitted the identification of twenty-six distinct genes of the endophytic nitrogen-fixing bacterium regulated in response to ammonium content. Among these, nine code for proteins involved in the transport of nitrogen compounds, such as that which codes the high-affinity ammonium transporter AmtB, and those which code uptake systems for alternative nitrogen sources; other nine genes produce proteins responsible for restoring intracellular ammonium levels through enzymatic reactions, such as nitrogenase, amidase and arginase; and a third group was composed by four genes that code for metabolic switches (sensor kinases and transcription regulation factors), and two of these may constitute two-component sensor/regulator pairs. Also, other four genes identified were of unknown function. This study describes the involvement of these latter eight genes in response to ammonium limitation. The developed procedure permitted to analyze physiologically the translation products of ammonium-regulated genes; for example, the involvement of the FixB and a HesB-like *H. seropedicae* proteins in nitrogen fixation was shown. A gene activated under low ammonium and coding for a nitrile hydratase might participate in the biosynthesis of the phytohormone indole-3-acetic acid (IAA) (which occurs in determined species) and the auxine production might be increased under low ammonium conditions, as suggested by the increased enzyme expression levels under those conditions. In contrast to the initial hypothesis, no important role was detected for this enzyme in producing that compound; also, IAA production by *H. seropedicae* only occurred under high ammonium concentration. The results provided a preliminary profile of the metabolic response of *H. seropedicae* to ammonium stress.

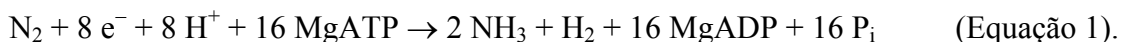
1 INTRODUÇÃO

1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) consiste na conversão de nitrogênio atmosférico em amônia por bactérias simbióticas, associativas e de vida livre, tendo uma importância enorme para o meio ambiente e a agricultura. A FBN é uma parte importante do ciclo do nitrogênio, pois reabastece com nitrogênio a biosfera e compensa as perdas provindas do processo de desnitrificação (DIXON e KAHN, 2004). A utilização crescente de fertilizantes químicos, que constitui a maior interferência no ciclo do nitrogênio pelo homem, tem gerado preocupação quanto à emissão de óxidos de nitrogênio, acidificação dos solos e eutroficação das águas. O nitrogênio que provém da FBN é menos propenso à lixiviação e volatilização, pois é utilizado *in situ*, sendo assim um insumo importante e sustentável para a agricultura.

Embora a FBN não seja encontrada em eucariotos, é amplamente distribuída em bactérias e arqueas, mostrando grande biodiversidade entre os organismos diazotróficos, *i.e.*, os que fixam nitrogênio e são capazes de crescer utilizando N₂ como fonte única de nitrogênio. Os diazotrofos são encontrados em uma ampla variedade de habitats, incluindo os de vida livre em solos e água, ou em simbiose associativa com gramíneas, nos intestinos de cupim, do tipo actinorriza (entre plantas que formam nódulos nas raízes e actinomicetos fixadores de nitrogênio), entre cianobactérias e plantas diversas, e em nódulos de raízes de leguminosas (DIXON e KAHN, 2004).

As nitrogenases, que catalisam a redução biológica de dinitrogênio em amônia, são metaloenzimas complexas com características estruturais e mecánísticas conservadas (REES e HOWARD, 2000; LAWSON e SMITH, 2002). Estas enzimas contêm dois componentes que são denominados de acordo com sua composição metálica. O componente menor, dimérico, conhecido como proteína ferro (Fe), funciona como um doador de elétrons dependente de ATP para o componente maior heterotetramérico, conhecido como proteína molibdênio-ferro (MoFe), que contém o sítio catalítico da enzima. A estequiometria global da redução do dinitrogênio em condições ótimas é:



O mecanismo da enzima requer a redução da proteína Fe por doadores de elétrons como a ferredoxina e a flavodoxina, a transferência de elétrons da proteína Fe para a proteína MoFe (que é dependente da hidrólise de MgATP) e, finalmente, a transferência interna de elétrons do grupamento P para o cofator FeMo do sítio de ligação do substrato na proteína MoFe.

A estequiometria mínima de dois MgATP hidrolisados por elétron que é transferido em cada passo no ciclo catalítico da nitrogenase representa uma demanda considerável de energia (DIXON e KAHN, 2004). Além disso, o longo período de “*turnover*” da enzima requer que os diazotrofos sintetizem grandes quantidades de nitrogenase (quase 20% do conteúdo proteico total de uma célula) para utilizar dinitrogênio como fonte única de nitrogênio. Assim, a síntese da nitrogenase é estritamente regulada ao nível de transcrição em resposta à disponibilidade de nitrogênio no meio.

A sensibilidade da nitrogenase ao oxigênio também impõe restrições fisiológicas consideráveis à diazotrofia, pois existe uma obrigação de proteger a enzima dos danos por oxigênio. Na maioria dos diazotrofos, uma rede diversa de estratégias fisiológicas é utilizada para prover proteção contra oxigênio, incluindo evitar oxigênio através de crescimento anaeróbico, consumo do oxigênio pela respiração, barreiras contra difusão de oxigênio, ou a compartimentalização da enzima espacial ou temporalmente (DIXON e KAHN, 2004). O nódulo de simbiose de raízes de leguminosas é um exemplo de tal estratégia em que o córtex do nódulo é uma barreira contra a difusão de oxigênio. As dificuldades em conciliar a fixação de nitrogênio com a presença de oxigênio também são refletidas ao nível da expressão da nitrogenase: a regulação da transcrição dos genes da fixação de nitrogênio (*nif*) nos diazotrofos ocorre em resposta à concentração externa de oxigênio.

Além da regulação ao nível de transcrição, a atividade de nitrogenase também está sujeita a regulação pós-tradução em alguns diazotrofos. Em *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* e *Azospirillum brasilense*, esse processo é mediado por ADP-ribosilação da proteína Fe da nitrogenase pela proteína DraT (dinitrogenase

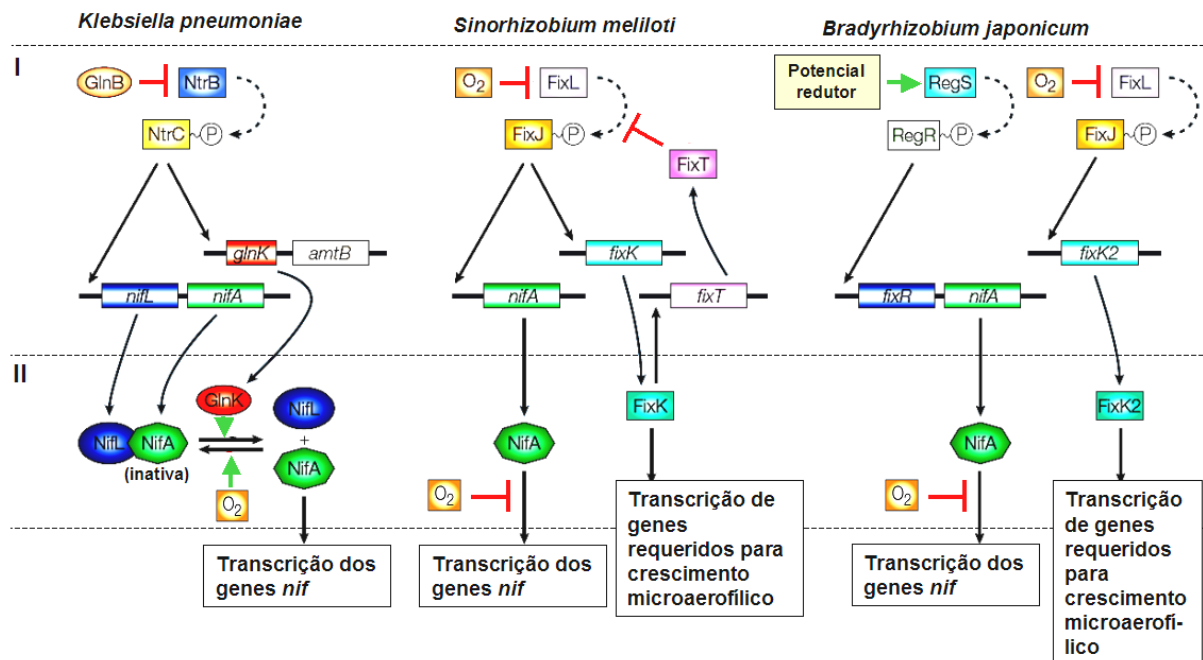
redutase ADP-ribosiltransferase), que inativa a nitrogenase em resposta à concentração de amônio e à intensidade de luz (DIXON e KAHN, 2004). A modificação covalente da nitrogenase é revertida pela proteína DraG (glico-hidrolase ativadora da dinitrogenase redutase), que remove o grupamento ADP-ribose em condições apropriadas à fixação de nitrogênio (HALBLEIB *et al.*, 2000; MASEPOHL *et al.*, 2002).

Em Proteobactérias, os genes *nif* são sujeitos a ativação da transcrição pela proteína NifA (um membro da família das proteínas ligadoras de seqüências estimuladoras – “*enhancer-binding proteins*” ou EBPs), em conjunto com o fator σ^{54} da RNA polimerase. A proteína NifA tem uma arquitetura de domínios que é similar a outros membros da família de proteínas que ligam seqüências ativadoras, em que um domínio central conservado AAA⁺ ATPase é flanqueado por um domínio N-terminal regulador e um domínio C-terminal que liga DNA, que por sua vez contém um motivo hélice-volta-hélice necessário para o reconhecimento das seqüências estimuladoras (DIXON e KAHN, 2004).

A co-dependência de σ^{54} -RNA polimerase e NifA para a formação do complexo aberto e o início da transcrição nos promotores dos genes *nif* assegura que a expressão destes últimos seja estritamente regulada. NifA é o principal regulador da fixação de nitrogênio e, embora as cascatas reguladoras sejam variadas, cada circuito regulatório resulta na regulação da expressão de NifA ou na modulação de sua atividade em resposta a oxigênio e/ou nitrogênio assimilado (DIXON e KAHN, 2004).

Nas Proteobactérias diazotróficas, o sistema regulador de dois componentes NtrB/NtrC (1.4) normalmente controla a expressão de NifA. Nos diazotrofos simbióticos, a transcrição de *nifA* e dos genes *fix* é predominantemente controlada pelo sistema de dois componentes que responde a oxigênio FixL/FixJ, junto com FixK, que é membro da superfamília Crp-Fnr, ou pelo sistema sensor redox RegS/RegR (Fig. 1). Estratégias diferentes são usadas para controlar a atividade de NifA de modo a prover um segundo nível de hierarquia regulatória. Em muitas Proteobactérias diazotróficas, a atividade de NifA é regulada em resposta à fonte de nitrogênio e parece ser intrinsecamente sensível a oxigênio (DIXON e KAHN, 2004).

FIGURA 1 – COMPARAÇÃO ENTRE AS CASCATAS REGULATÓRIAS QUE CONTROLAM A TRANSCRIÇÃO DOS GENES *nif* NO DIAZOTROFO DE VIDA LIVRE *Klebsiella pneumoniae* E NOS DIAZOTROFOS SIMBIÓTICOS *Sinorhizobium meliloti* E *Bradyrhizobium japonicum*



Os efeitos ativadores são mostrados em verde, os efeitos inibidores são mostrados em vermelho. Em *K. pneumoniae*, o primeiro nível na cascata (I) envolve o sistema de dois componentes regulado por nitrogênio NtrB/NtrC, que é antagonizado pela interação da proteína PII (GlnB) em resposta aos níveis de nitrogênio assimilado. Em contraste, em *S. meliloti* o primeiro nível da cascata envolve o sistema de dois componentes sensível a oxigênio FixL/FixJ, e em *B. japonicum* os sistemas sensíveis a oxigênio FixL/FixJ e ao estado redox RegS/RegR. Em *K. pneumoniae*, o segundo nível da cascata (II) envolve a regulação da atividade de NifA pelo antiativador NifL sensível ao estado redox em resposta a oxigênio e níveis de nitrogênio assimilado através da interação com a proteína GlnK. As proteínas do tipo NifL não estão presentes em *S. meliloti* ou *B. japonicum* e, diferentemente de *K. pneumoniae*, a atividade de NifA é sensível a oxigênio. O papel de FixK na cascata regulatória varia entre os diversos diazotrofos simbióticos. Em *S. meliloti*, a expressão de FixK é regulada negativamente por FixT, que inibe a atividade de FixL (FOUSSARD *et al.*, 1997; GARNERONE *et al.*, 1999). NtrC e NifA são proteínas estimuladoras da transcrição que interagem com a σ^{54} -RNA polimerase. Figura adaptada de DIXON e KAHN (2004).

Na subdivisão γ das Proteobactérias e em *Azoarcus* spp., *nifA* é co-transcrito com *nifL*, que codifica uma proteína anti-ativadora que regula a atividade de NifA em resposta a oxigênio e nitrogênio assimilado (vide exemplo de *Klebsiella pneumoniae*, Fig. 1). Em contraste com os sistemas de dois componentes clássicos, NifL não regula

a atividade de NifA por um mecanismo de transferência de fosfato, mas interage com NifA para formar um complexo inibidor em condições impróprias à fixação de nitrogênio (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004a). Quando ativada por estímulos ambientais, NifL inibe a atividade de ATPase do domínio AAA⁺ em resposta a determinados estímulos ambientais (BARRETT *et al.*, 2001; MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004a). As funções antagonísticas dessas cascatas funcionam no controle da transcrição dos genes *nif* de um modo hierárquico. Nos diazotrofos de vida livre, o primeiro nível da cascata permite a transcrição dos genes reguladores específicos para os genes *nif* em condições de limitação de nitrogênio, enquanto o segundo nível consiste na detecção mais estrita da concentração de nitrogênio em adição à detecção de oxigênio/estado redox (vide exemplo de *K. pneumoniae*, Fig. 1; DIXON e KAHN, 2004). O segundo passo da cascata possibilita assim a integração dos sinais antagonísticos de oxigênio e nitrogênio assimilado.

Em contraste, a cascata de regulação em simbioses providencia controle hierárquico em resposta a diferentes concentrações de oxigênio ou ao ambiente redox (vide exemplos de *Bradyrhizobium japonicum* e *Sinorhizobium meliloti*, Fig. 1). Em *B. japonicum*, o sistema FixL/FixJ induz a expressão a partir de seqüências promotoras em até 5% de oxigênio na fase gasosa, enquanto que a expressão de genes dependentes de NifA é induzida efetivamente em até 0,5% de oxigênio. Propôs-se que a expressão dos genes ativados por FixL/FixJ permite à bactéria a adaptação do seu metabolismo respiratório ao ambiente microaerofílico do nódulo, enquanto que a sensibilidade ao oxigênio de NifA é compatível com as condições de baixo oxigênio requeridas à atividade de nitrogenase em zonas determinadas do nódulo (SCIOTTI *et al.*, 2003).

Quatro proteínas que regulam a fixação de nitrogênio são sensoras de oxigênio/estado redox: a quinase de histidina FixL, a quinase de histidina RegB (também conhecida como PrrB, RegS ou ActS em diferentes sistemas), o anti-ativador NifL e o ativador dependente de σ^{54} NifA (que só é sensível a oxigênio nos diazotrofos que não têm NifL). As estruturas de domínios de FixL e NifL são análogas, embora como explicado anteriormente, NifL não seja uma quinase de histidina. Ambas as proteínas contêm domínios N-terminais PAS, normalmente encontrados em sensores

de oxigênio, estado redox, voltagem, ou de luz em procariotos e eucariotos (TAYLOR e ZHULIN, 1999). Porém o método de detecção difere em cada caso: o domínio PAS de FixL contém um grupamento prostético heme, enquanto NifL contém flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) (GILLES-GONZALEZ *et al.*, 1991; HILL *et al.*, 1996). A ligação reversível de oxigênio à fração heme de FixL regula a atividade de quinase e, conseqüentemente, o estado de fosforilação de FixJ. Na ausência de oxigênio, FixL autofosforila e transfere o grupamento fosforila para FixJ (TUCKERMAN *et al.*, 2002). Quando FixJ é fosforilada, induz sua dimerização e ativa-a como fator de transcrição (DA RE *et al.*, 1999). Por outro lado, a ligação de oxigênio à fração heme de FixL desativa a atividade de quinase.

1.2 COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA POR DIAZOTROFOS

Existe uma necessidade crescente, em todas as culturas agrícolas, de aumentar a resistência a vírus e insetos daninhos, a tolerância a sais, seca e calor, de melhorar a qualidade de grãos e outros produtos, e de, principalmente, melhorar os sistemas de fixação de nitrogênio (CONWAY, 1999; COCKING, 2003). Os biofertilizantes, de natureza microbiana e vegetal, aumentam o crescimento da cultura através de combinações entre FBN, síntese de substâncias promotoras do crescimento ou hormonais, aumento da disponibilidade de nutrientes no solo e controle das doenças. A importância dos biofertilizantes deve-se à sua capacidade de suplementar/mobilizar nutrientes do solo com o uso mínimo de fontes não renováveis (COCKING, 2003). O melhoramento da FBN é particularmente importante para as principais gramíneas do mundo: arroz, trigo e milho.

São conhecidos três modos de entrada de organismos fixadores de nitrogênio em raízes (por vezes caules): a) através de fissuras, particularmente onde raízes laterais ou adventícias emergem; b) através de pêlos radiculares; e c) entre células epidérmicas intactas. Há três grupos principais de organismos fixadores de nitrogênio heterotróficos que se associam a raízes: a) rizóbios, b) *Frankia*, e c) outras bactérias, incluindo *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. A propagação subsequente de endófitos pode ser através dos espaços intercelulares, ou atravessando

paredes, quando as bactérias ficam confinadas pelas paredes celulares do hospedeiro, formando cordões de infecção (SPRENT e DE FARIA, 1987). Os pêlos radiculares, que se desenvolvem como extensões de células epidérmicas da raiz perto do ápice são colonizadas extensivamente por microrganismos do solo, incluindo bactérias fixadoras de nitrogênio. Na rizosfera (nicho de interface entre solo e raízes), pêlos radiculares em desenvolvimento têm um papel importante na interação com o microrganismo. Por exemplo, os rizóbios, quando secretam os fatores Nod (oligossacarídeos de lipoquitina), estimulam a reorientação do crescimento da parede celular de pêlos radiculares, resultando em pêlos radiculares retorcidos. Dentro destes, os fatores Nod promovem a formação de fissuras de infecção, e é através destas estruturas tubulares que os rizóbios invadem a maioria de seus hospedeiros (PERRET *et al.*, 2000).

A inoculação de diversas bactérias diazotróficas, como *Azospirillum* e *Azotobacter*, em não-leguminosas (especialmente gramíneas) tem uma história longa. Medidas de quantidade de nitrogênio fixado em arroz e trigo utilizando ^{15}N têm confirmado que a maior parte do nitrogênio fixado permanece dentro da bactéria inoculante, no ambiente rizosférico (OKON, 1985). A elevada taxa de crescimento observada resultou provavelmente da capacidade da bactéria em sintetizar hormônios vegetais. Perturbações no equilíbrio da relação auxina/citoquinina podem levar a uma aceleração no crescimento da raiz. Mutantes incapazes de produzir ácido indol-3-acético perderam a capacidade de estimular o crescimento vegetal em condições de laboratório (DOBBELEARE *et al.*, 1999; BURDMAN *et al.*, 2000; LAMBRECHT *et al.*, 2000). Na maioria dos casos, as bactérias inoculantes colonizam somente a superfície das raízes e permanecem vulneráveis à competição com outros microrganismos da rizosfera (QUISPEL, 1991). Entretanto, o uso de inoculantes como biofertilizantes tornou-se comum em muitas regiões do globo com o objetivo de reduzir a aplicação de fertilizantes e pesticidas industriais potencialmente poluentes (BURDMAN *et al.*, 2000).

Tem-se sugerido que elementos do xilema da planta são sítios prováveis para a fixação de nitrogênio por diazotrofos, pois esses elementos poderiam disponibilizar o nível baixo de $p\text{O}_2$ requerido e o sítio para a troca de metabólitos necessários à FBN

(JAMES *et al.*, 1994; ROLFE *et al.*, 1998). Esta possibilidade de um nicho não-nodular para a fixação endofítica de nitrogênio em gramíneas e outras não-leguminosas tem estimulado bastante a realização de experimentos objetivando o estabelecimento de diazotrofos nos espaços intercelulares. *Azorhizobium caulinodans* estirpe ORS571 invade as raízes de trigo e arroz pelos pontos de emergência de raízes laterais (fendas de raízes laterais) (REDDY *et al.*, 1997; WEBSTER *et al.*, 1997). De modo interessante, o flavonóide naringenina a 50 µmol/L estimulou significativamente a colonização interna da raiz. Foi verificado que a colonização interna de raízes laterais é independente do fator Nod e de NodD (WEBSTER *et al.*, 1998). Estudos utilizando genes repórteres em fusão com genes *nif* demonstraram a fixação de nitrogênio *in planta* por *Azoarcus* sp. BH72 associado com arroz e capim de Kallar (HUREK *et al.*, 1994; REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998); por *Herbaspirillum rubrisubalbicans* associado com cana-de-açúcar e sorgo (OLIVARES *et al.*, 1997; JAMES *et al.*, 1997); por *A. brasilense* com trigo (VANDE BROEK *et al.*, 1993; ARSENE *et al.*, 1994; KATUPITIYA *et al.*, 1995); por *Alcaligenes faecalis* A15 e *Azospirillum irakense* com arroz (VERMEIREN *et al.*, 1998); por *H. seropedicae* SMR1 com trigo, milho, sorgo e arroz (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003); e da ativação do gene *nodD* de *A. caulinodans* em trigo (WEBSTER *et al.*, 1997). Além disso, diversas gramíneas inoculadas com diazotrofos exibiram níveis elevados de atividade de redução de acetileno (BALDANI e BALDANI, 2005). Quando cultivadas assepticamente, mudas de arroz foram tratadas com o flavonóide naringenina e inoculadas com ORS571(pXLGD4), que contém o gene repórter *lacZ*, e análises microscópicas demonstraram que o xilema fôra colonizado por *A. caulinodans* (GOPALASWAMY *et al.*, 2000). A verificação de uma associação benéfica envolvendo a promoção do crescimento vegetal por *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii em raízes de arroz (YANNI *et al.*, 2001) foi particularmente relevante em verificar se rizóbios podem fixar N₂ endossimbioticamente em gramíneas. Foi concluído que os benefícios dessa associação, levando a uma produção maior de biomassa vegetativa e reprodutiva, mais provavelmente envolveu a modulação pelo

rizóbio da arquitetura da raiz para uma aquisição mais eficiente de determinados nutrientes do solo, em vez da fixação de nitrogênio.

Estas e outras observações similares têm levantado algumas questões, como: a) o quão específica é a colonização do xilema; b) se a colonização do xilema é restrita ao sistema da raiz ou ocorre a nível sistêmico; c) se o número de bactérias diazotróficas é suficiente para disponibilizar quantidades benéficas de nitrogênio fixado para o hospedeiro não-leguminoso; e d) se o xilema colonizado disponibiliza um nível de pO_2 adequado e um nicho nutritivo para a expressão dos genes *nif*.

É de se realçar que, embora diazotrofos endofíticos como *A. caulinodans*, *Azoarcus* spp., *Herbaspirillum* spp. e algumas estirpes de *Azospirillum* sejam capazes de colonizar o córtex da raiz, não se estabelecem intracelularmente em células vivas. Pelo contrário, colonizam o apoplasto, incluindo os espaços intercelulares, os elementos do xilema e outras células mortas como as que compreendem o aerênquima lisigenoso em arroz e capim de Kallar (JAMES, 2000). Então, outra questão surge: será esta uma limitação ao fornecimento de quantidades benéficas de nitrogênio fixado para a planta hospedeira? Se sim, como os estudos da rizosfera e das interações micróbio-planta poderiam ajudar? (COCKING, 2003)

Em termos agrícolas, uma das associações não-nodulares mais promissoras ocorre entre *G. diazotrophicus* e cana-de-açúcar (BODDEY *et al.*, 2003). Mesmo assim, estudos de inoculação com diazotrofos mostraram que as bactérias endofíticas (*e.g.*, *H. seropedicae*) têm um potencial muito maior para contribuir com a FBN, síntese de substâncias promotoras do crescimento ou hormonais, aumento da disponibilidade de nutrientes e controle das doenças do que os diazotrofos associativos, uma vez que, neste caso, essas atividades ocorrem garantidamente no local desejado, *i.e.*, dentro da planta; além disso, os endófitos estão espacialmente separados da flora rizosférica, estando à parte da competição por nutrientes que ocorre nesse nicho (COCKING, 2003; BALDANI e BALDANI, 2005).

1.3 MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO EM BACTÉRIAS

Os microrganismos têm a capacidade de se adaptar ao ambiente, e os que não mostram tal característica correm o risco de serem eliminados. O fundamento para a sobrevivência bacteriana em condições de ambiente em alteração é a sua adaptabilidade em diferentes situações de estresse (JAIN *et al.*, 2006). A resposta causada por uma mudança no ambiente ou estresse é um resultado de muitas reações biológicas, a maioria ocorrendo ao nível de expressão gênica.

A regulação da transcrição em procariontes, como em eucariontes, é bastante variada. A RNA polimerase é o principal alvo de regulação a esse nível, tendo sua atividade controlada positivamente ou negativamente. Os sinais moleculares podem ser estruturas que se formam na molécula de RNA que vai sendo sintetizada, seqüências de bases e estruturas peculiares (*e.g.*, “em grampo”) no DNA, proteínas reguladoras, nucleotídeo iniciador, pequenas moléculas, entre outros (MOONEY *et al.*, 1998). Além das quatro subunidades invariáveis, $\alpha_2\beta\beta'$, a RNA polimerase possui uma quinta subunidade (σ) que pode variar e que determina o tipo de promotor que vai ser reconhecido. Em *Escherichia coli*, a maioria dos genes é transcrita por uma polimerase que contém o fator σ^{70} , sendo que um número menor de genes é transcrito por polimerases contendo fatores σ alternativos (Tabela 1; GROSS *et al.*, 1992).

Uma vez que as subunidades σ da RNA polimerase são as responsáveis pelo reconhecimento dos diferentes promotores, as seqüências promotoras no DNA, reconhecidas pela RNA polimerase associada aos diversos fatores sigma, também são diferentes (Tabela 1). O mecanismo de início de transcrição da RNA polimerase associada ao fator σ^{54} é diferente daqueles associados aos outros fatores σ . Para que a transcrição se inicie a partir do promotor, a σ^{54} -RNAP (ou σ^{54} -RNA polimerase) requer a interação com uma proteína ativadora ligada a 100–200 pb a montante no DNA. Isto ocorre através de um mecanismo em que o DNA forma uma estrutura em laço (THÖNY e HENNECKE, 1989; GUO *et al.*, 2000). A conversão de complexo fechado em aberto requer ainda a energia da hidrólise de um nucleosídeo trifosfato (POPHAM *et al.*, 1989; WEDEL *et al.*, 1990; WEISS *et al.*, 1991; BUCK *et al.*, 2000; CANNON *et al.*, 2000, 2001; XU e HOOVER, 2001). Os promotores dependentes de

σ^{54} são, portanto, modulados por proteínas ativadoras que respondem a variações metabólicas, determinando, assim, os níveis de expressão dos genes sob seu controle (SHINGLER, 1996; BUCK *et al.*, 2000; REITZER e SCHNEIDER, 2001). Alguns destes ativadores pertencem a uma família de proteínas reguladoras de dois componentes, que se caracterizam por detectar o estímulo ambiental, traduzindo-o eficientemente e desencadeando a resposta metabólica na forma de ativação da expressão gênica. O primeiro componente, a proteína sensora que responde aos sinais metabólicos, é uma quinase de histidina que se autofosforila e que regula a atividade de uma segunda proteína através de fosforilação/desfosforilação. Esta segunda proteína é efetivamente o ativador de transcrição e encontra-se na sua forma ativa quando fosforilada (HOCH e SILHAVY, 1995; XU e HOOVER, 2001). Este segundo componente possui, além da capacidade de ligação ao DNA, uma atividade ATPásica, que promove a abertura das fitas de DNA quando interage com a σ^{54} -RNAP. Outra propriedade destes ativadores é que eles geralmente exercem sua função a longa distância, através da ligação a seqüências localizadas 100–200 pb a montante do promotor (KUSTU *et al.*, 1991; XU e HOOVER, 2001), conhecidas como UAS (“*upstream activating sequences*”) ou *enhancers* (estimuladoras), o que leva, portanto, à formação da estrutura em laço no DNA.

Em *E. coli*, a maioria dos operons com promotores dependentes de σ^{54} está diretamente envolvida com a assimilação de nitrogênio (1.4). Contudo, operons envolvidos com outros tipos de metabolismo e dependentes daquele fator também são encontrados, como por exemplo, o do catabolismo de acetoacetato *atoDAEB* (regulado pelo par AtoC/AtoS) e de propionato *prpBCDE* (regulado por PrpR), e os operons que participam na tolerância a zinco *zraP* e *zraSR* (regulados pelo par ZraR/ZraS), entre outros (REITZER e SCHNEIDER, 2001).

TABELA 1 – FATORES SIGMA DE *Escherichia coli*

Gene	Fator	Metabo- lismo associado	Seqüência consenso 5'	Separação consenso	Seqüência consenso 3'	Referências
<i>rpoD</i>	σ^{70}	Geral	TTGACA	16–18 pb	TATAAT	LISSER e MARGALIT (1993).
<i>rpoS</i>	σ^S	Estresse	TTGACA	16–18 pb	TATACT	HENGGE-ARONIS (2002).
<i>rpoH</i>	σ^{32}	Choque por calor	CCCTTGAA	13–15 pb	CCCGATNT	COWING <i>et al.</i> (1985).
<i>rpoE</i>	σ^E	Choque por calor	N.D.	N.D.	N.D.	DARTIGALONGUE <i>et al.</i> (2001).
<i>rpoN</i>	σ^{54}	Assimilação de nitrogênio	CTGGNA	6 pb	TTGCA	BARRIOS <i>et al.</i> (1999).
<i>fliA</i>	σ^{28} (σ^F)	Síntese de flagelo	CTAAA	15 pb	GCCGATAA	HELMANN e CHAMBERLIN (1987).

N.D. = não determinado.

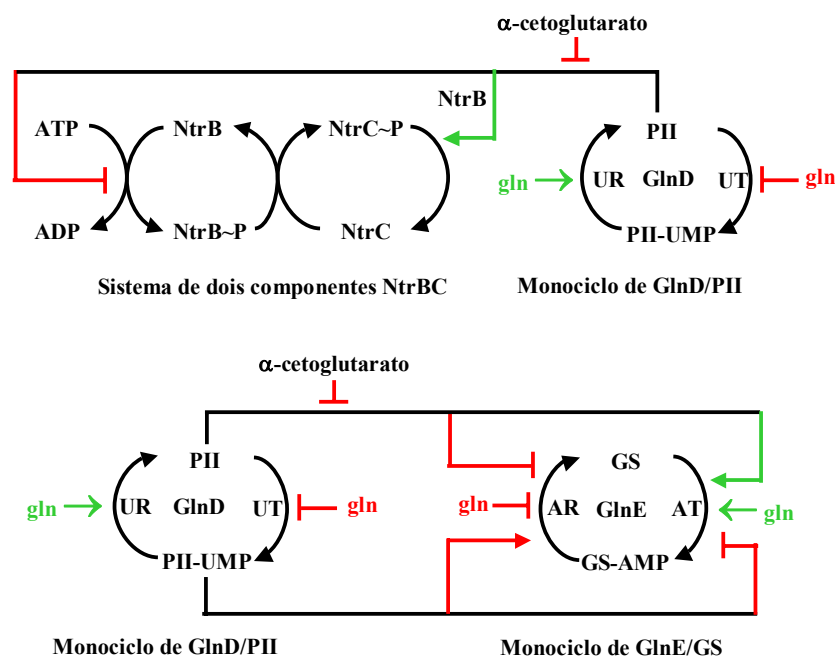
1.4 ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PROTEOBACTÉRIAS

A maioria dos organismos pode utilizar diferentes fontes de nitrogênio, regulando a assimilação desse elemento de tal modo que determinadas fontes (normalmente amônio, glutamato e glutamina, precursores diretos das vias catabólicas de compostos nitrogenados) são utilizadas primeiramente – a utilização de fontes alternativas só ocorre se necessária. Uma classe de proteínas é responsável por essa decisão metabólica: as do tipo PII (NINFA e JIANG, 2005). Estas proteínas controlam a atividade de componentes de transdução de sinais e de enzimas metabólicas importantes. Em alguns casos, uma proteína do tipo PII pode regular indiretamente sua própria expressão ou a expressão de sua paróloga, formando redes gênicas complexas (NINFA e ATKINSON, 2000). De fato, além de as proteínas do tipo PII serem responsáveis por efetuar parte do sensoriamento complexo dos níveis de nitrogênio celular, também são sensoras dos níveis de α -cetoglutarato.

As proteínas PII foram primeiramente identificadas como reguladoras da assimilação de nitrogênio em *E. coli*. Esta bactéria possui duas proteínas do tipo PII: PII (produto de *glnB*) e GlnK (produto de *glnK*), que têm funções distintas (BLAUWKAMP e NINFA, 2002; ATKINSON *et al.*, 2002). Em *E. coli*, existem

quatro proteínas conhecidas que interagem com PII e GlnK: NtrB, GlnD, GlnE e AmtB. PII exerce um papel chave na regulação do estado de adenililação da glutamina sintetase (GS), mediado pela proteína GlnE, e na regulação da transcrição dos genes regulados por nitrogênio (sistema Ntr), mediado por NtrB, conforme a disponibilidade de nitrogênio (Fig. 2; BLAUWKAMP e NINFA, 2002). Os sinais chaves dos níveis de nitrogênio e carbono celulares em *E. coli* são glutamina e α -cetogluturato, respectivamente; estes sinais regulam o estado de adenililação de GS e o estado de fosforilação do regulador de nitrogênio I (NRI ou NtrC) em sistemas sinalizadores reconstituídos.

FIGURA 2 – SISTEMAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS QUE CONTROLAM A TRANSCRIÇÃO DOS GENES *ntr* E O ESTADO DE ADENILILAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE EM *Escherichia coli*



O monociclo PII-GlnD faz parte de ambos os sistemas. Os efeitos ativadores são mostrados em verde e os efeitos inibidores são mostrados em vermelho. Os efeitos de α -cetogluturato são mostrados somente para concentrações perto do limite superior do intervalo fisiológico deste efetor, ou seja, concentrações necessárias para preencher o segundo e terceiro sítios de ligação de α -cetogluturato no trímero de PII. UR/UT = atividade removedora/de transferase de uridilil, respectivamente; AR/AT = atividade removedora/de transferase de adenilil, respectivamente. Figura adaptada de NINFA e JIANG (2005).

Em sistemas reconstituídos, PII promove a integração dos sinais antagonísticos de glutamina e α -cetogluturato. PII é reversivelmente uridililada pela enzima transdutora de sinal uridililtransferase/removedora de uridilil (UTase/UR ou GlnD) em resposta à concentração de glutamina (Fig. 2). A atividade da forma não modificada de PII é antagonizada por concentrações elevadas de α -cetogluturato.

No sistema de *E. coli* (Fig. 2), PII regula a proteína sensora NtrB (NRII) e a glutamina sintetase adenililtransferase (ATase ou GlnE). NtrB estimula a transcrição de genes regulados por nitrogênio por promover a fosforilação do fator de transcrição global NtrC na ausência de PII, e inibe a transcrição desses genes por promover a desfosforilação de NtrC~P na presença de PII. NtrC~P, por sua vez, ativa a transcrição de enzimas da assimilação e do catabolismo de nitrogênio (MERRICK e EDWARDS, 1995). A ligação de PII a NtrB inibe a atividade de autofosforilação de NtrB, que é o primeiro passo da atividade de quinase de NtrB, e ativa a “atividade de fosfatase regulada” de NtrB (JIANG e NINFA, 1999; PIOSZAK e NINFA, 2003, 2004). A forma uridililada, ou a forma não uridililada inativada por α -cetogluturato, não pode regular NtrB. Tanto PII como PII-UMP exercem um papel importante na regulação de GlnE, e glutamina também é um regulador de GlnE. A atividade de adenililtransferase de GlnE é sinergisticamente ativada por glutamina e PII, e inibida por PII-UMP (Fig. 2). A atividade removedora de adenilil de GlnE é aumentada por PII-UMP e inibida por PII e glutamina (Fig. 2).

Papéis fisiológicos adicionais parecem ser exercidos pela proteína GlnK, incluindo o controle da resposta por procura de compostos nitrogenados em células sob limitação de nitrogênio (BLAUWKAMP e NINFA, 2002; ATKINSON *et al.*, 2002), regulação da sensibilidade à adaptação a baixas concentrações de amônio (JAVELLE *et al.*, 2004; BLAUWKAMP e NINFA, 2003; STROSSER *et al.*, 2004), e aumento do controle do sistema Ntr sobre receptores que não interagem com PII (HE *et al.*, 1998; LITTLE *et al.*, 2002).

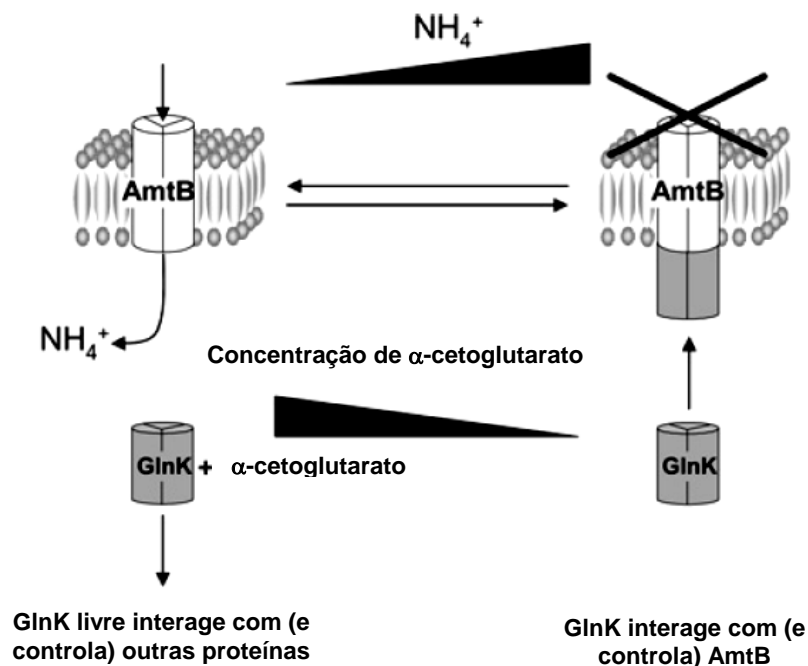
O gene *glnK* de procariotos é quase invariavelmente encontrado associado a um segundo gene, *amt*, que codifica uma proteína da família de transportadores de amônio (JAVELLE e MERRICK, 2005). Esta inclui um grupo único e amplo de proteínas

integrals de membrana encontradas nos três domínios biológicos. Esta família compreende as proteínas Amt/Mep, encontradas em bactérias, arqueas, fungos e plantas, e as proteínas Rhesus, que são encontradas em animais, de nematódeos a humanos (VON WIRÉN e MERRICK, 2004). Praticamente todos os procariotos codificam pelo menos uma proteína Amt e, em alguns casos, dois ou três homólogos estão presentes em um genoma. Destas proteínas, a melhor estudada é AmtB de *E. coli*, que é uma proteína de membrana trimérica, em que cada polipeptídeo tem 11 hélices transmembrana com a ponta N-terminal extra-citoplasmática e a ponta C-terminal citoplasmática (THOMAS *et al.*, 2000; BLAKEY *et al.*, 2002; VON WIRÉN e MERRICK, 2004).

A ligação transcricional entre *glnK* e *amtB* levou à proposta de que as proteínas GlnK e AmtB poderiam interagir fisicamente (THOMAS *et al.*, 2000). Foi verificado que, em *E. coli*, AmtB forma um complexo ligado à membrana com GlnK e que a atividade de AmtB é regulada pela formação desse complexo (JAVELLE *et al.*, 2004; COUTTS *et al.*, 2002). A formação do complexo é reversível e ocorre em alguns segundos em resposta a mudanças micromolares na concentração extracelular de amônio (JAVELLE *et al.*, 2004). Mostrou-se também que GlnK se liga na membrana de modo dependente de AmtB em *A. vinelandii*, *Bacillus subtilis* e *Corynebacterium glutamicum* (COUTTS *et al.*, 2002; DETSCH e STULKE, 2003; STROSSER *et al.*, 2004). Estas observações indicam que essa interação constitui uma via de transdução de sinais, que provavelmente é abrangente em procariotos (Fig. 3).

O estado de uridililação de GlnK comanda sua ligação a AmtB (JAVELLE *et al.*, 2004), o que levanta a questão se a ligação de amônio e/ou o transporte através de AmtB é necessário para propagar o sinal que leva à uridililação de GlnK. Através de mutações que reduzem ou eliminam a atividade de AmtB, mas não o número de cópias e a ligação, foi provado que, em condições fisiológicas, a desuridililação de GlnK é completamente dependente da atividade de AmtB. Assim, nestas condições, amônio entra na célula exclusivamente pela ação de AmtB e um aumento nos níveis intracelulares de glutamina está intimamente acoplado à atividade de AmtB (JAVELLE *et al.*, 2004).

FIGURA 3 – MODELO DO SISTEMA GlnK/AmtB EM BACTÉRIAS



(Figura adaptada de JAVELLE e MERRICK, 2005).

Esses experimentos confirmaram que, em *E. coli*, AmtB atua como um sensor da concentração de amônio extracelular. Conseqüentemente, AmtB e GlnK podem ser consideradas como componentes integrais do sistema de regulação de nitrogênio, que até recentemente foi caracterizado por apenas quatro proteínas: a uridililtransferase (GlnD), a PII e o sistema regulador de dois componentes NtrB/NtrC. O sistema de regulação de nitrogênio era considerado somente um monitor dos níveis de nitrogênio intracelular, mas a incorporação recente de AmtB e GlnK integrou a detecção dos níveis extracelulares de amônio ao sistema. Estes resultados indicam que o controle da atividade de AmtB é o papel celular primário de GlnK em *E. coli* e dão crédito ao conceito de que esse é o papel primário de todas as proteínas GlnK, que são codificadas em um operon *glnKamtB* ou *amtBglnK*. Além disso, o papel de AmtB como um sensor de amônio fornece um mecanismo pelo qual não só a atividade de

AmtB é regulada em resposta à demanda celular por amônio, mas a reserva citoplasmática de GlnK também é modulada rapidamente em resposta a mudanças na disponibilidade extracelular de amônio (JAVELLE e MERRICK, 2005).

Existem duas vias principais de incorporação de amônio em compostos orgânicos: a via da glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT) e a via da glutamato desidrogenase (GDH). Embora a GDH seja energeticamente mais eficiente do que GS/GOGAT, a enzima tem uma menor afinidade por amônio, sendo assim menos eficiente em células crescendo em condições de limitação de nitrogênio (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001).

As proteínas do tipo PII são importantes para comunicar o estado de nitrogênio aos vários alvos reguladores no controle da transcrição dos genes para a fixação de nitrogênio *nif* em resposta à disponibilidade de nitrogênio assimilado. A existência de mais de um homólogo de PII capacita as cascatas hierárquicas a um controle mais fino da resposta às mudanças dos estados metabólicos; por exemplo, uma ou mais proteínas-alvos de PII podem controlar a expressão de uma segunda proteína transdutora de sinal do tipo PII que, por sua vez, pode interagir com outras proteínas. Este é o caso de alguns diazotrofos, como *K. pneumoniae*, em que a proteína GlnB controla a atividade do sistema regulador de dois componentes NtrB/NtrC e, por sua vez, o nível de NtrC fosforilada controla a expressão da proteína GlnK e das proteínas NifL e NifA (Fig. 1; MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004a). Uma concentração relativamente alta de NtrC fosforilada, que é presente apenas em condições de limitação de nitrogênio (e quando GlnB está totalmente uridililada), é requerida para ativar os promotores de *nifLA* e de *glnKamtB* dependentes de σ^{54} . No segundo nível dessa cascata, GlnK tem um papel essencial na liberação de NifA da inibição por NifL em condições anaeróbicas e de limitação de nitrogênio. De modo interessante, o estado de uridililação de GlnK não parece ser importante para essa interação, e assim o controle pela concentração de nitrogênio do sistema NifLA a nível pós-tradução é mediado pela disponibilidade de GlnK (HE *et al.*, 1998; JACK *et al.*, 1999). Porém, como já referido, a modificação covalente de GlnK controla sua interação com o transportador de amônio AmtB. Em resposta a um aumento na concentração de

amônio externo, quando GlnK é desuridililada, AmtB seqüestra GlnK na membrana, levando ao decréscimo da concentração citoplasmática dessa proteína do tipo PII (COUTTS *et al.*, 2002; JAVELLE *et al.*, 2003). Portanto, a quantidade de GlnK que está disponível para a interação com NifL e NifA em *K. pneumoniae* é controlada ao nível de transcrição (do promotor de *glnKamtB*) e a nível pós-tradução (pelo seqüestro na membrana).

Uma outra interação bem conhecida é a que envolve GlnK e NifL em *A. vinelandii* (MAHESWARAN e FORCHHAMMER, 2003; LITTLE *et al.*, 2002; MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004a). Neste microrganismo, NifL detecta oxigênio (estado redox) através de um domínio N-terminal PAS que contém um grupo flavina ligado. NifL detecta ADP (estado energético) diretamente através de um domínio C-terminal semelhante ao domínio ligador de ATP das proteínas transmissoras de sistemas de dois componentes. NifL forma um complexo estável com o ativador de transcrição NifA, o que leva à inativação deste último, inibindo a transcrição dos genes *nif*. O domínio N-terminal de NifA é um domínio GAF conservado que liga α -cetogluturato (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004b). Este efector, quando em alta concentração e quando os níveis de amônio estão baixos, bloqueia a formação do complexo NifL-NifA. GlnK de *A. vinelandii* liga α -cetogluturato e é sujeita a uridililação reversível em resposta à concentração interna de glutamina. A forma desuridililada de GlnK liga-se a NifL e permite a formação do complexo NifL-NifA em concentrações elevadas de α -cetogluturato. Portanto, a ligação de GlnK a NifL sobrepõe-se ao efeito inibitório da ligação de α -cetogluturato a NifA. Assim, a expressão dos genes *nif* ativada por NifA requer um ambiente redutivo, alta demanda energética (baixa concentração de ADP), baixa concentração de nitrogênio (glutamina), e concentração elevada de carbono (α -cetogluturato).

Em algumas das Proteobactérias diazotróficas que não possuem NifL, há evidências de que as proteínas transdutoras de sinal PII modulam direta ou indiretamente a atividade de NifA através do domínio GAF. Em *A. brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae* e *R. rubrum* o gene *glnB* é essencial à fixação de

nitrogênio e a forma uridililada de GlnB parece ser requerida para ativar NifA em condições de limitação de nitrogênio (ARSENE *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2004). Em contraste, em *R. capsulatus* e *Azorhizobium caulinodans*, as proteínas do tipo PII (GlnB e GlnK) são requeridas para a inibição da atividade de NifA em condições de excesso de nitrogênio (MICHEL-REYDELLET e KAMINSKI, 1999; DREPPER *et al.*, 2003). Isto indica que apenas as formas não uridililadas destas proteínas podem modular a atividade de NifA. A interação direta de GlnB e GlnK com NifA de *R. capsulatus* foi demonstrada *in vivo* (PAWLOWSKI *et al.*, 2003). Portanto, como ocorre com os sistemas de *K. pneumoniae* e *A. vinelandii*, o mecanismo pelo qual as proteínas PII regulam a atividade de NifA difere de microrganismo para microrganismo.

Como já foi referido, a proteína sensora dos níveis de nitrogênio PII controla o sistema regulador de nitrogênio de dois componentes, NtrB e NtrC (NRII e NRI, respectivamente; Fig. 2), responsável pelo controle global da transcrição de enzimas da assimilação e do catabolismo de nitrogênio (MERRICK e EDWARDS, 1995). A ativação e repressão dos genes regulados pelos níveis de nitrogênio são coordenadas através da ação da proteína NtrC, um ativador de transcrição dependente do fator σ^{54} (MORETT e SEGOVIA, 1993). Essa proteína é fosforilada em um resíduo de ácido aspártico conservado em condições limitantes de amônio, dando origem a NtrC~P, que é a forma ativa da proteína (WEISS e MAGASANIK, 1988; VOLKMAN *et al.*, 1995; KERN *et al.*, 1999). A fosforilação induz à ligação ao DNA e à oligomerização dos dímeros dessa molécula. Muitos promotores dependentes de NtrC possuem um sítio extra de ligação, o que favorece a oligomerização (WEISS *et al.*, 1992; METTKER *et al.*, 1995; WYMAN *et al.*, 1997).

A célula de *E. coli* detecta a limitação de nitrogênio externo como um decréscimo na concentração interna de glutamina (IKEDA *et al.*, 1996). Uma consequência é a ativação da transcrição de genes que estão sob controle de NtrC; os produtos desses genes contrabalançam o decréscimo da velocidade de crescimento. Os produtos dos genes ativados por NtrC têm três funções: direcionar a assimilação de amônio para os dois intermediários centrais glutamato e glutamina, aumentar a

produção destes intermediários catabolicamente, ou diminuir a necessidade dos mesmos. Dentre os genes ativados por NtrC, encontra-se o gene *nac* (“*nitrogen assimilation control*” ou controlador da assimilação de nitrogênio) (MUSE e BENDER, 1998). A proteína Nac é um fator de transcrição que controla a expressão de genes a partir de um promotor dependente do fator σ^{70} , enquanto NtrC ativa a transcrição de genes a partir de um promotor dependente do fator σ^{54} . Dependendo da seqüência de ligação no DNA, a proteína Nac pode aumentar ou reprimir a expressão do gene a jusante. Portanto, Nac, que não tem nenhum co-regulador além de seus sítios de ligação no DNA (POMPOSIELLO *et al.*, 1998), serve como um adaptador entre NtrC e os operons dependentes de σ^{70} . A Tabela 2 mostra os operons de *E. coli* que têm sua transcrição ativada direta ou indiretamente (via proteína Nac) por NtrC~P.

Em outras bactérias não entéricas, NtrC~P ativa a transcrição de alguns outros genes. Em *A. brasilense* (subdivisão α das Proteobactérias), NtrC~P ativa a transcrição de *glnB* (que se encontra agrupado com *glnA*) (HUERGO *et al.*, 2003). Em *R. capsulatus* (também da subdivisão α), NtrC~P ativa a expressão dos operons da utilização de uréia *ureDABCEFG* (MASEPOHL *et al.*, 2001), do transporte de molibdênio *mopAmodABCD* e do ativador de transcrição específico *anfA* (necessário à síntese da nitrogenase alternativa – KUTSCHE *et al.*, 1996). Em *S. meliloti* (subdivisão α), o sistema NtrBC regula ainda a transcrição do gene regulador da formação do nódulo simbiótico *nodD3* (DUSHA *et al.*, 1999), e dos genes que codificam os transportadores de aminoácidos Liv e Aap (DAVALOS *et al.*, 2004).

Um sistema alternativo, NtrXY, é encontrado em membros da família Rhizobiaceae, estando envolvido no metabolismo de nitrogênio (nomeadamente na utilização de nitrato e glutamato) e na fixação de nitrogênio simbiótica (PAWLOWSKI *et al.*, 1991; KANEKO *et al.*, 2000; GALIBERT *et al.*, 2001). Em *A. brasilense* e *H. seropedicae* o sistema NtrXY está envolvido no metabolismo de nitrato (VITORINO *et al.*, 2001; ISHIDA *et al.*, 2002; ALVES, 2006).

TABELA 2 – OPERONS DE *Escherichia coli* ATIVADOS POR NtrC/Nac

Nome	Descrição	Controlado por	Referências sobre a regulação por	
			Nitrogênio	Outros efetores
<i>codBA</i>	Transporte de citosina, desaminase	Nac	MUSE e BENDER (1998)	QI e TURNBOUGH (1995) [†]
<i>glnKamtB</i>	Regulação de nitrogênio e transporte de amônio	NtrC	SOUPENE <i>et al.</i> (1998)	
<i>gltIJKL</i>	Transporte de glutamato	NtrC? [‡]	KUSTU <i>et al.</i> (1979)	URBANOWSKI <i>et al.</i> (2000)
<i>glnHPQ</i>	Transporte de glutamina	NtrC	NOHNO e SAITO (1987); CLAVERIE-MARTIN e MAGASANIK (1991)	CLAVERIE-MARTIN e MAGASANIK (1991); NOHNO e SAITO (1987); SCHELLHORN <i>et al.</i> (1998)
<i>potFGHI</i>	Transporte de putrescina	NtrC		PISTOCCHI <i>et al.</i> (1993)
<i>ompF</i>	Proteína F da membrana externa	Nac? [§]		PRATT <i>et al.</i> (1996) [†]
<i>ycdGHIJKLM</i>	Proteínas hipotéticas	NtrC	¶	
<i>chaBC</i>	Regulador de transporte de cátions	NtrC? [‡]		
<i>oppABCDF</i>	Transportador de oligopeptídeos	Nac? [§]		URBANOWSKI <i>et al.</i> (2000); ANDREWS <i>et al.</i> (1986); ANDREWS e SHORT (1986); CALVO e MATTHEWS (1994); SMITH e PAYNE (1992) [†]
<i>ycdSTUV</i>	Transporte de putrescina/espermidina (PAULSEN <i>et al.</i> , 1998)	Nac		SCHELLHORN <i>et al.</i> (1998)
<i>ddpXABCDE</i>	Transporte do dipeptídeo D-Ala-D-Ala e dipeptidase	NtrC	¶	LESSARD <i>et al.</i> (1998); LESSARD e WALSH (1999)
<i>astCADBE</i>	Catabolismo de arginina	NtrC	FRALEY <i>et al.</i> (1998); LU e ABDELAL (1999); SCHNEIDER <i>et al.</i> (1998)	FRALEY <i>et al.</i> (1998)
<i>yeaGH</i>	Proteínas hipotéticas	NtrC?	¶	†
<i>yedL</i>	Proteína hipotética	Nac		

Continua...

TABELA 2 (CONTINUAÇÃO)

Nome	Descrição	Controlado por	Referências sobre a regulação por	
			Nitrogênio	Outros efetores
<i>cbl</i>	Regulador do metabolismo de enxofre	NtrC		IWANICKA-NOWICKA e HRYNIEWICZ (1995)
<i>nac</i>	Regulação da assimilação de nitrogênio	NtrC	MUSE e BENDER (1998); FENG <i>et al.</i> (1995)	
<i>hisJQMP</i>	Transporte de histidina	NtrC*	FERRO-LUZZI AMES e NIKAIDO (1985); SCHMITZ <i>et al.</i> (1987, 1988)	SCHMITZ <i>et al.</i> (1987, 1988) [†]
<i>argT</i>	Transporte de aminoácidos básicos	NtrC	FERRO-LUZZI AMES e NIKAIDO (1985); SCHMITZ <i>et al.</i> (1987, 1988)	SCHMITZ <i>et al.</i> (1987, 1988) [†]
<i>nupC</i>	Transporte de nucleosídeos	Nac		CRAIG <i>et al.</i> (1994)
<i>gabDTPC</i>	Transporte e catabolismo de ácido γ -aminobutírico	Nac	KAHANE <i>et al.</i> (1978); METZER e HALPERN (1990); NIEGEMANN <i>et al.</i> (1993)	SCHELLHORN <i>et al.</i> (1998); METZER e HALPERN (1990); NIEGEMANN <i>et al.</i> (1993)
<i>ygjG</i>	Provável ornitina aminotransferase	NtrC		[†]
<i>yhdWXYZ</i>	Transporte de aminoácidos polares	NtrC (PAULSEN <i>et al.</i> , 1998)		
<i>ddpABCDF</i>	Transporte de dipeptídeos	Nac? [§]		URBANOWSKI <i>et al.</i> (2000); SMITH e PAYNE (1992); ABOUHAMAD e MANSON (1994) [†]
<i>glnAntrBC</i>	Assimilação de amônio e regulação da assimilação de nitrogênio	NtrC		REITZER e MAGASANIK (1985) [†]
<i>flBcycA</i>	Peptidil-prolil isomerase; transporte de D-Ala, D-Ser, Gly	Nac		

Total: 25 operons; 75 genes

[†] Comparando com amônio como fonte de nitrogênio no meio, os níveis de RNA em uma estirpe *ntrC* foram pelo menos duas vezes maiores/menores em células crescidas em glutamina.

[§] Alguns dados do segundo conjunto de produtos de PCR de baixa qualidade; difícil afirmar se sob controle de NtrC ou Nac.

§ Pelo menos um gene nesses operons também parece ser controlado por NtrC, o que é improvável biologicamente; o controle por Nac está de acordo com formas conhecidas de controle por esses operons (vide respectivas referências sobre a regulação), que envolve outros fatores sigma que não σ^{54} .

¶ Provável promotor dependente de σ^{54} (BLATTNER *et al.*, 1997; THIEFFRY *et al.*, 1998).

|| O promotor de *nac* é ativado por NtrC (MUSE e BENDER, 1998). O gene *cbl* provavelmente é expresso a partir do promotor *nac* em condições de limitação de nitrogênio.

* O promotor controlado por NtrC pode estar a montante de *argT* (SCHMITZ *et al.*, 1987).

Figura adaptada de ZIMMER *et al.* (2000).

1.5 *Herbaspirillum seropedicae*

H. seropedicae foi primeiramente descrita por BALDANI *et al.* (1986) como uma bactéria aeróbica, móvel, vibrióide, gram-negativa, em forma de bastão, e que fixa nitrogênio sob condições microaerofílicas em meio de cultura ou em associação com raízes de arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*). Mais tarde, demonstrou-se que a bactéria coloniza ainda raízes e caule de cana-de-açúcar, sorgo e arroz (PIMENTEL *et al.*, 1991; URETA *et al.*, 1995), abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) e bananeira (*Musa* spp.) (WEBER *et al.*, 1999; CRUZ *et al.*, 2001), e outras gramíneas de interesse econômico (BALDANI *et al.*, 1992; OLIVARES *et al.*, 1996). A observação de que as espécies do gênero *Herbaspirillum* não sobrevivem em solos não cultivados (BALDANI *et al.*, 1992), mas são encontradas na superfície de tecidos de plantas esterilizadas, em quantidades significativas, levou à conclusão de que a bactéria é endofítica (JAMES e OLIVARES, 1997). Este organismo pertence à subdivisão β das Proteobactérias (YOUNG, 1992).

A genética e a bioquímica da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* vem sendo descrita (PEDROSA *et al.*, 2001). Nesse organismo, essa atividade biológica é inibida por amônio e oxigênio, e a atividade de nitrogenase é inibida por amônio de uma forma independente de ADP-ribosilação (FU e BURRIS, 1989; KLASSEN *et al.*, 1997). A regulação da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* envolve a proteína ativadora de transcrição NifA (SOUZA *et al.*, 1991a,b) e o sistema regulador geral de nitrogênio Ntr. A expressão do promotor de *nifA* mostrou ser dependente de NtrC e RpoN (σ^{54}) (WASSEM *et al.*, 2000). Por outro lado, a atividade da proteína NifA é

controlada por oxigênio e íons amônio (SOUZA *et al.*, 1999), como ocorre em *B. japonicum*, sendo ainda controlada pela proteína PII (PEDROSA *et al.*, 1997; BENELLI *et al.*, 1997). Os genes *nif* de *H. seropedicae* foram seqüenciados, sendo organizados em três regiões separadas: a região I, que contém os genes *nifA* e *nifB* contíguos (SOUZA *et al.*, 1991b), a região II, que contém o operon *nifHDKENXorf1orf2orf3* (MACHADO *et al.*, 1996; KLASSEN *et al.*, 1999), e a região III, a jusante e com sentido de transcrição contrário ao da região II, onde estão localizados os genes *nifSU*, *nifW* e *fixABCX* (www.genopar.org). Análises de transcrição mostraram que todo o operon *nifHDKENXorf1orf2orf3* é transcrito a partir de um único promotor dependente de σ^{54} localizado a montante do gene *nifH* (KLASSEN *et al.*, 1999). Essa região a montante do gene *nifH* contém ainda dois sítios de ligação a NifA e um sítio de ligação a IHF (MACHADO *et al.*, 1996). Análises de mutagênese mostraram que o gene *nifN* é essencial à atividade de nitrogenase (KLASSEN *et al.*, 1999), e que os mutantes *nifX* ou *orf2* são incapazes de desreprimir a nitrogenase em condições de limitação de ferro (KLASSEN *et al.*, 2003). Um grupamento gênico contendo os genes *nifQ* e *modABC* foi encontrado 3 kpb a jusante de *nifHDKENXorf1orf2orf3* e pode constituir um operon. Mutantes *modA* e *nifQ* foram incapazes de mostrar atividade de nitrogenase em condições de limitação de molibdênio (KLASSEN, 2000).

Dois genes do tipo *glnB/glnK* foram identificados em *H. seropedicae* (BENELLI *et al.*, 1997; NOINDORF *et al.*, 2006). Um deles codifica uma proteína que provavelmente controla a atividade de NifA – um mutante apresentou o fenótipo de não fixar nitrogênio, mas foi capaz de sintetizar a proteína NifA (PEDROSA *et al.*, 1998; BENELLI *et al.*, 2000a). Outras evidências mostraram que o produto desse gene não está envolvido no controle por adenililação/desadenililação da atividade de glutamina sintetase (BENELLI *et al.*, 1997). Uma análise estrutural mostrou que essa proteína do tipo PII (BENELLI *et al.*, 2000a; BENELLI *et al.*, 2002) é estreitamente relacionada com as GlnK de enterobactérias (XU *et al.*, 1998), sugerindo funções similares. Ainda de acordo com isso, essa proteína do tipo PII foi capaz de reverter a inibição por NifL de *K. pneumoniae* sobre a atividade de NifA, em *E. coli*

(BONATTO *et al.*, 2000). Esse efeito não parece requerer a uridililação de PII, uma vez que ocorreu mesmo na presença de altas concentrações de amônio ou em um mutante *glnD*. A superexpressão dessa PII de *H. seropedicae* a partir de um plasmídeo de alto número de cópia (pTZ18R) aparentemente mantém NifL em sua forma inativa, mesmo na presença de amônio (BENELLI *et al.*, 2000b). Quanto ao outro gene do tipo *glnB/glnK*, uma ORF homóloga a *glnK* foi encontrada a montante de *amtB* e constitui com este um único operon (NOINDORF *et al.*, 2006).

Os genes *glnA*, *ntrB* e *ntrC* de *H. seropedicae* foram seqüenciados (GenBank nº acesso AF0828730) e sua organização estrutural e regulação da expressão determinadas. Esses genes estão organizados de forma contígua, como observado em *K. pneumoniae* (ESPIN *et al.*, 1982) e *A. vinelandii* (TOUKDARIAN e KENNEDY, 1986). Na região a montante de *glnA*, dois prováveis sítios de ligação de NtrC (“*upstream activating sequences*” – UAS) foram encontrados a 84 e 113 pb a montante de um promotor do tipo dependente de σ^{54} -RNAP. Uma seqüência semelhante a um promotor do tipo σ^{70} foi encontrada sobreposta a um sítio proximal de ligação de NtrC. Os prováveis códons de início e término de tradução dos referidos genes foram localizados. Nas regiões intergênicas *glnA-ntrB* e *ntrB-ntrC*, nenhuma seqüência promotora conhecida foi identificada e, em suporte a isto, fusões *ntrB::lacZ* e *ntrC::lacZ* resultaram em atividade não significativa de β -galactosidase em diferentes condições de disponibilidade de amônio (SCHWAB *et al.*, aceito para publicação); estes resultados sugerem que *glnA*, *ntrB* e *ntrC* constituem uma unidade de transcrição. Estudos utilizando uma fusão *glnA::lacZ* mostraram que a expressão de *glnA* é dependente de NtrC sob condições limitantes de amônio, e parcialmente reprimida sob condições de excesso de amônio (PERSUHN *et al.*, 2000). Estudos de mutação de um promotor dependente de σ^{54} mostraram que este é funcional, e que é envolvido na regulação da expressão dependente de NtrC (SCHWAB *et al.*, aceito para publicação). Mutações nos genes *ntrB* e *ntrC* de *H. seropedicae* resultaram em baixa atividade de glutamina sintetase (GS), em deficiência no controle por adenililação/desadenililação da atividade de GS, e na capacidade de desrepressão da atividade de nitrogenase. Estes resultados indicam que o sistema Ntr está envolvido na regulação da expressão do

gene *glnA*, no controle da atividade de GS e na regulação da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* (PERSUHN *et al.*, 2000).

Como já referido (1.4), um sistema alternativo, NtrXY, foi encontrado em *H. seropedicae*, estando este envolvido no metabolismo de nitrato (ALVES, 2006). Um mutante *ntrY* foi incapaz de crescer em nitrato como fonte única de nitrogênio, e mostrou deficiência em ativar a expressão de genes envolvidos com o metabolismo assimilatório (*nasFEDCBA*) e respiratório de nitrato e nitrito (*narKnirBDC* e *narXL*).

Mostrou-se que *H. seropedicae* promove o crescimento e faz aumentar o conteúdo de nitrogênio da planta, especialmente de alguns cultivares de arroz (GYANESHWAR *et al.*, 2002; JAMES *et al.*, 2002). Como já referido (1.2), foi verificado também que *H. seropedicae* expressa *in planta* o gene *nifH* que codifica a proteína dinitrogenase redutase, enzima diretamente envolvida na fixação de nitrogênio (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003). Além disso, a bactéria tem a capacidade de sintetizar *in vitro* auxinas como ácido indol-3-acético (AIA) e giberelinas, substâncias estas que promovem o crescimento da planta (BASTIÁN *et al.*, 1998). Não se sabe se o efeito de estimular o crescimento vegetal por *H. seropedicae* é decorrente da atividade de nitrogenase, da produção de auxinas, de ambos estes fatores, ou outros. No entanto, um efeito significativo sobre o crescimento da planta por *H. seropedicae* só é observado em solos ou meios de cultivo pobres em nitrogênio (L.D.B. RONCATO-MACCARI, 2003), o que indica que os efetores de crescimento vegetal de *H. seropedicae* são regulados em resposta à disponibilidade de nitrogênio.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

- Identificar e analisar genes de *H. seropedicae* regulados pela disponibilidade de amônio.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Obter uma biblioteca de mutantes de inserção de *H. seropedicae* utilizando um transposon que carrega as resistências a gentamicina e canamicina e o gene *lacZ* sem promotor;
- Selecionar os mutantes que apresentam padrão de expressão *lacZ* diferencial na presença de diferentes concentrações de amônio;
- Caracterizar o padrão de expressão dos genes alvos de inserção selecionados, através de ensaios de atividade de β -galactosidase;
- Identificar cada gene alvo através de seqüenciamento do DNA que flanqueia as seqüências de inserção;
- Investigar a função dos genes identificados no metabolismo de nitrogênio de *H. seropedicae* através de testes de crescimento em fontes variadas de nitrogênio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ESTIRPES, MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

2.1.1 *Escherichia coli*

A estirpe de *E. coli* utilizada neste trabalho foi a DH10B [ϕ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ lacX74 *deoR recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ^- rpsL nupG*] (GRANT *et al.*, 1990). Para a preparação de plasmídeos (2.2), a estirpe portando o replicon foi cultivada a 37 °C, a 150–180 rpm, por cerca de 16 h, em um frasco de 5 mL contendo 2,5 mL de meio LB (Luria Bertani = extrato de levedura 5,0 g/L, NaCl 10,0 g/L, triptona 10,0 g/L) (MANIATIS *et al.*, 1982) na presença de um antibiótico apropriado, conforme indicado por MILLER (1992), e ELBING e BRENT (1992). As concentrações de antibióticos utilizadas foram: ácido nalidíxico 10 μ g/mL, ampicilina 250 μ g/mL, cloranfenicol 30 μ g/mL, canamicina 50 μ g/mL e/ou gentamicina 20 μ g/mL.

Condições e meio de cultivo semelhantes foram utilizados para o preparo de células eletrocompetentes (2.6.1), exceto que as estirpes foram cultivadas até uma D.O.₆₀₀ de 0,6, em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio SOB (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,584 g/L, KCl 0,186 g/L, pH 7,0). O mesmo para a preparação de amostras de DNA para seqüenciamento (2.11.1), porém as estirpes foram cultivadas a 180–200 rpm, em poço de 2,2 mL de um bloco de 96 poços (MEGA-Titer plate, Sorenson, nº catálogo 23130) contendo 1,25 mL de meio LB. Este bloco foi fechado com tampa adesiva (Sorenson Bioscience, Inc., nº de catálogo 21950) previamente furada com uma agulha para a aeração (dois furos por poço).

2.1.2 *Herbaspirillum seropedicae*

A estirpe de *H. seropedicae* utilizada para a mutagênese aleatória (2.11) foi a do tipo selvagem Z78 (BALDANI *et al.*, 1986). Para a produção de células eletrocompetentes (2.6.1), a estirpe Z78 foi cultivada a 30 °C, a 120–150 rpm, por 28–30 h, em um frasco erlenmeyer de 500 mL contendo 220 mL de meio NFb malato

(MgSO₄·7H₂O 0,2 g/L, NaCl 0,1 g/L, CaCl₂ 20 mg/L, ácido nitrilo-triacético 56 mg/L, FeSO₄·7H₂O 20 mg/L, ácido málico 5,0 g/L, biotina 0,1 mg/L, Na₂MoO₄·2H₂O 0,2 mg/L, MnSO₄·H₂O 235 µg/L, H₃BO₃ 280 µg/L, CuSO₄·5H₂O 8,0 µg/L, ZnSO₄·7H₂O 24 µg/L, pH 6,5), adicionado da mistura de fosfatos (KH₂PO₄ 4,0 g/L, K₂HPO₄ 6,0 g/L) e NH₄Cl 20 mmol/L, conforme descrito por KLASSEN *et al.* (1997).

Condições e meio de cultivo semelhantes foram utilizados para a preparação de DNA cromossômico (2.9) ou ensaios de atividade de β-galactosidase envolvendo as estirpes mutantes (2.7), exceto que estas foram cultivadas a 180–200 rpm, por cerca de 16 h, em poço de 2,2 mL de um bloco de 96 poços contendo 1,25 mL de meio, adicionado de NH₄Cl 20 ou 2 mmol/L (ensaios de atividade de β-galactosidase), na presença dos antibióticos gentamicina 160 µg/mL e canamicina 500 µg/mL. O bloco foi fechado com uma tampa adesiva previamente furada com uma agulha para a aeração (dois furos por poço). Para os experimentos de determinação da concentração de derivados de indol/ácido indol-3-acético no sobrenadante (2.13), o meio foi adicionado de D,L-triptofano 1 mmol/L.

2.2 PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS PELA TÉCNICA DA LISE ALCALINA

Esta técnica foi efetuada de acordo com MANIATIS *et al.* (1982). Consistiu em centrifugar 1,5 mL da cultura de *E. coli* DH10B (2.1.1) contendo o plasmídeo a 10.000 × *g* durante 1 min. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspensionado em 150 µL de solução GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8,0). Foram adicionados 150 µL de solução de lise [NaOH 0,2 mol/L, dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%]. A solução resultante foi homogeneizada suavemente até a visualização da lise celular, incubando depois por 5 min à temperatura ambiente. Foram adicionados 150 µL de solução Kacf (acetato de potássio 3,0 mol/L, ácido fórmico 1,8 mol/L), homogeneizando suavemente. A incubação ocorreu por 5 min em banho de gelo. Foram acrescentados 100 µL de uma mistura fenol equilibrado:clorofórmio:isoamilol (25:24:1) (MANIATIS *et al.*, 1982), agitando vigorosamente em seguida. Centrifugou-se por 5 min a 10.000 × *g*. A fase aquosa

superior foi coletada e a esta foram adicionados dois volumes de etanol absoluto, incubando-se por 25–30 min à temperatura ambiente. Centrifugou-se a $10.000 \times g$ por 12 min, desprezando depois o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80%, centrifugando a $10.000 \times g$ por 5 min. O precipitado foi seco a vácuo e redissolvido em um volume que variou de 8 a 20 μL de água destilada e desionizada estéril (ddH_2O), dependendo da quantidade de DNA.

2.3 CLIVAGEM DE DNA POR ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As amostras de DNA foram clivadas utilizando as condições mais adequadas para a atividade da enzima de restrição, conforme indicado pelo respectivo manual (Invitrogen Life Technologies, GE Healthcare ou New England Biolabs).

2.4 ELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR OU AGAROSE

Géis contendo ágar 1,0–1,5% ou agarose 0,7–1,0% foram preparados em tampão TBE $1\times$ (Tris 1,62%, ácido bórico 0,275%, EDTA 0,095%), conforme descrito (VOYTAS, 1992). A amostra (ou o padrão) de DNA foi diluída em 3 μL de corante FSUDS (azul de bromofenol 0,8%, ficol 10%, xileno cianol 0,4%, SDS 1%, EDTA 1,8 mmol/L, Tris-HCl 65 mmol/L, pH 8,0) para depois ser aplicada no poço do gel. Efetuou-se a corrida sob 10–70 V, acompanhando a progressão do corante. Finalizada a corrida, o gel foi transferido para uma cuba contendo uma solução corante de brometo de etídeo a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Deixou-se nessa solução por cerca de 15 min. O gel foi lavado brevemente com água, e analisado e fotografado sob luz UV (312 nm).

2.5 LIGAÇÃO DE DNA

A mistura de ligação (vetor: inserto) foi preparada numa proporção aproximada de 20 ng:100 ng em um volume final de 10 μL . O tampão para a enzima ligase (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,6, MgCl_2 10 mmol/L, DTT 1 mmol/L, ATP 1 mmol/L e PEG8000 5%, concentrações finais) foi então adicionado, e depois a enzima T4-DNA ligase (0,5 a 1 unidade). A mistura completa foi incubada a 16–22 °C por 24–48 h.

2.6 TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO

2.6.1 Preparação de células eletrocompetentes

Este procedimento foi adaptado dos manuais que acompanham o eletroporador Cell-Porator[®] Electroporation System e o amplificador de campo Cell-Porator[®] Voltage Booster (Invitrogen), e também do método descrito por SEIDMAN *et al.* (1992).

Para as estirpes de *E. coli*, as células da cultura foram resfriadas em banho de gelo e sedimentadas por centrifugação a $1800 \times g$, 10 min, a 4 °C. As células foram então lavadas duas vezes com água bidestilada estéril, através de ressuspensão e centrifugação a $3000 \times g$, por 10 min, e lavadas uma vez com glicerol 10%, também a $3000 \times g$, só que por 25 min, a 4 °C. O sedimento foi ressuspensão no glicerol 10% residual e aliquoteado em amostras de 20–40 μL . As alíquotas foram prontamente utilizadas para a eletroporação propriamente dita (2.6.2) ou armazenadas a -80 °C.

Para as estirpes de *H. seropedicae*, as células foram resfriadas em banho de gelo e sedimentadas por centrifugação a $3000 \times g$, 10 min, a 4 °C, seguindo-se então o mesmo procedimento utilizado para células de *E. coli*, exceto que as células foram lavadas uma única vez com água bidestilada estéril. Após o último passo de centrifugação, o sedimento foi ressuspensão no glicerol 10% residual e aliquoteado em amostras de 35 μL . Estas alíquotas foram prontamente utilizadas para a eletroporação propriamente dita (2.6.2).

2.6.2 Eletroporação

Este procedimento foi adaptado dos manuais que acompanham o eletroporador Cell-Porator[®] (Life Technologies/Invitrogen), e do procedimento descrito por SEIDMAN *et al.* (1992). Cerca de 5 ng de DNA plasmidial ou de mistura de ligação foram adicionados a 20–40 μL de células eletrocompetentes (*E. coli* ou *H. seropedicae* – item 2.6.1). A mistura foi homogeneizada e mantida em banho de gelo e, então, transferida para a câmara de eletroporação. Esta foi conectada ao eletroporador ligado ao amplificador de campo, e submetida a uma descarga elétrica de 350 V, com o

seletor de capacitância na posição de 330 μF , o interruptor de alta/baixa resistência na posição baixa (“LOW Ω ”), o interruptor de velocidade de carga do condensador na posição rápida (“FAST”), e o botão de seleção de resistência (no amplificador de campo) na posição de 4 k Ω .

O sistema contendo as células de *E. coli* transformantes foi então ressuspensão em 1 mL de meio SOC (meio SOB, Mg^{2+} 0,02 mmol/L, glucose 0,02 mmol/L – item 2.1.1) e incubado a 37 °C, 180 rpm, por 1 hora. Alíquotas de 300 μL foram inoculadas em meio LA (LB + ágar 15 g/L – item 2.1.1) com o(s) antibiótico(s) apropriado(s) para a devida seleção, e incubadas a 37 °C durante 16–24 horas. As bactérias transformantes foram coletadas e analisadas quanto à presença dos plasmídeos.

O sistema contendo as células de *H. seropedicae* transformantes foi ressuspensão em 1 mL de meio NFb malato (2.1.2) e incubado a 30 °C, 120 rpm, por cerca de 10 h. Alíquotas de 300 μL foram inoculadas em meio NFb malato sólido (NFb malato + ágar 15 g/L – 2.1.2) com o(s) antibiótico(s) apropriado(s) para a devida seleção, e incubadas a 30 °C durante 16–24 horas. As bactérias transformantes foram coletadas e armazenadas em meio NFb malato semi-sólido (contendo ágar 1,5 g/L), conforme descrito (KLASSEN *et al.*, 1997).

2.7 ENSAIO DE ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE

Este método teve como base o ensaio de atividade de β -galactosidase descrito por MILLER (1972), mas com as adaptações descritas por SCHWAB (2002), e foi utilizado para determinar a expressão diferencial do gene alvo de inserção em fusão com o gene repórter *lacZ*, conforme a concentração de amônio no meio. Foram transferidos 20 μL de cultura de *H. seropedicae* (em triplicata ou quadruplicata) ou de meio de cultura (branco da reação) para poço de um bloco de 96 poços de 2,2 mL (MEGA-Titer plate, Sorenson, nº catálogo 23130) contendo 380 μL de tampão Z (SDS 0,27%, β -mercaptoetanol 0,39%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mmol/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mmol/L, KCl 10 mmol/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mmol/L, pH 7,0). Foram adicionados 25 μL de clorofórmio. A placa foi fechada com uma tampa adesiva (Sorenson Bioscience, Inc., nº de catálogo 21950). Misturou-se por vórtex (cerca de 2 min), centrifugando

brevemente e deixando estabilizar em banho-maria a 28 °C, por 10 min. Para iniciar a reação, foram adicionados 80 µL de solução de *o*-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG) 4 mg/mL em tampão Z e, depois de determinado período de tempo (conforme o desenvolvimento da coloração amarela), adicionados 200 µL de uma solução de Na₂CO₃ 1 mol/L, para interromper a reação. A mistura foi centrifugada a 2600 × g (utilizando rotor para placas) durante 10 min. Duzentos microlitros da fase aquosa superior foram transferidos para uma placa de ELISA de 96 poços (Greiner Bio-One, nº de catálogo 655180) para a leitura da A₄₁₅ no leitor de microplacas ELx800 (Bio-Tek Instruments).

A atividade específica de β-galactosidase foi em nanomoles de *o*-nitrofenol (ONP) formados por minuto por miligrama de proteína total (nmol ONP/min/mg prot), através da seguinte equação:

$$\text{Atividade específica}_{\beta\text{-galactosidase}} = \frac{\text{D.O.}_{415} \times 255 \text{ nmol ONP}}{\text{V} \times \text{t} \times [\text{prot}]} \quad (\text{Equação 2}),$$

em que V é o volume de amostra ensaiado (0,020 mL); t é o tempo de reação (em min); [prot] é a concentração de proteína determinada (em mg/mL; item 2.8); e 255 nmol ONP representa um fator de conversão entre A₄₁₅ e nmol de ONP formado (SCHWAB, 2002).

As estirpes que apresentaram diferenças significativas de atividade específica de β-galactosidase, sob baixo e alto amônio, verificadas através do teste t bilateral, 95% de intervalo de confiança (O'MAHONY, 1986), foram analisadas subseqüentemente.

2.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A concentração de proteína das amostras foi determinada conforme BRADFORD (1976), mas com as adaptações descritas por SCHWAB (2002), para se determinar a atividade específica de β-galactosidase (2.7). Para poço da placa de 96 poços de polipropileno (Greiner Bio-One, nº catálogo 651201) contendo 50 µL de NaOH 0,4 mol/L foram transferidos: 1) de 30 a 125 µL de cultura de *H. seropedicae*

mais meio de cultura q.s.p. 125 μ L, e 25 μ L de água desionizada e destilada (ddH₂O), ou 2) de 0 a 20 μ g de albumina de soro bovino (BSA) em ddH₂O q.s.p. 25 μ L, e 125 μ L de meio de cultura (em quadruplicata). A placa foi fechada com uma tampa adesiva, misturando suavemente e deixando decorrer a lise celular, por cerca de 1 h, à temperatura ambiente. Foram transferidos 40 μ L de lisado celular/solução padrão de BSA para uma placa de ELISA de 96 poços. Foram adicionados às amostras e aos padrões 160 μ L de reativo de Bradford (0,04 g de Coomassie Blue G-250 dissolvido em 20 mL de etanol 96% + 40 mL de ácido fósfórico 85% para 100 mL de ddH₂O) diluído 3 \times em ddH₂O, minutos antes à sua utilização. Após 2 min de reação, as placas foram transferidas para o leitor de microplacas ELx800 (Bio-Tek Instruments), para leitura da A₅₉₅.

2.9 PREPARAÇÃO DE DNA CROMOSSÔMICO DE *Herbaspirillum seropedicae*

Este método teve como base o procedimento descrito por SOUZA (1990), mas adaptado para placas de 96 poços, como se segue. A estirpe com o DNA cromossômico a ser purificado foi cultivada em 5 mL (ou em 4 poços, cada poço contendo 1,25 mL) de meio. Os blocos contendo as culturas foram centrifugados a 2600 \times g (utilizando rotor para placas) durante 10 min. O sobrenadante foi descartado por inversão dos blocos, e os sedimentos ressuspensos em 187,5 μ L de tampão TE (EDTA 20 mmol/L, Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8,0). O conteúdo dos quatro poços que continham amostras idênticas foi reunido em um único poço. Foram adicionados 85 μ L de uma solução de SDS 10% e 10 μ L de uma solução de proteinase K 20 mg/mL; a mistura foi incubada durante a noite a 37 °C. O conteúdo do poço foi transferido para um microtubo plástico de 2 mL. Foram feitas extrações com 1 volume de fenol equilibrado (MANIATIS *et al.*, 1982), depois 1 volume de fenol equilibrado:clorofórmio:isoamilol (25:24:1), e então 1 volume de clorofórmio, consecutivamente, centrifugando a 10.000 \times g para separar melhor as fases orgânica e aquosa, e coletando sempre a fase aquosa superior para novos microtubos de 2 mL. A fase aquosa da última extração foi transferida para poço de um bloco de 96 poços.

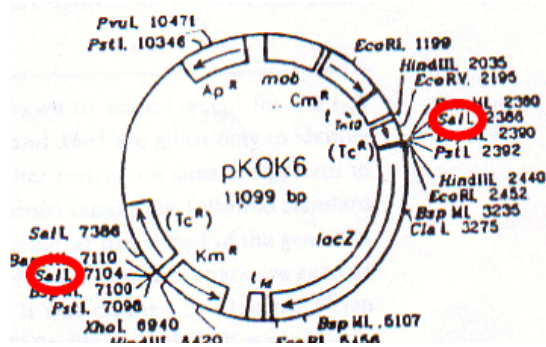
Foram adicionados 0,1 volumes de acetato de sódio 3 mol/L, pH 5,2, e 0,6 volumes de isopropanol. O bloco foi centrifugado a $2600 \times g$ durante 45 min. O sobrenadante foi descartado por sucção, com auxílio de uma micropipeta. Foi adicionado 1 mL de etanol 80%, e o bloco foi centrifugado a $2600 \times g$ durante 15 min. O sobrenadante foi descartado por sucção, com auxílio de uma micropipeta, e o precipitado foi seco em bomba de vácuo, para depois ser redissolvido em 200 μ L de ddH₂O. Algumas amostras foram digeridas com enzima de restrição (2.3) e visualizadas por eletroforese (2.4) para verificar a qualidade e quantidade de DNA purificado.

2.10 CONSTRUÇÃO E CLONAGEM DO PLASMÍDEO MUTAGÊNICO pTnMod-OGmKmlacZ

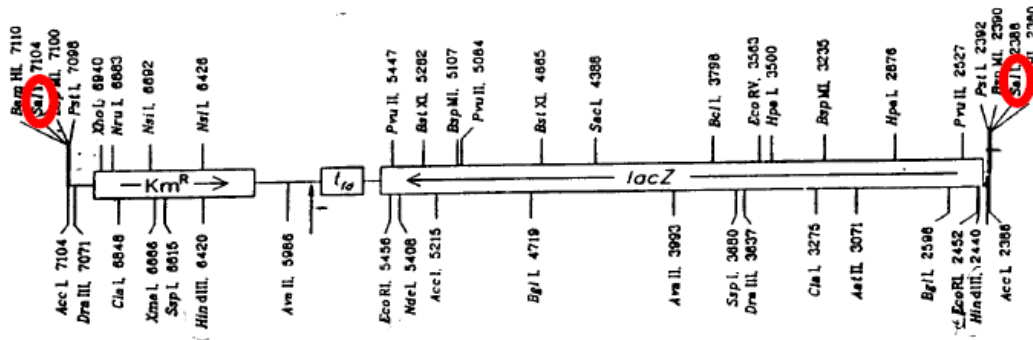
O plasmídeo pKOK6, que continha um cassete *lacZ-Km^r* (Fig. 4), foi tratado com a enzima de restrição *SalI* (2.3), liberando o fragmento com cerca de 4700 pb relativo ao cassete. O plasmídeo pTnMod-OGm (Fig. 5) foi tratado com a mesma enzima de restrição, e depois tratado com a enzima DNA ligase (2.5) na presença da mistura que continha o cassete *lacZ-Km^r*. Este sistema foi então introduzido (2.6) em células de *E. coli* DH10B (2.1), selecionando os transformantes com resistência a ácido nalidíxico, gentamicina e canamicina (2.1.1). Os plasmídeos das colônias transformantes foram preparados (2.2) e analisados por reações de restrição apropriadas para a seleção da construção desejada (denominada pTnMod-OGmKmlacZ, Fig. 6).

FIGURA 4 – MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pKOK6 E SEU CASSETE *lacZ-Km^r*

A

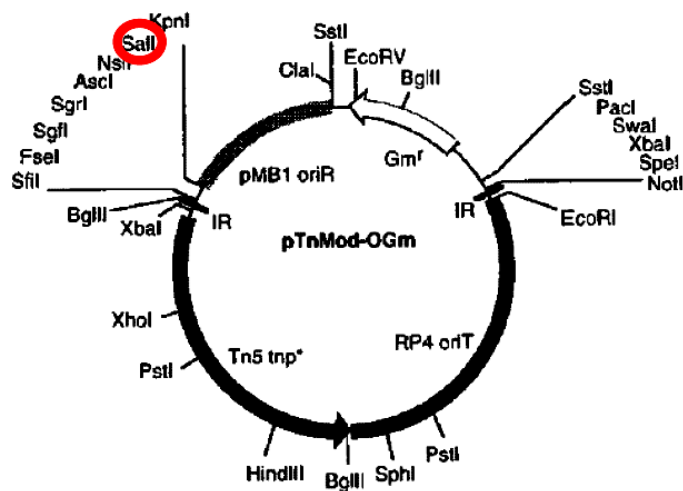


B



O cassete *lacZ-Km^r* de pKOK6 foi utilizado na construção do plasmídeo pTnMod-OGmKmlacZ. A) Mapa físico de pKOK6; B) mapa físico do cassete *lacZ-Km^r*. Os sítios *SalI* utilizados para a digestão e clonagem do cassete encontram-se assinalados em vermelho. Figura adaptada de KOKOTEK e LOTZ (1989).

FIGURA 5 – MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pTnMod-OGm



O plasmídeo pTnMod-OGm foi utilizado na construção do plasmídeo pTnMod-OGmKmlacZ através da inserção do cassete *lacZ-Km^r* no seu único sítio *SalI* assinalado em vermelho. Figura adaptada de DENNIS e ZYLSTRA (1998).

2.11 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES ALVOS DE INSERÇÃO

As estirpes mutantes de *H. seropedicae* Z78 que apresentaram padrão de expressão do gene repórter *lacZ* diferencial conforme a concentração de amônio no meio tiveram seus genes alvos de inserção identificados por seqüenciamento de DNA. Para isso, o DNA cromossômico de cada mutante selecionado foi previamente purificado (2.9) e fragmentado com a enzima de restrição *NarI* (2.3), enzima esta que não tinha qualquer sítio de clivagem na seqüência do transposon. A mistura foi tratada com a enzima T4-DNA ligase (2.5), com o objetivo da formação de moléculas de DNA circular. Algumas destas moléculas continham o transposon, que tinha em sua seqüência uma origem de replicação e genes para resistência a canamicina e gentamicina, apresentando, portanto, as mesmas propriedades que um plasmídeo. A mistura resultante foi transferida (2.6) para células de *E. coli* DH10B (2.1.1), sendo que os transformantes foram selecionados para resistência a canamicina e gentamicina (2.1.1). Os transformantes foram cultivados (2.1.1) e o respectivo DNA plasmidial foi sujeito a seqüenciamento, adotando os procedimentos descritos a seguir.

2.11.1 Preparação da amostra de DNA

Para a preparação das amostras de DNA com a finalidade de seqüenciamento, células de *E. coli* DH10B (2.1.1) transformadas (2.6) com a mistura de ligação gerada a partir do DNA cromossômico da estirpe mutante de *H. seropedicae* foram cultivadas em bloco (2.1.1). O bloco contendo as culturas foi centrifugado por 7 min, $2600 \times g$, para sua sedimentação. O adesivo foi retirado e o sobrenadante descartado. Foram adicionados, a cada poço, 180 μL de solução GET (2.2). O bloco foi novamente fechado com o adesivo e agitado por vórtex, para ressuspender as células. O bloco foi centrifugado por 7 min, $2600 \times g$, para sedimentar as células. O sobrenadante foi novamente descartado. Foram adicionados, a cada poço, 80 μL de solução GET contendo 0,5 μL de RNase 20 mg/mL. O bloco foi fechado com adesivo e agitado por vórtex, até ressuspender as células. A suspensão de células (80 μL) foi transferida para poço (com fundo em V) da placa de 96 poços de polipropileno (Greiner Bio-One, nº catálogo 651201). Foram adicionados, a cada poço, 80 μL da solução de lise (NaOH

0,18 N, SDS 1%). O bloco foi fechado com o adesivo e invertido 20 vezes para homogeneização. A mistura foi incubada por 5 min à temperatura ambiente. O bloco foi centrifugado por alguns segundos para que não ficasse solução no adesivo e este foi então removido. Foram adicionados, a cada poço, 80 μ L de acetato de potássio 3 mol/L. A placa foi fechada com adesivo e invertida 30 vezes para homogeneização. Incubou-se por 10 min à temperatura ambiente. O bloco foi centrifugado por alguns segundos para que não ficasse solução no adesivo e este foi então removido. Incubou-se o bloco destampado em estufa a 90 °C por 30 min. O bloco foi tampado com adesivo e resfriado em banho de gelo por 15 min. O sistema foi centrifugado por 10 min, 2600 \times g, a 4 °C. Foi fixada, com fita adesiva, uma placa-filtro de 96 poços (Millipore, n° catálogo MAGVN2250) sobre uma placa de 96 poços (com fundo em V) de polipropileno. Cento e vinte microlitros do sobrenadante foram transferidos para poço da placa-filtro. O sistema com a placa-filtro foi então centrifugado (sem a tampa) a 20 °C, 2600 \times g, por 5 min, ou até que todo o volume atravessasse o filtro para o poço da placa inferior. A placa-filtro foi retirada, e 80 μ L de isopropanol foram adicionados ao filtrado que estava no poço com fundo em V. A placa foi fechada com adesivo e invertida 30 vezes para homogeneização. A placa foi centrifugada por 45 min, 2600 \times g, a 20 °C. O adesivo foi retirado e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 150 μ L de etanol 70%. A placa foi tampada com adesivo e centrifugada por 15 min, 2600 \times g, a 20 °C. O sobrenadante foi removido, e a placa foi incubada a vácuo por ~10 min, para secagem do etanol residual. O DNA foi redissolvido em 30 μ L de ddH₂O, e a placa armazenada a -20 °C. O rendimento da purificação do DNA foi avaliado semi-quantitativamente por eletroforese (2.4).

2.11.2 Reação de seqüenciamento

O sistema de reação de seqüenciamento, também efetuada em placa de 96 poços (Skirted 96 PCR plate, Sorenson Bioscience, n° catálogo 23080), continha 200–400 ng de DNA plasmidial, 4 μ L do reagente DYEnamic ET terminator reagent premix (GE Healthcare), 5 pmol de oligonucleotídeo iniciador (LACZ5', 5'-

GCAAGGCGATTAAGTTGGGT-3', ou IR2, 5'-CGAACCGAACAGGCTTATGT-3'), complementar à seqüência de inserção do transposon Tn5, e ddH₂O q.s.p. 10 µL. Os ciclos de reação em termociclador automático foram: (95 °C, 1 min) × 1; [(94 °C, 20 s), (60 °C, 1,5 min)] × 35. A purificação do produto consistiu em adicionar 10 µL de ddH₂O, 2 µL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 60 µL de etanol 96% a cada poço da placa. Esta foi centrifugada por 45 min. O sobrenadante foi descartado e 150 µL de etanol 70% foram então adicionados. Centrifugou-se por 10 min e o sobrenadante foi então descartado. A placa foi incubada a vácuo por ~10 min para secagem do etanol residual. Para aplicação no seqüenciador automático MegaBACE (GE Healthcare), o DNA foi ressuspensão em 10 µL de ddH₂O ou tampão para aplicação no seqüenciador (“*loading buffer for MegaBACE*”, GE Healthcare). A placa foi armazenada tampada dentro de papel alumínio a -20 °C até o momento da aplicação no seqüenciador.

2.11.3 Edição e análise das seqüências

As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências depositadas no banco de dados público GenBank utilizando o programa BLASTx (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Domínios conservados codificados pela ORF inserida com o transposon foram identificados utilizando o programa SMART (SCHULTZ *et al.*, 1998; LETUNIC *et al.*, 2004). As seqüências também foram comparadas com seqüências depositadas no banco de dados do Projeto de Seqüenciamento do Genoma de *H. seropedicae* (Genopar; www.genopar.org), utilizando o programa BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1997), permitindo a localização precisa das inserções no genoma daquela bactéria. Os códons de início e término de tradução, bem como a fase de leitura de códons, das ORFs que flanqueiam as inserções foram determinados utilizando o programa FramePlot (ISHIKAWA e HOTTA, 1999). A identidade dos produtos gênicos dessas ORFs foi determinada comparando suas seqüências com seqüências depositadas no banco de dados público GenBank pelo programa BLASTx (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

Seqüências típicas para a ligação de elementos regulatórios foram identificadas utilizando o programa Vector NTI (Invitrogen), opção “Analyses” → “Motifs”, com

um mínimo de similaridade para com a seqüência consenso programada para 85% e similaridade para com nucleotídeos ambíguos selecionada para máxima (“*Maximum*”).

2.12 TESTES DE FISILOGIA

Para se determinar se as mutações afetaram a capacidade das estirpes em fixar N₂, estas foram cultivadas em placas de 96 poços contendo 150 mL de meio NFbHP malato semi-sólido (ágar 1,5 g/L – item 2.1.2) em cada poço, sem a adição de compostos nitrogenados, sob ar, e, após 48–72 h de cultivo, o conteúdo proteico das culturas foi determinado (2.8).

Para saber se as mutações afetaram a capacidade das estirpes mutantes de crescer utilizando outros compostos nitrogenados como fonte única de nitrogênio, as estirpes selvagem e mutantes de *H. seropedicae* foram inoculadas em meio NFbHP malato (ágar 15 g/L; 2.1.1), na presença de NaNO₃, L- α -alanina, L-asparagina, L-aspartato, L-glutamina, L-glutamato ou L-serina 10 mmol/L. As colônias resultantes foram analisadas qualitativamente por comparação de seus tamanhos com o da estirpe selvagem.

2.13 INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO NO SOBRENADANTE DE CULTURAS DE *Herbaspirillum seropedicae*

2.13.1 Quantificação de compostos de indol

A concentração de derivados de indol no sobrenadante da cultura foi determinada como descrito por TANG e BONNER (1947), modificado para o formato de placas de 96 poços. Duzentos microlitros de cultura foram transferidos para poço de uma placa-filtro Multiscreen-GV (Millipore, número de catálogo MAGVN2250) e filtrados por centrifugação a $2500 \times g$ por 5 min para poço de uma outra placa de 96 poços. Cem microlitros desta solução filtrada foram transferidos para poço de uma placa de ELISA de 96 poços. Foram adicionados 100 μ L de uma variação de reagente de Salkowski (FeCl₃ 55 mmol/L, H₂SO₄ 7,9 mol/L), fechando em seguida com tampa adesiva. O sistema foi incubado por 30 min, sob ausência de luz, à temperatura

ambiente. Os valores de absorvância foram determinados a 550 nm utilizando um leitor de microplacas Elx800 (Bio-Tek Instruments).

Para relacionar a concentração de AIA com o número de células na cultura, a D.O.₆₀₀ da mesma foi determinada. Para isso, foram transferidos 200 µL de cultura para poço de uma placa de ELISA e a absorvância determinada a 600 nm de modo semelhante à determinação a 550 nm. Os valores de D.O.₆₀₀ obtidos em placa de 96 poços foram convertidos em valores de D.O.₆₀₀ em cubeta padrão com caminho ótico de 1 cm, dividindo pelo fator de correção 0,2978, previamente determinado. Todos os experimentos foram efetuados em quadruplicata.

2.13.2 Detecção de ácido indol-3-acético por cromatografia em camada delgada

Para confirmar que os derivados de indol quantificados pelo método de Salkowski (2.13.1) eram predominantemente AIA, o sobrenadante de cada cultura foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) em gel de sílica, essencialmente como descrito (EHMANN, 1977). Vinte mililitros de cultura foram centrifugados a $15.000 \times g$ e o sobrenadante coletado por decantação. O pH do sistema foi ajustado para $\approx 1,0$ através da adição de solução HCl concentrada. A solução resultante foi extraída com 1 volume de clorofórmio. A fase orgânica inferior foi coletada e concentrada $\approx 15\times$ por evaporação. Cerca de 30 µL foram aplicados gradualmente (de forma a concentrar a amostra por evaporação do solvente, em uma área circular de ≈ 3 mm de diâmetro) na placa de gel de sílica. O sistema de solventes de CCD consistiu de uma mistura clorofórmio:metanol:água na proporção 84:14:1. Após a CCD, a placa foi seca a 45–60 °C por 5–10 min e fotografada sob luz UV (254 nm). Para a revelação dos compostos de indol, a placa foi borrifada na posição vertical, até a sílica adquirir um aspecto úmido, com o reagente de van Urk–Salkowski (EHMANN, 1977). O reagente de van Urk consistiu de 1 g de *p*-dimetilaminobenzaldeído dissolvido em 50 mL de solução HCl concentrada (massa específica 1,19 g/cm³), adicionado de 50 mL de etanol 96%. O reagente de van Urk–Salkowski consistiu de uma mistura reagente de van Urk:reagente de Salkowski

(2.13.1) na proporção 1:3. A placa foi incubada em estufa a 100 °C por 5 min, e depois resfriada à temperatura ambiente. A placa foi lavada 3× por imersão em ddH₂O, agitando cuidadosamente (pois nesta etapa o gel de sílica podia descolar-se da placa) por 1 min cada ciclo. O excesso de umidade da placa foi eliminado por mata-borrão com papel toalha e as cores das bandas foram comparadas com as da literatura (cores com a placa úmida – EHMANN, 1977). A placa foi seca a 45–60 °C por 20–30 min e novamente as cores das bandas foram comparadas com as da literatura (cores com a placa seca – EHMANN, 1977).

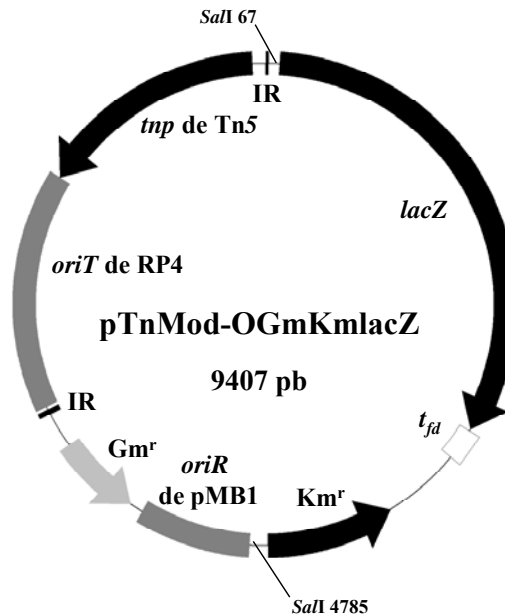
3 RESULTADOS

3.1 OBTENÇÃO DO PLASMÍDEO pTnMod-OGmKmlacZ PARA A MUTAGÊNESE ALEATÓRIA DE *Herbaspirillum seropedicae*

O plasmídeo pTnMod-OGm (Fig. 5) foi construído por DENNIS e ZYLSTRA (1998) para a mutagênese aleatória em bactérias Gram-negativas. Este plasmídeo contém um transposon cuja seqüência inclui um gene de resistência a gentamicina (para a seleção dos mutantes) e a origem de replicação *oriR* de pMB1, com alta especificidade para *E. coli*. Esta especificidade faz com que o plasmídeo seja instável (suicida) em outros hospedeiros, e permite a recuperação do fragmento de DNA mutagenizado do hospedeiro em *E. coli*, o que torna possível que seja seqüenciado e o gene identificado. O plasmídeo inclui ainda o gene da transposase de Tn5 fora da seqüência de inserção. Como o plasmídeo é suicida, o gene que codifica a transposase é perdido, e isto evita novos eventos de transposição depois que o transposon foi inserido aleatoriamente no DNA do hospedeiro. E o plasmídeo também possui a origem de transferência *oriT* de RP4, possibilitando ser transferido para o hospedeiro a ser mutagenizado por conjugação.

Apesar de todas estas características, o plasmídeo descrito acima não permite acompanhar os níveis de expressão do gene que contém a inserção. Para a seleção dos genes de *H. seropedicae* regulados em resposta à concentração de amônio no meio, foi necessária a inserção de um gene repórter (*lacZ*) sem promotor no transposon de pTnMod-OGm. Assim, o cassete *lacZ*-Km^r presente no plasmídeo pKOK6 (Fig. 4) foi transferido para o plasmídeo pTnMod-OGm, resultando no plasmídeo pTnMod-OGmKmlacZ (Fig. 6), que foi utilizado, com sucesso, para a mutagênese aleatória de *H. seropedicae*.

FIGURA 6 – MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pTnMod-OGmKmlacZ



O plasmídeo pTnMod-OGmKmlacZ, contendo o cassete *lacZ-Km^r* inserido entre os sítios *SalI* indicados, foi utilizado na obtenção de uma coleção de mutantes genômicos aleatórios de *H. seropedicae* Z78.

3.2 CONSTRUÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DE UMA BIBLIOTECA DE MUTANTES ALEATÓRIOS DE *Herbaspirillum seropedicae*

O plasmídeo pTnMod-OGmKmlacZ foi transferido para células de *H. seropedicae* conforme descrito (2.6), selecionando para resistência a gentamicina e canamicina. Um total de 5400 mutantes de inserção foi obtido mas, por probabilidade, somente a metade (≈ 2700) continha o gene repórter *lacZ* inserido na mesma orientação que o gene alvo.

Para se determinar o número aproximado de genes distintos coberto pela biblioteca de mutantes aleatórios, as propriedades estatísticas do conjunto de sítios de inserção foram analisadas utilizando o modelo do par de bases neutro, em que a probabilidade de inserção é a mesma para qualquer par de bases (JACOBS *et al.*, 2003). A probabilidade p de qualquer ORF ser inserida com o gene repórter *lacZ* na mesma orientação foi estimada considerando que todas as ORFs de *H. seropedicae* tinham 1022 pb de comprimento, que foi o tamanho médio de 126 ORFs anotadas de

H. seropedicae (www.genopar.org) aleatoriamente escolhidas. A constante p foi determinada dividindo o tamanho médio das ORFs pelo tamanho total do genoma de *H. seropedicae* (5,5 Mpb, www.genopar.org); portanto, $p = 1,9 \times 10^{-4}$. Os outros parâmetros foram $n = 2700$ (número de inserções obtidas com *lacZ* na mesma orientação), e $k = 5000$ (número total de ORFs em *H. seropedicae*, www.genopar.org). O número calculado de ORFs distintas inseridas com *lacZ* na mesma orientação foi obtido utilizando a fórmula (JACOBS *et al.*, 2003):

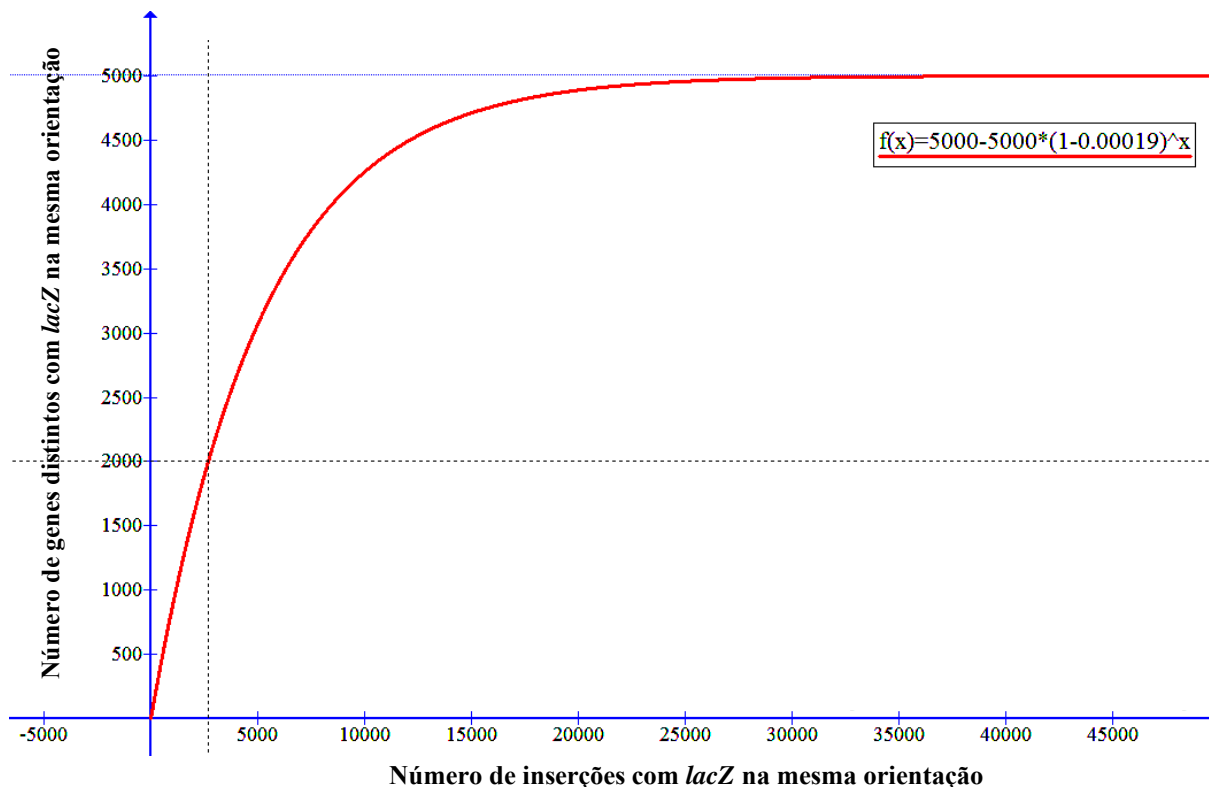
$$k - k(1 - p)^n = 5000 - 5000 \times (1 - 1,9 \cdot 10^{-4})^{2700} \cong 2000 \quad (\text{Equação 3}),$$

o que corresponde a aproximadamente 40% do número total de genes (ORFs) no genoma de *H. seropedicae*. A Fig. 7 mostra o gráfico que correlaciona o número de mutantes obtidos com a cobertura relativa do genoma de *H. seropedicae*, bem como o resultado deste trabalho.

3.3 OBTENÇÃO DE UMA COLEÇÃO DE MUTANTES *Herbaspirillum seropedicae* Z78 COM PADRÃO DE EXPRESSÃO *lacZ* DIFERENCIAL

Cerca de 2700 estirpes da biblioteca de mutantes aleatórios continham a inserção na mesma orientação que o gene inserido (2.11). Para se determinar quais apresentavam padrão de expressão *lacZ* diferencial conforme a concentração de amônio, as estirpes resistentes a canamicina e gentamicina foram cultivadas em meio sólido na presença do indicador de atividade de β -galactosidase X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo), adicionado de NH_4Cl 2 ou 20 mmol/L. A Fig. 8 é um exemplo ilustrativo que mostra um grupo de 96 mutantes aleatórios cultivados nestas duas concentrações de amônio. Com este procedimento, as estirpes mutantes cujas colônias apresentaram diferentes graus de intensidade de coloração azul, de uma condição para a outra, foram selecionadas para ensaios de atividade de β -galactosidase, num total de 131 estirpes.

FIGURA 7 – COBERTURA RELATIVA DO GENOMA DE *Herbaspirillum seropedicae* PELA ESTRATÉGIA DA MUTAGÊNESE ALEATÓRIA ENVOLVENDO O PLASMÍDEO pTnMod-OGmKmlacZ

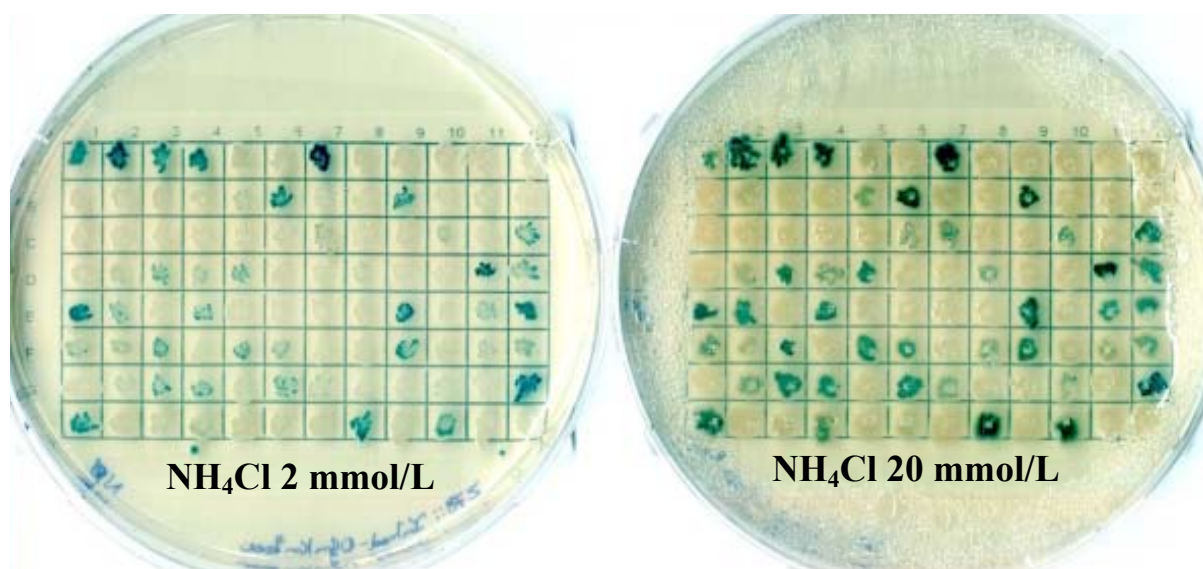


Representação gráfica da equação 3. O eixo das abcissas representa o número de mutantes aleatórios obtidos com a inserção na mesma orientação que o gene inserido (metade do número total de mutantes obtidos) e a linha tracejada vertical realça o resultado deste trabalho (2700); o eixo das ordenadas representa o número de genes distintos cobertos pela biblioteca de mutantes e a linha horizontal pontilhada em azul mostra o número total de genes em *H. seropedicae* (5000).

A Tabela 3 mostra os resultados dos ensaios de atividade de β -galactosidase para esse grupo de 131 estirpes mutantes. Os resultados dessa tabela mostram 59 estirpes contendo genes alvos de inserção diferencialmente expressos em condição de baixa concentração de amônio, incluindo 57 mutantes que possuem genes ativados (com níveis de atividade específica de β -galactosidase variando de 1,7 a 2000 vezes, Fig. 9), e duas que têm os genes reprimidos (com inibição de 5,6 e 2,0 vezes da atividade específica de β -galactosidase). Como foram analisadas ≈ 2700 inserções com

o gene repórter *lacZ* inserido na mesma orientação que o gene alvo, as 59 inserções com padrão de expressão diferencial indicaram que $59/2700 = 2,2\%$ do total de ORFs de *H. seropedicae* é regulado por amônio, o que corresponde a aproximadamente 110 genes (www.genopar.org).

FIGURA 8 – ENSAIO DE EXPRESSÃO *lacZ* DIFERENCIAL DAS ESTIRPES MUTANTES RESISTENTES A CANAMICINA E GENTAMICINA EM NH_4Cl 2 E 20 mmol/L.



A biblioteca com 5400 mutantes resistentes a canamicina e gentamicina foi cultivada em NFb malato sólido, na presença do indicador de atividade de β -galactosidase X-GAL, adicionado de NH_4Cl 2 ou 20 mmol/L, como ilustrado para este grupo de 96 mutantes. As estirpes mutantes que aparentemente apresentaram padrão de expressão diferencial (indicado pela coloração azul) entre as duas condições de disponibilidade de amônio testadas foram selecionadas para ensaios de atividade de β -galactosidase. Com este procedimento, um total de 131 estirpes foi selecionado para ensaios de atividade de β -galactosidase.

TABELA 3 – ATIVIDADE ESPECÍFICA DE β -GALACTOSIDASE DAS 131 ESTIRPES MUTANTES SELECIONADAS PELO TESTE EM X-GAL

Nome da estirpe (nome alternativo [§])	Atividade em NH ₄ Cl 20 mmol/L	Atividade em NH ₄ Cl 2 mmol/L	Fator de indução/ repressão [†]	Tipo de regulação [‡]
N1.12.H06	62 ± 16	77 ± 15	1,3	NS
N1.13.B10	0,76 ± 0,13	0,67 ± 0,27	0,88	NS
N1.12.C02	0,19 ± 0,15	0,10 ± 0,21	0,53	NS
N1.10.D05	0,37 ± 0,13	0,48 ± 0,22	1,3	NS
N1.06.G08	1,4 ± 0,7	12 ± 3	8,4	+
N1.02.D08	1,5 ± 0,6	60 ± 13	39	+
N1.08.D01	0,19 ± 0,19	4,6 ± 0,7	24	+
N1.20.A04	4,5 ± 4,2	21 ± 5	4,7	+
N1.15.B09 (S2)	0,64 ± 0,15	22 ± 2	35	+
N1.05.H03	0,87 ± 0,27	11 ± 3	13	+
N1.01.F05 (S6)	1,7 ± 0,5	47 ± 9	28	+
N1.13.E08	0,16 ± 0,10	4,7 ± 0,9	29	+
N2.16.G01 (S27)	2,7 ± 0,4	6,8 ± 1,6	2,5	+
N2.16.F04	2,1 ± 0,9	1,9 ± 0,5	0,90	NS
N2.16.F10	2,1 ± 0,6	2,3 ± 0,9	1,1	NS
N2.17.E07 (S12)	2,8 ± 0,8	19 ± 3	6,7	+
N2.17.E04	286 ± 83	8700 ± 2800	30	+
N2.18.F04	0,52 ± 0,14	22 ± 5	43	+
N2.18.G12	0,80 ± 0,29	0,66 ± 0,46	0,82	NS
N2.18.A12	4,7 ± 2,4	47 ± 6	10	+
N2.18.A05	46 ± 15	58 ± 13	1,2	NS
N2.19.B02	4,2 ± 1,0	5,2 ± 1,0	1,2	NS
N2.19.F10	5,6 ± 4,4	5,6 ± 2,0	0,99	NS
N2.19.G05	12 ± 3	310 ± 42	26	+
N2.19.G09	3,7 ± 0,9	9,2 ± 1,0	2,5	+
N2.19.C04	34 ± 4	34 ± 9	0,98	NS
N2.10.D05	4,1 ± 1,6	6,9 ± 1,7	1,7	+
N2.10.G02 (S5)	2,9 ± 1,1	19 ± 3	6,6	+
N2.10.G04	0,69 ± 0,16	0,72 ± 0,46	1,0	NS
N2.10.H03	0,35 ± 0,11	0,23 ± 0,12	0,65	NS
N2.10.E09 (S28)	7,7 ± 3,8	326 ± 75	42	+
N2.20.H10	4,8 ± 1,7	30 ± 6	6,3	+
N2.20.G01 (S24)	0,52 ± 0,18	6,2 ± 1,2	12	+
N2.20.D01 (S14)	43 ± 11	84 ± 10	2,0	+
N2.03.D11	0,41 ± 0,14	0,56 ± 0,44	1,4	NS
N2.03.E09	2,2 ± 0,49	2,6 ± 0,7	1,2	NS
N2.03.B09	0,87 ± 0,16	1,0 ± 0,4	1,2	NS
N2.02.D05	0,88 ± 0,31	1,1 ± 0,4	1,3	NS
N2.02.G02	3,3 ± 1,3	11 ± 2	3,4	+
N2.02.G12	5,2 ± 1,2	56 ± 11	11	+
N2.01.F12 (S3)	0,23 ± 0,27	29 ± 7	120	+
N2.01.H02 (S23)	0,49 ± 0,13	22 ± 7	45	+
N2.01.D11 (S7)	0,50 ± 0,39	16 ± 2	32	+
N2.11.E04 (S13)	1,6 ± 0,4	8,6 ± 2,7	5,5	+
N2.11.H02	0,67 ± 0,08	0,79 ± 0,36	1,2	NS
N2.04.C05	0,44 ± 0,31	0,68 ± 0,15	1,5	NS
N2.04.G11 (S31)	3,5 ± 1,6	10 ± 2	2,9	+

Continua...

TABELA 3 (CONTINUAÇÃO)

Nome da estirpe (nome alternativo [§])	Atividade em NH ₄ Cl 20 mmol/L	Atividade em NH ₄ Cl 2 mmol/L	Fator de indução/ repressão [†]	Tipo de regulação [‡]
N2.04.G06 (S26)	9,9 ± 2,9	92 ± 15	9,3	+
N2.04.E02	7,1 ± 2,6	10 ± 1	1,4	NS
N2.11.A10 (S8)	0,21 ± 0,13	421 ± 99	2000	+
N2.04.B06	0,21 ± 0,06	0,55 ± 0,14	2,6	+
N2.05.F07	6,8 ± 0,7	98 ± 22	14	+
N2.05.G05	14 ± 5	52 ± 10	3,8	+
N2.05.D08	0,82 ± 0,10	1,0 ± 0,4	1,2	NS
N2.05.D11	0,34 ± 0,46	0,28 ± 0,09	0,83	NS
N2.06.D02	5,2 ± 3,3	8,0 ± 3,0	1,5	NS
N2.06.D01	1,6 ± 0,4	6,2 ± 1,2	3,9	+
N2.06.G02	32 ± 9	43 ± 16	1,4	NS
N2.06.B03	0,36 ± 0,17	22 ± 5	60	+
N2.07.C08	6,8 ± 0,7	21 ± 4	3,2	+
N2.07.B05	0,39 ± 0,28	0,60 ± 0,28	1,5	NS
N2.08.F07	4,0 ± 1,7	8,3 ± 1,4	2,1	+
N2.08.E01	0,19 ± 0,04	0,44 ± 0,26	2,4	NS
N2.08.F03	1,2 ± 0,8	0,61 ± 0,16	0,52	NS
N2.08.B01 (S21)	0,17 ± 0,10	14 ± 4	83	+
N2.12.G03	13 ± 4	17 ± 4	1,3	NS
N2.12.H01	4,6 ± 0,9	12 ± 3	2,6	+
N2.12.H08	0,47 ± 0,22	1,5 ± 0,7	3,2	NS
N2.12.A09	50 ± 15	64 ± 13	1,3	NS
N2.13.B06	2,6 ± 1,9	2,6 ± 0,6	1,0	NS
N2.13.G08	2,0 ± 0,7	1,0 ± 0,6	0,54	NS
N2.13.H08 (S1)	30 ± 9	15 ± 4	0,50	-
N2.14.F12	0,15 ± 0,03	0,32 ± 0,15	2,2	NS
N2.14.F03	1,7 ± 0,3	1,5 ± 0,5	0,90	NS
N2.14.E05	2,5 ± 0,6	99 ± 12	40	+
N2.14.G02 (S22)	0,52 ± 0,36	31 ± 7	59	+
N2.15.E04	1,8 ± 0,6	2,0 ± 0,9	1,1	NS
N2.15.H06	2,6 ± 1,2	2,1 ± 0,3	0,80	NS
N2.15.F10	3,5 ± 2,0	2,3 ± 0,5	0,67	NS
N2.15.E07 (S19)	5,1 ± 0,56	12 ± 3	2,3	+
N2.15.B01 (S15)	11 ± 2	51 ± 10	4,7	+
N2.09.E02	0,80 ± 0,38	0,99 ± 0,71	1,2	NS
N2.09.F08	4,7 ± 1,2	0,85 ± 0,28	0,18	-
N2.09.C06	0,95 ± 0,53	1,8 ± 0,62	1,8	NS
N2.09.B01 (S11)	5,7 ± 4,8	110 ± 31	19	+
N3.20.H01	0,22 ± 0,15	0,40 ± 0,20	1,9	NS
N3.20.E09	2,7 ± 0,9	3,8 ± 1,3	1,4	NS
N3.20.D07	2,4 ± 1,3	2,2 ± 0,4	0,93	NS
N3.20.C01	1,1 ± 0,3	0,73 ± 0,22	0,67	NS
N3.19.A02	1,3 ± 0,4	1,8 ± 0,8	1,4	NS
N3.19.C02	0,74 ± 0,39	0,96 ± 0,20	1,3	NS
N3.19.G06 (S29)	0,11 ± 0,05	2,9 ± 0,3	26	+
N3.18.A05	1,0 ± 0,5	0,56 ± 0,75	0,55	NS
N3.18.A07	4,8 ± 1,1	3,4 ± 0,4	0,71	NS
N3.18.H06	1,7 ± 0,8	1,3 ± 0,6	0,74	NS

Continua...

TABELA 3 (CONTINUAÇÃO)

Nome da estirpe (nome alternativo [§])	Atividade em NH ₄ Cl 20 mmol/L	Atividade em NH ₄ Cl 2 mmol/L	Fator de indução/ repressão [†]	Tipo de regulação [‡]
N3.18.F02 (S17)	0,51 ± 0,12	20 ± 3	38	+
N3.17.A09	0,70 ± 0,14	11 ± 4	16	+
N3.12.F08	2,7 ± 0,6	1,8 ± 1,2	0,68	NS
N3.11.F05 (S20)	0,38 ± 0,15	1,4 ± 0,21	3,6	+
N3.11.G03	1,9 ± 0,6	2,8 ± 1,2	1,5	NS
N3.10.D10	1,0 ± 0,5	1,6 ± 0,8	1,6	NS
N3.10.H08	0,60 ± 0,44	1,1 ± 0,9	1,8	NS
N3.10.H07	0,40 ± 0,33	0,66 ± 0,35	1,7	NS
N3.09.H02	6,1 ± 2,0	26 ± 8	4,2	+
N3.09.H03	11 ± 3	13 ± 3	1,2	NS
N3.08.A07	0,85 ± 0,21	0,45 ± 0,23	0,52	NS
N3.07.B01	8,3 ± 2,9	5,0 ± 0,8	0,61	NS
N3.07.A12	1,2 ± 0,3	0,86 ± 0,49	0,74	NS
N3.07.G11 (S18)	0,58 ± 0,27	20 ± 5	35	+
N3.07.D05	0,68 ± 0,06	0,41 ± 0,49	0,60	NS
N3.06.E02	2,2 ± 1,3	3,0 ± 1,2	1,4	NS
N3.05.E01 (S24)	0,36 ± 0,08	17 ± 7	47	+
N3.05.G02 (S9)	1,9 ± 0,28	36 ± 7	19	+
N3.05.D03 (S16)	0,66 ± 0,14	18 ± 6	28	+
N3.03.D08	0,32 ± 0,18	0,55 ± 0,26	1,7	NS
N3.03.G11	1,8 ± 0,47	2,2 ± 0,9	1,2	NS
N3.03.H08 (S30)	0,11 ± 0,09	3,2 ± 0,8	30	+
N3.03.C10	5,6 ± 3,8	2,7 ± 1,2	0,49	NS
N3.03.H04 (S32)	5,6 ± 1,0	16 ± 4	2,9	+
N3.02.D11 (S4)	1,3 ± 0,4	36 ± 9	27	+
N3.02.F05	0,18 ± 0,05	0,36 ± 0,32	2,0	NS
N3.02.G06	0,058 ± 0,020	0,81 ± 0,85	14	NS
N3.16.G03 (S10)	2,1 ± 0,9	11 ± 2	5,3	+
N3.16.A10	2,9 ± 0,8	3,9 ± 1,1	1,3	NS
N3.15.H09	0,39 ± 0,10	0,38 ± 0,51	0,99	NS
N3.14.H11	2,5 ± 0,6	3,0 ± 1,4	1,2	NS
N3.14.C06	0,048 ± 0,058	0,26 ± 0,34	5,3	NS
N3.14.C10	0,46 ± 0,24	0,62 ± 0,31	1,4	NS
N3.14.D01	0,46 ± 0,17	0,78 ± 0,45	1,7	NS
N3.13.G08	0,56 ± 0,10	0,52 ± 0,43	0,92	NS
N3.13.H03	0,41 ± 0,06	0,54 ± 0,43	1,3	NS

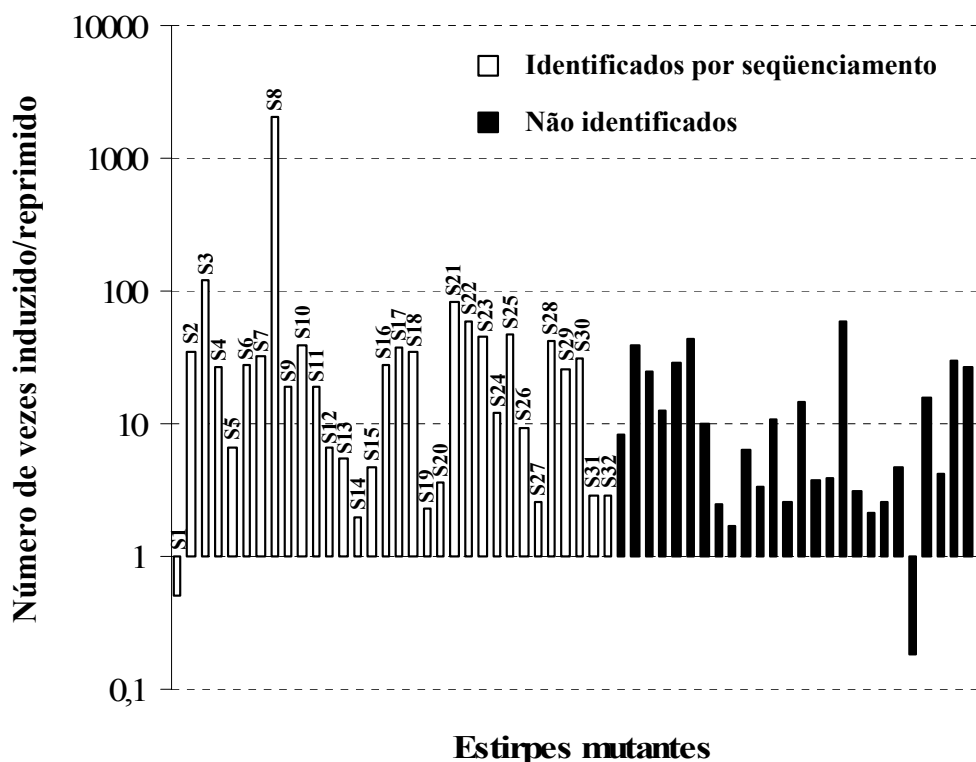
Os valores são a média da atividade específica de β-galactosidase de cada estirpe mutante testada em quadruplicata, expressa em nmol ONP/min/mg proteína, com intervalos de desvio padrão.

[§] Conforme Tabela 4.

[†] O fator de indução refere-se à razão entre a atividade específica em meio adicionado de NH₄Cl 2 mmol/L e a atividade em NH₄Cl 20 mmol/L.

[‡] Os tipos de regulação podem ser ativação (+) ou inibição (-) em NH₄Cl 2 mmol/L, conforme diferenças estatisticamente significativas (teste *t* bilateral, com intervalo de confiança de 95%). NS = diferença de atividade não significativa.

FIGURA 9 – INDUÇÃO/REPRESSÃO DOS GENES ALVOS DE INSERÇÃO NAS 59 ESTIRPES MUTANTES CULTIVADAS EM BAIXA CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIO



As 59 estirpes representadas correspondem às que apresentaram diferenças estatisticamente significativas de atividade específica de β -galactosidase em baixa concentração de amônio (Tabela 3). Número de vezes induzido/reprimido refere-se à atividade específica de β -galactosidase da estirpe mutante em NH_4Cl 2 mmol/L dividida pela atividade em NH_4Cl 20 mmol/L (induzido se a razão > 1 , ou reprimido se a razão < 1). Para cada estirpe, o coeficiente de variação não ultrapassou o valor 0,2.

3.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ORFS CONTENDO INSERÇÃO OGmKmlacZ COM PADRÃO DE EXPRESSÃO *lacZ* DIFERENCIAL

Trinta e duas das cinquenta e nove estirpes mutantes com padrão de expressão *lacZ* diferencial conforme a concentração de amônio no meio (Tabela 3, Fig. 9) tiveram sua região de inserção clonada e identificada, utilizando os protocolos descritos (2.11). A Tabela 4 mostra os resultados de uma comparação com as seqüências depositadas no banco de dados público GenBank, para a identificação dos genes que continham a inserção nessas 32 estirpes. As estirpes foram renomeadas de

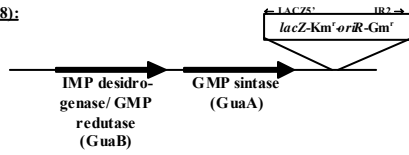
S1 a S32 para facilitar a descrição. As seqüências obtidas também foram comparadas com seqüências depositadas no banco de dados do Projeto de Seqüenciamento do Genoma de *H. seropedicae* (www.genopar.org). Isto permitiu identificar os sítios de inserção do transposon de pTnMod-OGmKmlacZ no genoma de *H. seropedicae*. A Fig. 10 mostra os mapas das inserções, em cada uma das 32 estirpes, no genoma de *H. seropedicae*. Quatro inserções foram encontradas em regiões intergênicas (estirpes S2, S10, S11 e S30); e três em um gene que codifica uma proteína do tipo SpoVR (estirpes S26, S27 e S28). Assim, os resultados apresentados permitiram a identificação de 26 genes distintos (25 ativados e 1 reprimido) de *H. seropedicae* regulados pela disponibilidade de NH_4^+ no meio.

Entre os genes identificados regulados por amônio estão os que codificam o transportador de amônio de alta afinidade AmtB, a proteína dinitrogenase redutase NifH, e um gene, denominado *orf1* (KLASSEN *et al.*, 1999), a jusante do grupamento da fixação de nitrogênio *nifHDKENX*, que codifica uma proteína de função desconhecida (estirpes S9, S23 e S24, respectivamente, Tabela 4, Fig. 10). Mostrou-se previamente que estes genes são ativados em situação de baixa concentração de amônio (KLASSEN *et al.*, 1999; NOINDORF *et al.*, 2006). Isto mostra que o sistema de mutagênese utilizado foi eficiente para a identificação de genes regulados de acordo com a concentração de amônio no meio.

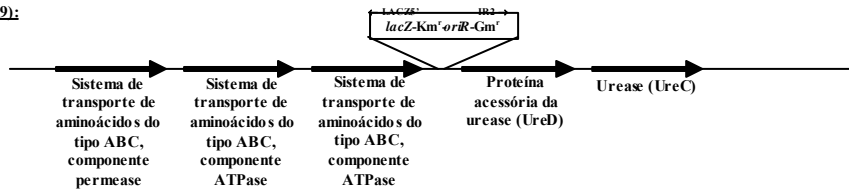
A maior parte dos genes de *H. seropedicae* regulados por amônio identificados neste estudo estão envolvidos no transporte de compostos de nitrogênio, particularmente íons amônio, íons nitrato ou aminoácidos. Genes responsáveis por restabelecer os níveis intracelulares de amônio via catabolismo de fontes alternativas de nitrogênio, tais como os que pertencem ao metabolismo de bases purínicas (estirpes S1 e S5, Tabela 4, Fig. 10), fixação de N_2 (estirpes S21, S22, S23 e S24) e amidases/proteases/vias de degradação de aminoácidos (estirpes S7, S8, S12 e S31) também foram encontrados. E quatro genes encontrados codificam quinases ou fatores de regulação da transcrição (estirpes S6, S20, S25 e S29). A Fig. 11 mostra uma classificação funcional dos genes identificados de acordo com seu papel ou via metabólica.

FIGURA 10 – MAPAS DAS INSERÇÕES NO GENOMA DE *Herbaspirillum seropedicae*

S1 (N2.13.H08):



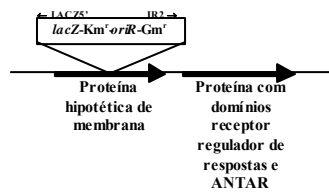
S2 (N1.15.B09):



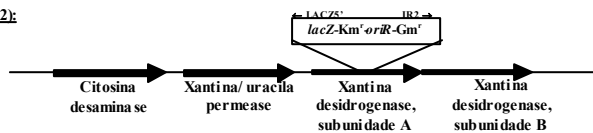
S3 (N2.01.F12):



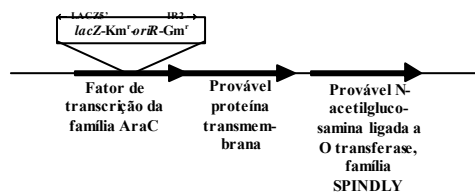
S4 (N3.02.D11):



S5 (N2.10.G02):



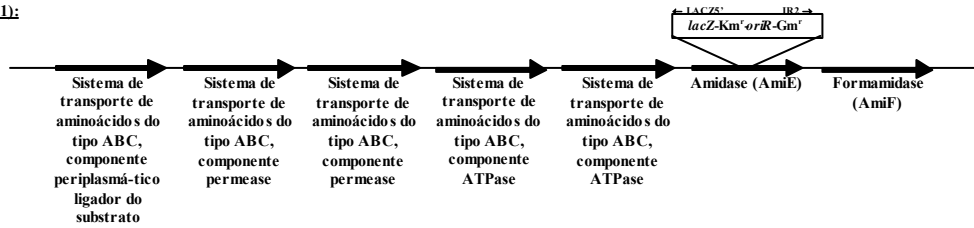
S6 (N1.01.F05):



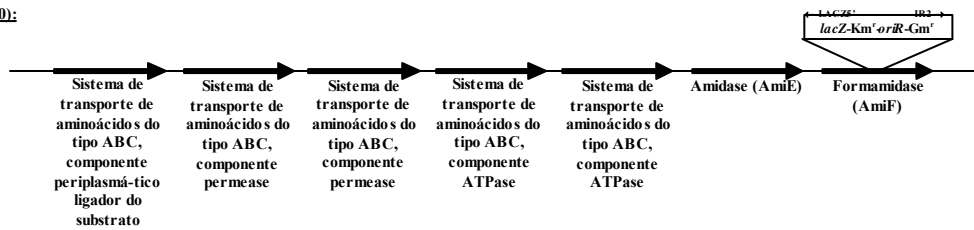
Continua...

FIGURA 10 (CONTINUAÇÃO)

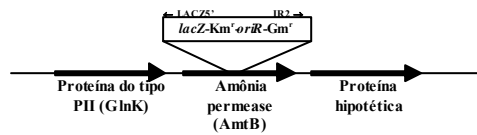
S7 (N2.01.D11):



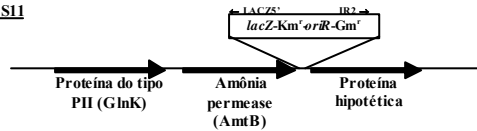
S8 (N2.11.A10):



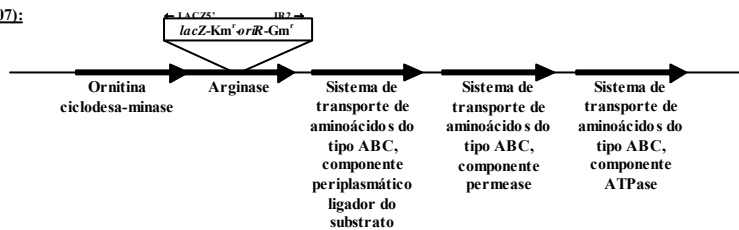
S9 (N3.05.G02):



S10 (N3.16.G03) e S11 (N2.09.B01):



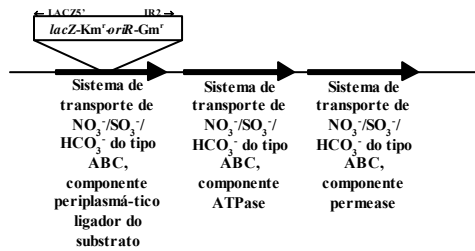
S12 (N2.17.E07):



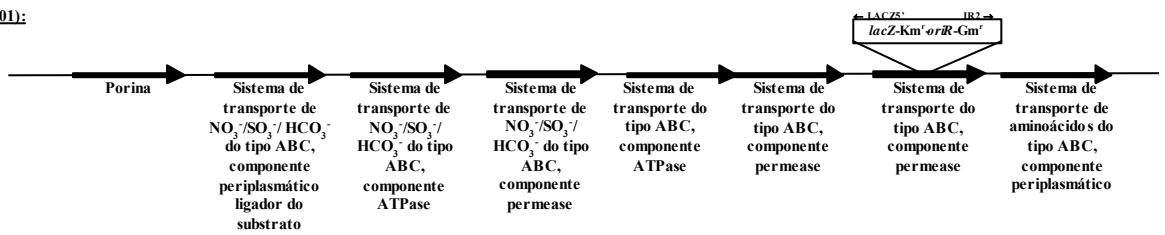
Continua...

FIGURA 10 (CONTINUAÇÃO)

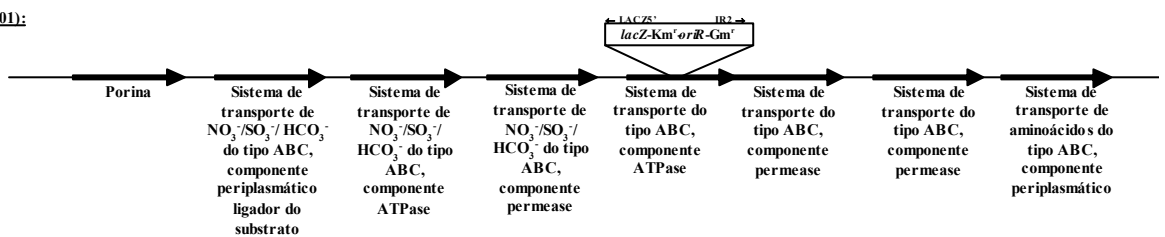
S13 (N2.11.E04):



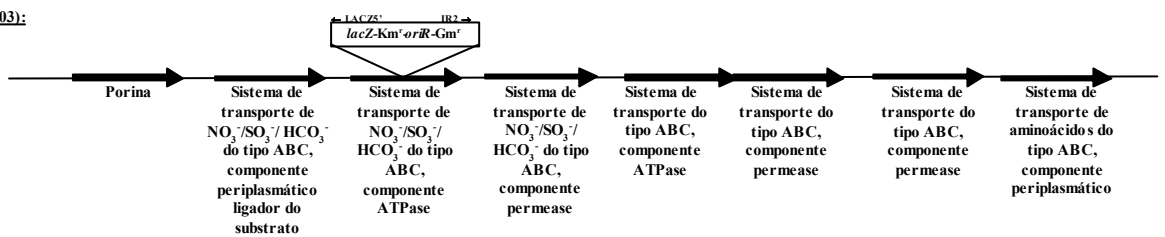
S14 (N2.20.D01):



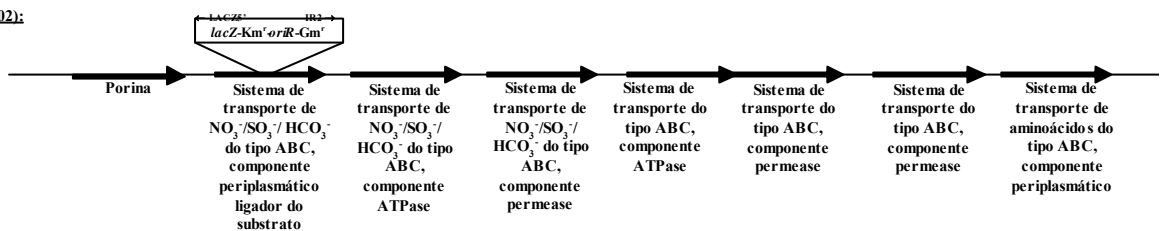
S15 (N2.15.B01):



S16 (N3.05.D03):



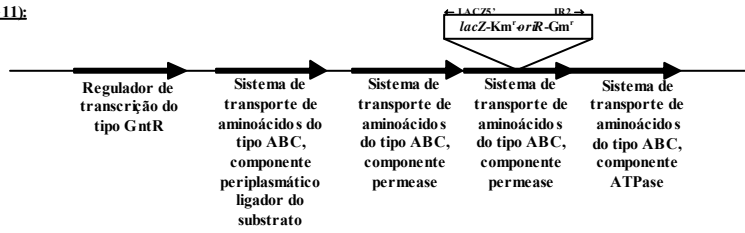
S17 (N3.18.F02):



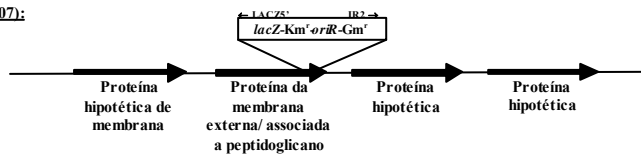
Continua...

FIGURA 10 (CONTINUAÇÃO)

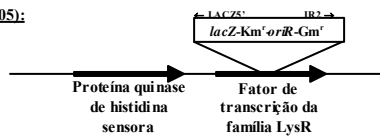
S18 (N3.07.G11):



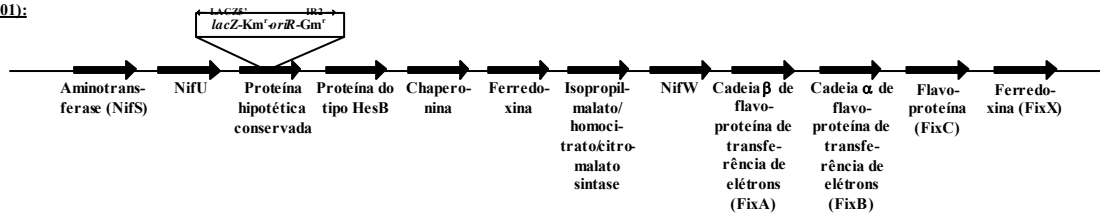
S19 (N2.15.E07):



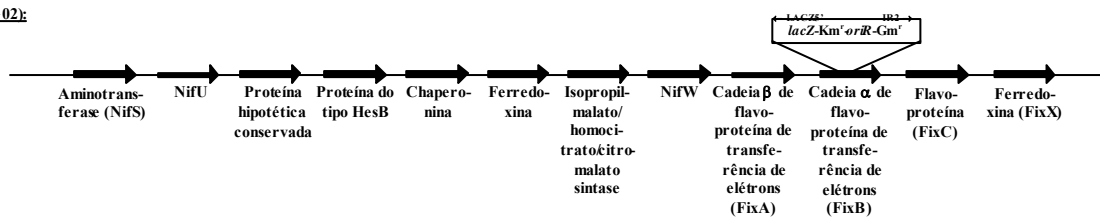
S20 (N3.11.F05):



S21 (N2.08.B01):



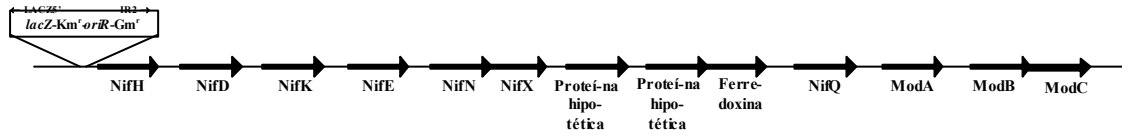
S22 (N2.14.G02):



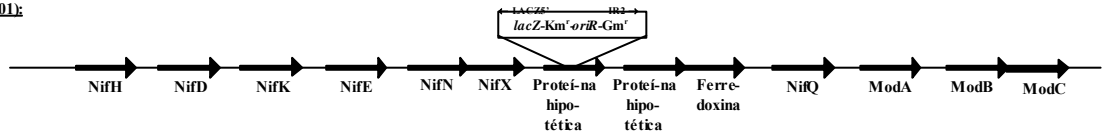
Continua...

FIGURA 10 (CONTINUAÇÃO)

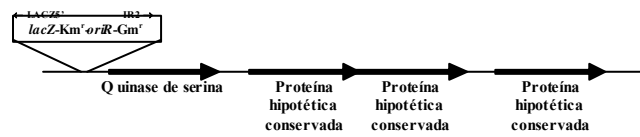
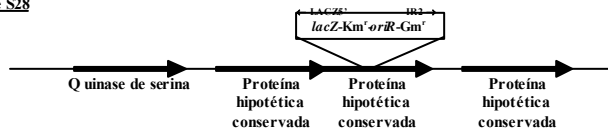
S23 (N2.01.H02):



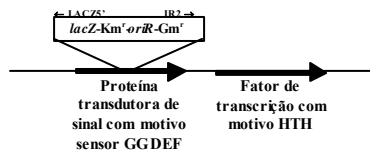
S24 (N2.20.G01):



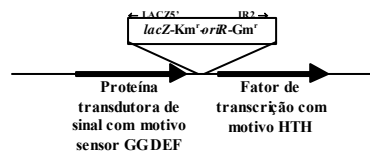
S25 (N3.05.E01):

S26 (N2.04.G06), S27
(N2.16.G01) e S28
(N2.10.E09):

S29 (N3.19.G06):

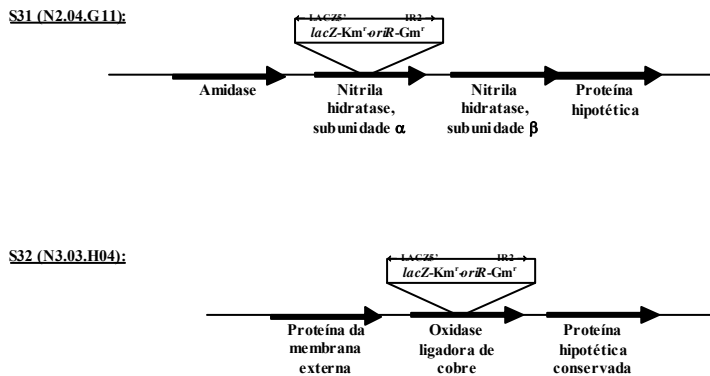


S30 (N3.03.H08):



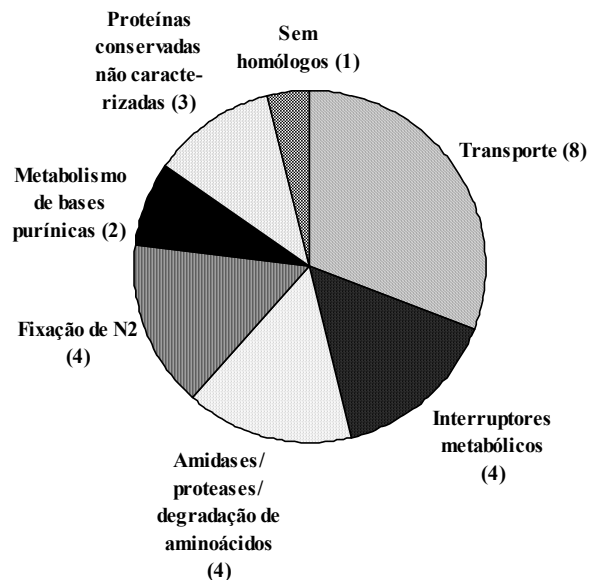
Continua...

FIGURA 10 (CONTINUAÇÃO)



No mapa de cada uma das estirpes, as setas grandes indicam a localização e o sentido de transcrição das ORFs próximas à inserção (indicada pela caixa sobressaída). Dentro da caixa, realça-se a estrutura do transposon contendo o gene repórter *lacZ*, genes que conferem resistência aos antibióticos canamicina e gentamicina, e a origem de replicação *oriR*. Sobre a caixa, os nomes e os sentidos de extensão dos oligonucleotídeos utilizados para o seqüenciamento das regiões do cromossomo de *H. seropedicae* vizinhas à inserção.

FIGURA 11 – CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DOS PRODUTOS DOS GENES REGULADOS POR AMÔNIO



Os números entre parênteses indicam o número de genes identificados dentro de cada classe. Transporte = transportadores de compostos nitrogenados; interruptores metabólicos = quinases e fatores de regulação da transcrição; sem homólogos = pouca similaridade com qualquer proteína previamente conhecida.

O único gene reprimido identificado neste trabalho codifica uma guanosina-mono-fosfato sintase (gene com a inserção na estirpe S1, Tabelas 3 e 4, Fig. 10), uma enzima envolvida com a síntese de nucleotídeos; seus níveis de expressão foram reduzidos em condições de baixa concentração de amônio. Por outro lado, nas mesmas condições, uma enzima envolvida na degradação de nucleotídeos (estirpe S5) foi superexpressa (6,6 vezes, Tabelas 3 e 4, Fig. 10).

3.5 EFEITOS FISIOLÓGICOS DAS MUTAÇÕES E EXPRESSÃO DOS GENES ALVOS DE INSERÇÃO EM FONTES VARIADAS DE NITROGÊNIO

Foi determinado o efeito das mutações na capacidade das estirpes em crescer utilizando N_2 , $NaNO_3$, L- α -alanina, L-asparagina, L-aspartato, L-glutamina, L-glutamato ou L-serina como fonte única de nitrogênio, em comparação com o crescimento da estirpe selvagem Z78. Para o teste com N_2 , as estirpes foram cultivadas em meio semi-sólido sem qualquer composto nitrogenado adicionado por 48–72 h. A Tabela 5 mostra os resultados de determinação da concentração de proteína nas culturas das estirpes. Como se pode verificar pelos dados dessa tabela, as únicas alterações significativas de crescimento em N_2 ocorreram com as estirpes S21, S22 e S23, que apresentaram um conteúdo proteico significativamente menor do que o da estirpe selvagem Z78. Os genes alvos de inserção nestas estirpes codificam uma proteína do tipo HesB, FixB e NifH, respectivamente (Fig. 10).

TABELA 5 – CONTEÚDO PROTEICO DAS ESTIRPES CULTIVADAS EM N₂ COMO FONTE ÚNICA DE NITROGÊNIO

Estirpe	[proteína] (µg/mL)	Estirpe	[proteína] (µg/mL)
Z78	87 ± 5	N2.11.A10 (S8)	69 ± 14
N1.06.G08	116 ± 22	N2.04.B06	91 ± 9
N1.02.D08	120 ± 26	N2.05.F07	98 ± 28
N1.08.D01	138 ± 18	N2.05.G05	101 ± 12
N1.20.A04	145 ± 22	N2.06.D01	115 ± 14
N1.15.B09 (S2)	109 ± 4	N2.06.B03	110 ± 14
N1.05.H03	117 ± 20	N2.07.C08	106 ± 26
N1.01.F05 (S6)	153 ± 27	N2.08.F07	96 ± 13
N1.13.E08	127 ± 39	N2.08.B01 (S21)	46 ± 11
N2.16.G01 (S27)	104 ± 23	N2.12.H01	106 ± 22
N2.17.E07 (S12)	133 ± 50	N2.13.H08 (S1)	117 ± 33
N2.17.E04	87 ± 19	N2.14.E05	97 ± 20
N2.18.F04	116 ± 15	N2.14.G02 (S22)	36 ± 19
N2.18.A12	114 ± 32	N2.15.E07 (S19)	116 ± 1
N2.19.G05	111 ± 15	N2.15.B01 (S15)	107 ± 19
N2.19.G09	123 ± 4	N2.09.F08	123 ± 21
N2.10.D05	123 ± 31	N2.09.B01 (S11)	112 ± 24
N2.10.G02 (S5)	101 ± 27	N3.19.G06 (S29)	110 ± 7
N2.10.E09 (S28)	91 ± 20	N3.18.F02 (S17)	97 ± 3
N2.20.H10	101 ± 16	N3.17.A09	101 ± 17
N2.20.G01 (S24)	88 ± 9	N3.11.F05 (S20)	100 ± 28
N2.20.D01 (S14)	127 ± 14	N3.09.H02	112 ± 27
N2.02.G02	115 ± 25	N3.07.G11 (S18)	143 ± 27
N2.02.G12	110 ± 18	N3.05.E01 (S25)	140 ± 37
N2.01.F12 (S3)	78 ± 25	N3.05.G02 (S9)	NE
N2.01.H02 (S23)	31 ± 25	N3.05.D03 (S16)	NE
N2.01.D11 (S7)	97 ± 19	N3.03.H08 (S30)	112 ± 48
N2.11.E04 (S13)	81 ± 11	N3.03.H04 (S32)	84 ± 11
N2.04.G11 (S31)	104 ± 16	N3.02.D11 (S4)	125 ± 13
N2.04.G06 (S26)	108 ± 14	N3.16.G03 (S10)	136 ± 24

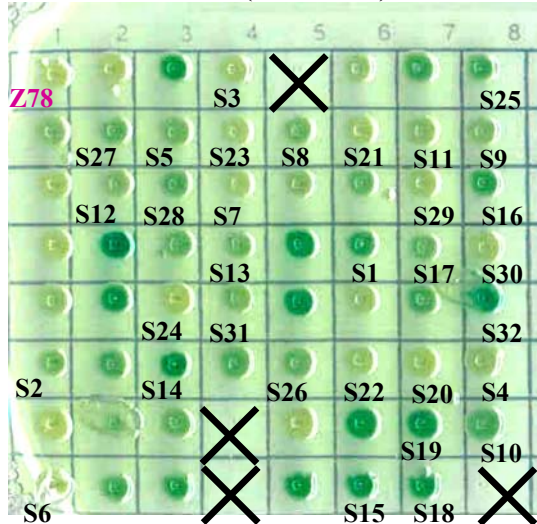
As estirpes foram cultivadas em meio semi-sólido sem qualquer composto nitrogenado adicionado e, após 48-72 h, a concentração de proteína foi determinada. NE = não determinado.

Para o teste com os restantes compostos nitrogenados, as estirpes foram cultivadas em meio sólido adicionado de uma das fontes de nitrogênio e, após 48–72 h, o tamanho da colônia da estirpe mutante foi comparado visualmente com o da estirpe selvagem Z78 (Fig. 12). Através deste teste, não foi detectada qualquer deficiência de crescimento das estirpes nas fontes de nitrogênio testadas. No mesmo ensaio, e para cada estirpe, a expressão do gene repórter *lacZ* foi comparada com a

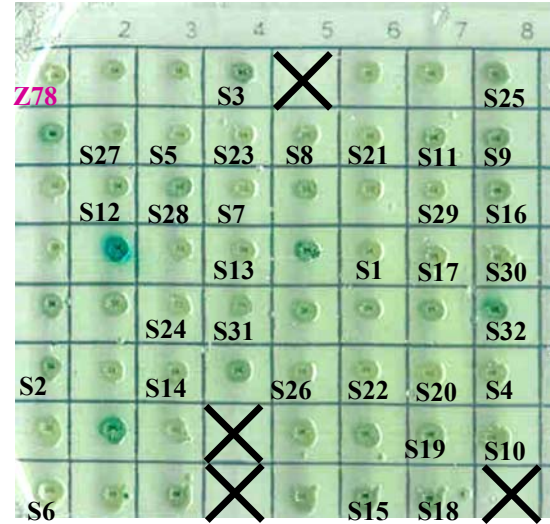
expressão na condição de crescimento em NH_4Cl 20 mmol/L, utilizando o indicador de atividade de β -galactosidase X-GAL (Fig. 12). A Tabela 6 sumariza as variações aparentes (conforme as mudanças na intensidade de coloração verde/azul) nos níveis de expressão dos genes alvos de inserção, bem como as alterações na capacidade de crescimento das estirpes nas fontes de nitrogênio testadas. Ainda pela Fig. 12, verifica-se que nenhuma estirpe (incluindo a selvagem Z78) cresceu significativamente em L-leucina, L- α -alanina ou L-serina como fonte única de carbono (meios sem ácido málico).

FIGURA 12 – EFEITO DA MUTAÇÃO SOBRE A UTILIZAÇÃO DE ALGUNS COMPOSTOS NITROGENADOS E VARIAÇÃO APARENTE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE ALVO DE INSERÇÃO NAS ESTIRPES MUTANTES DE *Herbaspirillum seropedicae*

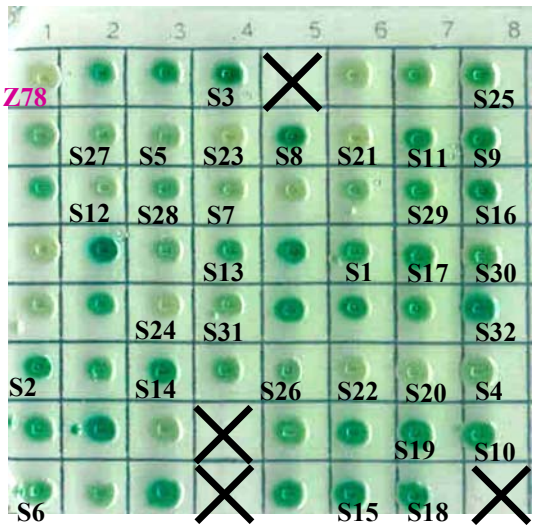
NH₄Cl 20 mmol/L (referência):



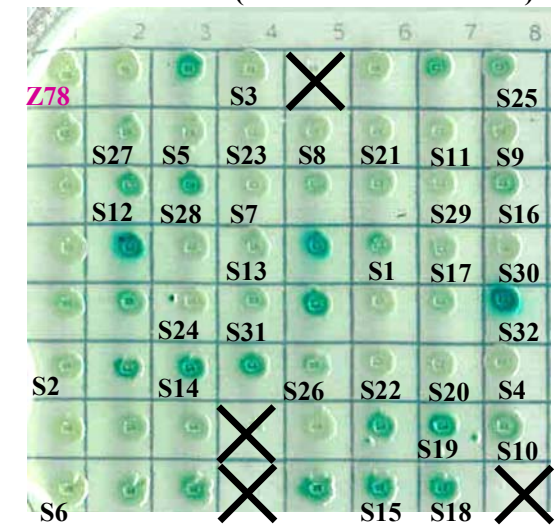
NaNO₃ 10 mmol/L:



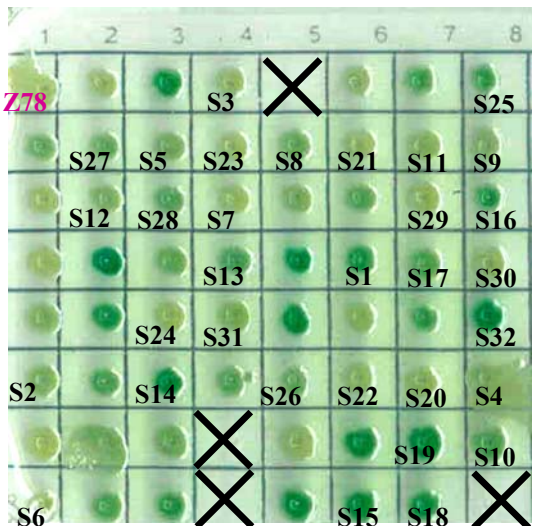
L-Glutamato 10 mmol/L:



L-Glutamato 10 mmol/L (meio sem ácido málico):



L-Glutamina 10 mmol/L:



L-Glutamina 10 mmol/L (meio sem ácido málico):

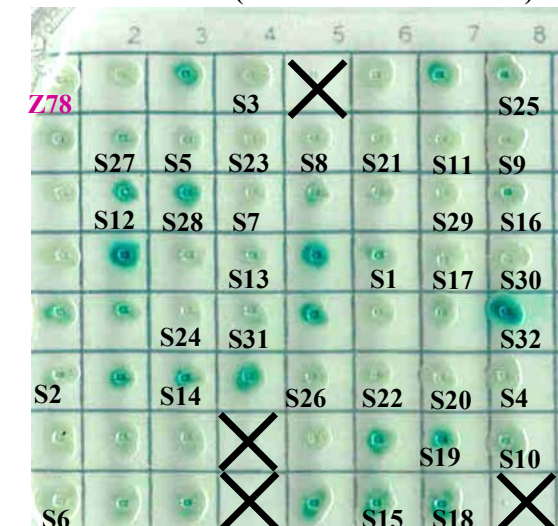
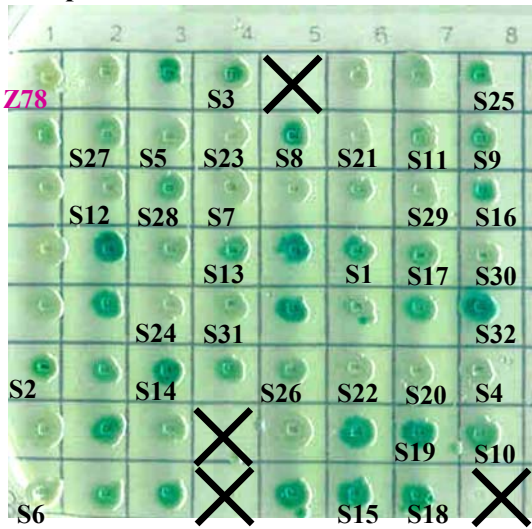
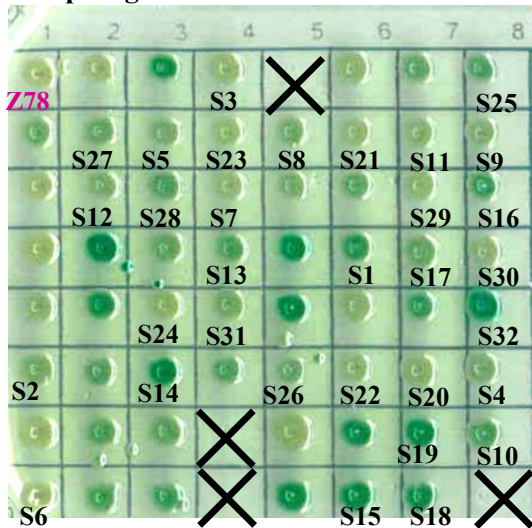
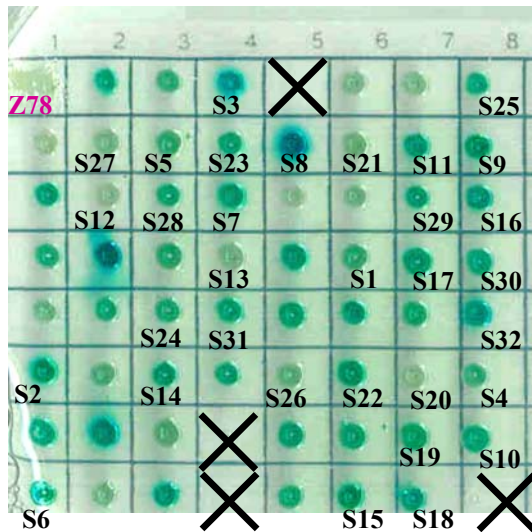


FIGURA 12 (CONTINUAÇÃO)

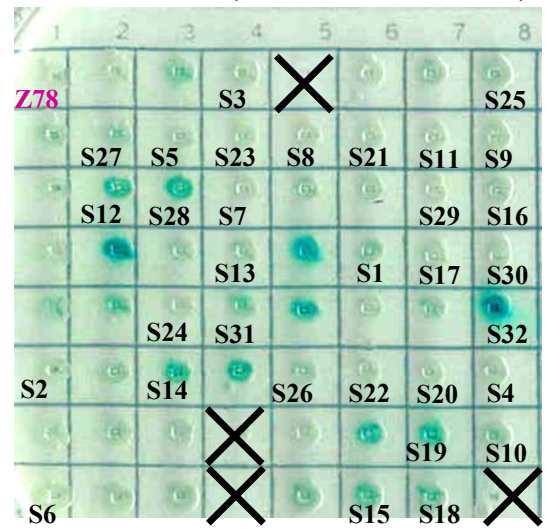
L-Aspartato 10 mmol/L:



L-Asparagina 10 mmol/L:

L- α -Alanina 10 mmol/L:

L-Aspartato 10 mmol/L (meio sem ácido málico):



L-Asparagina 10 mmol/L (meio sem ácido málico):

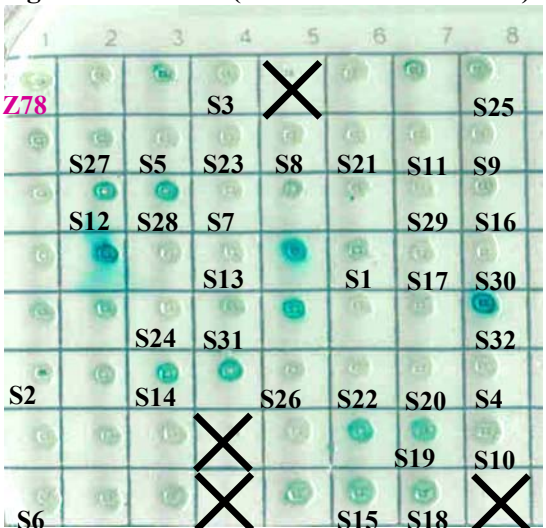
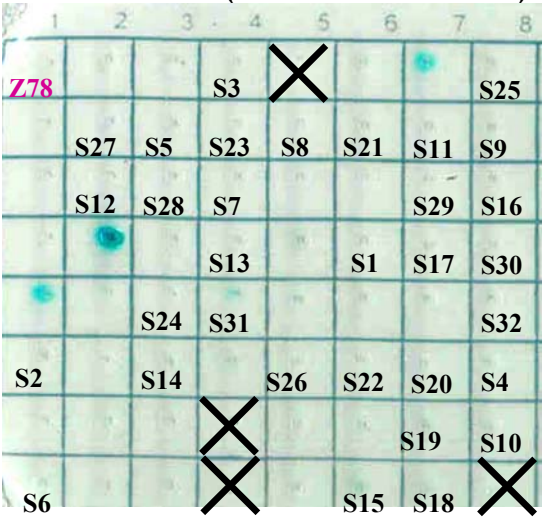
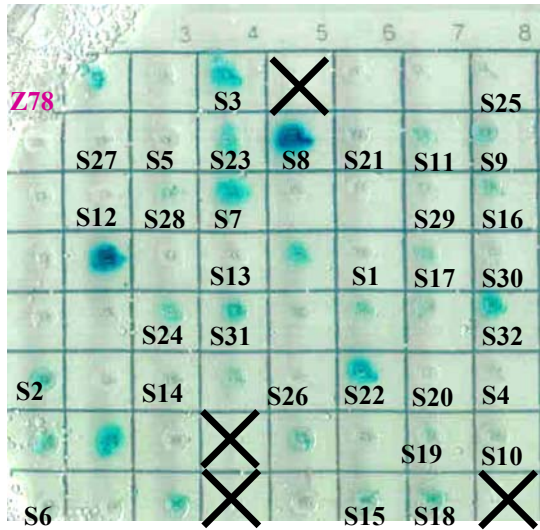
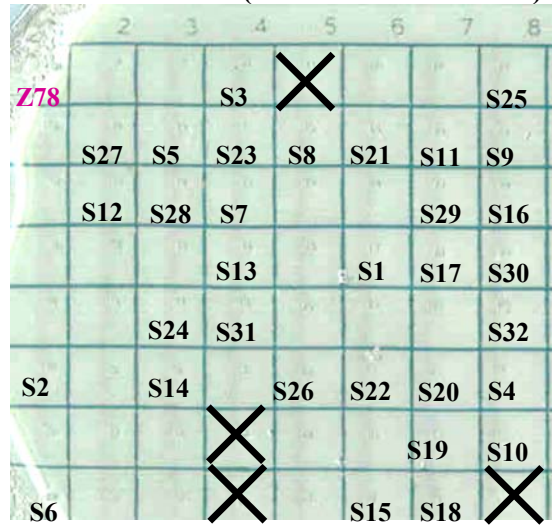
L- α -Alanina 10 mmol/L (meio sem ácido málico):

FIGURA 12 (CONTINUAÇÃO)

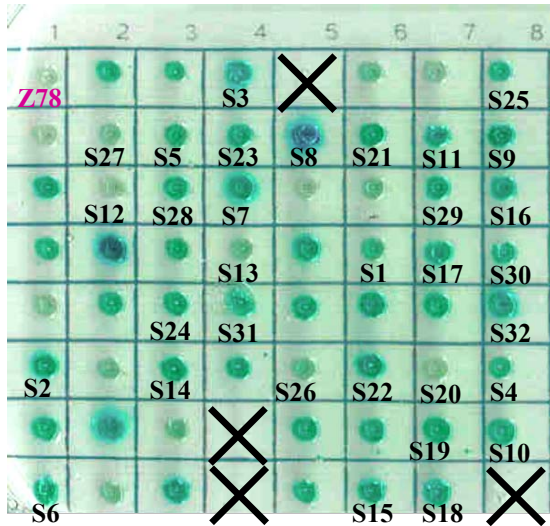
L-Leucina 10 mmol/L:



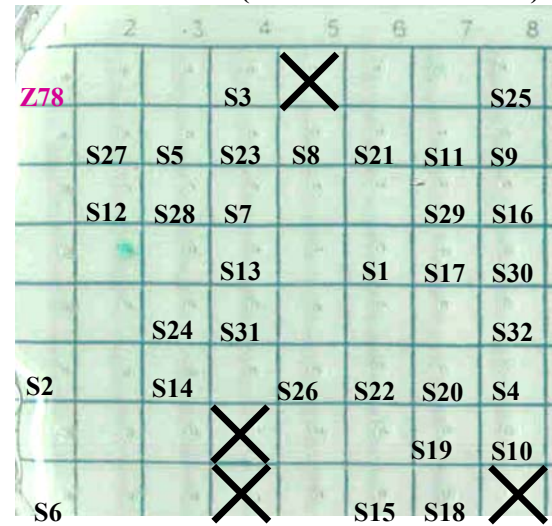
L-Leucina 10 mmol/L (meio sem ácido málico):



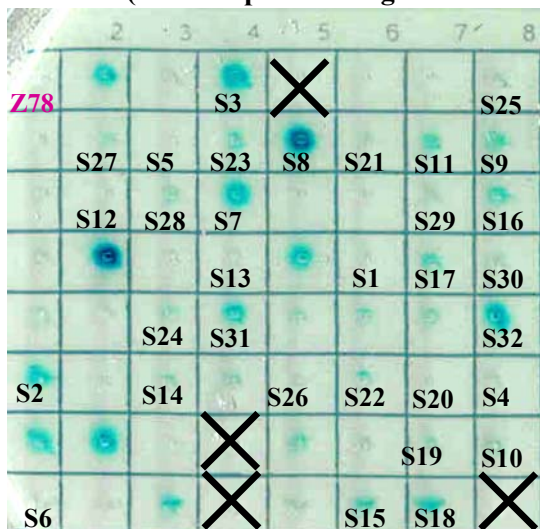
L-Serina 10 mmol/L:



L-Serina 10 mmol/L (meio sem ácido málico):



Controle (sem composto nitrogenado adicionado):



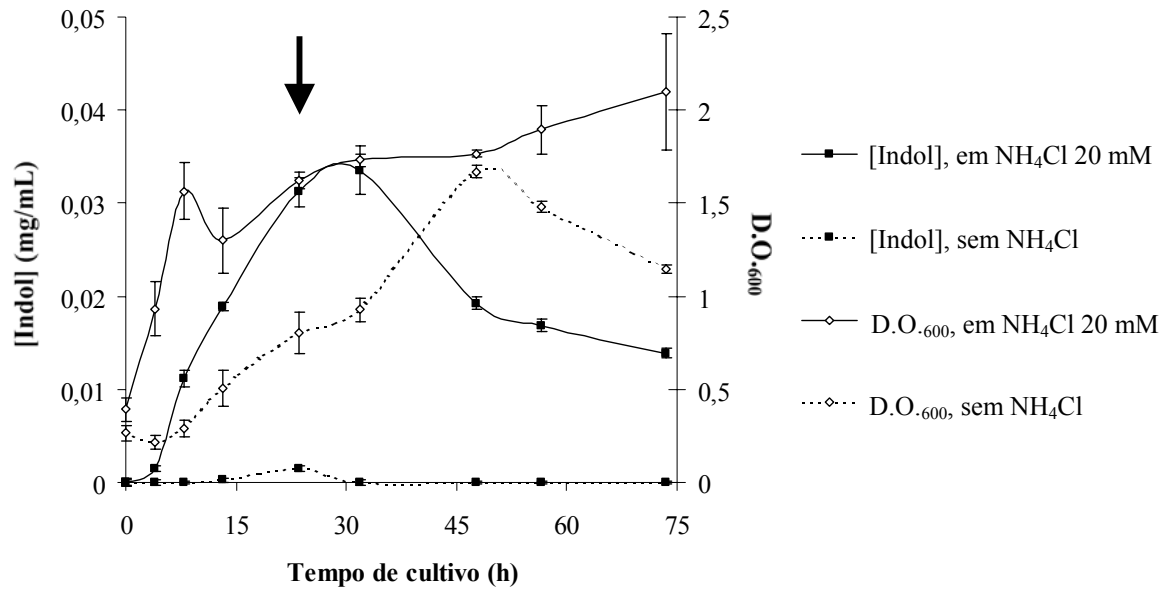
As 59 estirpes mutantes de *H. seropedicae* cujos genes alvos de inserção são regulados por amônio foram inoculadas em meio sólido na presença do indicador de atividade de β-galactosidase X-GAL e, após 48–72 h de crescimento, as colônias foram analisadas qualitativamente quanto a seus tamanhos e quanto à variação aparente da expressão de *lacZ* (vide texto para maior explicação) na presença da fonte de nitrogênio especificada. Os nomes das estirpes selvagem (Z78) e mutantes (S1–S32) são mostrados. As posições em que não houve inoculação de qualquer estirpe estão marcadas com um X.

3.6 PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA NITRILA HIDRATASE NO METABOLISMO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO DE *Herbaspirillum seropedicae*

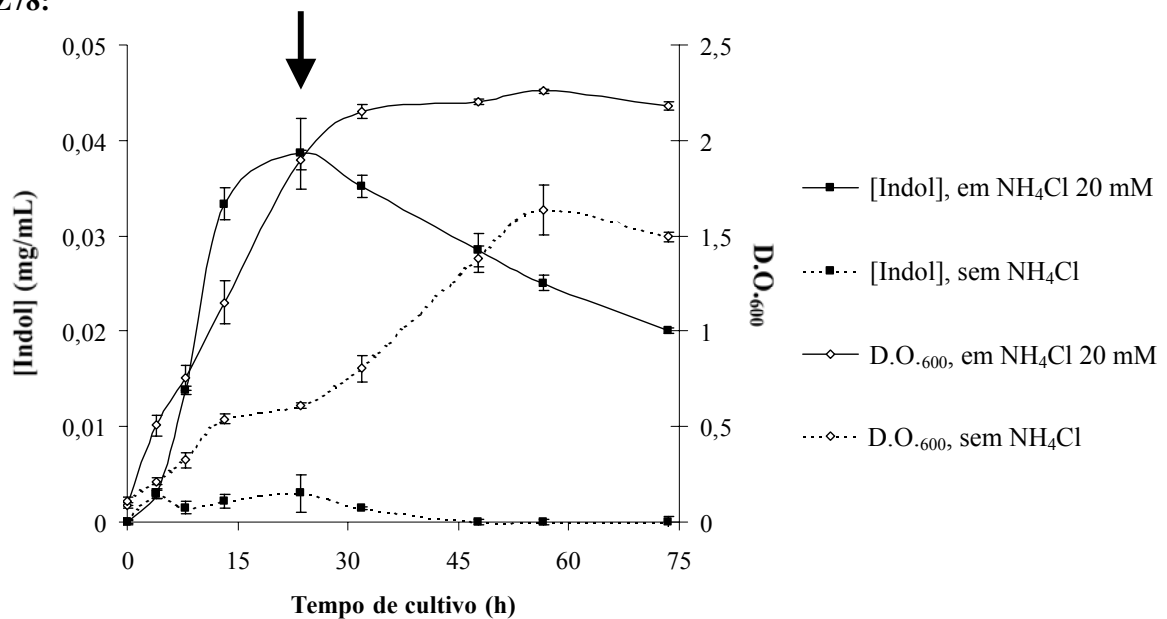
O gene que contém a inserção na estirpe S31 (Tabela 4, Fig. 10) codifica uma nitrila hidratase, enzima que catalisa a hidratação de uma nitrila gerando a amida correspondente. Em *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, a enzima está envolvida no metabolismo da auxina ácido indol-3-acético (AIA) (KOBAYASHI *et al.*, 1995; VEGA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2002). De modo a investigar se o produto do gene com a inserção na estirpe S31 está envolvido no metabolismo daquele fito-hormônio em *H. seropedicae*, o perfil de excreção/utilização de compostos de indol da estirpe mutante nitrila hidratase (estirpe S31, Tabela 4 e Fig. 10) foi comparado com o da estirpe selvagem (Z78) em diferentes tempos de crescimento, em condições de alta e baixa concentrações de nitrogênio (Fig. 13). Isto também permitiu investigar se a biossíntese desse fito-hormônio é aumentada em condições de limitação de nitrogênio, conforme indicado pelo aumento da expressão do gene que codifica a enzima nitrila hidratase (Tabela 3 e Fig. 9). Pela Fig. 13, verifica-se que não existe uma diferença significativa no conteúdo de compostos de indol no sobrenadante das culturas entre as estirpes de *H. seropedicae*, indicando que a enzima nitrila hidratase não tem um papel importante no metabolismo de AIA nesse microorganismo. Além disso, e contrariando a hipótese inicial, ambas as estirpes excretaram derivados de indol de forma significativa exclusivamente em condições de alta concentração de nitrogênio. Um ensaio de cromatografia em gel de sílica envolvendo as amostras coletadas em 24 h de cultivo em comparação com padrões de AIA e triptofano confirmou que os compostos de indol detectados nos diferentes tempos de cultivo eram predominantemente AIA (Fig. 14). Desta forma, 1) *H. seropedicae* provavelmente utiliza outra(s) via(s) que não a que envolve a enzima nitrila hidratase para a biossíntese de AIA, em condições de excesso de nitrogênio; e 2) o papel provável da enzima nitrila hidratase de *H. seropedicae* é o de restabelecer os níveis de amônio em condições de limitação deste composto coordenadamente com uma ou mais amidases, conforme discutido no próximo item.

FIGURA 13 – COMPARAÇÃO ENTRE AS ESTIRPES MUTANTE NITRILA HIDRATASE (S31) E SELVAGEM (Z78) DE *Herbaspirillum seropedicae* QUANTO AO PERFIL DE EXCREÇÃO DE COMPOSTOS DE INDOL

S31:

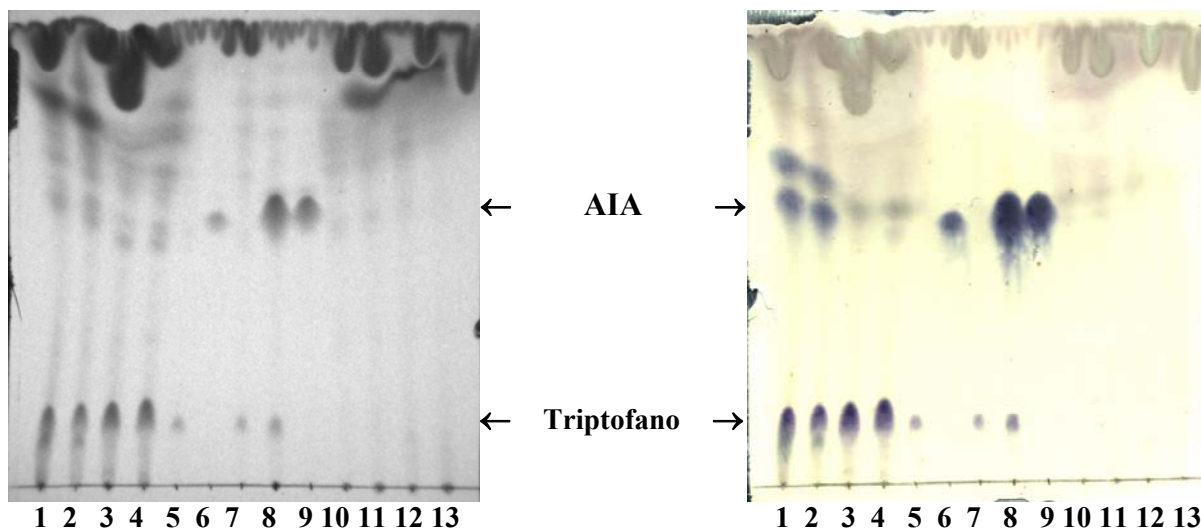


Z78:



Os resultados mostram a média e desvio padrão de pelo menos quatro experimentos independentes para culturas de S31 (em cima) e Z78 (em baixo). Os meios de cultura foram supridos inicialmente com triptofano 1 mmol/L. As setas indicam o tempo no qual amostras foram coletadas para o ensaio de cromatografia em camada delgada (Fig. 14).

FIGURA 14 – COMPARAÇÃO ENTRE AS ESTIRPES MUTANTE NITRILA HIDRATASE (S31) E SELVAGEM (Z78) DE *Herbaspirillum seropedicae* QUANTO AO PERFIL DE EXCREÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA)



À esquerda, a placa revelada sob luz UV (254 nm), e à direita a placa revelada com o reagente van Urk-Salkowski. As amostras 1–4 referem-se ao sobrenadante de culturas inicialmente adicionadas de triptofano 1 mmol/L, enquanto as culturas relativas às amostras 10–13 não continham triptofano. 1 = Z78 em NH_4Cl 20 mmol/L, triptofano 1 mmol/L; 2 = S31 em NH_4Cl 20 mmol/L, triptofano 1 mmol/L; 3 = Z78 em triptofano 1 mmol/L (sem NH_4Cl); 4 = S31 em triptofano 1 mmol/L (sem NH_4Cl); 5 = solução padrão de triptofano 1 mmol/L; 6 = solução padrão de AIA 0,1 mmol/L; 7 = meio de cultura adicionado de triptofano 1 mmol/L; 8 = meio de cultura adicionado de triptofano 1 mmol/L e AIA 1 mmol/L; 9 = meio de cultura adicionado de AIA 1 mmol/L; 10 = Z78 em NH_4Cl 20 mmol/L; 11 = S31 em NH_4Cl 20 mmol/L; 12 = Z78 em NH_4Cl 2 mmol/L; 13 = S31 em NH_4Cl 2 mmol/L.

3.7 IDENTIFICAÇÃO DE PROVÁVEIS ELEMENTOS DE REGULAÇÃO NAS SEQUÊNCIAS A MONTANTE DOS GENES ALVOS DE INSERÇÃO REGULADOS POR AMÔNIO

Para identificar prováveis reguladores envolvidos no controle da expressão dos genes que contêm as inserções, uma busca foi feita por sítios de ligação característicos e por sequências promotoras dos tipos dependentes de σ^{70} e σ^{54} , nas regiões a montante dos sítios de inserção nos 26 genes distintos de *H. seropedicae* identificados regulados por amônio. Sítios de ligação dos reguladores globais CRP, FNR, IHF, ArcA, NarL, Lrp (BROWNING e BUSBY, 2004), NtrC, ArgR, FhlA, PspF

(REITZER e SCHNEIDER, 2001), NifA, FixJ, FixK e RegR (DIXON e KAHN, 2004) foram pesquisados com base nas respectivas seqüências consenso em *E. coli* (http://regulondb.ccg.unam.mx/html/matrix_Alignment.jsp) e em algumas espécies de diazotrofos (BUCK *et al.*, 1986; FERRIERES e KAHN, 2002; DURMOWICZ e MAIER, 1998; MAO *et al.*, 2005). A maior parte dos sítios encontrados nas regiões a montante das inserções apresentaram baixa similaridade para com a respectiva seqüência consenso ou, em alguns casos, foram encontrados com um posicionamento muito incomum. Estes, portanto, foram desconsiderados por apresentarem baixa probabilidade de serem efetivamente funcionais. Contudo, em sete regiões promotoras distintas, foi possível identificar pelo menos uma provável seqüência de regulação (Fig. 15). Dentre as regiões promotoras com prováveis seqüências regulatórias identificadas estão: 1) a região a montante do gene *nifH* (estirpes S23 e S24, Fig. 15), onde foram encontrados um sítio de ligação de IHF, dois sítios de ligação de NifA e uma seqüência homóloga a um promotor dependente de σ^{54} -RNAP; e 2) a região a montante do operon *orf1glnKamtB*, contendo prováveis promotor tipicamente dependente de σ^{54} -RNAP e um sítio de ligação de NtrC (estirpes S9, S10 e S11, Fig. 15). Estas seqüências regulatórias já tinham sido previamente identificadas (MACHADO *et al.*, 1996; NOINDORF *et al.*, 2006), o que indica que o procedimento utilizado para a identificação das mesmas neste trabalho foi eficiente. Outros sítios de ligação de NifA e IHF, e um promotor dependente de σ^{54} -RNAP, também foram encontrados a montante dos genes *nifSU*, envolvidos com a fixação de N₂ (estirpes S21 e S22, Fig. 15).

Nas regiões a montante de *guaB* e de *guaA* de *H. seropedicae* (estirpe S1, Fig. 10), foi feita uma busca por seqüências similares às seqüências consenso para discriminador do operon *gua*, elemento UP, e ligação das proteínas DnaA, PurR e CRP, elementos estes que são encontrados a montante do operon *guaBA* de *E. coli* (MENG *et al.*, 1990; TESFA-SELASE e DRABBLE, 1992, 1996; HUTCHINGS e DRABBLE, 2000), além de outras seqüências regulatórias já citadas. A Fig. 15 (estirpe S1) mostra prováveis sítios de ligação para os reguladores DnaA e PurR em sobreposição a um promotor dependente de σ^{70} -RNAP a montante do gene *guaB* de *H.*

seropedicae. Nenhum provável sítio de ligação de Crp ou outro regulador, nem discriminador, elemento UP ou promotor dependente de σ^{54} -RNAP foi encontrado na região de *guaBA*.

Em três regiões distintas a montante das inserções com transposon, prováveis promotores dependentes de σ^{54} -RNAP foram encontrados (estirpes S14/S15/S16/S17, S18 e S25/S26/S27/S28, Fig. 15), sendo que, na estirpe S18, uma seqüência com cerca de 93% de identidade com a seqüência consenso para promotor dependente de σ^{70} -RNAP também foi encontrada. Os genes alvos de inserção em S14, S15, S16 e S17 estão agrupados e codificam sistema(s) de transporte do tipo ABC; o gene alvo de inserção na estirpe S18 faz parte de um grupamento gênico que codifica um outro sistema de transporte do tipo ABC; e os genes alvos nas estirpes S25, S26, S27 e S28 compreendem um mesmo grupo que codifica uma provável quinase de serina e três proteínas conservadas não caracterizadas (Fig. 10). Nenhuma seqüência significativamente similar às seqüências consenso de ligação dos reguladores NtrC, ArgR, FhlA, PspF, RtcR, NifA, FixJ e RegR (ativadores de transcrição tipicamente dependentes de σ^{54} -RNAP – REITZER e SCHNEIDER, 2001) foi encontrada nas regiões a montante das inserções naquelas estirpes.

FIGURA 15 – SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DAS REGIÕES A MONTANTE DOS GENES ALVOS DE INSERÇÃO REGULADOS POR AMÔNIO CONTENDO PROVÁVEIS ELEMENTOS REGULATÓRIOS

S1 (N2.13.H08):

GGGCTTGTGCGGATTTCAATCCATCCAGCGTTTTTGGCCACGCCTGGATGGATAAACGCAA
CCCGAACAGCGCTAAAGTTAGGTAGGTGCGAAAAACGGTGC GGACCTACCTATTTGCGTT

	Sítio para PurR Sítio para DnaA	Shine-Dalgarno
	ACGCAAACGTTTTGCGTTCTCTATAA	AGGAGG
	GCAGGGCA AAGACG CAAGTTCAAGTTTTCTG TATAAT TCGCTTTTGC GCCTATAGGAAATA	
	CGTCCCGTTCTGCGTTCAAGTTCAAAGACATATTAAGCGAAAACGCGGATATCCTTTAT	
Região -35	Região -10	

M R L L Q K A L T F D D V L L V P A F
CTATGCGTCTTCTCCAAAAGCACTCACGTTTCGATGATGTGCTGCTCGTTCCGGCCTTCT
GATACGCAGAAGAGGTTTTTTCGTGAGTGCAAGCTACTACACGACGAGCAAGCCGGAAGA
guaB→

S9 (N3.05.G02), S10 (N3.16.G03) e S11 (N2.09.B01):

NtrC UAS
TGCACYNNNNNTGTGCA
TTAACAAAAACAAGCAATATCGCACCAATCACGTGCATTTTCCCTTGGTCTGCACTATTT
AATTGTTTTTTGTTTCGTTATAGCGTGGTTAGTGCACGTAAAAGGGAACCAGACGTGATAAA

TGAACTGAAGTTAGAAAAAACGTGACCAATCTCCGGTTTCACCTAAAAACACAAGCCT
ACTTGACTTCAATCTTTTTTTTGCCTGGTTAGAGGCCAAAGTGGATTTTTGTGTTTCGGA

Promotor dependente de σ^{54} -RNAP
YTGGCACGNNNNNTGCGW
GCCTTGCCGAAAGAACATGGCACGGCTCCTGCTACAGGGTTTTGAGCAAACAAAAACG
CGGAACGGCTTCTTGTACCGTGCCGAGGACGATGTCCCAAACCTCGTTTGTGTTTTTGC

Shine-Dalgarno
AGGAGG M K K L I L A T
ACTTTTATTGTTCAAACACAAACCAGAGGGAAAGTCATGAAGAACTGATTCTTGCAACA
TGAAAATAACAAGTTTTGTGTTGGTCTCCCTTTCAGTACTTCTTTGACTAAGAACGTTGT
orf1 →

Continua...

FIGURA 15 (CONTINUAÇÃO)

S14 (N2.20.D01), S15 (N2.15.B01), S16 (N3.05.D03) e S17 (N3.18.F02):

TGCCTGCAATGCTGCGACCCACCAGCCCACCCTGCGCACTCACGCCACGGAACAACACGG
ACGGACGTTACGACGCTGGGTGGTGGGTGGGACGCGTGAGTGCGGTGCCTTGTTGTGCC

Promotor dependente de σ^{54} -RNAP

YTGGCACGNNNNTTGCW

ACAAAACCTTTTATTTCGCCAGGATGGCATTGGCACGATATCTGCTAAACATGCTGCCTGA
TGTTTTGGAAAATAAGCGGTCCTACCGTAACCGTGCTATAGACGATTTGTACGACGGACT

ATTCGCATGGCCAGCGGCACGGGAGAGCAGCAACACCGCCAGCCATGCGAAACATGGTGA
TAAGCGTACCGGTCGCCGTGCCCTCTCGTCGTTGTGGCGGTCGGTACGCTTTGTACCACT

Shine-Dalgarno

AGGAGG M K K T

ACCGCCGGGCAGTCCGCCCGGCGCCCATTTTTCTCAACAGGGGAGCGTAATGAAGAAAAC
TGGCGGCCCGTCAGGCGGGCCGCGGGTAAAAAGAGTTGTCCCCTCGCATTACTTCTTTTG

orf para porina →

Continua...

FIGURA 15 (CONTINUAÇÃO)

S18 (N3.07.G11):

TCTGCACCAAAAGGCCACAGGCAGCGCCCCAGCCCAGGGGCCACCCGCCGTTTGCAGCGC
AGACGTGGTTTTCCGGTGTCCGTTCGCGGGGTCGGGCCCCGGTGGGCGGGCAAACGTTCGCG

TTGACANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTATAAT
CGCATGCGAGCTCCGCCTGGCCCGCGCAAGCCT**TTGCCAGACA**AGGCCTGGGCCGCC**AATAAT**
GCGTACGCTCGAGGCGGACCGGGCGCGTTCGGAACGGTCTGTTCCGGACCCGGCGGTTATTA

Região -35

Região -10

Promotor dependente de σ^{54} -RNAP

YTGGCACGNNNNNTTGCW
CGTTGCCAGATGTTGTATGCCAATCTTGTATATCAGCGTGGCACACAACCTGCTGATG
GCAACGGTCTACAACATACGGTTAGAACATATAGTCGCACCGTGTGTTGAACGACTAC

AGAGGCCATGAGCACC AATCCTTCCCTCAAGTCGTTCGTCAGATCGCCGTGCGCATCAC
TCTCCGGTACTCGTGGTTAGGAAGGGAGTTCAGCAGCAGCGTCTAGCGGCACGCGTAGTG

CGAGGCCATCCTCGCCAAGCAATTGGCGCCGGGAACCCGCCCTGGGCGAGCAGCAGCTGGC
GCTCCGGTAGGAGCGGTTTCGTTAACCGCGGCCCTTGGGCGGACCCGCTCGTTCGTCGACCG

M A R
CGATCTCTTCAAGGTTTTCGCGCACCCAGGTGCGCGAAGCCCTGACGCACCTGATGGCGCG
GCTAGAGAAGTTCCAAAGCGCGTGGGTCCACGCGCTTCGGGACTGCGTGGACTACCGCGC

**orf para regulador de
transcrição do tipo
GntR →**

Continua...

FIGURA 15 (CONTINUAÇÃO)**S23 (N2.01.H02), S24 (N2.20.G01):****NifA UAS**

TGTNNNNNNNNNNNACA

TGGGTACACGGTTGTGTCGGGGATGCGGGCTTGTATCGTTCCCTACAGACCAGGTGCCGT
ACCCATGTGCCAACACAGCCCCTACGCCCGAACATAGCAAGGGATGTCTGGTCCACGGCA**NifA UAS**

TGTNNNNNNNNNNNACA

TTGTGCGGTTTGTAAACACCAGAAAGAAGTGGGTGCGAGGGCTGCGCGAAATGCTG
AACACGCCAAACATTGTGGTCTTTCTTCACCCAGCTCTCCGACGCGCTTTACGAC**IHF**

WATCAANNNTTR

TTTTACCAATTAATCAATGGCTTGGAATCGTTTTTTGATGGTGGCACGGCATTGCAAAGAGA
AAAAGTGGTTAATTTAGTTACCGAACCTTAGCAAAAACTACCACCGTGCCGTAAACGTTTCTCT**Promotor dependente de σ^{54} -RNAP**

YTGGCACGNNNNTTGCW

GGTGTGCACCGACGATGACTTGCCGAATGCGTGACTTGAGACGAAGACCAATAAAAGTTT
CCACACGTGGCTGCTACTGAACGGCTTACGCACTGAACTCTGCTTCTGGTTATTTTCAACGAAGCGGCGCCCCAACGGCTGCAAGTGTGATGACAAAACGCTTTGAACGAAACCTTAA
GCTTCGCCGCGGGTTGCCGACGTTACACTACTGTTTTGACGAAACTTGCTTTGGAATT**Shine-Dalgarno**

AGGAGG M A S L R Q

TTTCTTACACCAGAGCTACACCGCTTATTTCTAGGAGAATCAAATGGCCTCACTCAGACA
AAAGAATGTGGTCTCGATGTGGCGAATAAAGATCCTCTTAGTTTACCGGAGTGAGTCTGT*nifH* →**Continua...**

FIGURA 15 (CONTINUAÇÃO)

S25 (N3.05.E01), S26 (N2.04.G06), S27 (N2.16.G01) e S28 (n2.10.E09):

Promotor dependente de σ^{54} -RNAP

YTGGCACGNNNNNTTGCW

AGCAAAGAAGTCATACCGGCCTGGCACGATTCCAGCTATAAGGACATCAGGGCTTGTCTT
TCGTTTCTTCAGTATGGCCGGACCGTGCTAAGGTCGATATTCCTGTAGTCCCGAACAGGA

GCAAGGACGCCGTGCACTGCGCAAGGGACGCCGGGTGCACAGGCCGCAGGACCGGCAGAG
CGTTCCTGCGGCACGTGACGCGTTCCCTGCGGCCACGTGTCCGGCGTCTGGCCGTCTC

AATGGGGGCGCACAGTGTCTGCGGGTTTCAGGGCGGTGTGCATCAGGTTTTTCATGATAG
TTACCCCGCGTGTACAGACGCCCAAAGTCCCGCCACACGTAGTCCAAAAGTACTATC

CGCTCTGCGCGAAAATGGCGCACCGTGACGTCAACCGCAACCAGCACCTGCACATTGAAC
GCGAGACGCGCTTTTACCGCGTGGCACTGCAGTTGGCGTTGGTCTGGACGTGTAACCTG

GATCAGGAGGAGGATCAGCTTGTCCCGCTGCGCTGTCTCGAAATGCAGGGTCGGAATGAA
CTAGTCTCTCCTAGTTCGAACAGGGCGACGCGACAGAGCTTTACGTCCAGCCTTACTT

CCATACTGCAGTTAGGGGCTCACTAAGGTGAAGCAAAGCGGAAGAGAAAAAAGGAATAGA
GGTATGACGTCAATCCCCGAGTGATTCCACTTCGTTTCGCCTTCTCTTTTTTCTTATCT

ATAAAAACACGATCTGCAAAGATCTCTGCATCGCGCTGTTGATGCTACGGCTTTCAAAGA
TATTTTTGTGCTAGACGTTTCTAGAGACGTAGCGGACAACACTACGATGCCGAAAGTTTCT

ACACACCGGCAATGACGCAACCCAGAGTCACCGACGCGTTCTTTGATAACCGCAGATGGC
TGTGTGGCCGTTACTGCGTTGGGTCTCAGTGGCTGCGCAAGAACTATTGGCGTCTACCG

M D I
AAGTCCAGACATATGAATCTGTTTCGTACTTTTTTGGAGAGCGACGGAGGTGGTATGGATA
TTCAGGTCTGTATACTTAGACAAAGCATGAAAAACTCTCGCTGCCTCCACCATACTAT

orf para quinase de
serina →

Cada seqüência mostrada corresponde à provável região promotora a montante da inserção com transposon na estirpe descrita (seqüências de DNA gentilmente cedidas pelo programa Genopar – www.genopar.org); o terminal 5' do gene proximal é indicado com a seqüência do respectivo produto de tradução acima da seqüência de nucleotídeos principal; a presença de uma determinada seqüência regulatória provável é indicada pela respectiva seqüência consenso acima da seqüência principal (no caso da seqüência consenso para promotor dependente de σ^{54} -RNAP, os nucleotídeos 100% conservados encontram-se sublinhados); as seqüências de prováveis promotores dependentes de σ^{70} -RNAP são indicadas em itálico para ambas as regiões –35 e –10.

4 DISCUSSÃO

O procedimento desenvolvido envolvendo o plasmídeo construído pTnMod-OGmKmlacZ mostrou ser útil para o estudo do metabolismo de nitrogênio de *H. seropedicae*, permitindo acompanhar os níveis de expressão do gene mutagenizado pela atividade de β -galactosidase (LacZ). A presença de um gene extra de resistência a antibiótico (além do gene para gentamicina) no transposon do plasmídeo, o da canamicina, reduziu a obtenção de mutantes espontâneos de resistência. O procedimento com o plasmídeo apresenta ainda potencial para a identificação e caracterização de genes de bactérias Gram-negativas envolvidos com qualquer tipo de variável ambiental (*e.g.*, utilização de diversas fontes de carbono; defesa contra estresses como pH, temperatura, salinidade, etc.; transporte de nutrientes; ...).

A grande vantagem do procedimento foi que, além de revelar o perfil de expressão do gene alvo de inserção conforme a concentração de amônio ou conforme a fonte de nitrogênio, permitiu a realização subsequente de análises fisiológicas do gene através de ensaios que envolveram as estirpes mutantes, nomeadamente a utilização de fontes alternativas de nitrogênio pelas estirpes, e o envolvimento do gene que codifica uma provável nitrila hidratase de *H. seropedicae* no metabolismo de AIA (experimentos com a estirpe S31).

É de se realçar que, provavelmente, nem todas as inserções eliminaram a função de um gene, como é o caso das inserções que ocorreram próximas ao terminal 3' do transcrito produzido pelo gene alvo de inserção (*e.g.*, inserção da estirpe S1, Fig. 10). Se a inserção ocorreu a jusante do códon de parada, mas dentro ainda da seqüência do transcrito do gene alvo, foi possível a formação de um transcrito policistrônico codificando a proteína do gene alvo e LacZ (β -galactosidase) – este pode ter sido o caso da inserção na estirpe S1 (Fig. 10). Em outros casos, a inserção pode ter ocorrido a montante do códon de parada, próxima ao terminal 3', de um modo que não tenha afetado significativamente a estrutura (e, por conseqüência, a função) da proteína codificada pelo gene alvo de inserção; o resultado, neste caso, seria uma quimera entre essa proteína (funcional) e a proteína codificada pela seqüência do transposon (β -galactosidase, se a seqüência de *lacZ* estiver na mesma fase que a seqüência do gene

alvo de inserção). Portanto, os resultados das análises fisiológicas envolvendo genes alvos como o da estirpe S1 (que mostrou capacidade normal de utilização dos compostos nitrogenados alternativos – Tabela 6) eram de se esperar, já que, nestes casos, a função do gene alvo foi preservada. A eliminação da função dos genes a jusante da inserção também tem que ser considerada, devido ao já conhecido “efeito polar”: o transposon OGmKmlacZ contém um terminador de transcrição forte a jusante de *lacZ* (Fig. 6) e, portanto, os genes a jusante não são transcritos se não tiverem seu próprio promotor.

A biblioteca de mutantes aleatórios construída neste trabalho cobriu aproximadamente 2000 ORFs distintas de *H. seropedicae* (40% do total de ORFs), conforme indicado pelas análises estatísticas (2.11). Estas ORFs foram representadas por cerca de 2700 inserções aleatórias no genoma de *H. seropedicae* com a inserção *lacZ* na mesma orientação que o gene alvo. Estas inserções foram analisadas para expressão diferencial, e 59 mostraram ser reguladas conforme a concentração de amônio no meio (Fig. 9). Como 2000 genes é uma amostragem representativa da população de genes de *H. seropedicae*, uma extrapolação para todo o genoma pôde ser feita, o que permitiu estimar que aproximadamente 2,2% (como indicado pelas 59 das 2700 inserções) do total de ORFs é diferencialmente afetado por amônio, o que representa cerca de 110 genes. Uma porcentagem semelhante foi obtida em uma busca por genes de *E. coli* envolvidos no metabolismo de nitrogênio sob o controle do ativador de transcrição NtrC, utilizando microarranjo de DNA (ZIMMER *et al.*, 2000).

Dentre as classes de genes de *E. coli* regulados por NtrC, a maior compreende sistemas de transporte de fontes alternativas de nitrogênio, nomeadamente aminoácidos ou pequenas moléculas peptídicas (ZIMMER *et al.*, 2000). No presente trabalho, um resultado semelhante foi obtido com *H. seropedicae*, pois a maior classe de genes regulados conforme a concentração de amônio também compreende sistemas de transporte de compostos nitrogenados (Fig. 11). Apesar dessa analogia, conjuntos diferentes de genes regulados por amônio foram encontrados em ambas as espécies de bactéria, com exceção de AmtB, refletindo, possivelmente, respostas metabólicas à limitação de amônio adaptadas a seus diferentes estilos de vida e habitats. Dentre os

grupamentos gênicos que codificam sistemas de transporte regulados por amônio em *H. seropedicae*, verificou-se que dois podem ser transcritos a partir de promotores do tipo dependente de σ^{54} (codificados pelos genes alvos de inserção nas estirpes S14/S15/S16/S17 e S18).

Provavelmente, reguladores de transcrição que controlam sua própria expressão tiveram menor probabilidade de serem “capturados” nesta busca por genes regulados por amônio. Um exemplo é o operon *glnAntrBC*: uma inserção em qualquer um de seus genes elimina a expressão de *ntrC* (cujo produto ativa o promotor a montante de *glnA* em condições de limitação de nitrogênio), eliminando a ativação do promotor dependente de σ^{54} (PERSUHN *et al.* 2000; SCHWAB *et al.*, aceito para publicação). A ausência de NtrC deixa o promotor do tipo dependente de σ^{70} com expressão constante independentemente da concentração de amônio no meio. Outros genes cujos produtos regulam sua própria expressão teriam menor probabilidade de serem assim “capturados”. As exceções seriam as inserções ocorridas próximas ao terminal 3’ do transcrito produzido pelo gene alvo de inserção, conforme já discutido.

Em *Pseudomonas aeruginosa*, foi estimado que cerca de 377 genes do total de 5571 são essenciais nas condições de seleção das estirpes mutantes (JACOBS *et al.*, 2003), o que corresponde a quase 7% do genoma. Naquele estudo, os autores utilizaram um meio rico (LB) para a seleção das estirpes mutantes, condição esta que provavelmente requer um número relativamente pequeno de genes necessários à sobrevivência do microrganismo. Em contraste, neste estudo com *H. seropedicae*, um meio mínimo foi utilizado para a seleção das estirpes mutantes, de modo a controlar mais precisamente a fonte e concentração de nitrogênio (amônio) e outros compostos. Portanto, provavelmente uma fração maior de genes essenciais, incluindo alguns regulados por amônio (*e.g.*, envolvidos na biossíntese de nucleotídeos e aminoácidos), pode ter sido excluída durante a construção da biblioteca de mutantes. Mais uma vez, as exceções seriam as inserções que ocorreram próximas ao terminal 3’ do transcrito produzido pelo gene alvo de inserção, conforme já discutido – este pode ter sido o caso da inserção na estirpe S1 (Fig. 10), em que o gene alvo de inserção está provavelmente envolvido na biossíntese de nucleotídeos.

Esse problema da metodologia de mutagênese aleatória apresentar uma menor probabilidade para “capturar” genes essenciais e que se auto-regulam poderia ser contornado utilizando outras metodologias no estudo da resposta gênica global de *H. seropedicae* frente ao estresse por amônio. Um exemplo seria através de ensaios de hibridização de mRNA/cDNA em *chips* de microarranjo (“*microarray*”) de DNA. Recentemente esta metodologia foi aplicada em estudos de genoma funcional das bactérias fixadoras de nitrogênio *S. meliloti* e *Leptospirillum ferrooxidans* (RÜBERG *et al.*, 2003; PARRO e MORENO-PAZ, 2003; DAVALOS *et al.*, 2004), e pode ser assim utilizada em conjunto com a técnica de mutagênese aleatória para a identificação e análise dos genes de *H. seropedicae* regulados pela disponibilidade de nitrogênio no meio.

Dos genes regulados por amônio identificados neste trabalho, muitos codificam sistemas dependentes de ATP, incluindo genes da fixação de nitrogênio (*nif*) e aqueles envolvidos no transporte ativo de fontes alternativas de nitrogênio, todos estes ativados em condições de limitação de amônio (Tabela 4; Fig. 11). Outros que são diferencialmente expressos incluem amidases, proteases e enzimas envolvidas na degradação de aminoácidos, metabolismo de bases purínicas, interruptores metabólicos e quatro genes com papel desconhecido; todos, presumidamente, com a função de maximizar a disponibilidade de nitrogênio em condições de limitação de N para manter o equilíbrio de nitrogênio em *H. seropedicae*.

As análises qualitativas de variação da expressão dos genes alvos de inserção e de crescimento das respectivas estirpes em fontes diversas de nitrogênio forneceram dados importantes quanto ao metabolismo geral da estirpe Z78 de *H. seropedicae* utilizada: por exemplo, foi verificado que nenhuma estirpe (mutante ou selvagem Z78) cresceu significativamente em L-leucina, L-serina ou L- α -alanina como fonte única de carbono (meios sem ácido málico adicionado, Fig. 12). Nos casos de L-serina e L- α -alanina, quando se testou o crescimento das estirpes na presença de ácido málico, as estirpes foram capazes de crescer e apresentaram um aumento de expressão na maior parte dos genes regulados por amônio identificados (Tabela 6). Estes dados sugerem que L-serina e L- α -alanina não são utilizáveis como fonte de carbono pela estirpe Z78

de *H. seropedicae* utilizada neste trabalho, e são fontes de nitrogênio “pobres”, uma vez que a presença destes aminoácidos levou a uma superexpressão dos sistemas que maximizam a disponibilidade de nitrogênio. Quanto ao caso do aminoácido L-leucina, quando se testou o crescimento das estirpes na presença de ácido málico, as estirpes foram capazes de crescer e apresentaram um perfil de expressão bastante semelhante ao perfil da condição controle (condição esta em que nenhuma fonte de nitrogênio foi adicionada e que, portanto, se supõe que o crescimento foi suportado por N₂). Logo, provavelmente as estirpes utilizaram preferencialmente N₂ como fonte de nitrogênio na presença de L-leucina 10 mmol/L (meio com ácido málico). Seria importante verificar se L-leucina pode ser utilizada como fonte de nitrogênio na ausência de N₂. Em um estudo prévio envolvendo a caracterização do gênero *Herbaspirillum*, BALDANI e colegas (1996) verificaram que de sete estirpes de *H. seropedicae* testadas, todas metabolizaram L- α -alanina e de 11 a 89% destas sete estirpes metabolizaram L-serina como fontes únicas de carbono; além disso, de 37 estirpes do gênero *Herbaspirillum* testadas, todas (incluindo sete da espécie *H. seropedicae*) metabolizaram L-leucina. Deste modo, os resultados deste trabalho com L- α -alanina e L-leucina foram um tanto surpreendentes. Uma possibilidade para estas diferenças de resultados é a diversidade de características metabólicas entre as estirpes utilizadas em ambos os trabalhos.

Em termos específicos, as análises de expressão dos genes alvos de inserção e de utilização de fontes alternativas de nitrogênio pelas respectivas estirpes mutantes forneceram indícios sobre sua regulação gênica; porém, o significado fisiológico dessas variações de expressão deverá ser determinado com estudos complementares. Por exemplo, o aumento aparente da expressão do gene alvo na estirpe S3, que codifica uma proteína hipotética conservada, na presença exclusiva de NaNO₃, L-glutamato, L-aspartato, L- α -alanina ou L-serina (sempre na presença de ácido málico), e a não variação dos níveis de expressão em outras fontes de nitrogênio incluindo o próprio L-glutamato ou L-aspartato na ausência de outra fonte de carbono (meios sem ácido málico), deverá ser explicada com um maior conhecimento: 1) do metabolismo

geral de *H. seropedicae* e 2) da regulação específica dos genes identificados neste trabalho.

Das amidases que foram identificadas neste trabalho, o produto gênico da estirpe S7 mostra uma similaridade elevada com a amidase AmiE de *Helicobacter pylori* (69% de identidade). Esta enzima é específica para a hidrólise de amidas alifáticas, exceto formamida, liberando o ácido orgânico correspondente e amônio (SKOULOUBRIS *et al.*, 2001). Uma formamidase de *H. pylori*, AmiF, que produz amônio coordenadamente com AmiE, também foi caracterizada (SKOULOUBRIS *et al.*, 2001). Uma enzima similar em *H. seropedicae*, identificada por tentativa neste estudo como uma formamidase, foi altamente induzida sob limitação de amônio (estirpe S8, Tabela 4). Os genes que codificam ambas as prováveis amidases estão arranjados contiguamente no genoma de *H. seropedicae* (Fig. 10), o que indica que provavelmente pertencem ao mesmo operon. O gene a jusante, que codifica a provável formamidase AmiF, é mais induzido (2000 vezes; Tabelas 3 e 4) em condições de baixa concentração de amônio do que o gene a montante (32 vezes), que codifica a proteína do tipo AmiE. As proteínas AmiE e AmiF de *H. pylori* dependem da atividade de urease e arginase para converter certos compostos nitrogenados em amônio (SKOULOUBRIS *et al.*, 2001). De modo interessante, uma enzima arginase e talvez uma proteína acessória da urease são induzidas em *H. seropedicae* em condições de baixa concentração de amônio (estirpes S12 e S2, respectivamente), indicando que existe uma relação metabólica semelhante entre estas proteínas neste microrganismo.

Um papel semelhante pode ser atribuído a uma provável oxidase ligadora de cobre, mutagenizada na estirpe S32. De acordo com o banco de dados da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”, KEGG) (KANEHISA *et al.*, 2006), a única classe de oxidase ligadora de cobre é a das amina oxidases, que catalisam a oxidação de um composto com grupamento amina para formar o aldeído correspondente e amônio. Assim, o gene contendo a inserção provavelmente codifica uma amina oxidase de *H. seropedicae*.

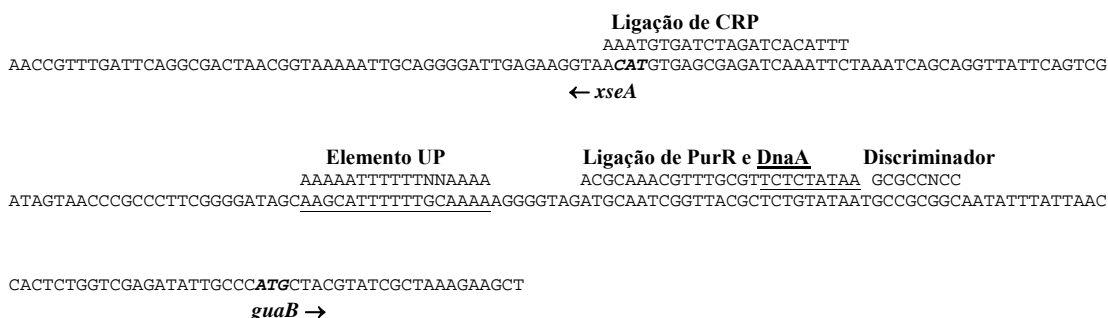
Quatro genes envolvidos na utilização de N₂ foram identificados como *hesB*, *fixB*, *nifH* e *orf1* (estirpes S21, S22, S23 e S24, respectivamente). O gene *nifH* codifica a proteína dinitrogenase redutase, enquanto os genes *fixB* e do tipo *hesB* estão envolvidos na fixação de N₂ em Rhizobiaceae (RUVKUN *et al.* 1982; PUHLER *et al.*, 1984; GUBLER e HENNECKE, 1986; KAMINSKI *et al.*, 1988; DOMBRECHT *et al.*, 2002). A deficiência de crescimento das respectivas estirpes mutantes utilizando N₂ como fonte única de nitrogênio era assim esperado. Quanto a *orf1*, que codifica uma proteína hipotética no grupamento dos genes estruturais para a nitrogenase em *H. seropedicae* (estirpe S24, Fig. 10), já tinha sido estudada em um trabalho prévio (KLASSEN *et al.*, 1999). Naquele trabalho, verificou-se que a inserção de um cassete em *orf1* não afeta a atividade de nitrogenase da respectiva estirpe. Portanto, o resultado deste trabalho, que mostrou capacidade de crescimento em N₂ como fonte única de nitrogênio pela estirpe S24, também era esperado.

Prováveis sítios de ligação de NifA e IHF e um promotor dependente de σ^{54} -RNAP foram encontrados a montante dos genes *nifSUhesB* (Fig. 15), o que corrobora a participação daquelas proteínas na ativação da transcrição dos genes *nif* em *H. seropedicae*, como ocorre com os genes *nifAB* e *nifHDKENXorf1orf2nifQ* (SOUZA *et al.*, 1991b; MACHADO *et al.*, 1996; WASSEM *et al.*, 2000).

O único gene reprimido em resposta à concentração de amônio identificado foi *guaA*, que codifica uma guanosina-mono-fosfato sintase (estirpe S1). Em *E. coli*, o operon *guaBA* é transcrito a partir do promotor *guaP*, que possui as seguintes características (Fig. 16): a seqüência do hexâmero -10 coincide com a seqüência consenso dos promotores dependentes de σ^{70} de *E. coli*; uma seqüência rica em bases G e C altamente conservada (o discriminador) está presente a jusante e adjacente ao hexâmero -10; e um elemento UP rico em bases A e T está localizado entre -41 e -57. A proteína Fis (“*factor for inversion stimulation*” ou “fator para estímulo da inversão”) foi primeiramente descrita pela sua atividade no estímulo das reações de inversão durante a recombinação de DNA em sítios específicos mediada por Hin (recombinase) e Gin (invertase), em *Salmonella* e no fago Mu, respectivamente (FINKEL e JOHNSON, 1992); posteriormente, foi verificado que Fis participa em diversos

processos biológicos, incluindo ativação e/ou repressão da transcrição, e replicação de DNA; em *E. coli*, Fis aumenta cerca de cinco vezes os níveis de expressão de promotores de rRNA por se ligar em sítios localizados entre -60 e -150; a montante do promotor *gua*, prováveis seqüências de ligação de Fis estão presentes em uma posição equivalente (HUTCHINGS e DRABBLE, 2000). O operon *gua* de *E. coli* também é regulado pela proteína de início de replicação de DNA DnaA (TESFA-SELASE e DRABBLE, 1992, 1996): a ligação de DnaA em seu sítio específico a montante de *guaBA* leva a uma redução dos níveis de expressão deste operon. A ligação da proteína repressora PurR de *E. coli* em seu sítio específico a montante dos genes *gua* leva a um decréscimo de cerca de três vezes nos níveis de expressão do operon (MENG *et al.*, 1990). A ligação da proteína receptora de AMP cíclico CRP de *E. coli* na posição centrada em -117,5 do sítio de início de transcrição de *guaBA* leva a um aumento de seus níveis de expressão. Em *H. seropedicae*, prováveis sítios de ligação para as proteínas DnaA e PurR foram encontrados a montante do gene *guaB*, que é contíguo a *guaA* (estirpe S1, Fig. 15), como ocorre em *E. coli* (Fig. 16). Os níveis de expressão do operon *gua* de *E. coli* são reduzidos em condições de alta concentração de DnaA (TESFA-SELASE e DRABBLE, 1992, 1996); portanto, a atividade de transcrição do operon está acoplada ao ciclo de replicação de DNA (KAGUNI, 1997). Por outro lado, também em *E. coli*, a coordenação global da expressão dos genes envolvidos na biossíntese de bases de purina e pirimidina, incluindo todos os genes envolvidos na biossíntese *de novo* de GMP, é mediada pela proteína repressora PurR (ZALKIN e NYGAARD, 1996; HE *et al.*, 1990; MENG *et al.*, 1990), e a produção de IMP desidrogenase e de GMP sintase (GuaB e GuaA, respectivamente) é coordenadamente reprimida por guanina no meio de cultura e induzida por adenina (MENG *et al.*, 1990). Em *H. seropedicae*, a expressão do operon *guaBA* mostrou ser induzida por NH_4^+ . Porém, o mecanismo de regulação pela concentração de amônio permaneceu desconhecido, requerendo estudos adicionais para o esclarecimento desta questão.

FIGURA 16 – REGIÃO PROMOTORA DO OPERON *guaBA* DE *Escherichia coli*



As seqüências terminais 5' dos genes *guaB* e *xseA* (a montante e divergente) são mostradas em itálico. Também indicadas estão as seqüências do elemento UP e do discriminador [envolvidas na regulação dependente da velocidade de crescimento e no controle estrito (“*stringent control*”), sítios identificados para a ligação de PurR e DnaA, e o provável sitio de CRP. Mostradas acima da seqüência principal estão as seqüências consenso para a ligação de CRP (BUSBY e KOLB, 1996), o elemento UP (ESTREM *et al.*, 1998), PurR (ZALKIN e NYGAARD, 1996), DnaA (SCHAEFER e MESSER, 1991) e o discriminador (KEENER e NOMURA, 1996). Figura adaptada de HUTCHINGS e DRABBLE (2000).

Prováveis promotores dependentes de σ^{54} -RNAP foram encontrados a montante de inserções referentes a três genes/grupos de genes distintos (estirpes S14/S15/S16/S17, S18 e S25/S26/S27/S28, Fig. 10) e, nas regiões próximas àqueles promotores, nenhuma seqüência similar às seqüências consenso para a ligação de ativadores de transcrição tipicamente dependentes de σ^{54} -RNAP foi encontrada. Isto pode sugerir a existência de um ou mais fator(es) de transcrição cuja(s) seqüência(s) típica(s) de ligação é(são) desconhecida(s) em *H. seropedicae* ou mesmo em outras espécies de bactérias, fator(es) esse(s) envolvido(s) na resposta ao estresse por amônio. De modo interessante, dois fatores de transcrição desconhecidos envolvidos na resposta ao estresse por amônio foram identificados neste trabalho (estirpes S6 e S20); estes fatores de transcrição podem estar envolvidos na regulação da expressão daqueles e/ou de outros genes identificados neste trabalho.

Estudos adicionais são necessários para determinar a funcionalidade dos prováveis elementos regulatórios encontrados, como por exemplo, ensaios de “*footprinting*” ou de retardamento em gel (GALAS e SCHMITZ, 1978; CAREY, 1988) envolvendo as regiões promotoras dos genes alvos de inserção e os prováveis reguladores de *H. seropedicae* cujos sítios de ligação foram identificados. Outros experimentos poderiam ser realizados no sentido de tentar identificar as proteínas que interagem com as seqüências a montante dos genes regulados por amônio, como por exemplo por espectrometria de massa MALDI-TOF (NORDHOFF *et al.*, 1999) envolvendo fragmentos que contêm as seqüências de DNA das regiões a montante das inserções e extratos celulares de *H. seropedicae* obtidos após cultivo em alta ou baixa concentração de amônio.

A produção de ácido indol-3-acético pelas bactérias endofíticas *Azospirillum* spp., *G. diazotrophicus* e *H. seropedicae* já tinha sido reportada (BASTIAN *et al.*, 1998; PEDRAZA *et al.*, 2004). Em *A. tumefaciens*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, uma nitrila hidratase está envolvida na biossíntese daquele importante fito-hormônio (KOBAYASHI *et al.*, 1995; VEGA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2002). Contudo, os resultados deste trabalho indicaram que a enzima nitrila hidratase de *H. seropedicae* identificada na estirpe S31 não tem um papel importante na formação de AIA. Em outras espécies de bactérias, vias alternativas para a produção de AIA a partir de triptofano estão descritas (KOGA *et al.*, 1991; OBERHÄNSLI *et al.*, 1991; COSTACURTA e VANDERLEYDEN, 1995; PATTEN e GLICK, 1996; VANDE BROEK *et al.*, 2000). Logo, *H. seropedicae* provavelmente utiliza outra(s) via(s) que não a que envolve a enzima nitrila hidratase para a biossíntese de AIA, em condições de excesso de nitrogênio. A enzima nitrila hidratase de *H. seropedicae*, ao ser superexpressa em condições de baixa concentração de amônio, provavelmente maximiza a produção deste composto coordenadamente com uma ou mais amidases (como as identificadas nas estirpes S7 e S8, ou mesmo a codificada pelo gene a montante do gene que contém a inserção na estirpe S31, Fig. 10) de modo a restabelecer o equilíbrio de nitrogênio: a enzima nitrila hidratase catalisa a hidratação de um composto com grupamento nitrila formando a amida correspondente, que por

sua vez é convertida no respectivo ácido carboxílico pela amidase, liberando amônia (ASANO *et al.*, 1980).

Vinte e seis genes distintos de *H. seropedicae* regulados por NH_4^+ foram identificados neste trabalho. De modo importante, três genes codificam proteínas conservadas não caracterizadas (estirpes S3, S26 e S32) e um outro codifica uma proteína sem homólogos conhecidos (estirpe S19). Estudos complementares poderiam ajudar a desvendar a função destas proteínas em *H. seropedicae* e talvez em outras bactérias. Por exemplo, outras fontes de nitrogênio poderiam ser testadas quanto à utilização pelas respectivas estirpes mutantes, de modo a tentar relacionar a função proteica do gene alvo de inserção com o metabolismo do composto nitrogenado. Estudos de interação com proteínas, DNA, outras biomoléculas e/ou metabólitos também poderiam ser importantes para investigar a função dessas proteínas não caracterizadas. A determinação estrutural dessas proteínas seria uma outra forma de obter indícios da função dessas proteínas.

Quatro genes identificados codificam quinases ou fatores de regulação da transcrição nunca descritos, cujo papel metabólico é totalmente desconhecido (estirpes S6, S20, S25 e S29). Uma análise de seqüenciamento do gene que contém a inserção na estirpe S30 revelou um fator de regulação da transcrição a jusante da provável quinase identificada em S29, indicando que ambas as proteínas constituem um sistema de dois componentes (Fig. 10). Além disso, uma análise através do programa BLASTn, utilizando o banco de dados do Projeto de Seqüenciamento do Genoma da Bactéria Fixadora de Nitrogênio *H. seropedicae* (www.genopar.org), revelou a presença de uma quinase a montante do gene que codifica o fator de regulação de transcrição identificado na estirpe S20, o que indica que ambas as proteínas também formam um sistema de dois componentes (Fig. 10). Este trabalho revelou, portanto, a presença de dois prováveis novos pares sensor/regulador de dois componentes cuja expressão é regulada por amônio. Como as respectivas estirpes mutantes dessas proteínas apresentaram crescimento normal em fontes de nitrogênio diversas, supõe-se que estas não tenham um papel central no metabolismo de nitrogênio de *H. seropedicae*, mas sim que estejam envolvidas na utilização de determinados

compostos nitrogenados, que não foram testados neste trabalho. Um aspecto importante deste estudo foi sugerir que essas proteínas novas ou conservadas estão provavelmente envolvidas na resposta ao estresse por amônio em *H. seropedicae* e talvez em outras espécies de bactérias.

5 CONCLUSÕES

- O plasmídeo pTnMod-OGmKmlacZ construído neste trabalho revelou-se como uma ferramenta útil para estudar o perfil de transcrição global e para a análise de genes de *H. seropedicae* envolvidos na resposta ao estresse por amônio;
- Cerca de 2,2% do total de ORFs de *H. seropedicae*, o que corresponde a aproximadamente 110 genes, é regulado de acordo com a disponibilidade de amônio no meio;
- Dentre os genes de *H. seropedicae* regulados por amônio, encontram-se oito envolvidos com o transporte de compostos nitrogenados, dez que são responsáveis pelo catabolismo de fontes alternativas de nitrogênio, e um terceiro grupo que compreende quatro genes que codificam interruptores metabólicos (quinases ou fatores de transcrição);
- Os genes *amiE* e *amiF* de *H. seropedicae* são superexpressos em condições de limitação de amônio e estão arranjados contiguamente no genoma;
- O gene *guaA* de *H. seropedicae*, que codifica uma guanosina-mono-fosfato sintase (enzima envolvida na biossíntese de bases purínicas em outras espécies de bactérias), tem seus níveis de transcrição reduzidos em condições limitantes de amônio;
- Os genes *fixB* e um do tipo *hesB* de *H. seropedicae* são ativados em baixa disponibilidade de amônio, e estão envolvidos na fixação de N₂;
- A proteína nitrila hidratase de *H. seropedicae* é superexpressa em baixos níveis de amônio, e não tem um papel importante na produção do fito-hormônio ácido indol-3-acético;
- O fito-hormônio ácido indol-3-acético apenas é produzido significativamente por *H. seropedicae* em condições de alta concentração de amônio;
- Dez proteínas, incluindo dois prováveis novos pares sensor/regulador de dois componentes, uma quinase, um fator de transcrição, uma proteína sem homólogos conhecidos e três proteínas conservadas não caracterizadas de *H. seropedicae* estão envolvidas na resposta à limitação de amônio.

ADENDO

TREINAMENTO EM TECNOLOGIA DE MICROARRANJO DE DNA

Trabalho do Estágio de Doutorando (“Sanduíche”), com Bolsa cedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Department of Plant Sciences, University of Arizona.

Orientador: Profa. Dra. Liu Un Rigo

Co-orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Orientador estrangeiro: Prof. Dr. David Galbraith

Tucson, E.U.A.

Maio 2005 – fevereiro 2006

A1 INTRODUÇÃO

A1.1 JUSTIFICATIVA

O uso de transposons tem sido uma ferramenta útil para o estudo da variação da expressão gênica conforme as condições ambientais a que a célula é sujeita. A mutagênese aleatória com transposons que carregam um gene repórter (*e.g.*, *lacZ*, *luxAB*, *gusA*) foi aplicada para a identificação de genes que respondem a estresse por metais pesados em *Pseudomonas fluorescens* (ROSSBACH *et al.*, 2000); e para identificar genes regulados pelo fator σ^S (RpoS) em *E. coli* e em *Salmonella enterica* serovar Tiphimurium (SCHELLHORN *et al.*, 1998; IBANEZ-RUIZ *et al.*, 2000). É possível que esses transposons possam ser utilizados para a procura de genes cuja expressão seja regulada por outros fatores ambientais, como é o caso da concentração de amônio no meio. Uma das formas clássicas de estudar a função de um determinado gene envolve sua mutação e a caracterização fisiológica da estirpe mutante. Assim, a metodologia de mutagênese aleatória, além de permitir a identificação do conjunto de genes envolvidos com um determinado tipo de metabolismo, também torna viável a caracterização fisiológica de cada gene desse conjunto.

No entanto, a metodologia de mutagênese aleatória não permite identificar genes que são essenciais para a sobrevivência do microrganismo nas condições de seleção – neste caso, os mutantes são inviáveis. Além disso, esse sistema não permite a “captura” de genes que codificam reguladores de transcrição que controlam sua própria expressão. Um exemplo é o operon *glnAntrBC*: mutações em qualquer destes genes impediria a expressão de *ntnC* (cujo produto gênico ativa o promotor a montante de *glnA* em condições de limitação de amônio), anulando a ativação pelo promotor dependente de σ^{54} (PERSUHN *et al.*, 2000; SCHWAB *et al.*, aceito para publicação). A ausência de NtrC leva à expressão não diferencial a partir do promotor dependente de σ^{70} , independentemente da concentração de amônio no meio. Logo, o conjunto de genes obtido por esta metodologia é incompleto e formado apenas por genes não essenciais e que não se auto-regulam.

Uma outra forma de acompanhar a resposta gênica global de um organismo em uma determinada condição ambiental é através de ensaios de hibridização de

mRNA/cDNA em *chips* de microarranjo (“*microarray*”) de DNA. Recentemente esta metodologia foi aplicada em estudos de genoma funcional das bactérias fixadoras de nitrogênio *S. meliloti* e *L. ferrooxidans* (RÜBERG *et al.*, 2003; PARRO e MORENO-PAZ, 2003; DAVALOS *et al.*, 2004). Mostra-se, assim, como uma ferramenta útil, que poderia ser utilizada em conjunto com a técnica de mutagênese aleatória para a identificação e análise dos genes de *H. seropedicae* regulados pela disponibilidade de nitrogênio no meio.

A equipe do Dr. David Galbraith, do Department of Plant Sciences, University of Arizona (E.U.A.), conta com uma excelente estrutura de laboratórios voltada para a pesquisa em instrumentação biológica, expressão gênica do desenvolvimento e tecido-específica em eucariotos, genômica funcional e proteômica, incluindo todo o equipamento utilizado em análises de varredura por microarranjo de DNA (<http://ag.arizona.edu/~dgalbrai/dginf.html>).

O plano do trabalho de estágio foi primeiro treinar a técnica de hibridização em microarranjo, através da participação em um projeto em andamento, intitulado “Mapeamento de *loci* de características quantitativas em arroz por tecnologia de microarranjo de DNA” (<http://cals.arizona.edu/research/RFG/>). Trabalhar com arroz (*O. sativa*) era do interesse do laboratório no Brasil, pois é uma das plantas hospedeiras de *H. seropedicae*; além disso, estudos de expressão gênica (por seqüenciamento de cDNA) de arroz inoculado ou não com *H. seropedicae* encontram-se em andamento nos laboratórios do Núcleo de Fixação de Nitrogênio. Portanto, a participação naquele projeto era de grande valia, pois traria contribuições aos projetos em andamento no Brasil. Depois, começar-se-ia com o projeto inicialmente proposto envolvendo a bactéria *H. seropedicae*. O projeto com arroz ainda se encontra em andamento (tem três anos de duração) e envolve sete co-autores (<http://cals.arizona.edu/research/RFG/>). Por envolver tantos pesquisadores, cada um teve/tem seu papel, sendo que a ênfase deste trabalho foi procurar métodos simples e econômicos de marcação de RNA de arroz. O método ULS™, envolvendo um fluoróforo dos *kits* ULYSIS® (Invitrogen), mostrou potencial para ser utilizado no projeto que envolve arroz e/ou no que envolve *H. seropedicae*. Além disso, mostrou

ser uma forma simples e econômica de estudar transcrição *sense* e *antisense* em plantas por ensaios de hibridização em microarranjo de DNA, apresentando, também, potencial para ser aplicado em outras espécies biológicas, como *H. seropedicae*.

A1.2 EXPERIMENTOS EM MICROARRANJO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS E MÉTODOS DE DETECÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO

Um microarranjo de oligonucleotídeos consiste em milhares de seqüências de oligonucleotídeos sintéticos depositados ordenadamente em alta densidade sobre uma lâmina de microscópio ótico por um robô especializado (YANG e SPEED, 2002). Em duas amostras de DNA ou RNA, as quantidades relativas de seqüências idênticas às do DNA depositado podem ser determinadas monitorando a hibridização diferencial das duas amostras com as seqüências em microarranjo. Para amostras de mRNA, as duas amostras são transcritas reversamente em cDNA, marcadas com dois cromóforos diferentes, respectivamente [normalmente um fluoróforo vermelho, cianina 5 (Cy5), e outro verde, cianina 3 (Cy3)], então misturadas em proporções equivalentes e hibridizadas com as seqüências de DNA em microarranjo. Após esta hibridização competitiva, as lâminas (*chips*) são visualizadas utilizando um *scanner*, e as medidas de fluorescência são feitas separadamente para cada posição, que por sua vez representa uma seqüência única. Após o processamento da imagem, os dados gerados para cada gene em arranjo precisam ser analisados antes dos genes com expressão diferencial serem identificados (HEGDE *et al.*, 2000). Para tal, faz-se a normalização das intensidades relativas de fluorescência em cada um dos dois canais escaneados. Isto é necessário para descontar diferenças de marcação e eficiências de detecção dos fluoróforos, e diferenças na quantidade de ácido nucleico nas duas amostras analisadas. Estes problemas podem causar um desvio na razão média entre Cy5 e Cy3, e as intensidades precisam ser ajustadas antes de um experimento ser propriamente analisado. Após a normalização, a razão das intensidades de fluorescência verde e vermelha para cada posição é indicativa da abundância relativa da seqüência do oligonucleotídeo entre as duas amostras de ácidos nucleicos.

Microarranjos de ácidos nucleicos podem consistir de oligonucleotídeos curtos (15–25 nt), longos (50–120 nt), ou de cDNA amplificado por PCR (100–3000 pb) (STEARS *et al.*, 2003). Os microarranjos de cDNA representam um tipo de arranjo em que produtos de PCR dupla fita amplificados de clones de identificadores de sequência expressa (“*expressed sequence tags*”, ESTs) são depositados nas lâminas de vidro, permitindo que perfis de expressão gênica sejam determinados com alta reprodutibilidade e eficiência (SCHENA *et al.*, 1995; HARRINGTON *et al.*, 2000). Contudo, a construção de microarranjos de cDNA apresenta certos desafios, relacionados com os custos associados com a validação, rastreamento e manutenção dos clones. O rastreamento dos clones de cDNA e amplicons de PCR, por ser trabalhoso e problemático, pode levar a 10–30% de falsa identificação de clones (WATSON *et al.*, 1998). Outras limitações dos microarranjos de cDNA são a sua dificuldade em discriminar padrões de expressão de genes homólogos (devido a hibridização cruzada), variações de emenda (“*splicing*”) e moléculas de RNA *antisense*. Alternativamente, os microarranjos podem ser constituídos de oligonucleotídeos curtos (25 nt) sintetizados diretamente sobre uma matriz sólida usando tecnologia de fotolitografia (Affymetrix; LIPSHUTZ *et al.*, 1999; LOCKHART *et al.*, 1996), ou constituídos por deposição de oligonucleotídeos longos (55–70 nt) nas lâminas de vidro (KANE *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2001; CALL *et al.*, 2001). Uma variação do desenho da Affymetrix de sondas ancoradas por uma das extremidades ao suporte sólido envolve oligonucleotídeos longos modificados por adição de um grupo 5'-amina para a ligação covalente às lâminas de vidro pré-ativado (SOUTHERN *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 2001). Esta estratégia de engenharia de oligonucleotídeo tem sido amplamente considerada como um pré-requisito para medidas de expressão gênica acuradas. Contudo, não existe uma evidência clara de que outras ligações covalentes não se formem. Com arranjos de oligonucleotídeos, problemas relacionados a rastreamento dos clones, manipulação de estoques em glicerol e falhas de amplificação por PCR são evitados. A publicação de seqüências de genomas de diversos organismos, bem como a abundância de dados de ESTs, fornecem informação suficiente sobre seqüências para desenhar oligonucleotídeos

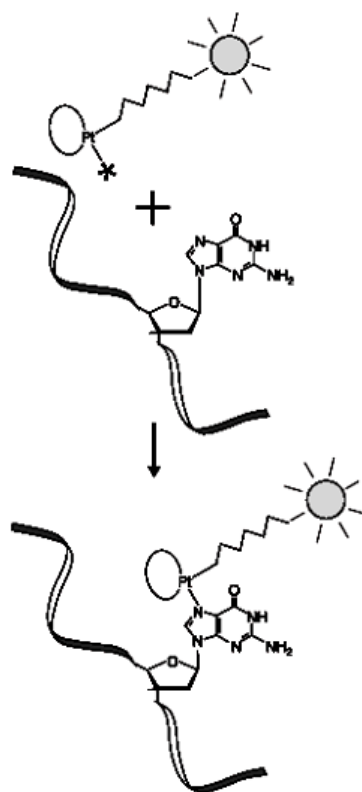
únicos capazes de distinguir genes homólogos e variações de emendas (“*splicing*”) alternativas. Como tal, as sondas de oligonucleotídeos fornecem flexibilidade adicional em relação aos amplicons de PCR (WANG *et al.*, 2003).

Muitos métodos têm sido usados para a preparação de ácidos nucleicos marcados a partir de RNA (EISEN e BROWN, 1999). Pode-se marcar cDNA diretamente por incorporação de nucleotídeos com grupamentos fluorescentes durante a transcrição reversa com oligonucleotídeo iniciador poli-dT. A síntese de cDNA utilizando oligonucleotídeos iniciadores com seqüências aleatórias pode ser usada para a marcação, mas nem sempre é apropriada. Por exemplo, arranjos constituídos por seqüências complementares às extremidades 3’ dos transcritos são mais adequados para análises de amostras de cDNA sintetizadas com oligonucleotídeo iniciador poli-dT, enquanto arranjos cujos elementos consistem de seqüências inteiras de cDNA ou de supostas ORFs são bem apropriados para amostras preparadas por ambos os métodos que envolvem os dois tipos de oligonucleotídeos iniciadores. As amostras também podem ser marcadas durante a síntese da segunda fita (a primeira fita de cDNA não é marcada). Porém, a incorporação de nucleotídeos marcados com fluoróforo traz inconvenientes como variabilidade de (ou mesmo baixa) eficiência de incorporação entre diferentes fluoróforos (COX e SINGER, 2004). Para superar isto, mais recentemente tem-se utilizado 5-(3-aminoalil)-2’-desoxiuridina 5’-trifosfato (aa-dUTP), que é enzimaticamente incorporado para gerar DNA modificado com grupamentos amina. Este, por sua vez, é quimicamente marcado com um fluoróforo reativo a grupamentos amina – método indireto de marcação.

Um outro método de marcação envolve a marcação química de ácidos nucleicos com fluoróforo sem a participação de qualquer enzima, o que o torna mais econômico. O método ULS™ (de “*Universal Linkage System*” ou Sistema de Ligação Universal) da Molecular Probes™ (Invitrogen) tem sido utilizado principalmente para a marcação de micro-RNA (miRNA) (THOMSON *et al.*, 2004; BABAK *et al.*, 2004). Este método é baseado na utilização de um composto platina-fluoróforo, que forma um complexo estável com o átomo N7 de bases de guanina e (em menor proporção)

adenina em DNA, RNA, PNA (ácido nucleico peptídico) e oligonucleotídeos (Fig. 17). A Tabela 7 ilustra a potencial economia do método ULS™ de marcação.

FIGURA 17 – ESQUEMA DA REAÇÃO DE MARCAÇÃO DO MÉTODO ULS™.



Os reagentes de platina-fluoróforo do método ULS™ reagem com o átomo N7 das bases de guanina e (em menor proporção) adenina de modo a gerar um complexo estável entre o ácido nucleico e fluoróforo.

TABELA 7 – COMPARAÇÃO DE CUSTOS ENTRE OS MÉTODOS ULS™ E POR INCORPORAÇÃO DE aa-UTP.

Método	Kit	Preço (US\$)[†]	Número de reações	Preço por reação (US\$)[†]	Referência
ULS™	ULYSIS® com os fluoróforos Alexa Fluor® 532 e 647, da Molecular Probes (Invitrogen)	452,00	20	22,60	https://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=viewCatalog.viewProductDetails&productDescription=3636&catname=North%20America%20Main https://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=viewCatalog.viewProductDetails&productDescription=3628&catname=North%20America%20Main
Por incorporação de aa-UTP	Amino Allyl MessageAmp™ II com os fluoróforos Cy™3 e Cy™5, da Ambion	1195,00	20	59,75	http://www.ambion.com/catalog/CatNum.php?1753

[†] Preço para entrega em território estadunidense, em fevereiro de 2006.

A1.3 OBJETIVOS

A1.3.1 Objetivo geral

- Desenvolver um protocolo econômico para a marcação de mRNA vegetal (especificamente arroz) para a hibridização em *chip* de microarranjo de oligonucleotídeos.

A1.3.2 Objetivos específicos

- Preparar mRNA vegetal;
- Testar um protocolo para a marcação de mRNA vegetal envolvendo o método ULS™;
- Verificar se o protocolo envolvendo mRNA vegetal pode ser aplicável especificamente em mRNA de arroz.

A2 MATERIAL E MÉTODOS

Na época da execução deste trabalho, o laboratório do Dr. Galbraith preparava rotineiramente *chips* de microarranjo de *Arabidopsis thaliana*, enquanto para o caso de arroz (*O. sativa*), apenas alguns *chips* protótipos estavam disponíveis (<http://www.ag.arizona.edu/microarray/>). Assim, a estratégia foi padronizar o método de detecção de mRNA vegetal (utilizando o modelo biológico *A. thaliana*), para depois aplicá-lo especificamente em mRNA de arroz.

A2.1 AMOSTRAGEM BIOLÓGICA E PREPARAÇÃO DO RNA TOTAL

Sementes da estirpe selvagem de *A. thaliana* Col-0 (O'KANE e AL-SHEHBAZ, 1997) foram esterilizadas e plantadas em placas de Petri contendo MS ágar (sacarose 2%, ágar 1,2%). As placas foram mantidas a 4 °C por 3 d, depois a 21 °C por 14 d, e então a 4 °C por 7 d, com fotoperíodos de dias de ≈ 16 h e noites de ≈ 8 h. Cerca de 10–20 mudas foram separadas manualmente do meio com ágar, transferidas para um almofariz previamente gelado com nitrogênio líquido, e homogeneizadas com o uso de um pistilo na presença do nitrogênio líquido. Ao tecido pulverizado foram adicionados cerca de 5 mL do reagente TRIzol (Invitrogen), sob homogeneização com o pistilo. Após 1 min de incubação, a amostra foi transferida para um tubo plástico de centrífuga de 50 mL, e incubada à temperatura ambiente por 5 min. Foram adicionados 0,2 volumes de uma mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) ao tubo, e depois este foi agitado por vórtex. Incubou-se por 3 min à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a $10.000 \times g$ por 10 min. A fase aquosa superior contendo o RNA foi distribuída em microtubos de 1,5 mL. O RNA foi precipitado pela adição de 1 volume de álcool isopropílico, agitando e incubando por 10 min. Os microtubos contendo as misturas foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 10 min. Descartou-se o sobrenadante por decantação e pipetagem. O precipitado foi lavado $1\times$ com etanol 70%, centrifugando a $10.000 \times g$ por 5 min. Descartou-se o sobrenadante por decantação e pipetagem. Secou-se o precipitado sob fluxo de ar por 5–10 min. O RNA foi

redissolvido em 50 μL de ddH₂O sem RNase, incubando o sistema a 65–90 °C por 10 min.

A2.2 PURIFICAÇÃO DE RNA

O RNA foi purificado através de eluição em mini-colunas do *kit* RNeasy[®] Mini (Qiagen). Para isto, o volume da amostra de RNA foi ajustado para os 100 μL com ddH₂O sem RNase. Foram adicionados 350 μL de tampão RLT (do *kit*). Para precipitar o RNA, foram adicionados 250 μL de etanol 96–100%. A amostra (700 μL) foi prontamente transferida para uma mini-coluna previamente posicionada sobre um tubo de coleta (do *kit*). O sistema foi centrifugado a 9000 $\times g$ por 15 s, e o eluato foi descartado. Foram adicionados à mini-coluna 500 μL de tampão RPE (do *kit*). O sistema foi centrifugado a 9000 $\times g$ por 15 s, para lavar a membrana da mini-coluna, e o eluato foi descartado. Este passo de adição de tampão RPE e centrifugação (2 min) foi repetido. A mini-coluna foi posicionada sobre um microtubo de 1,5 mL, foram adicionados 30–50 μL de ddH₂O sem RNase ao centro da membrana da mini-coluna, e o sistema foi centrifugado a 9000 $\times g$ por 1 min, para eluir o RNA.

O RNA foi quantificado e qualificado medindo sua absorbância a 230, 260 e 280 nm, utilizando o espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies) e, para RNA total, analisado também por eletroforese capilar, utilizando o sistema Bioanalyzer (Agilent Technologies). A solução de RNA foi armazenada a –80 °C.

A2.3 MARCAÇÃO DE RNA POR FLUORÓFOROS

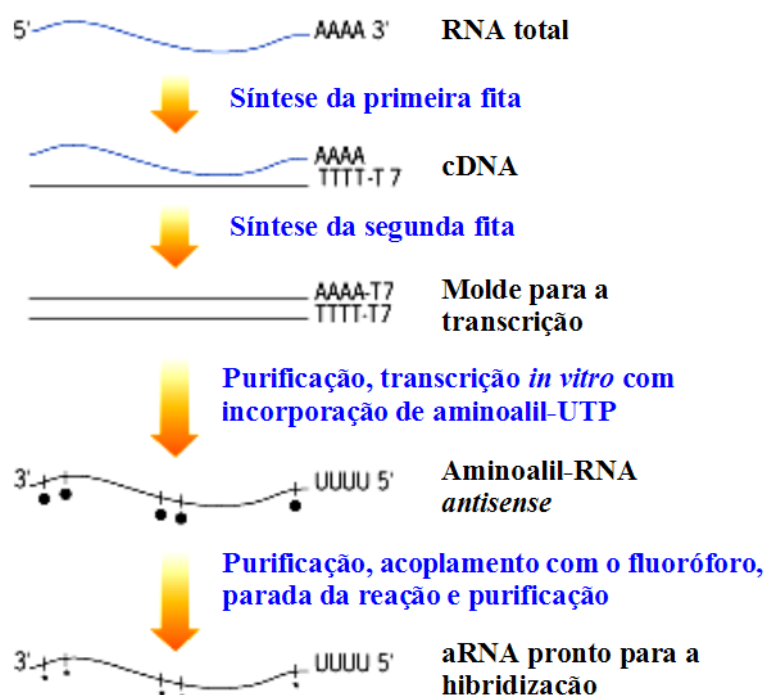
Para comparar o método de marcação ULS[™] com o método padrão por incorporação de aa-UTP, adotou-se uma estratégia para os experimentos de microarranjo envolvendo comparação indireta (YANG e SPEED, 2002). Uma amostra de RNA total de *A. thaliana* (A2.1) foi dividida em quatro alíquotas e, no final de cada tratamento envolvendo um dos métodos de marcação citados, foram denominadas com os prefixos Ref, T1, T2 e T3, respectivamente. O tratamento e a denominação a que cada alíquota foi sujeita são descritos como se segue.

A2.3.1 Marcação pelo método envolvendo incorporação de aa-UTP

Uma alíquota de RNA total de *A. thaliana* purificado, quantificado e qualificado (A2.2) foi sujeita a tratamento com o *kit* Amino Allyl MessageAmp™ II (Ambion) (Fig. 18). Para isto, 0,3–1,0 µg de RNA foram transferidos para um microtubo de PCR de 200 µL. Foi adicionado 1 µL de oligonucleotídeo iniciador T7 oligo(dT) (do *kit*). Adicionou-se ddH₂O sem RNase para um volume final de 12 µL. Para a desnaturação da amostra, o sistema foi incubado a 70 °C por 5 min em um termociclador; em seguida, o microtubo foi centrifugado brevemente e transferido para banho de gelo, de modo a promover o anelamento entre o oligonucleotídeo e o RNA. Foram adicionados 2 µL de “tampão para primeira fita” 10× concentrado, 1 µL de inibidor de nuclease, 4 µL de mistura de dNTP e 4 µL de transcriptase reversa (todos provenientes do *kit*). O sistema foi incubado a 42 °C por 2 h. Para a síntese da segunda fita de cDNA, foram adicionados 63 µL de ddH₂O sem RNase, 10 µL de “tampão para a segunda fita” 10× concentrado, 4 µL de mistura de dNTP, 2 µL de DNA polimerase e 1 µL de RNase H (todos provenientes do *kit*). O sistema foi incubado a 16 °C por 2 horas.

A amostra de cDNA foi purificada utilizando mini-colunas de gel de sílica do *kit* DNA QIAquick (Qiagen). Para a absorção do DNA na sílica da mini-coluna, foram adicionados 5 volumes (*i.e.*, 500 µL) de tampão PB (do *kit*) à amostra; o sistema foi transferido para uma mini-coluna previamente posicionada sobre um tubo coletor (do *kit*), e centrifugado a 10.000 × *g* por 45 s. O eluato foi descartado. Para lavar a amostra, foram adicionados 750 µL de tampão PE (do *kit*) à mini-coluna, e o sistema foi então centrifugado a 10.000 × *g* por 45 s. O eluato foi novamente descartado, o sistema foi submetido a uma centrifugação adicional de 1 min para livrar o etanol residual presente no tampão PE. A mini-coluna foi reposicionada sobre um microtubo de 1,5 mL. Para eluir o DNA, foram adicionados 18 µL de ddH₂O ao centro da membrana da coluna, e o sistema foi centrifugado a 10.000 × *g* por 1 min. O DNA foi quantificado e qualificado medindo sua absorbância a 230, 260 e 280 nm, utilizando o espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies).

FIGURA 18 – ESQUEMA DA SEQÜÊNCIA DE REAÇÕES PELO KIT AMINO ALLYL MESSAGEAMP™ II.



(Explicação no texto.)

Para a síntese do aRNA (RNA amplificado) por transcrição *in vitro*, foram adicionados 16 μL da solução anterior de cDNA dupla fita, 2 μL de solução de aminoalil-UTP (aa-UTP) 50 mmol/L, 12 μL de mistura de ATP, CTP e GTP 25 mmol/L, 2 μL de solução de UTP 50 mmol/L, 4 μL de “tampão de reação de T7” 10 \times concentrado e 4 μL de mistura de RNA polimerase T7 (todos provenientes do *kit*). A mistura foi incubada a 37 °C por cerca de 16 h. Para encerrar a reação, 60 μL de ddH₂O sem RNase foram adicionados. O aRNA foi então purificado, quantificado e qualificado (A2.2). Uma alíquota foi coletada para marcação pelo método ULS™ (A2.3.2).

Para o acoplamento com o éster do fluoróforo Cy3 ou Cy5, a amostra de aRNA foi seca em um microtubo de 200 μL aberto, a 90 °C, e redissolvida em 5 μL de

NaHCO₃ 0,2 mol/L. Foram adicionados 5 µL de solução de Cy3 ou Cy5 (GE Healthcare, cat. n° PA23001; todo o conteúdo do pacote dissolvido em 22 µL de dimetilsulfóxido – DMSO). O sistema foi incubado no escuro à temperatura ambiente por 2 h. O RNA foi purificado, quantificado e qualificado (A2.2), resultando nas amostras Ref-Cy3 ou T2-Cy5; a eficiência de incorporação do fluoróforo foi verificada com o espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies), por medida da absorbância a 550 ou 650 nm, para Cy3 ou Cy5, respectivamente.

A2.3.2 Marcação pelo método ULS™

Para a marcação pelo método ULS™, uma alíquota de aRNA de *A. thaliana* (A2.3.1) foi sujeita a tratamento com o *kit* ULYSIS® Alexa Fluor® 647 (Molecular Probes/Invitrogen). Para isto, cerca de 1,0 µg de amostra foi seco em um microtubo de 200 µL aberto a 90 °C, e redissolvido em 20 µL de tampão de marcação (componente C do *kit*). O RNA foi desnaturado por tratamento a 95 °C por 5 min, seguido de banho de gelo. Foram adicionados 5 µL do reagente de marcação ULS™ (Alexa Fluor® 647, componente A do *kit*, previamente preparado conforme o manual). O sistema foi incubado a 90 °C por 10 min, e transferido para banho de gelo. O RNA foi purificado, quantificado e qualificado (A2.2), resultando na amostra T1-AF; a eficiência de incorporação do fluoróforo foi verificada com o espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies), por medida da absorbância a 650 nm.

Para verificar se o método ULS™ poderia ser usado para a marcação de RNA total ao invés de aRNA (o que tornaria a marcação de RNA ainda mais simples e econômica), uma alíquota com cerca de 14 µg da amostra de RNA total de *A. thaliana* (A2.1), após este ter sido purificado, quantificado e qualificado (A2.2), foi tratada com o *kit* ULYSIS® Alexa Fluor® 647, conforme descrito no parágrafo anterior para aRNA, resultando na amostra T3-AFtotal.

A2.4 CARACTERÍSTICAS DO *CHIP* DE MICROARRANJO, HIBRIDIZAÇÃO E AQUISIÇÃO DOS DADOS

O *chip* de microarranjo de DNA utilizado continha 29.000 oligonucleotídeos de 70 nt, cujas seqüências correspondem à fita *sense*, porção 3', de cada gene do genoma de *A. thaliana* (“Arabidopsis Genome Oligo Set Version 3.0”, Operon, <http://omad.operon.com/download/index.php>), depositados por robô em lâminas-substratos de microarranjo SuperAmine (Telechem International) no laboratório do Dr. David Galbraith (<http://www.ag.arizona.edu/microarray/>).

Previamente ao ensaio de hibridização propriamente dito, os oligonucleotídeos depositados no *chip* foram re-hidratados por tratamento em vapor sobre água aquecida a 50 °C por 5–10 s, seguido de secagem sobre chapa quente (“*heat block*”) a 45 °C por 5 s, repetindo este ciclo por 8–12 vezes. Para a reação de ligação (“*cross-linking*”) entre os oligonucleotídeos e a superfície do *chip*, o lado contendo o DNA depositado foi exposto a radiação UV, utilizando uma câmara Stratalinker (Stratagene) regulada para 600 mJ. Para a remoção do excesso de oligonucleotídeos não ligados, o *chip* foi lavado com ddH₂O. Para o bloqueio das áreas livres de superfície, o *chip* foi banhado com solução BSA 1% a 37 °C por 1 h, e depois lavado uma vez por imersão em SDS 1% à temperatura ambiente por 5 min, e 5 vezes por imersão em ddH₂O. O *chip* foi seco por centrifugação a $\approx 800 \times g$ por 2 min, dentro de um tubo plástico de centrífuga de 50 mL. O *chip* foi armazenado em uma caixa à prova de luz em um local seco, até o momento do ensaio de hibridização propriamente dito.

O ensaio de hibridização foi efetuado como descrito (HUGHES *et al.*, 2001; BABAK *et al.*, 2004), com algumas modificações. Nos ensaios de hibridização envolvendo as amostras de aRNA (Ref-Cy3, T1-AF e/ou T2-Cy5) foram utilizados 0,8 µg de cada uma, enquanto no ensaio com a amostra de RNA total (T3-AFtotal) utilizou-se 7,0 µg da mesma. Uma mistura de duas amostras de RNA marcado pelos respectivos método e cor teve seu volume ajustado para os 14 µL. Foram adicionados 15 µL de “tampão de hibridização” 2× concentrado [NaCl 2 mol/L, lauroil-sarcosina de sódio 1%, ácido 2-(N-morfolino)etano-sulfônico (MES) 100 mmol/L, pH 6,5], 1 µL

de solução de DNA de esperma de arenque 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 30 μL de formamida. De modo a desnaturar o RNA previamente à hibridização, o sistema foi incubado a 65 °C por 5 min, e transferido para um banho de gelo.

A cada uma das cavidades do cassete de hibridização (Telechem International, cat. nº AHCXD), foram adicionados 20 μl de ddH₂O de modo a evitar a desidratação excessiva do *chip* durante a hibridização. O *chip* foi posicionado dentro do cassete (DNA voltado para cima), a lamínula de cobertura (Erie Scientific, cat. nº 24X601-2-4733) posicionada sobre o microarranjo de DNA, e a amostra (60 μL) aplicada sob a lamínula de cobertura, dispersando-se por todo o microarranjo por capilaridade. O cassete foi devidamente fechado e incubado a 47 °C por 16–20 h. O *chip* foi retirado do cassete de hibridização e lavado em solução de lavagem [SSPE 6 \times (MANIATIS *et al.*, 1982), lauroil-sarcosina de sódio 0,005%] e depois em SSPE 0,06 \times . O *chip* foi seco por centrifugação a $\approx 800 \times g$ por 2 min, e armazenado em uma caixa à prova de luz em um lugar seco, até o momento do procedimento de varredura.

A varredura e a quantificação dos sinais de fluorescência foram feitos utilizando o *scanner* GenePix 4200A (Molecular Devices). A normalização dos valores de intensidade de fluorescência foi feita através do método *quantile* (BOLSTAD *et al.*, 2003).

A3 RESULTADOS

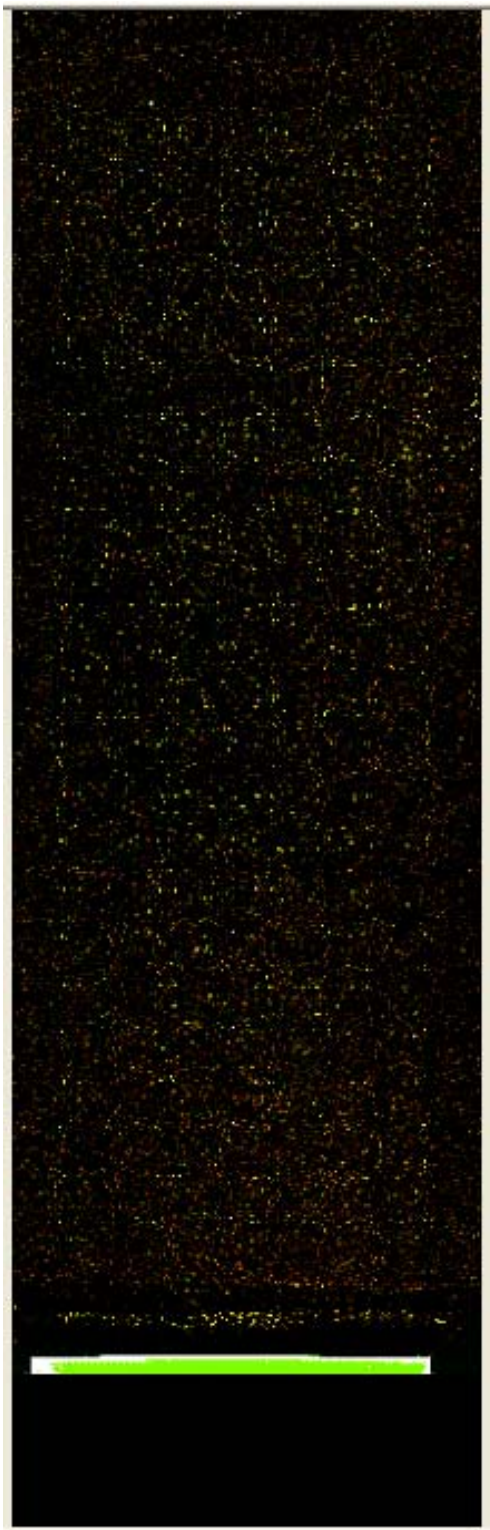
O *chip* de microarranjo de DNA disponível continha oligonucleotídeos cujas seqüências correspondem à fita *sense* de cada gene do genoma de *A. thaliana* (A2.4). O protocolo do *kit* Amino Allyl MessageAmp™ II, que segue o método por incorporação de aa-UTP, é apropriado para os oligonucleotídeos do *chip*, uma vez que envolve a síntese de RNA amplificado (aRNA) complementar a mRNA, produzindo assim RNA *antisense* (A2.3.1). Para testar o método de marcação ULS™ e compará-lo com o método de marcação por incorporação de aa-UTP nos ensaios de hibridização em microarranjo de DNA, foi necessário utilizar RNA *antisense*. Para mostrar que a reação de marcação de RNA envolvendo o reagente ULS™ Alexa Fluor® 647 (que reage com bases de guanina e, em menor extensão, de adenina; vermelho) traz resultados semelhantes à reação envolvendo o éster do fluoróforo Cy5 (que reage com bases modificadas aa-UTP; vermelho), uma mesma alíquota de aRNA obtido através do protocolo do *kit* Amino Allyl MessageAmp™ II foi marcado com os dois tipos de reagente, resultando nas amostras T1-AF e T2-Cy5, respectivamente (A2.3.2 e A2.3.1). Além disso, a mesma alíquota de aRNA foi marcada com o éster do fluoróforo Cy3 (que reage com bases modificadas aa-UTP; verde), resultando na amostra Ref-Cy3 (A2.3.1), que foi usada como referência interna entre os ensaios de hibridização. As Figs. 19A e B mostram as imagens obtidas pelo varrimento do *chip* após hibridização com as amostras T1-AF e Ref-Cy3, e T2-Cy5 e Ref-Cy3, respectivamente.

Para mostrar que é possível, nos ensaios de hibridização em microarranjo, utilizar RNA total de planta marcado através do método ULS™ com o fluoróforo Alexa Fluor® 647 (o que tornaria o processo de marcação mais simples e econômico), a amostra T3-AFtotal foi preparada (A2.3.2). A Fig. 19C mostra a imagem obtida pelo varrimento de um *chip* hibridizado com as amostras T3-AFtotal e Ref-Cy3.

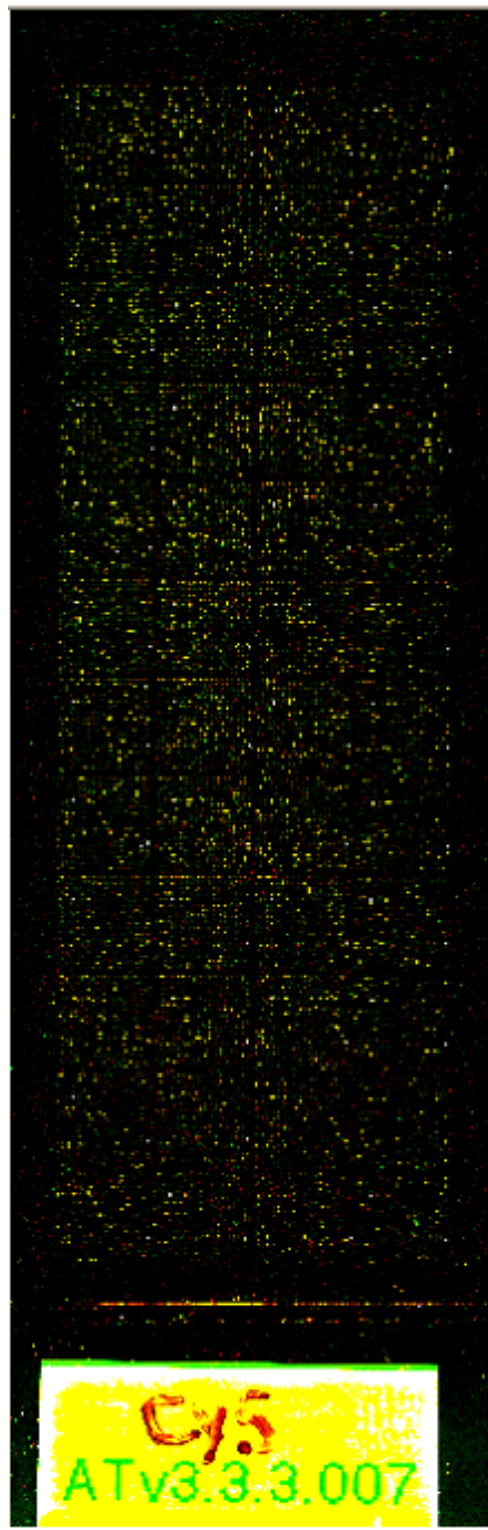
As Figs. 20A, B e C, e D, E e F são representações gráficas dos sinais de fluorescência dos três ensaios de hibridização, respectivamente.

FIGURA 19 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ULS™ E POR INCORPORAÇÃO DE aa-UTP PARA A MARCAÇÃO DE RNA VEGETAL DURANTE ENSAIOS DE HIBRIDIZAÇÃO EM MICROARRANJO DE DNA

A

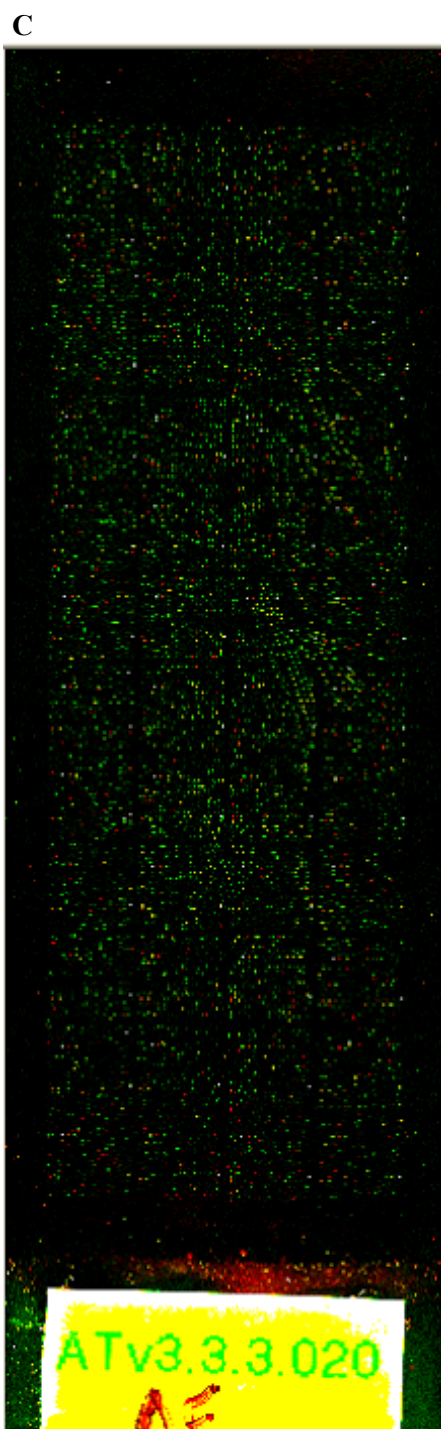


B



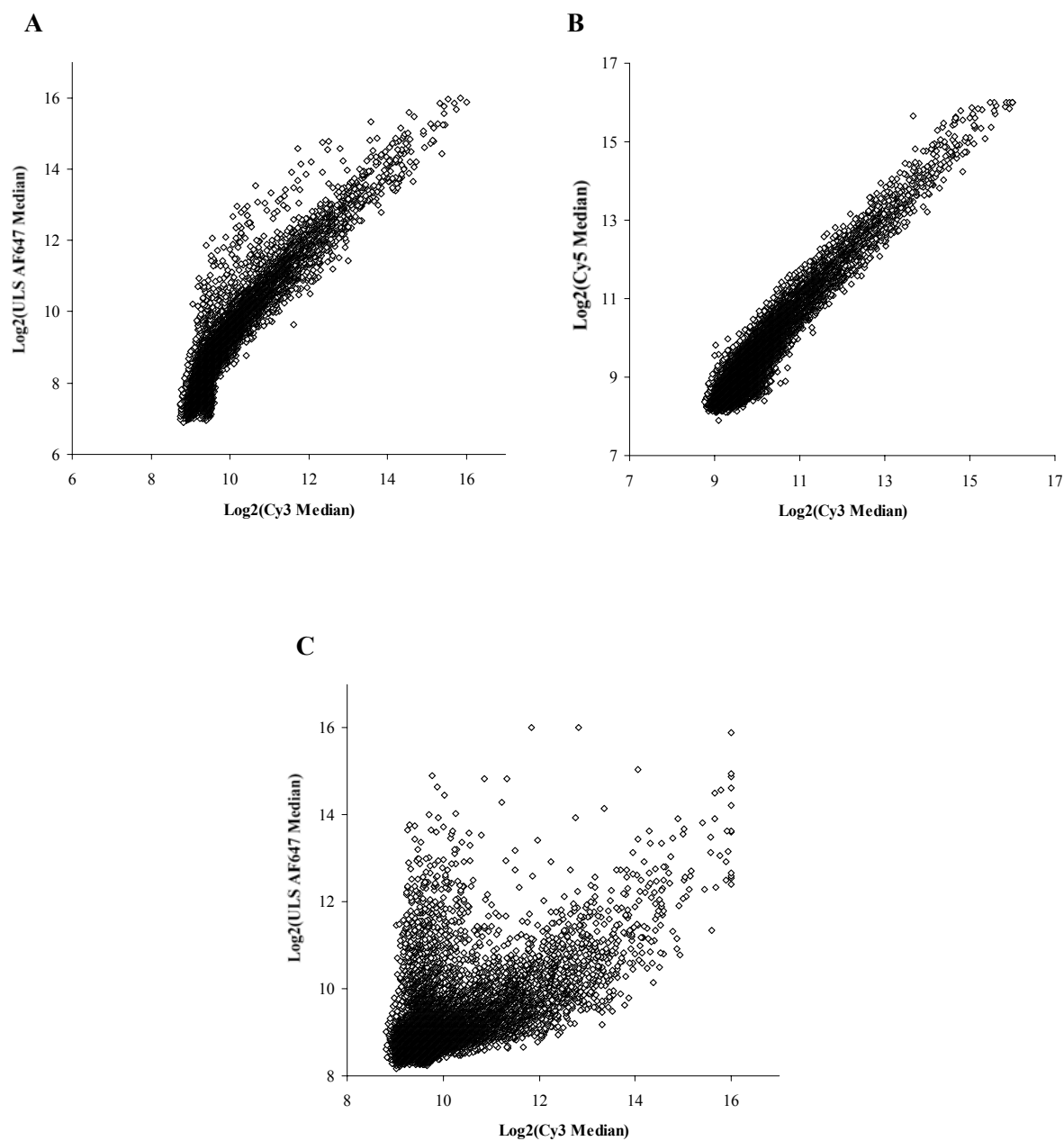
Continua...

FIGURA 19 (CONTINUAÇÃO)



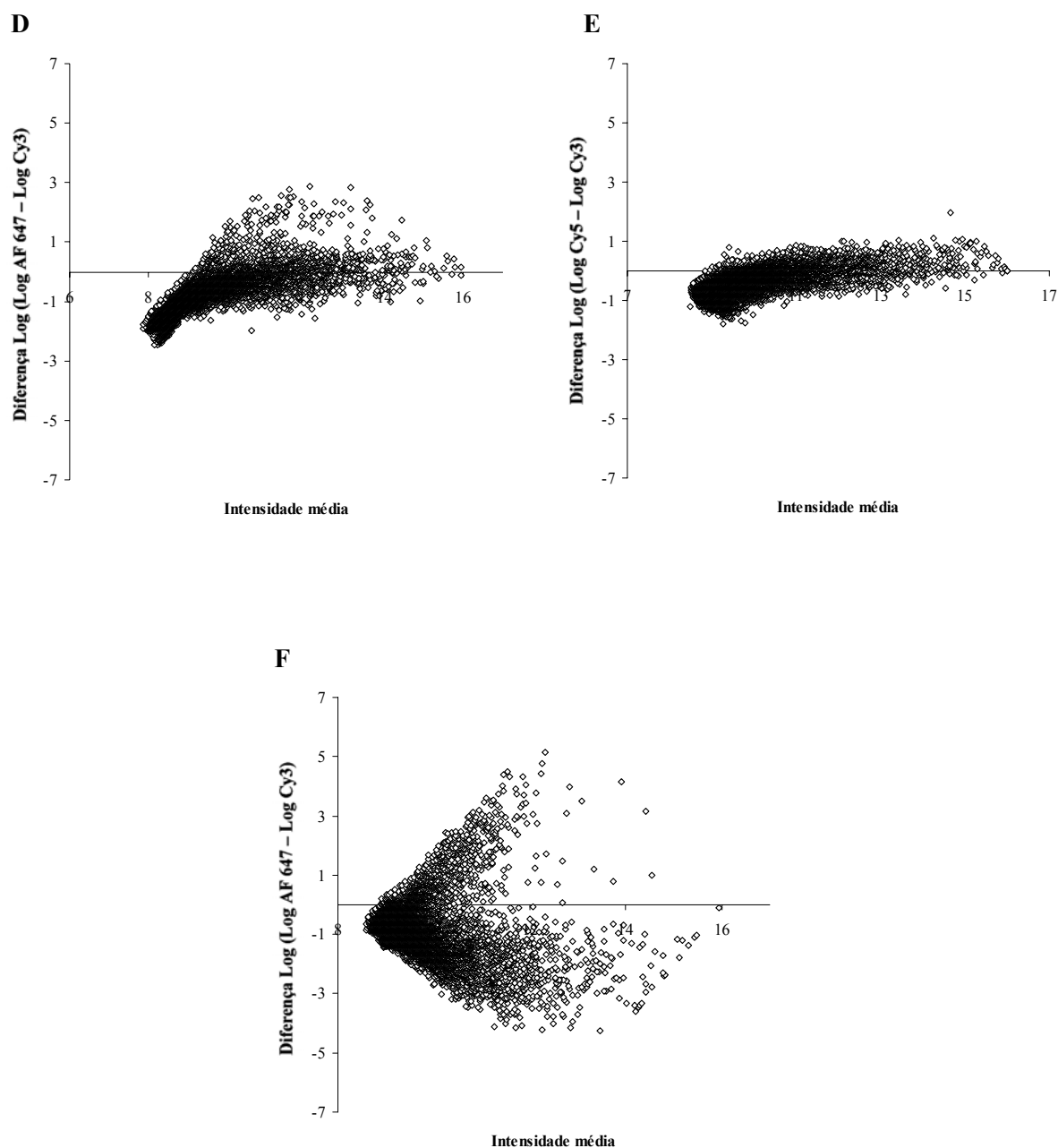
Os sinais verdes nos *chips* correspondem a aRNA marcado pelo método por incorporação de aa-UTP, fluoróforo Cy3 (amostra referencial Ref-Cy3). Sinais vermelhos: A = aRNA marcado pelo método de ULS™, fluoróforo Alexa Fluor® 647 (amostra T1-AF); B = aRNA marcado pelo método que envolve incorporação de aa-UTP, fluoróforo Cy5 (amostra T2-Cy5); C = RNA total marcado pelo método de ULS™, fluoróforo Alexa Fluor® 647 (amostra T3-AFtotal).

FIGURA 20 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ULS™ E POR INCORPORAÇÃO DE aa-UTP PARA A MARCAÇÃO DE RNA VEGETAL DURANTE ENSAIOS DE HIBRIDIZAÇÃO EM MICROARRANJO DE DNA



Continua...

FIGURA 20 (CONTINUAÇÃO)

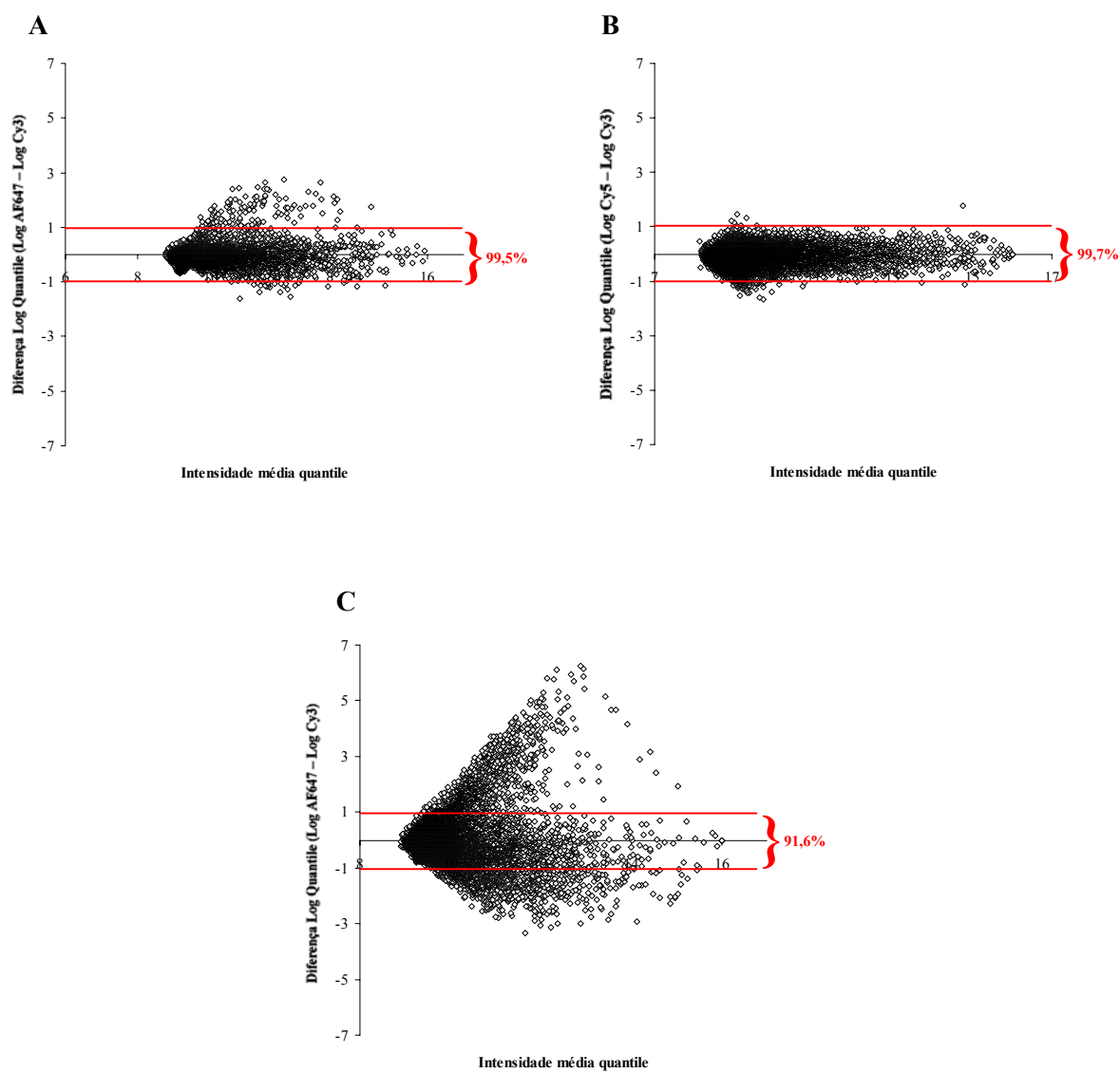


Em A, B e C, e D, E e F, dois tipos de representação gráfica, em escala logarítmica, dos valores de intensidade de fluorescência dos experimentos mostrados na Fig. 19A, B e C, respectivamente. Os dados em D, E e F foram representados como diferença logarítmica para visualizar alguma tendência para um determinado fluoróforo.

Os valores de intensidade de fluorescência obtidos foram normalizados (A2.4) e representados graficamente (Fig. 21). Este procedimento permitiu eliminar os desvios na razão média entre os fluoróforos verde e vermelho, devido a diferenças de marcação e eficiências de detecção dos fluoróforos, e a diferenças na quantidade de ácido nucleico nas duas amostras respectivas de cada fluoróforo analisadas (HEGDE *et al.*, 2000). O tipo de gráfico da Fig. 21 permite analisar o perfil de distribuição dos pontos em torno do valor zero de “diferença de intensidade de fluorescência verde e vermelha” – quanto maior o espalhamento dos pontos, maiores são as diferenças entre os sinais de ambas as cores (no caso deste experimento, maiores são as diferenças entre os métodos de marcação de RNA). Comparando as Figs. 21A e B, verifica-se um espalhamento maior dos dados no gráfico da Fig. 21A (amostra T1-AF, relativa ao método de marcação ULS™ com Alexa Fluor® 647 como fluoróforo vermelho) do que na Fig. 21B (amostra T2-Cy5, método por incorporação de aa-UTP com Cy5). Através de uma análise mais detalhada, verificou-se que 99,5% e 99,7% dos dados em ambas as Figs., respectivamente, encontravam-se no intervalo entre -1 e 1 de diferença logarítmica com a amostra referencial, após a normalização.

Nota-se um espalhamento ainda maior dos dados, quando se inclui na comparação o gráfico da Fig. 21C (amostra T3-AFtotal, relativa ao método ULS™, com Alexa Fluor® 647 como fluoróforo vermelho, para a marcação de RNA total). Apenas 91,6% dos dados encontravam-se no intervalo entre -1 e 1 de diferença logarítmica com a amostra referencial, após a normalização.

FIGURA 21 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS DADOS DE HIBRIDIZAÇÃO NORMALIZADOS



Em A, B e C, representação gráfica dos dados da Fig. 19 normalizados, respectivamente. As linhas vermelhas demarcam o intervalo de “Diferença Log Quantile” de -1 a 1 , com respectiva porcentagem de pontos que se encontram naquele intervalo (vide texto para maiores explicações).

A4 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

A estratégia adotada, da comparação indireta (YANG e SPEED, 2002), mostrou ser útil para avaliar o método ULSTM de marcação de RNA durante ensaios de hibridização em microarranjo, usando o método por incorporação de aa-UTP como padrão. Quando foi utilizada uma mesma amostra de RNA amplificado (aRNA), os resultados obtidos pelos métodos ULSTM e por incorporação de aa-UTP foram comparáveis (Figs. 21A e 19B). Como era de se esperar para a amostra marcada através do mesmo método que o da amostra referencial, o espalhamento dos dados foi menor no ensaio envolvendo T2-Cy5 (Fig. 21B). Verifica-se que, no ensaio envolvendo a amostra T1-AF (Fig. 21A), alguns dados apresentaram valores elevados de diferença logarítmica após a normalização, o que não aconteceu no ensaio com a amostra T2-Cy5 (Fig. 21B). Esse efeito pode ser devido às diferentes características de ambos os reagentes de marcação: o reagente ULSTM Alexa Fluor[®] 647 é específico para bases de guanina e (em menor proporção) adenina, enquanto o reagente para aa-UTP, éster de Cy5, é específico para bases de uracila; portanto, moléculas de RNA com elevada razão (G + A)/U tenderiam a ser marcadas mais extensivamente pelo primeiro reagente, resultando no efeito observado na Fig. 21A.

No ensaio com a amostra T3-AFtotal (Fig. 21C), o espalhamento dos dados foi ainda maior, o que também era de se esperar para uma amostra de RNA diferente (RNA total) da amostra referencial (aRNA, amostra Ref-Cy3). O objetivo maior deste ensaio, no entanto, foi provar que é possível executar um ensaio de hibridização com uma amostra de RNA total marcada com o reagente ULSTM Alexa Fluor[®] 647, o que pode tornar o processo de marcação por fluoróforo mais simples e econômico.

É de se realçar que os elementos do *chip* de microarranjo utilizado consistiam de oligonucleotídeos cujas seqüências correspondem à fita *sense* de cada gene do genoma de *A. thaliana* (A2.4). Portanto, somente RNA *antisense* foi capaz de hibridizar com os elementos do *chip*. No caso de aRNA, este é amplificado a partir de (e complementar a) mRNA, produzindo assim RNA *antisense* (A2.3.1); porém, o aRNA que hibridiza (*e.g.*, amostra Ref-Cy3, Fig. 21C) é exclusivamente representativo do mRNA *sense*. Por outro lado, quando se marcou o RNA total com o reagente

ULS™ Alexa Fluor® 647 (amostra T3-AFtotal, Fig. 21C), apenas o mRNA *antisense* foi capaz de hibridizar com o *chip*. Desta forma, o resultado da Fig. 21C mostra o perfil de transcrição genômica *sense* (sinal de Cy3, verde) e *antisense* (sinal de Alexa Fluor® 647, vermelho) em um único ensaio de hibridização em microarranjo de DNA. Não foram encontradas referências descrevendo um ensaio semelhante a este (simples e econômico) para o estudo de transcrição *sense* e *antisense*, revelando mais um potencial para o método ULS™ com o fluoróforo Alexa Fluor® 647.

Como perspectivas futuras, pretende-se utilizar o método ULS™ com os fluoróforos Alexa Fluor® 647 e 532 (correspondentes espectralmente a Cy5 e Cy3, respectivamente) para a marcação de RNA total, desta vez com os elementos do *chip* de microarranjo consistindo de oligonucleotídeos cujas seqüências correspondam à fita *antisense* de cada gene do genoma de arroz, em estudos de expressão gênica envolvendo condições definidas. Os resultados deste ensaio serão comparados aos resultados obtidos utilizando o método que envolve incorporação de aa-UTP e os fluoróforos Cy5 e Cy3 em aRNA, utilizando seqüências de oligonucleotídeos *sense*, e estudando expressão gênica nas mesmas condições que para o método ULS™. As duas listas de genes com expressão diferencial obtidas por ambos os protocolos serão comparadas como forma de avaliar a estratégia envolvendo o método ULS™.

Caso as duas listas de genes com expressão diferencial obtidas conforme texto no parágrafo anterior sejam significativamente semelhantes, o protocolo envolvendo o método ULS™ para a marcação de RNA por fluoróforos poderá ser adotado como uma alternativa simples e econômica no projeto de mapeamento de *loci* de características quantitativas em arroz, e também no estudo dos genes de *H. seropedicae* que respondem aos níveis de amônio no meio.

REFERÊNCIAS

- ABOUHAMAD, W. N.; MANSON, M. D. The dipeptide permease of *Escherichia coli* closely resembles other bacterial transport systems and shows growth-phase-dependent expression. **Mol. Microbiol.**, v. 14, p. 1077–1092, 1994.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.
- ALVES, L.R. **Análise funcional dos genes *ntrY* e *ntrX* de *Herbaspirillum seropedicae***. Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.
- ANDREWS, J.C.; SHORT, S.A. *opp-lac* operon fusions and transcriptional regulation of the *Escherichia coli* *trp*-linked oligopeptide permease. **J. Bacteriol.**, v. 165, p. 434–442, 1986.
- ANDREWS, J.C.; BLEVINS, T.C.; SHORT, S.A. Regulation of peptide transport in *Escherichia coli*: induction of the *trp*-linked operon encoding the oligopeptide permease. **J. Bacteriol.**, v. 165, p. 428–433, 1986.
- ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 80–105, 2001.
- ARSENE, F., KATUPITIYA, S.; KENNEDY, I.R.; ELMERICH, C. Use of *lacZ* fusions to study the expression of *nif* genes of *Azospirillum brasilense* in association with plants. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 7, p. 748–757, 1994.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P.A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 4830–4838, 1996.
- ATKINSON, M.R.; BLAUWKAMP, T.; NINFA, A.J. Context-dependant functions of the PII signal transduction protein of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 5364–5375, 2002.
- BABAK, T.; ZHANG, W.; MORRIS, Q.; BLENCOWE, B.J.; HUGHES, T.R. Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. **RNA**, v. 10, p. 1813–1819, 2004.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549–579, 2005.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 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.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, p. 802–810, 1996.
- BARRETT, J.; RAY, P.; SOBCZYK, A.; LITTLE, R.; DIXON, R. Concerted inhibition of the transcriptional activation functions of the enhancer-binding protein NifA by the antiactivator NifL. **Mol. Microbiol.**, v. 39, p. 480–494, 2001.
- BARRIOS, H.; VALDERRAMA, B.; MORETT, E. Compilation and analysis of σ^{54} -dependent promoter sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 27, p. 4305–4313, 1999.
- BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined media. **Plant Growth Reg.**, v. 24, p. 7–11, 1998.
- 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.
- BENELLI, E.M.; SOUZA, E.M.; BONATTO, A.C.; BUCK, M.; MOORE, M.; HARPER, A.; POLIKARPOV, I.; PEDROSA, F.O. Role of PII protein as a signal nitrogen level in *Herbaspirillum seropedicae*. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000a. p. 105–106.
- BENELLI, E.M.; BUCK, M.; BONATTO, A.C.; SOUZA, E.M.; MOORE, M.; HARPER, A.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. *Herbaspirillum seropedicae* PII protein relieves NifA inhibition by NifL in an enteric background. In: EUROPEAN NITROGEN FIXATION CONFERENCE, 4., 2000. **Resumos...** Sevilha: Spanish Society for Nitrogen Fixation, 2000b. p. 247.
- BENELLI, E.M.; BUCK, M.; POLIKARPOV, I.; SOUZA, E.M.; CRUZ, L.M.; PEDROSA, F.O. *Herbaspirillum seropedicae* signal transduction protein PII is structurally similar to the enteric GlnK. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, p. 3296–3303, 2002.
- BLAKEY, D.; LEECH, A.; THOMAS, G.H.; COUTTS, G.; FINDLAY, K.; MERRICK, M. Purification of the *Escherichia coli* ammonium transporter AmtB reveals a trimeric stoichiometry. **Biochem. J.**, v. 364, 527–535, 2002.

- BLATTNER, F.R.; PLUNKETT, 3RD, G.; BLOCH, C.A.; PERNA, N.T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J.D.; RODE, C.K.; MAYHEW, G.F.; *ET AL.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, p. 1453–1474, 1997.
- BLAUWKAMP, T.A.; NINFA, A.J. Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: survival of nitrogen starvation. **Mol. Microbiol.**, v. 46, p. 203–214, 2002.
- BLAUWKAMP, T.A.; NINFA, A.J. Antagonism of PII signalling by the AmtB protein of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 1017–1028, 2003.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant Soil**, v. 249, p. 375–385, 2003.
- BOLSTAD, B.M.; IRIZARRY, R.A.; ASTRAND, M.; SPEED, T.P. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on bias and variance. **Bioinformatics**, v. 19, p. 185–193, 2003.
- BONATTO, A.C.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S.; BENELLI, E.M. Functional differences between the PII proteins from *Herbaspirillum seropedicae* and *Klebsiella pneumoniae*. *In*: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 128.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BROWNING, D.F.; BUSBY, S.J.W. The regulation of bacterial transcription initiation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621–631, 2004.
- BUCK, M.; MILLER, S.; DRUMMOND, M.H.; DIXON, R.A. Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. **Nature**, v. 320, p. 374–378, 1986.
- BUCK, M.; GALLEGOS, M.T.; STUDHOLME, D.J.; GUO, Y.; GRALLA, J.D. The bacterial enhancer-dependent σ^{54} (σ^N) transcription factor. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 4129–4136, 2000.
- BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Recent advances in the use of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in agriculture. *In*: RAO, N.S.; DOMMERGUES, Y.R. (eds.). **Microbial Interactions in Agriculture and Forestry, Vol II**. Plymouth: Science Publishers Inc., 2000. pp. 29–250.
- BUSBY, S.; KOLB, A. The CAP modulon. *In*: Lin, E.C.C.; Lynch, A.S. (eds.). **Regulation of gene expression in *Escherichia coli***. Austin: R.G. Landes Co., 1996.
- CALL, D.R.; CHANDLER, D.P.; BROCKMAN, F. Fabrication of DNA microarrays using unmodified oligonucleotide probes. **BioTechniques**, v. 30, p. 368–372, 2001.
- CALVO, J.M.; MATTHEWS, R.G. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 58, p. 466–490, 1994.

- CANNON, W.V.; GALLEGOS, M.T.; BUCK, M. Isomerization of a binary sigma-promoter DNA complex by transcription activators. **Nat. Struct. Biol.**, v. 7, p. 594–601, 2000.
- CAREY, J. Gel retardation at low pH resolves *trp* repressor-DNA complexes for quantitative study **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 975–979, 1988.
- CLAVERIE-MARTIN, F.; MAGASANIK, B. Role of integration host factor in the regulation of the *glnHp2* promoter of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 1631–1635, 1991.
- COCKING, E.C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant Soil**, v. 252, p. 169–175, 2003.
- CONWAY, G. **The doubly green revolution: food for all in the twenty-first century**. Ithaca: Cornell University Press, 1999.
- COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 21, p. 1–18, 1995.
- COUTTS, G.; THOMAS, G.; BLAKEY, D.; MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **EMBO J.**, v. 21, p. 536–545, 2002.
- COWING, D.W.; BARDWELL, J.C.A.; CRAIG, E.A.; WOOLFORD, C.; HENDRIX, R.W.; GROSS, C.A. Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock promoters. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 2679–2683, 1985.
- COX, W.G.; SINGER, V.L. Fluorescent DNA hybridization probe preparation using amine modification and reactive dye coupling. **BioTechniques**, v. 36, p. 114–122, 2004.
- CRAIG, J.E.; ZHANG, Y.; GALLAGHER, M.P. Cloning of the *nupC* gene of *Escherichia coli* encoding a nucleoside transport system, and identification of an adjacent insertion element, IS 186. **Mol. Microbiol.**, v. 11, p. 1159–1168, 1994.
- CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 2375–2379, 2001.
- DA RE, S.; SCHUMACHER, J.; ROUSSEAU, P.; FOURMENT, J.; EBEL, C.; KAHN, D. Phosphorylation-induced dimerization of the FixJ receiver domain. **Mol. Microbiol.**, v. 34, p. 504–511, 1999.
- DARTIGALONGUE, C.; MISSIAKAS, D.; RAINA, S. Characterization of the *Escherichia coli* σ^E regulon. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 20866–20875, 2001.

- DAVALOS, M.; FOURMENT, J.; LUCAS, A.; BERGÈS, H.; KAHN, D. Nitrogen regulation in *Sinorhizobium meliloti* probed with whole genome arrays. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 241, p. 33–40, 2004.
- DENNIS, J.J.; ZYLSTRA, G.J. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of Gram-negative bacterial genomes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 2710–2715, 1998.
- DETSCH, C.; STULKE, J. Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. **Microbiology**, v. 149, p. 3289–3297, 2003.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621–631, 2004.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; THYS, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wildtype and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant Soil**, v. 212, p. 155–164, 1999.
- DOMBRECHT, B.; TESHAY, M.Z.; VERRETH, C.; HEUSDENS, C.; NÁPOLES, M.C.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. The *Rhizobium etli* gene *iscN* is highly expressed in bacteroids and required for nitrogen fixation. **Mol. Genet. Genomics**, v. 267, p. 820–828, 2002.
- DREPPER, T.; GROß, S.; YAKUNIN, A.F.; HALLENBECK, P.C.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiology**, v. 149, p. 2203–2212, 2003.
- DURMOWICZ, M.C.; MAIER, R.J. The FixK2 protein is involved in regulation of symbiotic hydrogenase expression in *Bradyrhizobium japonicum*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 3253–3256, 1998.
- DUSHA, I.; AUSTIN, S.; DIXON, R. The upstream region of the *nodD3* gene of *Sinorhizobium meliloti* carries enhancer sequences for the transcriptional activator NtrC. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 491–499, 1999.
- EDDY, S.R. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. **Nat. Rev. Genet.**, v. 2, p. 919–929, 2001.
- EHMANN, A. The van Urk-Salkowski reagent – a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. **J. Chromatogr.**, v. 132, p. 267–276, 1977.
- EISEN, M.B.; BROWN, P.O. DNA arrays for analysis of gene expression. **Meth. Enzymol.**, vol. 303, p. 179–205, 1999.
- ELBING, K.L.; BRENT, R. *Escherichia coli*, plasmids and bacteriophages. In: AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (eds.). **Short protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1992. p. 1–5.

- ESPIN, G.; ALVAREZ-MORALES, A.; CANNON, F.; DIXON, R.; MERRICK, M. Cloning of the *glnA*, *ntrB* and *ntrC* genes of *Klebsiella pneumoniae* and studies of their role in regulation of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster. **Mol. Gen. Genet.**, v. 186, p. 518–524, 1982.
- ESTREM, S.T.; GAAL, T.; ROSS, W.; GOURSE, R.L. Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 9761–9766, 1998.
- FENG, J.; GOSS, T.J.; BENDER, R.A.; NINFA, A.J. Activation of transcription initiation from the *nac* promoter of *Klebsiella aerogenes*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 5523–5534, 1995.
- FERRIERES, L.; KAHN, D. Two distinct classes of FixJ binding sites defined by in vitro selection. **FEBS Lett.**, v. 517, p. 185–189, 2002.
- FERRO-LUZZI AMES, G.; NIKAIDO, K. Nitrogen regulation in *Salmonella typhimurium*: identification of an *ntrC* protein-binding site and definition of a consensus binding sequence. **EMBO J.**, v. 4, p. 539–547, 1985.
- FINKEL, S.E.; JOHNSON, R.C. The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 3257–3265, 1992.
- FOUSSARD, M.; GARNERONE, A.M.; NI, F.; SOUPÈNE, E.; BOISTARD, P.; BATUT, J. Negative autoregulation of the *Rhizobium meliloti fixK* gene is indirect and requires a newly identified regulator, FixT. **Mol. Microbiol.**, v. 25, p. 27–37, 1997.
- FRALEY, C.D.; KIM, J.H.; McCANN, M.P.; MATIN, A. The *Escherichia coli* starvation gene *cstC* is involved in amino acid catabolism. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 4287–4290, 1998.
- FU, H.; BURRIS, R.H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 3168–3175, 1989.
- GALAS, D.J.; SCHMITZ, A. DNAase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. **Nucleic Acids Res.**, v. 5, p. 3157–3170, 1978.
- GALIBERT, F.; FINAN, T.M.; LONG, S.R.; PUHLER, A.; ABOLA, P.; AMPE, F.; BARLOY-HUBLER, F.; BARNETT, M.J.; BECKER, A.; BOISTARD, P.; BOTHE, G.; BOUTRY, M.; BOWSER, L.; BUHRMESTER, J.; CADIEU, E.; CAPELA, D.; CHAIN, P.; COWIE, A.; DAVIS, R.W.; DREANO, S.; FEDERSPIEL, N.A.; FISHER, R.F.; GLOUX, S.; GODRIE, T.; GOFFEAU, A.; GOLDING, B.; GOUZY, J.; GURJAL, M.; HERNANDEZ-LUCAS, I.; HONG, A.; HUIZAR, L.; HYMAN, R.W.; JONES, T.; KAHN, D.; KAHN, M.L.; KALMAN, S.; KEATING, D.H.; KISS, E.; KOMP, C.; LELAURE, V.; MASUY, D.; PALM, C.; PECK, M.C.; POHL, T.M.; PORTETELLE, D.; PURNELLE, B.; RAMSPERGER, U.; SURZYCKI, R.; THEBAULT, P.; VANDENBOL, M.; VORHOLTER, F.J.; WEIDNER, S.; WELLS, D.H.; WONG, K.; YEH, K.C.; BATUT, J. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Science**, v. 293, p. 668–672, 2001.

- GARNERONE, A.M.; CABANES, D.; FOUSSARD, M.; BOISTARD, P.; BATUT, J. Inhibition of the FixL sensor kinase by the FixT protein in *Sinorhizobium meliloti*. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 32500–32506, 1999.
- GILLES-GONZALEZ, M.A.; DITTA, G.S.; HELINSKI, D.R. A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. **Nature**, v. 350, p. 170–172, 1991.
- GOPALASWAMY, G.; KANNAIYAN, S.; O'CALLAGHAN, K.J.; DAVEY, M.R.; COCKING, E.C. The xylem of rice (*Oryza sativa*) is colonized by *Azorhizobium caulinodans*. **Proc. R. Soc. London B**, v. 267, p. 103–107, 2000.
- 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.
- GROSS, C.A.; LONETTO, M.; LOSICK, R. Sigma factors. In: YAMAMOTO, K.; McKNIGHT, S. (eds.). **Transcriptional Regulation**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. p. 129–176.
- GUBLER, M.; HENNECKE, H. *fixA*, *B* and *C* genes are essential for symbiotic and free-living, microaerobic nitrogen fixation. **FEBS Lett.**, v. 3637, p. 186–192, 1986.
- GUO, Y.; LEW, C.M.; GRALLA, J.D. Promoter opening by σ^{54} and σ^{70} RNA polymerases: σ factor-directed alterations in the mechanism and tightness of control. **Genes Dev.**, v. 14, p. 2242–2255, 2000.
- GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; REDDY, P.M.; LADHA, J.K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytol.**, v. 154, p. 131–145, 2002.
- HALBLEIB, C.M.; ZHANG, Y.; LUDDEN, P.W. Regulation of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase by a redox-dependent conformational change of nitrogenase Fe protein. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 3493–3500, 2000.
- HARRINGTON, C.A.; ROSENOW, C.; RETIEF, J. Monitoring gene expression using DNA microarrays. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 3, p. 285–291, 2000.
- HE, B.; SHIAU, A.; CHOI, K.Y.; ZALKIN, H.; SMITH, J.M. Genes of the *Escherichia coli pur* regulon are negatively controlled by a repressor-operator interaction. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 4555–4562, 1990.
- HE, L.; SOUPENE, E.; NINFA, A.; KUSTU, S. Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting conditions. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 6661–6667, 1998.

- HEGDE, P.; QI, R.; ABERNATHY, K.; GAY, C.; DHARAP, S.; GASPARD, R.; HUGHES, J.E.; SNESRUD, E.; LEE N.; QUACKENBUSH, J. A concise guide to cDNA microarray analysis. **BioTechniques**, v. 29, p. 548–562, 2000.
- HELMANN, J.D.; CHAMBERLIN, M.J. DNA sequence analysis suggests that expression of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is controlled by an alternative σ factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 6422–6424, 1987.
- HENGEN, P.N.; BARTRAM, S.L.; STEWART, L.E.; SCHNEIDER, T.D. Information analysis of Fis binding sites. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 4994–5002, 1997.
- HENGGE-ARONIS, R. Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter σ^S -selective? **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 5, p. 591–595, 2002.
- HILL, S.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; DIXON, R. *Azotobacter vinelandii* NifL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 2143–2148, 1996.
- HOCH, J.A.; SILHAVY, T.J. **Two-component signal transduction**. Washington: ASM Press, 1995.
- HUERGO, L.F.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Regulation of *glnB* gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 223, p. 33–40, 2003.
- HUGHES, T.R.; MAO, M.; JONES, A.R.; BURCHARD, J.; MARTON, M.J.; SHANNON, K.W.; LEFKOWITZ, S.M.; ZIMAN, M.; SCHELTER, J.M.; MEYER, M.R.; KOBAYASHI, S.; DAVIS, C.; DAI, H.; HE, Y.D.; STEPHANIANTS, S.B.; CAVET, G.; WALKER, W.L.; WEST, A.; COFFEY, E.; SHOEMAKER, D.D.; STOUGHTON, R.; BLANCHARD, A.P.; FRIEND, S.H.; LINSLEY, P.S. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. **Nat. Biotechnol.**, v. 19, p. 342–347, 2001.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; MONTAGU, M. van; KELLENBERG, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 1913–1923, 1994.
- HUTCHINGS, M.I.; DRABBLE, W.T. Regulation of the divergent *guaBA* and *xseA* promoters of *Escherichia coli* by the cyclic AMP receptor protein. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 187, p. 115–122, 2000.
- IBANEZ-RUIZ, M.; ROBBE-SAULE, V.; HERMANT, D.; LABRUDE, S.; NOREL, F. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 5749–5756, 2000.
- IKEDA, T.P.; SHAUGER, A.E.; KUSTU, S. *Salmonella typhimurium* apparently perceives external nitrogen limitation as internal glutamine limitation. **J. Mol. Biol.**, v. 259, p. 589–607, 1996.

- ISHIDA, M.L.; ASSUMPÇÃO, M.C.; MACHADO, H.B.; BENELLI, E.M.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. 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.
- ISHIKAWA, J.; HOTTA, K. FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G + C content. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 174, p. 251–253, 1999.
- IWANICKA-NOWICKA, R.; HRYNIEWICZ, M.M. A new gene, *cbl*, encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators belongs to *Escherichia coli* *cys* regulon. **Gene**, v. 166, p. 11–17, 1995.
- JACK, R.; DE ZAMAROCZY, M.; MERRICK, M. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 1156–1162, 1999.
- JACOBS, M.A.; ALWOOD, A.; THAIPISUTTIKUL, I.; SPENCER, D.; HAUGEN, E.; ERNST, S.; WILL, O.; KAUL, R.; RAYMOND, C.; LEVY, R.; CHUN-RONG, L.; GUENTHNER, D.; BOVEE, D.; OLSON, M.V.; MANOIL, C. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 14339–14344, 2003.
- JAIN, V.; KUMAR, M.; CHATTERJI, D. ppGpp: stringent response and survival. **J. Microbiol.**, v. 44, p. 1–10, 2006.
- JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associated symbiosis. **Field Crops Res.**, v. 65, p. 197–209, 2000.
- JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 17, p. 77–119, 1997.
- JAMES, E.K.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDINI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **J. Exp. Bot.**, v. 45, p. 757–766, 1994.
- JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum* an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor*. **J. Exp. Bot.**, v. 48, p. 785–797, 1997.
- JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W.L.; REDDY, P.M.; IANNETTA, P.P.M.; OLIVARES, F.L.; LADHA, J.K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Mol. Plant Microbe Inter.**, v. 15, p. 894–906, 2002.
- JAVELLE, A.; MERRICK, M. Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. **Biochem. Soc. Transact.**, v. 33, p. 170–172, 2005.

- JAVELLE, A.; SEVERI, E.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium sensing in *E. coli*: the role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 8530–8538, 2003.
- JAVELLE, A.; SEVERI, E.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium sensing in *Escherichia coli*: role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 8530–8538, 2004.
- JIANG, P.; NINFA, A.J. Regulation of the autophosphorylation of *Escherichia coli* NRII by the PII signal transduction protein. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 1906–1911, 1999.
- KAGUNI, J.M. *Escherichia coli* DnaA protein: the replication initiator. **Mol. Cells**, v. 7, p. 145–157, 1997.
- KAHANE, S.; LEVITZ, R.; HALPERN, Y.S. Specificity and regulation of γ -aminobutyrate transport in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 135, p. 295–299, 1978.
- KAMINSKI, P.A.; NOREL, F.; DESNOUES, N.; KUSH, A.; SALZANO, G.; ELMERICH, C. Characterization of the *fixABC* region of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 and identification of a new nitrogen fixation gene. **Mol. Gen. Genet.**, v. 214, p. 496–502, 1988.
- KANE, M.D.; JATKOE, T.A.; STUMPF, C.R.; LU, J.; THOMAS, J.D.; MADORE, S.J. Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 4552–4557, 2000.
- KANEHISA, M.; GOTO, S.; HATTORI, M.; AOKI-KINOSHITA, K.F.; ITOH, M.; KAWASHIMA, S.; KATAYAMA, T.; ARAKI, M.; HIRAKAWA, M. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, p. D354–D357, 2006.
- KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; ASAMIZU, E.; KATO, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; ISHIKAWA, A.; KAWASHIMA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KIYOKAWA, C.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MOCHIZUKI, Y.; NAKAYAMA, S.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKEUCHI, C.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA Res.**, v. 7, p. 331–338, 2000.
- KATUPITIYA, S.; MILLET, J.; VESK, M.; VICCARS, L.; ZEMAN, A.; LIDONG, Z.; ELMERICH, C.; KENNEDY, I.R. A mutant of *Azospirillum brasilense* Sp7 impaired in flocculation with a modified colonization pattern and superior nitrogen fixation in association with wheat. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 1987–1995, 1995.
- KEENER, J.; NOMURA, M. Regulation of ribosome synthesis. In: Neidhardt, F.C. (ed.). *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Washington: American Society for Microbiology, 1996.

- KERN, D.; VOLDMAN, B.F.; LUGINBUHL, P.; NOHAILE, M.J.; KUSTU, S.; WEMMER, D.E. Structure of a transiently phosphorylated switch in bacterial signal transduction. **Nature**, v. 402, p. 894–898, 1999.
- KLASSEN, G. **Análise genética e funcional dos genes *nifENXorf1orf2*, *nifQmodABCfixXC* de *Herbaspirillum seropedicae***. Tese de doutorado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2000.
- KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.**, 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.
- KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; RIGO, L.U. Nitrogenase activity of *Herbaspirillum seropedicae* grown under low iron levels requires the products of *nifXorf1* genes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 224, p. 255–259, 2003.
- KLOPPROGGE, K.; GRABBE, R.; HOPPERT, M.; SCHMITZ, R.A. Membrane association of *Klebsiella pneumoniae* NifL is affected by molecular oxygen and combined nitrogen. **Arch. Microbiol.**, v. 177, p. 223–234, 2002.
- KOBAYASHI, M.; SUZUKI, T.; FUJITA, T.; MASUDA, M.; SHIMIZU, S. Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 714–718, 1995.
- KOGA, J.; ADACHI, T.; HIKEDA, H. Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 226, p. 10–16, 1992.
- KOKOTEK, W.; LOTZ, W. Construction of a *lacZ*-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. **Gene**, v. 84, p. 467–471, 1989.
- KUSTU, S.G.; McFARLAND, N.C.; HUI, S.P.; ESMON, B.; AMES, G.F. Nitrogen control of *Salmonella typhimurium*: co-regulation of synthesis of glutamine synthetase and amino acid transport systems. **J. Bacteriol.**, v. 138, p. 218–234, 1979.
- KUSTU, S.; NORTH, A.K.; WEISS, D.S. Prokaryotic transcriptional enhancers and enhancer-binding proteins. **Trends Biochem. Sci.**, v. 16, p. 397–402, 1991.
- KUTSCHE, M.; LEIMKÜHLER, S.; ANGERMÜLLER, S.; KLIPP, W. Promoters controlling expression of the alternative nitrogenase and the molybdenum uptake system in *Rhodobacter capsulatus* are activated by NtrC, independent of σ^{54} , and repressed by molybdenum. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 2010–2017, 1996.

- LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 298–300, 2000.
- LAWSON, D.M.; SMITH, B.E. *In*: SIGEL, A.; SIGEL, H. (eds). **Metal ions in biological systems vol. 39**. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 75–119.
- LESSARD, I.A.; WALSH, C.T. VanX, a bacterial D-alanyl-D-alanine dipeptidase: resistance, immunity, or survival function? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 11028–11032, 1999.
- LESSARD, I.A.; PRATT, S.; McCAFFERTY, D.G.; BUSSIÈRE, D.E.; HUTCHINS, C.; WANNER, B.L.; KATZ, L.; WALSH, C.T. Homologs of the vancomycin resistance D-Ala-D-Ala dipeptidase VanX in *Streptomyces toyocaensis*, *Escherichia coli* and *Synechocystis*: attributes of catalytic efficiency, stereoselectivity and regulation with implications for function. **Chem. Biol.**, v. 5, p. 489–504, 1998.
- LETUNIC, I.; COPLEY, R.R.; SCHMIDT, S.; CICCARELLI, F.D.; DOERKS, T.; SCHULTZ, J.; PONTING, C.P.; BORK, P. SMART 4.0: towards genomic data integration. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. D142–D144, 2004.
- LIPSHUTZ, R.J.; FODOR, S.P.; GINGERAS, T.R.; LOCKHART, D.J. High density synthetic oligonucleotide arrays. **Nat. Genet.**, v. 21, p. 20–24, 1999.
- LISSER, S.; MARGALIT, H. Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, p. 1507–1516, 1993.
- LITTLE, R.; COLOMBO, V.; LEECH, A.; DIXON, R. Direct interaction of the NifL regulatory protein with the GlnK signal transducer enables the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA regulatory system to respond to conditions replete for nitrogen. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 15472–15481, 2002.
- LOCKHART, D.J.; DONG, H.; BYRNE, M.C.; FOLLETTIE, M.T.; GALLO, M.V.; CHEE, M.S.; MITTMANN, M.; WANG, C.; KOBAYASHI, M.; HORTON, H.; BROWN, E.L. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. **Nat. Biotechnol.**, v. 14, p. 1675–1680, 1996.
- LU, C.D.; ABDELAL, A.T. Role of ArgR in activation of the *ast* operon, encoding enzymes of the arginine succinyltransferase pathway in *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 1934–1938, 1999.
- MACHADO, I.M.P.; YATES, M.G.; MACHADO, H.B.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 1599–1602, 1996.

- MAHESWARAN, M.; FORCHHAMMER, K. Carbon-source-dependent nitrogen regulation in *Escherichia coli* is mediated through glutamine-dependent GlnB signalling. **Microbiology**, v. 149, p. 2163–2172, 2003.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- MAO, L.; MACKENZIE, C.; ROH, J.H.; ERASO, J.M.; KAPLAN, S.; RESAT, H. Combining microarray and genomic data to predict DNA binding motifs. **Microbiology**, v. 151, p. 3197–3213, 2005.
- MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; SHEARER, N.; JOHNSON, P.; DIXON, R. The NifL-NifA system: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 601–610, 2004a.
- MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; DIXON, R. Role of the amino-terminal GAF domain of the NifA activator in controlling the response to the antiactivator protein NifL. **Mol. Microbiol.**, v. 52, p. 1731–1744, 2004b.
- MASEPOHL, B.; KAISER, B.; ISAKOVIC, N.; RICHARD, C.L.; KRANZ, R.G.; KLIPP, W. Urea utilization in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* is regulated by the transcriptional activator NtrC. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 637–643, 2001.
- MASEPOHL, B.; DREPPER, T.; PASCHEN, A.; GROSS, S.; PAWLOWSKI, A.; RAABE, K.; RIEDEL, K.U.; KLIPP, W. Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 4, p. 243–248, 2002.
- MENG, L.M.; KILSTRUP, M.; NYGAARD, P. Autoregulation of PurR repressor synthesis and involvement of *purR* in the regulation of *purB*, *purC*, *purL*, *purMN* and *guaBA* expression in *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem.**, v. 187, p. 373–379, 1990.
- MERRICK, M.J.; EDWARDS, R.A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p. 604–622, 1995.
- METTKER, I.; FIELDLER, U.; WEISS, V. Mechanism of activation of a response regulator: interaction of NtrC-P dimers induces ATPase activity. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 5056–5061, 1995.
- METZER, E.; HALPERN, Y.S. In vivo cloning and characterization of the *gabCTDP* gene cluster of *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 3250–3256, 1990.
- MICHEL-REYDELLET, N.; KAMINSKI, P.A. *Azorhizobium caulinodans* PII and GlnK proteins control nitrogen fixation and ammonia assimilation. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 2655–2658, 1999.
- MILLER, J.H. **Experiments in molecular genetics**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.

- MILLER, J.H. **A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria.** Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. p.456.
- MOONEY, R.A.; ARTSIMOVITCH, I.; LANDICK, R. Information processing by RNA polymerase: recognition of regulatory signals during RNA chain elongation. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 3265–3275, 1998.
- MORETT, E.; SEGOVIA, L. The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 6067–6074, 1993.
- MUSE, W.B.; BENDER, R.A. The *nac* (nitrogen assimilation control) gene from *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 1166–1173, 1998.
- NIEGEMANN, E.; SCHULZ, A.; BARTSCH, K. Molecular organization of the *Escherichia coli* *gab* cluster: nucleotide sequence of the structural genes *gabD* and *gabP* and expression of the GABA permease gene. **Arch. Microbiol.**, v. 160, p. 454–460, 1993.
- NINFA, A.J.; ATKINSON, M.R. PII signal transduction proteins. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 172–179, 2000.
- NINFA, A.J.; JIANG, P. PII signal transduction proteins: sensors of α -ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 168–173, 2005.
- NOHNO, T.; SAITO, T. Two transcriptional start sites found in the promoter region of *Escherichia coli* glutamine permease operon, *glnHPQ*. **Nucleic Acids Res.**, v. 15, p. 2777, 1987.
- NOINDORF, L.; REGO, F.G.M.; BAURA, V.A.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.**, v. 185, p. 55–62, 2006.
- NORDHOFF, E.; KROGSDAM, A.M.; JORGENSEN, H.F.; KALLIPOLITIS, B.H.; CLARK, B.F.; ROEPSTORFF, P.; KRISTIANSEN, K. Rapid identification of DNA-binding proteins by mass spectrometry. **Nat. Biotechnol.**, v. 17, p. 884–888, 1999.
- O’KANE, Jr., S.L.; AL-SHEHBAZ, I.H. A synopsis of *Arabidopsis* (Brassicaceae). **Novon**, v. 7, p. 323–327, 1997.
- O’MAHONY, M. **Sensory evaluation of food – statistical methods and procedures.** Boca Raton: CRC Press, 1986. p. 111–134.
- OBERRHÄNSLI, T.; DÉFAGO, G.; HAAS, D. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. **J. Gen. Microbiol.**, v. 137, p. 2273–2279, 1991.

- OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculum for agriculture. **Trends Biotechnol.**, v. 3, p. 223–228, 1985.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of gramineae. **Biol. Fertil. Soils**, v. 21, p. 197–200, 1996.
- OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugar cane by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytol.**, v. 135, p. 723–737, 1997.
- PARRO, V.; MORENO-PAZ, M. Gene function analysis in environmental isolates: the *nif* regulon of the strict iron oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 7883–7888, 2003.
- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Can. J. Microbiol.**, v. 42, p. 207–220, 1996.
- PAULSEN, I.T.; SLIWINSKI, M.K.; SAIER, JR., M.H. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. **J. Mol. Biol.**, v. 277, p. 573–592, 1998.
- PAWLOWSKI, K.; KLOSSE, U.; DE BRUIJN, F.J. Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. **Mol. Gen. Genet.**, v. 231, p. 124–138, 1991.
- PAWLOWSKI, A.; RIEDEL, K.U.; KLIPP, W.; DREISKEMPER, P.; GROß, S.; BIERHOFF, H.; DREPPER, T.; MASEPOHL, B. Yeast two-hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 5240–5247, 2003.
- PEDRAZA, R.O.; RAMÍREZ-MATA, A.; XIQUI, M.L.; BACA, B.E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 233, p. 15–21, 2004.
- PEDROSA, F.O.; TEIXEIRA, K.R.S.; MACHADO, I.M.P.; STEFFENS, M.B.R.; KLASSEN, G.; BENELLI, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, R.U.; ISHIDA, M.L.; YATES, M.G.; SOUZA, E.M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, p. 843–846, 1997.

- PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; BENELLI, E.M.; MACHADO, I.M.P.; STEFFENS, M.B.R.; KLASSEN, G.; MACHADO, H.B.; RIGO, L.U.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R.A.; REGO, F.G.M.; CHUBATSU, L.S.; BUCK, M.; MOORE, M.; HARPER M.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation in *Herbaspirillum seropedicae*. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E. (eds.). **Biological nitrogen fixation for the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 129–130.
- PEDROSA, F.O.; BENELLI, E.M.; YATES, M.G.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R.A.; KLASSEN, G.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; CHUBATSU, L.S.; RIGO, L.U. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Biotechnol.**, v. 91, p. 189–195, 2001.
- PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 180–201, 2000.
- PERSUHN, D.C.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.; YATES, M.G.; RIGO, L.U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 192, p. 217–221, 2000.
- PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil**, v. 137, p. 61–65, 1991.
- PIOSZAK, A.A.; NINFA, A.J. Genetic and biochemical analysis of the PII-dependant phosphatase activity of *Escherichia coli* NRII. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 1299–1315, 2003.
- PIOSZAK, A.A.; NINFA, A.J. Mutations altering the N-terminal receiver domain of NRI (NtrC) that prevent dephosphorylation by the NRII::PII complex in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 5730–5740, 2004.
- PISTOCCHI, R.; KASHIWAGI, K.; MIYAMOTO, S.; NUKUI, E.; SADAKATA, Y.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI, K. Characteristics of the operon for a putrescine transport system that maps at 19 minutes on the *Escherichia coli* chromosome. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 146–152, 1993.
- POMPOSIELLO, P.J.; JANES, B.K.; BENDER, R.A. Two roles for the DNA recognition site of the *Klebsiella aerogenes* nitrogen assimilation control protein. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 578–585, 1998.
- POPHAM, D.L.; SZETO, D.; KEENER, J.; KUSTU, S. Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. **Science**, v. 243, p. 629–635, 1989.
- PRATT, L.A.; HSING, W.; GIBSON, K.E.; SILHAVY, T.J. From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 911–917, 1996.

- PUHLER, A.; AGUILAR, M.O.; HYNES, P.; KLIPP, W.; PRIEFER, U.; SIMON, R.; WEBER, G. Advances in the genetics of free-living and symbiotic nitrogen fixation bacteria. *In: VEEGER, C.; NEWTON, W.E. (eds.). Advances in nitrogen fixation research.* Haia: Nijhoff-Junk/Pudoc, 1984. p. 609–619.
- QI, F.; TURNBOUGH, JR, C.L. Regulation of *codBA* operon expression in *Escherichia coli* by UTP-dependent reiterative transcription and UTP-sensitive transcriptional start site switching. **J. Mol. Biol.**, v. 254, p. 552–565, 1995.
- QUISPEL, A. A critical evaluation of the prospects for nitrogen fixation with non-legumes. **Plant Soil**, v. 137, p. 1–11, 1991.
- REDDY, P.M.; LADHA, J.K.; SO, R.B.; HERNANDEZ, R.J.; RAMOS, M.C.; ANGELES, O.R.; DAZZO, F.B.; DE BRUIJN, F.J. Rhizobial communication with rice roots: induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. **Plant Soil**, v. 194, p. 81–98, 1997.
- REES, D.C.; HOWARD, J.B. Nitrogenase: standing at the crossroads. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 4, p. 559–566, 2000.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 17, p. 29–54, 1998.
- REITZER, L.J.; MAGASANIK, B. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, 1979–1983, 1985.
- REITZER, L.J.; SCHNEIDER, B.L. Metabolic context and possible physiological themes of σ^{54} -dependent genes in *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 422–444, 2001.
- ROLFE, B.G.; *ET AL.* Round table: agriculture 2020 8 billion people. *In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E. (eds.). Biological nitrogen fixation for the 21st century.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 685–692.
- RONCATO-MACCARI, L.D.B. **Colonização de gramíneas por *Herbaspirillum seropedicae* e expressão de genes *nif* in planta.** Tese de doutorado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2003.
- RONCATO-MACCARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 45, p. 39–47, 2003.
- ROSS, W.; THOMPSON, J.F.; NEWLANDS, J.T.; GOURSE, R.L. *E. coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription in vitro and in vivo. **EMBO J.**, v. 9, p. 3733–3742, 1990.

- ROSSBACH, S.; KUKUK, M.L.; WILSON, T.L.; FENG, S.F.; PEARSON, M.M.; FISHER, M.A. Cadmium-regulated gene fusions in *Pseudomonas fluorescens*. **Environ. Microbiol.**, v. 2, p. 373–382, 2000.
- RÜBERG, S.; TIAN, Z.X.; KROL, E.; LINKE, B.; MEYER, F.; WANG, Y.; PÜHLER, A.; WEIDNER, S.; BECKER, A. Construction and validation of a DNA microarray for genome-wide expression profiling in *Sinorhizobium meliloti*. **J. Biotechnol.**, v. 106, p. 255–268, 2003.
- RUVKUN, G.B.; SUNDARESAN, V.; AUSUBEL, F.M. Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. **Cell**, v. 29, p. 551–559, 1982.
- SCHAEFER, C.; MESSER, W. DnaA protein/DNA interaction: modulation of the recognition sequence. **Mol. Gen. Genet.**, v. 226, p. 34–40, 1991.
- SHELLHORN, H.E.; AUDIA, J.P.; WIE, L.I.C.; CHANG, L. Identification of conserved, RpoS-dependent stationary-phase genes of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 6283–6291, 1998.
- SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v. 270, p. 467–470, 1995.
- SCHMITZ, G.; DÜRRE, P.; MULLENBACH, G.; AMES, G.F. Nitrogen regulation of transport operons: analysis of promoters *argTr* and *dhuA*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 209, p. 403–407, 1987.
- SCHMITZ, G.; NIKAIDO, K.; AMES, G.F. Regulation of a transport operon promoter in *Salmonella typhimurium*: identification of sites essential for nitrogen regulation. **Mol. Gen. Genet.**, v. 215, p. 107–117, 1988.
- SCHNEIDER, B.L.; KIUPAKIS, A.K.; REITZER, L.J. Arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 4278–4286, 1998.
- 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***. Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.
- SCHWAB, S.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PERSUHN, D.C.; STEFFENS, M.B.R.; CHUBATSU, L.S.; PEDROSA, F.O.; RIGO, L.U. The *glnAntrBC* operon of *Herbaspirillum seropedicae* is transcribed by two oppositely regulated promoters upstream of *glnA*. **Can. J. Microbiol.**, aceito para publicação.

- SCIOTTI, M.A.; CHANFON, A.; HENNECKE, H.; FISCHER, H.M. Disparate oxygen responsiveness of two regulatory cascades that control expression of symbiotic genes in *Bradyrhizobium japonicum*. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 5639–5642, 2003.
- SEIDMAN, C.E.; STRUHL, K.; SHEEN, J. *Escherichia coli*, plasmids and bacteriophages. In: AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (eds.). **Short protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1992. p. 1–30.
- SHINGLER, V. Signal sensing by σ^{54} -dependent regulators: derepression as a control mechanism. **Mol. Microbiol.**, v. 19, p. 409–416, 1996.
- SKOULOUBRIS, S.; LABIGNE, A.; DE REUSE, H. The AmiE aliphatic amidase and AmiF formamidase of *Helicobacter pylori*: natural evolution of two enzyme paralogues. **Mol. Microbiol.**, v. 40, p. 596–609, 2001.
- SMITH, M.W.; PAYNE, J.W. Expression of periplasmic binding proteins for peptide transport is subject to negative regulation by phosphate limitation in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 79, p. 183–190, 1992.
- SOUPENE, E.; HE, L.; YAN, D.; KUSTU, S. Ammonia acquisition in enteric bacteria: physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 7030–7034, 1998.
- SOUTHERN, E.; MIR, K.; SHCHEPINOV, M. Molecular interactions on microarrays. **Nat. Genet.**, v. 21, p. 5–9, 1999.
- SOUZA, E.M. **Clonagem, caracterização e seqüenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae***. Tese de doutorado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1990.
- SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.**, 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 gene 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 *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 681–684, 1999.
- SPRENT, J.I.; DE FARIA, S.M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. In: SKINNER, F.A.; BODDEY, R.M.; FENDRIK, I. (eds.). **Nitrogen fixation with nonlegumes**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1987. p. 3–11.

- STEARNS, R.L.; MARTINSKY, T.; SCHENA, M. Trends in microarray analysis. **Nat. Med.**, v. 9, p. 140–145, 2003.
- STROSSER, J.; LUDKE, A.; SCHAFFER, S.; KRAMER, R.; BURKOVSKI, A. Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. **Mol. Microbiol.**, v. 54, p. 132–147, 2004.
- TANG, Y.W.; BONNER, J. The enzymatic inactivation of indole-acetic acid. **Arch. Biochem.**, v. 13, p. 11–25, 1947.
- TAYLOR, B.L.; ZHULIN, I.B. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, p. 479–506, 1999.
- TESFA-SELASE, F.; DRABBLE, W.T. Regulation of the *gua* operon of *Escherichia coli* by the DnaA protein. **Mol. Gen. Genet.**, v. 231, p. 256–264, 1992.
- TESFA-SELASE, F.; DRABBLE, W.T. Specific binding of DnaA protein to a DnaA box in the *guaB* gene of *Escherichia coli* K12. **Eur. J. Biochem.**, v. 241, p. 411–416, 1996.
- THIEFFRY, D.; SALGADO, H.; HUERTA, A.M.; COLLADO-VIDES, J. Prediction of transcriptional regulatory sites in the complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Bioinformatics**, v. 14, p. 391–400, 1998.
- THOMAS, G.H.; MULLINS, J.G.; MERRICK, M. Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. **Mol. Microbiol.**, v. 37, p. 331–344, 2000.
- THOMSON, J.M.; PARKER, J.; PEROU, C.M.; HAMMOND, S.M. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. **Nat. Meth.**, v. 1, p. 1–7, 2004.
- THÖNY, B.; HENNECKE, H. The –24/–12 promoter comes of age. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 5, p. 341–357, 1989.
- TOUKDARIAN, A.; KENNEDY, C. Regulation of nitrogen metabolism in *Azotobacter vinelandii*: isolation of *ntr* and *glnA* genes and construction of *ntr* mutants. **EMBO J.**, v. 5, p. 399–407, 1986.
- TUCKERMAN, J.R.; GONZALEZ, G.; DIOUM, E.M.; GILLES-GONZALEZ, M. A. Ligand and oxidation-state specific regulation of the heme-based oxygen sensor FixL from *Sinorhizobium meliloti*. **Biochemistry**, v. 41, p. 6170–6177, 2002.
- URBANOWSKI, M.L.; STAUFFER, L.T.; STAUFFER, G.V. The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 37, p. 856–868, 2000.
- URETA, A.; ALVAREZ, B.; RAMON, A.; VERA, M.A.; MARTINEZDRETS, G. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. **Plant Soil**, v. 172, p. 271–277, 1995.

- VANDE BROEK, A.; MICHIELS, J.; GOOL, A. VAN; VANDERLEYDEN, J. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 6, p. 592–600, 1993.
- VANDE BROEK, A.; DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; VAN DOMMELEN, A. *Azospirillum*-plant root interactions: signaling and metabolic interactions. In: TRIPLETT, E.W. (ed.) **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process**. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2000. p. 761–777.
- VEGA-HERNÁNDEZ, M.C.; LEÓN-BARRIOS, M.; PÉREZ-GALDONA, R. Indole-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in *Bradyrhizobium*. **Soil Biol. Biochem.**, v. 34, p. 665–668, 2002.
- VERMEIREN, H.; VANDERLEYDEN, J.; HAI, W. Colonization and *nifH* expression on rice roots by *Alcaligenes faecalis* A15. In: MALIK, K.A. et al. (eds.). **Nitrogen fixation with non-legumes**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 287–305.
- VITORINO, J.C.; STEFFENS, M.B.R.; MACHADO, H.B.; YATES, M.G.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Potential roles for the *glnB* and *ntrYX* genes in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 201, p. 199–204, 2001.
- VOLKMAN, B.F.; NOHAILE, M.J.; AMY, N.K.; KUSTU, S.; WEMMER, D.E. 3-dimensional solution structure of the N-terminal receiver domain of NtrC. **Biochemistry**, v. 34, p. 1413–1424, 1995.
- VON WIRÉN, N.; MERRICK, M. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi and plants. **Trends Curr. Genet.**, v. 9, p. 95–120, 2004.
- VOYTAS, D. Preparation and analysis of DNA. In: AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (eds.). **Short protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1992. p. 2–16.
- WANG, H.Y.; MALEK, R.L.; KWITEK, A.E.; GREENE, A.S.; LUU, T.V.; BEHBAHANI, B.; FRANK, B.; QUACKENBUSH, J.; LEE, N.H. Assessing unmodified 70-mer oligonucleotide probe performance on glass-slide microarrays. **Genome Biol.**, v. 4, p. R5.1–R5.13, 2003.
- WASSEM, R.; SOUZA, E.M.; YATES, G.M.; PEDROSA, F.O.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 756–764, 2000.
- WATSON, A.; MAZUMDER, A.; STEWART, M.; BALASUBRAMANIAN, S. Technology for microarray analysis of gene expression. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 9, p. 609–614, 1998.
- WEBER, O.B.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant Soil**, v. 210, p. 103–113, 1999.

- WEBSTER, G.; GOUGH, C.; VASSE, J.; BATCHELOR, C.A.; O'CALLAGHAN, K.J.; KOTHARI, S.L.; DAVEY, M.R.; DÉNARIÉ, J.; COCKING, E.C. Interactions of rhizobia with rice and wheat. **Plant Soil**, v. 194, p. 115–122, 1997.
- WEBSTER, G.; JAIN, V.; DAVEY, M.R.; GOUGH, C.; VASSE, J.; DÉNARIÉ, J.; COCKING, E.C. The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. **Plant Cell Environ.**, v. 21, p. 373–383, 1998.
- WEDEL, A.; WEISS, D.S.; POPHAM, D.; DRÖGE, P.; KUSTU, S. A bacterial enhancer functions to tether a transcriptional activator near a promoter. **Science**, v. 248, p. 486–490, 1990.
- WEISS, D.; BATUT, J.; KLOSE, K.; KEENER, J.; KUSTU, S. The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NtrC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. **Cell**, v. 67, p. 155–167, 1991.
- WEISS, V.; MAGASANIK, B. Phosphorylation of nitrogen regulator I (NR_I) of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 8919–8923, 1988.
- WEISS, V.; CLAVERIE-MARTIN, F.; MAGASANIK, B. Phosphorylation of nitrogen regulator I of *Escherichia coli* induces strong cooperative binding to DNA essential for activation of transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 5088–5092, 1992.
- WYMAN, C.; ROMBEL, I.; NORTH, A. K.; BUSTAMANTE, C.; KUSTU, S. Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. **Science**, v. 275, p. 1658–1661, 1997.
- XU, H.; HOOVER, T.R. Transcriptional regulation at a distance in bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, p. 138–144, 2001.
- XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P.D.; HEESWIJK, W.C. VAN; WETERHOF VASUDEVAN, S.G.; OLLIS, D.L. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **J. Mol. Biol.**, v. 282, p. 149–165, 1998.
- YANG, Y.H.; SPEED, T. Design issues for cDNA microarray experiments. **Nat. Rev. Genet.**, v. 3, p. 579–588, 2002.
- YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; ABD. EL-FATTAH, F.K.; SQUARTINI, A.; CORICH, V.; GIACOMINI, A.; DE BRUIJN, F.; RADEMAKER, J.; MAYA-FLORES, J.; OSTROM, P.; VEGA-HERNANDEZ, M.; HOLLINGSWORTH, R.I.; MARTINEZ-MOLINA, E.; MATEOS, P.; VELAZQUEZ, E.; WOPEREIS, J.; TRIPLETT, E.; UMALI-GARCIA, M.; ANARNA, J.A.; ROLFE, B.G.; LADHA, J.K.; HILL, J.; MUJOO, R.; NG, P.K.; DAZZO, F.B. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Aust. J. Plant Physiol.**, v. 28, p. 845–870, 2001.

- YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *In*: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (eds.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 43–88.
- ZALKIN, H.; NYGAARD, P. Biosynthesis of purine nucleotides. *In*: NEIDHARDT, F.C.; CURTISS III, R.; INGRAHAM, J.L.; LIN, E.C.C.; LOW, K.B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, W.S.; RILEY, M.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H.E. (eds.). ***Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed.** Washington: American Society for Microbiology, 1996. p. 561–579.
- ZHANG, Y.; POHLMANN, E.L.; ROBERTS, G.P. Identification of critical residues in GlnB for its activation of NifA activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 2782–2787, 2004.
- ZHAO, X.; NAMPALLI, S.; SERINO, A.J.; KUMAR, S. Immobilization of oligodeoxyribonucleotides with multiple anchors to microchips. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, p. 955–959, 2001.
- ZIMMER, D.P.; SOUPENE, E.; LEE, H.L.; WENDISCH, V.F.; KHODURSKY, A.B.; PETER, B.J.; BENDER, R.A.; KUSTU, S. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 14674–14679, 2000.

ANEXOS

1 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO INDEXADO

Decision Letter

From: sve@dsmz.de

To: lurigo@ufpr.br

Cc:

Subject: Archives of Microbiology - Manuscript ArchMicr-2006-0203.R2

Body: @@date to be populated upon sending@@

Dear Dr. Rigo,

Thank you for submitting your revised manuscript to Archives of Microbiology. Your manuscript was evaluated by the editor and was accepted for publication as a/an Original Paper in Archives of Microbiology on @@date to be populated upon sending@@.

The copy editor will contact you by e-mail if there are any editorial questions (in approximately 2 weeks), and the publisher will inform you by e-mail when the galley proofs are ready (in approximately 3 to 4 weeks).

If a new genus or species is proposed, the name of the new bacterial taxon must be validated. To do this, send a reprint of the manuscript after it is published to the Editor in Chief of the International Journal of Systematic Bacteriology, along with a letter requesting validation of the name.

We would like to thank you for considering Archives of Microbiology for the publication of your work and hope that you will do so again.

Yours sincerely,
Susanne Verburg
Editorial Assistant
Archives of Microbiology

Date Sent:
22-Nov-2006

2 CARTA DE RECOMENDAÇÃO DO ORIENTADOR ESTRANGEIRO,
REFERENTE AO TRABALHO DE ESTÁGIO DE DOUTORANDO

College of Agriculture and Life Sciences
Department of Plant Sciences
Forbes Building # 36
Room 303

THE UNIVERSITY OF
ARIZONA
TUCSON ARIZONA

P.O. Box 210036
Tucson, AZ 85721-0036
(520) 621-1977
FAX: (520) 621-7186

April 11th, 2006.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
Ministério da Educação - Anexos I e II - 2o Andar
Caixa Postal 365
70359-970 - Brasília, DF

To whom it may concern:

I am delighted to write a report on behalf of the CAPES' grantee Stefan Schwab. He spent nine months in my laboratory as an exchange student to participate in the project "Microarray-based genotyping and QTL mapping in rice". I would have to say Stefan was a thoughtful and independent researcher during his work period in our laboratory. Beyond acquiring skills in microarray technologies, he was able to provide answers to novel biological questions, which will certainly contribute to advance the studies being done by my group.

Concerning his specific achievements, he helped in establishing and standardizing a microarray hybridization protocol for quantitative trait locus (QTL) mapping in rice. This project is of considerable importance relating not simply to its duration time (three years) and amount of funds involved, but also to its potential impact on world agriculture. These points reflect the importance of Stefan's contribution.

As a colleague, Stefan was very much appreciated by the laboratory. He established excellent rapport with all of his fellow students, postdoctoral associates, and staff. His enthusiasm, sense of humor, and easy-going personality made him an excellent colleague.

Stefan Schwab was extremely competent, and undertook his experimental work with care and great responsibility. If you wish to learn any further details about his activities in my laboratory, please do not hesitate to contact me at galbraith@arizona.edu. I would be delighted to have him return to work in my laboratory.

Sincerely,



Dr. David Galbraith
Supervisor
Professor, Department of Plant Sciences
University of Arizona
822D Marley Building
1145 E 4th Street
Tucson, AZ 85721
USA

TABELA 4 – IDENTIDADES MAIS PROVÁVEIS DE 32 GENES DE *Herbaspirillum seropedicae* REGULADOS CONFORME A CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIO NO MEIO

Nome da estirpe mutante (nome alternativo [†])	Número de acesso no GenBank	Seqüência no banco de dados com maior similaridade [‡]	Porcentagem de identidade (aminoácidos idênticos/ aminoácidos totais) [‡]	Identidade da ORF [§]
S1 (N2.13.H08)	DQ073924	GMP sintase (GuaA) de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400 .	95% (71/74)	247.0313
S2 (N1.15.B09)	DQ073925	Transportador do tipo ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, proteína ligadora de ATP, de <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 ; proteína acessória da urease UreD, de <i>Nitrospira</i> sp. NpAV ^{*.#}	65% (99/152) ; 55% (46/83) [*]	192.0039 ; 192.0052 [*]
S3 (N2.01.F12)	DQ073926	Proteína não caracterizada de <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Atroseptica</i> SCRI1043.	70% (170/242)	203.0021
S4 (N3.02.D11)	DQ073927	Proteína hipotética SKA53_03364 de <i>Loktanella vestfoldensis</i> SKA53. [SMART: provável permease transportadora do tipo ABC de bactéria].	53% (83/156)	203.0097
S5 (N2.10.G02)	DQ073928	Xantina desidrogenase, subunidade A ligadora de grupamento ferro-enxofre e FAD, de <i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243.	63% (172/269)	210.0207
S6 (N1.01.F05)	DQ073929	Regulador de transcrição da família AraC, de <i>Rhodoferax ferrireducens</i> DSM 15236.	50% (110/222)	236.0408
S7 (N2.01.D11)	DQ073930	Amidase alifática de <i>Burkholderia</i> sp. 383.	84% (120/142)	248.0442
S8 (N2.11.A10)	DQ073931	Provável proteína formamidase, de <i>Synechococcus</i> sp. JA-3-3Ab.	59% (108/182)	248.0431
S9 (N3.05.G02) [¶]	DQ073932	Permease de amônia (AmtB), de <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134.	74% (220/296)	249.0129
S10 (N3.16.G03) [¶]	DQ073933	Permease de amônia (AmtB), de <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 ; proteína de quimiotaxia receptora de metila, de <i>Ralstonia metallidurans</i> CH34 ^{.*.j}	71% (106/149) ; 93%. (62/66) [*]	249.0129 ; 249.0116 [*]
S11 (N2.09.B01) [¶]	DQ073934	Permease de amônia (AmtB), de <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 ; proteína de quimiotaxia receptora de metila, de <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 ^{.*.j}	71% (107/150) ; 93% (61/65) [*]	249.0129 ; 249.0116 [*]
S12 (N2.17.E07)	DQ073935	Arginase/agmatinase/formiminoglutamato hidrolase, família da arginase, de <i>Rubrivivax gelatinosus</i> PM1. [SMART/Pfam: arginase].	61% (101/165)	249.0360
S13 (N2.11.E04)	DQ073936	Sistema de transporte do tipo ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, componente periplasmático, de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400.	75% (138/183)	249.0392
S14 (N2.20.D01)	DQ073937	Sistema de transporte do tipo ABC não caracterizado, componente permease, de <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134.	75% (197/262)	253.0274
S15 (N2.15.B01)	DQ073938	Sistema de transporte do tipo ABC não caracterizado, componente ATPase, de <i>Ralstonia solanacearum</i> GM11000.	70% (235/333)	253.0303

Continua...

TABELA 4 (CONTINUAÇÃO)

Nome da estirpe mutante (nome alternativo [†])	Número de acesso no GenBank	Sequência no banco de dados com maior similaridade [‡]	Porcentagem de identidade (aminoácidos idênticos/aminoácidos totais) [‡]	Identidade da ORF [§]
S16 (N3.05.D03)	DQ073939	Sistema de transporte do tipo ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, componente ATPase, de <i>Ralstonia metallidurans</i> CH34.	75% (199/262)	253.0322
S17 (N3.18.F02)	DQ073940	Sistema de transporte do tipo ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, componente periplasmático, de <i>Ralstonia metallidurans</i> CH34.	63% (117/185)	253.0329
S18 (N3.07.G11)	DQ073941	Sistema de transporte de aminoácidos do tipo ABC, componente permease, de <i>Rhizobium etli</i> CFN 42.	70% (136/193)	253.0458
S19 (N2.15.E07)	DQ073942	Proteína hipotética RED65_02659 de <i>Oceanobacter</i> sp. RED65. [SMART/Pfam: proteína da família de OmpA].	45% (95/209)	261.0387
S20 (N3.11.F05)	DQ073943	Fator de regulação da transcrição da família de LysR, de <i>Ralstonia solanacearum</i> W551.	74% (99/133)	275.0162
S21 (N2.08.B01)	DQ073944	Proteína da família de HesB/YadR/YfhF de <i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath.	73% (79/107)	275.0568
S22 (N2.14.G02)	DQ073945	Proteína FixB de <i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP.	77% (198/257)	275.0629
S23 (N2.01.H02)	DQ073946	Proteína dinitrogenase redutase (NifH) de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> *.	100% (158/158)*	275.0772*
S24 (N2.20.G01)	DQ073947	Proteína hipotética conservada (codificada pelo grupamento <i>nif</i>) de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .	74% (120/161)	275.0706
S25 (N3.05.E01)	DQ073948	Provável proteína quinase de serina, de <i>Burkholderia dolosa</i> AUO158.	88% (115/130)	283.0075
S26 (N2.04.G06) [¶]	DQ073949	Proteína do tipo SpoVR de <i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4.	79% (265/333)	283.0101
S27 (N2.16.G01) [¶]	DQ073950	Proteína do tipo SpoVR de <i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4.	79% (264/333)	283.0101
S28 (N2.10.E09) [¶]	DQ073951	Proteína do tipo SpoVR de <i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4.	79% (260/329)	283.0101
S29 (N3.19.G06) [¶]	DQ073952	Provável proteína transdutora de sinal contendo um domínio de membrana, um domínio EAL e um GGDEF, <i>Magnetococcus</i> sp. MC-1. [SMART/Pfam: domínio PAS (domínio sensor de sinal); motivo PAC – motivos C-terminais a motivos PAS (prováveis auxiliares estruturais do domínio PAS); domínio DUF1 de função desconhecida com motivo GGDEF; domínio DUF2 com função desconhecida].	58% (98/168)	286.0317

Continua...

TABELA 4 (CONTINUAÇÃO)

Nome da estirpe mutante (nome alternativo [†])	Número de acesso no GenBank	Seqüência no banco de dados com maior similaridade [‡]	Porcentagem de identidade (aminoácidos idênticos/aminoácidos totais) [‡]	Identidade da ORF [§]
S30 (N3.03.H08) [¶]	DQ073953	Provável proteína de transdução de sinal contendo um domínio de membrana, um domínio EAL e um domínio GGDEF, de <i>Magnetococcus</i> sp. MC-1 ; proteína ScpB de segregação e condensação de cromossomo procariótico de <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 ^{* §}	55% (71/128) ; 60% (78/129) [*]	286.0317 ; 286.0334 [*]
S31 (N2.04.G11)	DQ073954	Subunidade alfa da nitrila hidratase de <i>Pseudomonas</i> sp. K-9.	84% (143/170)	287.0821
S32 (N3.03.H04)	DQ073955	Provável oxidase ligadora de cobre exportada, de <i>Ralstonia solanacearum</i> UW551. [SMART/Pfam: oxidase ligadora de vários átomos de cobre].	74% (127/171)	258.0234

[†] Conforme Tabela 3.

[‡] De acordo com as análises através dos programas BLASTx e SMART, utilizando o banco de dados público GenBank (acesso em 10 de julho de 2006).

[§] ORF ID, de acordo com análises através do programa BLASTn, utilizando o banco de dados do Projeto de Seqüenciamento do Genoma da Bactéria Fixadora de Nitrogênio *H. seropedicae*, www.genopar.org.

[¶] Os pontos de inserção nas estirpes S9, S10 e S11 estavam pelo menos 67 pb de distância entre si, enquanto os nas estirpes S26, S27 e S28, 20 pb, e nas estirpes S29 e S30, 149 pb.

^{||} A montante do ponto de inserção.

^{*} A jusante do ponto de inserção.

[#] Neste caso, não foi possível afirmar se o gene a montante ou a jusante era regulado conforme a concentração de amônio no meio.

[‡] Análises de seqüenciamento do gene que contém a inserção na estirpe S9 confirmaram que *amtB*, o gene a montante, é de fato regulado.

[§] Análises de seqüenciamento do gene alvo de inserção na estirpe S29 confirmaram que o gene a montante, que codifica uma provável quinase, é de fato regulado.

TABELA 6 – EFEITO DA MUTAÇÃO SOBRE A UTILIZAÇÃO DE N₂, NaNO₃ E AMINOÁCIDOS, E VARIAÇÃO APARENTE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE ALVO DE INSERÇÃO, NAS ESTIRPES MUTANTES DE *Herbaspirillum seropedicae*

Es-tir-pe	Utilização de [†]			Variação da expressão em [‡]										
	N ₂	NaNO ₃	Aminoácidos	NaNO ₃	Glutamato	Glutamato (sem ácido málico)	Glutamina	Glutamina (sem ácido málico)	Aspartato	Aspartato (sem ácido málico)	Asparagina	Asparagina (sem ácido málico)	Alanina	Serina
S1	NE	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S2	+	+	+	ND	↑	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↑	↑
S3	+	+	+	↑	↑	ND	ND	ND	↑	ND	ND	ND	↑	↑
S4	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↑	↑
S5	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S6	+	+	+	ND	↑	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↑	↑
S7	+	+	+	ND	↑	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↑	↑
S8	+	+	+	ND	↑	ND	ND	ND	↑	ND	ND	ND	↑	↑
S9	+	+	+	ND	↑	ND	ND	ND	↑	ND	ND	ND	↑	↑
S10	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S11	+	+	+	ND	↑	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↑	↑
S12	+	+	+	ND	ND	↑	ND	↑	ND	↑	ND	↑	ND	ND
S13	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S14	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S15	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S16	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S17	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↑	ND
S18	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↑	ND
S19	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S20	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S21	-	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↑	↑
S22	-	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↑	↑
S23	-	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↑	↑
S24	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↑	↑
S25	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↑	↑
S26	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S27	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S28	+	+	+	ND	ND	↑	ND	↑	ND	↑	ND	↑	ND	ND
S29	+	+	+	ND	↑	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↑	↑

Continua...

TABELA 6 (CONTINUAÇÃO)

Es- tir- pe	Utilização de [†]			Variação da expressão em [‡]										
	N ₂	NaNO ₃	Aminoácidos	NaNO ₃	Glutamato	Glutamato (sem ácido málico)	Glutamina	Glutamina (sem ácido málico)	Aspartato	Aspartato (sem ácido málico)	Asparagina	Asparagina (sem ácido málico)	Alanina	Serina
S30	+	+	+	ND	↑	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↑	↑
S31	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↑	↑
S32	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

[†] N₂ atmosférico, NaNO₃ ou aminoácidos (L- α -alanina, L-asparagina, L-aspartato, L-glutamina, L-glutamato ou L-serina) 10 mmol/L como fonte única de nitrogênio. Para o ensaio de utilização de N₂, as estirpes foram inoculadas em meio semi-sólido (ágar 1,5%) e, após cultivo por 48–72 h, a concentração de proteína foi determinada. Para os ensaios com os restantes compostos nitrogenados, a utilização dos mesmos pelas estirpes foi avaliada qualitativamente conforme ilustrado na Fig. 13. + ou –, capacidade de crescimento semelhante (+), ou significativamente reduzida (–), utilizando a respectiva fonte única de nitrogênio, quando comparada com a estirpe selvagem Z78; NE, não determinado.

[‡] Conforme análise qualitativa (variação da intensidade de coloração verde/azul – Fig. 13) das colônias das estirpes mutantes cultivadas na presença da respectiva fonte de nitrogênio, em comparação com a condição de cultivo em NH₄Cl 20 mmol/L. ↑ = aumento aparente da expressão; ND = variação de expressão não detectada.