

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE *Azospirillum amazonense*
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM RESPOSTA À
DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO

Fernando Hayashi Sant'Anna

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e
Molecular da UFRGS como um dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Irene Silveira Schrank

Porto Alegre
Outubro de 2007

Este trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sendo financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

À professora Irene Silveira Schrank, uma pessoa que admiro muito, pelos ensinamentos e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

À minha estimada família, pelo carinho e apoio.

À Shana “Loca”, guriuzinha linda do tio, pessoa com quem sempre posso contar e que me passou todo *know-how* de expressão heteróloga.

Ao “Rei dos Livros”, Ricardo, pelas discussões sobre RDA, pelos incentivos, pela sabedoria delegada e pelas conversas amistosas.

Ao pessoal do laboratório, sempre disposto para uma churrascada e para uma discussão de artigo.

Aos meus amigos, pelos incentivos e descontrações.

Ao pessoal do “futibas”, que animam minha segunda-feira. Principalmente ao Andrei, que tomou aquele “elástico” de mim, em um momento em que eu precisava ter a alma revigorada.

Aos professores Augusto Schrank, Arnaldo Zaha, Henrique Bunselmeyer, Sérgio Ceroni, exemplos de profissionais, pelos ensinamentos e pelas sugestões valorosas.

À comissão de acompanhamento, composta pelos professores Marilene Vainstein e Arnaldo Zaha, pelas sugestões e críticas importantes.

Aos órgãos financiadores, FAPERGS, CAPES e CNPq, que possibilitaram a execução deste trabalho.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	14
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	16
INTRODUÇÃO	17
I.1.1. A fixação do nitrogênio	17
I.1.2. Nitrogenase	20
I.1.3. O gênero <i>Azospirillum</i>	22
I.1.4. O metabolismo do nitrogênio	26
I.1.4.a. O sistema Ntr	28
I.1.4.b. Genética da fixação do nitrogênio	31
I.1.4.c. Controle da fixação do nitrogênio	32
I.1.4.d. Regulação da fixação do nitrogênio em <i>Azospirillum</i>	34
I.1.5. Objetivo geral:	36

CAPÍTULO II – Caracterização do gene <i>glnK</i> de <i>Azospirillum amazonense</i>	37
INTRODUÇÃO	38
MATERIAIS E MÉTODOS	41
II.2.1. Linhagens bacterianas, meios de cultura e condições de crescimento	41
II.2.2. Métodos em biologia molecular	42
II.2.3. Reação de seqüenciamento	43
II.2.4. Análise <i>in silico</i> da região genômica de <i>glnk</i>	43
II.2.5. Expressão de GlnK-T7 tag	45
RESULTADOS	46
II.3.1. Clonagem parcial do gene <i>glnb</i> de <i>A. amazonense</i>	46
II.3.2. Análise do número de cópias de genes que codificam para PII em <i>A. amazonense</i>	46
II.3.3. Clonagem e identificação do gene <i>glnk</i> de <i>A. amazonense</i>	47
II.3.4. Presença de dois genes que codificam proteínas PII no genoma de <i>A. amazonense</i>	51
II.3.5. Análise “ <i>in silico</i> ” das regiões regulatórias dos gene <i>glnk</i> e <i>aat</i> de <i>A. amazonense</i>	52
II.3.6. Regulação da expressão dos genes <i>glnB</i> e <i>glnK</i> de <i>A. amazonense</i>	55
II.3.7. Expressão da proteína GlnK-T7 tag em <i>Escherichia coli</i>	56
DISCUSSÃO	57
CAPÍTULO III – Isolamento de genes de <i>A. amazonense</i> com expressão dependente da disponibilidade de nitrogênio	62
INTRODUÇÃO	63
MATERIAIS E MÉTODOS	65
III.2.1. Linhagens bacterianas, meios de cultura e condições de crescimento	65
III.2.2. Métodos em biologia molecular	65
III.2.3. Micro-rda (cDNA-RDA)	66
III.2.4. Reação de seqüenciamento	67
III.2.5. Análise <i>in silico</i> do produto do Micro-RDA	67
RESULTADOS	68
III.3.1. Expressão de genes de <i>A. amazonense</i> em resposta à limitação de nitrogênio	68

III.3.2. Isolamento de seqüências de <i>A. amazonense</i> envolvidas na resposta à indisponibilidade de nitrogênio através da técnica Micro-RDA (cDNA-RDA)	71
DISCUSSÃO	72
CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO GERAL	78
DISCUSSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXOS - CURRICULUM VITAE	99

ABREVIATURAS

ΔG°	Energia livre de Gibbs
(p)ppGpp	guanosina pentafosfato ou tetrafosfato
ADP	difosfato de adenosina
ATase	adeniltransferase
ATP	trifosfato de adenosina
Blast	<i>Base Local Alignment and Search Tool</i>
c-di-GMP	diguanilato cíclico
DNA	ácido desoxirribonucléico
DO	densidade ótica
DraG	dinitrogenase redutase glicoidrolase
DraT	dinitrogenase redutase ADP-ribosil transferase
EBP	<i>enhancer binding protein</i>
GAF	<i>cGMP-specific and stimulated phosphodiesterases, Anabaena adenylate cyclases and Escherichia coli FhlA</i>
GDH	glutamato desidrogenase
GMP	monofosfato de guanosina
GOGAT	glutamato sintase
GS	glutamina sintetase
GTP	trifosfato de guanosina
IHF	integration host factor
IPTG	β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo

kb	quilobases
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NHD-I	NADH ubiquinona oxidorreductase tipo I
NHD-II	NADH ubiquinona oxidorreductase tipo II
OSPERT	<i>oscillating phenol emulsion reassociation technique</i>
pb	par de base
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PERT	<i>phenol emulsion reassociation technique</i>
PHB	poli-β-hidroxibutirato
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
UAS	<i>upstream activation sequences</i>
UTase/UR	enzima uridil-transferase/uridil- removedora
UV	radiação ultravioleta
βNAD+	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1.1. Ciclo biogeoquímico do nitrogênio.	19
Figura I.1.2. Representação esquemática do ciclo da Fe-proteína.	22
Figura I.1.3. Modelo de interação entre <i>Azospirillum</i> e a planta hospedeira.	25
Figura I.1.4. Esquema demonstrando os papéis das proteínas PII na regulação do metabolismo do nitrogênio em <i>E. coli</i> .	31
Figura I.1.5. Esquema demonstrando o envolvimento de EBPs na formação do complexo transcricional aberto.	33
Figura I.1.6. Modelo de regulação das enzimas DraT e DraG em resposta a disponibilidade de nitrogênio em <i>A. brasilense</i> .	36
Figura II.3.1. Padrão de hibridização do gene <i>glnB</i> com o DNA genômico de <i>A. amazonense</i> digerido com diferentes enzimas de restrição.	47
Figura II.3.2. Alinhamento de GlnK de <i>A. amazonense</i> com proteínas PII de diferentes bactérias.	48
Figura II.3.3. Análise filogenética das proteínas PII de diferentes diazotrofos.	50
Figura II.3.4. Representação gráfica demonstrando grau de identidade entre a região gênica de <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> com a região gênica de <i>glnK</i> de <i>A. amazonense</i> .	51
Figura II.3.5. Padrão de hibridização do gene <i>glnK</i> com o DNA genômico de <i>A. amazonense</i> digerido com diferentes enzimas de restrição.	52
Figura II.3.6. Mapa físico e representação das regiões regulatórias dos genes <i>glnK</i> e <i>aat</i> de <i>A. amazonense</i> .	54
Figura II.3.7. Representação gráfica de um possível grampo de terminação do	54

gene *glnK* de *A.amazonense* gerada pelo software SFOLD. $\Delta G^\circ = -10$ Kcal/mol.

Figura II.3.8. Análise da expressão dos genes *glnB* e *glnK* de *A. amazonense*. 55

Figura II.3.9. Análise SDS-PAGE da expressão heteróloga da proteína GlnK-T7 56
de *A. amazonense*.

Figura III.3.1. Análise da expressão dos genes *glnB* e *glnK* de *A. amazonense* em 69
condições de ausência de nitrogênio fixado.

Figura III.3.2. Purificação do RNA total de *A. amazonense* com o kit 70
MICROBExpress.

Figura IV.1. Esquema representando possíveis mecanismos de resposta de *A. 81*
amazonense à indisponibilidade de nitrogênio.

LISTA DE TABELAS

Tabela II.2.1: Linhagens bacterianas utilizadas	41
Tabela II.2.2: Plasmídeos utilizados	41
Tabela II.2.3: Sequências de ligação à NtrC experimentalmente comprovadas	44
Tabela II.3.1: Grau de similaridade e identidade da proteína GlnK de <i>A. amazonense</i> com proteínas PII de diferentes organismos.	49
Tabela II.3.2: Matriz de peso baseada em 28 sítios caracterizados de ligação a NtrC de genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio de Proteobactérias.	53
Tabela III.3.1: Genes de <i>A. amazonense</i> provavelmente expressos em resposta à limitação de nitrogênio	71

RESUMO

Bactérias do gênero *Azospirillum* possuem a capacidade de promover o crescimento vegetal através de mecanismos que não estão claramente elucidados. Contudo, essa característica é muito estudada, tendo em vista a possibilidade de utilizar esses microrganismos na agricultura em detrimento do uso indiscriminado de fertilizantes industriais, que poluem o meio ambiente. O solo é um ambiente altamente variável quanto à disponibilidade de nutrientes e quanto a fatores físico-químicos, por isso, bactérias que ocupam esse nicho possuem um aparato genético capaz de prover uma adaptação plena a este ambiente. A bactéria *A. amazonense* tem um genoma altamente complexo e pouco estudado. O presente trabalho isolou genes envolvidos na resposta de *A. amazonense* ao estresse por limitação nutricional de nitrogênio, elemento crucial para a sobrevivência, já que compõe diferentes moléculas biológicas.

Um dos objetivos deste trabalho foi o isolamento de genes que codificam proteínas PII em *A. amazonense*, que estão envolvidas na regulação do metabolismo do nitrogênio. *A. amazonense* apresenta dois genes parálogos que codificam para proteínas PII, *glnB* e *glnK*. Demonstramos que ambos são regulados pela disponibilidade de nitrogênio no meio. A região promotora de *glnK* possui elementos típicos de genes regulados pelo sistema Ntr: quatro sítios de ligação ao fator de transcrição NtrC e um promotor dependente de σ^{54} . Foi identificada uma seqüência que corresponde a um promotor dependente de σ^{70} putativo sobreposto a um sítio de ligação a NtrC.

O segundo objetivo foi isolar genes regulados pela disponibilidade de nitrogênio através da técnica Micro-RDA. Essa técnica é muito sensível, no entanto há poucos relatos da sua utilização em bactérias, visto provavelmente as dificuldades

técnicas do trabalho com o mRNA bacteriano. Através desse procedimento, foram isolados oito genes envolvidos na resposta à limitação de nitrogênio. Sete deles apresentam homologia com genes de bactérias da classe Proteobacteria: *dnaK* e *rpoH* (genes que codificam proteínas envolvidas em choque térmico), *relA* (envolvido na síntese de ppGpp, um mediador da resposta “estringente”), um gene que codifica para uma diguanilato ciclase/fosfodiesterase (envolvido na síntese de c-di-GMP, envolvido na formação de biofilmes), um gene que codifica uma subunidade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, *glnA* (glutamina sintetase) e *gltB* (glutamato sintase). A variedade funcional desses genes ilustra o grau de complexidade da resposta de *A. amazonense* à limitação nutricional de nitrogênio.

ABSTRACT

Bacteria belonging to the *Azospirillum* genus are capable of promoting plant growth, but the mechanisms implicated in this feature are not clearly elucidated. This ability has been investigated by several research groups with the main objective of substitute the use of industrialized fertilizers by bacteria inoculation in the soil. The soil is a very dynamic environment, so bacteria have developed many genetic resources to survive in this environment. *Azospirillum amazonense* has a very complex genome and up till now is poorly analysed. This work has isolated different genes implicated in the nitrogen starvation response of *A. amazonense*.

In the first part of this work we investigated the PII coding genes of *A. amazonense*, that are involved in nitrogen metabolism regulation. *A. amazonense* has two PII genes, *glnK* and *glnB*. Both are regulated by the nitrogen availability in the medium. The *glnK* regulatory region has typical elements of Ntr regulated genes: four NtrC UAS sequences (upstream activator binding site) and one σ^{54} -dependent promoter. A putative σ^{70} -dependent promoter, that overlaps the NtrC UAS sequence has been found.

In the second part of this work we isolated nitrogen regulated genes by the Micro-RDA technique. This technique is very sensitive, but there are few reports of its applicability on bacterial species. This occurs probably due to the bacterial mRNA features. In our work we isolated eight nitrogen regulated genes through the micro-RDA procedure and seven of them have shown similarity to proteobacteria genes. The isolated sequences correspond to: *dnaK* and *rpoH* genes (implicated in heat shock response), *relA* gene (involved in stringent response), a diguanylate

cyclase/phosphodiesterase gene (implicated in biofilm formation), a complex I subunit gene (electrons transport chain), *glnA* gene (glutamine synthetase) and *gltB* gene (glutamate synthase). The functional variability of these genes illustrates the complexity of the nitrogen starvation response of *A. amazonense*.

CAPÍTULO I

Introdução geral

INTRODUÇÃO

I.1.1. A fixação do nitrogênio

O nitrogênio é um elemento que constitui proteínas e ácidos nucleicos, as duas classes mais importantes de macromoléculas da célula, perfazendo aproximadamente dois terços do seu peso seco. Embora o nitrogênio molecular (N_2) componha cerca de 80% da atmosfera terrestre, não pode ser utilizado pela maioria das formas de vida porque é quimicamente estável. Portanto, este nitrogênio na sua forma molecular deve ser transformado, pois a grande maioria dos organismos vivos obtém este elemento em alguma forma combinada, como o nitrato, a amônia, ou compostos mais complexos (*e.g.* aminoácidos).

O nitrogênio pode existir em diferentes estados de oxidação, sendo a interconversão entre estes estados conhecida como o ciclo biogeoquímico do nitrogênio (fig. I.1.1). Os processos que regulam este ciclo são governados por diversos fatores, sendo o mais importante o potencial redox, já que certos processos ocorrem somente aerobicamente e outros somente anaerobicamente (ROSSWALL, 1982). Em todos os ecossistemas, atividades microbianas têm papel fundamental na ciclagem do nitrogênio, como a conversão redutora do nitrato (NO_3^-) a N_2 (desnitrificação), a conversão oxidativa da amônia a nitrato (nitrificação) e a interconversão entre amônia e formas orgânicas de nitrogênio (assimilação e desaminação) (IGARASHI & SEEFELDT, 2003).

A conversão redutora do nitrogênio molecular em amônia, denominada fixação do nitrogênio, ocorre por meio de três rotas principais. As descargas elétricas

atmosféricas são responsáveis por aproximadamente 1% da fixação total do nitrogênio molecular por ano (total de N_2 fixado $\sim 3 \times 10^{14}$ g/ano). A rota principal para a fixação do nitrogênio ocorre pelo método industrial Haber-Bosch, utilizado na produção de fertilizantes nitrogenados (cerca de 50% do N_2 fixado por ano) (FINAN *et al.*, 2002). Este processo converte o N_2 do ar em amônia utilizando altas pressões (200 atm) de N_2 e H_2 , altas temperaturas (450°C) e catalisadores contendo ferro (SMIL, 2001).

Com o aumento progressivo da população mundial, houve e há uma demanda crescente por recursos como alimentos e energia. Tendo em vista que a disponibilidade de nitrogênio é um fator limitante à produtividade agrícola, há um aumento cada vez maior na utilização de fertilizantes nitrogenados pelo homem (DIXON & KAHN, 2004; GALLOWAY, 1998; SOCOLOW, 1999). Conseqüentemente, nos últimos 60 anos, a atividade humana está acelerando a taxa de fixação do nitrogênio, pela produção industrial de fertilizantes nitrogenados e da combustão de combustíveis fósseis (VITOUSEK *et al.*, 1997; GALLOWAY, 1998). A utilização indiscriminada de fertilizantes nitrogenados causa muitos impactos ao meio-ambiente, entre os quais estão (VITOUSEK *et al.*, 1997; DIXON & KAHN, 2004; GALLOWAY, 1998):

- o aumento da concentração de óxido nitroso (N_2O), um dos gases do efeito estufa, na atmosfera;
- a perda dos nutrientes do solo como cálcio e potássio, essenciais para fertilidade do solo;
- a acidificação substancial dos solos e águas de lagos e rios;
- o aumento do transporte de nitrogênio dos rios para estuários e águas costeiras;
- a perda da diversidade biológica, especialmente entre plantas adaptadas a solos com baixa concentração de nitrogênio, e subseqüentemente, os animais e micróbios que dependem destas plantas;
- o impacto na vida e nos processos ecológicos de ecossistemas litorâneos e a contribuição para o declínio na população de peixes pela eutroficação da água.

A terceira rota principal para a redução do nitrogênio à amônia ocorre via fixação biológica do nitrogênio ($\sim 50\%$ do N_2 total fixado por ano) (IGARASHI & SEEFELDT, 2003). A fixação biológica do nitrogênio é um processo onde o nitrogênio

atmosférico (N_2) é convertido em amônia por bactérias diazotróficas e tem grande importância ao ambiente e à agricultura mundial, já que repõe o conteúdo de nitrogênio na biosfera e compensa as perdas que ocorrem devido ao processo de desnitrificação (fig. I.1.1) (DIXON & KAHN, 2004).

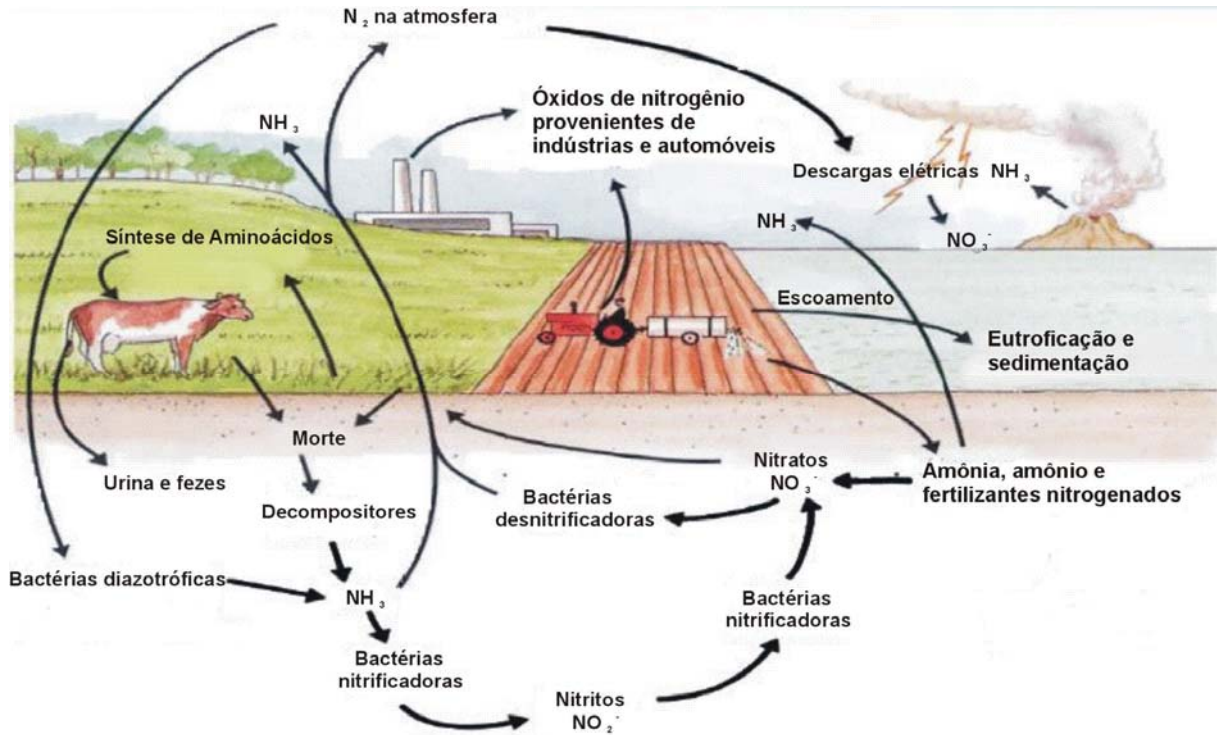


Figura I.1.1. Ciclo biogeoquímico do nitrogênio.

O reservatório primário de nitrogênio é a atmosfera, constituindo cerca de 80% do ar. As bactérias diazotróficas são organismos capazes de fixar o dinitrogênio em compostos orgânicos, que podem ser utilizados por plantas na síntese de aminoácidos e outros compostos nitrogenados orgânicos (adaptado de <http://www.umwestern.edu/envirosci/what'snew/beaverheadnitrates/img003.jpg>).

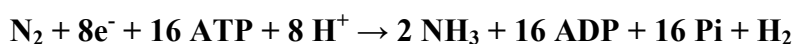
A capacidade de fixar nitrogênio é amplamente distribuída entre bactérias e *archaeae*. Essas bactérias diazotróficas encontram-se associadas com raízes de plantas ou em vida livre no solo. O vegetal pode se beneficiar indiretamente desta fonte de nitrogênio fixado por meio de relações simbióticas ou associativas com bactérias, incorporando esse nitrogênio ao seu metabolismo. Como parte da cadeia alimentar, as plantas disponibilizarão os compostos nitrogenados para outros microrganismos ou animais que dela se alimentarem. Assim, de uma maneira ou de outra, todos os seres vivos obtêm parte de seu nitrogênio a partir da redução deste composto efetivada por bactérias diazotróficas (ATLAS & BARTHA, 1981). O nitrogênio fixado biologicamente é menos suscetível à lixiviação e volatilização, já que é fixado *in situ*, sendo esse, portanto, um processo biológico que contribui para um

desenvolvimento sustentável da agricultura (DIXON & KAHN, 2004). Além disso, estima-se que a produção industrial de fertilizantes nitrogenados consuma 1% da energia mundial total por ano, sendo, portanto, oneroso econômica e ambientalmente (KIM & REES, 1994; SMITH, 2002).

Tendo em vista estes fatores, o processo biológico de fixação do nitrogênio despertou interesse, sendo estudado em laboratórios de todo o mundo, visando, obviamente, reduzir a produção e o consumo de fertilizantes nitrogenados, utilizando as bactérias diazotróficas como uma forma alternativa de fornecimento de nitrogênio às plantas.

I.1.2. Nitrogenase

As enzimas denominadas nitrogenases são metaloenzimas, com características funcionais e estruturais conservadas, responsáveis pela redução do nitrogênio molecular a amônia. Estas enzimas são classificadas de acordo com o grupamento metálico que constitui seu sítio ativo (IGARASHI & SEEFELDT, 2003). Um grupo destas enzimas é representado pela nitrogenase de *Streptomyces thermoautotrophicus*, sendo constituída por duas proteínas. Um componente protéico, a CO-desidrogenase, oxida CO a CO₂ e reduz O₂ a superóxido (O₂⁻). O segundo componente é uma oxidoreductase dependente de manganês que oxida O₂⁻, doando elétrons para o N₂ e reduzindo o sítio ativo MoFeS (RIBBE *et al.*, 1997). As outras três famílias de nitrogenases compartilham muitas similaridades entre si, sendo diferenciadas através do grupamento metálico do sítio ativo (Mo, V ou somente Fe). Estas nitrogenases incluem um pequeno componente protéico denominado Fe-proteína (ou dinitrogenase reductase). Este componente possui um grupamento [4Fe-4S] e age como uma proteína doadora de elétrons dependente de MgATP para o componente maior, chamado dinitrogenase, o qual contém o sítio ativo com o grupamento metálico (BURGESS & LOWE, 1996). A dinitrogenase possui, além do grupamento metálico do sítio ativo, outro denominado grupamento P ([8Fe-7S]), que está envolvido na transferência de elétrons. A reação geral de redução do N₂, catalisada por estas enzimas, está tipicamente representada a seguir:



As nitrogenases que possuem um grupamento metálico no sítio ativo com a composição [7Fe-9S-1Mo-X-homocitrato], denominado cofator FeMo, constituem a família mais estudada destas enzimas. As outras duas famílias parecem ter grupamentos metálicos semelhantes no sítio ativo, com a exceção da substituição do Mo por V ou Fe. Estas últimas famílias de nitrogenases são conhecidas como nitrogenases alternativas (IGARASHI & SEEFELDT, 2003).

O componente maior da nitrogenase dependente de Mo é chamado MoFe proteína (componente I ou dinitrogenase) sendo composto por dois polipeptídeos diferentes (codificados pelos genes *nifD* e *nifK*) que são organizados como dois dímeros ($\alpha_2\beta_2$). Cada subunidade α liga-se a um cofator FeMo, e na interface entre cada dímero $\alpha\beta$ liga-se um grupamento P. O componente menor da nitrogenase, denominado Fe proteína (componente II ou dinitrogenase redutase), é codificado pelo gene *nifH*, sendo composto por duas subunidades idênticas (γ_2) com um único grupamento [4Fe-4S] ligado entre as subunidades. A Fe-proteína possui também dois sítios de ligação a MgATP, um em cada subunidade (IGARASHI & SEEFELDT, 2003). Estes componentes da nitrogenase são altamente sensíveis ao oxigênio. A sensibilidade ao oxigênio da Fe-proteína é conferida pela exposição do grupamento [4Fe-4S], que liga as duas subunidades do dímero (DIXON & KAHN, 2004)

O mecanismo proposto para a redução do nitrogênio molecular a amônia pela nitrogenase envolve as seguintes etapas: a Fe-proteína, com duas moléculas de MgATP ligadas e seu grupamento [4Fe-4S] reduzido, liga-se a uma metade da MoFe-proteína (uma subunidade $\alpha\beta$). Esta ligação permite a hidrólise de duas moléculas de MgATP a duas moléculas de MgADP e a transferência de um único elétron da Fe-proteína para a MoFe-proteína. O receptor dos elétrons é o grupamento P, que provavelmente age como um mediador na transferência eletrônica. Os elétrons (um ou mais) são então transferidos ao cofator FeMo, onde o substrato liga-se, sendo então reduzido. Depois de cada evento de transferência eletrônica, a Fe-proteína deve se dissociar da MoFe-proteína para ser reduzida por uma proteína doadora de elétrons (ferredoxina ou flavodoxina) substituindo MgADP por MgATP (fig. I.1.2). Então, este ciclo deve ser repetido no mínimo 8 vezes para cada N_2 reduzido e H_2 formado (IGARASHI & SEEFELDT, 2003).

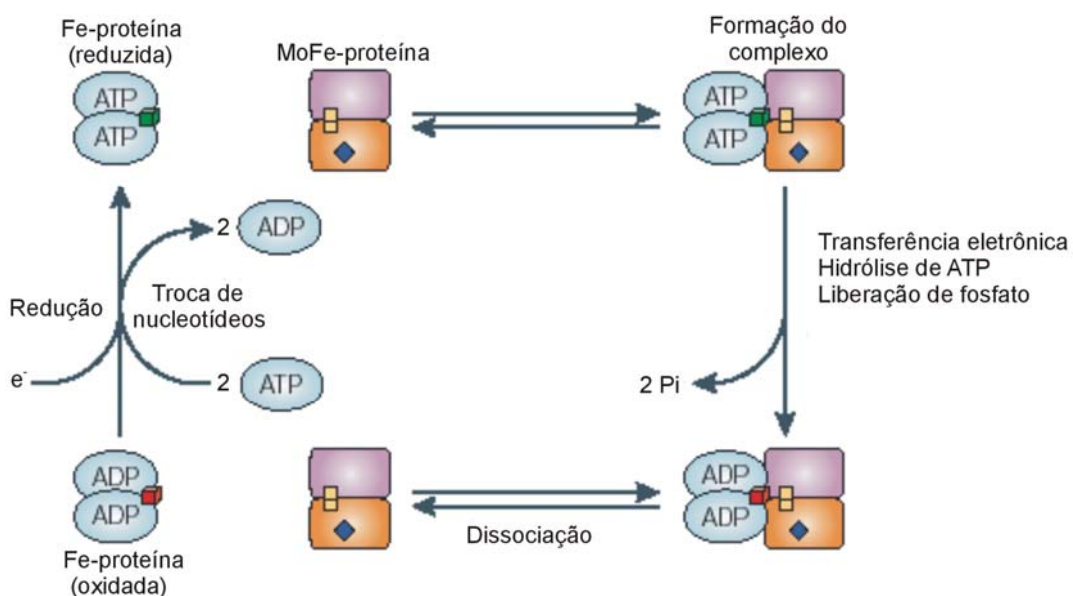


Figura I.1.2. Representação esquemática do ciclo da Fe-proteína.

A Fe-proteína é mostrada em azul com o grupamento [4Fe-4S] representado pelo cubo vermelho, quando oxidado, e verde, quando reduzido. As subunidades α e β da FeMo-proteína estão representadas em laranja e rosa, respectivamente. Os quadrados amarelos representam o grupamento P e o losango azul representa o cofator FeMo (adaptado de DIXON & KAHN, 2004).

I.1.3. O gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* (α -proteobacteria) compreende bactérias Gram-negativas, flageladas e fixadoras de nitrogênio de vida livre. Até agora, dez espécies foram descritas: *A. lipoferum*, *A. brasilense* (TARRAND *et al.*, 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES *et al.*, 1983), *A. halopraeferens* (REINHOLD *et al.*, 1987), *A. irakense* (KHAMMAS *et al.*, 1989), *A. largimobile* (SLY & STACKEBRANDT, 1999), *A. doebereineriae* (ECKERT *et al.*, 2001), *A. oryzae* (XIE & YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG *et al.*, 2006) e *A. canadense* (MEHNAZ *et al.*, 2007). Essas bactérias são caracterizadas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) (OKON, 1994; OKON & VANDERLEYDEN, 1997) tendo sido isoladas da rizosfera de gramíneas e cereais por todo mundo, tanto em climas tropicais, quanto em climas temperados (DÖBEREINER & DAY, 1976; PATRIQUIN *et al.*, 1983). Experimentos demonstraram que as bactérias do gênero *Azospirillum* exercem efeitos benéficos sobre o crescimento de mais de 100 espécies vegetais, desde gramíneas a dicotiledôneas, aumentando assim, a produtividade agrícola. Além disso, em muitos casos, a inoculação

reduz o uso de fertilizantes químicos, especialmente os nitrogenados, em 20-50%, promovendo resultados superiores quando fertilizantes orgânicos foram incorporados, diminuindo a razão custo-benefício. (BASHAN *et al.*, 2004; BODDEY *et al.*, 1986; OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

Diferentes trabalhos apresentam resultados conflitantes relativos a um mecanismo principal responsável pela promoção do crescimento vegetal. A "Hipótese Aditiva", sugerida há 13 anos, é ainda válida, a qual considera mecanismos múltiplos de promoção do crescimento, operando simultaneamente ou sucessivamente, mais do que um mecanismo individual, que seria menos significativo se avaliado separadamente. O principal efeito observado da inoculação é a mudança na morfologia do sistema radicular. Atualmente, a explicação mais comum para o efeito da bactéria sobre as plantas é a produção de fitormônios, que alteram o metabolismo e morfologia da planta, aumentando a absorção de água e minerais. A contribuição da fixação do nitrogênio, no entanto, já é mais controversa (BASHAN *et al.*, 2004).

O fenômeno mais notável na inoculação de *Azospirillum* é que a inoculação tem maior sucesso e é mais vantajosa quando outros microrganismos são co-inoculados, como bactérias solubilizadoras de fosfatos, *Azotobacter*, *Rhizobia*, Bacilli, e até mesmo fungos. Embora a maioria dos mecanismos pelos quais a co-inoculação afeta o crescimento vegetal não tenha sido elucidada, aparentemente, ela permite às plantas uma melhor nutrição e uma melhor absorção dos nutrientes. Os fenômenos mais notáveis são o aumento da absorção de minerais, a redução no uso de fertilizantes de N e P por 25%-50%, o aumento na disponibilidade de NPK no solo, o melhoramento das características da safra e uma melhor razão custo-benefício. A tendência é que essa seja a futura forma de inoculação do *Azospirillum* no campo (BASHAN *et al.*, 2004).

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Azospirillum* apresentam um metabolismo do nitrogênio e do carbono versátil, permitindo seu estabelecimento no competitivo ambiente da rizosfera. Amônia, nitrato, nitrito, aminoácidos e nitrogênio molecular podem ser utilizados como fonte de nitrogênio (HARTMANN & ZIMMER, 1994). Em condições nutricionais desfavoráveis, as bactérias do gênero *Azospirillum* podem alterar a sua morfologia, desenvolvendo uma capa externa de polissacarídeos e acumulando grânulos de poli- β -hidroxibutirato, que servem como fonte de carbono (TAL *et al.*, 1990).

A alta motilidade das bactérias é conferida por flagelos. *A. brasilense*, *A. lipoferum* e *A. irakense* possuem um padrão flagelar misto, onde um flagelo polar é sintetizado durante o crescimento em meio líquido, sendo que vários flagelos laterais são sintetizados adicionalmente durante o crescimento em meio sólido (HALL & KRIEG, 1984). *A. amazonense*, *A. doebereineriae* e *A. halopraeferens* possuem apenas o flagelo polar. A alta motilidade, aliada à quimiotaxia positiva por ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos (BARAK *et al.*, 1983; REINHOLD *et al.* 1985; ZHULIN *et al.*, 1988), provavelmente confere ao *Azospirillum* uma vantagem seletiva importante sobre outros microrganismos na rizosfera, onde a disponibilidade de nutrientes é muitas vezes limitada (BARAK *et al.*, 1983). Além disso, *Azospirillum* exibe um comportamento aerotático típico (BARAK *et al.*, 1982), pois as células se movem em direção a concentrações ótimas de oxigênio e, assim, atingem um nicho propício para a atividade de fixação do nitrogênio (ZHULIN *et al.*, 1996).

Embora o processo de associação entre o *Azospirillum* e a planta hospedeira não esteja completamente descrito, um modelo foi proposto (DEL GALLO & FENDRIK, 1994):



Figura I.1.3. Modelo de interação entre *Azospirillum* e a planta hospedeira. Modificado de Del Gallo & Fendrik (1994).

A espécie *A. amazonense*, alvo do presente trabalho, possui algumas diferenças em comparação com as espécies mais amplamente estudadas, *A. brasilense* e *A. lipoferum*: seu pH ótimo de crescimento ocorre entre 5,8 e 6,8, sendo sensível a pH alcalino; possui a capacidade de utilizar sacarose como fonte de carbono; o crescimento dependente de N_2 é mais lento e sua enzima nitrogenase possui menor tolerância ao O_2 . A temperatura ótima de crescimento é $36^\circ C$ e as células acumulam grandes grânulos de PHB em cultivo dependente de N_2 (MAGALHÃES *et al.*, 1983). A bactéria *A. amazonense* não apresenta o sistema DRAG/T de controle pós-traducional da nitrogenase, que é somente parcialmente inibida pela presença de amônia, característica favorável na utilização desse microrganismo como biofertilizante (FU *et al.* 1989; HARTMANN *et al.*, 1986).

Estudos demonstraram que plantas de cana-de-açúcar micropropagadas têm seu conteúdo de nitrogênio e sua massa aumentados ao serem inoculadas somente com *Azospirillum amazonense* ou com uma combinação dessa bactéria com outros diazotrofos (CANUTO *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Além das bactérias, outros fatores influenciam na contribuição de nitrogênio e na promoção do crescimento, como o genótipo da planta, o tipo de solo e a fertilização de nitrogênio. Em solo de baixa fertilidade e sem suplementação com fertilizante químico, as plantas da variedade SP70-1143 de cana-de-açúcar inoculadas com uma combinação de diazotrofos (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia sp.*) apresentaram um desenvolvimento similar a plantas cultivadas com suplementação de fertilizante nitrogenado (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

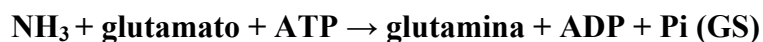
1.1.4. O metabolismo do nitrogênio

Ao longo da evolução, as bactérias desenvolveram diferentes mecanismos que as permitem sobreviver em condições de limitação de nutrientes, reiniciando o crescimento quando os nutrientes estivessem disponíveis novamente. A célula bacteriana vive em um estado dinâmico, se adaptando rapidamente às mudanças ambientais, através de uma ampla variedade de acomodações genóticas e fenóticas, como modificação na síntese proteica para captar o nutriente limitante, modulação das taxas de captação de nutrientes disponíveis em excesso, redirecionamento das vias metabólicas para evitar possíveis bloqueios devido à limitação do nutriente e coordenação das taxas biossintéticas para manter um crescimento equilibrado (ROSZAK & COLWELL, 1987).

A limitação de nutrientes é o maior fator de estresse no solo. Assim, a bactéria permanece por longos períodos de tempo sem se multiplicar e por períodos transitórios de multiplicação, podendo sobreviver na forma vegetativa ou de cistos, até que a planta hospedeira esteja disponível. Sob a influência de metais tóxicos, condições de cultivo, envelhecimento ou estresse hídrico, as células de *Azospirillum* podem se transformar em cistos, com tempos longos de sobrevivência, que podem rapidamente retornar a forma vegetativa, quando as condições estiverem favoráveis (BASHAN, 1999).

Como comentado anteriormente, os microrganismos pertencentes ao gênero *Azospirillum* demonstram um metabolismo do nitrogênio e do carbono versátil, característica importante para que as células se estabeleçam na rizosfera. A bactéria *A. amazonense* se multiplica muito bem quando a única fonte de nitrogênio e carbono é glutamato, aspartato, serina ou histidina e a fixação de nitrogênio é severamente inibida por esses aminoácidos, quando cultivada na presença de malato ou sacarose (HARTMANN *et al.*, 1988).

Em praticamente todas as células, glutamato e glutamina servem como doadores-chave para reações biossintéticas. Existem duas vias principais que estão envolvidas na incorporação do nitrogênio em glutamato e glutamina. A via mais importante é a da glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT), que é ubíqua nas bactérias. A glutamina sintetase (GS) converte glutamato e amônia em glutamina, e a glutamato sintase (GOGAT) transfere o grupo amida da glutamina ao 2-cetoglutarato para produzir duas moléculas de glutamato (MERRICK & EDWARDS, 1995). A glutamato desidrogenase catalisa a formação de glutamato, a partir de amônia e 2-cetoglutarato (REITZER, 2003). Essas reações encontram-se representadas a seguir:



Em *E.coli*, a via GS-GOGAT é mais apropriada para assimilação de amônia em um ambiente limitado em nitrogênio, pois a GS tem um Km muito menor para a amônia do que a GDH (REITZER, 2003).

Em *Azospirillum*, a amônia é assimilada através da via GS/GOGAT (glutamina sintetase/glutamato sintase), em condições limitantes de nitrogênio. Em níveis elevados de amônia ou com suprimento amplo de nitrogênio através de aminoácidos, a via da glutamato desidrogenase (GDH) é ativada (HARTMANN & BALDANI, 2006).

I.1.4.a. O sistema Ntr

A amônia é quase que invariavelmente a fonte preferencial de nitrogênio para o crescimento bacteriano, já que promove uma maior taxa de crescimento comparado com outras fontes deste elemento. No entanto, as bactérias freqüentemente têm de utilizar fontes alternativas de nitrogênio, e para isso sintetizam diferentes proteínas responsáveis pela entrada e metabolismo subsequente de compostos nitrogenados. A síntese e a atividade dessas proteínas são altamente reguladas conforme a disponibilidade de seus substratos, sendo esta regulação conhecida como controle do nitrogênio ou sistema Ntr. Os mecanismos genéticos e bioquímicos que estão envolvidos neste sistema são bem compreendidos nas bactérias entéricas, embora elementos desse sistema tenham sido reconhecidos em outros grupos bacterianos (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Estudos anteriores consideravam que o sistema regulatório global do nitrogênio seria composto por quatro proteínas com atividade enzimática: uma enzima com a função de uridiltransferase/remoção de uridil (UTase/UR), codificada pelo gene *glnD*, uma pequena proteína trimérica PII, codificada por *glnB* e um sistema regulatório composto por histidino-quinase NtrB e o regulador de resposta NtrC. No entanto, a descoberta de proteínas parálogas a proteína GlnB, como a proteína GlnK, aumentaram a complexidade do sistema, ajudando simultaneamente a explicar anomalias do sistema anteriormente proposto (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001).

Normalmente, a ativação e repressão da transcrição dos genes regulados pelo nitrogênio são coordenadas pela ação da proteína regulatória NtrC, um fator de transcrição dependente de σ^{54} (MORETT & SEGOVIA, 1993). Esta proteína regulatória possui uma estrutura terciária altamente conservada na região N-terminal, contendo o resíduo Asp-54, que em condições limitantes de nitrogênio é fosforilado, gerando NtrC-P, a forma ativa dessa proteína (KERN *et al.*, 1999; VOLKMAN *et al.*, 1995; WEISS & MAGASANIK, 1988). NtrC em sua forma não fosforilada se apresenta como um dímero, mas para ativar a transcrição é necessário que ocorra a oligomerização na forma de um tetrâmero ou oligômeros maiores. A fosforilação permite a oligomerização e a ligação de NtrC ao DNA. Muitos promotores dependentes de NtrC possuem mais de um sítio de ligação, facilitando esta oligomerização (AUSTIN & DIXON, 1992; METTKE *et al.*, 1995; WEISS *et al.*, 1991; WEISS *et al.*, 1992; WYMAN *et al.*, 1997).

O controle da atividade de NtrC em resposta ao *status* de nitrogênio é mediado por NtrB, que age como um doador de fosfato a NtrC. NtrB existe na forma de um dímero que é autofosforilado no resíduo His-139 do domínio C-terminal (NINFA *et al.*, 1986; NINFA & BENNETT, 1991). Na presença de ATP e GlnB, NtrB desfosforila NtrC através de sua atividade de fosfatase (KAMBEROV *et al.*, 1994; KAMBEROV *et al.*, 1995; KEENER & KUTSU, 1988; LIU & MAGASANIK, 1995; NINFA & MAGASANIK, 1986). A proteína NtrB é composta por três domínios: o domínio N-terminal envolvido na transdução do sinal, um domínio central com atividade de fosfotransferase/fosfatase e envolvido na dimerização, e finalmente, o domínio C-terminal com atividade de quinase. A ligação de PII (GlnB) ao domínio com atividade de quinase parece resultar numa mudança conformacional de NtrB, fazendo com que essa proteína tenha sua atividade de fosfatase aumentada (JIANG *et al.*, 2000).

Em *E. coli*, GlnB sinaliza o nível de nitrogênio da célula integrando os sinais de 2-cetoglutarato e de glutamina, o primeiro por ligação alostérica e a última pelo efeito que tem sobre a UTase/UR.

A enzima uridiltransferase/removedora de uridil (GlnD) é o sensor primário do nível de nitrogênio intracelular e afeta o estado de uridilação da proteína PII, que por sua vez, modula a atividade de *ntrBC* (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). Em condições fisiológicas, o estado de uridilação de GlnB é regulado principalmente pela concentração de glutamina, sugerindo que a enzima UTase/UR serve como um sensor de nitrogênio (JIANG *et al.*, 1998).

O estado de uridilação de GlnB, em resposta ao nível intracelular de nitrogênio regula a atividade de fosfatase ou quinase de NtrB, que por conseguinte modula a atividade transcricional de NtrC. Em condições onde o nitrogênio está abundante, a proteína GlnB não se encontra uridilada, pois a atividade removedora de uridil de GlnD está ativa, e estimula a desfosforilação de NtrC pela atividade de fosfatase de NtrB. Mas em condições limitantes de nitrogênio, GlnD uridila GlnB, que por sua vez não interage com NtrB. Assim, a atividade de quinase de NtrB é ativada e fosforila NtrC, que irá promover a transcrição de diversos genes nas enterobactérias como: o operon *glnK-amtB* (envolvido em transporte de amônia) (ATKINSON & NINFA, 1998; JACK *et al.*, 1999; VAN HEESWIJK *et al.*, 1996), o operon *glnHPQ* (envolvido em transporte de glutamina) (CLAVERIE-MARTIN & MAGASANIK, 1991), o operon *astCADBE* (catabolismo arginina) (SCHNEIDER *et al.*, 1998), o

operon *nifLA* (envolvido na regulação de genes de fixação do nitrogênio) (DRUMMOND *et al.*, 1983; WU *et al.*, 1999) entre outros (MUSE & BENDER, 1998; SCHMITZ *et al.*, 1988).

A glutamina sintetase, a enzima primária de assimilação de amônia em muitos procariontes, se encontra dependente de uma complexa regulação sendo inibida por diferentes produtos de seu metabolismo. Adicionalmente, a atividade é afetada por modificação covalente. Essa enzima é um dodecâmero e cada monômero pode ser modificado por adenilação, aumentando o grau de suscetibilidade à inibição por retroalimentação. A enzima que modifica covalentemente a GS, originalmente descrita como PI, é uma adeniltransferase (ATase), que transfere um AMP para um resíduo de tirosina da GS a partir de ATP e também remove AMP por clivagem fosforolítica. A atividade da ATase é regulada pela proteína GlnB, que quando uridilada (escassez de nitrogênio), estimula a desadenilação da GS, e desuridilada (excesso de nitrogênio), estimula a adenilação da GS (LEIGH & DODSWORTH, 2007).

Assim como outras bactérias, *E. coli* possui uma proteína paráloga de GlnB, denominada GlnK, que tem como função ligar-se ao transportador de amônia AmtB. Esta função é amplamente dispersa nas bactérias e em Euryarchaeota e sugeriu-se que fosse a função ancestral de GlnK. Em condição de excesso de nitrogênio, GlnK é desuridilada e se liga com AmtB, inibindo o transporte de amônia (LEIGH & DODSWORTH, 2007).

Excesso de nitrogênio

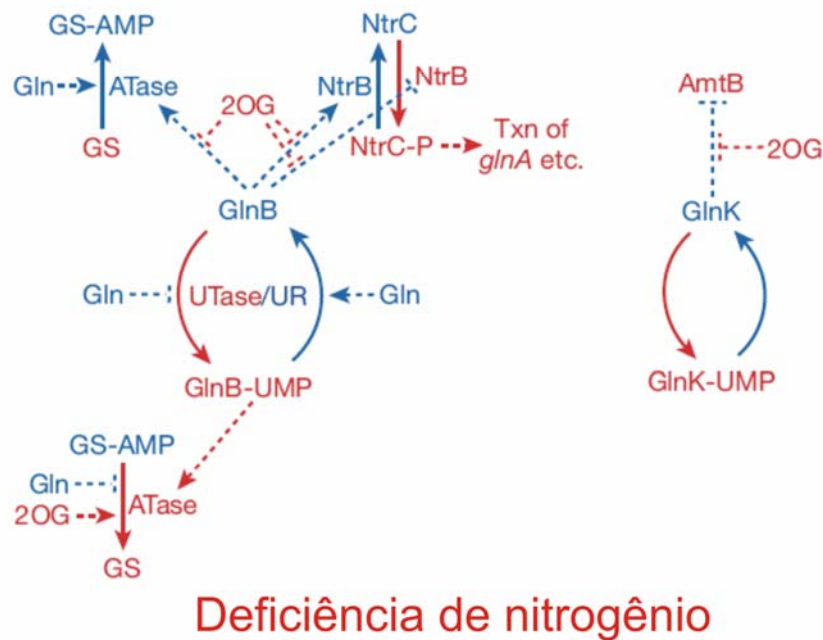


Figura I.1.4. Esquema demonstrando os papéis das proteínas PII na regulação do metabolismo do nitrogênio em *E. coli*. Azul indica excesso de nitrogênio, enquanto vermelho indica deficiência de nitrogênio. Linhas sólidas indicam modificações e linhas tracejadas indicam a ação de efetores ou proteínas regulatórias. Setas indicam efeitos positivos, enquanto extremidades tracejadas indicam efeitos negativos (adaptado de LEIGH & DODSWORTH, 2007).

I.1.4.b. Genética da fixação do nitrogênio

A enterobactéria *Klebsiella pneumoniae* é considerada o organismo modelo na genética da fixação do nitrogênio. Estudos genéticos, bioquímicos e fisiológicos utilizando o sistema de fixação de nitrogênio em *K. pneumoniae* possibilitaram a formulação de uma série de conceitos básicos relativos aos processos mais relevantes na regulação da expressão da nitrogenase, revelando que muitos deles são comuns à boa parte dos organismos diazotróficos. Uma das descobertas mais importantes refere-se à alta conservação da nitrogenase e de seus componentes em termos de estrutura e função, na maioria das bactérias (HOWARD & REES, 1994).

Os genes diretamente envolvidos no processo de fixação do nitrogênio, e homólogos aos encontrados em *K. pneumoniae*, são denominados genes *nif*, tendo sido caracterizados em diversas espécies bacterianas. Embora *K. pneumoniae* tenha sido o organismo no qual se iniciaram os estudos da genética da fixação do nitrogênio, à medida que as pesquisas com outras espécies avançavam, foram sendo descobertos

genes essenciais à fixação que não possuíam homólogos nesta bactéria. Esses genes foram denominados genes *fix* e se encontram presentes na grande maioria das bactérias diazotróficas, tendo grande importância no processo de fixação do nitrogênio (FISCHER, 1994).

Os produtos primários da tradução dos genes estruturais da nitrogenase (*nifHDK*) não são ativos. Outros genes *nif*-específicos devem ser expressos para que haja o processamento dos componentes estruturais imaturos da nitrogenase em formas ativas (DEAN *et al.*, 1993). Em *K. pneumoniae*, vinte genes *nif* estão organizados seqüencialmente, formando 8 operons: *nifJ*, *nifHDKT*, *nifENX*, *nifUSVWZ*, *nifM*, *nifF*, *nifLA* e *nifBQ* (ARNOLD *et al.*, 1988).

Em *A. brasilense*, a maioria dos genes *nif* está organizada em um grupamento de 45 kb que inclui os genes e operons *nifHDKorf1Y* (PASSAGLIA *et al.*, 1991), *nifENXorf3orf5fdxAnifQ* (POTRICH *et al.*, 2001), *nifW* (MILCAMPS *et al.*, 1993), *orf2nifUSVorf4* (FRAZZON & SCHRANK, 1998) e *fixABCX* (SPEROTTO *et al.*, 2004).

I.1.4.c. Controle da fixação do nitrogênio

Nas proteobactérias diazotróficas, o sistema regulatório NtrB-NtrC comumente controla a expressão da proteína regulatória NifA em resposta à disponibilidade de nitrogênio (DIXON & KAHN, 2004). Nas bactérias pertencentes ao grupo Proteobacteria, a transcrição da maioria dos genes *nif* é dependente do fator σ^{54} alternativo, que reconhece promotores com seqüências consenso localizadas nas posições -24 e -12 (BARRIOS *et al.*, 1999; BUCK *et al.*, 2000). O início da transcrição pela RNAPolimerase- σ^{54} necessita uma classe especial de ativadores transcricionais, que se ligam a elementos à montante dos promotores dependentes do fator σ^{54} . Através da hidrólise de ATP pelo ativador, ocorre uma mudança conformacional em σ^{54} , permitindo a transição para o complexo promotor aberto (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004). A ativação da transcrição de genes *nif* dependentes de σ^{54} requer a presença da proteína NifA, uma EBP (*enhancer binding protein*) que regula os genes necessários para a síntese da nitrogenase (fig. I.1.3) (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004).

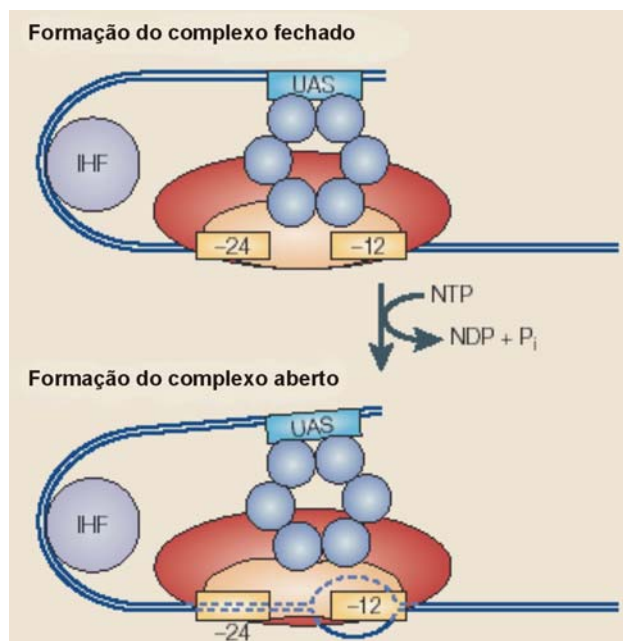


Figura I.1.5. Esquema demonstrando o envolvimento de EBPs na formação do complexo transcricional aberto. O fator σ^{54} (elipse laranja) juntamente com a RNA polimerase (elipse vermelha) reconhecem seqüências consenso -12/-24 em relação ao sítio de início de transcrição. O início da transcrição é dependente de EBPs (família das proteínas NifA e NtrC), representadas pelo oligômero em azul. Seqüências UAS (caixa azul) localizadas a no mínimo 100 pb do início da transcrição facilitam a ligação do ativador (oligômero de EBPs) com a RNA polimerase. A formação de uma alça no DNA é necessária para haver a interação entre o ativador ligado ao DNA e a RNA-polimerase. Normalmente isso é feito pela ajuda de uma proteína IHF (círculo maior lilás). A hidrólise de nucleotídeos catalisada pelo ativador promove um remodelamento no complexo fechado, favorecendo a conversão para um complexo promotor aberto (adaptado de DIXON & KAHN, 2004).

A proteína NifA possui uma arquitetura que é similar a outras proteínas pertencentes à família EBP: o domínio central, que possui atividade de AAA^+ ATPase; o domínio C-terminal que possui o motivo hélice-volta-hélice, envolvido no reconhecimento de elementos UAS; e finalmente, o domínio regulatório N-terminal. A região N-terminal de NifA, que apresenta maior diversidade, possui um domínio GAF, onde pequenas moléculas se ligam, modulando assim a atividade dessa proteína (DIXON & KAHN, 2004).

A ativação da transcrição por NifA é regulada em resposta a presença de oxigênio e ao nitrogênio fixado. Em muitos diazotrofos dos subgrupos α e β das Proteobactérias, a atividade de NifA é modulada diretamente pela disponibilidade de oxigênio, sendo que os resíduos de cisteína conservados estão envolvidos nessa resposta (FISCHER & HENNECKE, 1987; FISCHER, 1994). Além disso, em muitas proteobactérias diazotróficas, a atividade de NifA é regulada em resposta a fonte de nitrogênio (DIXON & KAHN, 2004). No entanto em alguns organismos, particularmente do subgrupo γ das Proteobactérias, a atividade de NifA não é sensível

ao oxigênio ou nitrogênio, necessitando de uma proteína específica, denominada NifL, que modula a atividade de NifA em resposta ao nitrogênio fixado e a presença de oxigênio (DIXON, 1998; SCHMITZ *et al.*, 2002).

I.1.4.d. Regulação da fixação do nitrogênio em *Azospirillum*

Azospirillum somente fixa nitrogênio em condições microaeróbias e com disponibilidade limitante de nitrogênio. Amônia, nitrato, glutamina e nitrito reprimem a fixação do nitrogênio em *A. brasilense*. A fixação biológica do nitrogênio é um processo altamente regulado, devido ao enorme gasto energético e à sensibilidade da nitrogenase ao oxigênio (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). A expressão dos genes *nif* em *A. brasilense* necessita da proteína ativadora NifA, bem como do fator σ^{54} (NtrA) (LIANG *et al.*, 1991; MERRICK, 1992; PASSAGLIA *et al.*, 1998; SANTERO *et al.*, 1988; TOUKDARIAN & KENNEDY, 1986; VANDE BROEK *et al.*, 1992).

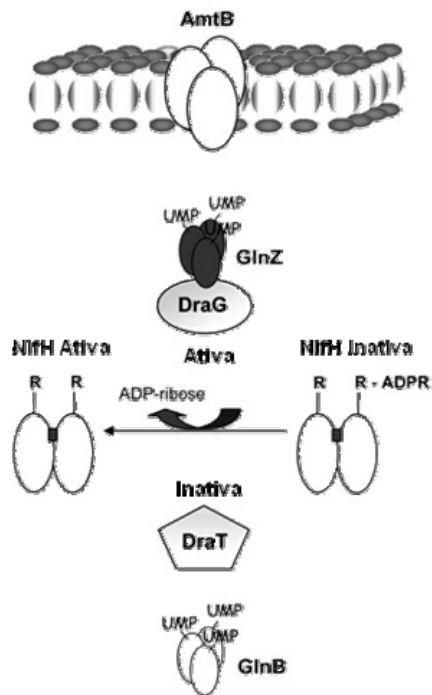
Em *A. brasilense*, NifA é expressa constitutivamente, independentemente da presença de nitrogênio combinado ou da concentração de oxigênio. No entanto, seu nível de expressão é menor em condições incompatíveis com a fixação de nitrogênio (LIANG *et al.*, 1991; LIANG *et al.*, 1992). Como no caso de *Azotobacter*, a expressão de NifA não é dependente das proteínas regulatórias NtrBC (LIANG *et al.*, 1991; LIANG *et al.*, 1992; SANTERO *et al.*, 1988; TOUKDARIAN & KENNEDY, 1986). Entretanto, NtrC é requerida para fixação ótima do nitrogênio e para expressão máxima de *nifA* em condições de fixação, embora não pela ação direta de NtrC sobre o promotor do gene que codifica *nifA* (LIANG *et al.*, 1993).

A atividade de NifA é modulada em resposta ao nível celular de nitrogênio e à tensão de oxigênio (LIANG *et al.*, 1992). Tanto NifA quanto GlnB são sintetizados em condições incompatíveis com a fixação do nitrogênio. No entanto, em condições favoráveis à fixação, há um aumento da expressão de *glnB* decorrente da ativação transcricional por NtrC e da uridilação da proteína GlnB (de ZAMAROCZY *et al.*, 1993; de ZAMAROCZY *et al.*, 1995; HUERGO *et al.*, 2003). O domínio N-terminal de NifA, onde está localizado o domínio GAF, está envolvido na regulação negativa de sua própria atividade na presença de amônia. Em condições propícias à fixação, GlnB-UMP liga-se ao domínio GAF de NifA, convertendo NifA para sua

forma ativa (ARSENE *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 2005; de ZAMAROCZY *et al.*, 1993; de ZAMAROCZY, 1998). Além disso, quatro resíduos de cisteína conservados na proteína NifA estão envolvidos na sensibilidade de NifA ao oxigênio (FISCHER *et al.*, 1988; LIANG *et al.*, 1991; SOUZA *et al.*, 1991; SOUZA *et al.*, 1999).

Um nível adicional da regulação da fixação do nitrogênio em *A. brasilense*, envolve a modificação pós-traducional da atividade da nitrogenase. Em condições incompatíveis com a fixação do nitrogênio, a subunidade da nitrogenase redutase é reversivelmente inativada por ADP-ribosilação através da atividade da enzima DraT. Em condições ideais de fixação, a enzima DraG está ativa e catalisa a remoção da ADP-ribose da Fe-proteína, tornando desta forma a nitrogenase redutase ativa. As proteínas PII, em *A. brasilense*, estão diretamente envolvidas na regulação do sistema DraG/DraT. Foi observado que DraT interage com GlnB e que a desuridilação de GlnB tem um papel fundamental na formação do complexo GlnB/DraT, formado quando os níveis externos de amônia aumentam, resultando na ativação de DraT, que adiciona uma ADP-ribose à nitrogenase redutase, inativando-a. Foi demonstrado recentemente que após uma elevação dos níveis externos de amônia, as proteínas PII de *A. brasilense*, GlnB e GlnZ, são seqüestradas para a membrana pelo transportador AmtB. DraG interage especificamente com GlnZ e um modelo foi proposto, onde um complexo ternário AmtB-GlnZ-DraG se formaria na membrana, quando os níveis de amônia estivessem altos. Com isso, AmtB estaria envolvido no seqüestro das proteínas PII e seus alvos, no caso, a proteína DraG. Conseqüentemente, a proteína DraG não estaria disponível no citoplasma e não removeria a ADP-ribose da Fe-proteína, mantendo-a na sua forma inativa (HUERGO *et al.*, 2006). Todavia este sistema só foi descrito até o momento em *A. lipoferum* e *A. brasilense* não tendo sido encontrado em *A. amazonense* (FU *et al.*, 1989; HARTMANN *et al.*, 1986).

A) Condições de fixação do nitrogênio



B) Choque de amônio

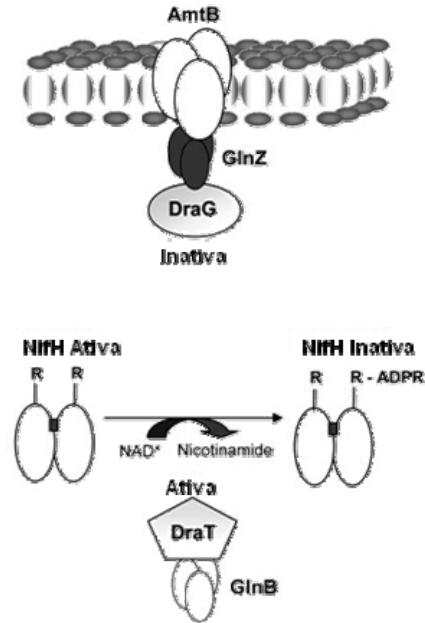


Figura I.1.6. Modelo de regulação das enzimas DraT e DraG em resposta a disponibilidade de nitrogênio em *A. brasilense*.

A) Em condições de fixação do nitrogênio, GlnB e GlnZ estão uridiladas e localizadas no citosol. DraT encontra-se inativa no citosol, enquanto que DraG está ativa devido à sua interação com GlnZ uridilada. Assim, DraG remove o grupo ADP-ribose da dinitrogenase redutase (NifH), ativando-a. B) Em condições de choque de amônio, GlnB e GlnZ são deuridiladas. GlnB deuridilada associa-se a DraT, fazendo com que esta adicione um grupo ADP-ribose e inactive NifH. Concomitantemente, GlnZ deuridilada faz com que o complexo GlnZ/DraG se associe com o transportador de membrana AmtB, interrompendo o fluxo de amônio. O seqüestro de DraG à membrana celular a separa fisicamente do seu substrato citoplasmático, NifH, inibindo o processo de remoção da ADP-ribose. Modificado de HUERGO *et al.*, 2006.

I.1.5. Objetivo geral:

Estudar os mecanismos genéticos da bactéria diazotrófica *Azospirillum amazonense* envolvidos na resposta à limitação de nitrogênio.

CAPÍTULO II

Caracterização do gene *glnK* de
Azospirillum amazonense

INTRODUÇÃO

As proteínas da família PII são altamente conservadas e têm papel central na regulação do metabolismo do nitrogênio. Os genes que codificam estas proteínas estão presentes em uma diversidade de genomas, desde procariotos até vegetais complexos (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001).

Em *E. coli*, existem dois genes que codificam para proteínas PII, *glnB* e *glnK*. Os produtos desses genes são modificados pela proteína GlnD (UTase/UR), uma enzima com características de adicionar ou remover grupos uridil, dependendo da concentração de glutamina, que sinaliza o nível celular de nitrogênio. A alta quantidade de glutamina (representando disponibilidade de nitrogênio) estimula a atividade UR, que remove os grupos UMP de GlnB-UMP e GlnK-UMP, e a baixa quantidade de glutamina (representando limitação de nitrogênio) estimula a atividade UTase, que nestas condições uridila GlnB e GlnK (REITZER, 2003; LEIGH & DODSWORTH, 2007). A forma desuridilada de GlnB ativa a atividade de fosfatase de NtrB que controla o estado de fosforilação de NtrC, que é um fator regulador da transcrição de genes controlados pela disponibilidade de nitrogênio. Ambas formas de GlnB regulam a atividade da glutamina sintetase adeniltransferase (ATase), enzima que controla a atividade da glutamina sintetase (GS). A reação de adenilação da GS e a reação de desadenilação da GS-AMP ocorrem em sítos ativos independentes. A adenilação, que inativa a GS, é sinergisticamente ativada por glutamina e PII (quando em suficiência de nitrogênio) e inibida por PII-UMP (quando em limitação de nitrogênio). Por outro lado, a remoção de AMP, que ativa a GS, é ativada por PII-UMP e inibida por PII e glutamina (figura I.1.4) (NINFA & JIANG, 2005).

A forma desuridilada de GlnK interage com o transportador de amônia AmtB, impedindo a entrada de amônia na célula em condições de excesso de nitrogênio. Alternativamente, quando há suficiência de nitrogênio, GlnK é uridilada e perde sua afinidade por AmtB, permitindo que ocorra o transporte de amônia (DIXON & KAHN, 2004).

As proteínas PII também regulam o processo de fixação de nitrogênio de muitos gêneros procarióticos. O gênero *Azospirillum* é composto por bactérias diazotróficas que promovem o crescimento de plantas de importância econômica. A espécie *A. brasilense* também possui duas proteínas PII, GlnB e GlnZ, que estão diretamente relacionadas com a regulação da fixação do nitrogênio, um processo altamente oneroso energeticamente para a célula bacteriana (de ZAMAROCZY *et al.*, 1996; HUERGO *et al.*, 2006).

O gene *glnB* de *A. brasilense* está localizado à jusante do gene *glnA*, que codifica para GS, compondo um operon regulado por dois promotores diferentes, um dependente de σ^{70} e outro dependente de σ^{54} e NtrC, este último ativo em condições de limitação de nitrogênio (de ZAMAROCZY *et al.*, 1996; HUERGO *et al.*, 2003). No entanto, *glnB* parece não ser responsável pela modificação covalente por adenilação da GS, como em *E. coli* (de ZAMAROCZY *et al.*, 1996).

Em *A. brasilense* foi demonstrado que GlnB-UMP está envolvida na ativação de NifA, uma proteína que ativa a transcrição de genes *nif* e *fix*, que codificam a Nitrogenase e suas proteínas acessórias. Devido a esta atividade de GlnB, mutantes *glnB* são incapacitados de fixar nitrogênio (de ZAMAROCZY *et al.*, 1996).

Como o gene *glnZ* (ortólogo de *glnK*) de *A. brasilense* forma um grupamento com o gene *aat*, que codifica uma possível aspartato amino transferase, foi sugerido uma possível interação de GlnZ com o produto do gene *aat* (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001).

Semelhante à *E. coli*, GlnZ interage com AmtB, em condições de excesso de nitrogênio, e além disso, seqüestra a enzima DraG para a membrana. Conseqüentemente, a fixação do nitrogênio é inativada, já que a enzima DraG é responsável pela remoção da ADP-ribose da dinitrogenase redutase (HUERGO *et al.*, 2006). *A. amazonense* não possui este sistema de inativação da nitrogenase, cuja atividade só é parcialmente inibida pela presença de amônia (FU *et al.*, 1989).

O objetivo deste trabalho é isolar e caracterizar o gene *glnK* de *A. amazonense* e as proteínas que interagem diretamente com seu produto, visando avaliar o seu papel no metabolismo do nitrogênio desta bactéria.

MATERIAIS E MÉTODOS

II.2.1. Linhagens bacterianas, meios de cultura e condições de crescimento

As linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados nesse trabalho estão descritos nas tabelas II.2.1 e II.2.2, respectivamente.

Tabela II.2.1: Linhagens bacterianas utilizadas

Linhagem	Genótipo	Referência
<i>A. amazonense</i> Y1 (ATCC35119)		
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZ.M15 Tn10</i> (Tet ^r)].	SAMBROOK & RUSSELL, 2001
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	SAMBROOK & RUSSELL, 2001

Tabela II.2.2: Plasmídeos utilizados

Plasmídeo	Descrição	Referência
pUC18	Vetor de clonagem, Amp ^r	SAMBROOK & RUSSELL, 2001.
pUCPII	pUC18 contendo parte do gene <i>glnB</i> de <i>A. amazonense</i>	Este trabalho
pAAGlnK	Fragmento genômico de <i>A. amazonense</i> , que contém os genes <i>ubiH</i> , <i>glnK</i> , <i>aat</i> e <i>ftsK</i> , clonado no sítio SmaI de pUC18	Este trabalho
pUCGLNK	Gene <i>glnZ</i> integral clonado em sítio SmaI de pUC18	Débora Trentini, este laboratório
pET23D	Vetor de expressão, Amp ^r	Novagen
pTK	Fragmento EcoRI-BamHI do plasmídeo pUCGLNK (gene <i>glnZ</i>) clonado nos sítios EcoRI-BamHI do vetor pET23D	Este trabalho

Azospirillum amazonense e *Escherichia coli* foram cultivados, respectivamente, em meio M79 (FRED & WAKSMAN, 1928) e Luria-Bertani (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). *E. coli* contendo o vetor de clonagem pUC18 (e derivados) ou pET23D (e derivados) foi cultivada com o antibiótico ampicilina na concentração de 100 µg/mL. Para a extração do RNA usado em experimentos de *Dot Blot*, *A. amazonense* foi cultivado em 100 mL meio M79 líquido a 37°C em 160 rpm de agitação orbital até atingir a DO₅₆₀ de 0,5. A cultura foi dividida em duas alíquotas iguais que foram centrifugadas (5000g por 10min) e lavadas duas vezes em 40 mL de meio mínimo LGI (DÖBEREINER *et al.*, 1995). Após nova centrifugação, uma alíquota foi resuspendida em 40 mL de meio LGI sem fonte de nitrogênio e outra em 40 mL de meio LGI acrescido de NH₄Cl a 50 mM. As células foram mantidas neste meio por 3 h a 37°C e 160 rpm de agitação.

II.2.2. Métodos em biologia molecular

Isolamento de DNA plasmidial, eletroforese em gel de agarose, purificação de DNA a partir de gel de agarose por eletroeluição, *Dot Blotting*, *Southern Blotting*, clonagem, quantificação de ácidos nucleicos por espectrofotometria UV, transformação bacteriana por eletroporação e seleção de transformantes foram conduzidos como descrito por Russell & Sambrook (2001). Os ácidos nucleicos também foram quantificados utilizando o aparelho Qubit (Invitrogen).

PCR para amplificação de parte do gene *glnB* foi realizado como descrito por Potrich *et al.* (2001).

Enzimas de restrição comerciais foram utilizadas de acordo com as instruções dos fabricantes. Purificação de DNA foi realizada com o *kit* GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). Extração de DNA genômico de *A. amazonense* foi realizada com proteinase K e fenol/clorofórmio. RNA foi extraído com reagente Trizol (Invitrogen) e tratado com DNase (Promega), segundo orientações do fabricante.

Cerca de 3 µg de RNA total de cada condição foi transferido para membrana de nylon Hybond-N⁺ (GE Healthcare) utilizando o aparelho BioDot (BioRad), conforme as instruções do fabricante.

II.2.3. Reação de seqüenciamento

O DNA plasmidial extraído foi submetido à reação de seqüenciamento, utilizando o *kit* Dye terminator cycle sequencing (GE Healthcare), desenvolvido para o seqüenciador automático MEGABACE 1000, conforme o manual do fabricante. A seqüência total clonada de pAAGLNK foi determinada utilizando uma série de oligonucleotídeos iniciadores conforme a necessidade.

II.2.4. Análise *in silico* da região genômica de *glnK*

O pacote de programas Staden foi utilizado para processar os resultados de seqüenciamento, para montar a matriz de peso das regiões de ligação a NtrC a partir de sítios UAS experimentalmente comprovados (tabela II.2.3) e localizar prováveis sítios de ligação a NtrC, σ^{54} e σ^{70} utilizando as matrizes de peso correspondentes.

Os genes foram identificados pelo software Blastx e Blastn (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e anotados utilizando o programa Artemis (RUTHERFORD *et al.*, 2000). O programa Muscle foi utilizado para alinhamento de seqüências (EDGAR, 2004). MEGA 4 foi utilizado para as análises filogenéticas (TAMURA *et al.*, 2007). Argo (ENGELS *et al.*, 2006) foi utilizado para comparar a região gênica de *glnK* de *A. amazonense* com a região gênica de *glnZ* de *A. brasilense* (número de acesso AF279917). MatGat (CAMPANELLA *et al.*, 2003) foi usado para o cálculo de similaridade e identidade de GlnK de *A. amazonense* com as proteínas GlnB de *A. brasilense* (número de acesso AAK01659.1), GlnB de *Azoarcus sp.* (AAG40188.1), GlnB de *E. coli* (YP_001459348.1), GlnB de *Herbaspirillum seropedicae* (CAM32567.1), GlnB de *Klebsiella pneumoniae* (YP_001336518.1), GlnB de *Rhodospirillum rubrum* (AAB84167.1), GlnJ de *Rhodospirillum rubrum* (AAK00342.1), GlnK de *Azoarcus sp.* (AAG40187.1), GlnK de *E. coli* (YP_001457295.1), GlnK de *H. seropedicae* (AAZ43074), GlnK de *K. pneumoniae* (YP_001334095.1), GlnK de *R. rubrum* (AAF28331.1), GlnY de *Azoarcus sp.* (AAG40186.1) e GlnZ de *A. brasilense* (AAG10012.1). Os programas Mfold (ZUKER, 2003) e Sfold (DING & LAWRENCE, 2003) foram utilizados para prever grampos na estrutura do RNA.

Tabela II.2.3: Sequências de ligação à NtrC experimentalmente comprovadas

Organismo	Gene/sítio	Seqüencia	Referência
<i>A.</i>			
<i>brasiliense</i>	<i>glnB1</i>	TGCGCGGATTGCTTGCA	HUERGO <i>et al.</i> , 2003
	<i>glnB2</i>	TGCACAAATATTGTTC	
	<i>glnB3</i>	TGCCGCCACGGTGGCA	
<i>E. coli</i>			
	<i>astC1</i>	ATGTCAACGATGGCGCA	KIUPAKIS & REITZER, 2002
	<i>astC2</i>	TGCCCCGCTTTTGGTGCG	
	<i>astC3</i>	TGCGTCAGAATGGCGCA	
<i>E. coli</i>			
	<i>glnA1</i>	TGCACCAACATGGTGCT	ATKINSON <i>et al.</i> , 2002
	<i>glnA2</i>	AGCACTATATTGGTGCA	
<i>H. seropedicae</i>			
	<i>nifA</i>	AGCACGCACGTGGTGCA	PERSUHN <i>et al.</i> , 2000
<i>K. pneumoniae</i>			
	<i>glnA</i>	TGCACTATATTGGTGCA	DIXON, 1984
<i>Rhodobacter capsulatus</i>			
	<i>anfA</i>	CGCCTTCGAGCGGGGCA	CULLEN <i>et al.</i> , 1998
	<i>anfA2</i>	TGCCCGAATAACGGGCA	
	<i>mopA</i>	CGCCAATTCATGGGCAA	
	<i>mopA2</i>	AGCCCGTTTTTCGCATCA	
	<i>nifR3</i>	TGCCTATATTTTGTGCG	
	<i>nifR3</i>	TGCCGATTTTCTCGCC	
	<i>glnB2</i>	CGCCTAAATCATCATCG	
<i>R. capsulatus</i>			
	<i>nifA1I</i>	TGCCAGATTTTCCGGCC	FOSTER-HARNETT <i>et al.</i> , 1994
	<i>nifA1II</i>	CGCCGCATAATTGCGCA	
	<i>nifA2I</i>	CGCCATTTTTTTCGGCG	
	<i>nifA2II</i>	CGCCTCAAAGTTGATCT	
	<i>glnB</i>	CGCACAATAAATATGCT	
<i>R. capsulatus</i>			
	<i>ureD</i>	CGCTGAATTTGCGGGCA	MASEPOHL, 2001
	<i>ureD2</i>	CGCGGATTTGTGCGGGA	
<i>Salmonella typhimurium</i>			
	<i>dhuA</i>	TGCACCTTTTTGGTGCA	FERRO-LUZZI & NIKAIDO, 1985
	<i>ntrBCr</i>	TGCACTAAAATGGTGCA	
	<i>glnA1</i>	AGCACTATTTTGGTGCA	
	<i>glnA2</i>	TGCACCAATGTGGTGCA	

II.2.5. Expressão de GlnK-T7 tag

A expressão de GlnK-T7 tag foi realizada conforme Sambrook & Russel (2001). O plasmídeo recombinante pTK foi transformado na cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli* e a proteína foi expressa após indução com 800 mM de IPTG. Após adição de IPTG, a cada hora era retirada uma alíquota de 1 mL da cultura para análise de SDS-PAGE. SDS-PAGE foi realizado como descrito no manual do equipamento Mini Protean 3 (BioRad). O *stacking gel* foi preparado com poliacrilamida na concentração final de 4%. O *running gel* foi preparado com poliacrilamida na concentração final de 17%. O padrão de massa molecular utilizado foi Benchmark Ladder (Invitrogen). As amostras foram migradas em gel em 30 mA por 190 minutos. Depois da eletroforese, as proteínas foram coradas com Coomassie Blue G-250 (NEUHOFF *et al.*, 1985).

RESULTADOS

II.3.1. Clonagem parcial do gene *glnB* de *A. amazonense*

Potrich *et al.* (2001) desenvolveram *primers* para amplificar o gene *glnB* baseados em regiões conservadas, determinadas pela análise de ortólogos desse gene de diferentes diazotrofos. Através da técnica de PCR, utilizando como molde o DNA genômico de *A. amazonense*, foi isolado um produto de aproximadamente 230 pb, que foi clonado, gerando o plasmídeo pUCPII. Esse fragmento teve sua seqüência de nucleotídeos determinada e através de programas de análise de seqüências (*i.e.* Blast), foi verificado que tinha alto grau de similaridade com o gene *glnB* de *A. brasilense*, confirmando a clonagem parcial do gene *glnB* de *A. amazonense*.

II.3.2. Análise do número de cópias de genes que codificam para PII em *A. amazonense*

O fragmento de DNA contendo parte do gene *glnB* de *A. amazonense* foi utilizado como sonda em experimentos de hibridização com DNA genômico digerido com diferentes enzimas de restrição (Sall, NcoI, PstI e HincII) visando determinar a número de cópias de genes que codificam para proteínas PII no genoma de *A. amazonense*. A figura II.3.1 demonstra que no genoma de *A. amazonense* há dois genes que codificam para proteínas PII. No DNA genômico digerido com Sall, foram detectados duas regiões contendo fragmentos de DNA que hibridizaram com a sonda, sendo o sinal mais forte em fragmentos de aproximadamente 2000 pb e o mais fraco de

aproximadamente 3000 pb. No DNA digerido com NcoI, houve um sinal forte em fragmentos com 4000 pb e um mais fraco em fragmentos com 1500 pb. No DNA digerido com PstI houve um sinal de hibridização nos fragmentos com mais de 5000 pb. No DNA digerido com HincII, houve três sinais de hibridização, o mais forte em fragmentos com cerca de 2000 pb e os mais fracos em fragmentos de 4300 pb e 3100 pb.

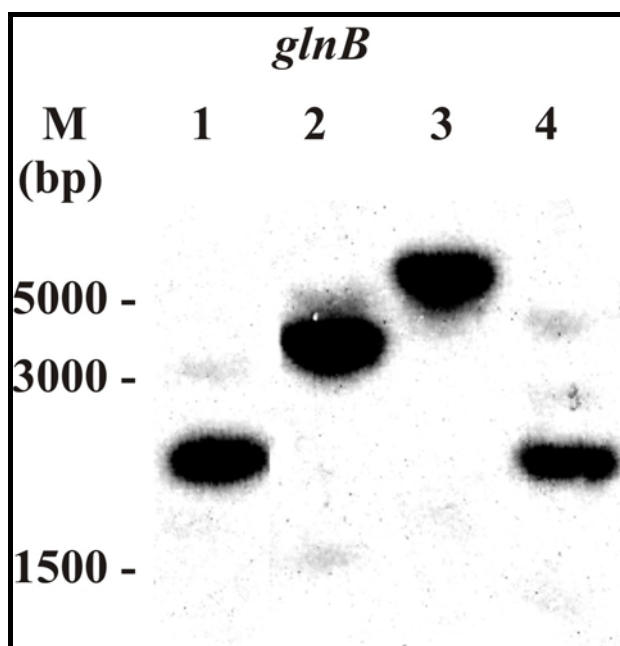


Figura II.3.1. Padrão de hibridização do gene *glnB* com o DNA genômico de *A. amazonense* digerido com diferentes enzimas de restrição.

M - Marcador de massa molecular, 1 -DNA genômico de *A. amazonense* digerido com Sall, 2 - com NcoI, 3 - PstI e 4 – com HincII.

II.3.3. Clonagem e identificação do gene *glnK* de *A. amazonense*

A partir dos resultados anteriores de hibridização, foi construída uma biblioteca genômica parcial oriunda dos fragmentos do DNA genômico de *A. amazonense* digerido com Sall, visando isolar genes que codificam para proteínas PII. Foram analisadas aproximadamente 80 seqüências de diferentes clones e através de análise comparativa (pelo programa Blastx), foi identificado um clone (pAAGLNK) que continha um gene que codifica para uma proteína PII. O clone pAAGLNK foi totalmente seqüenciado e analisado por ferramentas de bioinformática, sugerindo que o gene em questão codifica para um ortólogo de proteínas GlnK (figura II.3.2).

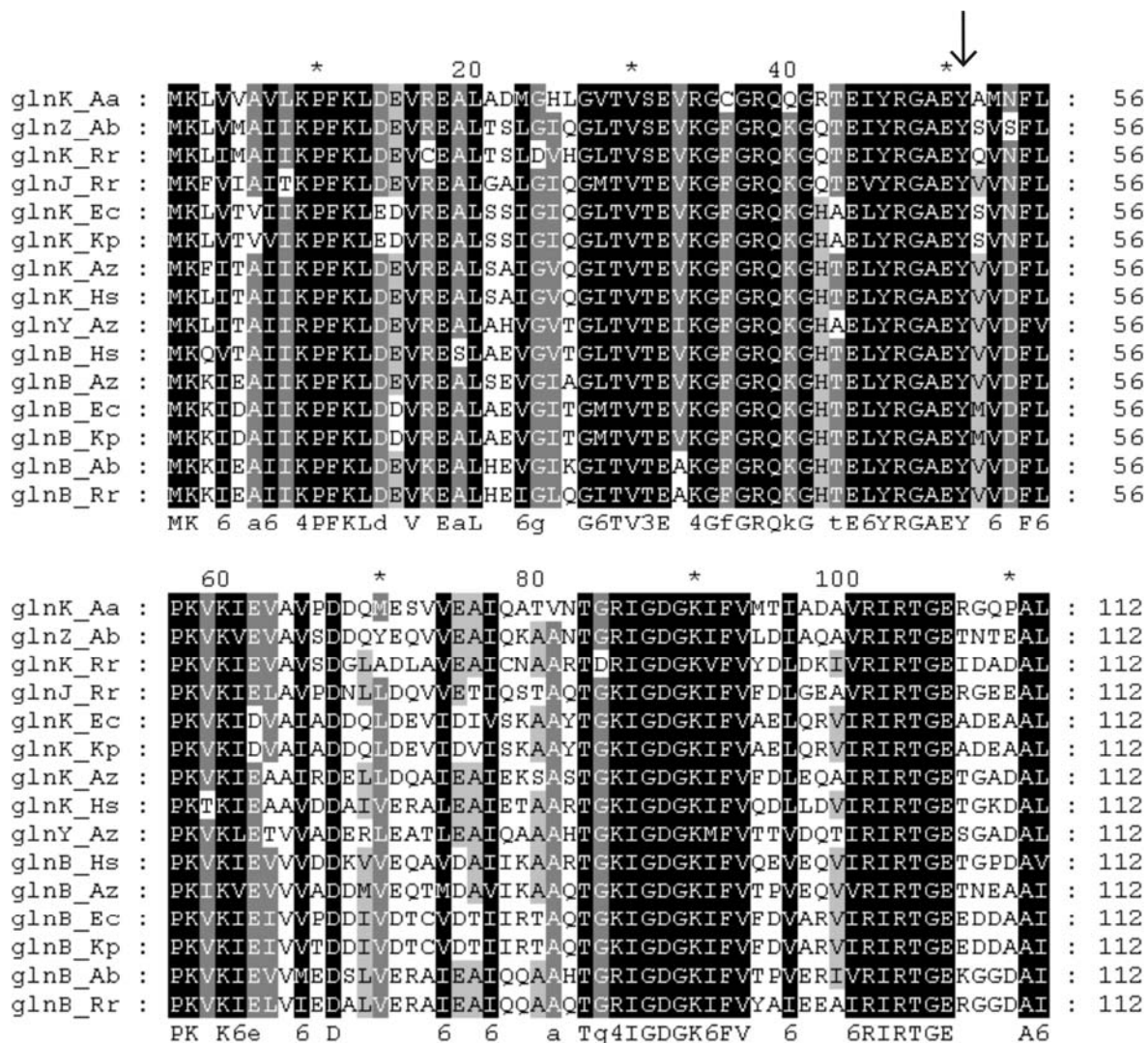


Figura II.3.2. Alinhamento de GlnK de *A. amazonense* com proteínas PII de diferentes bactérias. *A. amazonense* (Aa); *A. brasilense* (Ab), *Azotobacter sp.* (Az), *E. coli* (Ec), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs), *Klebsiella pneumoniae* (Kb) e *Rhodospirillum rubrum* (Rr). A seta indica o resíduo onde há modificação covalente pela enzima UTase/UR. O alinhamento foi realizado pelo programa ClustalX.

A tabela II.3.1 mostra os graus de similaridade e identidade do produto deduzido do gene *glnK* de *A.amazonense* com PIIs de diferentes organismos. Como podemos observar a proteína GlnK de *A. amazonense* possui 73,2 % e 67,9 % de identidade com as proteínas GlnZ de *A. brasilense* e GlnJ de *R. rubrum*, respectivamente, e 84,8 % de similaridade com ambas.

Tabela II.3.1: Grau de similaridade e identidade da proteína GlnK de *A. amazonense* com proteínas PII de diferentes organismos.

Proteína	Bactéria	Identidade (%)	Similaridade (%)
GlnB	<i>A. brasilense</i>	59,8	77,7
	<i>Azotobacter sp.</i>	57,1	77,7
	<i>E. coli</i>	59,8	79,5
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	60,7	76,8
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	58,9	78,6
	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	60,7	78,6
GlnJ	<i>R. rubrum</i>	67,9	84,8
GlnK	<i>Azotobacter sp.</i>	59,8	80,4
	<i>E. coli</i>	57,1	78,6
	<i>H. seropedicae</i>	61,6	78,6
	<i>K. pneumoniae</i>	58,9	78,6
	<i>R. rubrum</i>	62,5	74,1
GlnY	<i>Azotobacter sp.</i>	58,9	81,3
GlnZ	<i>A. brasilense</i>	73,2	84,8

Com o objetivo de obter mais informações sobre a classificação do gene isolado dentro do grupo das proteínas GlnK, foi realizada uma análise filogenética pelo método *Neighbor Joining*. A análise deste resultado confirma que a proteína GlnK de *A. amazonense* forma um clado com proteínas GlnK de diferentes organismos (fig. II.3.3).

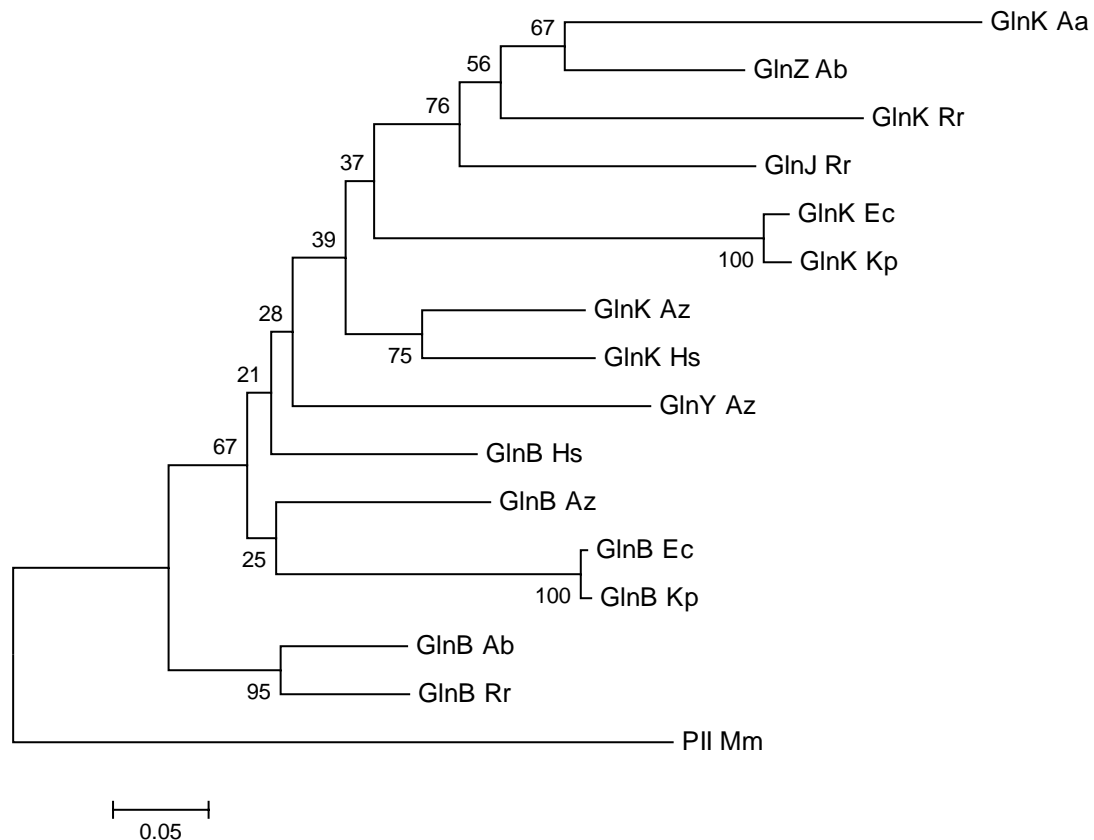


Figura II.3.3. Análise filogenética das proteínas PII de diferentes diazotrofos. A análise foi realizada através do método *Neighbor-Joining*, utilizando o software MEGA 4.0. Os valores de *bootstrap* (1000 replicatas) são mostrados na base do clado. *A. amazonense* (Aa); *A. brasilense* (Ab), *Azotobacter sp.* (Az), *E. coli* (Ec), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs), *Klebsiella pneumoniae* (Kb) e *Rhodospirillum rubrum* (Rr). PII Mm – proteína PII de *M. maripaludis* (ZP_01801294): grupo externo.

A análise da seqüência de nucleotídeos do fragmento isolado contendo o gene *glnK* revelou que este gene se encontra em um contexto gênico igual ao de *A. brasilense*: à montante do gene *glnK* se encontra o gene *ubiH* (que codifica uma provável enzima envolvida na síntese de ubiquinona) e à jusante, os genes *aat* (que codifica uma provável aspartato amino transferase) e *ftsK* (que codifica uma proteína envolvida em divisão celular), respectivamente. As regiões codificadoras possuem um alto grau de conservação, em contraposição com as regiões intergênicas, que não possuem nenhum grau de identidade entre estas espécies (fig. II.3.4).

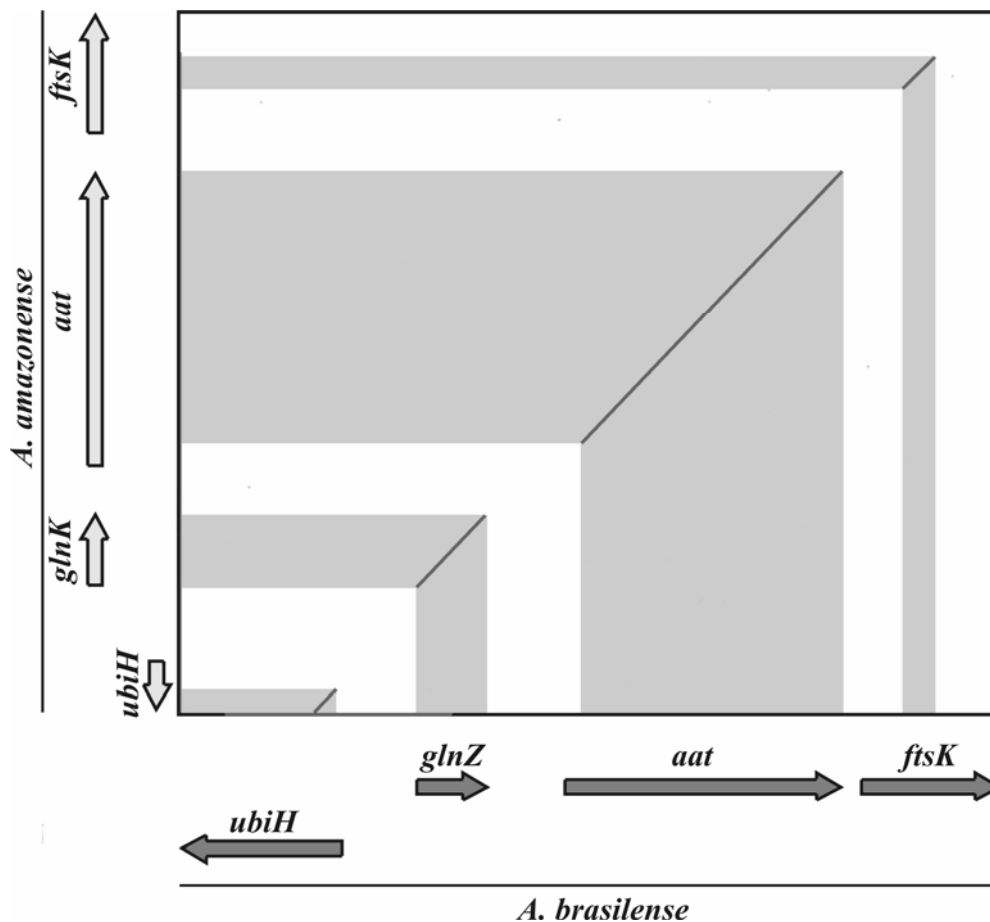


Figura II.3.4. Representação gráfica demonstrando grau de identidade entre a região gênica de *glnZ* de *A. brasilense* com a região gênica de *glnK* de *A. amazonense*. A linha diagonal mostra as regiões de identidade. Os genes são representados pelas setas e o sentido delas indica a orientação da transcrição. A representação gráfica foi gerada pelo programa Argo.

II.3.4. Presença de dois genes que codificam proteínas PII no genoma de *A. amazonense*

Para confirmação da presença de um segundo gene que codifica proteínas do tipo PII em *A. amazonense* foi realizado um experimento de hibridização utilizando como sonda o fragmento contendo o gene *glnK*. Através deste experimento foi possível confirmar que os fragmentos que contêm o gene *glnK* de *A. amazonense* correspondem aos sinais fracos de hibridização quando *glnB* foi utilizado como sonda (comparar a figura II.3.1 com a figura II.3.5).

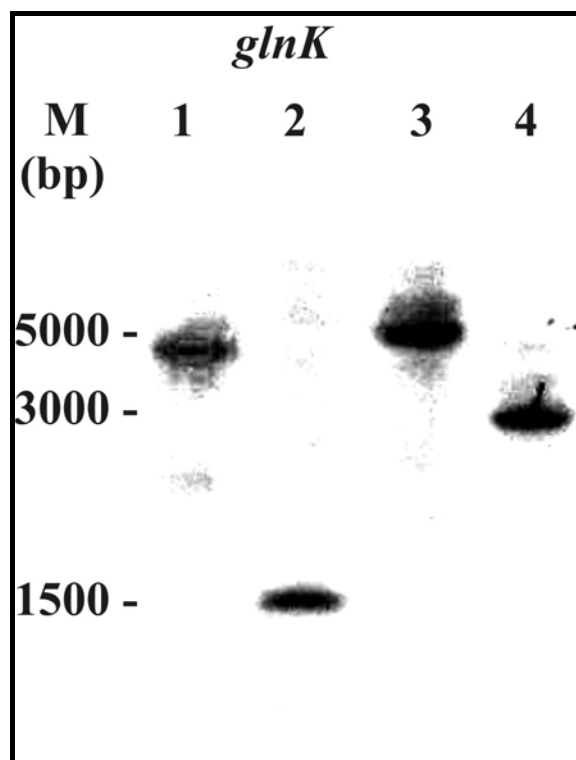


Figura II.3.5. Padrão de hibridização do gene *glnK* com o DNA genômico de *A. amazonense* digerido com diferentes enzimas de restrição.

M - Marcador de massa molecular, 1 -DNA genômico de *A. amazonense* digerido com SalI, 2 - com NcoI, 3 - PstI e 4 – com HincII.

A análise da figura II.3.5 revela que no DNA genômico digerido com Sal I, houve dois sinais de hibridização, sendo o mais forte em fragmentos de aproximadamente 4400 pb e o mais fraco no de aproximadamente 2000 pb. No DNA digerido com NcoI, houve um sinal forte em fragmentos com 1500 pb. No DNA digerido com PstI houve um sinal forte de hibridização nos fragmentos com cerca de 5000 pb e outros mais fracos em fragmentos com mais de 5000 pb. No DNA digerido com HincII, houve um sinal forte em fragmentos com cerca de 3000 pb.

II.3.5. Análise “*in silico*” das regiões regulatórias dos gene *glnK* e *aat* de *A. amazonense*

A proteína NtrC está associada à ativação da transcrição de genes do metabolismo do nitrogênio, sendo capaz de se ligar ao DNA em regiões à montante de promotores dependentes de σ^{54} . Com o objetivo de analisar os mecanismos de regulação que ocorrem no gene *glnK* de *A. amazonense*, a região regulatória foi analisada através de ferramentas de bioinformática. Os motivos pesquisados foram sítios de ligação de

proteínas relacionadas à ativação da transcrição como NtrC e sítios de ligação para subunidade σ^{54} da RNA polimerase. Foi construída uma matriz de peso a partir de seqüências de ligação a NtrC caracterizadas de genes de diferentes proteobactérias (tabela II.3.2). Analisando as regiões intergênicas do grupamento gênico *ubiH-glnK-aat-ftsK*, foram encontradas 4 possíveis regiões de ligação a NtrC, todas à montante de *glnK* (fig. II.3.6).

Tabela II.3.2: Matriz de peso baseada em 28 sítios caracterizados de ligação a NtrC de genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio de proteobactérias.

A matriz foi desenvolvida utilizando o programa Make_Weights do pacote Staden.

P	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A	5	0	0	10	3	9	16	10	9	9	3	0	1	3	0	1	19
C	9	0	27	13	15	7	4	2	3	2	2	5	5	4	1	26	2
G	0	27	1	3	5	6	1	2	1	5	3	16	19	8	23	1	4
T	14	1	0	2	5	6	7	14	15	12	20	7	3	13	4	0	3

Utilizando uma matriz de peso para promotores σ^{54} de Rhizobiales (DOMBRECHT *et al.*, 2002), foi encontrado apenas um promotor dependente de σ^{54} à montante do gene *glnK*. No entanto, o promotor *glnK* não segue o padrão usual GG-10(N)-GC, já que o último nucleotídeo da posição -12 é uma adenina e não uma citosina (fig. II.3.6). Também foi encontrado um possível promotor dependente de σ^{70} sobreposto a um sítio de ligação a NtrC à montante do gene *glnK* e um promotor σ^{70} com alta conservação à montante do gene *aat* (fig. II.3.6).

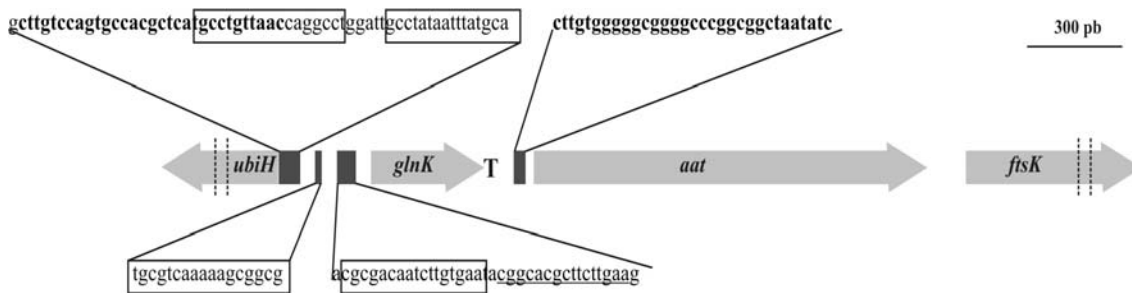


Figura II.3.6. Mapa físico e representação das regiões regulatórias dos genes *glnK* e *aat* de *A. amazonense*.

glnK, *ubiH*, *aat* e *ftsK* são genes que foram identificados pelo seqüenciamento do fragmento de aproximadamente 3 Kb do plasmídeo pAAGLNK. As setas demonstram o sentido da transcrição gênica e as que são interrompidas por traços pontilhados possuem as seqüências parciais dos genes. As seqüências em negrito correspondem a regiões de ligação do fator σ^{70} , encontradas utilizando a matriz de peso descrita por MacLellan *et al.*, 2006. A seqüência sublinhada corresponde a um possível promotor dependente de σ^{54} , tendo como base a matriz de peso descrita por Dombrecht *et al.*, 2002. As seqüências cercadas por retângulos são possíveis locais de ligação do fator de transcrição NtrC, tendo como base a matriz de peso descrita por este trabalho. Em T em negrito está a localização de um possível terminador de transcrição independente de fator Rho, determinado pela utilização do programa MFold.

Para a determinação de terminadores transcricionais independentes do fator Rho, foi utilizado o software MFold, que permite prever a formação de estruturas secundárias no RNA a partir da seqüência de DNA. Parte da região 3' do gene *glnK* está envolvida na formação de um grampo de $\Delta G^\circ = -10$ Kcal/mol sendo este grampo imediatamente seguido por uma região rica em uridilas (fig. II.3.7).

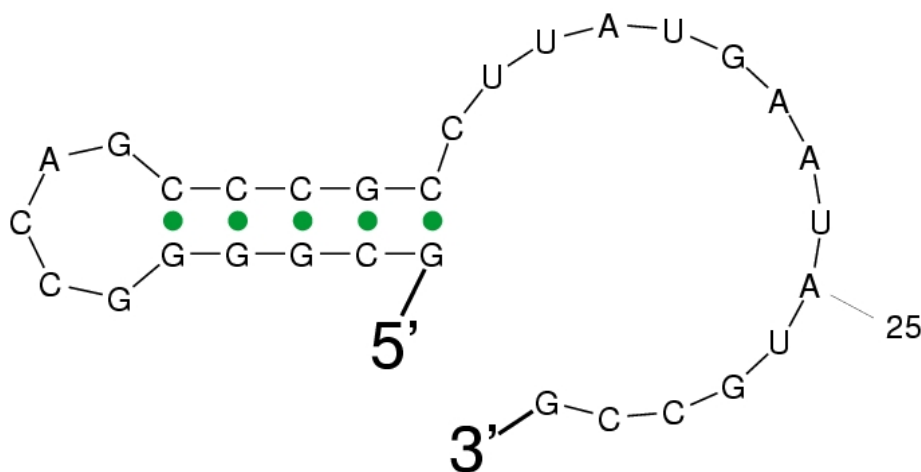


Figura II.3.7. Representação gráfica de um possível grampo de terminação do gene *glnK* de *A. amazonense* gerada pelo software SFOLD. $\Delta G^\circ = -10$ Kcal/mol.

II.3.6. Regulação da expressão dos genes *glnB* e *glnK* de *A. amazonense*

Na maioria dos organismos a expressão das proteínas tipo PII apresenta regulação transcricional dependente da disponibilidade de nitrogênio. Em *A. amazonense* os dois genes isolados neste trabalho, que codificam para as proteínas GlnB e GlnK, também apresentam esse perfil. Através do experimento de *Dot blot* foi comprovado que os genes *glnB* e *glnK* são induzidos quando a bactéria é cultivada em meio sem nitrogênio disponível. A expressão de *glnB* aumenta após a primeira hora de cultivo em meio sem nitrogênio, enquanto que o gene *glnK* atinge o nível máximo de expressão somente após 2 horas (fig.II.3.8).

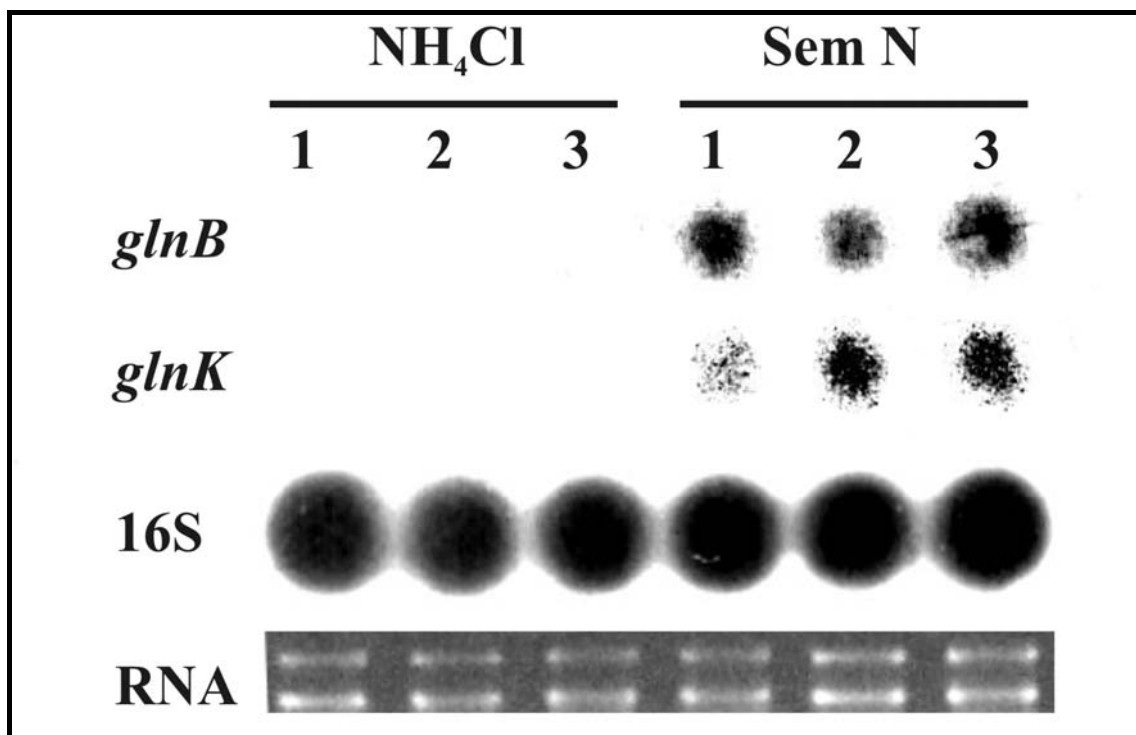


Figura II.3.8. Análise da expressão dos genes *glnB* e *glnK* de *A. amazonense*. Padrão de hibridização dos genes *glnB*, *glnK* e rDNA 16S com o RNA total de *A. amazonense* cultivado em condições de suficiência de nitrogênio (NH_4Cl 50 mM) ou ausência de nitrogênio. Os números 1, 2 e 3 referem-se a uma, duas e três horas de cultivo. NH_4Cl indica cultivo em meio contendo cloreto de amônia 50 mM e sem N indica cultivo em meio desprovido de fonte nitrogenada. *glnB*, *glnK* e 16S indicam a sonda utilizada. RNA mostra as bandas de rRNA 23S e rRNA 16S resolvidas por eletroforese em gel de agarose 2% e coradas com brometo de etídeo.

II.3.7. Expressão da proteína GlnK-T7 Tag em *Escherichia coli*

Visando purificar a proteína GlnK e estudar seus possíveis alvos de interação, foi construído o plasmídeo pTK, que expressa a proteína GlnK fusionada com um T7 Tag. O tamanho deduzido de GlnK-T7 Tag é de 13,6 KDa. O experimento de SDS-PAGE demonstrou que a proteína heteróloga está com a massa molecular esperada de 13,6 KDa e que está na fração solúvel do extrato protéico (fig. II.3.9).

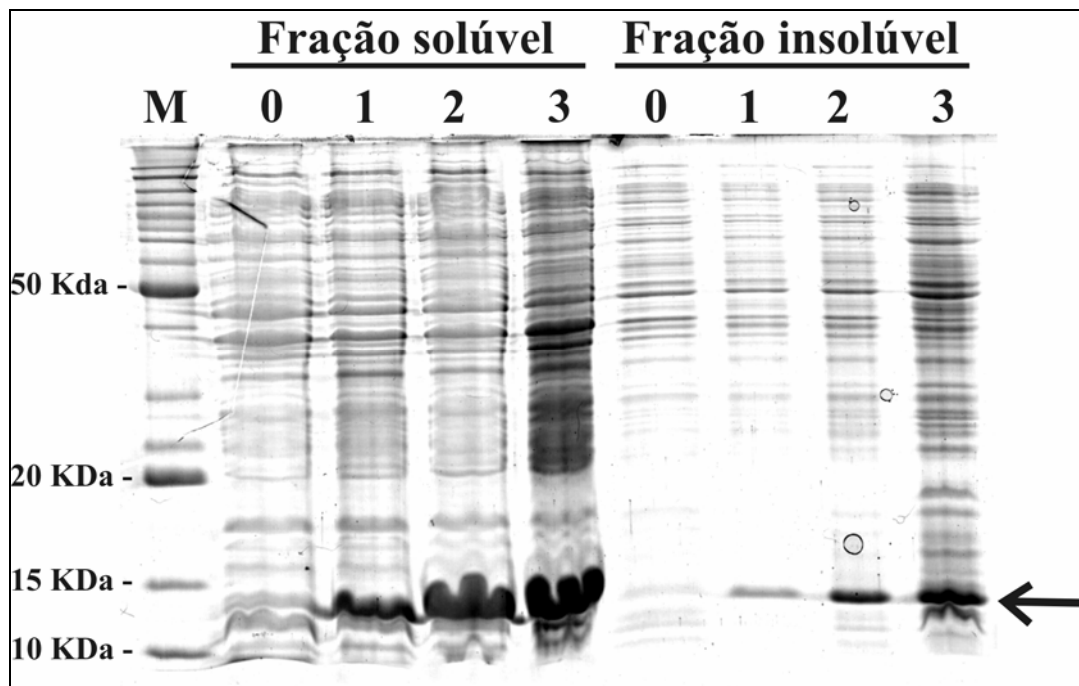


Figura II.3.9. Análise SDS-PAGE da expressão heteróloga da proteína GlnK-T7 de *A. amazonense*. Eletroforese em gel de poliacrilamida 17% em condições desnaturantes (SDS-PAGE). M – Benchmark Ladder, 0 – não induzido, 1, 2 e 3 – uma, duas e três horas após indução com IPTG. A seta à direita mostra a faixa onde há acúmulo de GlnK-T7.

DISCUSSÃO

As proteínas triméricas PII compõem uma das famílias mais conservadas no mundo procariótico e têm papel significativo na coordenação do metabolismo do nitrogênio de muitos microrganismos. A presença de homólogos de PII no genoma de bactérias da classe Proteobacteria é variada, de um a três genes (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). *A. brasilense* possui dois genes que codificam para proteínas PII, *glnB* e *glnZ*, que possuem diferentes funções no metabolismo do nitrogênio (de ZAMAROCZY, 1998; HUERGO *et al.*, 2006).

O presente trabalho demonstrou, por intermédio de experimentos de hibridização (fig. II.3.1 e fig. II.3.5), que o genoma de *A. amazonense* contém dois genes que codificam proteínas PII. A partir desta informação, foi construído um banco genômico parcial de *A. amazonense*, que permitiu o isolamento e seqüenciamento integral de um fragmento de aproximadamente 3 kb que continha o gene *glnK*, um parálogo de *glnB*.

De modo geral, as proteínas GlnK são distinguidas das proteínas GlnB por terem um resíduo hidrofóbico na posição 3 e isoleucina, treonina ou metionina na posição 5 (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). O produto do gene *glnK* de *A. amazonense* possui uma leucina na posição 3 e uma valina na posição 5 (fig. II.3.2). A proteína GlnK de *A. amazonense* possui 73,2 % e 67,9 % de identidade com as proteínas GlnZ de *A. brasilense* e GlnJ de *R. rubrum*, respectivamente, e 84,8 % de similaridade com ambas (tabela II.3.1). A análise filogenética, feita pelo método *Neighbor-Joining*, indica uma grande proximidade evolutiva de GlnK com essas proteínas (fig. II.3.3). Como GlnZ de *A. brasilense* é altamente similar com a proteína GlnK de *Rhizobium etli*,

Arcondéguy *et al.* (2001) sugeriram que essa proteína fosse designada como GlnK. Por isso, o gene isolado por nosso trabalho foi denominado desse modo. A análise filogenética revelou que as proteínas PII de *A. amazonense* estão em clados discretos, assim como em muitas bactérias da subclasse α -proteobacteria, sugerindo que ocorreu um evento de duplicação gênica anterior ao evento de especiação (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001; de ZAMAROCZY, 1998; TRENTINI, 2007).

A análise da estrutura primária de GlnK de *A. amazonense* (fig. II.3.2) mostra que na posição 51 há um resíduo de tirosina, provável sítio de modificação covalente pela ação da enzima UTase/UR (GlnD). Nas bactérias da classe Proteobacteria, as proteínas PII são modificadas covalentemente pela enzima UTase/UR dependendo do status de nitrogênio. Quando há disponibilidade de nitrogênio, a atividade UR promove a remoção de UMP da tirosina-51, e quando há limitação de nitrogênio, a UTase transfere um UMP para a tirosina-51. Assim, o estado de modificação de PII, desuridilada ou uridilada, definirá a atividade dessa proteína (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). A forma desuridilada das proteínas PIIs (suficiência de nitrogênio) liga-se a histidina proteína cinase NtrB e ativa sua atividade de fosfatase, que conseqüentemente remove o fosfato de NtrC, inativando esse importante fator de transcrição de genes do metabolismo do nitrogênio. A forma fosforilada de NtrC (ativa) está presente quando há limitação de nitrogênio, ou melhor, quando as PIIs estão totalmente uridiladas e incapazes de interagir com NtrB (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001; DIXON & KAHN, 2004).

Em *E. coli*, o gene *glnK* e o gene *amtB* (que codifica um transportador de amônia) formam um operon e isso levantou a hipótese de que os produtos protéicos desses genes interagiriam fisicamente (THOMAS *et al.*, 2000). Recentemente muitos estudos comprovaram a interação física de GlnK com AmtB em diferentes organismos (CONROY *et al.*, 2007; HUERGO *et al.*, 2006; LEIGH & DODSWORTH, 2007; WOLFE *et al.*, 2007). O transportador de amônia AmtB é inativado pela formação de um complexo reversível com GlnK em resposta a mudanças micromolares da concentração extracelular de amônia (JAVELLE *et al.*, 2004).

Muitos organismos, de *Archaea* a bactérias, possuem essa mesma organização gênica, portando foi proposto que os genes *glnK* e *amtB* constituiriam um sistema sensor de amônia ancestral e que subseqüentemente teria se adaptado ao

controle de outros aspectos do metabolismo do nitrogênio (JAVELLE & MERRICK, 2005).

No entanto, como mostrado na figura II.3.4, o gene *glnK* de *A. amazonense* está em um contexto gênico não usual, similar ao contexto do gene *glnZ* de *A. brasilense*, sendo flanqueado à montante pelo gene *ubiH*, que provavelmente codifica uma enzima envolvida na síntese de ubiquinona, e à jusante pelos genes *aat*, que codifica uma provável aspartato aminotransferase (transaminase envolvida na conversão de glutamato e oxalacetato em L-aspartato e 2-cetoglutarato e vice-versa) e *ftsK*, envolvido na divisão celular (de ZAMAROCZY, 1998). Comparando a região do gene *glnK* de *A. amazonense* com a região do gene *glnZ* de *A. brasilense* por *dot plot*, verificamos que há um alto grau de identidade nas regiões codificadoras, em contraposição com as regiões intergênicas, que não possuem conservação. Tendo em vista que *glnZ* está localizado à montante do gene *aat*, Arcondéguy *et al.* (2001) sugeriram que GlnZ poderia regular o produto deste gene.

As proteínas GlnJ de *R. rubrum* e GlnZ de *A. brasilense* interagem fisicamente com a proteína DraG, que tem papel fundamental na reativação da dinitrogenase redutase através da remoção da ADP-ribose. Essas proteínas estão envolvidas na formação de um complexo ternário AmtB-GlnZ(GlnJ)-DraG na membrana plasmática, impossibilitando a ativação da Fe-proteína no citoplasma em condições de suficiência de nitrogênio (HUERGO *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2005). No entanto, não foi localizado nenhum gene que codifique as enzimas do sistema DraG/DraT no genoma de *A. amazonense* (FU *et al.*, 1989), conseqüentemente estudos são necessários para elucidar o papel de GlnK em *A. amazonense*.

Em *E. coli*, a enzima glutamina sintetase (GS) é regulada por adenilação e as proteínas PII têm papel importante nesse controle, entretanto, em *A. brasilense*, nem GlnZ, nem GlnB têm papel na adenilação da GS (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001; de ZAMAROCZY, 1998; LEIGH & DODSWORTH, 2007).

A região à montante de *glnK* de *A. amazonense* demonstra elementos usuais de genes regulados pela disponibilidade de nitrogênio, como sítio de ligação a NtrC e o promotor dependente de σ^{54} . Em *K. pneumoniae*, *E. coli*, *A. brasilense*, *Azorhizobium caulinolans* e *Rhizobium etli*, *glnK* é transcrito principalmente através de um promotor dependente de σ^{54} ativado por NtrC em condições de limitação de

nitrogênio (ATKINSON *et al.*, 1998; de ZAMAROCZY, 1998; JACK *et al.*, 1999; MICHEL-REYDELLET *et al.*, 1999; TATÉ *et al.*, 1998).

Foi construída uma matriz de peso considerando as seqüências UASs de NtrC de diferentes proteobactérias (tabela II.3.2), que permitiu localizar quatro sítios de ligação a NtrC à montante de um possível promotor dependente de σ^{54} do gene *glnK* (fig. II.3.6). A presença de inúmeros sítios de NtrC estaria envolvida na oligomerização desse fator de transcrição (METTKE *et al.*, 1995), que interagiria com o aparato RNAPol- σ^{54} por uma alça de DNA gerada pela proteína IHF (DIXON & KAHN, 2004). O promotor σ^{54} putativo foi encontrado usando uma matriz de peso definida para promotores de organismos da ordem Rhizobiales (DOMBRECHT *et al.*, 2002) e desvia um pouco do consenso na região -12 pela presença de uma adenina no local de uma citosina.

Além dos sítios de ligação à NtrC e à σ^{54} , há um provável sítio de ligação ao fator σ^{70} sobreposto aos sítios de NtrC (fig. II.3.6), baseando-se no consenso definido por MacLellan *et al.* (2006). Uma situação parecida ocorre na região regulatória do operon *nifR3-ntrBC* de *A. brasilense*, que possui um promotor putativo dependente de σ^{70} sobreposto a uma provável UAS de NtrC (MACHADO *et al.*, 1995). Isso também ocorre na região regulatória do operon *glnBA* de *A. brasilense* onde em condições de limitação de nitrogênio *glnB* e *glnA* são cotranscritos em grande quantidade pela ação de um promotor dependente de σ^{54} e em condições de excesso de nitrogênio, os genes são transcritos em um nível menor através de um promotor σ^{70} que se sobrepõe a um sítio de ligação a NtrC (de ZAMAROCZY *et al.*, 1990). Huergo *et al.* (2003) demonstraram que a transcrição de *glnB* é dependente de NtrC e que essa proteína exerce um efeito negativo na transcrição dependente do promotor σ^{70} .

O gene *glnZ* de *A. brasilense* é transcrito de forma monocistrônica e possui dois terminadores independentes de Rho à jusante de sua região codificadora, confirmados pelos resultados de hibridização (de ZAMAROCZY, 1998). De forma similar, é provável que o gene *glnK* de *A. amazonense* não forme um operon com o gene *aat*. Dois fatos que corroboram com esta hipótese são a presença de um possível terminador na região 3' de *glnB* e a presença de um promotor σ^{70} altamente conservado à montante do gene *aat*, segundo o consenso definido para *Rhizobia* (MacLELLAN *et al.*, 2006). O possível terminador de *glnK* possui características como a formação de um grampo de energia livre de Gibbs de -10 Kcal/mol em 25°C e a região 3' proximal rica

em uridilas (fig. II.3.7), que são congruentes aos trabalhos de análise *in silico* de terminadores independentes de Rho (de HOON *et al.*, 2005; KINGSFORD *et al.*, 2007; LESNIK *et al.*, 2001; UNNIRAMAN *et al.*, 2002).

Corroborando com os resultados encontrados na análise da região regulatória de *glnK* de *A. amazonense*, foi confirmado através de experimentos de hibridização que esse gene é expresso em condições de limitação de nitrogênio (fig. II.3.8). Há um aumento gradual na expressão de *glnK* horas após o cultivo em meio sem nitrogênio, assim como *glnB*, que atinge um nível alto de expressão mais rapidamente. No entanto, em suficiência de nitrogênio (NH₄Cl 50 mM), não foram detectados sinais de hibridização utilizando como sonda *glnB* e *glnK*. Isso pode ser uma limitação da técnica já que experimentos de RT-PCR realizados em nosso laboratório demonstraram a expressão reduzida de *glnB* em condições de suficiência de nitrogênio (TRENTINI, 2006). Como *glnK* não foi detectado por RT-PCR, provavelmente NtrC funcione como um repressor em condições de suficiência de nitrogênio, já que a UAS se sobrepõe ao provável promotor σ^{70} , como no caso do gene *glnB* de *A. brasilense* (HUERGO *et al.*, 2003).

Visto que as proteínas PII têm função importante sobre a regulação da proteína NtrB (que fosforila NtrC) em outros organismos, provavelmente essas proteínas se auto-regulam transcricionalmente, no entanto, evidências experimentais ainda são necessárias em *A. amazonense*.

A presença de aspartato como fonte única de nitrogênio tem como consequência um aumento significativo da transcrição do gene *glnZ* em *A. brasilense*, provavelmente pelo aumento da concentração de NtrC-P. Pode ser que o produto do gene *aat* esteja envolvido neste mecanismo (de ZAMAROCZY, 1998).

Tendo em vista a dificuldade de traçar um paralelo com outros sistemas bacterianos, a proteína GlnK de *A. amazonense* foi expressa em um sistema heterólogo, visando purificação e utilização em experimentos de *pull-down*. Assim, será possível elucidar possíveis alvos protéicos de interação. A proteína GlnK recombinante está fusionada a uma cauda de T7, que facilitará o processo de purificação por cromatografia de afinidade.

CAPÍTULO III

Isolamento de genes de *A. amazonense*
com expressão dependente da
disponibilidade de nitrogênio

INTRODUÇÃO

O gênero *Azospirillum* é composto por bactérias que promovem o crescimento de plantas através de diversos mecanismos, como a produção de fitormônios e a fixação do nitrogênio. Estas bactérias demonstram um metabolismo do nitrogênio e do carbono versátil, característica importante para que as células se estabeleçam no competitivo ambiente da rizosfera (HARTMANN & ZIMMER, 1994).

A organização dos genes no genoma dos membros do gênero *Azospirillum* é complexa: os genomas variam de 4,8 Mbp (*A. irakense*) a 9,7 Mbp (*A. lipoferum* Sp59b) e a informação genética se encontra distribuída em diversos replicons. O genoma de *A. amazonense* Y2 é estimado em 7,3 Mbp sendo dividido em quatro replicons de tamanhos variados (MARTIN-DIDONET *et al.*, 2000).

Bactérias que habitam o solo, como as do gênero *Azospirillum*, tendem a possuir diversos sistemas de regulação gênica, tendo em vista as condições adversas enfrentadas nesse ambiente altamente variável quanto à disponibilidade de nutrientes e a fatores físico-químicos. Análises computacionais revelaram que existe uma correlação entre o número de fatores de transcrição com o tamanho do genoma e com o nicho que a bactéria ocupa. Estas análises sugerem que quanto maior o genoma, maior quantidade de reguladores por gene são codificados. Além disso, as bactérias que vivem em ambientes como solo e água tendem a possuir um número maior de reguladores por gene, se comparadas com patógenos intracelulares e endosimbiontes, havendo uma forte pressão seletiva para uma expressão gênica regulada e coordenada, diferentemente de ambientes considerados estáveis (*e.g.* hospedeiro de um patógeno) (CASES *et al.*, 2003). Uma vez que o ambiente de solo é muito dinâmico, a bactéria deve acompanhar

essas mudanças modificando seu metabolismo, garantindo assim, sua sobrevivência (CASES *et al.*, 2003; ROSZAK & COLWELL, 1987). O papel dos replicons na sobrevivência das espécies do gênero *Azospirillum* no ambiente e *in vitro* deve ser determinada, mas provavelmente é o que deve permitir a ampla distribuição ecológica e flexibilidade metabólica do gênero (MARTIN-DIDONET *et al.*, 2000).

O nitrogênio é um elemento indispensável para vida, pois compõe moléculas biológicas como proteínas e ácidos nucleicos. Normalmente, este elemento é assimilado pelas bactérias na forma de amônia e fontes nitrogenadas alternativas devem ser assim convertidas para serem assimiladas. Com isto, a utilização destas fontes alternativas de nitrogênio é regulada para minimizar o desperdício energético pela bactéria. Como resultado, estas vias assimilatórias são reprimidas quando há suficiência de nitrogênio e induzidas em condições de deficiência de nitrogênio (LEIGH & DODSWORTH, 2007). Muitos estudos avaliaram genes bacterianos envolvidos na resposta à limitação de nitrogênio, mas a maioria destes estudos foi realizada em organismos com o genoma seqüenciado (*e.g.* KABIR *et al.*, 2004; SCHWAB *et al.*, 2007; TOLONEN *et al.*, 2006; VEIT *et al.*, 2006). Uma desvantagem no estudo genético de *Azospirillum* é que ainda nenhum genoma desse gênero foi publicado, devido a grande presença de transposases nos replicons, que dificultam a etapa de montagem (Gladys Alexandre *apud* VALVERDE *et al.*, 2006).

A técnica cDNA-RDA é uma alternativa para superar este obstáculo, já que permite o isolamento simultâneo de genes diferencialmente expressos através de PCR (HUBANK & SCHATZ, 1999; BECKER *et al.*, 2001).

O objetivo deste trabalho é isolar genes envolvidos na resposta de *A. amazonense* à indisponibilidade de nitrogênio, através da técnica Micro-RDA (cDNA-RDA).

MATERIAIS E MÉTODOS

III.2.1. Linhagens bacterianas, meios de cultura e condições de crescimento

Azospirillum amazonense Y1 e *Escherichia coli* XL1-Blue (SAMBROOK & RUSSELL, 2001) foram cultivados, respectivamente, em meio M79 (FRED & WAKSMAN, 1928) e Luria-Bertani (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). *E. coli* contendo o vetor de clonagem pUC18 (e derivados) foi cultivada com o antibiótico ampicilina na concentração de 100 µg/mL. Para a extração do RNA usado em experimentos de *Dot Blot*, *A. amazonense* foi cultivado em 100 mL meio M79 líquido a 37°C em 160 rpm de agitação orbital até atingir a DO₅₆₀ de 0,5. A cultura foi dividida em duas alíquotas iguais que foram centrifugadas (5000 g por 10 min) e lavadas duas vezes em 40 mL de meio mínimo LGI (DÖBEREINER *et al.*, 1995). Após nova centrifugação, uma alíquota foi resuspendida em 40 mL de meio LGI sem fonte de nitrogênio e outra em 40 mL de meio LGI acrescido de NH₄Cl a 50 mM. As células foram mantidas neste meio por 3 h a 37°C e 160 rpm de agitação.

III.2.2. Métodos em biologia molecular

Isolamento de DNA plasmidial, eletroforese em gel de agarose, *Dot Blotting*, clonagem, quantificação de ácidos nucleicos por Espectrofotometria UV, transformação bacteriana por eletroporação e seleção de transformantes foram conduzidos como descrito por Russell & Sambrook (2001). Os ácidos nucleicos também foram quantificados utilizando o aparelho Qubit (Invitrogen).

Enzimas de restrição comerciais foram utilizadas de acordo com as instruções dos fabricantes. Purificação de DNA foi realizada com o *kit* GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). Extração de DNA genômico de *A. amazonense* foi realizada com proteinase K e fenol/clorofórmio. RNA foi extraído com reagente Trizol (Invitrogen) e tratado com DNase (Promega), segundo orientações do fabricante.

Cerca de 3 µg de RNA total de cada condição foi transferido para membrana de nylon Hybond-N⁺ (GE Healthcare) utilizando o aparelho BioDot (BioRad), conforme as instruções do fabricante.

III.2.3. Micro-RDA (cDNA-RDA)

O RNA total extraído foi purificado pelo *kit* MICROBExpress (Ambion), que remove rRNAs 16S e 23S através de hibridização com oligonucleotídeos complexados com esferas magnéticas. A primeira fita de cDNA foi sintetizada com 100 ng de *primers* randômicos, utilizando a enzima Improm-II (Promega), segundo as instruções do fabricante. A segunda fita foi sintetizada baseando-se no protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001): a reação foi realizada em tampão 1X da DNAPol I de *E. coli* (Promega), dNTP 200 µM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, βNAD⁺ 300 µM, 40 U de DNAPol I de *E. coli* (Promega), 2,2 U de RNase H (Pharmacia) e 20 U de DNA Ligase de *E. coli* (Invitrogen) e incubada a 16°C por uma noite.

Micro-RDA (U.S. Patent 5759780) foi realizado de acordo com as instruções descritas em <http://www.freepatentsonline.com/5759780.html> e em Becker *et al.* (2001), contudo a hibridização foi realizada com OSPERT (BRUZEL & CHEUNG, 2006) e não com PERT (MILLER & RIBLET, 1995). O material denominado *tester* foi composto pelo cDNA proveniente da condição de limitação de nitrogênio e o *driver* foi composto pelo cDNA proveniente da condição de suficiência de nitrogênio. Foram realizadas três etapas de hibridização subtrativa com as relações tester:driver de 1:100, 1:1000 e 1:10000, respectivamente. O produto integral da terceira etapa do Micro-RDA foi clonado em pUC18.

III.2.4. Reação de seqüenciamento

O DNA plasmidial extraído foi submetido à reação de seqüenciamento utilizando o *kit* Dyanamic et dye terminator cycle sequencing (Amersham Biosciences), desenvolvido para o seqüenciador automático MEGABACE, utilizando os *primers* M13 *forward* ou *reverse*, conforme o manual do fabricante.

III.2.5. Análise *in silico* do produto do Micro-RDA

O pacote Staden foi utilizado para processar os resultados de seqüenciamento e os genes foram identificados pelo software Blastx e Blastn (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

RESULTADOS

III.3.1. Expressão de genes de *A. amazonense* em resposta à limitação de nitrogênio

Nas proteobactérias, os genes que codificam para proteínas PII têm sua expressão induzida quando estão em condições de limitação de nitrogênio. Para determinar os tempos ideais de extração do RNA total de *A. amazonense* foram realizados experimentos de hibridização utilizando como sonda os genes *glnB* e *glnK*. Nossos experimentos demonstram que os dois genes que codificam as proteínas PII em *A. amazonense* também são regulados pelos níveis de nitrogênio intracelular. A figura III.3.1 mostra que a expressão do gene *glnK* atinge maior nível após 2 horas de cultivo de *A. amazonense* em meio sem nitrogênio. No entanto, o gene *glnB* atinge níveis altos de expressão após 1 hora, com expressão máxima em 3 horas. Portanto, o tempo escolhido para extrair o RNA total de *A. amazonense* foi de 3 horas, já que neste momento deveria existir uma maior abundância de mRNA de genes expressos nessa condição limitante.

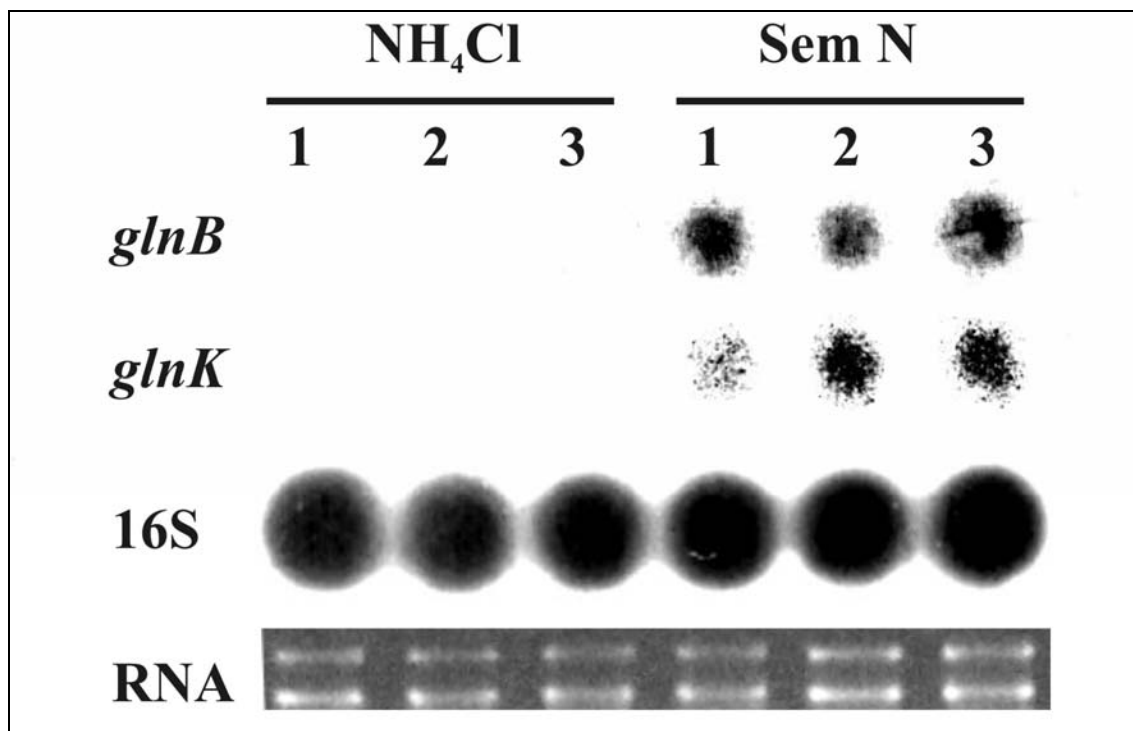


Figura III.3.1. Análise da expressão dos genes *glnB* e *glnK* de *A. amazonense* em condições de ausência de nitrogênio fixado.

Padrão de hibridização dos genes *glnB*, *glnK* e rDNA 16S com o RNA total de *A. amazonense* cultivado em condições de suficiência de nitrogênio (50 mM de cloreto de amônia) ou ausência de nitrogênio. Os números 1, 2 e 3 referem-se a uma, duas e três horas de cultivo. NH₄Cl indica cultivo em meio contendo cloreto de amônia 50 mM e sem N indica cultivo em meio desprovido de fonte nitrogenada. *glnB*, *glnK* e 16S indicam a sonda utilizada. RNA apresenta as bandas de rRNA 23S e rRNA 16S resolvidas por eletroforese em gel de agarose 2% e coradas com brometo de etídeo.

Tendo como base as condições anteriormente estabelecidas, foi extraído RNA total de *A. amazonense* cultivado em meio contendo ou não fonte de nitrogênio. Um dos grandes problemas nas extrações de RNA total é a grande quantidade de RNA ribossômico relativa à população de mRNA. Portanto, após o tratamento com DNase a população de RNAs foi submetida ao *kit* MICROBExpress, que minimiza a quantidade de rRNAs da amostra. A utilização deste *kit* visa eliminar essas formas abundantes de RNA da amostra, que interferem no experimento de cDNA-RNA, através de hibridização com oligonucleotídeos ligados a esferas magnéticas. A figura III.3.2 mostra que uma redução significativa na quantidade de rRNA 16S e 23S das amostras.

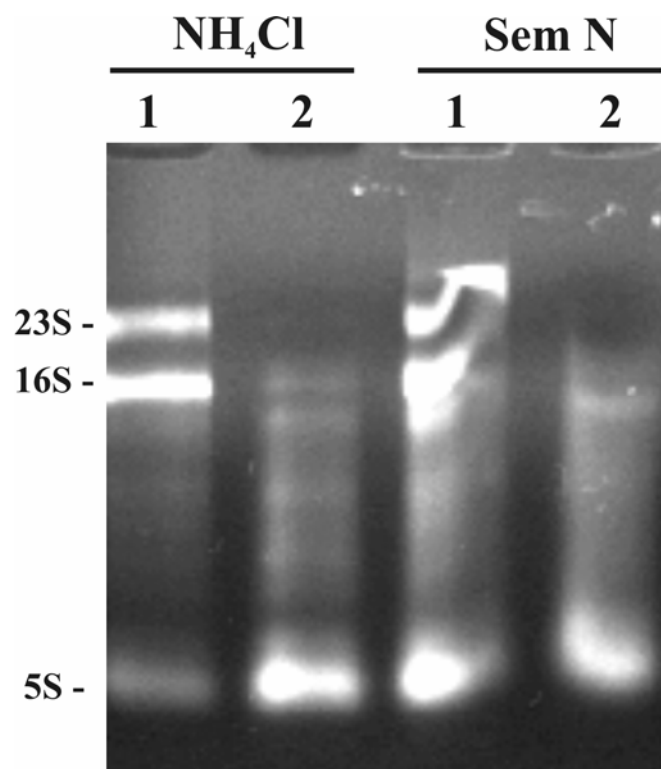


Figura III.3.2. Purificação do RNA total de *A. amazonense* com o *kit* MICROBExpress.

Gel de agarose 2%/Brometo de etídeo demonstrando o RNA extraído de *A. amazonense* cultivado em condições de suficiência de nitrogênio (50 mM de cloreto de amônia) ou ausência de nitrogênio por 3 horas e posteriormente purificação com o *kit* MICROBExpress. 1 refere-se ao RNA total de *A. amazonense* e 2 refere-se ao RNA após a purificação com o *kit* MICROBExpress. NH₄Cl indica cultivo em meio contendo cloreto de amônia 50 mM e sem N indica cultivo em meio desprovido de fonte nitrogenada. 23S, 16S e 5S correspondem aos rRNAs 23S, 16S e 5S, respectivamente.

III.3.2. Isolamento de seqüências de *A. amazonense* envolvidas na resposta à indisponibilidade de nitrogênio através da técnica Micro-RDA (cDNA-RDA)

O Micro-RDA foi composto por três etapas de subtração, com as razões *tester:driver* de 1:100, 1:1000 e 1:10000, consecutivamente, utilizando como *tester* o cDNA proveniente do cultivo em meio deficiente em nitrogênio e como *driver* o cDNA proveniente do cultivo em cloreto de amônia 50 mM.. O produto integral da terceira etapa de subtração foi clonado em pUC18. Cerca de 10% das seqüências analisadas comparativamente em banco de dados (pelo software Blastn) não apresentaram identidade com rRNAs. O tamanho desses fragmentos variou de aproximadamente 350 pb até cerca de 100 pb. A tabela abaixo mostra as seqüências identificadas:

Tabela III.3.1: Genes de *A. amazonense* provavelmente expressos em resposta à limitação de nitrogênio

Seqüência	Organismo	Proteína	Valor E ⁼
B07	<i>Magnetospirillum magneticum</i>	DnaK	1 x 10 ⁻⁷⁰
E07	<i>M. magneticum</i>	Guanosine polifosfato pirofosfohidrolase/sintetase	7 x 10 ⁻²⁴
E09	<i>A. brasilense</i>	Glutamina sintetase	7 x 10 ⁻³⁷
F05	<i>Acidovorax avenae</i>	Diguanilato ciclase/fosfodiesterase ⁺	2 x 10 ⁻¹⁹
F08	-	Hipotética	-
G04	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	NADH-quinona oxidoreductase, cadeia I ⁺	2 x 10 ⁻²⁴
G10	<i>M. magneticum</i>	σ ³²	4 x 10 ⁻³³
H09	<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	Glutamato sintase ⁺	0,005*

⁼ obtido por BlastX

* utilizando a ferramenta Discontiguous Blast com os parâmetros usuais, foi obtido o valor de E de 2 x 10⁻¹⁶ com o produto do gene *glbB* de *A. brasilense*, que codifica a subunidade maior de uma Glutamato sintase dependente de NADPH

⁺seqüências fusionadas com rDNA

DISCUSSÃO

A técnica RDA (*representational difference analysis*) foi desenvolvida por Lisitsyn em 1993 e inicialmente, foi aplicada para elucidar diferenças entre genomas complexos. Essa técnica combina a hibridização subtrativa com o enriquecimento cinético de seqüências exclusivas de uma população de fragmentos de DNA (LISITSYN, 1995).

Em 1994, Hubank & Schatz combinaram essa técnica com o procedimento de cDNA, permitindo a detecção de genes diferencialmente regulados. Inúmeros trabalhos demonstraram a viabilidade dessa técnica (*e.g.* BAEZA *et al.*, 2007; HABBE *et al.*, 2007; SPEROTTO *et al.*, 2007; DUTRA *et al.*, 2004), no entanto a maioria está restrita para organismos eucarióticos. Há poucos relatos de trabalhos que adaptaram a técnica de cDNA-RDA em bactérias com sucesso (BECKER *et al.*, 2001; BOWLER *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2001; MEHTA & ROSATO, 2005; TAYLOR *et al.*, 2003; WESTBROCK-WADMAN *et al.*, 1999).

A principal dificuldade na aplicação desta técnica em bactérias é a síntese de cDNA, já que o mRNA bacteriano é altamente lábil. Adicionalmente, nem todos mRNAs são poliadenilados e aqueles que são, possuem uma cauda de poli(A) muito curta (DREYFUS & RÉGNIER, 2002; SARKAR, 1997). Por isso, é inevitável a utilização de RNA total na síntese de cDNA, conseqüentemente gerando um enriquecimento para cDNAs oriundos de rRNAs, as formas mais abundantes de RNA na célula (BOWLER *et al.*, 1999).

Para contornar o problema de contaminação por fragmentos de genes de rRNA, duas abordagens principais foram adotadas: a utilização de um *driver*

suplementado com amplicons derivados dos genes que codificam os rRNAs 16S e 23S (BOWLER *et al.*, 1999; MEHTA & ROSATO; TAYLOR *et al.*, 2003) ou a realização de etapas de subtração altamente “estringentes” (com a relação *tester:driver* chegando a 1:10000). Essas etapas foram realizadas pela incorporação da técnica de reassociação em emulsão de fenol (PERT), que possibilita a utilização de quantidades ínfimas de amostra, viabilizando as hibridizações altamente “estringentes” (BECKER *et al.*, 2001; BRUZEL & CHEUNG, 2006; MILLER & RIBLET; 1995; WESTBROCK-WADMAN *et al.*, 1999).

Em contrapartida, a técnica de cDNA-RDA não é limitada a bactérias com genomas descritos e tem alta sensibilidade, já que é baseada em PCR (BOWLER *et al.*, 1999).

Tendo em vista que *A. amazonense* é uma bactéria que promove o crescimento vegetal e que vive em um ambiente adverso (*i.e.* solo), seria importante avaliar os mecanismos que permitem a ampla distribuição das bactérias desse gênero no mundo e que permitem o estabelecimento no competitivo ambiente da rizosfera.

O presente trabalho utilizou a técnica de micro-RDA para elucidar genes envolvidos na resposta de *A. amazonense* ao estresse por limitação de nitrogênio.

O RNA total de *A. amazonense* foi preparado tendo como base o padrão de expressão dos genes *glnB* e *glnK*, que apresentam uma maior quantidade de transcritos após 3 horas de cultivo em condições de limitação de nitrogênio (fig. III.3.1).

Visando diminuir a contaminação da amostra de RNA com rRNAs, utilizou-se o *kit* MICROBExpress, que elimina essas formas abundantes de RNA através de hibridização com oligonucleotídeos complexados a esferas magnéticas. Como mostrado na figura III.3.2, houve uma redução significativa dos rRNAs 16S e 23S da amostra.

Subseqüentemente, as amostras de RNA foram convertidas em cDNA e o procedimento de Micro-RDA foi executado utilizando como *driver* a condição de suficiência de nitrogênio e como *tester* a condição de limitação.

A técnica teve um grau de eficiência muito baixo, somente cerca de 10% das seqüências são potencialmente diferenciais (três vezes menor que o trabalho de BOWLER *et al.*, 1999). No entanto foi possível isolar 8 fragmentos que correspondem a genes que provavelmente estão envolvidos na resposta de *A. amazonense* à limitação do nitrogênio (tabela III.3.1). Trabalhos utilizando outras bactérias isolaram cerca de 5-

7 genes diferencialmente expressos (BOWLER *et al.*, 1999; BECKER *et al.*, 2001; TAYLOR *et al.*, 2003). Outros trabalhos, como o de Mehta & Rosato (2005) identificaram cerca de 37 genes de *Xanthomonas axopodis* e revelaram que a frequência de clones contendo cDNA proveniente de rRNA era de 30%, enquanto que Westbrook-Wadman *et al.* (1999) identificaram cerca de 30 ORFS de *Pseudomonas aeruginosa* após o seqüenciamento de 200 clones.

As seqüências isoladas por este trabalho foram analisadas através da ferramenta Blast, que permitiu a identificação de seis genes com alta similaridade a genes de bactérias da subclasse α -proteobacteria. No entanto, a seqüência F05 possui similaridade com o gene de *Acidovorax avenae*, uma bactéria da subclasse β -proteobacteria. A seqüência F08 não apresentou similaridade com nenhuma seqüência depositada nos bancos de dados (GenBank), por isso foi denominada hipotética.

O produto protéico deduzido da seqüência E09 possui alta similaridade com a proteína glutamina sintetase de *A. brasilense*. Essa enzima é codificada pelo gene *glnA*, que nas bactérias da subclasse α -proteobacteria, forma um operon com o gene *glnB*, que codifica uma proteína PII. Huergo *et al.* (2003) demonstraram que o operon *glnAB* é ativado transcricionalmente em limitação de nitrogênio pela ação da proteína NtrC. Outro dado que corrobora esse fato é que o gene *glnB* de *A. amazonense* é altamente expresso em condições de limitação de nitrogênio (fig. III.3.1), no entanto, a organização de *glnA* e *glnB* em um operon tem ainda de ser determinada em *A. amazonense*.

A seqüência H09 corresponde a parte do gene *gltB*, que codifica para a subunidade maior da glutamato sintase (GOGAT). Em *Azospirillum lipoferum* a atividade de GOGAT é maior quando a bactéria cresce em N₂ como única fonte de nitrogênio (OKON *et al.*, 1976). O promotor do gene *gltB* de *A. brasilense* possui sítios potenciais de ligação a σ^{54} e de ligação a NifA (MANDAL & GHOSH, 1993). Essas evidências suportam que provavelmente o gene *gltB* das bactérias do gênero *Azospirillum* tenha um aumento na transcrição em condições de limitação de nitrogênio.

Também existem evidências que em *Corynebacterium glutamicum*, *glnA* e *gltB* são expressos em resposta à limitação de nitrogênio (SCHULZ *et al.*, 2001; SILBERBACH *et al.*, 2005).

A seqüência F05 contém similaridade com uma diguanilato ciclase/fosfodiesterase, enzima que controla os níveis intracelulares de c-di-GMP. Essa

enzima é bifuncional, sendo seu domínio GGDEF (atividade de diguanilato ciclase) envolvido na produção de c-di-GMP a partir de duas moléculas de GTP e seu domínio EAL (atividade de fosfodiesterase) envolvido na degradação de c-di-GMP a GMP. A molécula c-di-GMP é uma molécula sinalizadora que está relacionada com a formação de biofilmes, produção de exopolissacarídeos, adesão a superfícies e atenuação da motilidade (JENAL & MALONE, 2006). Em *Pseudomonas putida*, situações de estresse por limitação nutricional causam a dissolução de biofilmes, provavelmente para que as bactérias deixem o ambiente inóspito e colonizem outras superfícies. Esse mecanismo pode ser mediado pela atividade de fosfodiesterase, que diminuiria os níveis de c-di-GMP para que a bactéria adotasse o hábito planctônico (GJERMENSEN *et al.*, 2005). Entretanto, o trabalho de Bleakley *et al.* (1988) demonstrou que as células de *A. lipoferum* cresciam como filamentos em meio com PHB e sem fonte de nitrogênio e com tempos mais prolongados de cultivo nessas condições, elas formavam microflocos. Seria válido avaliar se as células de *A. amazonense* exibem esse perfil e se a enzima diguanilato ciclase está envolvida nesse processo.

É importante relatar que a análise feita com a ferramenta Scan Prosite revelou somente o domínio EAL no polipeptídeo deduzido a partir da sequência F05 (dados não mostrados), portanto não se pode descartar a conjectura de que este gene possa codificar para uma enzima sem atividade de diguanilato ciclase. Obviamente, mais estudos devem ser realizados para melhor avaliar o papel deste gene no estresse nutricional de nitrogênio em *A. amazonense*.

A sequência E07 corresponde a parte de um gene que codifica uma guanossina polifosfato pirofosfohidrolase/sintetase (RelA/SpoT), enzima envolvida na síntese de GDP 3'difosfato ou GTP 3' difosfato, que são coletivamente chamados de (p)ppGpp. Essa molécula permite a bactéria sobreviver ao estresse nutricional através de uma reação adaptativa chamada “resposta estrigente”, que já foi descrita em diferentes gêneros bacterianos (JAIN *et al.*, 2006). Foi proposto que quando há limitação de aminoácidos, há um aumento na proporção de tRNAs desacilados. Com isso, um tRNA desacilado entraria no sítio A do ribossomo, causando uma parada na tradução. Então, a enzima RelA reconheceria esse ribossomo “travado” e se ligaria a ele, resultando na síntese de ppGpp (WENDRICH *et al.*, 2002). A molécula ppGpp é conhecida por exercer uma grande gama de efeitos na fisiologia bacteriana. Um deles é a repressão da transcrição de RNAs estáveis, como tRNA e rRNA, e ativação da

transcrição de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de aminoácidos (CASHEL *et al.*, 1996). Essa molécula interage diretamente com a RNA polimerase, impedindo a transcrição a partir de promotores que formam complexos abertos instáveis (BROWNING & BUSBY, 2004). Foi relatado que um mutante de *Rhizobium etli* incapaz de sintetizar (p)ppGpp tinha sua capacidade de utilizar aminoácidos e nitrato como fontes de nitrogênio afetada, em condições de limitação deste elemento (CALDERÓN-FLORES *et al.*, 2005). A molécula sinalizadora (p)ppGpp também está envolvida em outras funções celulares como esporulação, formação de biofilmes, simbiose e virulência (JAIN *et al.*, 2006).

As seqüências G10 e B07 possuem homologia com genes envolvidos em estresse por choque térmico: G10 codifica o fator σ^{32} (*rpoH*) e B07 codifica a proteína DnaK (*dnaK*), uma chaperona.

Em *E. coli*, o fator σ^{32} (*rpoH*) direciona a RNA polimerase para promotores dependentes de choque térmico, aumentando a expressão de genes que codificam proteínas Hsp. O sistema é retroalimentado negativamente, já que as proteínas Hsp (DnaJ, DnaK e GrpE) regulam os níveis de σ^{32} , através da degradação mediada por FtsH. As chaperonas DnaK/DnaJ reconhecem proteínas aberrantes e desnaturadas, que em excesso, sequestram o sistema DnaK/DnaJ, permitindo que o fator σ^{32} se estabeleça e promova a transcrição de genes específicos (GROSS, 1996; ARSÈNE *et al.*, 2000). Além de choque térmico, outros fatores induzem proteínas Hsp. Em 1988, o trabalho de Jenkins *et al.* reportou que culturas de *E. coli* limitadas em glicose ou em fonte nitrogenada exibiam maior resistência ao estresse térmico. Também foi relatado que mutantes *dnaK* de *E. coli* são muito sensíveis a condições de limitação de nitrogênio (JURKIEWICZ & WOLSKA, 1999; SPENCE *et al.*, 1990). Diferentes trabalhos demonstraram que as células de *E. coli* perdem a fidelidade na tradução quando cultivadas em meios limitados nutricionalmente (BARAK *et al.*, 1996; BALLESTEROS *et al.*, 2001). A falha na tradução acompanhada pela modificação oxidativa das proteínas anômalas tem como resultado um aumento na expressão de genes Hsp. Todavia, o tratamento das células com puromicina, uma droga que causa a terminação prematura da tradução, gera muitos polipeptídeos desnaturados, que induzem o sistema Hsp, independentemente da disponibilidade de oxigênio (FREDRIKSSON *et al.*, 2006). Essas evidências podem explicar o fato de genes do

sistema Hsp estarem sendo expressos em *A. amazonense* quando cultivado em meio sem fonte de nitrogênio.

A seqüência G04 codifica parte da subunidade I de uma NADH-quinona oxidoreductase, um complexo protéico pertencente à cadeia transportadora de elétrons, envolvida na formação de um gradiente de prótons que dirige processos como síntese de ATP, transporte de solutos e motilidade flagelar (FRIEDRICH, 1997). A bactéria diazotrófica *Azotobacter vinelandii* é capaz de fixar N₂ em ambientes com altas concentrações de oxigênio, já que sua alta taxa respiratória consome rapidamente essa molécula prejudicial à nitrogenase. Essa bactéria possui duas NADH:ubiquinona oxidoreductases: NHD-I, que tem seu nível diminuído em altas concentrações de oxigênio, e NHD-II, que tem seu nível aumentado em excesso de oxigênio e limitação de amônia. Bertsova *et al.* (1998) sugeriram que NHD-II estaria envolvida na proteção respiratória da nitrogenase. Contudo, esse modelo deve ser examinado com prudência, pois o gene isolado de *A. amazonense* codifica para a subunidade I de NHD-I e não há evidências da existência de respiração protetiva da nitrogenase em *A. brasilense* (NELSON & KNOWLES, 1978).

Podemos concluir que a maioria dos genes isolados por esse trabalho tem relação com estresse nutricional de nitrogênio, todavia é importante ter cautela com as hipóteses levantadas, porque a expressão diferencial desses genes em limitação de nitrogênio tem de ser confirmada por RT-PCR ou hibridização por *Northern blot*.

A baixa eficiência da técnica de Micro-RDA pode ter sido consequência da qualidade do RNA, que pode ter influenciado na capacidade do *kit* MICROBExpress em remover os rRNAs ou na representatividade dos mRNAs na amostra. Mesmo assim, a técnica mostrou-se sensível e se melhorada, permitirá diferentes abordagens no estudo genético de *A. amazonense* com um bom custo-benefício.

CAPÍTULO IV

Discussão geral

DISCUSSÃO

No desenvolvimento desse trabalho foi possível o isolamento de genes que provavelmente estão envolvidos na resposta de *A. amazonense* à limitação de nitrogênio. Embora poucos genes de *A. amazonense* tenham sido isolados, já podemos ter uma idéia do quão complexa é a resposta desse organismo a fatores ambientais adversos. Como discutido anteriormente, o genoma relativamente grande de *A. amazonense* seria o principal agente dessa adaptabilidade, já que poderia abrigar diversos genes capazes de propiciar um estabelecimento pleno no ambiente hostil.

Diversos relatos na literatura científica mostram que genes isolados pelo nosso trabalho, como *gltB*, *glnK*, *glnB*, *glnA* e *relA* estão claramente envolvidos na resposta à limitação nutricional.

Contudo, fica difícil traçar um paralelo com o metabolismo de outros microrganismos, já que muitos dados são contraditórios. Podemos relatar, como exemplo, o gene *glnK* que, em *E. coli*, tem sua expressão aumentada na “resposta estrigente” (CHANG *et al.*, 2002), e em *C. glutamicum* esse gene é reprimido nessas condições (BROCKMAN-GRETZA & KALINOWSKI, 2006). Esses resultados podem ter sido gerados pela utilização de abordagens técnicas diferentes, mas não se pode descartar que esses genes desempenhem funções espécie-específicas.

Um dado curioso, apresentado por nosso trabalho, é a expressão aumentada de DnaK e σ^{32} , proteínas envolvidas em estresse térmico. Como as condições de cultivo não eram relacionadas diretamente com choque térmico, provavelmente estes genes estejam envolvidos em outras funções.

Um cenário hipotético da resposta de *A. amazonense* ao estresse nutricional pela limitação de nitrogênio pode ser discutido: o meio limitado nutricionalmente quanto à fonte de nitrogênio incapacitaria a bactéria em sintetizar aminoácidos, assim, o mecanismo de tradução seria interrompido, gerando proteínas

aberrantes. Dessa forma DnaK interagiria com essas proteínas anômalas, permitindo que o fator σ^{32} promovesse a síntese de proteínas Hsp (inclusive DnaK). Ao mesmo tempo, os ribossomos “travados” no mRNA mensageiro, consequência da limitação de aminoácidos, promoveriam a ação de RelA, que sintetizaria (p)ppGpp, molécula sinalizadora da “resposta estrigente”. Então, (p)ppGpp poderia influenciar a transcrição de diversos genes do metabolismo do nitrogênio, inclusive de reguladores centrais como *glnB* e *glnK*.

Outra hipótese seria que com a limitação de nitrogênio, ocorreria um aumento na concentração de 2-cetoglutarato, que interagiria com UTase, promovendo a uridilação de proteínas PII. Essas proteínas uridiladas são incapazes de interagir com NtrB, que consequentemente, fosforilaria NtrC, fator que poderia ativar a transcrição de genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio, como *glnAB*, *glnK* e *gltB*. Seria válido avaliar o papel das proteínas PII na expressão dos genes relatados no nosso trabalho e também se RelA tem papel fundamental nesse processo, inclusive na expressão de *glnB* e *glnK*.

O aumento de 2-cetoglutarato na célula também poderia intensificar a síntese de NADH, via 2-cetoglutarato-desidrogenase (enzima do ciclo de Krebs), e isso poderia promover de alguma forma a expressão do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, NADH ubiquinona oxidoreductase. Esse aumento na expressão do complexo I poderia elevar a taxa de respiração aeróbia da bactéria e com isso uma maior produção de ATP, importante para funções diversas, como a síntese de reservas nutricionais (PHB).

Em outros organismos, (p)ppGpp e c-di-GMP (gerado pela enzima diguanilato ciclase) estão envolvidos na formação de biofilmes. Seria importante avaliar se *A. amazonense* se agrega nas condições de limitação de nitrogênio como *A. lipoferum*, qual o papel desse processo na sobrevivência da bactéria e se as moléculas sinalizadoras (p)ppGpp e c-di-GMP estariam envolvidas no processo.

Muitos genes isolados por nosso trabalho que em princípio não demonstram relação direta, podem estar vinculados de alguma forma na resposta ao estresse por limitação de nitrogênio. Um exemplo interessante é o que ocorre na γ -proteobactéria *Myxococcus xanthus*. Essa bactéria desenvolve corpos de frutificação multicelulares em condições de limitação de nitrogênio e tende a acumular (p)ppGpp nessa etapa (MANOIL & KAISER, 1980). Laval-Favre *et al.* (1997) demonstraram que

uma subunidade do complexo enzimático NADH ubiquinona oxidoreductase é ativada transcricionalmente nesse desenvolvimento induzido por limitação nutricional, sendo ela importante para essa etapa.

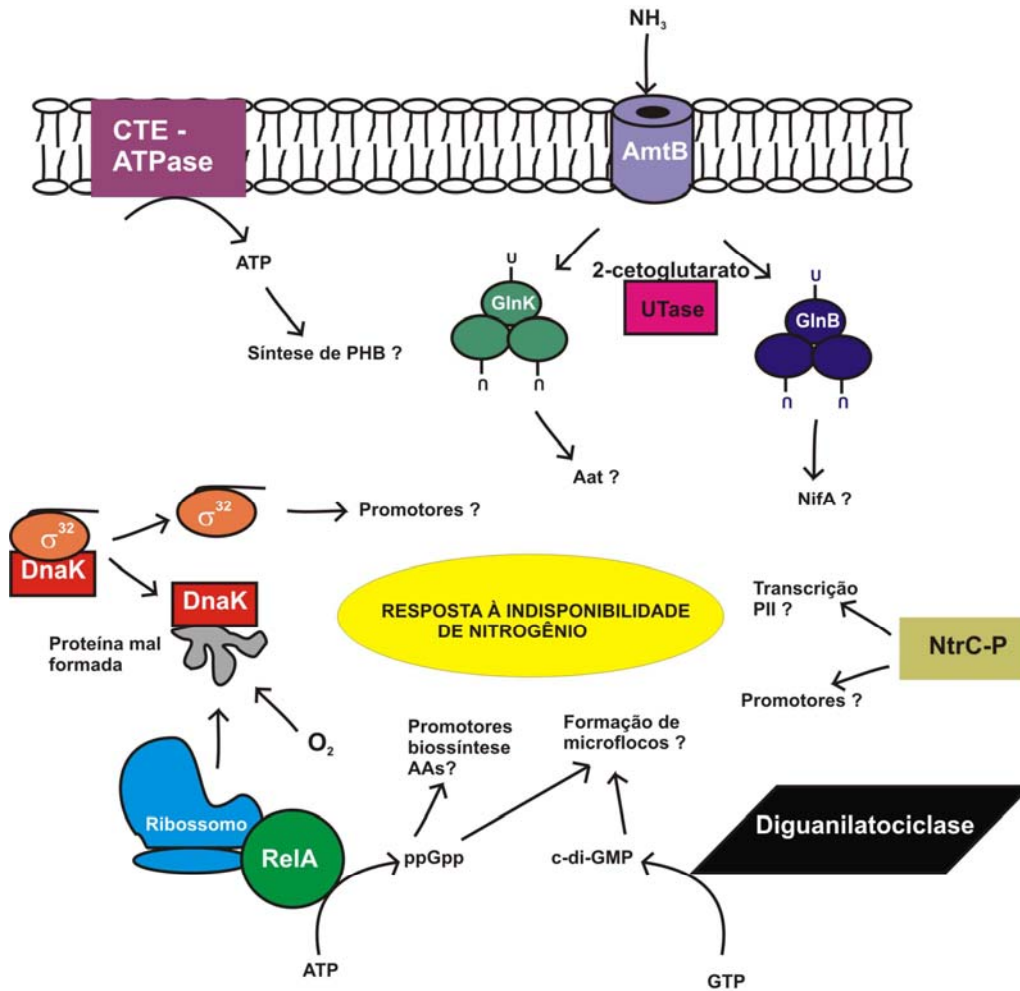


Figura IV.1. Esquema representando possíveis mecanismos de resposta de *A. amazonense* à indisponibilidade de nitrogênio.

Em condição de baixa concentração de nitrogênio no meio, as proteínas PII seriam uridiladas pela ação da enzima UTase. Assim, o transportador de amônia AmtB ficaria liberado da ação inibitória das proteínas PII e começaria a transportar amônia para a célula. GlnK uridilada poderia agir sobre a enzima aspartato amino-transferase e GlnB uridilada poderia ativar NifA, um fator de transcrição da fixação do nitrogênio. Nesse momento, NtrC estaria fosforilado e poderia promover a transcrição de diferentes genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio. A limitação de aminoácidos seria responsável pela formação de proteínas anômalas, que interagiriam com DnaK, liberando o fator σ^{32} , que poderia agir sobre promotores específicos. Além do mais, os ribossomos poderiam ficar “parados” sobre o mRNA mensageiro, tendo em vista a limitação de aminoácidos, e com isso, interagiriam com a enzima RelA, promovendo a síntese de ppGpp, que poderia ativar promotores ligados a biossíntese de aminoácidos. A enzima diguanilato ciclase estaria envolvida na produção de c-di-GMP, que poderia promover a formação de microflocos. Uma maior atividade da cadeia transportadora de elétrons poderia culminar em uma maior síntese de ATP, que poderia ser utilizado, por exemplo, na síntese de reservas nutricionais, como PHB.

A bactéria *A. amazonense* possui uma importância ecológica inestimável, visto a possibilidade de utilizar sua capacidade de promover o crescimento de plantas na agricultura em detrimento do uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados poluidores. Muitos estudos devem ser feitos futuramente para confirmar as conjecturas originadas por nosso trabalho, visando melhor entender os recursos genéticos que *A. amazonense* dispõe para se estabelecer no ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschul, S. F., T. L. Madden, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res, v.25, n.17, Sep 1, p.3389-402. 1997.

Arcondeguy, T., R. Jack, *et al.* P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. Microbiol.Mol.Biol.Rev., v.65, n.1, p.80-105. 2001.

Arnold, W., A. Rump, *et al.* Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* J.Mol.Biol., v.203, n.3, p.715-738. 1988.

Arsene, F., P. A. Kaminski, *et al.* Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense* : evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. J.Bacteriol., v.178, n.16, p.4830-4838. 1996.

Arsene, F., T. Tomoyasu, *et al.* The heat shock response of *Escherichia coli*: Elsevier. 55: 3-9 p. 2000.

Atkinson, M. R. e A. J. Ninfa. Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli* Mol.Microbiol., v.29, n.2, p.431-447. 1998.

Atkinson, M. R., N. Pattaramanon, *et al.* Governor of the glnAp2 promoter of *Escherichia coli*. Mol Microbiol, v.46, n.5, Dec, p.1247-57. 2002.

Atlas, R. M. e R. Bartha. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications: Addison-Wesley Publishing Company. 1981

Austin, S. e R. Dixon. The prokaryotic enhancer binding protein NTRC has an ATPase activity which is phosphorylation and DNA dependent. EMBO J., v.11, n.6, p.2219-2228. 1992.

Baeza, L. C., A. M. Bailao, *et al.* cDNA representational difference analysis used in the

identification of genes expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin. Microbes Infect, Jul 17. 2007.

Ballesteros, M., A. Fredriksson, *et al.* Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes. Embo J, v.20, n.18, Sep 17, p.5280-9. 2001.

Barak, R., I. Nur, *et al.* Aerotactic response of *Azospirillum brasilense* J.Bacteriol., v.152 p.643-649. 1982.

Barak, R., L. Nur, *et al.* Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense* J.Gen.Microbiol., v.53, p.399-403. 1983.

Barak, Z., J. Gallant, *et al.* Enhanced Ribosome Frameshifting in Stationary Phase Cells: Academic Press. 263: 140-148 p. 1996.

Barrios, H., B. Valderrama, *et al.* Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. Nucleic Acids Res., v.27 p.4305-4313. 1999.

Bashan, Y. Interactions of *Azospirillum spp.* in soils: a review: Springer. 29: 246-256 p. 1999.

Bashan, Y., G. Holguin, *et al.* *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Can J Microbiol. v.50, n.8, Aug, p.521-77. 2004.

Becker, P., W. Hufnagle, *et al.* Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference analysis. Appl Environ Microbiol, v.67, n.7, Jul, p.2958-65. 2001.

Bertsova, Y. V., A. V. Bogachev, *et al.* Two NADH:ubiquinone oxidoreductases of *Azotobacter vinelandii* and their role in the respiratory protection. Biochim Biophys Acta, v.1363, n.2, Feb 25, p.125-33. 1998.

Bleakley, B. H., M. H. Gaskins, *et al.* Flocculation by *Azospirillum lipoferum* Grown on Poly-beta-Hydroxybutyrate. Appl Environ Microbiol, v.54, n.12, Dec, p.2986-2995. 1988.

Boddey, R. M., V. L. D. Baldani, *et al.* Effect of inoculation of *Azospirillum spp.* on nitrogen accumulation by field-grown wheat. Plant Soil, v.95, p.109-121. 1986.

Bowler, L. D., M. Hubank, *et al.* Representational difference analysis of cDNA for the detection of differential gene expression in bacteria: development using a model of iron-regulated gene expression in *Neisseria meningitidis*. Microbiology, v.145 (Pt 12), Dec, p.3529-37. 1999.

Brockmann-Gretza, O. e J. Kalinowski. Global gene expression during stringent response in *Corynebacterium glutamicum* in presence and absence of the rel gene

encoding (p)ppGpp synthase. BMC Genomics, v.7, p.230. 2006.

Browning, D. F. e S. J. Busby. The regulation of bacterial transcription initiation. Nat Rev Microbiol, v.2, n.1, Jan, p.57-65. 2004.

Bruzel, A. e V. G. Cheung. DNA reassociation using oscillating phenol emulsions. Genomics, v.87, n.2, Feb, p.286-9. 2006.

Buck, M., M. T. Gallegos, *et al.* The bacterial enhancer-dependent sigma 54 (sigma N) transcription factor. J.Bacteriol., v.182, p.4129-4136. 2000.

Burgess, B. K. e D. J. Lowe. Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. Chem.Rev., v.96, n.7, p.2983-3012. 1996.

Calderon-Flores, A., G. Du Pont, *et al.* The Stringent Response Is Required for Amino Acid and Nitrate Utilization, Nod Factor Regulation, Nodulation, and Nitrogen Fixation in *Rhizobium etli* This work is dedicated to the memory of Jorge Calderon: Am Soc Microbiol. 187: 5075-5083 p. 2005.

Campanella, J. J., L. Bitincka, *et al.* MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. BMC Bioinformatics, v.4, Jul 10, p.29. 2003.

Canuto, E. L., J. F. Salles, *et al.* Resposta de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas: Agronomia 2003.

Cases, I., V. De Lorenzo, *et al.* Transcription regulation and environmental adaptation in bacteria. Trends Microbiol, v.11, n.6, Jun, p.248-53. 2003.

Cashel, M., D. R. Gentry, *et al.* The stringent response. 1: 1458–1496 p. 1996.

Chang, D. E., D. J. Smalley, *et al.* Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. Mol Microbiol, v.45, n.2, Jul, p.289-306. 2002.

Chen, S., L. Liu, *et al.* Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense* : effects of Tyr-->Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. Mol.Genet.Genomics, v.273, n.5, p.415-422. 2005.

Claverie-Martin, F. e B. Magasanik. Role of integration host factor in the regulation of the *glnHp* 2 promoter of *Escherichia coli* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v.88, n.5, p.1631-1635. 1991.

Conroy, M. J., A. Durand, *et al.* The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.4, Jan 23, p.1213-8. 2007.

Cullen, P. J., W. C. Bowman, *et al.* Translational activation by an NtrC enhancer-binding protein. J Mol Biol, v.278, n.5, May 22, p.903-14. 1998.

- De Hoon, M. J., Y. Makita, *et al.* Prediction of transcriptional terminators in *Bacillus subtilis* and related species. PLoS Comput Biol, v.1, n.3, Aug, p.e25. 2005.
- De Oliveira, A. L. M., E. L. De Canuto, *et al.* Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria: Springer. 284: 23-32 p. 2006.
- De Zamaroczy, M. Structural homologues P(II) and P(Z) of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. Mol.Microbiol., v.29, n.2, p.449-463. 1998.
- De Zamaroczy, M., F. Delorme, *et al.* Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*. Mol Gen Genet, v.224, n.3, Dec, p.421-30. 1990.
- De Zamaroczy, M., I. Fendrik, *et al.* Genetic control of nitrogen assimilation and nitrogen fixation in free living *Azospirillum brasilense* : a review. In: (Ed.). *Azospirillum VII and Related Microorganisms*. Berlin: Springer, 1995. Genetic control of nitrogen assimilation and nitrogen fixation in free living *Azospirillum brasilense* : a review, p.77-89
- De Zamaroczy, M., A. Paquelin, *et al.* Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense* J.Bacteriol., v.175, n.9, p.2507-2515. 1993.
- _____. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. J Bacteriol, v.178, n.14, Jul, p.4143-9. 1996.
- Dean, D. R., J. T. Bolin, *et al.* Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. J.Bacteriol., v.175, n.21, p.6737-6744. 1993.
- Del Gallo, M. e I. Fendrik. The rhizosphere and *Azospirillum*: 57–75 p. 1994.
- Ding, Y. e C. E. Lawrence. A statistical sampling algorithm for RNA secondary structure prediction. Nucleic Acids Res, v.31, n.24, Dec 15, p.7280-301. 2003.
- Dixon, R. Tandem promoters determine regulation of the *Klebsiella pneumoniae* glutamine synthetase (*glnA*) gene. Nucleic Acids Res, v.12, n.20, Oct 25, p.7811-30. 1984.
- _____. The oxygen-responsive NIFL-NIFA complex: a novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in gamma-proteobacteria. Arch.Microbiol., v.169, n.5, p.371-380. 1998.
- Dixon, R. e D. Kahn. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. Nat.Rev.Microbiol., v.2, n.8, p.621-631. 2004.
- Döbereiner, J., V. L. D. Baldani, *et al.* Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas 1995.

Döbereiner, J. e J. M. Day. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. Pullman: Washington State University Press. 1976. 518-538 p.

Dombrecht, B., K. Marchal, *et al.* Prediction and overview of the RpoN-regulon in closely related species of the Rhizobiales. Genome Biol, v.3, n.12, p.RESEARCH0076. 2002.

Dreyfus, M. e P. Regnier. The poly(A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria. Cell, v.111, n.5, Nov 27, p.611-3. 2002.

Drummond, M., J. Clements, *et al.* Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae* Nature, v.301, n.5898, p.302-307. 1983.

Dutra, V., L. Nakazato, *et al.* Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. Res Microbiol, v.155, n.4, May, p.245-51. 2004.

Eckert, B., O. B. Weber, *et al.* *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus* Int.J.Syst.Evol.Microbiol., v.51, n.Pt 1, p.17-26. 2001.

Edgar, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC Bioinformatics, v.5, Aug 19, p.113. 2004.

Engels, R., T. Yu, *et al.* Combo: a whole genome comparative browser. Bioinformatics, v.22, n.14, Jul 15, p.1782-3. 2006.

Ferro-Luzzi Ames, G. e K. Nikaido. Nitrogen regulation in *Salmonella typhimurium*. Identification of an NtrC protein-binding site and definition of a consensus binding sequence. Embo J, v.4, n.2, Feb, p.539-47. 1985.

Finan, T. M., M. R. O'brian, *et al.* Nitrogen Fixation: Global Perspectives. Wallingford, UK: CABI Publishing. 2002, 2001. p.

Fischer, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. Microbiol.Rev., v.58, n.3, p.352-386. 1994.

Fischer, H. M., T. Bruderer, *et al.* Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. Nucleic Acids Res., v.16, n.5, p.2207-2224. 1988.

Fischer, H. M. e H. Hennecke. Direct response of *Bradyrhizobium japonicum* NifA - mediated *nif* gene regulation to cellular oxygen status. Mol.Gen.Genet., v.209, p.621-626. 1987.

Foster-Hartnett, D., P. J. Cullen, *et al.* A new type of NtrC transcriptional activator. J Bacteriol, v.176, n.20, Oct, p.6175-87. 1994.

Frazzon, J. e I. S. Schrank. Sequencing and complementation analysis of the *nifUSV* genes from *Azospirillum brasilense* FEMS Microbiol.Lett., v.159, n.2, p.151-158. 1998.

Fred, E. B. e S. A. Waksman. Laboratory manual of general microbiology. 145 1928.

Fredriksson, A., M. Ballesteros, *et al.* Induction of the heat shock regulon in response to increased mistranslation requires oxidative modification of the malformed proteins. Mol Microbiol, v.59, n.1, Jan, p.350-9. 2006.

Friedrich, T. e H. Weiss. Modular evolution of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase and the origin of its modules. J Theor Biol, v.187, n.4, Aug 21, p.529-40. 1997.

Fu, H., A. Hartmann, *et al.* Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum spp.* J.Bacteriol., v.171, p.4679-4685. 1989.

Galloway, J. N. The global nitrogen cycle: changes and consequences: Elsevier Ltd. 102: 15-24 p. 1998.

Gjermansen, M., P. Ragas, *et al.* Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. Environ Microbiol, v.7, n.6, Jun, p.894-906. 2005.

Gross, C. A. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology: ASM Press Washington, DC 1996.

Habbe, N., T. Bert, *et al.* Identification of methylation-associated gene expression in neuroendocrine pancreatic tumor cells. Pancreatology, v.7, n.4, p.352-9. 2007.

Hall, P. G. e N. R. Krieg. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense* Appl.Environ.Microbiol., v.47 p.433-435. 1984.

Hartmann, A. e J. Baldani. The Genus *Azospirillum*. In: (Ed.). The Prokaryotes, 2006. The Genus *Azospirillum*, p.115-140

Hartmann, A., H. Fu, *et al.* Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum spp.* J.Bacteriol., v.165, n.3, p.864-870. 1986.

Hartmann, A., H. A. Fu, *et al.* Influence of amino acids on nitrogen fixation ability and growth of *Azospirillum spp.* Appl Environ Microbiol, v.54, n.1, Jan, p.87-93. 1988.

Hartmann, A., W. Zimmer, *et al.* Physiology of *Azospirillum* In: (Ed.). Azospirillum /Plant Associations. Boca Raton, FL CRC Press, 1994. Physiology of *Azospirillum* p.15

- Howard, J. B. e D. C. Rees. Nitrogenase: a nucleotide-dependent molecular switch. Annu.Rev.Biochem., v.63, p.235-264. 1994.
- Hubank, M. e D. G. Schatz. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. Nucleic Acids Res, v.22, n.25, Dec 25, p.5640-8. 1994.
- Huergo, L. F., L. S. Chubatsu, *et al.* Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. FEBS Lett, v.580, n.22, Oct 2, p.5232-6. 2006.
- Huergo, L. F., E. M. Souza, *et al.* Regulation of *glnB* gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein. FEMS Microbiol.Lett., v.223, n.1, p.33-40. 2003.
- Igarashi, R. Y. e L. C. Seefeldt. Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. Crit Rev.Biochem.Mol.Biol., v.38, n.4, p.351-384. 2003.
- Jack, R., M. De Zamaroczy, *et al.* The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae* J.Bacteriol., v.181, n.4, p.1156-1162. 1999.
- Jain, V., M. Kumar, *et al.* ppGpp: stringent response and survival. J Microbiol, v.44, n.1, Feb, p.1-10. 2006.
- Javelle, A. e M. Merrick. Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. Biochem Soc Trans, v.33, n.Pt 1, Feb, p.170-2. 2005.
- Javelle, A., E. Severi, *et al.* Ammonium sensing in *Escherichia coli* . Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. J.Biol.Chem., v.279, n.10, p.8530-8538. 2004.
- Jenal, U. e J. Malone. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. Annu Rev Genet, v.40, p.385-407. 2006.
- Jenkins, D. E., J. E. Schultz, *et al.* Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. J Bacteriol, v.170, n.9, Sep, p.3910-4. 1988.
- Jiang, P., M. R. Atkinson, *et al.* Functional dissection of the dimerization and enzymatic activities of *Escherichia coli* nitrogen regulator II and their regulation by the PII protein. Biochemistry, v.39, n.44, p.13433-13449. 2000.
- Jiang, P., J. A. Peliska, *et al.* Reconstitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of Ntr gene transcription in *Escherichia coli* Biochemistry, v.37, n.37, p.12795-12801. 1998.
- Jurkiewicz, D. e K. I. Wolska. Effect of DnaK and DnaJ proteins deprivation on

- Escherichia coli* response to starvation. Acta Microbiol Pol, v.48, n.2, p.197-201. 1999.
- Kabir, M. S., T. Sagara, *et al.* Effects of mutations in the *rpoS* gene on cell viability and global gene expression under nitrogen starvation in *Escherichia coli*. Microbiology, v.150, n.Pt 8, Aug, p.2543-53. 2004.
- Kamberov, E. S., M. R. Atkinson, *et al.* Effect of mutations in *Escherichia coli glnL* (*ntrB*), encoding nitrogen regulator II (NR-II or NtrB), on the phosphatase activity involved in bacterial nitrogen regulation. J.Biol.Chem., v.269, n.45, p.28294-28299. 1994.
- _____. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. J.Biol.Chem., v.270, n.30, p.17797-17807. 1995.
- Keener, J. e S. Kustu. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v.85, n.14, p.4976-4980. 1988.
- Kern, D., B. F. Volkman, *et al.* Structure of a transiently phosphorylated switch in bacterial signal transduction. Nature, v.402, n.6764, p.894-898. 1999.
- Khammas, K. M., E. Ageron, *et al.* *Azospirillum irakense* *sp. nov.*, a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res.Microbiol., v.140, n.9, p.679-693. 1989.
- Kim, J. e D. C. Rees. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. Biochemistry, v.33, n.2, p.389-397. 1994.
- Kingsford, C. L., K. Ayanbule, *et al.* Rapid, accurate, computational discovery of Rho-independent transcription terminators illuminates their relationship to DNA uptake. Genome Biol, v.8, n.2, p.R22. 2007.
- Kiupakis, A. K. e L. Reitzer. ArgR-independent induction and ArgR-dependent superinduction of the *astCADBE* operon in *Escherichia coli*. J Bacteriol, v.184, n.11, Jun, p.2940-50. 2002.
- Laval-Favre, K., B. Letouvet-Pawlak, *et al.* A gene involved in both protein secretion during growth and starvation-induced development encodes a subunit of the NADH:ubiquinone oxidoreductase in *Myxococcus xanthus*. Mol Microbiol, v.23, n.5, Mar, p.1043-52. 1997.
- Leigh, J. A. e J. A. Dodsworth. Nitrogen regulation in bacteria and archaea. Annu Rev Microbiol, v.61, p.349-77. 2007.
- Lesnik, E. A., R. Sampath, *et al.* Prediction of rho-independent transcriptional terminators in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res, v.29, n.17, Sep 1, p.3583-94. 2001.
- Li, M. S., I. M. Monahan, *et al.* cDNA-RNA subtractive hybridization reveals increased

expression of mycocerosic acid synthase in intracellular *Mycobacterium bovis* BCG. Microbiology, v.147, n.Pt 8, Aug, p.2293-305. 2001.

Liang, Y. Y., F. Arsene, *et al.* Characterization of the *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* Sp7: their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity. Mol.Gen.Genet., v.240, n.2, p.188-196. 1993.

Liang, Y. Y., M. De Zamaroczy, *et al.* Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. FEMS Microbiol.Lett., v.79, n.1-3, p.113-119. 1992.

Liang, Y. Y., P. A. Kaminski, *et al.* Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. Mol.Microbiol., v.5, n.11, p.2735-2744. 1991.

Lisitsyn, N., N. Lisitsyn, *et al.* Cloning the differences between two complex genomes. Science, v.259, n.5097, Feb 12, p.946-51. 1993.

Lisitsyn, N. A. Representational difference analysis: finding the differences between genomes. Trends Genet., v.11, n.8, Aug, p.303-7. 1995.

Liu, J. e B. Magasanik. Activation of the dephosphorylation of nitrogen regulator I-phosphate of *Escherichia coli* J.Bacteriol., v.177, n.4, p.926-931. 1995.

Machado, H. B., M. G. Yates, *et al.* The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3-like-ntrB-ntrC* operon and are negatively regulated. Can J Microbiol, v.41, n.8, Aug, p.674-84. 1995.

MacLellan, S. R., A. M. Maclean, *et al.* Promoter prediction in the rhizobia. Microbiology, v.152, n.Pt 6, Jun, p.1751-63. 2006.

Magalhães, F. M., J. L. Baldani, *et al.* A new acid-tolerant *Azospirillum* species. An.Acad.Bras.Cienc., v.55, p.417-429. 1983.

Mandal, A. K. e S. Ghosh. Isolation of a glutamate synthase (GOGAT)-negative, pleiotropically N utilization-defective mutant of *Azospirillum brasilense*: cloning and partial characterization of GOGAT structural gene. J Bacteriol, v.175, n.24, Dec, p.8024-9. 1993.

Manoil, C. e D. Kaiser. Accumulation of guanosine tetrphosphate and guanosine pentaphosphate in *Myxococcus xanthus* during starvation and myxospore formation. J Bacteriol, v.141, n.1, Jan, p.297-304. 1980.

Martin-Didonet, C. C., L. S. Chubatsu, *et al.* Genome structure of the genus *Azospirillum*. J Bacteriol, v.182, n.14, Jul, p.4113-6. 2000.

Martinez-Argudo, I., R. Little, *et al.* The NifL-NifA System: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. J.Bacteriol., v.186, n.3, p.601-610. 2004.

Masepohl, B., B. Kaiser, *et al.* Urea utilization in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* is regulated by the transcriptional activator NtrC. J Bacteriol, v.183, n.2, Jan, p.637-43. 2001.

Mehnaz, S., B. Weselowski, *et al.* *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. Int J Syst Evol Microbiol, v.57, n.Pt 3, Mar, p.620-4. 2007.

Mehta, A. e Y. B. Rosato. Identification of differentially expressed genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by representational difference analysis of cDNA: SciELO Brasil. 28: 140-149 p. 2005.

Merrick, M. J. e R. A. Edwards. Nitrogen control in bacteria. Microbiol.Rev., v.59, n.4, p.604-622. 1995.

Merrick, M. J., G. Stacey, *et al.* Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. In: (Ed.). Biological Nitrogen Fixation. New York: Chapman and Hall, 1992. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria, p.835-876

Mettke, I., U. Fiedler, *et al.* Mechanism of activation of a response regulator: interaction of NtrC-P dimers induces ATPase activity. J.Bacteriol., v.177, n.17, p.5056-5061. 1995.

Michel-Reydellet, N. e P. A. Kaminski. *Azorhizobium caulinodans* PII and GlnK proteins control nitrogen fixation and ammonia assimilation. J Bacteriol, v.181, n.8, Apr, p.2655-8. 1999.

Milcamps, A., V. Keyers, *et al.* Identification of a *nifW* -like gene in *Azospirillum brasilense* Biochim.Biophys.Acta, v.1173, n.2, p.237-238. 1993.

Morett, E. e L. Segovia. The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains J.Bacteriol., v.175, p.6067-6074. 1993.

Muse, W. B. e R. A. Bender. The *nac* (nitrogen assimilation control) gene from *Escherichia coli* J.Bacteriol., v.180 p.1166-1173. 1998.

Nelson, L. M. e R. Knowles. Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by *Azospirillum brasilense* grown in continuous culture. Can J Microbiol, v.24, n.11, Nov, p.1395-403. 1978.

Neuhoff, J., N. Arnold, *et al.* Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Blue. 9: 255-262 p. 1988.

Ninfa, A. J. e R. L. Bennett. Identification of the site of autophosphorylation of the bacterial protein kinase/phosphatase NRII. J.Biol.Chem., v.266, n.11, p.6888-6893. 1991.

Ninfa, A. J. e P. Jiang. PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. Curr Opin Microbiol, v.8, n.2, Apr, p.168-73. 2005.

Ninfa, A. J. e B. Magasanik. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v.83, n.16, p.5909-5913. 1986.

Ninfa, A. J., S. Ueno-Nishio, *et al.* Purification of nitrogen regulator II, the product of the *glnL* (*ntrB*) gene of *Escherichia coli* J.Bacteriol., v.168, n.2, p.1002-1004. 1986.

Okon, Y. Azospirillum /plant associations: CRC Press. 1994

Okon, Y., S. L. Albrecht, *et al.* Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum*. J Bacteriol, v.128, n.2, Nov, p.592-7. 1976.

Okon, Y. e C. A. Labandera-Gonzalez. Agronomic applications of *Azospirillum* : an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol.Biochem., v.26, p.1551-1601. 1994.

Okon, Y. e J. Vanderleyden. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. ASM News, v.63, p.366-370. 1997.

Oliveira, A. L. M., S. Urquiaga, *et al.* The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants: Springer. 242: 205-215 p. 2002.

Passaglia, L. M., C. P. Nunes, *et al.* The *nifHDK* operon in the free-living nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum brasilense* sequentially comprises genes H, D, K, an 353 bp orf and gene Y. Braz.J.Med.Biol.Res., v.24, n.7, p.649-675. 1991.

Passaglia, L. M., C. Van Soom, *et al.* Purification and binding analysis of the nitrogen fixation regulatory NifA protein from *Azospirillum brasilense* Braz.J.Med.Biol.Res., v.31, n.11, p.1363-1374. 1998.

Patriquin, D. G., J. Döbereiner, *et al.* Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. Can.J.Microbiol., v.29, p.900-915. 1983.

Peng, G., H. Wang, *et al.* *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. Int J Syst Evol Microbiol, v.56, n.Pt 6, Jun, p.1263-71. 2006.

Persuhn, D. C., E. M. Souza, *et al.* The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. FEMS Microbiol Lett, v.192, n.2, Nov 15, p.217-21. 2000.

Potrich, D. P., L. M. Passaglia, *et al.* Partial characterization of *nif* genes from the bacterium *Azospirillum amazonense* Braz.J.Med.Biol.Res., v.34, n.9, p.1105-1113. 2001.

Reinhold, B., T. Hurek, *et al.* Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. J.Bacteriol., v.162, n.1, p.190-195. 1985.

_____. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth. Int.J.Syst.Bacteriol., v.37 p.43-51. 1987.

Reitzer, L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. Annu Rev Microbiol, v.57, p.155-76. 2003.

Ribbe, M., D. Gadkari, *et al.* N₂ fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase. J Biol Chem, v.272, n.42, Oct 17, p.26627-33. 1997.

Rosswall, T. Microbiological regulation of the biogeochemical nitrogen cycle: Springer. 67: 15-34 p. 1982.

Roszak, D. B. e R. R. Colwell. Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol Rev, v.51, n.3, Sep, p.365-79. 1987.

Rutherford, K., J. Parkhill, *et al.* Artemis: sequence visualization and annotation. Bioinformatics, v.16, n.10, Oct, p.944-5. 2000.

Sambrook, J. e D. W. Russell. Molecular Cloning A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001

Santero, E., A. Toukdarian, *et al.* Identification and characterization of two nitrogen fixation regulatory regions, *nifA* and *nfrX*, in *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter chroococcum* Mol.Microbiol., v.2, n.3, p.303-314. 1988.

Sarkar, N. Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. Annu Rev Biochem, v.66, p.173-97. 1997.

Schmitz, G., K. Nikaido, *et al.* Regulation of a transport operon promoter in *Salmonella typhimurium* : identification of sites essential for nitrogen regulation. Mol.Gen.Genet., v.215, n.1, p.107-117. 1988.

Schmitz, R. A., K. Klopprogge, *et al.* Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii* : NifL, transducing two environmental signals to the nif transcriptional activator NifA. J.Mol.Microbiol.Biotechnol., v.4, n.3, p.235-242. 2002.

Schneider, B. L., A. K. Kimpakis, *et al.* Arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in *Escherichia coli* J.Bacteriol., v.180 p.4278-4286. 1998.

Schulz, A. A., H. J. Collett, *et al.* Nitrogen and carbon regulation of glutamine synthetase and glutamate synthase in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. FEMS Microbiol Lett, v.205, n.2, Dec 18, p.361-7. 2001.

Schwab, S., H. J. Ramos, *et al.* Identification of NH₄⁺-regulated genes of *Herbaspirillum seropedicae* by random insertional mutagenesis. Arch Microbiol, v.187, n.5, May, p.379-86. 2007.

Silberbach, M., A. Huser, *et al.* DNA microarray analysis of the nitrogen starvation response of *Corynebacterium glutamicum*. J Biotechnol, v.119, n.4, Oct 10, p.357-67. 2005.

Sly, L. I. e E.Stackebrandt. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* Int.J.Syst.Bacteriol., v.49 p.541-544. 1999.

Smil, V. Enriching the Earth: Fritz Haber, Carl Bosch and the Transformation of World Food Production. Cambridge, MA The MIT Press 2001

Smith, B. E. Structure. Nitrogenase reveals its inner secrets. Science, v.297, n.5587, Sep 6, p.1654-5. 2002.

Socolow, R. H. Nitrogen management and the future of food: Lessons from the management of energy and carbon: National Acad Sciences. 96: 6001-6008 p. 1999.

Souza, E. M., S. Funayama, *et al.* Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. Can.J.Microbiol., v.37, n.6, p.425-429. 1991.

Souza, E. M., F. O. Pedrosa, *et al.* Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. J.Bacteriol., v.181, n.2, p.681-684. 1999.

Spence, J., A. Cegielska, *et al.* Role of *Escherichia coli* heat shock proteins DnaK and HtpG (C62.5) in response to nutritional deprivation. J Bacteriol, v.172, n.12, Dec, p.7157-66. 1990.

Sperotto, R. A., T. Boff, *et al.* Increased senescence-associated gene expression and lipid peroxidation induced by iron deficiency in rice roots. Plant Cell Rep, Aug 24. 2007.

Sperotto, R. A., J. Gross, *et al.* The electron transfer flavoprotein *fixABCX* gene products from *Azospirillum brasilense* show a NifA-dependent promoter regulation. Curr.Microbiol., v.49, n.4, p.267-273. 2004.

Steenhoudt, O. e J. Vanderleyden. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol.Rev., v.24, n.4, p.487-506. 2000.

Tal, S., P. Smirnoff, *et al.* The regulation of poly- beta-hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* during balanced growth and starvation. 136: 1191-1196 p. 1990.

Tamura, K., J. Dudley, *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol, v.24, n.8, Aug, p.1596-9. 2007.

Tarrand, J. J., N. R. Krieg, *et al.* A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum gen. nov.* and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) *comb. nov.* and *Azospirillum brasilense sp. nov.* Can J Microbiol, v.24, n.8, Aug, p.967-80. 1978.

Tate, R., A. Riccio, *et al.* The *Rhizobium etli amtB* gene coding for an NH₄⁺ transporter is down-regulated early during bacteroid differentiation. Mol Plant Microbe Interact, v.11, n.3, Mar, p.188-98. 1998.

Taylor, D. L., P. N. Ward, *et al.* Identification of a differentially expressed oligopeptide binding protein (OppA2) in *Streptococcus uberis* by representational difference analysis of cDNA. J Bacteriol, v.185, n.17, Sep, p.5210-9. 2003.

Thomas, G., G. Coutts, *et al.* The *glnKamtB* operon. A conserved gene pair in prokaryotes. Trends Genet, v.16, n.1, Jan, p.11-4. 2000.

Tolonen, A. C., J. Aach, *et al.* Global gene expression of *Prochlorococcus* ecotypes in response to changes in nitrogen availability. Mol Syst Biol, v.2, p.53. 2006.

Toukdarian, A. e C. Kennedy. Regulation of nitrogen metabolism in *Azotobacter vinelandii*: isolation of *ntr* and *glnA* genes and construction of *ntr* mutants. Embo J, v.5, n.2, Feb, p.399-407. 1986.

Trentini, D. Isolamento e Análise do Gene *glnB* de *Azospirillum amazonense*. UFRGS, Porto Alegre, 2007. 84 p.

Unniraman, S., R. Prakash, *et al.* Conserved economics of transcription termination in eubacteria. Nucleic Acids Res, v.30, n.3, Feb 1, p.675-84. 2002.

Valverde, A., Y. Okon, *et al.* cDNA-AFLP reveals differentially expressed genes related to cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett, v.265, n.2, Dec, p.186-94. 2006.

Van Heeswijk, W. C., S. Hoving, *et al.* An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli* Mol.Microbiol., v.21 p.133-146. 1996.

Vande, B. A., J. Michiels, *et al.* Transcription of the *Azospirillum brasilense nifH* gene is positively regulated by NifA and NtrA and is negatively controlled by the cellular nitrogen status. Mol.Gen.Genet., v.232, n.2, p.279-283. 1992.

Veit, K., C. Ehlers, *et al.* Global transcriptional analysis of *Methanosarcina mazei* strain Go1 under different nitrogen availabilities. Mol Genet Genomics, v.276, n.1, Jul, p.41-55. 2006.

Vitousek, P. M., H. A. Mooney, *et al.* Human Domination of Earth's Ecosystems. 277: 494 p. 1997.

- Volkman, B. F., M. J. Nohaile, *et al.* Three-dimensional solution structure of the N-terminal receiver domain of NTRC. Biochemistry, v.34, n.4, p.1413-1424. 1995.
- Wang, H., C. C. Franke, *et al.* Reversible membrane association of dinitrogenase reductase activating glycohydrolase in the regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*; dependence on GlnJ and AmtB1. FEMS Microbiol Lett, v.253, n.2, Dec 15, p.273-9. 2005.
- Weiss, D. S., J. Batut, *et al.* The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. Cell, v.67, n.1, p.155-167. 1991.
- Weiss, V., F. Claverie-Martin, *et al.* Phosphorylation of nitrogen regulator I of *Escherichia coli* induces strong cooperative binding to DNA essential for activation of transcription. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., v.89, n.11, p.5088-5092. 1992.
- Weiss, V. e B. Magasanik. Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., v.85, n.23, p.8919-8923. 1988.
- Wendrich, T. M., G. Blaha, *et al.* Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. Mol Cell, v.10, n.4, Oct, p.779-88. 2002.
- Westbrock-Wadman, S., D. R. Sherman, *et al.* Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. Antimicrob Agents Chemother, v.43, n.12, Dec, p.2975-83. 1999.
- Wolfe, D. M., Y. Zhang, *et al.* Specificity and regulation of interaction between the PII and AmtB1 proteins in *Rhodospirillum rubrum*. J Bacteriol, v.189, n.19, Oct, p.6861-9. 2007.
- Wu, S. Q., W. Chai, *et al.* General nitrogen regulation of nitrate assimilation regulatory gene *nasR* expression in *Klebsiella oxytoca* M5al. J.Bacteriol., v.181, n.23, p.7274-7284. 1999.
- Wyman, C., I. Rombel, *et al.* Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. Science, v.275, n.5306, p.1658-1661. 1997.
- Xie, C. H. e A. Yokota. *Azospirillum oryzae* *sp. nov.*, a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa* Int.J.Syst.Evol.Microbiol., v.55, n.Pt 4, p.1435-1438. 2005.
- Zhulin, I. B., V. A. Bespalov, *et al.* Oxygen taxis and proton motive force in *Azospirillum brasilense* J.Bacteriol., v.178, n.17, p.5199-5204. 1996.
- Zhulin, I. B., S. Tretyakova, *et al.* Chemotaxis of *Azospirillum brasilense* towards compounds typical of plant root exudates. Folia Microbiol., v.33 p.277-280. 1988.
- Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.

Nucleic Acids Res, v.31, n.13, Jul 1, p.3406-15. 2003.

CURRICULUM VITAE SANT'ANNA, F.H.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Fernando Hayashi Sant'Anna

Local e data de nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil, 27 de janeiro de 1984

Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia

Avenida Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, Prédio 43421, Laboratório 222

Agronomia - Porto Alegre

91540-000, RS - Brasil

Telefone profissional: 51 33166055

E-mail: hayashi@cbiot.ufrgs.br

2. FORMAÇÃO:

Bacharelado em Ciências Biológicas - ênfase Molecular, Celular e Funcional

3. ESTÁGIOS:

Estágio Curricular. Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – FEPPS. Desenvolvimento de método molecular de detecção de *Chlamydia trachomatis* em urina e Diagnóstico de infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. 2005

Bolsista de iniciação científica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Laboratório de organismos diazotróficos. Estudo do metabolismo do Nitrogênio em *Azospirillum*. 2003 – 2005.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Menção Honrosa, 25ª Reunião de Genética de Microrganismos

5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

BROETTO, L., CECAGNO, R., SANT'ANNA, F. H., WEBER, S. S., SCHRANK, Irene Silveira

Stable transformation of *Chromobacterium violaceum* with a broad-host-range plasmid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. , v.71, p.450 - 454, 2006.

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, Irene Silveira

Identification of differentially expressed genes of *Azospirillum amazonense* related to the nitrogen availability by cDNA-RDA technique In: XI Congreso Argentino de Microbiología, 2007, Córdoba.

Revista Argentina de Microbiología. , 2007. v.39. p.160 -

2. SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, Irene Silveira

Isolation of glnK gene of Azospirillum amazonense In: XI Congreso Argentino de Microbiología, 2007, Córdoba.

Revista Argentina de Microbiología. , 2007. v.39. p.160 -

3. TRENTINI, D. B., SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, Irene Silveira
Sequence isolation and transcriptional regulation of the PII protein encoding gene glnB of the diazotroph Azospirillum amazonense In: XI Congreso Argentino de Microbiología, 2007, Córdoba.

Revista Argentina de Microbiología. , 2007. v.39. p.48 -

4. TRENTINI, D. B., SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, Irene Silveira
Transcriptional regulation of the Azospirillum brasilense orf2-nifUSV-orf4 operon, involved with nitrogenase biosynthesis In: XI Congreso Argentino de Microbiología, 2007, Córdoba.

Revista Argentina de Microbiología. , 2007. v.39. p.49 -

5. TRENTINI, D. B., SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, Irene Silveira
Análise da região regulatória do operon nifUSV de Azospirillum brasilense In: XVIII Salão de iniciação científica, 2006, Porto Alegre.

XVIII Salão de iniciação científica. , 2006.

6. SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, Irene Silveira
Clonagem e caracterização do gene glnK de Azospirillum amazonense In: 25ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2006, São Pedro.

25ª Reunião de Genética de Microrganismos. , 2006.

7. SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, Irene Silveira
Identificação de genes diferencialmente expressos em resposta à disponibilidade de nitrogênio em Azospirillum amazonense In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre.

VIII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. , 2006.

8. SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, Irene Silveira
Análise dos genes glnB e glnD da bactéria diazotrófica Azospirillum amazonense In: 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia.

51º Congresso Brasileiro de Genética. , 2005.

9. SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, Irene Silveira
Análise dos genes glnB e glnD da bactéria diazotrófica Azospirillum amazonense In: 51º Congresso de genética, 2005, Águas de Lindóia.
., 2005.

10. SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, Irene Silveira

Análise dos genes *glnB* e *glnD* da bactéria diazotrófica *Azospirillum amazonense* In: XVII Salão de Iniciação Científica, 2005, Porto Alegre.

. , 2005.

11. BECKER, D., JARDIM, F. M. A., WEBER, S. S., SANT'ANNA, F. H., SANTOS JR, S., RIBEIRO, M. O., SCHERER, L. C.

Contribuição do PCR in house no diagnóstico da tuberculose: a experiência em rotina de um laboratório de saúde pública In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos.

XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2005.

12. SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, Irene Silveira

Caracterização da região promotora do operon *nifUSV* de *Azospirillum brasilense* In: XXIV Reunião de Genética de Microorganismos, 2004, Gramado.

XXIV Reunião de Genética de Microorganismos. , 2004.

13. SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, Irene Silveira

Clonagem e caracterização dos genes *glnB* e *glnD* de *Azospirillum amazonense* In: XVI Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre.

. , 2004.

14. SANT'ANNA, F. H., SCHRANK, Irene Silveira

Determinação da atividade promotora do operon *ORF2nifUSVORF4* de *Azospirillum brasilense* na presença da proteína *NifA* In: XV Salão de Iniciação Científica, 2003, Porto Alegre.

. , 2003.