

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

***atrAb* - Gene que Codifica um Ativador de Transcrição da  
Família LysR em *Azospirillum brasilense*:  
Seqüenciamento, Caracterização e Análise da Região  
Promotora**

Samanta Bolzan de Campos

Trabalho apresentado como  
Conclusão de Curso para  
obtenção de título de Bacharel  
em Ciências Biológicas,  
Ênfase Molecular, Celular e  
Funcional

Orientadoras: Prof. Dra. Luciane M. P. Passaglia e Prof. Dra. Irene S. Schrank

Porto Alegre

2003

UFRGS - BIBLIOTECA  
INST. BIOCÊNCIAS

BIO  
BIO  
200

## **Agradecimentos**

Às Professoras Dra. Luciane Passaglia e Irene Schrank pela orientação e ensinamentos preciosos nesses mais de três anos de convivência.

Aos meus pais, Irineu e Elizabeth, e a minha irmã, Camila, por todo amor, compreensão e atenção.

A todos meus familiares, que me apoiaram durante o curso.

Ao Felipe por todo carinho e atenção nesse tempo que estamos juntos.

Aos colegas do laboratório 210, Deise, Raul, René, Ricardo, sempre dispostos a ajudar nos momentos mais propícios.

Aos demais colegas do Centro de Biotecnologia, principalmente dos laboratórios 205, 213 e 107.

Aos meus amigos feitos durante esse curso, principalmente às meninas Vivi, Vê, e Ale.

As Instituições Financiadoras, por possibilitarem a realização desse trabalho.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desse trabalho.

1 INTRODUÇÃO

- 1.1 Função biológica do sistema imunológico
- 1.2 Características da resposta imune
- 1.3 Antígenos e anticorpos
- 1.4 Tipos de anticorpos
- 1.5 Oligonucleotídeos

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Anticorpos monoclonais

2.2 Síntese de oligonucleotídeos

2.3 Purificação de anticorpos

2.4 Caracterização dos anticorpos

2.5 Síntese de DNA linear

2.6 Síntese de DNA plasmidial

2.7 Sequenciamento de DNA

2.8 Análises estatísticas

2.9 Resultados e discussão

2.10 Conclusões

2.11 Referências

2.12 Anexos

2.13 Bibliografia

2.14 Glossário

2.15 Índice

2.16 Apêndice

2.17 Anexos

2.18 Bibliografia

2.19 Glossário

2.20 Índice

2.21 Apêndice

Esse trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e concessão da bolsa de Iniciação Científica pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do Programa Interno de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO:</b>	<b>5</b>
1.1. Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN):	5
1.2. Gênero <i>Azospirillum</i> :	11
1.3. Mutação sítio-dirigida com transposon Tn5:	12
1.4. LysR: Ativadores de transcrição em procariotos:	14
1.5. Objetivos:	17
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS:</b>	<b>18</b>
2.1. Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados:	18
2.2. Manipulações de DNA:	18
2.2.1.: Reações de clivagem:	19
2.2.2. Ligação de fragmentos:	19
2.2.3.: Transformação bacteriana:	19
2.3. Extrações de DNA:	20
2.3.1.: Extração de DNA total de <i>Azospirillum brasilense</i> :	20
2.3.2.: Extração de DNA plasmidial:	20
2.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):	21
2.4.1.: Oligonucleotídeos:	21
2.4.2.: Condições de amplificação:	21
2.5. Reações de Seqüenciamento:	22
2.6. Análise das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos obtidas:	23
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:</b>	<b>24</b>
3. 1. Seqüência do gene <i>orfatrAb</i> :	24
3.2. Comparação da seqüência de aminoácidos da ORFatrAb com outras proteínas da família LysR:	28
3.3. Amplificação e clonagem da região promotora do gene <i>orfatrAb</i> :	31
<b>4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS:</b>	<b>35</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b>	<b>37</b>

# 1. INTRODUÇÃO:

## 1.1. Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN):

O nitrogênio é um elemento-chave na composição de diversas biomoléculas, como proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos. Este nitrogênio é proveniente da atmosfera, onde ele está sob forma de  $N_2$  (com uma ligação tripla entre os dois átomos de N), se tornando muito resistente ao ataque químico, e, portanto, não estando disponível para a maior parte dos organismos. Porém, existem microrganismos, como bactérias e algas azuis, que são capazes de converter este  $N_2$  em formas que possam ser assimiladas por outros organismos, como a amônia. Estes microrganismos, chamados de **diazotróficos**, são responsáveis por aproximadamente 60% do nitrogênio fixado disponível. O processo de conversão do nitrogênio atmosférico em compostos orgânicos assimiláveis recebe a denominação de **fixação biológica do nitrogênio (FBN)** (Stryer, 1994).

A alternativa industrial para a conversão do nitrogênio molecular em compostos orgânicos reativos foi estabelecida, em 1910, por Fritz Haber. Embora utilizada na fabricação de fertilizantes, a condição de quebra da ligação só é obtida a uma temperatura de  $500^\circ C$  e uma pressão de 300 atmosferas (Stryer, 1994), o que torna o processo bastante caro e praticamente inviável.

O processo de FBN por microrganismos diazotróficos é catalisado pelo complexo enzimático **nitrogenase**. Um dos produtos da reação catalisada pela nitrogenase é a amônia ( $\text{NH}_3$ ) que a bactéria diazotrófica fornece como fonte assimilável de nitrogênio para os outros organismos ou diretamente para o solo. A relevância deste processo se dá, além da redução dos custos com adubos nitrogenados, pela importância do nitrogênio como um elemento vital, aumentando a produtividade das plantas (Peters *et al.*, 1995).

O complexo enzimático nitrogenase possui duas subunidades: a Fe-proteína e a MoFe-proteína. Durante a reação ocorre o transporte de elétrons da Fe-proteína para uma das subunidades da MoFe-proteína. Este processo utiliza uma grande quantidade de energia: pelo menos 16 moléculas de ATP são necessárias para cada molécula de  $\text{N}_2$  reduzida. Devido a isso, existem diferentes níveis de controle na expressão dos genes envolvidos, e, também, mecanismos de controle em nível posterior à transcrição (Fu *et al.*, 1989).

Os genes envolvidos no processo de FBN são chamados *nif* (de *nitrogen fixation*) e foram primeiramente caracterizados na bactéria diazotrófica de vida livre *Klebsiella pneumoniae* (figura 1). A maioria destes genes está envolvida na montagem e estabilização do complexo enzimático da nitrogenase. Existe uma grande similaridade em estrutura, organização e função dos genes *nif* de diversos organismos diazotróficos, com estes identificados em *K. pneumoniae*. Os genes *nif* desta bactéria estão localizados em uma região genômica de aproximadamente 24.000 pares de base, próximos aos genes da biossíntese de histidina, e organizados em oito operons (Arnold *et al.*, 1988). Os genes estruturais da nitrogenase estão situados em um mesmo operon (*nifHDK*), onde o gene *nifH* codifica a subunidade da Fe-proteína e os genes *nifDK* codificam a

MoFe-proteína. Muitos dos outros genes estão envolvidos na síntese do cofator da enzima, o MoFeco, entre eles *nifE*, *nifN*, *nifV*, *nifB*, *nifQ*. Existem, ainda, genes envolvidos no transporte de elétrons, como os genes *nifJ* e *nifF* (Arnold *et al.*, 1988; Dixon, 1984).

Entre os genes *nif* de *K. pneumoniae* existem dois cujos produtos apresentam funções reguladoras, que são os genes *nifL* e *nifA*. Nessa bactéria, o produto do gene *nifL* apresenta a função de reprimir a atividade do produto do gene *nifA*, quando as condições para a síntese da nitrogenase não são adequadas. A proteína reguladora NifA, produto do gene *nifA*, reconhece seqüências UAS (seqüências ativadoras a montante, do inglês *upstream activator sequences*) no DNA, aproximadamente 100 nucleotídeos a montante do sítio de ligação da RNA-polimerase, ativando a transcrição dos genes *nif*. As seqüências UAS, que possuem a seqüência consenso TGT-N<sub>10</sub>-ACA, estão presentes em todas regiões promotoras dos genes *nif* já caracterizadas, evidenciando, portanto, que estes genes estão sujeitos à ativação da transcrição através ligação da proteína NifA (Arnold *et al.*, 1988; Dixon, 1984).

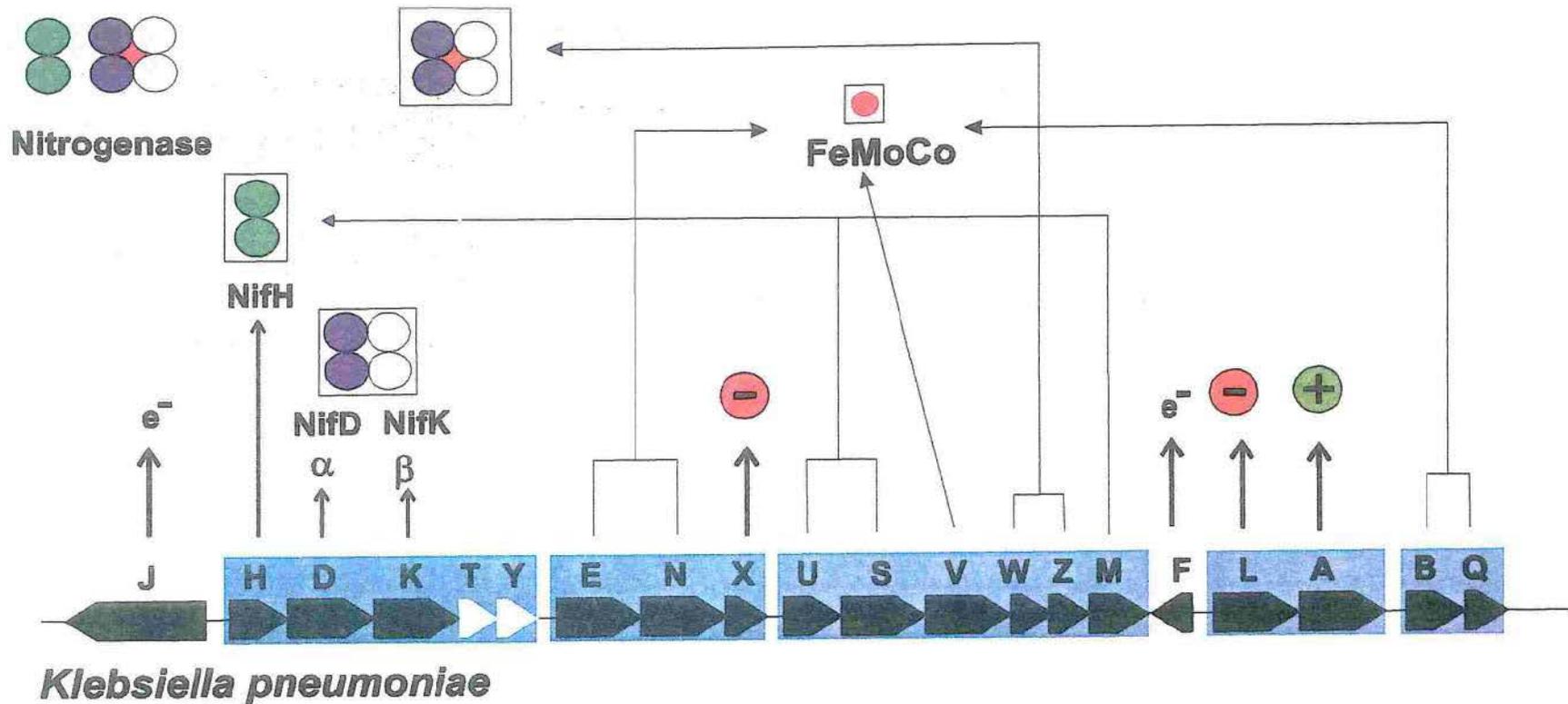
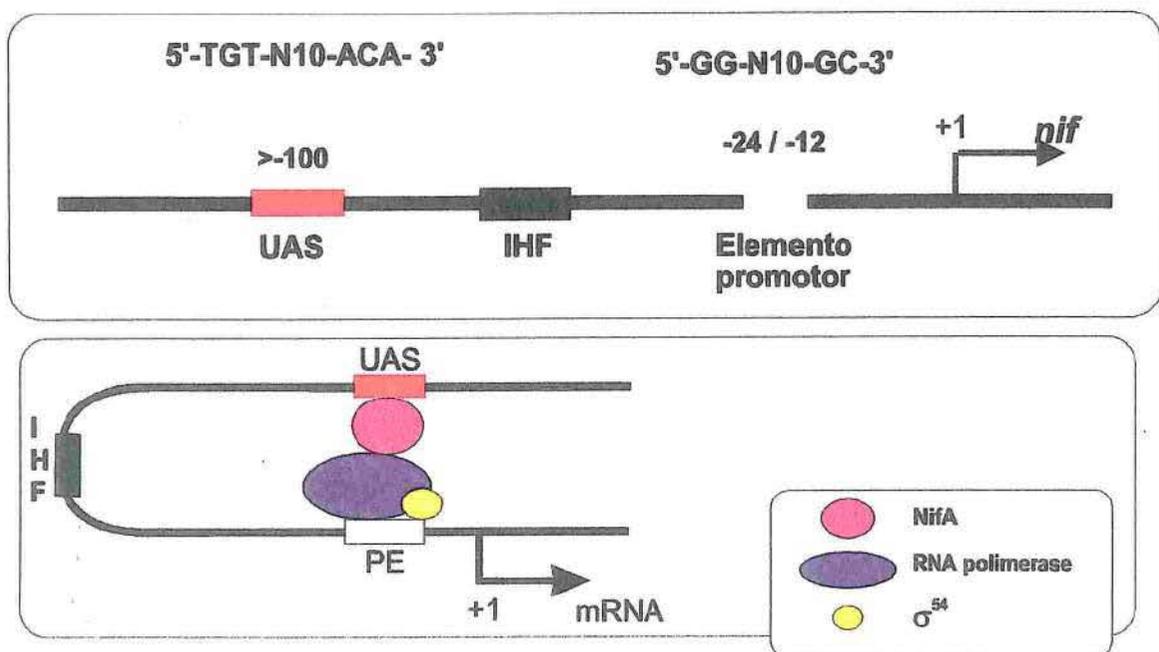


Figura 1: Organização dos genes *nif* em *Klebsiella pneumoniae* seus respectivos produtos gênicos (Figura cedida pela Dra. Irene Schrank).

Além deste sistema de regulação com os genes *nifLA*, existem, em *K. pneumoniae*, outros genes cujos produtos apresentam funções reguladoras gerais e que também regulam os genes *nif*, como os genes *ntrB* e *ntrC*. Os produtos dos genes *ntrBC* podem estar envolvidos na regulação do metabolismo de nitratos, regulação posterior à tradução da nitrogenase e podem também ativar a transcrição do gene *nifA* (Arnold *et al.*, 1988; Fu *et al.*, 1989; Merrick *et al.*, 1995). Um outro mecanismo de controle, que não é encontrado em *Klebsiella pneumoniae*, ocorre em diversos diazotróficos através dos produtos dos genes *draT* e *draG*. Os produtos desses genes possuem funções de regulação posterior à tradução da nitrogenase, agindo diretamente sobre a enzima, inativando-a quando o nível de oxigênio celular está muito elevado (Fu *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1997).

A região promotora dos genes envolvidos no metabolismo e na fixação biológica do nitrogênio possui uma seqüência de reconhecimento para a RNA-polimerase, que difere daquelas presentes em genes que desempenham outras funções. O fator sigma ( $\sigma$ ) da RNA-polimerase de procariotos é o responsável pelo reconhecimento da região promotora e se liga a ela para promover o início da transcrição. A região promotora dos genes envolvidos no processo de fixação do nitrogênio é constituída por uma seqüência consenso rica de nucleotídeos C e G, localizada nas posições -24/-12, que é reconhecida pelo fator sigma alternativo da RNA-polimerase,  $\sigma^{54}$  (Zaha, 1996). A RNA-polimerase complexada com o fator  $\sigma^{54}$  necessita da presença de proteínas acessórias para a transcrição dos genes, que, no caso dos genes envolvidos na fixação do nitrogênio de bactérias diazotróficas, é a proteína ativadora NifA, juntamente com a proteína IHF (fator de integração do hospedeiro) (Barrios *et al.*, 1999). Com a ligação da

proteína ativadora NifA na região UAS e o reconhecimento e ligação da RNA-polimerase complexada com fator  $\sigma^{54}$ , a proteína IHF promove uma curvatura no DNA, aproximando essas duas proteínas. A interação da proteína NifA com o complexo da RNA-polimerase promove o início da transcrição, como demonstrado na figura 2 (Zhang *et al.*, 1997).



**Figura 2:** Regulação dos genes *nif* na bactéria *Azospirillum brasilense*, mostrando a região promotora de um gene *nif*, com a sequência reconhecida pela proteína NifA (UAS) aproximadamente 100 nucleotídeos a montante do início da transcrição; a sequência de reconhecimento do fator sigma alternativo da RNA-polimerase ( $\sigma^{54}$ ) na posição -24/-12, e a ativação da transcrição através da interação da proteína NifA com o complexo da RNA-polimerase, devido à curvatura no DNA promovida pelo fator IHF. (Figura cedida pela Dra. Irene Schrank.)

## 1.2. Gênero *Azospirillum*:

O gênero *Azospirillum* compreende bactérias de vida livre, fixadoras de nitrogênio, que se localizam na rizosfera e pertencem a um grupo de bactérias que promove o crescimento vegetal. Triagens em campo demonstraram que, sob certas condições ambientais, a inoculação de *Azospirillum* tinha efeitos benéficos nas plantações. Porém, apesar de todos os estudos realizados, o modo de ação pelo qual *Azospirillum* aumenta o crescimento das plantas ainda não foi completamente elucidado (Steenhoudt *et al.*, 2000; Vande-Broek *et al.*, 1995).

O gênero possui sete espécies: *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense*, *A. halopraeferens*, *A. largimobile* e *A. doebereineriae* as quais se associam, preferencialmente, com gramíneas. (Martin-Didonet *et al.*, 2000; Potrich *et al.*, 2001).

As culturas de *Azospirillum* produzem fitormônios, como: auxinas, principalmente IAA (Vande-Broek *et al.*, 1995; Vande-Broek *et al.*, 1999; Zimmer *et al.*, 1998), citocinas e giberelinas (Vande-Broek *et al.*, 1995). Dos fitormônios produzidos, a auxina é tida como a de maior interesse, pois é ela que promove o crescimento das plantas associadas com a bactéria (Vande-Broek *et al.*, 1995). Alguns dos genes envolvidos na rota da biossíntese de fitormônios já foram isolados e identificados em *Azospirillum brasilense*, como o gene *ipdC*, que codifica a enzima indol-3-piruvato descarboxilase, a qual é a segunda enzima na rota da biossíntese de ácido indol-3- acético (IAA) (Zimmer *et al.*, 1998; Vande-Broek *et al.*, 1999).

As bactérias do gênero *Azospirillum* fixam nitrogênio atmosférico sob condições de baixa tensão de oxigênio e falta de amônia (Vande-Broek *et al.*, 1995). O controle do processo ocorre tanto em nível de síntese da nitrogenase (Vande-Broek *et al.* 1995), quanto em nível da sua atividade (Vande-Broek *et al.*, 1995; Fu *et al.*, 1989). O íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) possui ação inibitória rápida, porém reversível, da atividade da nitrogenase em uma grande quantidade de microrganismos diazotróficos, inclusive nas bactérias do gênero *Azospirillum*, que diminuem a atividade da nitrogenase quando inoculadas com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no meio de cultura. O provável modo de ação do íon seria uma modificação covalente em uma das subunidades da Fe-proteína (Fu *et al.*, 1989).

O gênero *Azospirillum* apresenta uma estrutura genômica complexa, com múltiplos replicons, e estruturas parecidas com cromossomos (*chromosome-like*), no qual o genoma se divide. O operon *nifHDK*, aparentemente, está localizado em um único e grande replicon (Martin-Didonet *et al.*, 2000).

Testes com oligonucleotídeos específicos em isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio de diversas plantas verificaram que as diversas espécies do gênero *Azospirillum* apresentam associações com gramíneas de importância agrônômica e econômica, como trigo, arroz, cana-de-açúcar, palmeiras, aveia, entre outras (Kirchhof *et al.*, 1996).

### **1.3. Mutações sítio-dirigida com transposon Tn5:**

A técnica de mutação sítio-dirigida por transposon foi muito importante na identificação e no estudo do funcionamento de genes, principalmente no início dos anos 80. O transposon Tn5 e seus derivados se mostraram como boas ferramentas de biologia molecular, pois possuem uma alta estabilidade de transposição, baixa freqüência de rearranjos e um gene de resistência a um antibiótico, *nptII*, que confere resistência à canamicina, tornando mais fácil a identificação dos mutantes (Araújo, 1988; Lewin, 2001).

O transposon Tn5 possui 5,7 kb tamanho, com duas seqüências de inserções IS50 nas suas extremidades e o gene *nptII* na região central (Lewin, 2001).

Araújo, em 1988, induziu diversas inserções do Tn5 na linhagem selvagem Sp7 de *Azospirillum brasilense* com o objetivo de identificar e isolar o operon da nitrogenase, *nifHDK*, dessa bactéria. Os mutantes obtidos foram isolados a partir da resistência ao antibiótico canamicina e da manifestação do fenótipo Nif<sup>-</sup>. A maior parte dos mutantes com fenótipo Nif<sup>-</sup> apresentou a inserção do transposon em um fragmento de aproximadamente 6,5 kb de tamanho, resultado da clivagem do DNA total da bactéria com a enzima de restrição *EcoRI*, e que continha os genes *nifHDK*. Alguns dos mutantes, no entanto, apresentaram fenótipo Nif<sup>+</sup>. Em um desses, denominado Sp7:Tn5-81, a inserção do transposon foi posicionada em um fragmento de aproximadamente 2,4 kb, resultado da clivagem do DNA total de *Azospirillum* com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, adjacente ao fragmento de *EcoRI* de 6,5 Kb. Esse resultado ocorreu, provavelmente, devido a um evento de recombinação homóloga. Em outro mutante com o fenótipo Nif<sup>+</sup> analisado, denominado de Sp7:Tn5-33, acredita-se que tenha ocorrido um evento

de recombinação não-homóloga, pois, apesar do fragmento gerado ter apresentado o tamanho esperado, de aproximadamente 12,3 kb (5,7 kb do transposon e 6,5 kb do genoma de *Azospirillum*), a seqüência interrompida não correspondeu ao operon *nifHDK* (Araújo, 1988; Revers, 1996; Blaha, 2001).

O seqüenciamento da região correspondente à inserção do Tn5 no genoma do mutante Sp7::Tn5-33 identificou duas fases de leitura aberta (ORF, do inglês: *open reading frame*), as quais foram denominadas de *orf281* e *orfatrAb*, respectivamente, conforme mostrado na figura 3. Estas duas ORFs apresentam sentidos contrários de transcrição. A primeira delas, *orf281*, apresentou similaridade de seqüência de aminoácidos com uma família de proteínas responsivas a estresse, USP (*universal stress proteins*) (Revers *et al.*, 2000; Blaha, 2001). A seqüência parcial de aminoácidos, deduzida a partir da seqüência de nucleotídeos, da outra ORF, *orfatrAb*, apresentou grande similaridade de seqüência com membros da família de proteínas ativadoras de transcrição em procariotos LysR (Revers, 1996; Blaha, 2001).

#### **1.4. LysR: Ativadores de transcrição em procariotos:**

Um completo entendimento da expressão dos genes só pode ser obtido através do conhecimento dos mecanismos nos quais diferentes proteínas reguladoras interagem com seqüências específicas no DNA. A descoberta de motivos peptídicos em diversas proteínas que interagem com o DNA facilitou o entendimento das proteínas reguladoras e seu modo de ação (Henikoff *et al.*,

1988). Os principais motivos de ligação ao DNA são os domínios de dedos de zinco (*zinc fingers*), que utilizam uma ou mais moléculas de zinco como um de seus componentes estruturais e os motivos hélice-volta-hélice (Alberts, *et al.*, 1997), que foram originalmente encontrados na proteína Cro do fago  $\lambda$  e em muitas outras proteínas que se ligam ao DNA (Henikoff *et al.*, 1988).

A família de ativadores de transcrição de procariotos LysR (*autoregulatory transcriptional regulators* – ATR) possui o motivo hélice-volta-hélice em seu domínio de ligação ao DNA na extremidade amino-terminal, a qual apresenta, devido a isso, uma grande conservação entre os membros da família. A extremidade carboxi-terminal não apresenta grande conservação, podendo ser bem variada entre as diferentes ATRs (Henikoff *et al.*, 1988; Schell, 1993). Em um estudo comparativo com diversos membros da família LysR, Henikoff e colaboradores (1988) propuseram que uma homologia de 20% na seqüência de aminoácidos com outros membros da família LysR e/ou a presença do motivo hélice-volta-hélice em uma região amino-terminal com alto grau de conservação caracterizariam essa seqüência como correspondente à uma ATR.

Outra característica desta família é o conteúdo dos aminoácidos lisina e arginina. A maioria dos membros da família LysR apresenta uma quantidade reduzida do aminoácido lisina (Lys) e um aumento na quantidade do aminoácido arginina (Arg), quando comparado com outras proteínas procarióticas (Viale *et al.*, 1991).

Em resposta a diferentes co-indutores, as ATRs ativam a transcrição de genes ou regulons com sentidos divergentes ao seu e com as mais diversas funções na célula (Schell, 1993). Esta família possui mais de cinquenta

membros conhecidos com tamanhos similares (em torno de 300 aminoácidos) e, que, aparentemente, evoluíram de um ancestral distante para subfamílias, que são encontradas em diversos gêneros de procariotos, possuindo representantes em diversos microrganismos (Schell, 1993). Muitos genes, cujos produtos são ATRs, já foram identificados, como, por exemplo: o gene *rbcR* em *Chromatium vinosum* (Viale *et al.*, 1991) e em *Anabaena* sp. (Mori *et al.*, 2002), o gene *nac* em *Klebsiella aerogenes* (Bender, 1991; Schwacha *et al.*, 1993; Pompsiello *et al.*, 1995), o gene *nodD* em bactérias simbióticas como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* (Loh e Stacey, 2002), o gene *syrM* em *Rhizobium meliloti* (Schell, 1993) e o gene *oxyR* em *Escherichia coli* (revisado em Blaha, 2001).

A ORF encontrada no mutante Sp7::Tn5-33 (*orfatrAb*) demonstrou, através de suas seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos, diversas características que a posicionam como pertencente à família LysR, como a conservação da região amino-terminal, com a presença do motivo de ligação ao DNA, hélice-volta-hélice, e o conteúdo anormal da proporção dos aminoácidos Lys/Arg (Revers, 1996; Blaha, 2001).

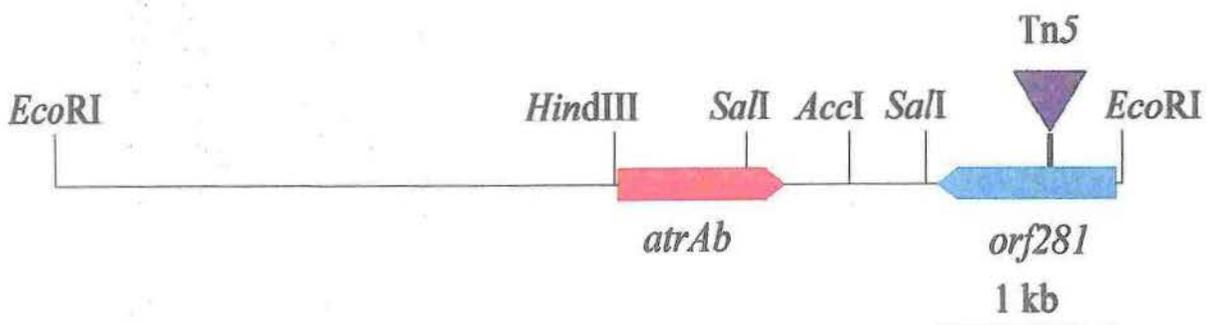


Figura 3: Mapa físico do fragmento de DNA contendo a ORF281 e ORFatrAb isolado de *Azospirillum brasilense* Sp7, mostrando o local de inserção do transposon Tn5 e o sentido de transcrição das ORFs.

## 1.5. OBJETIVOS:

Um dos objetivos desse trabalho foi a obtenção da seqüência completa de nucleotídeos do gene *orfatrAb* e da seqüência de aminoácidos, derivada da seqüência nucleotídica obtida, da proteína (ORFATRab) correspondente para uma análise comparativa mais abrangente com as seqüências protéicas de outros membros da família LysR já caracterizadas.

Além desse, o outro objetivo foi isolar e caracterizar a região promotora do gene *orfatrAb* para a realização de experimentos para a verificação da atividade de sua seqüência reguladora.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS:**

### **2.1. Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados:**

As linhagens bacterianas utilizadas foram: *Azospirillum brasilense* Sp7 selvagem (ATCC29145), *Azospirillum brasilense* Sp7::Tn5-33, que contém a mutação com o transposon Tn5 (Araújo, 1988) e a linhagem XL1-Blue de *Escherichia coli*, hospedeira dos plasmídeos utilizados.

O plasmídeo pUC18 (Stratagene) foi utilizado como vetor nas tentativas de clonagem do fragmento correspondente à região reguladora do gene *orfatrAb*.

O plasmídeo pKS6,0 (Revers, 1996, com. pessoal), o qual possui um fragmento de 6,0 kb de *EcoRI* contendo uma parte do gene *orf281* e a seqüência completa do gene *orfatrAb* de *A. brasilense*, foi utilizado como DNA-molde nas reações de amplificação da região promotora do gene *orfatrAb* e nas reações de seqüenciamento deste mesmo gene.

### **2.2. Manipulações de DNA:**

### **2.2.1: Reações de clivagem:**

Foram utilizadas enzimas de restrição e modificação dos seguintes fornecedores: Biogen; CENBIOT enzimas; Gibco e Amersham Pharmacia Biotech. As reações foram realizadas com concentrações diferentes de DNA, utilizando de uma a 5 unidades da enzima de restrição por  $\mu\text{g}$  de DNA. Tampão de reação, temperatura e tempo de incubação foram utilizados conforme as especificações dos fabricantes.

### **2.2.2. Ligação de fragmentos:**

Os fragmentos de DNA de interesse foram purificados em colunas de purificação (Amersham Pharmacia Biotech), conforme especificações do fabricante e tiveram suas extremidades preenchidas. Esses fragmentos foram ligados no vetor pUC18, clivado com a enzima *Sma*I, utilizando o *kit* comercial *Sure Clone Ligation* (Amersham Pharmacia Biotech).

### **2.2.3: Transformação bacteriana:**

O produto da reação de ligação descrita no item 2.2.2 foi transformado em *Escherichia coli* XL1-Blue pelo método de choque térmico (Sambrook e Russel., 2001). As colônias foram selecionadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido suplementado com o antibiótico ampicilina, na concentração de

100 µg/ml, 0,1 mM de IPTG (ácido isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) e 0,02mg/ml de X-Gal (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) (Sambrook e Russel., 2001).

## **2.3. Extrações de DNA:**

### **2.3.1.: Extração de DNA total de *Azospirillum brasilense*:**

As colônias de *Azospirillum brasilense* Sp7 foram inoculadas em meio LB com ampicilina (100 µg/ml) e o DNA total foi extraído conforme método descrito em Passaglia, 1992.

### **2.3.2.: Extração de DNA plasmidial:**

As colônias brancas de *E. coli* selecionadas da transformação bacteriana foram inoculadas em meio LB, suplementado com ampicilina, e tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos pelo método de lise alcalina, descrito em Sambrook e Russel, 2001.

## 2.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

### 2.4.1.: Oligonucleotídeos:

As reações de amplificação foram realizadas utilizando o plasmídeo pKS6,0 e o DNA total de *A. brasilense* como DNA-moldes. Os oligonucleotídeos específicos para amplificação de um fragmento de aproximadamente 800 pares de base (figura 4), correspondente à região reguladora do gene *orfatrAb*, possuem as seqüências:

- Promatrup: 5' CAGGAAGCCGGACAACCGGGG 3'
- Atrup: 5' TAGCTGTCTGAACCGCTTCT 3'

### 2.4.2.: Condições de amplificação:

As condições de amplificação foram estabelecidas por Blaha (2001), e contaram com um volume final de reação de 25 µl. Os reagentes foram utilizados nas seguintes concentrações: 100 ng de DNA-molde, tampão de reação contendo 2mM de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs (1mM), 1U de *Taq* DNA Pol (CENBIOT), 20 pmol de cada oligonucleotídeo. O volume foi completado com água milli-Q.

O programa de amplificação da região promotora do gene *orfatrAb* consistiu de ciclos térmicos de:

- 1º ciclo: 94°C por 5 min

- 2: 35 ciclos de: 42°C por 1 min, 72°C por 1 min. e 94°C por 30 seg.
- 3: 42°C por 3 min.
- 4: 72°C por 5 min.
- 5: 4°C por 2 min.

Esta reação foi realizada em termocicladores automáticos do tipo PTC-100 e PTC-200, MJ Research™.

## 2.5. Reações de Seqüenciamento:

As reações de seqüenciamento manual foram realizadas utilizando o *kit Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing* da Amersham Pharmacia Biotech. Para seqüenciar o plasmídeo pKS6,0 foram utilizados os oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação. No seqüenciamento dos fragmentos clonados em pUC18 foi utilizado o oligonucleotídeo interno do pUC, fornecido pelo *kit*.

O seqüenciamento automático foi utilizado para a finalização da seqüência do gene *orfatrab*. Para isto foi projetado o oligonucleotídeo:

- Atrseq: 5' TTC CTG GTG GAC GGC AGC AA 3'

Esse oligonucleotídeo anela na posição 1356 da seqüência de nucleotídeos deste gene, conforme está demonstrado na figura 4. O seqüenciador automático utilizado foi o *MegaBACE DNA Analysis System* (Amersham Biosciences).

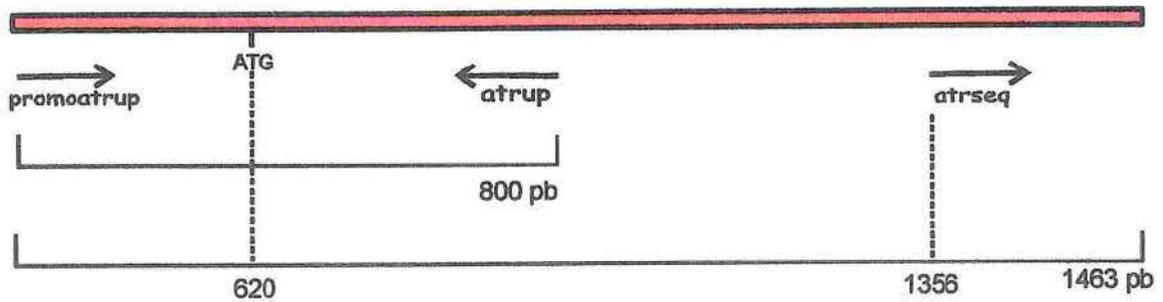


Figura 4: Mapa representando a seqüência nucleotídica parcial do gene *orfatrAb*, mostrando as posições de anelamento dos oligonucleotífos utilizados na amplificação da região promotora e no seqüenciamento.

## 2.6. Análise das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos

obtidas:

As seqüências obtidas foram analisadas utilizando o programa BLASTn, disponível na página do *National Centre for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), o programa Expasy (<http://us.expasy.org>), o programa Vector NTI v4.0 InforMax<sup>®</sup> e o programa GeneDoc.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

#### 3. 1. Seqüência do gene *orfatrAb*:

Com a finalidade de completar a seqüência nucleotídica do gene *orfatrAb* um oligonucleotídeo foi sintetizado (figura 4). Este oligonucleotídeo, cujo local de anelamento é na posição 1356 da seqüência nucleotídica parcial e já conhecida desse gene foi utilizado em uma reação de seqüenciamento que resultou na leitura de aproximadamente 300 nucleotídeos, suficiente para atingir o final do gene, incluindo as possíveis regiões de terminação da transcrição.

A figura 5 demonstra a seqüência completa do gene *orfatrAb*, que, da região promotora até o códon de terminação da proteína correspondente, apresenta em torno de 1500 pares de base. A seqüência de aminoácidos, deduzida a partir da seqüência nucleotídica corresponde a uma proteína de 297 aminoácidos, a qual foi denominada ORFatrAb.

Através da análise computacional da seqüência de aminoácidos da ORFatrAb foram deduzidos o peso molecular desta proteína, 33.581,6 KDa; o pI (ponto isoelétrico) de 7,26 e uma meia vida de aproximadamente 10 horas em *Escherichia coli* (<http://us.expasy.org>).

Na região promotora (5') do gene *orfatrAb* foi encontrada uma região de ligação para o fator sigma alternativo da RNA-polimerase  $\sigma^{54}$ , o códon de iniciação da tradução (ATG) da ORFatrAb e o sítio de ligação ao ribossomo (RBS)

(figura 5). O fato de apenas uma região com a seqüência de reconhecimento para o fator  $\sigma^{54}$  ter sido identificada nessa seqüência sugere que este gene seja transcrito sob o controle do promotor reconhecido por  $\sigma^{54}$  (Barrios *et al.*, 1999). Os genes que estão sob o controle de  $\sigma^{54}$ , em *Azospirillum brasilense*, geralmente estão envolvidos no processo de fixação biológica do nitrogênio, embora outros grupos de genes já tenham sido descritos como sendo regulados por este mesmo promotor, como alguns dos genes envolvidos na síntese do flagelo, por exemplo, o gene *lafI* (revisado em Revers, 1996). Além das regiões anteriormente descritas também foram encontradas, na região 5' do gene *orfatrAb*, seqüências para a ligação de uma outra proteína reguladora, NtrC, que faz parte do sistema global de regulação do nitrogênio, cuja seqüência de reconhecimento consensual é: GCAC-N<sub>5</sub>-TGGTGCA (Merrick *et al.*; 1995; revisado em Wasseem, 1999; Steenhoudt *et al.*, 2000; Pedrosa *et al.*, 2001). Nesse sistema, a proteína NtrC é fosforilada por um outro componente do sistema (NtrB) em um de seus domínios, ligando-se ao DNA e ativando a transcrição de diversos genes, como, por exemplo, reguladores da fixação do nitrogênio, *nifLA*, em *Klebsiella pneumoniae*, e o gene de regulação do nitrogênio, *nac*, em *K. aerogenes* (Merrick *et al.*, 1995).

Na seqüência de aminoácidos da ORFatrAb podem ser encontradas algumas das características comuns aos membros da família de ativadores de transcrição LysR, como a proporção desigual dos aminoácidos lisina (K) e arginina (R) (Viale *et al.*, 1991), que possivelmente é resultante do alto conteúdo de G+C da seqüência nucleotídica dos genes. Uma vez que os códons de lisina são compostos apenas de A+T e os de arginina de G+C, isso gera a desproporção na seqüência de aminoácidos (Henikoff *et al.*, 1988; Schell, 1993).

Outra característica comum aos membros da família LysR é a capacidade de regular a expressão de genes com sentidos de transcrição contrários ao seu (Henikoff *et al.*, 1988; Schell, 1993) Como pode ser visto na figura 3, esta característica também é encontrada na ORFatrAb, onde o possível alvo da regulação dessa proteína é o gene *orf281* (Revers, 1996; Revers *et al.*, 2000; Blaha, 2001). A análise da região promotora do gene *orf281* demonstrou a presença de sítios para ligação de diversas proteínas reguladoras, incluindo um possível sítio para a ligação da proteína NAC, membro da família LysR (Bender, 1991; Schwacha *et al.*, 1993; Pompsiello *et al.*, 1995), assim como a seqüência consenso para a ligação de outras proteínas da família LysR (Schell, 1993).

```

ttc cag gaa gcc gga caa ccg ggg ncn aag gaa gaa tgn tgg gtc 47
gcc ctc ccc caa tgt att cgt cgg cgn cgg gtn caa ctg cgg cct 92
cca tca att cgg caa ggc gtt gcg ccc gtg cca atg atg ctg cga 137
tgc nca tgt cgt cca ggc gcc cgc aga tgt cga tca cct gat cgc 182
ggg gag cgc cgg ctn atg ctg atc ggg cat tcg gaa ccc cct cct 227
tcc aaa ttc cgc atc ccc acg att agc ggc ccg tct ccc ggg ccg 272
gcg caa cgg cgc aag ggt gga agc ccc gcc gca aca agg ggg atg 317
ctc tct ccc gag tcc cct ggt ccc gca ccg gcc ctc gat tgt cct 362
ccg agc aaa tcc agc gcg gcg acg tcg tcc ttc ggt tgc gaa ata 407
ggc aaa aat ccc aca atg cgg gat aag caa atg tgc gct ctt cgc 452
agc aca acg gaa aat tct tac caa gct tgg ctc ttt ttc gtg cgg 497
tga gcc ttt ggt tgg ggg tgc gtt cgc cgg gcg ttc ccg gta taa 542
atg agc atg gcg gct atg cgc cgt ctt cag aat aaa cgg gag gct 587
ccc cgc cag ggc gcg ggc agc aag aca ggc atg atg gac tgg gac 632
                                     M D W D 3
aag ctt cgg gtc ttc cac gcc gtg gcc gag gct gga agt ttc acg 677
K* L* R* V F* H A V* A E* A G S* F T 18
cac gcc ggc gag acg ctg aac ctc agc cag tcg gcg gtc agc cgc 722
H A* G E* T L* N* L* S* Q* S* A* V* S* R 33
cag atc agc gcg ctg gag gag agc ctc ggc gtg ccg ctg ttt cac 767
Q* I* S A L* E* E* S L* G* V P L* F* H 48
cgg cac gcg cgc ggc ctg atc ctc cgg atc ctg acc gag cag ggc 812
R* H A R G L* I L R I L T E Q G 63

```

gag ctt ctg cac cgc acc gcc cgc gat gtc ttc gcc aag ctg teg	857
E L L H R T A R D V F A K L S	78
atg acc gaa gcg atg ctg acc gaa agc cgg gag cat ccg aag ggt	902
M T E A M L T E S R E H P K G	93
ccg ctg cgc gtg acc acc acg gtg gcc ttc ggc tcg acc tgg ctg	947
P L R V T T T V A F G S T W L	108
acc ccg cgc gtc aac gag ttc ctg tca atc tac ccg gac atc cag	992
T P R V N E F L S I Y P D I Q	123
ctc acc ctg ctg atc gat gac aat gaa ctg gat ctg gcg atg cgc	1037
L T L L I D D N E L D L A M R	138
gag gcg gac atc gcc atc cgc atg aac acg ccg cgc cag ccc gac	1082
E A D I A I R M N T P R Q P D	153
ctg atc cag cgc cac ctg atg tcg gtg cat ttc cat ctc tac gcc	1127
L I Q R H L M S V H F H L Y A	168
cac cag gag tat ctg aag aag cgc ggc gcc ccg aag atc ccc gcc	1172
H Q E Y L K K R G A P K I P A	183
gac ctg gac ggg cac gac atc gtc gcc tat ccg ccg gac gtc cgc	1217
D L D G H D I V A Y P P D V R	198
gcg ccc atc gcc aac gtc aac tgg atc aac gag gtg ggc gac ccg	1262
A P I A N V N W I N E V G D P	213
gca ccg ggc gtg cgc aag ccg att ctg cag gtc aac agc atc tat	1307
A P G V R K P I L Q V N S I Y	228
gcc atg tac cgc gcc gtg aga gcg gct ggg cat cgc cgc ctg ccc	1352
A M Y R A V R A A G H R R L P	243
gac ttc ctg gtg gac ggc agc aag gag ctg acg cgc gtc ctg ccg	1397
D F L V D G S K E L T R V L P	258
gac gtg gac ggc ctc aag <b>gtc gac</b> gcc tac ttc gtc tat gcc gag	1442
D V D G L K V D A Y F V Y A E	273
gag ttg cgt cat tcc aag cgc atc gcg gtg ttc cgc gat ttc ctc	1487
E L R H S K R I A V F R D F L	288
gtg aag aag gtg gcg gag tcg gcc ttc <b>tga</b> cca agc tca gcc ttt	1532
V K K V A E S A F	297
<b>ggc nca gac atg atg ttn gcc</b> tcg ttt tna tnc acn gcc gtn	1574

**Figura 5:** Sequência completa do gene *orfatrAb*. Em letras maiúsculas está a proteína hipotética deduzida a partir da sequência de nucleotídeos, em código de uma letra. Em azul está demonstrado o local de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho. Em preto o códon de iniciação da tradução (ATG); em **vermelho**, os sítios para enzimas de restrição (*HindIII* e *SalI*); em **laranja**, a sequência do possível promotor  $\sigma^{54}$  da RNA-polimerase; em **roxo**, o sítio de ligação ao ribossomo (RBS); em **verde**, o códon de parada (*stop codon*) e em **água**, a possível sequência da região de terminação da transcrição. A região de aminoácidos mostrando similaridade com a porção N-terminal das proteínas ATRs da família LysR, onde se localiza o motivo hélice-volta-hélice, está em **negrito**. Os asteriscos (\*) indicam os resíduos idênticos dessa região com a sequência consenso da família LysR (Schell, 1993).

### 3.2. Comparação da seqüência de aminoácidos da ORFatrAb com outras proteínas da família LysR:

A comparação da seqüência de aminoácidos deduzida do gene *orfatrAb* com as seqüências de aminoácidos de proteínas pertencentes à família LysR de outros microrganismos, revelou uma grande similaridade entre as seqüências, principalmente na região amino-terminal, onde, nos membros desta família, a conservação é maior (Henikoff *et al.*, 1988; Viale *et al.*, 1991; Schell, 1993), conforme está demonstrado na figura 6. É nesta região, altamente conservada, que se encontra o motivo de ligação ao DNA, hélice-volta-hélice (Henikoff *et al.*, 1988; Viale *et al.*, 1991; Schell, 1993).

Na região carboxi-terminal, aproximadamente entre os resíduos 236-246, que é muito variável entre os membros dessa família, existe apenas uma região que demonstra alguma similaridade de seqüência, onde provavelmente ocorra a ligação da molécula indutora (co-indutor). Foi demonstrado que mutações nessa região levam à perda de função em diversas ATRs (Schell, 1993).

As diferentes ATRs, dentre os mais diversos microrganismos regulam diferentes tipos de genes (Henikoff *et al.*, 1988; Schell, 1993). Essas proteínas podem regular genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos, como no caso de *metR*, *ilvY*, *cysB*, em *Escherichia coli* (Schell, 1993), na nodulação de bactérias simbióticas, como *nodD* em *Rhizobium Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (Loh *et al.*, 2002), ou, ainda, podem regular genes responsivos ao

estresse oxidativo, como *oxyR* em *Escherichia coli* (Schell, 1993) e *oxyS* em *Mycobacterium tuberculosis* (Domenech *et al.*, 2001).

Nenhum trabalho até o momento descreve uma caracterização mais detalhada da seqüência reguladora de um gene correspondente a uma ATR, apresentando os sítios de proteínas ativadoras e outras seqüências de consenso. O que se encontra na literatura são os tipos de promotores aos quais as ATRs respondem, como, por exemplo, os estudos realizados com o gene *nac* de *Klebsiella aerogenes*, onde se verificou que este gene responde também ao fator  $\sigma^{54}$  (Bender, 1991; Schwacha *et al.*, 1993; Pomposiello *et al.*, 1995).

```

*      20      *      40      *      60      *      80
A.t   : ~mampldwklrifhaaaeagsfthaadklnlsqsaisravsalegdvgyklfrbargl---lleggeellrtahvllletvk : 83
S.m   : mgdsmsldwklrifhaaaeagsfthaadklnlsqsaisravsalegdvgyklfrbargl---lleggemlrtahvmlkesvk : 85
B.m   : ~mvapldwklrifhaaaeagsfthaagtlhlsqsaisravsalegdvgyklfrbargl---lleggetlrtahvmlenvr : 83
M.l   : ~~~malldwklrvfhaaaeagsfthaactlnlsqsaisravsalehdvgyklfrbargl---vleggemlrtahvmlletik : 81
atrAb : ~~~~~LDWDKLRVFAVFAEAGSFTHAGETNLSQSAVSRQISALES LGVPLFRHARGILRL/LEGGELRHETARIVFAKLSMTE : 82

*      100     *      120     *      140     *      160     *
A.t   : mqltetekekskrlrvttvlglgqgwlttdvqefllglycenslglldealdnmshaccarlrqgqsdliqrklftvnmhvyaa : 171
S.m   : aqlsfttdkeskrlritttvlglgqgwlttdkigefnsllycelsqyglldnealdnmshaccarlrqgqsdliqrklftvnmhvyaa : 173
B.m   : sklaesrekeskrlrvttvlglgsgwlierlqefvlycdvqglldnealdnmshaccavrlrqgqsdliqrklftvnmhvyas : 171
M.l   : srltetekekskrlrvttvlglgagwlttervqefllelycelsqglldnealdnmshaccarlrqgqsdliqrklftvnmhvyaa : 169
atrAb : AMTEGSRHEHKKPLRVTTTVAFGSTWLTPEVNEFLSIYPIQTLTLLDNEELDAMREADIAIRNNTTRCPBLIQRHLMVHFHLYAH : 170

*      180     *      200     *      220     *      240     *      260
A.t   : psvlnhlepqsvedlnrnlifgepapnylldvnwleagrssdntriphlginsqtsikracllgdiacpdyivgrdpqliq- : 258
S.m   : psvlnhlepqslddlnrnlifgepapnylldvnwleagrdsdnprishlginsqtsikracllgdiampdyivgrdpqliq- : 260
B.m   : aglsytklsideqqrntgepapnytgmetarpdgsaipaenllsrwvqrgviavpbadkesgvgl : 259
M.l   : psvlnhlepqsvedlnrnlifgepapnylldvnwleagrdsdntriphlginsqtsikracllgdiampdyivgrdpqliq- : 257
atrAb : QEYIKRGAAPKIPADIDGDIYVAPPDVRVAVANVNWINEVGDPAQGVKPKPILOVNSIYAYRVAV-RAACHRRRFDFLVDGSKELTRV : 257

*      280     *      300
A.t   : lslaadpsfetycypdenaaklkafrdifivakarnwfn : 300
S.m   : lpsiadpsfetycypdenaaklkvfrdyivakarnwfn : 302
B.m   : lpeleedpsfetycypdenaaklkafzdfllfskarnwty : 301
M.l   : lpe-tevpsfetycypdenaaklkahvfrdfiiakarswfn : 298
atrAb : LPDVDGK-KVLAIVVAEELRHSKRIAVFRDFLVKKVAESAF : 297

```

**Figura 6:** Comparação da seqüência de aminoácidos da ORFatrAb com seqüências de aminoácidos de outros membros da família LysR de outros microrganismos, disponíveis no GeneBank. A. t: *Agrobacterium tumefaciens* (nº de acesso: NP\_355147); S. m: *Sinorhizobium meliloti* (nº de acesso NP\_385672); B. m: *Brucella melitensis* (nº de acesso NP\_539430); M. l: *Mesorhizobium loti* (nº de acesso NP\_103870). Os blocos de aminoácidos em preto significam 100% de similaridade; blocos cinza escuro apresentam 80% de similaridade; blocos cinza claro significam 60% de similaridade.

### **3.3. Amplificação e clonagem da região promotora do gene *orfatrAb*:**

Os oligonucleotídeos descritos na seção 2. 4. 1 (figuras 4 e 5) foram utilizados em uma reação de amplificação, tendo como DNA-molde o plasmídeo pKS 6,0, o qual contém todo o gene *orfatrAb*. Um fragmento de 814 pares de base, correspondente à região promotora deste gene era esperado (figura 7). O programa de amplificação utilizou 35 ciclos de amplificação, com a temperatura de anelamento de 42°C (Blaha, 2001).

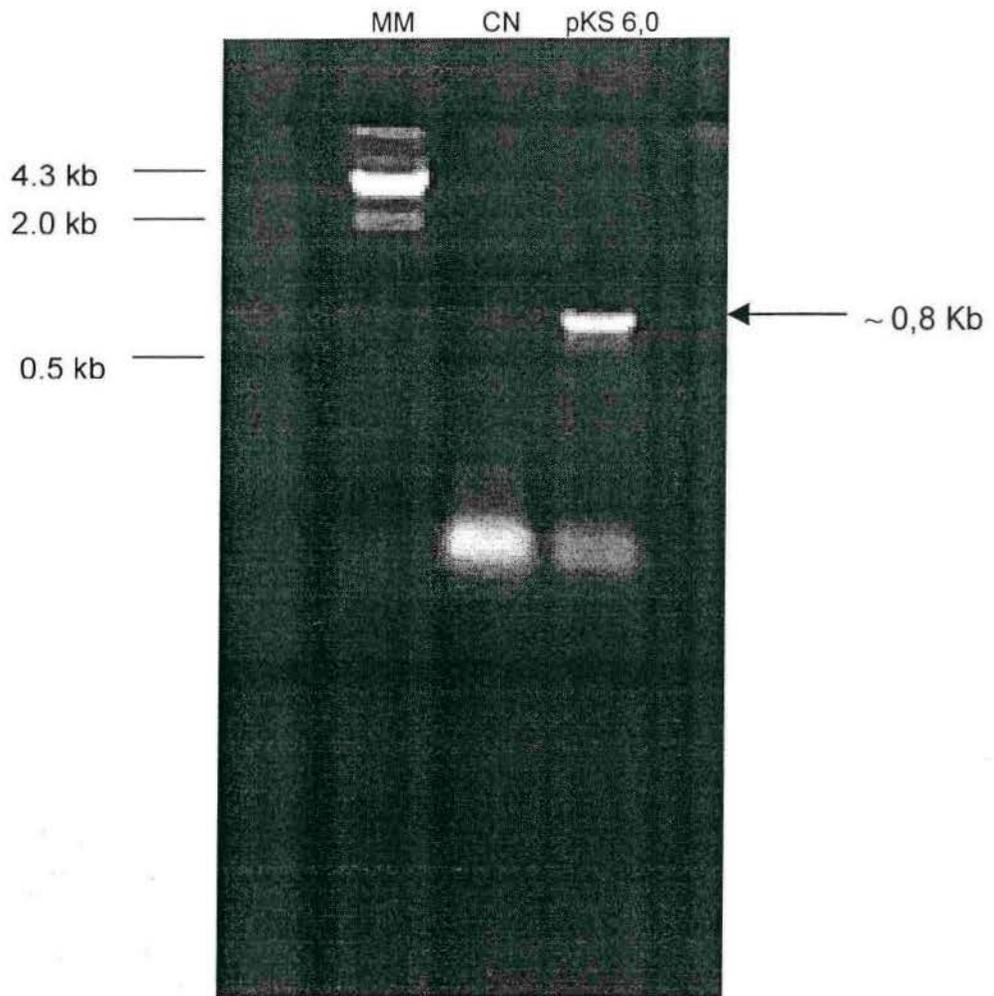
O fragmento amplificado obtido foi diretamente seqüenciado, utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos da reação de amplificação. Após diversas tentativas fracassadas de seqüenciamento manual, optou-se pela estratégia de clonagem desse fragmento em pUC18, uma vez que, na amplificação, esse fragmento sempre demonstrou ser uma banda única de amplificação e corresponder ao tamanho esperado.

O fragmento amplificado foi purificado e utilizado em uma reação de ligação com o vetor de clonagem pUC18, clivado com a enzima *Sma*I. O produto desta ligação foi transformado em *Escherichia coli* XL1-Blue. Colônias brancas foram selecionadas e inoculadas em meio LB líquido, suplementado com ampicilina, e tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos.

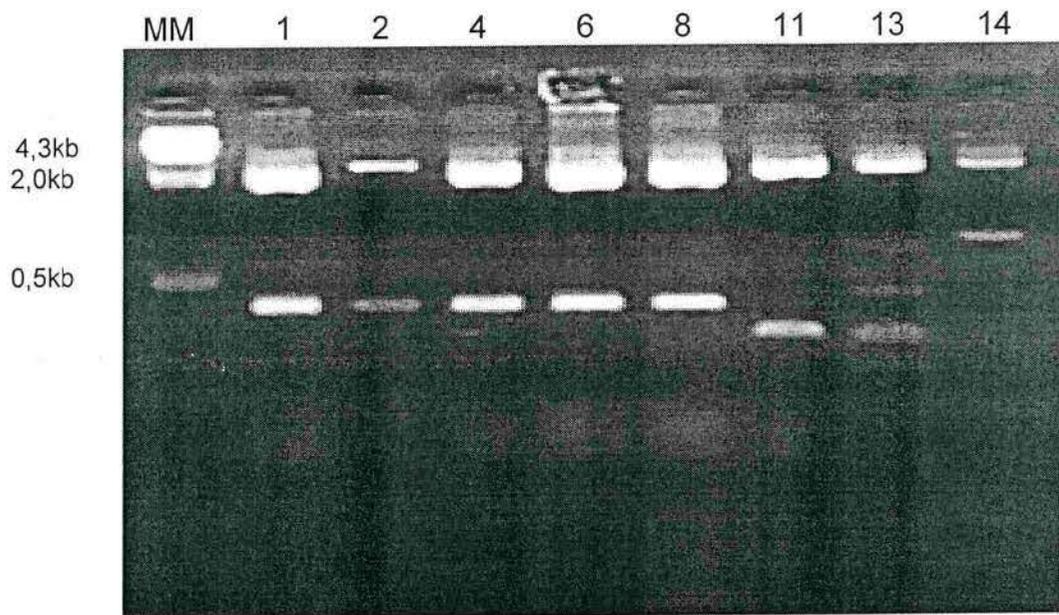
Para a certificação do tamanho do fragmento clonado nos possíveis recombinantes foram realizadas clivagens do DNA plasmidial com as enzimas *Eco*RI e *Pst*I, para a liberação dos fragmentos clonados do DNA correspondente

ao vetor (figura 8). Os clones 13 e 14 foram os únicos que apresentaram um fragmento de aproximadamente 800 pares de base após a clivagem (figura 8).

Esses dois recombinantes foram seqüenciados utilizando-se os *primers* internos do vetor pUC 18. No entanto, a comparação das seqüências de nucleotídeos obtidas com a seqüência conhecida da região correspondente à região promotora do gene *orfatrAb* não revelou nenhuma homologia significativa. Caso o fragmento clonado, em um dos clones obtidos, fosse o correto, a próxima etapa seria a subclonagem desse fragmento no vetor pMC1403, o qual contém o operon da lactose sem a região promotora, para a realização de experimentos que possibilitassem a análise comparativa dessa região reguladora com outras regiões reguladoras de outros genes de *A. brasilense* isoladas e caracterizadas em nosso laboratório, como, por exemplo, *nifHDK* (Passaglia, 1992).



**Figura 7:** Gel de agarose 1,5%, mostrando o resultado da reação de amplificação. MM: DNA de fago  $\lambda$  clivado com a enzima de restrição *HindIII*; CN: controle negativo da reação; pKS 6,0: plasmídeo contendo o gene *orfatrAb*. A seta indica o fragmento de 800 pb obtido na reação de amplificação.



**Figura 8:** Gel de agarose 1,2%, mostrando a clivagem dos DNAs plasmidiais com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*. MM: marcador de peso molecular (DNA de fago  $\lambda$  clivado com *HindIII*). Os números representam os diferentes plasmídeos recombinantes obtidos.

#### 4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS:

A seqüência nucleotídica completa do gene *orfatrAb* foi obtida. Essa seqüência corresponde a aproximadamente 1500 nucleotídeos e apresenta na região promotora um único sítio de reconhecimento para o fator  $\sigma^{54}$  da RNA-polimerase. Além desse sítio foram também encontradas seqüências consensuais para a ligação de proteínas ativadoras de genes envolvidos no metabolismo e fixação biológica do nitrogênio (NtrC e NifA).

A seqüência de aminoácidos deduzida da seqüência de nucleotídeos apresentou 297 resíduos. A análise desta seqüência demonstrou que a proteína correspondente possui um peso molecular de 33.581,6 KDa, ponto isoelétrico de 7,26 e meia-vida estimada de 10 horas, em *Escherichia coli*.

Na seqüência de aminoácidos foi encontrado o motivo de ligação ao DNA, hélice-volta-hélice, característico de proteínas que regulam a transcrição de determinados genes. Este motivo localiza-se na porção amino-terminal da proteína, justamente onde ocorre a maior homologia com outros membros da família de ativadores de transcrição LysR.

A proteína ORFatrAb possivelmente ativa a transcrição de uma outra ORF, ORF280, que no mutante Sp7::Tn5-33, encontra-se interrompida pelo transposon Tn5. A ORF280 já foi caracterizada como uma proteína responsiva a estresse, da família USP (do inglês: *universal stress protein*).

A região promotora do gene *orfatrAb* foi amplificada em uma PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos. Para a continuidade deste trabalho o

fragmento amplificado, será seqüenciado e clonado no vetor pMC1403 para verificação da sua possível atividade promotora.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALBERTS, B.; DENNIS, B.; LEWIS, J.; RAFF, M.; WATSON, J. D. 1997. *Biologia Molecular da Célula*. Ed. Artes Médicas, Porto Alegre:p. 1294.

ARAÚJO, E. F. 1988. Caracterização de segmentos de DNA adjacentes aos genes *nifHDK* de *Azospirillum brasilense* Sp7, por mutagênese sítio direcionada com transposon Tn5. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Genética. UFRGS.

ARNOLD, W.; RUMP, A.; KLIPP, W.; PRIEFER, O.; PÜHLER, A. 1988. Nucleotide sequence of a 24,206 base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Molecular Biology**. 203: (3) 715-738.

BARRIOS, H.; VALDERRAMA, B.; MORRET, E. 1999. Compilation and analysis of  $\sigma^{54}$ -dependent promoter sequences. **Nucleic Acids Research**. 27(22): 4305-4313.

BENDER, R. A. 1991. The role of the NAC protein in the nitrogen regulation of *Klebsiella aerogenes*. **Molecular Microbiology**. 5 (11): 2575-2580.

BLAHA, C. G. 2001. Estudos microbiológicos, fisiológicos e moleculares de um mutante de *Azospirillum brasilense* superfixador de nitrogênio: papel dos genes *orf280* e *orfatrAb*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS.

DIXON, R. A. 1984. The genetic complexity of nitrogen fixation. **Journal of Genetics Microbiology** 130: 2745-2755.

DOMENECH, P.; HONORÉ, N.; HEYM, B.; COLE, S. T. 2001. Role of OxyS of *Mycobacterium tuberculosis* in oxidative stress: overexpression confers increased sensitivity to organic hydroperoxides. **Microbes and Infection**. 3: 713-721.

FU, H.; HARTMANN, A.; LOWERY, R. G.; FITZMAURICE, W. P.; ROBERTS, G. P.; BURRIS, R. H. 1989. Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum spp.* **Journal of Bacteriology**. 171: 4679-4685.

HENIKOFF, S.; HAUGHN, G. W.; CALVO, J. M.; WALLACE, J. C. 1988. A large family of bacterial activator proteins. **PNAS. USA**. 85: 6602-6606.

KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. 1997. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology Biochemistry** 29 (5/6): 853-862.

LEWIN, B. 2001. *Genes VII*. Ed. Artes Médicas, Porto Alegre: p. 955.

LOH, J.; STACEY, G. 2002. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. **Applied and Environmental Microbiology**. 69 (1): 10-17.

MARTIN-DIDONET, C. C.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; KLEINA, M.; REGO, F. G.; RIGO, L. U.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. 1999. Genome structure of the genus *Azospirillum*. **Journal of Bacteriology**. 182: 4113-4116.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. 1995. Nitrogen control in Bacteria. **Microbiological Reviews**. 59(4): 604-622.

MORI, S.; CASTORENO, A.; LAMMERS, P. J. 2002. Transcript levels of *rbcR1* and *ntcA*, and *rbcL/S* genes in cyanobacterium *Anabaena sp.* PCC 7120 are downregulated in response to cold and osmotic stress. **FEMS Microbiology Letters**. 213: 167-173.

PASSAGLIA, L. M. P. 1992. Estudo da organização e regulação da transcrição dos genes da nitrogenase de *Azospirillum brasilense* Sp7. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS.

PEDROSA, F. O.; BENELLI, E. M.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A.; KLASSEN, G.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U. 2001. *Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Biotechnology**. 91: 189-195.

PETERS, J. W.; FISCHER, K.; DEAN, D. R. 1995. Nitrogenase structure and function: A biochemical-genetic perspective. **Annual Reviews of Microbiology**. 49: 335-366.

POMPSIELLO, P. J.; BENDER, R. A. 1995. Activation of the *Escherichia coli lacZ* promoter by the *Klebsiella aerogenes* Nitrogen Control Assimilation (NAC), a LysR family transcription factor. **Journal of Bacteriology**. 177 (16): 4820-4824.

POTRICH, D. P.; PASSAGLIA, L. M. P.; SCHRANK, I. S. 2001. Partial characterization of *nif* genes from bacterium *Azospirillum amazonense*. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**. 34 (x).

REVERS, L. F. 1996. Análise molecular de mutantes de *Azospirillum brasilense* Sp7 com alta atividade de nitrogenase obtidos por mutagênese com transposon Tn5. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS.

REVERS, L. F.; PASSAGLIA, L. M. P.; MARCHAL, K.; FRAZZON, J.; BLAHA, C. G.; VANDERLEYDEN, J.; SCHRANK, I. S. 2000. Characterization of an *Azospirillum brasilense* Tn5 mutant with enhanced N<sub>2</sub> fixation: the effect of ORF280 on *nifH* expression. **FEMS Microbiology Letters**. 183: 23-29.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3º ed. Cold Spring Harbor, New York. 3v.

SCHELL, M. A. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. **Annual Reviews of Microbiology**. 47: 597-626.

SCHWACHA, A.; BENDER, R. A. 1993. The *nac* (Nitrogen Assimilation Control) gene from *Klebsiella aerogenes*. **Journal of Bacteriology**. 175 (7): 2107-2115.

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

STRYER, L. 1996. *Bioquímica*. Ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro: p. 1000.

VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. 1995. Genetics of the *Azospirillum*-plant root association. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 14 (5): 445-466.

VANDE-BROEK, A.; LAMBRECHT, M.; EGGERMONT, K.; VANDERLEYDEN, J. 1999. Auxins upregulate expression of the Indole-3-Pyruvate Decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**. 181 (4): 1338-1342.

VIALE, A. M.; KOBAYASHI, H.; AKASAWA, T.; HENIKOFF, S. 1991. *rbcR*, a gene coding for a member of the LysR family of transcriptional regulators, is located upstream of the expressed set of Ribulose 1,5-Biphosphate Carboxylase/Oxygenase genes in the photosynthetic bacterium *Chromatium vinosum*. **Journal of Bacteriology**. 173 (16): 5224-5229.

WASSEM, R. 1999. Regulação da transcrição do gene *nifA* de *Herbaspirillum seropedicae* pelas proteínas NtrC, NifA e IHF. p. 158. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Ciências, área Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ZAHA, A. (Ed). 1996. *Biología Molecular básica*. Ed. Mercado Aberto, Porto Alegre: p. 337.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. 1997. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters** 152: 195-204.

ZIMMER, W.; WESCHE, M.; TIMMERMANS, L. 1998. Identification and isolation of the Indole-3-Pyruvate Decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* Sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. **Current Microbiology**. 36(6): 327-331.