

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Trabalho de Conclusão de Curso

Bacharelado em Ciências Biológicas – Ênfase Molecular e Funcional 2010/2

Caracterização do gene *glnK2*

de

Azospirillum amazonense

Aluna: Dieime de Souza Andrade

Cartão: 00152624

Orientadora: Irene Silveira Schrank

Coorientador: Fernando Hayashi Sant'Anna

Colaboradora: Débora Broch Trentini

Porto Alegre, 20 de novembro de 2010.

AGRADECIMENTOS

À professora Irene pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório e por ser tão acessível e disposta em todos os momentos que procurei suas sugestões;

Aos colegas do laboratório 222: Shana (pelas dicas na clonagem que deu certo), Débora (pelas bibliotecas do Genome Walker e pelas discussões do Site-Finding), Fran (pelas agradáveis conversas nas intermináveis tardes de PCR), Maicon (pela parceria nas discussões de artigos e pela ajuda nas figuras), Sheila (pela companhia nos dias vazios do lab), Luciano (pelo otimismo de que tudo dá certo no final) e Ricardo (por me socorrer em bioinformática quando o Fer não estava). Obrigada pela ajuda, amizade e descontração. Especialmente ao Fernando, pelo envolvimento neste projeto e por todo o conhecimento prático que tenho hoje em biologia molecular, sendo por longas e pacienciosas explicações ou por indicações bibliográficas adequadas;

Ao Caio por estar ao meu lado incondicionalmente suportando todos os meus surtos de nervosismos ao longo da graduação, principalmente no TCC;

À família e aos amigos pelo apoio e compreensão quando eu recusava almoços de domingo, festas, viagens, cineminhas porque precisava estudar;

Ao pessoal da COMGRAD-BIO sempre respondendo todos os e-mails prontamente;

Às instituições financiadoras CNPq, CAPES e FAPERGS pelo fomento;

A todos que torceram e que de alguma forma participaram, mesmo que à distância.

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	grau Celsius
µl	Microlitro
A	adenina
Amp ^r	resistência à ampicilina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	citosina
cm	centímetro
DNA	ácido desoxirribunucleico
dNTP	trifosfato de desoxirribunucleotídeo
FBN	fixação biológica do nitrogênio
fmoles	femtomol
g	grama
G	guanina
GW	Genome Walker
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
LB	Lúri-Bertani
M79	meio indefinido 79
ml	mililitro
mM	milimolar
NCBI	Nacional Center for Biotechnology Information
ng	nanograma
pb	par de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
RNase	ribonuclease
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (reverse transcriptase PCR)
SAP	fosfatase alcalina de camarão (shrimp alkaline phosphatase)
SFP	SiteFinding primer
SHP	Sequencial Hibrid Primer
T	timina
T4PNK	T4 polinucleotídeo quinase
U	unidade
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-d-tiogalactopiranosídeo
µg	micrograma
µM	micromolar

Trabalho formatado segundo regras de submissão do periódico

Genetics and Molecular Biology - ISSN 1415-4757

<http://www.scielo.br/revistas/bjg/iinstruc.htm>

Caracterização do gene *glnK2* de *Azospirillum amazonense*

Dieime de Souza Andrade, estudante de graduação em Ciências Biológicas¹

Fernando Hayashi Sant'Anna, estudante de doutorado em Biologia Celular e Molecular¹

Débora Broch Trentini, estudante de doutorado do *International PhD Programme in Molecular Life Sciences*²

Irene Silveira Schrank, Doutora em Biologia Molecular¹

Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia

Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43421

Campus do Vale, Caixa Postal 15005

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

CEP 91501-970

Correspondência para: Dieime Andrade

dieime@cbiot.ufrgs.br

(51) 3308.6077

Título para cabeçalho: Caracterização do gene *glnK2* de *A. amazonense*

Trabalho financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

1 - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);

2 - Research Institute of Molecular Pathology (IMP)

RESUMO

A bactéria diazotrófica *Azospirillum amazonense* promove o crescimento de plantas de importância econômica e, portanto, pode ser uma alternativa sustentável à produção agrícola. Visto que o solo é um ambiente variável em relação à disponibilidade de nutrientes, as bactérias que o habitam são adaptadas geneticamente para suportar situações de restrição nutricional. O nitrogênio é um elemento essencial para os seres vivos, portanto trabalhos que visem entender os mecanismos de resposta de *A. amazonense* à privação desse nutriente são relevantes. As proteínas PII são transdutoras de sinal envolvidas no metabolismo do nitrogênio, são altamente conservadas e bem distribuídas entre os procariotos. Nosso grupo de estudo isolou e caracterizou dois genes parálogos de *A. amazonense* que codificam para proteínas PII: *glnK* e *glnB*. A análise do genoma dessa bactéria (recentemente sequenciado e em fase de anotação) revelou um terceiro gene que codifica para uma proteína PII, localizado a jusante do gene *amtB* (codifica para um transportador de amônia). O presente trabalho visa entender o papel de *glnK2* na resposta de *A. amazonense* à limitação de nitrogênio e quais seriam os elementos responsáveis por sua expressão. Análises de similaridade e de filogenia mostraram que esse gene é mais relacionado com o gene *glnK* do que com o gene *glnB*, portanto foi denominado *glnK2*. Neste trabalho também se verificou, por análises de similaridade, os possíveis alvos de interação com as proteínas PII. O gene *glnK2* está localizado na extremidade de um *contig*, e, através de técnicas de “caminhada cromossômica”, foram isolados fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, que poderão contribuir para um melhor entendimento dos elementos cis-atuantes que regem a transcrição desse gene. Este trabalho também objetiva gerar um mutante de *A. amazonense* para o gene *glnK2* e caracterizar seu fenótipo. A técnica de *Cross-over* PCR foi utilizada para deletar o gene *glnK2*. O produto gerado será clonado no vetor pk19mobsacB, que posteriormente será transferido para *A. amazonense*, para que o gene selvagem seja substituído.

INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um nutriente fundamental para os seres vivos, pois compõe biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas. Apesar de compor grande parte da atmosfera como dinitrogênio (N_2), organismos mais complexos, como animais e plantas, não conseguem assimilar essa molécula (Lehninger et al., 1995). Em plantas, a reposição nutricional pode ser feita por meio de fertilizantes nitrogenados industriais, pois através de altas pressões e temperaturas é possível converter N_2 em amônia. No entanto, cerca de 70% dos fertilizantes não são absorvidos, sendo facilmente lixiviados pela chuva, e este excesso de nutrientes pode gerar eutrofização das águas, liberação de gases que agravam o efeito estufa, acidificação de solos e águas, etc (Cheng, 2008). Além dos danos ambientais comprovadamente adversos, a produção industrial de fertilizantes nitrogenados gera grandes danos econômicos consumindo 1% da energia mundial total por ano (Kim and Rees, 1994).

Outra rota de redução do N_2 à amônia é através da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Fig. 1). Este processo é realizado pelos microrganismos diazotróficos, portadores da enzima nitrogenase que possibilita esta conversão. Por ser um processo energeticamente dispendioso para as células, é finamente regulado pela disponibilidade de nitrogênio e níveis de oxigênio (Huergo et al., 2009). Um papel notável nessas vias de regulação é desempenhado pelas proteínas PII. Estas proteínas são altamente conservadas e distribuídas em procariotos, podendo também ser encontradas em cloroplastos de vegetais superiores (Truan et al., 2010). As proteínas PII refletem o *status* dos níveis de nitrogênio intracelular através do seu estado de uridilação. Essa informação é repassada tanto para o sistema regulatório global do nitrogênio (Ntr) - que controla a assimilação deste elemento pela bactéria - como para as diversas vias de regulação da FBN (Sant'Anna et al., 2009).

O gênero *Azospirillum* (α -proteobacteria) comporta um grande número de bactérias simbióticas e associativas a plantas. Experimentos demonstraram que *Azospirillum* exerce

efeitos benéficos sobre o crescimento de plantas, aumentando assim, a produtividade agrícola (Pedraza, 2008). Portanto, organismos diazotróficos representam uma alternativa sustentável na agricultura. A espécie *Azospirillum amazonense* foi inicialmente isolada da rizosfera e das raízes de gramíneas da região da Amazônia brasileira. Experimentos com cana-de-açúcar e outras culturas de importância econômica para nosso país sugerem um efeito sinérgico ou aditivo no uso de *A. amazonense* como inoculante combinado a outros diazotróficos (Baldani and Baldani, 2005). Este efeito estimulatório tem sido atribuído a vários mecanismos, incluindo a FBN e a produção de fitormônios. Esta espécie se difere das demais do gênero em algumas características importantes como a fixação do nitrogênio com menor tolerância ao oxigênio, a incapacidade de desnitrificação, a capacidade de utilizar sacarose como fonte de carbono e - a mais peculiar delas - a tolerância a pHs ácidos, comum em solos brasileiros (Magalhães et al., 1983).

A maioria das α -proteobactérias examinadas até o momento apresenta dois genes para proteína PII; *glnB* e *glnK* (*glnZ* em *A. brasilense*). Estes dois genes foram isolados e caracterizados em *A. amazonense* por nosso laboratório (Sant'Anna, 2007; Sant'Anna, 2005; Trentini, 2007). No entanto, devido ao recente sequenciamento (ainda em fase de anotação) de *A. amazonense*, este trabalho encontrou um terceiro gene que codifica para esta proteína, denominado *glnK2*, localizado a jusante do gene *amtB* (que codifica para um transportador de amônia). Contudo, parte do gene *amtB*, bem como a região regulatória desse operon ainda não foi caracterizada (Fig. 2).

O objetivo geral deste trabalho visa entender o papel do gene *glnK2* na resposta de *A. amazonense* à limitação de nitrogênio e os elementos responsáveis por sua expressão. Os objetivos específicos incluem: (i) isolamento do provável operon *amtB/glnK2*, (ii) identificação de elementos cis-atuantes através ferramentas *in silico*, (iii) identificação dos prováveis alvos de interação com as proteínas PII e (iv) construção de um mutante de *A. amazonense* deletando o gene *glnK2*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Análises in silico

Devido ao recente sequenciamento do genoma de *A. amazonense*, atualmente em fase de anotação, identificou-se as proteínas PII deste organismo através de *BLAST* local no genoma de *A. amazonense* pelo programa *BioEdit* (Hall, 1999) utilizando como *query* (sequência de consulta) as proteínas PII de *A. brasilense* (AAK01659-1). A mesma metodologia foi utilizada para localizar possíveis alvos de interação com a proteína PII.

Os alinhamentos de proteína foram realizados com o programa *Clustal X* (Larkin et al., 2007).

A reconstrução filogenética das proteínas PII foi realizada através do programa *MEGA 4.0* (Tamura et al., 2007) pelo método *Neighbor-Joining*.

Para análise de similaridade e identidade entre as proteínas PII de *A. amazonense* foi utilizado *Software MatGAT* (Campanella et al., 2003).

Linhagens bacterianas e plasmídeos

As linhagens e plasmídeos utilizados estão listados na Tabela I.

Meios de cultura e condições de cultivo

Para *Escherichia coli*, o meio utilizado foi LB (Sambrook and Russell, 2001). Ampicilina, X-gal e IPTG foram adicionados ao meio dependendo da necessidade do procedimento, utilizando as concentrações recomendadas por Sambrook and Russell, 2001. O cultivo ocorreu a 37°C.

Para *A. amazonense* o meio utilizado foi M79 (Fred and Waksman, 1928). O cultivo foi realizado a 35°C.

Métodos em biologia molecular

Extração de DNA, isolamento de DNA plasmidial, tratamento de extremidades, clonagem no vetor pUC18, eletroforese em gel de agarose, transformação bacteriana por eletroporação e seleção de transformantes foram conduzidos como descrito por Sambrook and Russell, 2001.

A purificação de DNA foi realizada utilizando o *kit GFX PCR DNA & Gel Band Purification (GE Healthcare)* e sua quantificação foi realizada utilizando o aparelho *Qubit (Invitrogen)*.

Isolamento da região promotora do provável operon *amtB/glnK2*

Foram testadas três técnicas de caminhada cromossômica, que permitem acessar regiões desconhecidas adjacentes a sequências conhecidas. Os *primers* utilizados estão listados na Tabela II. A Figura 2 ilustra os sítios de reconhecimento destes oligonucleotídeos.

Os protocolos adaptados e as condições de reação padronizadas para este experimento estão apresentados nas Tabelas III - V.

1- *Genome Walker (GW-PCR)*: Segundo protocolo adaptado de Clontech, 2007 (Fig. 3).

2- *Site Finding (SF-PCR)*: Adaptação do método descrito por Tan et al., 2005 (Fig. 4).

3- *Sequential Hybrid Primer (SHP-PCR)*: Segundo Martin-Harris et al., 2010 (Fig. 5).

Os produtos de PCR foram tratados com cinase de polinucleotídeos (*Polynucleotide kinase, PNK, Fermentas*) e clonados no vetor pUC18 clivado com *SmaI (GE Healthcare)* e defosforilado com fosfatase alcalina de camarão (*Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP, USB*), seguindo as orientações dos fabricantes. Os clones foram sequenciados pelo método automático no aparelho MEGABACETM utilizando o kit *Dyynamic et dye terminator cycle sequencing*

(Amersham Biosciences). Outros produtos puderam ser diretamente sequenciados após purificação devido a sua especificidade.

Resultados dos seqüenciamentos foram processados no pacote *Staden* (Dear and Staden, 1991) e analisados no banco de dados do *GENBANK* pelo *Software Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al., 1997).

Construção de mutante não polar e em fase

A metodologia *Cross-over* PCR foi utilizada para gerar uma deleção no gene *glnK2* sem alterar a fase de leitura (Link et al., 1997). Primeiramente foram amplificadas- por duas reações de PCR independentes e simultâneas- as regiões adjacentes ao gene *glnK2*, com os *primers* A + B e C + D . Subsequentemente, esses produtos foram unidos por uma terceira amplificação de PCR, utilizando os *primers* A + D, devido a uma pequena sequencia de sobreposição entre ambos *amplicons* (Fig. 6) (Tab. VI). O fragmento resultante desta última reação pode ser clonado no vetor suicida pk19mobsacB (Eggeling and Bott, 2005) (Fig. 7) e transferido para *A. amazonense* para que o gene mutante substitua o gene selvagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação do gene *glnK2* e de genes que codificam possíveis alvos de interação de proteínas PII.

A pesquisa local através do *Software tBlastn* no genoma de *A. amazonense* revelou a presença de três genes que codificam proteínas PII (Fig. 8), dispersos em diferentes *contigs*. Dois deles já haviam sido isolados pelo nosso laboratório, *glnK* e *glnB* (Sant'Anna, 2005; Trentini, 2007). O terceiro gene que codifica uma proteína PII demonstrou maior identidade e similaridade, segundo o *Software MatGAT* (Tab. VII), com o gene que codifica para GlnK, sendo portanto, denominado *glnk2*. Este resultado foi reforçado pela reconstrução filogenética

realizada pelo método de *Neighbor-Joining* (MEGA 4), que mostrou que GlnK2 se agrupa no mesmo clado de proteínas GlnK, indicando que este gene realmente se trata de um parálogo do gene *glnK* (Fig. 9).

Como dito anteriormente, as proteínas PII são os reguladores centrais do metabolismo e regulam a atividade de diferentes proteínas celulares, como transportadores, fatores de transcrição e enzimas (Sant'Anna et al., 2009). Tendo em vista que este sistema de regulação é amplamente descrito e conservado em Proteobacteria, este trabalho visou identificar por homologia possíveis alvos de interação com as proteínas PII (Tabela VIII).

O genoma de *A. amazonense* contém um gene que codifica para GlnD uma enzima que modifica covalentemente as proteínas PII pela função uridiltransferase/uridil removase. Tanto a proteína deduzida GlnK2, como GlnK e GlnB, possuem um resíduo de tirosina na posição 51 (Fig. 8) sugerindo que sejam modificadas pela proteína GlnD, a sensora primária do nível de nitrogênio intracelular. Esta proteína detecta a falta ou excesso de nitrogênio, através da concentração de glutamina (Araújo et al., 2008).

Os genes *amtB* e *amtB2* codificam para transportadores de amônia e foram identificados no genoma de *A. amazonense*. O gene *glnK2* forma um provável operon com *amtB*. Em condições de excesso de nitrogênio, GlnK-UMP é desuridilada e se liga com AmtB, inibindo o transporte de amônia na membrana celular. O operon *glnK-amtB* é um padrão entre os procariotos (Arcondéguy et al., 2001; Arcondéguy et al., 1999), sendo uma exceção o *Azospirillum brasilense*, em que o gene *glnZ*, ortólogo de *glnK*, encontra-se em um cromossomo diferente de *amtB* (Van Dommelen et al., 1998). Evidências definitivas na formação do complexo *in vivo* entre GlnK e AmtB foram obtidas através da purificação do complexo intacto a partir de uma fração de membrana de células de *E. coli*, ao ser submetido a um choque de amônio (Durand and Merrick, 2006). Uma série de estudos subsequentes em outras bactérias mostrou que esta interação é altamente conservada entre procariotos (Radchenko et al., 2010). Uma peculiaridade encontrada neste trabalho foi a posição do gene

amtB no operon, em *A. amazonense* encontra-se à montante de *glnK2* (Fig. 2) enquanto na maioria dos organismos encontra-se à jusante. Exceção feita ao já comentado *A. brasilense*, que não possui estes genes em operon e *Rhodospirillum rubrum*, que possui o gene *amtB* também à montante de *glnK* como em *A. amazonense* (Arcondéguy et al., 2001) (Fig. 2).

Também se identificou no genoma de *A. amazonense* genes homólogos aos presentes no operon *ntrBC*, que controla a transcrição de genes envolvidos na obtenção de fontes alternativas de nitrogênio. Em situação de disponibilidade de nitrogênio, a proteína GlnB, interage com a proteína NtrB. Em situações de limitação de nitrogênio, GlnD uridila GlnB (GlnB-UMP), que nesta forma não interagem com a proteína NtrB. Assim, a atividade de quinase de NtrB é ativada e catalisa a fosforilação de NtrC (NtrC-P), que por sua vez, promove a transcrição de diversos genes de assimilação do nitrogênio (Jiang and Ninfa, 2007).

O gene *glnE*, que codifica a proteína GlnE, outro possível alvo das proteínas PII, foi identificado em *A. amazonense*. Em escassez de nitrogênio, GlnB estimula sua atividade de desadenilação da proteína GlnA, que desadenilada converte glutamato e amônio em glutamina, reestabelecendo os níveis de nitrogênio intracelular (Van Dommelen et al., 2009),

O fator de transcrição mais importante da fixação biológica do nitrogênio é a proteína NifA e o seu gene também foi encontrado no genoma de *A. amazonense*. Em condições propícias à fixação (baixa tensão de oxigênio e baixa concentração de amônia), GlnB-UMP liga-se ao domínio GAF (local que pequenas moléculas como PII podem se ligar) localizado na porção N-terminal de NifA. Além do nível intracelular de nitrogênio, NifA tem sua resposta modulada pela tensão de oxigênio, sensibilidade que se deve a 4 resíduos de cisteína nesta proteína. No diazotrófico *Rhodospirillum rubrum* foram relatadas várias substituições no domínio GAF de NifA que permitem sua ativação na falta de *glnK*. Presumivelmente, estas substituições causam mudanças conformacionais em NifA necessárias para a ativação,

sem interação com *glnK*, sugerindo que algum outro efetor (s) pode também ativar NifA (Zou et al., 2008).

A regulação pós-traducional da enzima nitrogenase pelo sistema DraG/DraT é dependente das proteínas PII está bem descrita em *A. brasilense* (Fut al., 1989). Entretanto, os genes que codificam para estas proteínas não foram encontrados no genoma de *A. amazonense*. A ausência deste sistema em *A. amazonense* é uma característica que favorece o seu uso como biofertilizante, pois tendo sua nitrogenase apenas parcialmente inibida pela presença de amônia, ofereceria um aporte constante de nitrogênio fixado, mesmo que em pequena quantidade em alguns períodos (Huergo et al., 2006).

Um modelo da cascata regulatória do nitrogênio foi proposto neste trabalho para *A. amazonense* baseado em modelos de outros organismos e nos possíveis alvos encontrados em *A. amazonense* (Fig.10).

Isolamento da região promotora do provável operon *amtB/glnK2*.

Através da metodologia *Genome Walker* obteve-se um fragmento com a biblioteca StuI de 500 pb (Fig. 11) que foi clonado, porém, após o sequenciamento, o *Software Blastx* não reconheceu este fragmento como contendo as sequências do gene *amtB*, mas uma proteína hipotética, sugerindo uma amplificação inespecífica.

Outros cinco fragmentos encontram-se em fase de sequenciamento: um de 200 pb obtido pela técnica *SiteFinding* (Fig. 12) e quatro de 200, 300, 500 e 1000 obtidos pelo método *Sequential Hybrid Primer* (Fig. 13).

Posteriormente, pretende-se fazer uma análise *in silico* da região regulatória do provável operon utilizando matrizes de peso para elementos cis-atuantes típicos de resposta a privação de nitrogênio como NtrC e sigma 54. Além disso, será avaliada a expressão do gene *glnK2* e do gene *amtB* por Real-Time PCR.

Construção de mutante não polar e em fase.

As reações de *Crossover* PCR geraram fragmentos compatíveis com o projeto: 585 pb (A+B) e 608 pb (C+D), sendo assim foi feita a terceira reação que resultou na união das regiões adjacentes ao gene então deletado. O produto de 1192 pb (A+D) (Fig. 14) será clonado no plasmídeo mobilizável e suicida pK19mobsacB (Eggeling and Bott, 2005) (Fig. 7), que possui uma marca de seleção negativa, o gene que codifica para a enzima levansacarase (tóxica na presença de sacarose) e uma marca de seleção positiva, o gene de resistência à canamicina.

Posteriormente, esse plasmídeo será transferido para *A. amazonense* através de conjugação triparental, esperando que o mesmo seja integrado ao genoma da bactéria (conferindo resistência ao antibiótico canamicina). Subsequentemente, as colônias que possuírem o vetor de deleção integrado ao genoma serão cultivadas por inúmeras gerações para que um segundo evento de recombinação substitua o gene selvagem *glnK2* pelo gene mutante, ou seja, o vetor integrado será excisado, permitindo que os mutantes *deltaglnK2* sobrevivam na presença de sacarose.

Então o fenótipo do mutante pode ser caracterizado segundo sua resposta em cultivos com suficiência e privação de nitrogênio.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colegas do laboratório 222 pelas valorosas sugestões nos protocolos e durante a elaboração deste manuscrito. Este trabalho foi financiado pela FAPERGS (Fundação de Amparo e Pesquisa do Rio Grande do Sul), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERÊNCIAS

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman, 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.: *Nucleic Acids Res*, v. 25, p. 3389-402.
- Araújo, L. M., L. F. Huergo, A. L. Invitti, C. I. Gimenes, A. C. Bonatto, R. A. Monteiro, E. M. Souza, F. O. Pedrosa, and L. S. Chubatsu, 2008, Different responses of the GlnB and GlnZ proteins upon in vitro uridylylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD protein.: *Braz J Med Biol Res*, v. 41, p. 289-94.
- Arcondéguy, T., R. Jack, and M. Merrick, 2001, P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control.: *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 65, p. 80-105.
- Arcondéguy, T., W. C. van Heeswijk, and M. Merrick, 1999, Studies on the roles of GlnK and GlnB in regulating *Klebsiella pneumoniae* NifL-dependent nitrogen control.: *FEMS Microbiol Lett*, v. 180, p. 263-70.
- Baldani, J., and V. Baldani, 2005, History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience.: *An Acad Bras Cienc*, v. 77, p. 549-79.
- Campanella, J., L. Bitincka, and J. Smalley, 2003, MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences.: *BMC Bioinformatics*, v. 4, p. 29.
- Cheng, Q., 2008, Perspectives in biological nitrogen fixation research.: *J Integr Plant Biol*, v. 50, p. 786-98.
- Clontech, L., 2007, Genome Walker Universal Kit User Manual.
- Dear, S., and R. Staden, 1991, A sequence assembly and editing program for efficient management of large projects.: *Nucleic Acids Res*, v. 19, p. 3907-11.

- Durand, A., and M. Merrick, 2006, In vitro analysis of the Escherichia coli AmtB-GlnK complex reveals a stoichiometric interaction and sensitivity to ATP and 2-oxoglutarate.: J Biol Chem, v. 281, p. 29558-67.
- Eggeling, L., and M. Bott, 2005, Handbook of *Corynebacterium glutamicum*: Boca Raton, FL CRC Press Taylor & Francis Group.
- Fred, E. B. and Waksman, S. A., 1928, Laboratory Manual of General Microbiology with Special Reference to Microorganisms of the Soil. McGraw-Hill Book Company, Inc.
- Fu, H. A., A. Hartmann, R. G. Lowery, W. P. Fitzmaurice, G. P. Roberts, and R. H. Burris, 1989, Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp.: J Bacteriol, v. 171, p. 4679-85.
- Hall, T. A., 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucl Acids Symp Ser, p. 95-98.
- Huergo, L., M. Merrick, R. Monteiro, L. Chubatsu, M. Steffens, F. Pedrosa, and E. Souza, 2009, In vitro interactions between the PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*.: J Biol Chem, v. 284, p. 6674-82.
- Huergo, L. F., E. M. Souza, M. S. Araujo, F. O. Pedrosa, L. S. Chubatsu, M. B. Steffens, and M. Merrick, 2006, ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG.: Mol Microbiol, v. 59, p. 326-37.
- Jiang, P., and A. J. Ninfa, 2007, *Escherichia coli* PII signal transduction protein controlling nitrogen assimilation acts as a sensor of adenylate energy charge *in vitro*.: Biochemistry, v. 46, p. 12979-96.
- Kim, J., and D. Rees, 1994, Nitrogenase and biological nitrogen fixation.: Biochemistry, v. 33, p. 389-97.

- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins, 2007, Clustal W and Clustal X version 2.0.: *Bioinformatics*, v. 23, p. 2947-8.
- Lehninger, A., D. L. Nelson, and M. M. Cox, 1995, *Princípios de Bioquímica*: São Paulo, Sarvier.
- Link, A., D. Phillips, and G. Church, 1997, Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization.: *J Bacteriol*, v. 179, p. 6228-37.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker, 2004, *Microbiologia de Brock*, Prentice Hall.
- Magalhães, F. M., J. I. Baldani, S. M. Souto, J. R. Kuykendal, and J. Döbereiner, 1983, A new acid-tolerant *Azospirillum* species, *Academia Brasileira de Ciências*, p. 417-430.
- Martin-Harris, M., P. Bartley, and A. Morley, 2010, Gene walking using sequential hybrid primer polymerase chain reaction.: *Anal Biochem*, v. 399, p. 308-10.
- Pedraza, R., 2008, Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria.: *Int J Food Microbiol*, v. 125, p. 25-35.
- Radchenko, M. V., J. Thornton, and M. Merrick, 2010, Control of AmtB-GlnK complex formation by intracellular levels of ATP, ADP, and 2-oxoglutarate.: *J Biol Chem*, v. 285, p. 31037-45.
- Sambrook, J., and D. W. Russell, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sant'Anna, F., 2007, Identificação de genes de *Azospirillum amazonense* diferencialmente expressos em resposta à disponibilidade de nitrogênio, *Dissertação de mestrado*, Porto Alegre, RS, UFRGS.
- Sant'Anna, F., D. Trentini, S. de Souto Weber, R. Cecagno, S. da Silva, and I. Schrank, 2009, The PII superfamily revised: a novel group and evolutionary insights.: *J Mol Evol*, v. 68, p. 322-36.

- Sant'Anna, F. H., 2005, Análise do gene *glnK* da bactéria diazotrófica *Azospirillum amazonense*, Trabalho de Conclusão de Curso, Porto Alegre-RS, UFRGS.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar, 2007, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.: Mol Biol Evol, v. 24, p. 1596-9.
- Tan, G., Y. Gao, M. Shi, X. Zhang, S. He, Z. Chen, and C. An, 2005, SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking.: Nucleic Acids Res, v. 33, p. e122.
- Trentini, D., 2007, Isolamento e Análise do Gene *glnB* de *Azospirillum amazonense*., Trabalho de conclusão de Curso, Porto Alegre, RS, UFRGS.
- Truan, D., L. Huergo, L. Chubatsu, M. Merrick, X. Li, and F. Winkler, 2010, A new P(II) protein structure identifies the 2-oxoglutarate binding site.: J Mol Biol, v. 400, p. 531-9.
- Van Dommelen, A., V. Keijers, J. Vanderleyden, and M. de Zamaroczy, 1998, (Methyl)ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*.: J Bacteriol, v. 180, p. 2652-9.
- Van Dommelen, A., S. Spaepen, and J. Vanderleyden, 2009, Identification of the glutamine synthetase adenylyltransferase of *Azospirillum brasilense*.: Res Microbiol, v. 160, p. 205-12.
- Zou, X., Y. Zhu, E. L. Pohlmann, J. Li, Y. Zhang, and G. P. Roberts, 2008, Identification and functional characterization of NifA variants that are independent of GlnB activation in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*.: Microbiology, v. 154, p. 2689-99.

FIGURAS

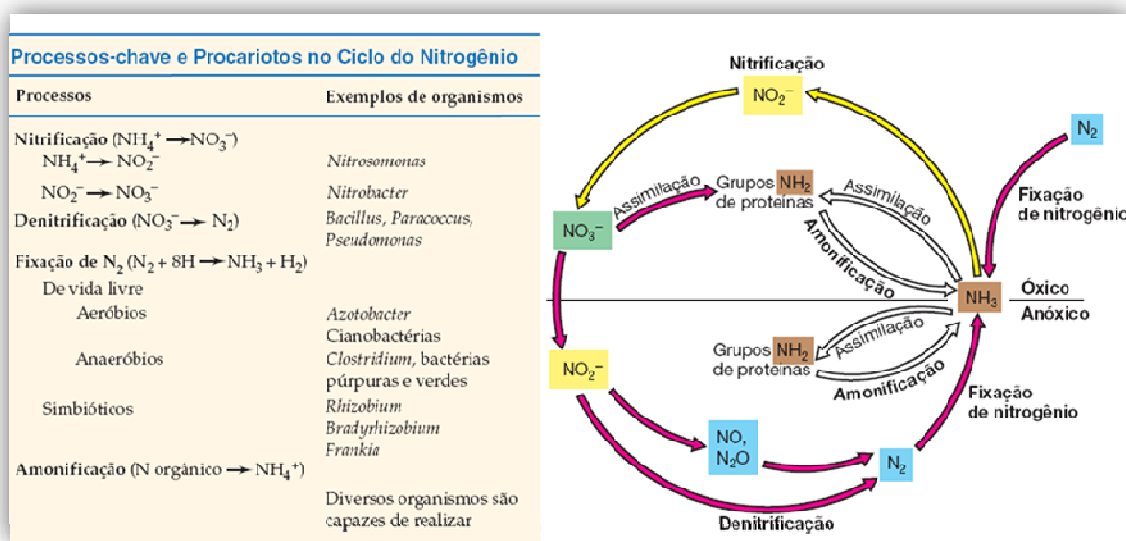


Figura 1: Ciclo de redox do nitrogênio.

As reações de oxidação são indicadas pelas setas amarelas e as de redução pelas setas vermelhas. (Adaptado de (Madigam et al., 2004))

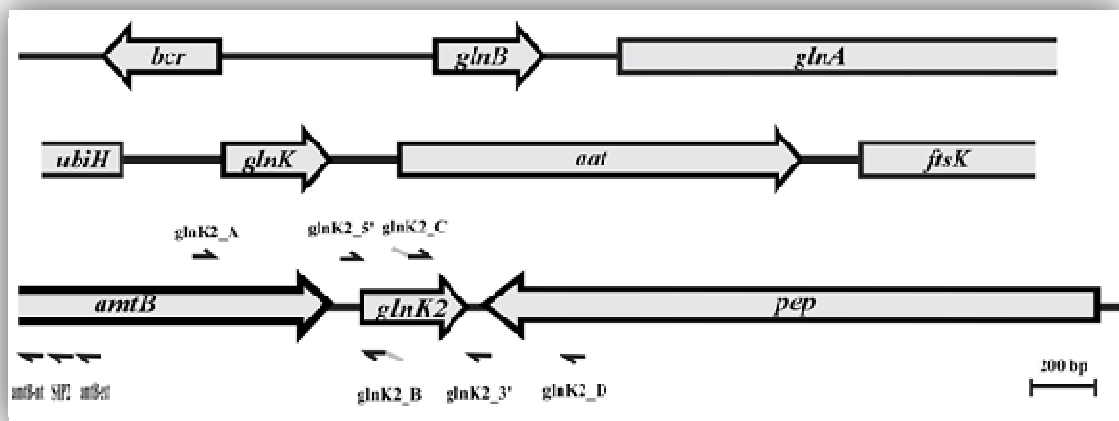


Figura 2: Mapa gênico das proteínas PII.

Contexto dos genes que codificam para PII em *A. amazonense* e local de anelamento dos primers sintetizados (setas localizadas abaixo dos genes) para as técnicas de isolamento do provável operon *amtB/glnK2* e as técnicas de construção do mutante com *glnK2* deletado.

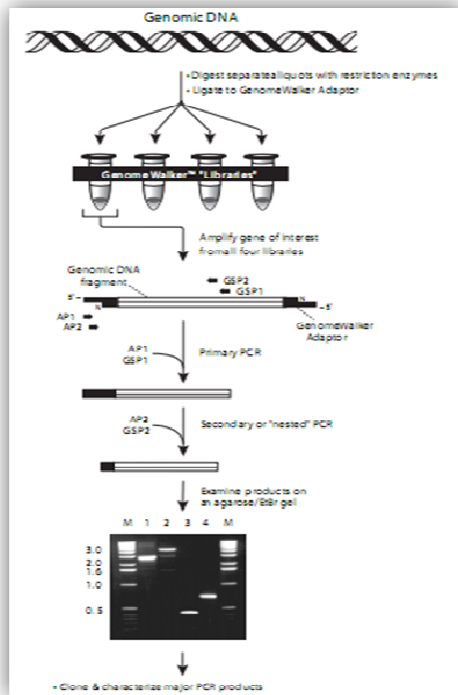


Figura 3: Esquema demonstrando as etapas da metodologia *Genome Walker*.

1-Construção de Bibliotecas por clivagens de DNA genômico; 2- Ligação de adaptadores; 3- PCR1° com bibliotecas; 4- PCR2° com produto do PCR1° diluído; 5- Clonagem e sequenciamento dos produtos do PCR2°.

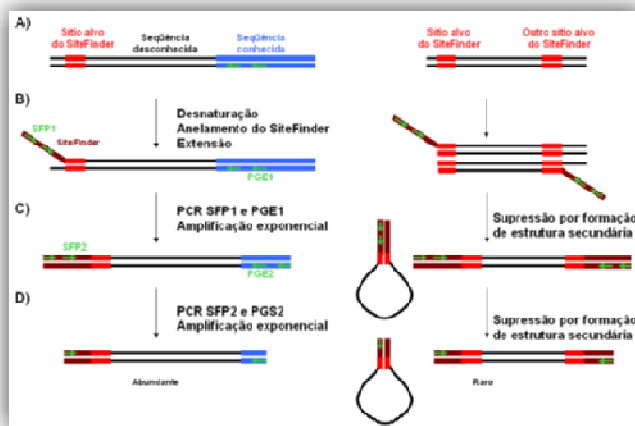


Figura 4: Representação da técnica *Site Finding*.

A e B- O *Sitefinder* permite a incorporação de sítios conhecidos (marrom e vermelho) às imediações do gene de interesse;

C- Reação de amplificação utilizando o *primer* externo (SPF1) que se anela ao *Sitefinder* e outro que se anela ao gene de interesse (PGE1);

D- *Nested-PCR* utilizando o *primer* interno (SPF2) que se anela ao *Sitefinder* e um *primer* gene-específico interno (PGE2);

Direita – amplificação inespecífica:

As sequencias não alvo formam grampos e são amplificadas raramente.

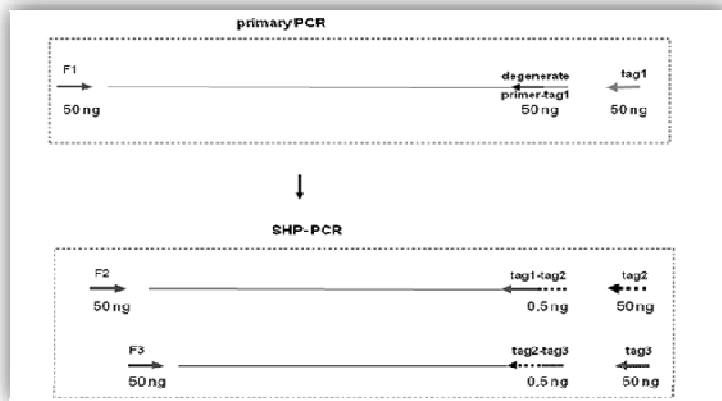


Figura 5: Ilustração das etapas do método *Sequential Hybrid Primer*.

A PCR primária envolve um *primer* degenerado *reverse* para a caminhada cromossômica. Os *primers* híbridos estão em baixa Concentração e tem uma sequência marca da rodada anterior na sua porção 3' e uma sequência única na porção 5'. F1, F2, e F3 representam os *primers* gene-específicos *forward* utilizados em cada rodada.

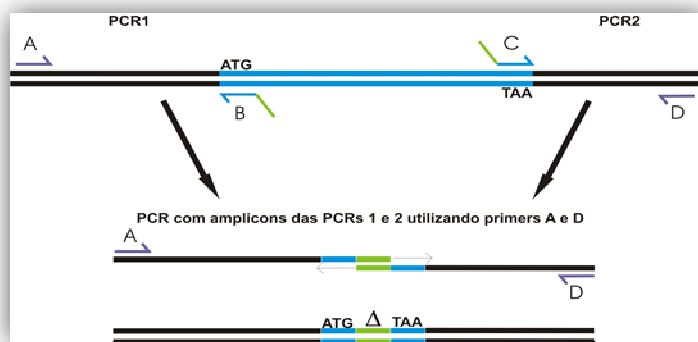


Figura 6: Esquema ilustrando da técnica de *Cross-over PCR*.

PCR1 e PCR2 representam a amplificação das regiões adjacentes ao gene a ser deletado. Subsequentemente, os produtos dessas reações são unidos por uma terceira reação de amplificação, que utiliza os *primers* mais externos. Azul – gene a ser deletado; verde – região de sobreposição

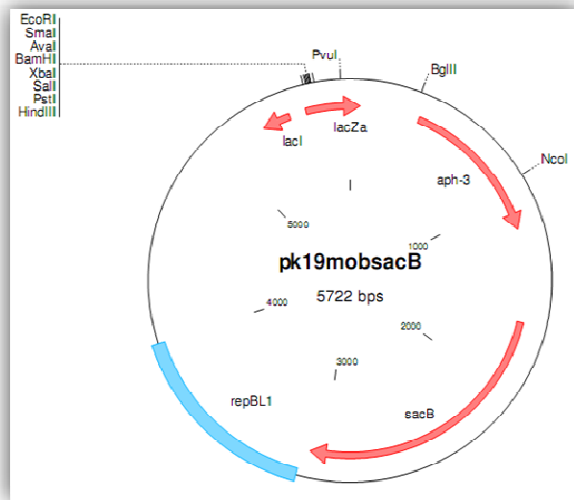


Figura 7: Mapa do vetor suicida pK19mobsacB.

Uma seleção positiva pode ser feita pela resistência conferida à bactéria portadora ao antibiótico canamicina e uma seleção negativa pode ser feita pelo gene *sacB* que confere sensibilidade a sacarose (codifica para uma enzima letal na presença deste açúcar).



Figura 8: Alinhamento das proteínas PII de *A. amazonense*.

Os * mostram as regiões idênticas e a seta indica a tirosina da posição 51, possível local de modificação (uridilação) pela proteína GlnD.

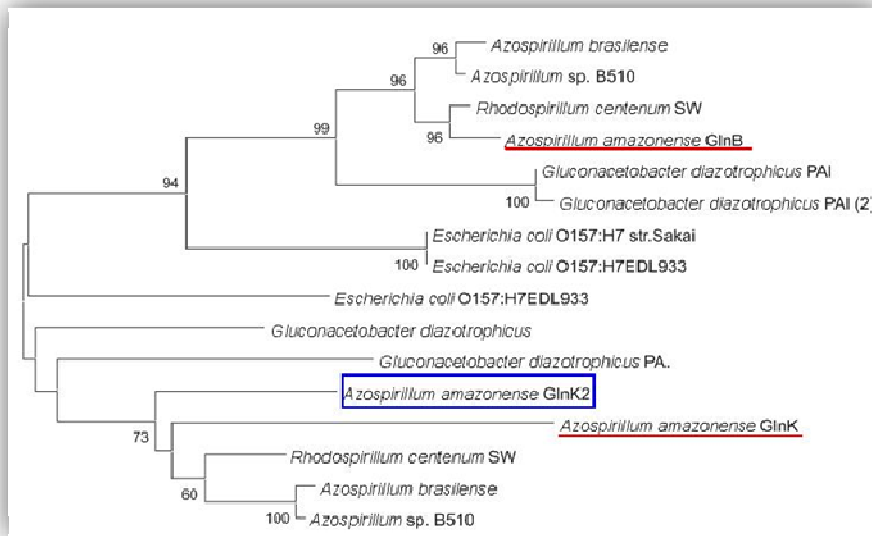


Figura 9: Árvore filogenética de proteínas PII de membros da subclasse α -Proteobacteria.

O método *Neighbor-Joining* (MEGA4) evidencia que as proteínas GlnK e GlnK2 pertencem ao mesmo clado. Os valores de *bootstap* (1000 replicatas) estão representados no nó de cada ramo.

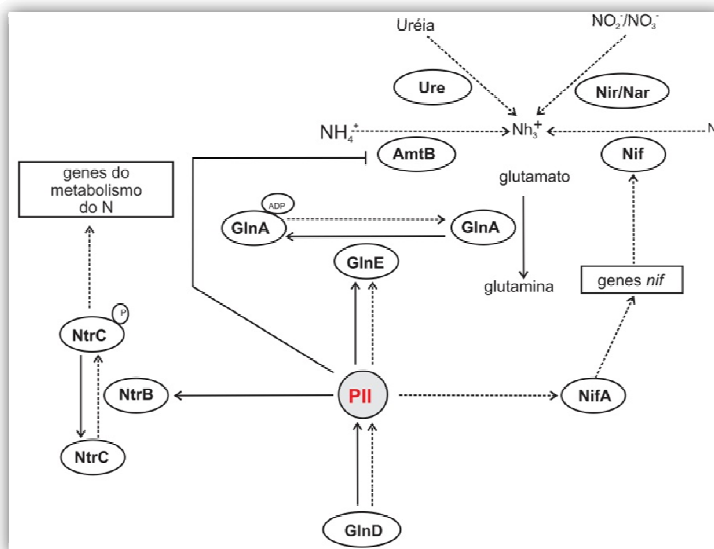


Figura 10: Modelo proposto da cascata regulatória do metabolismo do nitrogênio para *A. amazonense*.

É possível observar o papel central das proteínas PII e seus principais alvos de interação. As **linhas contínuas** representam suficiência de nitrogênio e **linhas pontilhadas**, falta de nitrogênio. Pontas em **seta** indicam estímulo e pontas em **traço**, bloqueio.



Figura 11: PCR *Genome Walker* secundário.

Produto de PCR com biblioteca *StuI* em gel de agarose 1,2% corado com Brometo de Etídio. Marcado de peso molecular: LADDER 100 pb (*Ludwig Cbiot*).

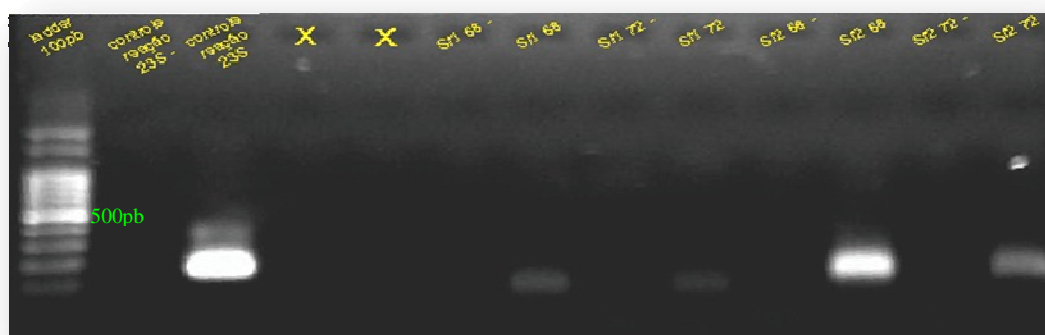


Figura 12: PCR *SiteFinding* secundário.

Produto de PCR em gel de agarose 1,2% corado com Brometo de Etídio demonstrando amplificação específica abundante de 200 pb com o *sitefinder2* e temperatura de 68°C de extensão da enzima, reação selecionada para purificação e clonagem.

Sf1: *sitefinder1*; **Sf2:** *sitefinder2*; **68:** 68°C de extensão; **72:** 72°C de extensão; **X:** canaletas inválidas. Marcador: LADDER 100 pb.

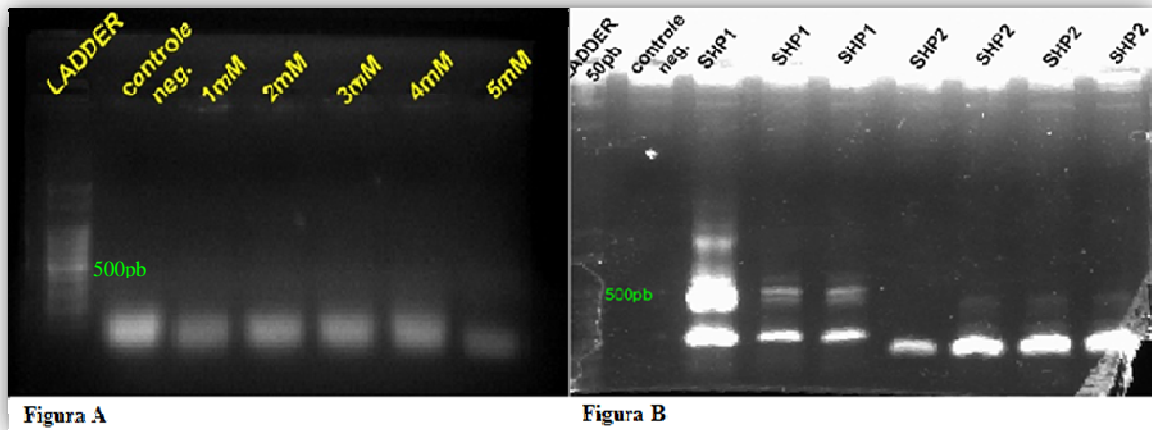


Figura 13: PCRs *Sequential Hybrid Primer*.

Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídio. **Figura A:** Produto de PCR primário demonstrando t nue consumo de *primers* em 1mM de MgCl₂ , condi o selecionada para template das PCRs seguintes. **Figura B:** Produto de PCR 1 e 2 demonstrando amplia es de 200, 300, 500 e 1000 pb. Marcador: LADDER 100 pb e 50pb.

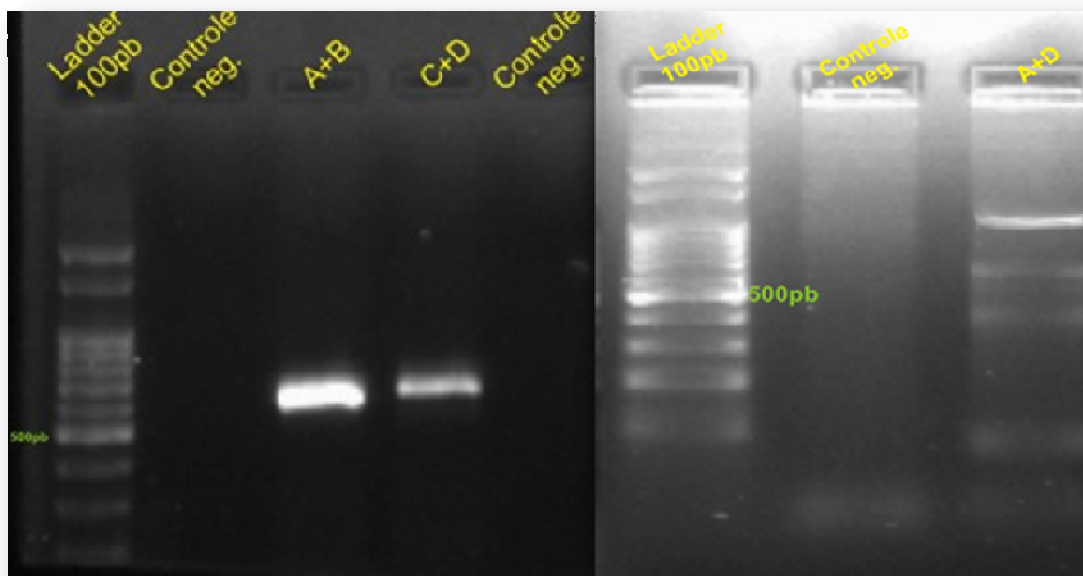


Figura 14: PCRs *Cros-over*.

Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Et dio. (ESQUERDA) Produto do CO-PCR 1 e 2 demonstrando amplia o das sequencias adjacentes ao gene a ser deletado: A+B e C+D. (DIREITA) Produto do CO-PCR 3 demonstrando sequencias adjacentes unidas numa nova amplia o (A+D).

TABELAS

Tabela I. Linhagens bacterianas e plasmídeos usados neste estudo.

Linhagem	Genótipo	Referência
<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)].	Stratagene TM
<i>Azospirillum amazonense</i> Y2 (ATCC 35120)	Selvagem	EMBRAPA-CNPAB

Plasmídeo	Descrição	Referência
pUC18	Amp ^r	(Sambrook and Russell, 2001)
pk19mobsacB	Amp ^r , Sac ^s , suicida	(Eggeling and Bott, 2005b)

Tabela II. Lista de primers utilizados neste trabalho.

Nome	Sequência	Tm* (°C)
<i>amtB-GW-ext</i> (SP1)	5' GGA GAA GGC CAG GCT GTA TT 3'	57.0
<i>amtB-GW-int</i> (SP2)	5' ATG GTC ATC ATC AGC ACC AG 3'	54.9
<i>AP1-GW</i>	5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'	59.0
<i>AP2-GW</i>	5' ACT ATA GGG CAC GCG TGG T 3'	71.0
<i>glnK2_A</i>	5' ATG AAT TCC CGT CGG TAT CAT CTG CTT 3'	59.9
<i>glnK2_B</i>	5' CC CAT CCA CTA AAC TTA AAC AAT CCA GCT TGA AGG GTT TGA T 3'	64.2
<i>glnK2_C</i>	5' TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG CTG GAA CTG GCG CAA 3'	66.3
<i>glnK2_D</i>	5' TTA AGC TTG ACA TCA ACC AGG GCT TC 3'	59.3
<i>glnK2_5</i>	5' CAA TCA GGG AGT GGT CTG 3'	52.4
<i>glnK2_3</i>	5' TCT CCT TCA ACC TGT CCG 3'	53.9
<i>SFP1</i>	5' CAC GAC ACG CTA CTC AAC AC 3'	48.7
<i>SFP2</i>	5' ACT CAA CAC ACC ACC TCG CAC AGC 3'	62.1
<i>Tag1</i>	5' TCAT GCT AGG ATC CAA GG 3'	51
<i>GWc</i>	5' TGC TAG GAT CCA AGG NNN NNC TTC G 3'	61.3
<i>GWg</i>	5' TGC TAG GAT CCA AGG NNN NNG TTC G 3'	61.4
<i>Tag2</i>	5' GCA GTT CAT GGT CCC GTC ATC C 3'	60.3
<i>HTag12</i>	5' GCA GTT CAT GGT CCC GTC ATC CTC ATG CTA GGA TCC AAG G 3'	68.2
<i>SHP2</i>	5' GAT GGC AAA GCT CTG CAT CAC C 3'	58.9
<i>Tag3</i>	5' AAA GAA GAG TCG CAG AGG CTC G 3'	59.1
<i>HTag23</i>	5' AAA GAA GAG TCG CAG AGG CTC GGC AGT TCA TGG TCC CGT CAT CC 3'	70.9

* **Tm**: Temperatura de desnaturação teórica calculada a partir do programa Vector NTI Advance 10.3.0 (Invitrogen). Os primers foram adquiridos da XX IDT (Integrate DNA Technologies).

Tabela III. Protocolo adaptado da técnica *Genome Walker*.

PCR primário (25 µl)			
Reagentes		Concentração utilizada	
H ₂ O MiliQ		completar para 24 µl	
dNTP		200 µM	
tampão Gold Taq DNA polimerase (Invitrogen)		1 x	
MgCl ₂		1 µM	
<i>GWAP1</i>		30 pmol	
<i>amtB-ext</i>		30 pmol	
Gold Taq DNA polimerase (Invitrogen)		1 U	
Bibliotecas genômicas 1:10		100 ng	
Nestred PCR (25 µl)			
Reagentes		Concentração utilizada	
H ₂ O MiliQ		completar para 24 µl	
dNTP		200 µM	
tampão Gold Taq DNA polimerase (Invitrogen)		1 x	
MgCl ₂		1 µM	
<i>GWAP1</i>		30 pmol	
<i>amtB-int</i>		30 pmol	
DMSO		10 %	
Gold Taq DNA polimerase (Invitrogen)		1 U	
Produto PCR primário 1:10		1 µl	
Condições de reação			
Nº ciclos	Ciclo	Temperatura	Tempo
1	desnaturação inicial	94°C	01 min
30 (PCR1°) e 35 (<i>Nestred</i> PCR)	desnaturação	94°C	30 seg
	anelamento	50°C	30 seg
	extensão	72°C	03 min
1	extensão final	72°C	10 min

Tabela IV. Protocolo adaptado da técnica *SiteFinding*.

1) SiteFinding (20 μ l) - Incorporação de oligonucleotídeos no genoma.

Reagentes	Concentração utilizada
H ₂ O MiliQ	com pletar para 19 μ l
dNTP	200 μ M
tampão Taq DNA polimerase (Cbiot)	1x
<i>SiteFinder 1 ou 2</i>	10 pmol
DMSO	5 %
Taq DNA polimerase (Cbiot)	1 U
DNA genômico	50 ng

2) Nested PCR

2A) Primário (25 μ l) - Adição dos *primers* (colocar no tubo anterior:).

Reagentes	Concentração utilizada
água Mili-Q	completar para 5 μ l
<i>SFP1</i>	50 pmol
<i>amtB-ext</i>	10pmol

2B) Secundário (50 μ l) - *Nested* propriamente dito.

Reagentes	Concentração utilizada
água Mili-Q	completar para 49 μ l
dNTP	200 μ M
tampão Gold Taq DNA polimerase	1 x
<i>SFP2</i>	50 pmol
<i>amtB-int</i>	50 pmol
Taq DNA polimerase (Cbiot)	1 U
produto de PCR primário	1 μ l

Condições de reação

Reação	Nº ciclos	Condições Térmicas
SiteFinding	1	92°C (2 min) 95°C (1 min) 25°C (1 min) escalar para 68°C por 3 min, 68°C (10 min)
Primário	1	94°C (1min)
e	30	95°C (10 seg), 50°C (30 seg), 68°C (6 min)
Secundário	1	68°C (5 min)

**Tabela V. Protocolo adaptado da técnica *Sequential Hybrid Primer*.
PCR primário (25 µl)**

Reagentes	Concentração utilizada
H2O	completar para 24 µl
dNTP	300 µlM
tampão Gold Taq DNA polimerase (Invitrogen)	1 x
MgCl2	1 mM
<i>p. Gene-esp. Ext (amtB-ext)</i>	10 pmol (aprox 50 ng)
<i>p. degenerado (GWC ou GWG)</i>	10 pmol (aprox 50 ng)
<i>Tag1</i>	10 pmol (aprox 50 ng)
Gold Taq DNA polimerase (Invitrogen)	1 U
DNA genômico	50 ng

SHP1°-PCR (25 µl)	
Reagentes	Concentração utilizada
H2O	completar para 24 µl
dNTP	300 µlM
tampão Gold Taq DNA polimerase (Invitrogen)	1 x
MgCl2	1 mM
<i>p. Gene-esp. Int (SHP2)</i>	10 pmol (aprox 50 ng)
<i>p. H.rev (Htag12)</i>	0,1 pmol (aprox 0,5 ng)
<i>Tag2</i>	10 pmol (aprox 50 ng)
Taq DNA polimerase (Cbiot)	1 U
produto PCR primário 1:10	1 µl

SHP2°-PCR (25 µl)	
Reagentes	Concentração utilizada
H2O	completar para 24 µl
dNTP	300 µlM
tampão Gold Taq DNA polimerase (Invitrogen)	1 x
MgCl2	1 mM
<i>p. Gene-esp. Int (amtB-int)</i>	10 pmol (aprox 50 ng)
<i>p. H.rev (Htag23)</i>	0,1 pmol (aprox 0,5 ng)
<i>Tag3</i>	10 pmol (aprox 50 ng)
Taq DNA polimerase (Cbiot)	1 U
produto de PCR1° 1:10	1 µl

Condições de reação PCR primário			
Nº ciclos	Ciclo	Temperatura	Tempo
1	desnaturação inicial	94°C	3 min
5	desnaturação	94°C	30 seg
	anelamento	35°C	1 min
	extensão	72°C	1 min 30 seg
45	desnaturação	94°C	30 seg
	anelamento	50°C	3 min
	extensão	72°C	1 min 30 seg
1	extensão final	72°C	10 min

SHP1°e SHP2°			
Nº ciclos	Ciclo	Temperatura	Tempo
1	desnaturação inicial	94°C	3 min
50 (SHP1°) e 35 (SHP2°)	desnaturação	94°C	30 seg
	anelamento	50°C	1 min
	extensão	72°C	1 min 30 seg
1	extensão final	72°C	10 min

Tabela VI. Protocolo da técnica *Cross-over PCR*.**PCR 1 e 2**

Reagentes	Concentração utilizada
H ₂ O MilliQ	completar para 24 µl
dNTP	200 µM
tampão Gold Taq DNA polimerase (Invitrogen)	1 x
primer A ou C	30 pmol
primer B ou D	30 pmol
Gold Taq DNA polimerase (Invitrogen)	1 U
DNA genômico	50 ng

PCR 3

Reagentes	Concentração utilizada
H ₂ O MilliQ	completar para 24 µl
dNTP	200 µM
tampão Gold Taq DNA polimerase (Invitrogen)	1 x
primer A ou C	30 pmol
primer B ou D	30 pmol
Gold Taq DNA polimerase (Invitrogen)	1 U
PCR 1 e PCR 2	10 ng de cada reação

Condições de reação

Nº ciclos	Ciclo	Temperatura	Tempo
1	desnaturação inicial	94°C	01 min
35	desnaturação	94°C	30 seg
	anelamento	55°C	30 seg
	extensão	72°C	30 seg
1	extensão final	72°C	10 min

Tabela VI. Tabela de similaridade/identidade das proteínas PII de *A. amazonense*.

	GlnK2	GlnB	GlnK
GlnK2		64.3	69.6
GlnB	82.1		59.8
GlnK	85.7	79.5	

Gerada pelo Software *MatGAT* (Campanella et al., 2003)

Tabela VIII. Proteínas PII e seus possíveis alvos de interação em *A. amazonense*.

	Similaridade	Identidade	Cobertura	Valor	Gene	Organismo
GlnB	100%	100%	100%	5e ⁻²⁶	<i>glnB</i>	<i>Azospirillum</i> sp. B510
GlnK	100%	100%	100%	6e ⁻⁴¹	<i>glnK</i>	<i>Azospirillum</i> sp. B510
GlnK2	94%	84%	100%	5e ⁻⁴⁸	<i>glnK2</i>	<i>Rhodospirillum centenum</i> SW
AmtB2	84%	72%	99%	5e ⁻¹⁷²	<i>amtB2</i>	<i>Azospirillum</i> sp. B510
AmtB	84%	73%	95%	4e ⁻¹⁷⁴	<i>amtB</i>	<i>Azospirillum</i> sp. B510
GlnE	78%	68%	98%	0.0	<i>glnE</i>	<i>Rhodospirillum centenum</i> SW
GlnD	82%	70%	90%	0.0	<i>glnD</i>	<i>Rhodospirillum centenum</i> SW
NifA	75%	62%	93%	0.0	<i>nifA</i>	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b
NtrB	91%	80%	93%	2e ⁻¹⁶³	<i>ntrB</i>	<i>Rhodospirillum centenum</i> SW
NtrC	94%	87%	99%	0.0	<i>ntrC</i>	<i>Rhodospirillum centenum</i> SW

Resultados gerados por blastp (Gene Bank).