

INTRODUÇÃO

Fertilizantes industriais utilizados indiscriminadamente apresentam consequências adversas ao ambiente. A bactéria diazotrófica de solo *Azospirillum amazonense* possui a capacidade de promover o crescimento de plantas de importância econômica como o arroz, podendo ser, portanto, uma alternativa aos fertilizantes industriais, assim desenvolvendo uma agricultura sustentável.

As proteínas PII compõem uma superfamília de proteínas de sinal envolvidas no metabolismo do nitrogênio. Estas pequenas proteínas são altamente conservadas e amplamente distribuídas em procariotos. Nosso grupo de estudo isolou e caracterizou dois genes de *A. amazonense* que tipicamente aparece em microorganismos filogeneticamente próximos. No entanto, devido ao projeto recente de sequenciamento do genoma dessa bactéria, descobriu-se um terceiro gene com esta mesma função, denominado *glnK2* (FIG. 2, 3 e 4), que se localiza a jusante do gene *amtB* (que codifica para um transportador de amônio) (FIG. 3). Contudo, parte do gene *amtB*, bem como a região regulatória desse provável operon não foram contempladas na montagem dos *contigs*.

O objetivo 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.

METODOLOGIA

Para o isolamento da região promotora pela técnica de *Sitefinding*, foram projetados dois *primers* (FIG. 1) específicos direcionados para a região 5' do gene *amtB*. O produto de PCR será sequenciado utilizando o *kit* Dynamic et dye terminator cycle sequencing (Amersham Biosciences) seguindo as instruções do fabricante. O pacote de programas *Staden* será utilizado para processar os resultados do sequenciamento.

A técnica de *Cross-over PCR* (FIG. 3 e 5) permite a deleção de pequenas regiões no gene de interesse. Foram projetados dois pares de *primers* para amplificação das regiões adjacentes ao gene *glnK2*. Os produtos dessas reações são posteriormente unidos por PCR, gerando uma deleção no interior do gene. O produto final dessa reação será clonado no vetor suicida pK19MOBSACB, que permitirá a substituição alélica do gene selvagem.

RESULTADOS

Isolamento da região promotora:

Foi obtido um fragmento de 200pb (FIG.6) que encontra-se em fase de sequenciamento.

Um fragmento de 500 pb foi obtido utilizando uma outra técnica de caminhada cromossômica chamada *Genome Walker* que também permite acessar regiões desconhecidas adjacentes a regiões conhecidas, porém, após o sequenciamento, o Software tBlastx (GeneBank) não reconheceu este fragmento como *amtB*, sugerindo uma amplificação inespecífica.

Construção de mutante não-polar e em fase:

O produto do *Crossover PCR* foi obtido (FIG. 7 e 8) e encontra-se em fase de clonagem no vetor pK19MOBSACB.

PERSPECTIVAS

Fazer análise *in silico* da região regulatória do *operon* utilizando matrizes de peso para elementos cis-atuantes típicos de resposta a privação de nitrogênio como NtrC e sigma 54;

Avaliar a expressão do gene *glnK2* e do gene *amtB* por *Real-Time PCR*;

Clonar e transferir o fragmento amplificado por *Cross-over PCR* em *A. amazonense* para que o gene mutante substitua o gene selvagem e seu fenótipo seja caracterizado.

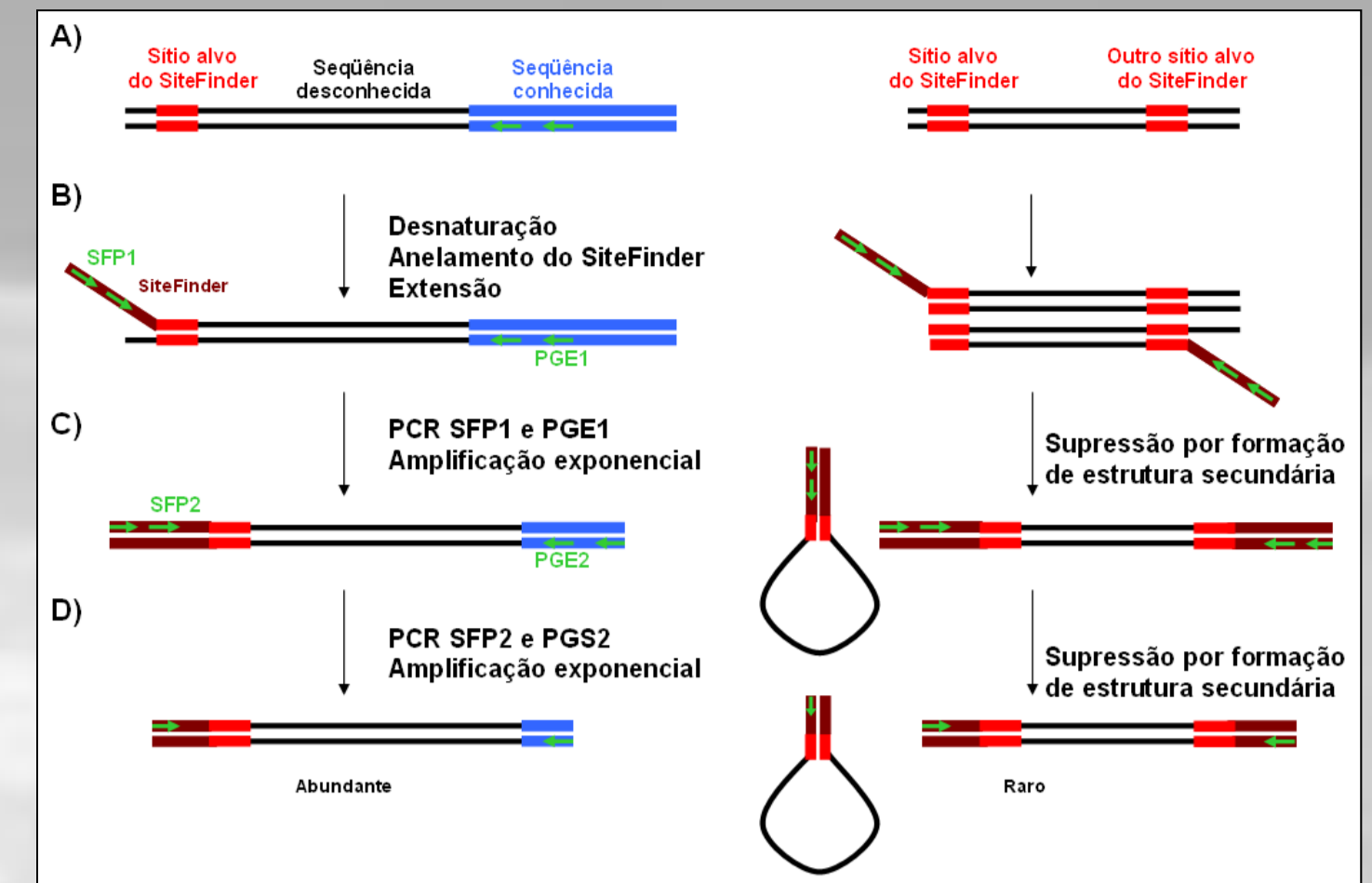


FIG. 1: Representação da técnica de *SiteFinding-PCR*.

Esquerda - amplificação de interesse:

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 (SFP1) que se anela ao *Sitefinder* e outro que se anela ao gene de interesse (PGE1);

D- *Nested-PCR* utilizando o *primer* interno (SFP2) que se anela ao *Sitefinder* e um *primer* gene-específico interno (PGE2);

Direita - amplificação inespecífica:

As sequências não alvo formam grampões e são amplificadas raramente.

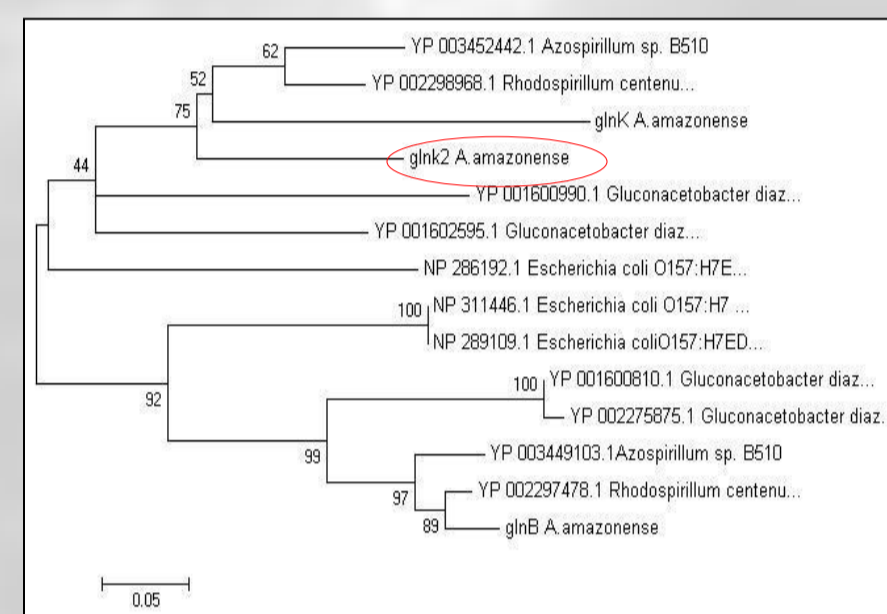


FIG. 2: Árvore filogenética de proteínas PII de membros da subclasse α -Proteobacteria.

A reconstrução filogenética realizada pelo método de *Neighbor-Joining* demonstra que as proteínas GlnK e GlnK2 ficam no mesmo clado, indicando uma duplicação mais recente em relação à duplicação GlnB-GlnK. Os valores de *bootstrap* estão indicados no nó de cada ramo,

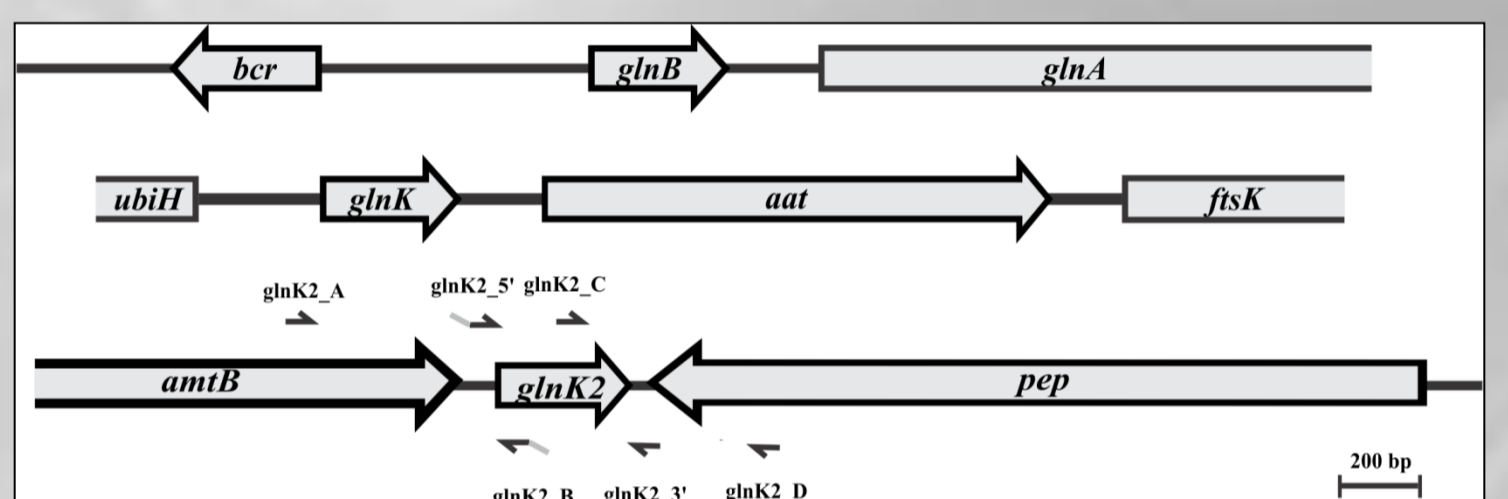


FIG. 3: Mapa gênico dos genes que codificam para proteínas PII.

Contexto dos genes que codificam para proteínas PII em *A. amazonense* e local de anelamento dos *primers* sintetizados para a técnica de *Crossover PCR*.

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

FIG. 4: Tabela de similaridade/identidade das proteínas PII de *A. amazonense*.

Amarelo - similaridade Verde - identidade.

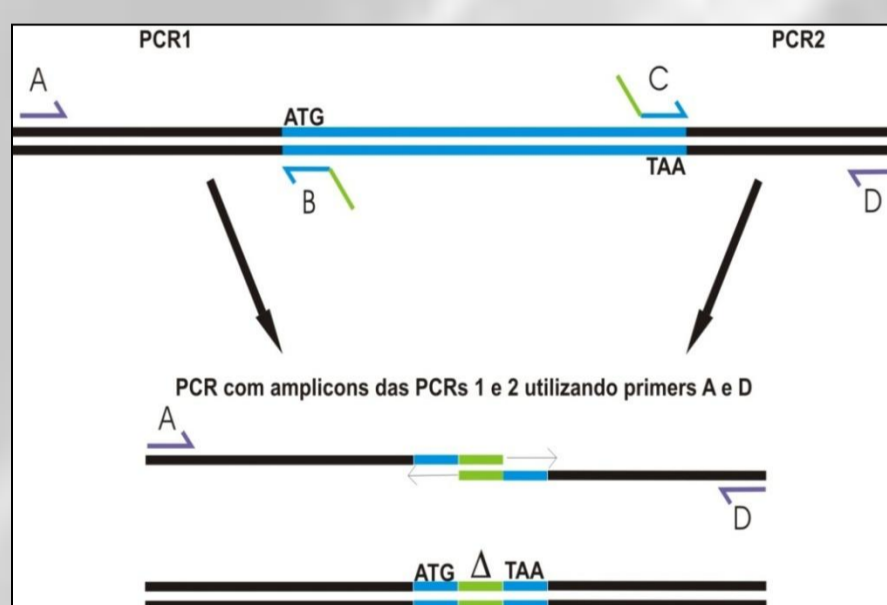


FIG. 5: Representação da técnica de *Crossover PCR*.

PCR1 e PCR2 representam a amplificação das regiões adjacentes ao gene a ser deletado. Em seguida, 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.



FIG. 6: Produto do PCR-SF em gel de agarose 1,2% corado com Brometo de Etídio demonstrando amplificação específica de 200pb em diversas condições testadas.

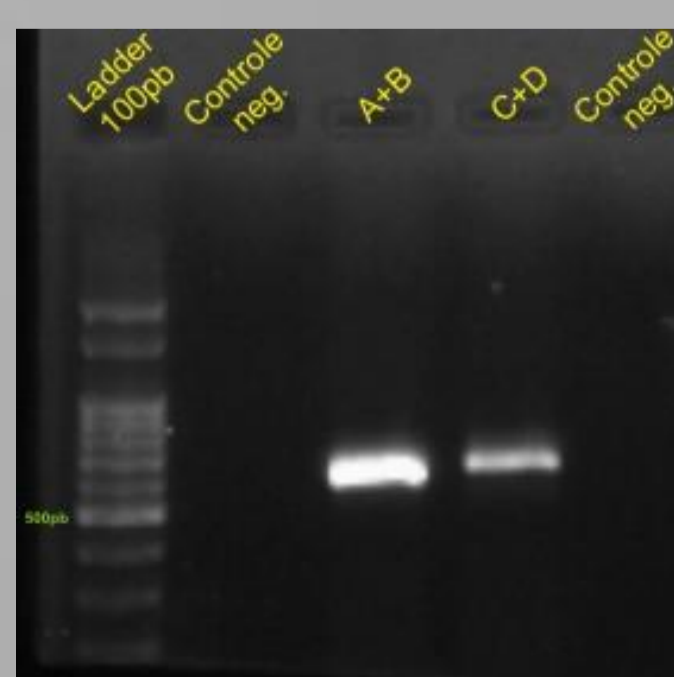


FIG. 7: Produto do CO-PCR1 em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídio demonstrando amplificação das sequências adjacentes ao gene a ser deletado (A+B e C+D).

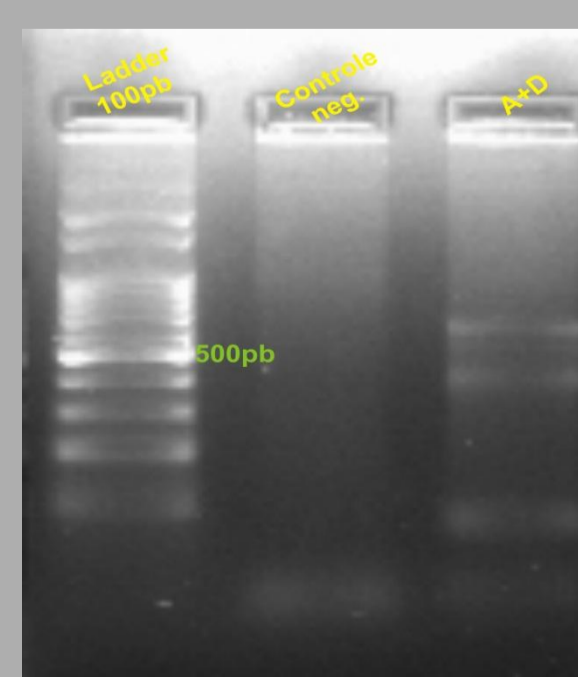


FIG. 8: Produto do CO-PCR1 em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídio demonstrando sequências adjacentes unidas numa nova amplificação (A+D).